

# 博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成26年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

# 目 次

平成 26 年度

| (学位記番号)    | (氏 名)   | (論 文 題 目)   | (頁) |
|------------|---------|---|-----|
| 博(医)甲第503号 | 三宅 隆 広  | Carotid blood flow, cardiovascular and endocrine responses during head-up tilt in patients with acute cerebrovascular diseases<br>(急性期脳血管障害者における起立時循環・内分泌応答) ……………  | 1   |
| 博(医)甲第504号 | 孫 玉 静   | Elevated serum 1,25(OH) <sub>2</sub> -vitamin D <sub>3</sub> level attenuates renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in <i>kl/kl</i> mice<br>(血清中活性型ビタミンDの上昇はクロソーマウスにおける片側尿管結紮により誘導される腎尿細管間質線維を減弱させる) …………… | 4   |
| 博(医)甲第505号 | 後藤 理恵子  | Screening of Specific Proteins Involved in Breast Cancer Metastasis by 2D-LC-ESI-MS/MS<br>(2D-LC-ESI-MS/MSによる転移乳癌特異的蛋白質の探索) ……………   | 6   |
| 博(医)甲第506号 | 横井 賀津志  | Short stick exercises for fall prevention among older adults: a cluster randomized trial<br>(高齢者における転倒予防のための棒体操：クラスターランダム化試験) ……………   | 8   |
| 博(医)甲第507号 | 寺 口 郁 子 | Acute-Phase Glucose Fluctuation Is Negatively Correlated With Myocardial Salvage After Acute Myocardial Infarction<br>— Involvement of Monocyte Subsets —<br>(急性心筋梗塞において、急性期の血糖変動は単球を介して心筋救済率に悪影響を及ぼす) ……………                                      | 11  |
| 博(医)甲第508号 | 山 下 泰 伸 | Nrf2-Inducing Anti-Oxidation Stress Response in the Rat Liver-New Beneficial Effect of Lansoprazole<br>(ランソプラゾールの新規薬効：肝臓における転写因子 Nrf2 の誘導と抗酸化ストレス作用効果の検討) ……………   | 14  |
| 博(医)甲第509号 | 谷 崎 優 子 | Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment<br>(インドールアミン 2,3-ジオキシナーゼは免疫抑制環境を誘導して卵巣癌腹膜播種を促進する) ……………   | 17  |

|            |        |   |    |
|------------|--------|---|----|
| 博(医)甲第510号 | 下角 あい子 | Smad3 plays an inhibitory role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification<br>(Smad3 は血管平滑筋細胞のリン誘導性石灰化を抑制する) ……………   | 19 |
| 博(医)甲第511号 | 王 叶 楠  | Forensic Potential of MMPs and CC Chemokines for Wound Age Determination<br>(皮膚創傷治癒過程における法医学の創傷時間にMMPとケモカインの意義と予測する可能性) ……  | 22 |
| 博(医)甲第512号 | 山田 信一  | Microstructural abnormalities in anterior callosal fibers and their relationship with cognitive function in major depressive disorder and bipolar disorder: A tract-specific analysis study<br>(うつ病と双極性障害における脳梁前部の白質神経線維の微細構造異常と認知機能障害の関連: tract-specific analysis 研究) ……………  | 25 |
| 博(医)甲第513号 | 上出 三起子 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clinical evaluation of glycolic acid chemical peeling in patients with acne vulgaris: a randomized, double-blind, placebo-controlled, split-face comparative study</li> <li>• Persistent effects of adapalene gel after chemical peeling with glycolic acid in patients with acne vulgaris</li> </ul> (尋常性ざ瘡患者に対するグリコール酸ケミカルピーリングの有効性に関する研究) …………… | 27 |
| 博(医)甲第514号 | 金井 一修  | Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells<br>(タバコ煙の気道上皮におけるTLR3-EGFR経路を介したMUC5AC産生増強に関する検討) ……………   | 30 |
| 博(医)甲第515号 | 佐々木有見子 | Weight loss intervention reduces the risk of kidney stone formation in a rat model of metabolic syndrome<br>(肥満の予防/改善が尿路結石形成リスクに及ぼす影響についての検討) ……………   | 33 |
| 博(医)甲第516号 | 小池 有美  | Cilnidipine but not amlodipine suppresses sympathetic activation elicited by isometric exercise in hypertensive patients<br>(等尺性運動による自律神経活動の変化に及ぼすカルシウム拮抗薬の影響～瞳孔機能計を用いた自律神経機能評価による検討～) ……………  | 35 |

|            |        |   |    |
|------------|--------|---|----|
| 博(医)乙第908号 | 三木 康弘  | Prevalence and Characterization of Enterotoxin Gene-Carrying <i>Clostridium perfringens</i> Isolates from Retail Meat Products in Japan.<br>(市販肉製品におけるウェルシュ菌の汚染状況に関する研究) ……………  | 38 |
| 博(医)乙第909号 | 石黒 真理子 | Evaluation of the quality of life of lupus erythematosus patients with cutaneous lesions in Japan<br>(日本における皮膚病変を有するループス関連疾患患者の QOL に対する検討) ……………   | 41 |
| 博(医)乙第910号 | 金子 郁子  | Detection of Enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> in Meat Samples by Using Molecular Methods<br>(分子生物学的手法を用いた食肉中の腸管病原性 <i>Clostridium Perfringens</i> の検出) ……………  | 44 |
| 博(医)乙第911号 | 桐山 茂久  | CEACAM1 Long Cytoplasmic Domain Isoform is Associated with Invasion and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma<br>(CEACAM1 細胞内ドメイン long isoform と肝細胞癌の浸潤・転移に関連する検討) ……………   | 47 |
| 博(医)乙第912号 | 中田 元子  | Diabetes mellitus suppresses hemodialysis-induced increases in tear fluid secretion<br>(糖尿病は、血液透析後に生じる涙液分泌の増加を抑制する) ……………   | 50 |
| 博(医)乙第913号 | 西畑 雅也  | Effect of Kampo extracts on urinary stone formation: An experimental investigation<br>(尿路結石症に対する漢方治療についての基礎的検討) ……………   | 53 |
| 博(医)乙第914号 | 吉村 祥子  | Identification of an HLA-A2-Restricted Epitope Peptide Derived from Hypoxia-Inducible Protein 2 (HIG2)<br>(低酸素誘導タンパク質 2 (HIG2) 由来 HLA-A2 拘束性エピトープペプチドの同定) ……………   | 55 |
| 博(医)乙第915号 | 前田 真也  | Roles of the <i>ALDH2</i> and <i>ADH1B</i> Genotypes on the Association Between Alcohol Intake and Serum Adiponectin Levels Among Japanese Male Workers<br>(職域男性における <i>ALDH2</i> , <i>ADH1B</i> 遺伝子型と飲酒、血清アディポネクチン値との関連) …………… | 57 |

|            |       |  |    |
|------------|-------|--|----|
| 博(医)乙第916号 | 北野 尚美 | Epidemiologic features and prognostic factors of coronary artery lesions associated with Kawasaki disease based on a 13-year cohort of consecutive cases identified by complete enumeration surveys in Wakayama, Japan<br>(川崎病の疫学的特徴と冠動脈障害の予測因子—和歌山県における13年間の悉皆的調査から)…………… | 60 |
|------------|-------|--|----|

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第503号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成26年7月8日  |          |          |
| 氏名      | 三宅 隆広  |          |          |
| 学位論文の題目 | Carotid blood flow, cardiovascular and endocrine responses during head-up tilt in patients with acute cerebrovascular diseases<br>(急性期脳血管障害者における起立時循環・内分泌応答) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 前田 正信 |          |
|         | 副査   | 教授 加藤 正哉 | 教授 田島 文博 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

ヒトにおいて、血圧変化は、頸動脈洞と大動脈弓の圧受容器によりモニターされている。臥位から立位になった時、重力の影響により下肢への血液移動による静脈環流量の減少が生じ、心拍出量の低下が惹起される。その結果、血圧低下が生じ、頸動脈洞と大動脈弓から抑制性の入力に延髄の孤束核に伝えられる。孤束核への抑制性の入力は延髄の疑核に伝わり迷走神経（副交感神経）の活動を抑制する。さらに、孤束核への抑制性の入力は延髄の尾側腹外側部に伝えられ、尾側腹外側部において興奮性の刺激に変換され吻側腹外側部に伝えられる。延髄の吻側腹外側部からの興奮性の刺激は脊髄の中間外側核を介し、交感神経活動を亢進させる。このように延髄の神経核を介した中枢性調節機序により交感神経活動の亢進と副交感神経活動の抑制が起こり、起立時の血圧が維持されている。そのため、視床下部より上位の病変は起立時血圧調節に影響しないものと考えられてきた。しかし、Mizushima らの寒冷昇圧試験や Nakamura らの静的運動負荷時における視床下部より更に上位に障害を持つ脳血管障害者の筋交感神経活動の直接測定によって、大脳皮質、視床レベルの病変が延髄における循環調節に大きく影響を与えていることを証明している。また、起立耐性については Enishi らが慢性期の脳血管障害患者において血圧維持メカニズムの鈍化した反応として起立直後の血圧低下を報告している。

起立は発症早期の脳血管障害者のリハビリテーションでは、臨床的に最も重要な訓練方法である。ところが、その起立負荷に対する循環・内分泌応答や総頸動脈血流量は研究されていない。本研究は視床下部より上位の病変を持つ発症早期の脳血管障害者での起立負荷に対する循環・内分泌応答を明確にすることである。

### 【対象・方法】

脳血管障害者男性31名と年齢・身長・体重を合わせた循環器疾患・内分泌障害を有しない健常者男性21名を対象とした。

方法は、被験者に水平0度から90度まで起立可能な斜面台上で背臥位になってもらい、安静臥床を3分間、その後60度起立位へ変換後5分間保持した。そして水平位に戻し、回復期を3分間観察した。実験中、心拍数、一回心拍出量、心拍出量、総頸動脈血流量は連続して監視し、血圧は1分毎に測定した。アドレナリン、ノルアドレナリン、ADH、アルドステロン、PRAは安静臥床3分・起立5分・回復期3分の各時点を測定した。心拍数は、心電図のRR変化から、一回心拍出量はインピーダンス心拍出量計により高周波と低周波抵抗変化を測定し計算した。そして、総頸動脈血流量は、超音波装置を使用し、脳血管障害者では病変側頸部、健常者では右頸部より測定した。血圧測定は、すべての姿勢で上肢が心臓と同じ高さになるように固定し測定した。統計学的検討は分散分析を行い、有意差があると認めたものはフィッシャーのLSD検定を用いて多重比較を行った。有意水準5%未満を有意差有りとした。

なお、本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た上でを行い、全ての被験者に研究内容を説明し、同意を得た上で行った。

### 【結果】

心拍数は、起立時に両群とも有意に増加した。回復期には即時に安静臥床の値まで戻った。また、1 回心拍出量と心拍出量、総頸動脈血流量は起立時に両群とも有意に減少し、回復期には即時に安静臥床の値まで戻った。平均血圧は起立時においても両群とも維持された。

アドレナリン、ノルアドレナリンは起立時に両群とも有意に増加した。そして、回復期には即時に安静臥床の値まで戻った。ADHとアルドステロンは起立時に有意な差はなかった。また、PRAは起立時に両群で有意に増加した。

なお、全ての項目で両群間において有意差は認めなかった。

### 【考察】

発症早期の脳血管障害者は、60 度起立位で健常者と同様に平均血圧は維持されており、起立時の循環調節においては視床下部より上位の中樞の関与は少ない可能性が示唆された。また、慢性期脳血管障害者では、健常者より起立直後の血圧が有意に低下したとの報告がある。しかし、本研究では平均血圧は両群とも起立時に減少しなかった。発症早期の脳血管障害者は発症から平均 7.4 日で実験に参加し、慢性期脳血管障害者の研究では発症から平均 33.8 ヶ月で実験に参加していた。一般的に、脳血管障害者は健常者よりも低活動である。慢性期脳血管障害者は発症早期の脳血管障害者より低活動期間が長いこと、低活動による重力刺激の不足・欠如が血管の圧受容器の感受性を低下させ、起立耐性の低下を招くことになったと考えられる。

我々は、若年健常者の総頸動脈血流量は心拍出量の減少にも関わらず起立中、維持されたことを報告している。しかし、本研究では総頸動脈血流量と心拍出量は両群で起立時に減少した。従って、高齢者の起立時の総頸動脈血流量減少は血管のコンプライアンス低下が原因と考えられる。

アドレナリンとノルアドレナリンが起立時に両群で有意に増加したことは、交感神経系が活性化されていることが示唆された。長時間、立位姿勢に適応するために最も重要なホルモンはレニン-アンジオテンシン、アルドステロン、ADHである。本研究では、PRAは起立時に両群で有意に増加した。しかし、ADH、アルドステロンは両群で変化しなかった。これは、今回のような短時間の起立では十分に働かなかったことが示唆された。

### 【結論】

本研究により、最も重要な知見は発症早期の脳血管障害者でも起立時の平均血圧が維持されたことである。さらに、総頸動脈血流量の変化も健常者と同様であった。そのため、視床下部より上位に病変を持つ発症早期の脳血管障害者において起立負荷の循環調節メカニズムには影響しないと考えられる。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 26 年 6 月 12 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

ヒトの起立時における血圧調節は、主に延髄の中樞神経核を介して行われている。しかし、大脳レベルの中樞神経が循環調節に影響を与える事は良く知られており、視床下部より上位の中樞神経が、起立時の血圧調節に影響を与えている可能性も否定できない。一方、脳血管障害者の発症早期における起立負荷は、臨床的に最も重要な訓練の 1 つである。本研究は視床下部より上位に病変を持つ発症早期の脳血管障害者での起立負荷に対する循環・内分泌応答を調べたものである。

対象は急性期脳血管障害者男性 31 名と年齢・身長・体重を合わせた健常者男性 21 名としている。方法は、被験者を起立可能な斜面台上で背臥位にし、安静臥床を 3 分間、その後 60 度起立位を 5 分間、さらに水平位に戻し 3 分間の測定を行い、その間の総頸動脈血流量と循環・内分泌応答を測定している。

その結果、心拍数は起立時に両群とも有意に増加し、1回心拍出量と心拍出量、総頸動脈血流量は起立時に両群とも有意に減少した。しかし、平均血圧は起立時においても両群ともに維持されていた。アドレナリン、ノルアドレナリン、PRAは起立時に両群とも有意に増加したが、ADH、アルドステロンは起立時に有意な変化はなかった。なお、全ての項目で両群間において有意差は認めなかった。

本研究の結果より、発症早期の脳血管障害者は、健常者と同様に起立位での平均血圧は維持されていた。さらに、心拍数、心拍出量、総頸動脈血流量、内分泌応答においても脳血管障害者と健常者の間において、その反応に差は認められなかった。このことから、起立時の循環・内分泌応答は、視床下部より上位の中樞神経の影響は少ない可能性が示唆された。さらに、この結果は、視床下部より上位の中樞神経障害が、起立時の循環・内分泌応答に与える影響はなく、発症早期の脳血管障害者に対する起立訓練は、臨床的にも安全に行えることを示している。

以上より、本論文は視床下部より上位に病変を持つ発症早期の脳血管障害者において、起立負荷時の循環・内分泌応答は正常に維持されていることを明らかにした。傷害部位による差異の検討が必要な点など課題もあるが、臨床的に重要な研究であり、学位論文として価値あるものとして認めた。



|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第504号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成26年11月18日   |          |          |
| 氏名      | 孫 玉 静   |          |          |
| 学位論文の題目 | Elevated serum 1,25(OH) <sub>2</sub> -vitamin D <sub>3</sub> level attenuates renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in <i>kl/kl</i> mice<br><br>(血清中活性型ビタミンDの上昇はクロソーマウスにおける片側尿管結紮により誘導される腎尿細管間質線維を減弱させる) |          |          |
| 論文審査委員  | 主 査   | 教授 村田 晋一 |          |
|         | 副 査   | 教授 重松 隆  | 教授 村垣 泰光 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

Previous studies have suggested that *Klotho* is a reno-protector against unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced renal tubulointerstitial fibrosis (RTF). Since the existing studies are mainly carried out using *klotho* heterozygous mutant (HT) mice, we focus on how *klotho* homozygous mutant (*kl/kl*) mice respond to UUO. UUO kidneys from HT mice showed significantly higher levels of RTF and TGF- $\beta$ /Smad3 signaling activation compared with wild-type (WT) mice, while both of which were greatly suppressed in *kl/kl* mice. Primary proximal tubular epithelial cell culture derived from *kl/kl* mice showed no suppression in TGF- $\beta$ 1-induced EMT compared with those derived from HT mice. In cultured renal epithelial cells (NRK52E), high levels of inorganic phosphate, FGF23 or calcitriol were added to medium which mimic *kl/kl* in vivo homeostasis. Neither inorganic phosphate nor FGF23 antagonized TGF- $\beta$ 1-induced EMT. In contrast, calcitriol ameliorated TGF- $\beta$ 1-induced EMT in dose dependent manner. Vitamin D3-deficient mice normalized serum levels of 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D3 in *kl/kl* mice and restored UUO-induced RTF and TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. In conclusion, the alleviation of UUO-induced RTF in *kl/kl* mice was due to TGF- $\beta$ 1 signaling suppression caused by elevated levels of serum 1, 25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3.

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成26年10月17日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

慢性腎不全の最終像である腎尿細管間質線維化 (Renal tubulointerstitial fibrosis: RTF) は、筋線維芽細胞の活性化による尿細管間組織への細胞外マトリックスの過剰な沈着とネフロン機能不全がその主な病態である。間質に起こる線維化は種々の因子により調節されているが、近年 Klotho が RTF に重要な役割を演じることが報告されている。本研究では Klotho の欠損が RTF においてどのように影響するかを検索し、その分子機構を解明することを目的とした。

方法として、野生型マウス (WT) とヘテロ (HT) およびホモ (*kl/kl*) の Klotho ミュータントマウスを用いて片側尿管結紮 (UUO) を行い、3日後と7日後の腎臓の RTF の程度を検索した。腎尿細管上皮を WT, HT, *kl/kl* マウスの腎臓からそれぞれ初代培養し、TGF- $\beta$ 1 処理の後、リン酸化 Smad3 および上皮間葉転換 (EMT) マーカーの発現を検索した。また、ラット腎上皮細胞株 NRK52E を用いて FGF23、高濃度リンまたは活性型ビタミン D を作用させ、TGF- $\beta$ 1 により誘導される EMT の影響を観察した。さらに *kl/kl* マウスにおいて異常なリンとカルシウム代謝の影響を除くため、ビタミン D 欠損食で飼育した *kl/kl* マウスを用いて、UUO で誘導される RTF の程度を比較した。

その結果、① *kl/kl* マウスでは UUO で誘導される RTF の程度は WT および HT マウスより軽度で、TGF- $\beta$ 1/Smad3 活性も抑制されていた。② 腎尿細管上皮の初代培養では、*kl/kl* マウス由来上皮で TGF- $\beta$ 1 で誘導される EMT および Smad3 のリン酸化も抑制されなかった。このことより *in vivo* でみられる *kl/kl* マウスにおける RTF の抑制はリン・カルシウム代謝異常であることが疑われた。

③ NRK52E 細胞では FGF23 でも高濃度リン処理によっても TGF- $\beta$ 1 により誘導される EMT は影響を受けなかったが、活性型ビタミン D (calcitriol) 処理において有意に抑制された。④ ビタミン D 欠乏食で飼育した *kl/kl* マウスでは、リン・カルシウム代謝異常はみられず、*kl/kl* マウスの表現型は消失した。UUO で誘導される RTF の程度および TGF- $\beta$ 1/Smad3 活性も HT マウスと同レベルにまで亢進した。⑤ *kl/kl* マウスの腎は WT、HT マウスと比較して軽度線維化が亢進していた。これは NRK52E 細胞を高濃度リンで処理した時、RTF マーカーが軽度上昇したことより、高リン血症により軽度な線維化が惹起される可能性が窺われた。

以上より、本研究では *kl/kl* マウスにおいて、活性化ビタミン D が TGF- $\beta$ 1/Smad3 シグナルを強力に抑制して RTF を軽減し、腎線維化から腎を保護することを示したことから学位論文として価値あるものと認めた。

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第505号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成26年12月9日  |          |          |
| 氏名      | 後藤 理恵子  |          |          |
| 学位論文の題目 | Screening of Specific Proteins Involved in Breast Cancer Metastasis by 2D-LC-ESI-MS/MS<br>(2D-LC-ESI-MS/MSによる転移乳癌特異的蛋白質の探索) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 岩橋 秀夫 |          |
|         | 副査  | 教授 原 勲   | 教授 吉田 宗人 |

## 論文内容の要旨

### 【背景】

乳癌の転移、再発は治療が難しく、新しい治療と分子標的薬が望まれている。乳癌の予後における転移に関連する因子として、リンパ節転移の他に、腫瘍の大きさ (pT)、腫瘍の組織学的グレード、エストロゲンとプロゲステロンレセプターの状態、ヒト上皮成長因子受容体 (HERs) の状態、遺伝子変異がある。リンパ節転移の有無は強い予後因子である。この点でリンパ節転移に関連する分子を見出すことは、転移、再発乳癌の治療及び分子標的薬開発に繋がると考えられる。

### 【目的】

乳癌リンパ節転移に関わるタンパク質を同定するとともに、そのタンパク質を定量する手法を開発し、診断、治療への応用を試みることを目的とした。

### 【対象】

乳癌リンパ節転移に関連する因子を探索するために、220名の外科的切除された乳癌組織の内、組織学的に10個以上のリンパ節転移が確認された13例のリンパ節転移群と、サイトケラチン19を用いたOSNA法により分子生物化学的にリンパ節転移のないことが確認された6例の非転移群の原発巣である乳癌組織を対象とした。

### 【方法】

各々の組織から遠心分画法により核画分を除いた上清を得て、トリプシン消化後、2D-LC-ESI-MS/MSの分析を行い、ペプチドシーケンスタグ法 (PST法) によるデータベース検索を行った。PST法の結果得られたprotein score値を基に転移群と非転移群を比較して、転移群に有意に発現しているタンパク質を抽出した。また、二群間で有意な変化がみられたタンパク質に対して、免疫染色によるバリデーションを行った。

### 【結果】

2D-LC-ESI-MS/MSの分析の結果、protein score値が非転移群ではすべての症例で37.0未満であるのに対して、転移群ではすべての症例で38.0以上であり、type XIV Collagenが有意に発現していた。二群間でtype XIV Collagenを含む有意な差のみられたタンパク質34種について示した。また、免疫染色においても、type XIV collagenは非転移群では陰性であるのに対して、転移群では陽性であった。

## 【考察】

Type XIV Collagen は接着因子としての機能を有するとの報告がある。type XIV Collagen は細胞外基質に存在するため、標的治療薬としては適さないと推察される。しかしながら、通常癌細胞が移動、浸潤、転移を来すためには接着因子の変化が必要であることを考慮すると、type XIV Collagen は転移に関連する乳癌のバイオマーカーの可能性があると考えられる。

## 【結語】

2D-LC-ESI-MS/MS における網羅的解析の結果、type XIV Collagen がリンパ節転移群特異的に発現していることを見出した。type XIV Collagen を含めたこれらのタンパク質について直接定量する手法を開発し、バイオマーカーとしての実用性を評価するさらなる研究が望まれる。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年11月7日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

乳癌の転移及び再発は治療が難しく、新しい治療と分子標的薬が望まれている。乳癌の予後における転移に関連する因子として、リンパ節転移の有無は強い予後因子である。この点で、リンパ節転移に関与する分子を同定することは、術後再発を予測するバイオマーカーとなりうる可能性がある。

今回、乳癌リンパ節転移に関わるタンパク質を同定するとともに、そのタンパク質を定量する手法を開発し、診断及び治療への応用を試みることを目的とした。

リンパ節転移に関連する因子を探索するために、220名の外科的切除された乳癌組織の内、組織学的に10個以上のリンパ節転移が確認された13例のリンパ節転移群と、分子生物化学的にリンパ節転移のないことが確認された6例の非転移群の原発巣である乳癌組織を対象とした。

各々の組織から遠心分画法により核画分を除いた上清を得て、トリブシン消化後2D-LC-ESI-MS/MS分析を行い、ペプチドシーケンスタグ法（PST法）によるデータベース検索を行った。その結果、転移群と非転移群を比較して、type XIV Collagenが転移群に有意に発現していた。また、免疫染色においても、type XIV collagenは非転移群では陰性であるのに対して、転移群では陽性であった。

type XIV Collagenは細胞外基質に存在するため、標的治療薬としては適さないと推察されるが、通常癌細胞が移動、浸潤、転移を来すためには接着因子の変化が必要であることを考慮すると、本結果はtype XIV Collagenが転移に関連する乳癌のバイオマーカー候補である可能性を示唆している。

また、type XIV collagenの他にも、2D-LC-ESI-MS/MS分析で有意であった33種のタンパク質の中にも、有力な乳癌バイオマーカー候補となるタンパク質が存在する可能性があり、今後の研究に繋がると考えられる。

本研究によって、type XIV collagenが乳癌リンパ節転移のバイオマーカーになる可能性が見出され、乳癌リンパ節転移について新たな知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認められた。

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第506号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年1月13日   |          |          |
| 氏名      | 横井 賀津志   |          |          |
| 学位論文の題目 | Short stick exercises for fall prevention among older adults:<br>a cluster randomized trial<br><br>(高齢者における転倒予防のための棒体操：クラスターランダム化試験) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 竹下 達也 |          |
|         | 副査   | 教授 田島 文博 | 教授 宮下 和久 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

高齢者の累積転倒発生率は、1年間で約20～30%と報告されており、施設入所者に限れば、その発生率は更に高くなる。転倒はその後の日常生活を大きく制限し、寝たきりの原因にもなる。さらに、転倒は死亡率とも高い関連性が認められている。これらのことから、施設入所者への転倒予防に関する有効な介入方法の確立が求められている。そこで、われわれは新聞を用いて、投げる・受け取ることを主な運動とし、転倒やつまずきの際に起きるバランスを崩した状態を椅子坐位で安全に体験できる「棒体操」を考案した。地域在住高齢者に対する予備研究において、「棒体操」を週2回6ヵ月間継続して行った群は、通常のリビング生活を継続した群と比較して、転倒者数の有意な減少を認めた。本研究では転倒者数、初回転倒時期、転倒の内的要因、健康観QOLの指標を用いて、「棒体操」の養護老人ホーム入所者への転倒予防効果を検討することとした。加えて、「棒体操」による介入の効果発揮時期および効果持続期間を検討することとした。

### 【方法】

認知症を有さず歩行が自立している105名の養護老人ホーム(5ヵ所)入所者を対象とし、2施設51名(男性18名、女性33名)を介入群(週2回6ヵ月間、「棒体操」を集団で実施し、その後6ヵ月間は棒体操を中止し追跡する)、3施設54名(男性24名、女性30名)を対照群(10分間のストレッチ体操を実施し、通常のリビング生活を12ヵ月間継続する)にランダムに割り付けた。主要結果指標は転倒者数および初回転倒時期とした。転倒の確認はFICSITの定義を用い、カルテからの情報とした。副次的結果指標は、内的要因(身体機能と認知機能)および健康観QOLとした。身体機能評価として握力、30-second chair-stand test(以下、CS-30)、Functional Reach Test(以下、FR)、落下棒テスト、Timed up and Go Test(以下、TUG)、5m通常歩行時間・5m最大歩行時間、開眼片脚立位時間、長座体前屈、認知機能評価としてMini Mental State Examination(以下、MMSE)を、健康観QOLとしてSF-8を用いた。身体機能評価はランダム化前のベースラインと1、3、6、12ヵ月目に再評価を行い、その他の評価はランダム化前のベースラインと6ヵ月目と12ヵ月目に再評価を行った。分析では、6ヵ月間および12ヵ月間の両群の転倒者数と初回転倒時期を比較した(Coxハザード分析、Kaplan-Meier法によるlog-rank検定)。両群の身体機能の指標についてはベースラインと1、3、6ヵ月目の変化のパターンを比較した(線型混合モデルによる2元配置分散分析)。認知機能と健康観QOLはベースラインと6ヵ月目の変化のパターンを比較した。また、「棒体操」の効果発揮時期を明らかにするため、介入群のベースラインと介入1、3、6ヵ月目の身体機能の指標を比較した(Bonferroniの多重比較)。さらに、「棒体操」の持続を検討するため、介入群の6ヵ月目と介入終了後6ヵ月目の各指標を比較した(対応のあるt検定)。ベースライン調査時に両群で差を認めたBMIは補正した。

## 【結果】

ベースラインにおいて両群の基本属性はBMIを除いて有意な差はなかった。6ヵ月間の転倒者数は介入群で3名、対照群で11名であり、初回転倒における調整ハザード比は0.21(95% CI 0.04–0.98)であった。また、介入終了後6ヵ月間の追跡期間を含めても介入群は6名、対照群は16名と介入群の人数が有意に少なく、調整ハザード比は0.15(95% CI 0.03–0.74)であった。身体機能の指標では、介入群と対照群の6ヵ月間の変化の比較において、CS-30、FR、落下棒テスト、TUG、開眼片脚立位時間、長座体前屈においてそれぞれ有意な交互作用を認めた。認知機能および健康観QOLの指標は、MMSE、SF-8の精神的サマリースコアにおいてそれぞれ有意な交互作用が認められたが、効果量は小さかった。介入群のベースライン、1、3、6ヵ月目の各指標を多重比較した結果、落下棒テストはベースラインに比べ1、3、6ヵ月目の全てに有意な改善を認めた。FRと長座体前屈は3、6ヵ月目に、CS-30は3ヵ月目に有意な改善を認めた。介入群で「棒体操」を中止した6ヵ月目と12ヵ月目を比較したところ、身体機能ではCS-30、TUGが有意に低下した。「棒体操」実施率は87.8%(36名/41名)であった。

## 【考察】

「棒体操」を週2回の頻度で6ヵ月間継続したことで、介入群の転倒者数が有意に減少した。対象者の生活環境など外的要因に変化がなかったことを考えれば、転倒に関わる内的要因の変化によるものと推察される。事実、介入群は立ち上がり能力、静的・動的バランス、敏捷性、柔軟性の指標が改善した。敏捷性は「棒体操」実施後1ヵ月目、立ち上がり能力、静的バランス、柔軟性は3ヵ月目で改善した。さらに、立ち上がり能力を除く3指標は6ヵ月目にも効果が持続していた。「棒体操」実施が、一部の身体機能に対して即効性があることは注目すべき点であると考えられる。さらに、敏捷性、静的バランスと柔軟性は棒体操実施終了後も6ヵ月間維持されることが判明した。「棒体操」実施の完遂率は高く、多くの参加者が週2回のプログラムを継続できたことから、無理なく継続して行えるプログラムであることが明らかとなった。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年11月11日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

高齢者の累積転倒発生率は、1年間で約20～30%と報告されており、施設入所者に限れば、その発生率は更に高くなる。転倒はその後の日常生活を大きく制限し、寝たきりの原因にもなる。さらに、転倒は死亡率とも高い関連性が認められている。これらのことから、施設入所者への転倒予防に関する有効な介入方法の確立が求められている。

本論文は、施設入居高齢者を対象とした「棒体操」を用いたクラスターランダム化比較試験による転倒予防のための介入研究である。「棒体操」の特徴は、新聞を用いて、投げる・受け取ることを主な運動とし、転倒やつまずきの際に起きるバランスを崩した状態を椅子坐位で安全に体験できることである。介入群(51名)は「棒体操」を週2回6ヵ月間実施し、その後通常のケアを6ヵ月間行い、対照群(54名)はストレッチ体操と通常のケアを12ヵ月間行った。転倒予防において、比較的安全な椅子坐位での体操のみを用いた初めての研究であり、施設入居高齢者への転倒予防介入に向けての端緒を得たものである。

1. 転倒者数および初回転倒時期において、12ヵ月間の転倒者数は介入群で6名、対照群は16名と介入群の人数が有意に少なく、調整ハザード比は0.15(95%CI, 0.03–0.74)であり、転倒予防効果が確認された。
2. 身体機能の指標では、介入群と対照群の6ヵ月間の変化の比較において、30-second chair-stand test ( $p<0.01$ )、Functional Reach ( $p<0.01$ )、落下棒テスト( $p<0.01$ )、Timed up and Go ( $p=0.01$ )、開眼片脚立位時間( $p<0.01$ )、長座体前屈( $p<0.01$ )にそれぞれ交互作用を認めた。棒体操実施は、転倒の内的要因の改善に関係していることが考えられた。

3. 身体機能改善効果の時期について、落下棒テストはベースラインに比べ1、3、6ヵ月目に、**Functional Reach**と長座体前屈は3、6ヵ月目に、**30-second chair-stand test**は3ヵ月目に有意な改善を認めた。棒体操実施は、静的バランスや柔軟性などの身体機能改善効果に即効性があると考えられた。
4. 介入群の「棒体操」実施の完遂率は87.8%であり、多くの参加者が週2回の「棒体操」を実施できた。

以上、本論文は、施設入居高齢者に対する「棒体操」の転倒予防効果が確認された介入研究であり、今後、施設入居高齢者に対する転倒予防介入の調査・研究及び実践に寄与すると考えられ、学位論文として価値のあるものと認めた。

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第507号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日  |          |          |
| 氏名      | 寺口 郁子   |          |          |
| 学位論文の題目 | Acute-Phase Glucose Fluctuation Is Negatively Correlated With Myocardial Salvage After Acute Myocardial Infarction –Involvement of Monocyte Subsets–<br><br>(急性心筋梗塞において、急性期の血糖変動は単球を介して心筋救済率に悪影響を及ぼす) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 岡村 吉隆 |          |
|         | 副査  | 教授 近藤 稔和 | 教授 赤阪 隆史 |

## 論文内容の要旨

### [緒言]

糖尿病は、心血管イベント発症の危険因子の一つである。近年の研究報告により、高血糖のみならず、血糖の変動が心血管イベントの危険因子であることが示されている。高血糖および血糖変動は酸化ストレス反応や炎症サイトカインを介して心血管に影響を与えるとされているが、その成因や病態を修飾するメカニズムは十分に解明されていない。

急性心筋梗塞(AMI)の発症や予後に高血糖および血糖変動が関与していると考えられる。これまでの研究報告では、AMI患者の入院時高血糖(ストレス高血糖)が左室収縮能の変化率や心血管イベント死に影響を与えることが報告されてきた。ストレス高血糖は、AMI急性期の障害心筋に作用し、慢性期心筋リモデリングの亢進や左室収縮能の低下に関与するとされている。これらの背景より、ストレス高血糖のみならず、AMI急性期の血糖変動もまた障害心筋に悪影響を与える可能性があると考えられる。

また、インクレチンは、腸管から分泌され、膵臓に作用することでインスリン分泌を促すホルモンとして知られており、新たな糖尿病治療ターゲットとして注目されている。グルカゴン様ペプチド(glucagon-like peptide; GLP)-1は、インクレチンの一つであり、濃度が高い程血糖変動振れ幅が小さいと報告されている。

一方で、冠動脈プラーク破綻から冠動脈血栓閉塞、心筋虚血に至る急性冠症候群発症の一連の過程において、循環末梢血単球の関与が指摘されている。ヒト末梢血単球は単一ではなく、多様性を有することが明らかにされている。その特性より3つの単球サブセット(CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>、CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>)に分けることができる。すでに我々は、AMI急性期に末梢血単球の動員がみられ、特に炎症性単球とよばれる末梢血CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>単球サブセットの選択的な増加がAMI急性期の心筋救済率に関係していることを明らかにした(Tsujioka H, et al. J Am Coll Cardiol 2009; 54: 130-138)。AMI後の炎症性単球の選択的動員の機序の詳細は未だ不明であるが、炎症および酸化ストレスの活性化を介したシグナル伝達の関与の可能性が高いと考えられる。

本研究では、AMIにおける急性期血糖変動と末梢血単球サブセットの動員、心筋救済の関係について検討し、さらに血糖変動とGLP-1濃度、酸化ストレスとの関係について検討を加えた。

### [方法]

和歌山県立医大附属病院に入院した発症24時間以内に再灌流療法に成功した初回AMI患者36例を対象とした(うち、非糖尿病群24症例、糖尿病群12症例)。再灌流療法成功までに発症後24時間以上経過



した亜急性心筋梗塞、陳旧性心筋梗塞、心原性ショック、腎機能障害(クレアチニン 1.5mg/dl 以上)、MRI 撮像困難(体内金属、閉所恐怖症)、摂食困難を除外した。

入院時に酸化ストレスマーカーである尿中 8-インプロスタン<sup>1</sup>を測定した。また、末梢血単球サブセットの測定は、発症1~5日目に連続して施行し、そのピーク値を評価した。血糖変動は、発症1~3日目に持続血糖測定器(CGMs)を用いて測定し、平均血糖変動幅(MAGE)を用いて評価した。発症7日後に心臓MRI検査を施行し、心筋救済率を評価した。心筋救済率は、T2 強調画像での高信号域(心筋虚血エリア)、およびガドリニウムによる遅延造影領域(心筋梗塞エリア)を用いて算出した(心筋救済率=(心筋虚血エリア-心筋梗塞エリア)/心筋虚血エリア)。入院時ヘモグロビン A1c(HbA1c)が 6.5%未満であった 23 症例に対して発症 2 週間目に経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を施行し、負荷時(0 分、30 分、60 分、120 分)の活性型グルカゴン様ペプチド(GLP)-1 濃度を測定、時間曲線下面積(AUC<sub>GLP-1</sub>)を算出した。

#### [結果]

全 36 症例中、非糖尿病群 24 症例、糖尿病群 12 症例であった。HbA1c 値と心筋救済率には有意な相関はみられなかったが、MAGE は心筋救済率と有意に逆相関を示した( $r=-0.49$ ,  $P=0.01$ )。また、非糖尿病群、糖尿病群においてもそれぞれ同様に、MAGE と心筋救済率は有意に逆相関を示した( $r=-0.46$ ,  $P=0.025$  と  $r=-0.63$ ,  $P=0.028$ )。また、酸化ストレスマーカーである尿中 8-インプロスタンおよび末梢血炎症性単球のピーク値は、心筋救済率と有意に逆相関を示した ( $r=-0.33$ ,  $P=0.047$  と  $r=-0.20$ ,  $P=0.02$ )。さらに、AUC<sub>GLP-1</sub> は MAGE と逆相関( $r=-0.42$ ,  $P=0.047$ )、心筋救済率と正相関を示した ( $r=0.38$ ,  $P=0.03$ )。

また、MAGE と尿中 8-インプロスタン有意に正の相関を示した ( $r=0.36$ ,  $P=0.003$ )。

#### [考察と結語]

今回の我々の研究により、AMI 急性期の血糖変動が心筋救済に悪影響を与えることが示された。血糖変動が心筋救済に影響する詳細な機序は明らかではないが、酸化ストレスや炎症性単球の動員を介して虚血による障害心筋での炎症を惹起し、心筋救済を減少させる可能性が示唆された。

AMI 急性期の血糖変動の抑制は、AMI 後の予後を改善させる新たな治療ターゲットとなる可能性が期待される。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 26 年 7 月 24 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

高血糖のみならず、血糖の変動が心血管イベントの危険因子であることが近年の研究により示されており、急性心筋梗塞(AMI)の発症や予後に関与していると考えられる。これまでに、AMI 患者の入院時高血糖(ストレス高血糖)が慢性期左室収縮能の変化率や心血管イベント死に影響を与えることが報告されてきた。ストレス高血糖は、AMI 急性期の障害心筋に作用し、慢性期心筋リモデリングの亢進や左室収縮能の低下に関与するとされている。これらストレス高血糖のみならず、AMI 急性期の血糖変動もまた障害心筋に悪影響を与える可能性があると考えられる。

一方で、冠動脈プラーク破綻から冠動脈血栓閉塞、心筋虚血に至る急性冠症候群発症の一連の過程において、循環末梢血単球の関与が指摘されている。ヒト末梢血単球は単一ではなく多様性を有することが明らかにされており、その特性より 3 つの単球サブセット(CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>、CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>)に分けることができる。すでに学位申請者らは、AMI 急性期に末梢血単球の動員がみられ、特に炎症性単球とよばれる末梢血 CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>単球サブセットの選択的な増加がAMI急性期の心筋救済率に悪影響を及ぼすことを明らかにした。AMI 後の炎症性単球の選択的動員の機序の詳細は未だ不明であるが、炎症および酸化ストレスの活性化を介したシグナル伝達の関与の可能性が高いと考えられる。

本論文は、AMIにおける急性期血糖変動と末梢血単球サブセットの動員、心筋救済の関係について検討し、さらに血糖変動とグルカゴン様ペプチド(GLP)-1濃度、酸化ストレスとの関係を明らかにしたものである。

その結果、全症例(n=36)、非糖尿病群(n=24)、糖尿病群(n=12)いずれにおいても平均血糖変動幅(MAGE)と心筋救済率は有意に逆相関を示した。また、酸化ストレスマーカーである尿中8-イソプロスタンおよび末梢血炎症性単球のピーク値は、心筋救済率と有意に逆相関を示した。さらに、GLP-1濃度はMAGEと逆相関、心筋救済率と正相関を示した。また、MAGEと尿中8-イソプロスタンは有意に正の相関を示すことが明らかとなった。

以上、本論文はAMI急性期の血糖変動が心筋救済に悪影響を与えることを初めて報告したものである。血糖変動が、酸化ストレスや炎症性単球の動員を介して虚血による障害心筋での炎症を惹起し、心筋救済を減少させる可能性が示唆された。AMI急性期の血糖変動の抑制が、予後を改善させる新たな治療ターゲットとなる可能性を提示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第508号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日  |          |          |
| 氏名      | 山下 泰伸   |          |          |
| 学位論文の題目 | Nrf2-Inducing Anti-Oxidation Stress Response in the Rat Liver-New Beneficial Effect of Lansoprazole<br><br>(ランソプラゾールの新規薬効：肝臓における転写因子 Nrf2 の誘導と抗酸化ストレス作用効果の検討) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 岸岡 史郎 |          |
|         | 副査  | 教授 鶴尾 吉宏 | 教授 一瀬 雅夫 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

酸化ストレスが様々な病態や生命現象に関与することは、今日までの多くの研究により明らかにされている。内因性あるいは外因性の原因により生じる活性酸素は多様な細胞傷害を惹起する。一方、これらの産物の刺激によって、酸化的ストレス関連遺伝子群の転写因子として機能する NF-E2-related factor 2 (Nrf2) が、Kelch-like ECH associating protein 1 (Keap1)から解放されて、細胞質から核内に移行し、DNA の antioxidant response element (ARE) 領域に結合することで heme oxygenase-1 (HO-1) などの抗酸化酵素が誘導されることが知られている。肝臓においても、酸化ストレスは肝障害に重要な役割を演じていると考えられ、酸化ストレスを減ずることを目標にした治療が行われている。ランソプラゾールは proton pump inhibitor (PPI) として、胃酸過多による諸疾患に汎用されている。その効果には酸分泌抑制作用に依存しない作用も想定されている。その一部に、胃粘膜および小腸粘膜上皮細胞で、HO-1 の誘導による粘膜保護作用も報告されている。本研究はラットの肝臓において、ランソプラゾールの抗酸化ストレス作用と急性肝炎モデルでの有効性について検討した。

### 【対象と方法】

#### ・実験 1

ランソプラゾール投与による Nrf2 の発現、および Nrf2 により誘導され、解毒/抗酸化に関わる第 II 相酵素の発現および Nrf2 の誘導に関わる遺伝子を検討した。

・急性投与：ランソプラゾールを 0.5%メチルセルロースに溶解後、vehicle 単独、10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg を、6 週齢雄 Wistar rat に経胃的にそれぞれ単回投与し、投与後 3 時間、6 時間で検体を採取した。

①ランソプラゾール急性投与 (3 時間)による Nrf2、Keap1、HO-1、その他の第 II 相酵素(Nqo1、Gsta2、Ugt1a6)の mRNA の用量依存的な発現について real-time RT-PCR を用いて検討した。

②ランソプラゾール急性投与 (6 時間)による Nrf2、Keap1、HO-1 のタンパク抗原に対する免疫陽性の用量依存的な発現について western blot 法を用い検討した。

③ランソプラゾール急性投与 (6 時間) による HO-1 の組織学的発現について免疫組織化学を用いて検討した。

④Nrf2 の核内移行について western blot 法および蛍光免疫組織化学を用いて検討した。

⑤ランソプラゾール急性投与 100 mg/kg (3 時間) 群および vehicle 群を用いて、2 群間での発現遺伝子の差を、マイクロアレイ法で解析し、発現変化した遺伝子のリストから、生物学的な機能及び疾患や既知のシグナルパスウェイとの関連性を見出すため、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析を施行した。

・慢性投与：ランソプラゾールを 0.5%メチルセルロースに溶解後、vehicle 単独あるいは 30 mg/kg を、6 週齢雄 Wistar rat に 1 週間、毎日経皮的に 1 日 1 回投与し、投与後 24 時間に検体を採取した。

①ランソプラゾール慢性投与による Nrf2、Keap1、HO-1 の mRNA の用量依存的な発現について検討した。

②ランソプラゾール慢性投与による Nrf2、Keap1、HO-1 のタンパク抗原に対する免疫陽性の用量依存的な発現について検討した。

③Nrf2の核内移行について western blot 法および蛍光免疫組織化学を用いて検討した。

#### Real-time RT-PCR

各サンプルより total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて、cDNA を合成した。LightCycler®(Roche) を用いて SYBR Green 法で Nrf2、Keap1、第 II 相酵素の mRNA について定量的 PCR を行った。

#### Western blot 法

各サンプルより可溶性タンパクを抽出し、一部は核分画と細胞質分画に分けて抽出した。1次抗体、2次抗体を反応させたのち、各タンパク質の定量は、light capture® (ATTO) で行い、actin で補正した。

#### 免疫組織化学

10 μm の凍結薄切切片を 3% $H_2O_2$  処理後、western blot 法と同じ抗 HO-1 抗体を用いて反応させた。Vectorstain ABC Elite kit® (Vector) を用いて、DAB で発色後、Hematoxylin で対比染色した。

#### 蛍光免疫組織化学

ウサギ抗 Nrf2 抗体は、Biotin 化抗ウサギ IgG 抗体と反応後、Texas-Red avidin D® (Vector) で赤色に標識し、DAPI® (Wako) で核を青に発色させた。

#### マイクロアレイおよび IPA 解析

ランソプラゾール 100 mg/kg (3時間) 投与群、vehicle 群、それぞれ 3 個体から total RNA を抽出した。3 個体由来のサンプルをプールし、whole rat genome oligo DNA microarray version 3.0 を用いて Agilent 社推奨プロトコールにて解析した。群間のノーマライゼーションは Gene Spring GX11.5.1 を用いて行った。蛍光強度が 100 以上の遺伝子を選出し、発現変動遺伝子の判定基準として、2 倍を閾値とした。

IPA 解析は version Fall 2013 ソフトウェアを用いた。

#### ・実験 2

ラット急性肝炎モデルを用い、ランソプラゾール投与による肝障害の改善の有無を血液検査および病理標本を用いて検討した。

ランソプラゾールを 0.5%メチルセルロースに溶解後、vehicle 単独あるいは 30 mg/kg を、それぞれ 6 週齢雄 Wistar rat に経皮的に 5 日間毎日投与した。別の群では、HO-1 阻害薬 Stannous mesoporphyrin (SnMP) 20 μmol/kg を第 4、5 日に腹腔内投与した。肝障害モデル作成のため、ランソプラゾール投与 4 日目に Thioacetamide (TAA) 500 mg/kg を腹腔内に投与し、TAA 投与 2 日後に肝機能障害の程度を 6 群 (A: Control vehicle 群、B: ランソプラゾール皮下投与群、C: TAA 腹腔内投与群、D: TAA 腹腔内投与+ランソプラゾール皮下投与群、E: TAA 腹腔内投与+ SnMP 腹腔内投与、F: TAA 腹腔内投与+SnMP 腹腔内投与+ランソプラゾール皮下投与群)に分け、評価した。

### 【結果】

#### ・実験 1

#### ①ランソプラゾール単回急性投与における変化

##### i) Nrf2

Nrf2 の mRNA は control に比べ 10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg で有意な増加を認めた。タンパク抗原に対する免疫陽性においてもコントロールに比べ 30 mg/kg、100 mg/kg で有意な増加を認めた。

Nrf2 の核内移行が western blot 法および蛍光免疫組織化学にて示された。

##### ii) Keap1

制御タンパクである Keap1 は mRNA、タンパク抗原に対する免疫陽性ともに有意な変化は認められなかった。

##### iii) HO-1

HO-1 の mRNA はコントロールに比べ 30 mg/kg、100 mg/kg で有意な増加を認めた。タンパク抗原に対する免疫陽性においてもコントロールに比べ 100 mg/kg で有意な増加を認めた。また、HO-1 の組織学的発現をコントロール群ではほとんど認めなかったが、ランソプラゾール投与群では中心静脈周囲の肝細胞で著明に認めた。

##### iv) その他の第 II 相酵素 (Nqo1、Gsta2、Ugt1a6)

Nrf2 により誘導されるその他の第 II 相酵素の mRNA はコントロールに比べ 30 mg/kg、100 mg/kg で有意な増加を認めた。

#### ① ランソプラゾール慢性投与における変化

24 時間後のサンプルでは Nrf2、Keap1、HO-1 の mRNA はともに変化を認めなかった。

一方、Nrf2、HO-1 のタンパク抗原に対する免疫陽性において、コントロールに比べ有意な発現を認めた。

Keap1 においては、急性投与同様にタンパク抗原に対する免疫陽性の有意な変化は認められなかった。

Nrf2 の核内移行が急性投与同様に western blot 法および蛍光免疫組織化学にて示された。

## ② IPA 解析

Nrf2 に関わる上流遺伝子として Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)、Ppara、Cytochrome P450 (CYP1A1) が抽出された。RT-PCR による再確認で、ランソプラゾール投与により AhR、CYP1A1 の有意な上昇を認めた。

## ・実験 2

### 血液学的評価

ALT においてランソプラゾール投与により有意な肝障害の改善を認めた。

### 組織学的評価

ランソプラゾール投与群は肝障害群に比べ病理学的に明らかな改善を認め、障害の割合を示す lesion index において有意な改善を認めた。

## 【結語】

ランソプラゾールは、PPI 活性とは別に、肝細胞において、Keap1 のレベルを変えず、Nrf2 を誘導する。過剰な Nrf2 は、核内に移行し、HO-1 などの第 II 相薬物代謝系や抗酸化ストレス酵素を誘導した。ランソプラゾールは、Nrf2 の上流にある AhR を誘導し CYP1A1 などの第 I 相薬物代謝系の誘導にも関わることが示された。HO-1 依存性および HO-1 非依存性の機序で、TAA 誘発急性肝障害に対して、ランソプラゾールは保護作用があることが示された。今後、急性肝障害以外にも non-alcoholic steatohepatitis (NASH) など、酸化ストレスが関与すると考えられている肝障害に対しても、ランソプラゾールの有用性が期待される。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成26年10月29日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

酸化ストレスが様々な病態や生命現象に関与することは、今日までの多くの研究により明らかにされている。一方、proton pump inhibitor (PPI) として、胃酸過多による諸疾患に汎用されているランソプラゾールの効果には酸分泌抑制作用に依存しない作用も報告されている。その一部に、胃粘膜および小腸粘膜上皮細胞で、抗酸化物質である heme oxygenase-1 (HO-1) の誘導による粘膜保護作用も報告され注目を集めている。

本研究では、ラットの肝臓においてランソプラゾール投与における酸化的ストレス関連遺伝子群の転写因子として機能する NF-E2-related factor 2 (Nrf2)、Nrf2 により誘導される HO-1 などの解毒/抗酸化に関わる第 II 相酵素の発現について検討するとともに Nrf2 に関わる遺伝子の発現を探る目的でマイクロアレイおよび Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析を行った。更に肝障害に対するランソプラゾールの有用性について Thioacetamide (TAA) 投与による急性肝炎モデルを用いて検討した。その結果、

- 1) ランソプラゾールは制御タンパクである Kelch-like ECH associating protein 1 (Keap1) のレベルを変えず、Nrf2 を誘導すること、その誘導された Nrf2 が細胞質から核内に移行することにより第 II 相酵素の発現を認めた。
- 2) Nrf2 に関わる上流遺伝子として、IPA 解析にて Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)、Ppara、Cytochrome P450 (CYP1A1) が抽出された。RT-PCR による再確認で、ランソプラゾール投与により AhR、CYP1A1 の有意な上昇を認めた。
- 3) ランソプラゾール投与により、血清化学的、組織学的に肝障害は有意な改善を認めた。

以上、本研究は、ランソプラゾールの作用として、PPI 活性とは別に、肝細胞において、Keap1 のレベルを変えず、Nrf2 を誘導し、過剰な Nrf2 は、核内に移行し、HO-1 などの第 II 相薬物代謝系や抗酸化ストレス酵素を誘導した。更に Nrf2 の上流にある AhR を誘導し、CYP1A1 などの第 I 相薬物代謝系の誘導にも関わることがを解明した。それらの作用により TAA 誘発急性肝障害に対して保護作用があることを明らかにした。消化器系潰瘍治療薬のランソプラゾールの抗酸化作用による肝保護作用という新規薬効を発見し、その作用機構を解明するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第509号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日  |          |          |
| 氏名      | 谷崎 優子   |          |          |
| 学位論文の題目 | Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment<br>(インドールアミン 2,3-ジオキシナーゼは免疫抑制環境を誘導して卵巣癌腹膜播種を促進する) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 山上 裕機 |          |
|         | 副査  | 教授 改正 恒康 | 教授 井篁 一彦 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

卵巣癌はその半数以上が初回手術時に腹膜播種を伴う進行症例である。進行症例に対する治療の主役は腫瘍減量手術に引き続く化学療法であるが、長期予後の改善は見られないのが現状である。腫瘍微小環境内での宿主細胞と癌細胞との相互関係、その結果もたらされる癌の増殖、浸潤、転移のメカニズムを分子病理学的に解明することが、卵巣癌の病態解明、さらには新規治療法の開発に必須である。癌の増殖・進展には腫瘍微小環境内での宿主免疫監視機構からの逃避、免疫寛容の獲得が必須である。Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は必須アミノ酸であるトリプトファン代謝酵素であり、腫瘍細胞や樹状細胞、胎盤トロホプラストなどに発現している。腫瘍微小環境内においてはIDOが局所のトリプトファン濃度を低下させ、キヌレニンなどの毒性代謝産物を産生し、腫瘍浸潤性T細胞(TIL)やNK細胞を抑制することにより腫瘍免疫寛容を誘導する。ヒト卵巣がん組織においてIDO強発現の症例ではIDO陰性や弱発現の症例に比べて生存率が低下し、IDO強発現が予後不良因子になることが報告されている。本研究ではマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、卵巣癌進展におけるIDOの機能的役割を検討した。また、IDO阻害剤である1-methyl-tryptophan (1-MT)の効果についても検討した。

### 【目的】

卵巣癌進展におけるIDOの機能的役割を解明し、IDO阻害剤1-MTの治療効果について検討する。

### 【方法】

1. IDO過剰発現株の作成  
マウス卵巣癌細胞株OV2944-HM-1にマウスIDO遺伝子を導入し、IDO過剰発現株(HM-1-IDO)を確立し、培養細胞の特徴をコントロールベクター導入株(HM-1-mock)と比較した。
2. マウス卵巣癌腹膜播種モデルの作成と腫瘍進展の比較  
HM-1-IDOおよびHM-1-mock ( $1.0 \times 10^6$  cells/mouse)をB6C3F1マウスに腹腔内移植した後、生存期間を検討した。また、11日目、14日目に開腹し、腹水量および播種腫瘍重量を比較した。さらに得られた腫瘍組織の免疫組織化学的検討を行った。また、腹水中のサイトカイン、血管新生因子、成長因子をELISAで測定し検討を行った。
3. IDO阻害剤の治療効果の検討  
HM-1-IDOを腹腔内移植したB6C3F1マウスにIDO阻害剤である1-MT (4mg/mouse)を週2回腹腔内投与し、腹水量と腹膜播種重量を比較し、さらに生存期間の検討を行った。

### 【結果】

1. IDO過剰発現株の作成  
マウスIDO遺伝子をマウス卵巣癌細胞HM-1に遺伝子導入し、複数の過剰発現クローンを得た。これらのクローンのIDO活性をみるために培養上清中のトリプトファン、キヌレニン濃度を測定した。

親株, HM-1-mock 株に比べ, トリプトファン<sup>1</sup>の枯渇と, キヌレニン濃度の上昇を認めた IDO 活性が強いクローンを IDO 過剰発現株 HM-1-IDO として実験に用いた. *in vitro* における HM-1-IDO の細胞形態, 細胞増殖能および遊走能は親株, HM-1-mock と有意差を認めなかった.

## 2. マウス卵巣癌腹膜播種モデルの作成と腫瘍進展の比較

HM-1-IDO および HM-1-mock を腹腔内移植しマウス卵巣癌腹膜播種モデルを作成した. HM-1-IDO 移植マウスは HM-1-mock 移植マウスと比較して, 有意に生存期間の短縮を認めた ( $P=0.042$ ).

HM-1-IDO および HM-1-mock を移植後, 14 日目の腹膜播種腫瘍重量, 腹水量は mock 移植マウスに比べて HM-1-IDO 移植マウスで有意に増加していた (腹膜播種重量: $P=0.017$ , 腹水量: $P=0.003$ ). 病理組織学的検索においても HM-1-IDO 移植マウスでは mock 移植マウスと比較すると, 腹膜, 横隔膜に高度に浸潤する卵巣癌細胞を確認できた. 免疫組織化学的検討では, HM-1-mock 移植マウスと比較して HM-1-IDO 移植マウスにおいて, 腫瘍内の CD8<sup>+</sup>T 細胞および NK 細胞の減少を認めた. 腹水中のサイトカインを ELISA で測定したところ, HM-1-IDO 移植マウスの腹水中の TGF- $\beta$ , IL-10 は HM-1-mock 移植マウスと比較して高値であった (TGF- $\beta$  :  $P=0.01$ , IL-10 :  $P=0.02$ ).

## 3. IDO 阻害剤の治療効果の検討

生存期間については両群に有意差を認めなかったが, 移植後 14 日目の開腹所見では 1-MT 投与群において腹膜播種重量, 腹水量の有意な減少を認めた (腹膜播種重量 :  $P=0.025$ , 腹水量 :  $P=0.049$ ).

### 【考察・結語】

卵巣癌において, トリプトファン代謝酵素である IDO が腫瘍微小環境内の免疫寛容を誘導し, 播種の促進, 生存期間の短縮に寄与するメカニズムを解明した. また担癌マウスモデルにおいて IDO 阻害剤が卵巣癌の腫瘍進展を有意に抑制することが判明し, IDO が卵巣癌の新規標的治療の候補分子になる可能性が示唆された. IDO 阻害剤 1-MT の臨床試験はすでに米国で開始されている. 国内外で 1-MT に代わるさらなる IDO 阻害剤の開発が進行中であり, IDO をターゲットとした新たな治療戦略が期待される.

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 26 年 12 月 18 日, 論文審査委員は学位申請者の出席を求め, 論文審査を行った.

癌の増殖・進展には腫瘍微小環境内での宿主免疫監視機構からの逃避, 免疫寛容の獲得が必須である. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は必須アミノ酸であるトリプトファン<sup>1</sup>の代謝酵素であり, 腫瘍微小環境内においては IDO が局所のトリプトファン濃度を低下させ, キヌレニンなどの毒性代謝産物を産生し, 腫瘍浸潤性 T 細胞や NK 細胞を抑制することにより腫瘍免疫寛容を誘導する.

本論文では, 卵巣癌進展における IDO の機能的役割を解明し, IDO 阻害剤である 1-methyl-tryptophan (1-MT)の治療効果について検討した. はじめに, マウス卵巣癌細胞株 OV2944-HM-1 にマウス IDO 遺伝子を導入し, IDO 過剰発現株 (HM-1-IDO)を確立した. 培養細胞の特徴をコントロールベクター導入株 (HM-1-mock)と比較し, トリプトファン<sup>1</sup>の枯渇と, キヌレニン濃度の上昇を認めた IDO 活性が強いクローンを IDO 過剰発現株 HM-1-IDO として実験に用いた. HM-1-IDO および HM-1-mock を B6C3F1 マウスに腹腔内移植した後, 生存期間を検討したところ, HM-1-IDO 移植マウスは HM-1-mock 移植マウスと比較して, 有意に生存期間の短縮を認めた. また, HM-1-IDO および HM-1-mock を移植後, 11 及び 14 日目に開腹したところ, 腹膜播種腫瘍重量, 腹水量は HM-1-mock 移植マウスに比べて HM-1-IDO 移植マウスで有意に増加していた. 免疫組織化学的検討では, HM-1-IDO 移植マウスにおいて, 腫瘍内の CD8 陽性 T 細胞および NK 細胞の有意な減少を認めた. 腹水中のサイトカインを検討したところ, HM-1-IDO 移植マウスの腹水中の TGF- $\beta$ , IL-10 は HM-1-mock 移植マウスと比較して有意に高値であった.

IDO 阻害剤 1-MT の治療効果の検討したところ, HM-1-IDO 移植後 14 日目の開腹所見では 1-MT 投与群において腹膜播種重量, 腹水量の有意な減少を認めた.

卵巣癌において, トリプトファン代謝酵素である IDO が腫瘍微小環境内の免疫寛容を誘導し, 播種の促進, 生存期間の短縮に寄与するメカニズムを解明した. また担癌マウスモデルにおいて IDO 阻害剤が卵巣癌の腫瘍進展を有意に抑制することが判明した. IDO が卵巣癌の新規標的治療の候補分子になる可能性が示唆され, 学位論文として価値のあるものと認めた.

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第510号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日  |          |          |
| 氏名      | 下角 あい子  |          |          |
| 学位論文の題目 | Smad3 plays an inhibitory role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification<br>(Smad3 は血管平滑筋細胞のリン誘導性石灰化を抑制する) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 重松 隆  |          |
|         | 副査  | 教授 村垣 泰光 | 教授 赤阪 隆史 |

## 論文内容の要旨

### 【背景】

血管石灰化は動脈硬化型石灰化と中膜石灰化に分類される。後者は、慢性腎疾患や糖尿病を有する患者にみられ、重篤化すれば心血管系イベントや末梢循環不全に繋がるとされるが、その詳細な発生メカニズムはいまだ解明されていない。

Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )は、線維化や炎症、癌の増殖など生体内の多様な反応に関わる重要な生理活性物質である。Smad3はその細胞内シグナル分子の一つであり、リン酸化を受けて転写因子として働く。2010年、大動脈瘤や若年性変形性関節症等の症状が特徴であるSmad3の変異を有する家系が報告され、Smad3の血管平滑筋細胞や関節軟骨細胞に対する働きが注目されている。一方で、TGF- $\beta$ /Smad3シグナルが石灰化抑制因子であるピロリン酸の代謝に関わる因子に影響することが軟骨細胞実験で示されており、TGF- $\beta$ が血管石灰化に関わるという報告もあるが、血管平滑筋細胞に対する作用についての報告はほとんどない。

本研究では、高リン濃度下で血管平滑筋が石灰化する中膜石灰化実験モデルを用いて、TGF- $\beta$ /Smad3シグナルがピロリン酸代謝を介して血管石灰化にもたらす影響について検討した。

### 【目的】

TGF- $\beta$ /Smad3シグナルが血管石灰化に及ぼす影響を検証すること。

### 【方法】

#### 1) 動物、大動脈の分離と器官培養、血管平滑筋細胞培養、血管石灰化モデルの作製

6-8週齢の雄Smad3ノックアウトマウス (KOマウス)および野生型マウス (WTマウス)を使用した。

器官培養：マウス大動脈を摘出後2-3mmに切断し、WT群、KO群をそれぞれ対照群、高Pi群 (3.8 mM Pi)、TGF- $\beta$ 群 (高Pi群に10 ng/ml TGF- $\beta_1$ を添加)に分け計6群で7日間培養した。

細胞培養：マウス大動脈から酵素処理により血管平滑筋細胞のみを分離し、器官培養と同様6群(高Pi群は2.0 mM Pi、2.7 mM Ca<sup>2+</sup>)に分け、3~5日間培養した。

#### 2) 石灰化の評価

von Kossa染色、Alizarin Red S染色で石灰化の有無を判定した。定量評価には比色定量法を用いた。

#### 3) Ectonucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase-1 (Enpp-1)活性とアルカリフォスファターゼ (ALP)活性の測定

Enpp-1活性、ALP活性ともに既報論文 (Chen IP et al. Hum Mol Genet. 2011)に従って測定した。

#### 4) 細胞外ピロリン酸 (ePPi)濃度の測定

既報論文 (Rees and Ali, Ann Rheum Dis. 1988)に従いアイソトープを用いた酵素法を用いて細胞培養培地内のピロリン酸濃度を測定した。



## 5) リアルタイム-PCR (qRT-PCR)

培養細胞を用いて *Enpp-1*、Ankylosis homolog (ANK)、ALP の mRNA 発現量を SYBR Green による qRT-PCR 定法により検討した。

## 6) ウェスタンブロット法

培養細胞から蛋白を抽出し、蛋白量の比較を行った。抗体には抗 Smad3 抗体、抗リン酸化 Smad3 抗体、抗 *Enpp-1* 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体を使用した。

## 7) クロマチン免疫沈降 (ChIP)

WT マウスの血管平滑筋細胞を TGF- $\beta$  添加群と非添加群に分け、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit を用いて ChIP アッセイを行った。免疫沈降用抗体には、抗リン酸化 Smad3 抗体を使用した。得られた精製 DNA は、*Enpp-1* のプロモーター領域に含まれる Smad 結合領域 (SBE1、SBE2) に対してプライマーを作製し、qRT-PCR を行った。得られた増幅曲線から %インプットを算出した。

## 8) 統計学的解析

全ての実験は最低 3 回以上繰り返し行いデータを得た。データは平均  $\pm$  S.E. で表し、2 群間の検定には Student's T 検定、3 群以上の検定には ANOVA with post hoc Turkey 検定を用いて、P 値が 0.05 未満を有意とした。

## 【結果】

### 1) TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルによるリン誘導性血管石灰化の抑制

細胞及び器官培養において、高 Pi 群には WT 群、KO 群とも石灰化が誘導され、KO 群で有意に血管石灰化の亢進を認め、WT 群の TGF- $\beta$  群で抑制された。(P < 0.01)

### 2) 高 Pi、高 Ca 培地による Smad3 のリン酸化

ウェスタンブロットにより、WT 群の TGF- $\beta$  群だけでなく高 Pi 群でも抗リン酸化 Smad3 抗体のバンドが検出された。

### 3) ピロリン酸 (PPi) によるリン誘導性血管石灰化の抑制

細胞培養培地中の ePPi 濃度を測定したところ、WT 群ではコントロール群に比し、TGF- $\beta$  群で有意に上昇し、KO 群では TGF- $\beta$  群でその上昇が認められなかった。(P < 0.05)

低濃度 PPi (250 pM および 2.5 nM) で細胞培養を行ったところ、WT 群、KO 群とも、PPi 添加群では有意に石灰化が抑制された。(P < 0.01)

### 4) TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルによる PPi 代謝関連因子の発現誘導

*Enpp-1* や ANK は ePPi 濃度を上昇させ、血管石灰化を抑制する一方、ALP は PPi を加水分解し、血管石灰化を亢進させる。それらの PPi 代謝関連因子の石灰化誘導後の発現を qRT-PCR で確認したところ、*Enpp-1* の mRNA は WT 群に比し KO 群で有意に低下していた。また、ANK mRNA や ALP mRNA は KO 群で有意に増加していたが、ALP 活性についてはリン負荷前後や WT 群と KO 群の 2 群間で変化や差を認めなかった。ウェスタンブロット法でも、TGF- $\beta$  群で *Enpp-1* の発現は増加し、KO 群でその発現は少なかった。*Enpp-1* 活性においても、TGF- $\beta$  群や高 Pi 群で KO 群は WT 群よりも低かった。

### 5) リン酸化 Smad3 の *Enpp-1* 遺伝子プロモーター領域への直接結合による *Enpp-1* 発現調節

クロマチン免疫沈降において、TGF- $\beta$  添加群は非添加群に比し、リン酸化 Smad3 抗体の免疫沈降で得られた *Enpp-1* プロモーター領域の Smad 結合領域を含む DNA 断片が、より多く増幅された。(P < 0.01)

## 【考察】

TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルは、血管平滑筋細胞内で *Enpp-1* の転写を増加させることにより細胞外ピロリン酸濃度を上昇させ、リン誘導性血管石灰化を抑制することが示された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年1月23日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

血管石灰化は動脈硬化型石灰化と中膜石灰化に分類される。後者は、慢性腎疾患や糖尿病を有する患者にみられ、重篤化すれば心血管系イベントや末梢循環不全に繋がるとされるが、その詳細な発生メカニズムはいまだ解明されていない。Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )は、線維化や炎症、癌の増殖など生体内の多様な反応に関わる重要な生理活性物質である。Smad3はその細胞内シグナル分子の一つであり、リン酸化を受けて転写因子として働く。TGF- $\beta$ /Smad3シグナルが石灰化抑制因子であるピロリン酸 (PPi) の代謝に関わる因子に影響することが軟骨細胞実験で示されており、本研究では、TGF- $\beta$ /Smad3シグナルがピロリン酸代謝を介して血管石灰化にもたらす影響について、高リン刺激で血管平滑筋細胞が石灰化する中膜石灰化実験モデルを用いて検討した。

まず、野生型マウス (WT 群)、Smad3 ノックアウト型マウス (KO 群) を用いた細胞及び器官培養において、高リン刺激により WT 群、KO 群とも石灰化が誘導され、KO 群で有意に血管石灰化の亢進を認め、WT 群では TGF- $\beta$  添加で石灰化は抑制された。次に、ウエスタンブロット法により、WT 群においては TGF- $\beta$  添加だけでなく高リン刺激でも抗リン酸化 Smad3 抗体のバンドが検出された。これによって、高リン刺激が Smad3 シグナルを伝達していることが示唆された。

また、Smad3 と細胞外ピロリン酸 (ePPi) 濃度との関連性を検証するため、細胞培養培地中の ePPi 濃度を測定した。WT 群では TGF- $\beta$  添加により ePPi 濃度は有意に上昇したが、KO 群ではその上昇が認められなかった。このことから、血管平滑筋細胞において、TGF- $\beta$  は Smad3 を介して ePPi 濃度を上昇させることが示された。Enpp-1 や ANK は ePPi 濃度を上昇させ、血管石灰化を抑制する一方、ALP は PPi を加水分解し、血管石灰化を亢進させる。それらの PPi 代謝関連因子の石灰化誘導後の発現を qRT-PCR で確認したところ、Enpp-1 の mRNA は WT 群に比し KO 群で有意に低下していた。また、ANK mRNA や ALP mRNA は KO 群で有意に増加していたが、ALP 活性については高リン刺激前後や WT 群と KO 群の 2 群間で変化や差を認めなかった。ウエスタンブロット法や Enpp-1 活性測定においても、TGF- $\beta$  刺激で Enpp-1 の発現や活性は増加し、KO 群でそれらは低下していた。そこで、Enpp-1 が血管石灰化に大きく関わっていると考え、クロマチン免疫沈降を行った。TGF- $\beta$  添加群は、非添加群に比し、リン酸化 Smad3 抗体の免疫沈降で得られた Enpp-1 プロモーター領域の Smad 結合領域を含む DNA 断片が、より多く増幅された。これらより、TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルは、血管平滑筋細胞内で Enpp-1 の転写を増加させることにより ePPi 濃度を上昇させ、リン誘導性血管石灰化を抑制することが示された。

以上より、本研究は、Smad3 がリン誘導性血管平滑筋細胞石灰化を抑制する分子機構を示したものであり、学位論文として価値があるものとして認めた。

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第511号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日  |          |          |
| 氏名      | 王 叶楠  |          |          |
| 学位論文の題目 | Forensic Potential of MMPs and CC Chemokines for Wound Age Determination<br>(皮膚創傷治癒過程における法医学の創傷時間に MMP とケモカインの意義と予測する可能性) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 村垣 泰光 |          |
|         | 副査  | 教授 近藤 稔和 | 教授 古川 福実 |

## 論文内容の要旨

### INTRODUCTION

In forensic practice, wound examination is one of the most important tasks for forensic pathologists. It is also essential for judging how much time has elapsed since each wound was sustained, so called wound age determination. Skin wound repair starts immediately after an injury and consists of three phases; inflammation, proliferation, and the tissue remodeling phase, and these phases proceed with a complicated but well organized interaction between various types of tissues and cells.

MMPs are strongly associated with levels of inflammation, and it has been suggested that circulating MMPs control aspects of vascular remodeling and angiogenesis. Because angiogenesis and collagen deposition are indispensable for sustaining granulation tissue, this prompted us to hypothesize that MMPs are candidates for considering the age of skin wound. In addition, chemokines are small soluble proteins that act as molecular signals to induce cellular migration during inflammation. Several chemokines are expressed in healing wounds, and abnormal expression or activity of chemokines is associated with impaired healing. Although chemokine function in wound healing is thought to include recruitment of leukocytes, the precise roles of most chemokines in wound healing have not yet been addressed.

In this study, we investigated the time-dependent expression of MMP-2, MMP-9, CCL-2, CCL-3, CCL-5, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA at the skin injury site by real-time PCR during the skin wound repair process. It was expected that the results could have the forensic potential to estimate wound age more accurately and objectively.

### METHODS

#### *Mice*

Pathogen-free 8- to 10-week-old male BALB/c mice were obtained from Sankyo Laboratories. All animal

experiments were approved by the Committee on Animal Care and Use of Wakayama Medical University.

#### *Skin Wound Model and Excisional Wound preparation*

36 samples were obtained from skin wounds of different ages (1d, 3d, 5d, 7d, 10d, 14d after the skin was injured) in six mice during the skin wound repair process. The other six samples were obtained from another mouse without skin injury before death, designated as comparison group 0d. Excisional full-thickness skin wounds were aseptically created on the dorsal surface by picking up a fold of skin at the midline and punching through two layers of skin with a sterile disposable biopsy punch with a diameter of 4 mm and 8mm respectively. These samples were prepared for real-time PCR.

### **RESULT**

In our study, we considered that MMP-2 only acted a major part in the inflammation phase after skin injury during the mouse skin wound healing process. Additionally, MMP-9 played the main role in angiogenesis of the skin wound healing process. Thus, it is suggested that the roles and regulation of MMP-2 and MMP-9 differ during the development and progression of the skin wound healing process.

We presume that a mass of thrombin could dramatically activate MMP-2 during mouse dying, resulting in the high expression of MMP-2 transiently at 0d.

It demonstrated that CCL-2 and CCL-3 played important roles during skin wound healing, especially in inflammation phase and the formation of granulation tissue phase. However, it is more likely that CCL-5 did not become an important role at the skin injury sites during the skin wound healing process.

When the MMP-9/MMP-2 ratio was over 0.84, it is likely to strongly indicate an age of 5 days or less after skin injury according to the accumulated observations in mouse skin wound models.

### **CONCLUSIONS**

In summary, CCL-5 aside, the combined investigation of time-dependent expression of MMP-2, MMP-9, CCL-2, CCL-3, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA could help to determine the wound age more objectively. Collectively, from the viewpoint of forensic application, the results illustrated that MMP-9/MMP-2 ratios in the skin injury area were more useful for the age estimation of the skin wound healing process. Furthermore, the present results were obtained from well-controlled mice experiments. Further study is necessary to proceed further study using human skin wound samples of different ages.

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年1月26日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

法医学分野の皮膚創傷治癒過程（skin wound healing process）に関する基礎研究において、創傷時間を予測すること（skin wound age determination）は極めて重要である。皮膚創傷部には、様々な因子が放出され、一部は治癒を促進する。本研究では、real-time polymerase chain reaction（PCR）を用いて、皮膚創傷治癒過程に重要な cytokine の matrix metalloprotease と chemokine C-C motif ligand を測定することにより皮膚創傷時間との関連を検討した。

Pathogen free 8～10週齢 BALB/C 雄マウスを用いた。直径4 mm 皮膚生検パンチを用いて、背部に皮膚創傷を作成した。0日（創傷前）、1日、3日、5日、7日、10日と14日（創傷後）に直径8 mm 生検サンプルを得た。Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて、MMP-2、MMP-9、CCL-2、CCL-3、CCL-5及びいくつかの cytokine（IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ）を測定した。

その結果、皮膚創傷後、MMP-2、MMP-9、CCL-2、CCL-3 と cytokine（IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ）が有意な変動を示した。この中で、MMP-9、CCL-3、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現量が皮膚創傷後5日目に最も発現した。IL-6 と CCL-2 は1日後に最も発現した。MMP-2 の peak 変化は7日後最大となった。そして、CCL-5 の発現に経時的な有意はなかった。

経時的な指標を種々検討したところ、MMP9/MMP2 ratio が、皮膚創傷後の5日以内において、その比が上昇し、skin wound age determination の新しい指標である可能性が示された。

本研究はおよび論文は、MMP9/MMP2 ratio が skin wound age determination の有力な指標となることを初めて示したものであり、学位論文として価値あるものとして認めた。

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第512号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日   |          |          |
| 氏名      | 山田 信一  |          |          |
| 学位論文の題目 | Microstructural abnormalities in anterior callosal fibers and their relationship with cognitive function in major depressive disorder and bipolar disorder: A tract-specific analysis study<br><br>(うつ病と双極性障害における脳梁前部の白質神経線維の微細構造異常と認知機能障害の関連: tract-specific analysis 研究) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 金桶 吉起 |          |
|         | 副査   | 教授 伊東 秀文 | 教授 篠崎 和弘 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

うつ病と双極性障害における白質神経線維の異常は、両疾患の病態生理の一つとして注目されている。白質神経線維の微細構造異常を評価する神経画像解析法として拡散テンソル画像 (Diffusion tensor imaging, DTI) があるが、うつ病と双極性障害においては DTI 研究のメタ解析で脳梁白質の微細構造異常が指摘されている。脳梁は左右の大脳半球を連絡する最大の神経線維束であり、半球間の認知情報の交換に寄与している。近年はうつ病と双極性障害において、気分症状が増悪している時期だけでなく寛解期にも認知機能障害が存在していることが注目されており、脳梁白質神経線維の異常が認知機能障害と関係している可能性がある。そこで今回我々は、DTI の Tract specific analysis を用いて脳梁白質神経線維を皮質領域への投射部位別に 6 つに細分化し、うつ病と双極性障害における脳梁白質神経線維の微細構造異常と認知機能障害の関連を検討した。

### 【方法】

対象は、うつ病 (MDD) 群 18 名、双極性障害 (BP) 群 20 名、健常対照 (HC) 群 21 名である。3 テスラ MRI 装置で DTI を撮像した。Tract specific analysis は拡散テンソル解析ソフト Extended MR Workspace 2.6.3.1 を用いて Tractography を作成した。脳梁の白質神経線維を両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、上部前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉を連絡する 6 つの領域に細分化し、それぞれの領域における拡散異方性 (Fractional Anisotropy, FA) 値を求めた。脳梁白質神経線維の FA 値の 3 群間の比較には Repeated measures analysis of variance を用い、事後検定には Bonferroni test を用いた。認知機能の評価には数字順列課題 (作動記憶)、符号課題 (注意)、言語性記憶課題 (言語記憶)、ロンドン塔検査 (遂行機能) を用い、各群において 6 つに細分化した脳梁白質神経線維の各領域の FA 値と認知機能との相関を Spearman の順位相関を用いて検定した。本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ており、すべての対象者に文書を用いて十分な説明を行い、書面による同意を取得した。

### 【結果】

MDD 群と BP 群において両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、上部前頭葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値は HC 群よりも有意に低下し、MDD 群の両側の頭頂葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値は HC 群よりも有意に低下していた。両側の側頭葉、後頭葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値は 3 群間で有意な差を認めなかった。また、MDD 群において両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、上部前頭葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値の低下は数字順列課題の低成績と有意に相関し、両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、頭頂葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値の低下は符号課題の低

成績と有意に相関した。BP 群と HC 群において脳梁白質神経線維の FA 値と各認知機能課題の素点に有意な相関を認めなかった。

#### 【考察】

本研究では、Tract specific analysis を用いて脳梁白質神経線維を皮質領域への投射部位別に細分化することにより脳梁白質の構造異常を詳細に検討し、さらにそれらの構造異常と認知機能障害との関連を検討した。MDD 群と BP 群において両側前頭葉を連絡する脳梁前部の白質神経線維の微細構造異常が認められ、MDD 群において脳梁前部の白質神経線維の微細構造異常と作動記憶、注意の障害が関連した。これらの結果は、うつ病と双極性障害が同様の脳梁白質障害の病態生理を持つ可能性を示唆し、うつ病において両側前頭葉を連絡する脳梁前部の白質神経線維の微細構造異常が認知機能障害と関連する可能性を示唆した。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年2月19日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的はうつ病と双極性障害における脳梁白質神経線維の構造異常と認知機能障害の関連を明らかにすることである。拡散テンソル画像（Diffusion tensor imaging, DTI）の Tract specific analysis を用いて脳梁白質神経線維を皮質領域への投射部位別に6つに細分化し、うつ病と双極性障害における脳梁白質神経線維の微細構造異常と認知機能障害の関連を検討した。

うつ病（MDD）群18名、双極性障害（BP）群20名、健常対照（HC）群21名を対象とし、3テスラ MRI 装置で DTI を撮像し、Tract specific analysis は拡散テンソル解析ソフト Extended MR Workspace 2.6.3.1 を用いて Tractography を作成した。脳梁白質神経線維を両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、上部前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉を連絡する6つの領域に細分化し、それぞれの領域における拡散異方性（Fractional Anisotropy, FA）値を3群間で比較した。また、認知機能の評価には数字順列課題（作動記憶）、符号課題（注意）、言語性記憶課題（言語記憶）、ロンドン塔検査（遂行機能）を用い、各群で6つに細分化した各領域の FA 値と認知機能との関係を検討した。

MDD 群と BP 群において両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、上部前頭葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値は HC 群よりも有意に低下し、MDD 群の両側の頭頂葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値は HC 群よりも有意に低下していた。両側の側頭葉、後頭葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値は3群間で有意な差を認めなかった。また、MDD 群において両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、上部前頭葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値の低下は数字順列課題の低成績と有意に相関し、両側の眼窩前頭皮質、前部前頭葉、頭頂葉を連絡する脳梁白質神経線維の FA 値の低下は符号課題の低成績と有意に相関した。BP 群と HC 群において脳梁白質神経線維の FA 値と各認知機能課題の素点に有意な相関を認めなかった。

本論文は、うつ病と双極性障害が同様に前頭葉を連絡する脳梁白質神経線維の微細構造異常が存在し、うつ病においてその微細構造異常が認知機能障害と関連する可能性を示唆した初めての報告であり、気分障害の認知機能障害に対する治療反応性の予測指標の確立につながる可能性をもつ知見となることから、学位論文として価値あるものとして認めた。

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第513号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日   |          |          |
| 氏名      | 上出 三起子   |          |          |
| 学位論文の題目 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clinical evaluation of glycolic acid chemical peeling in patients with acne vulgaris: a randomized, double-blind, placebo-controlled, split-face comparative study</li> <li>• Persistent effects of adapalene gel after chemical peeling with glycolic acid in patients with acne vulgaris</li> </ul> <p>(尋常性ざ瘡患者に対するグリコール酸ケミカルピーリングの有効性に関する研究)</p> |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 近藤 稔和 |          |
|         | 副査   | 教授 篠崎 和弘 | 教授 古川 福実 |

## 論文内容の要旨

### 緒言

グリコール酸 (GA) はケミカルピーリング (Chemical peeling; CP) 剤の一つで、脂肪酸の総称である  $\alpha$ -ヒドロキシ酸 ( $\alpha$ -hydroxy acid; AHA) の中に含まれており、角質細胞の接着を弱めることで角層を剥離する作用がある。ざ瘡に対しては、毛漏斗部の角化異常を是正し、面皰を改善する効果があるといわれている。しかし、CP の有効性を報告した論文は多いが、未だにエビデンスレベルは極めて低く、CP の有効性を二重盲検で検討した報告は今までにない。そこで我々は、ざ瘡患者に対し二重盲検にて CP の効果を検討した。一方、CP は持続性が弱いため、継続治療が必要である。また保険外診療となるため、患者への経済的負担が大きい。そこでさらに我々は、CP で皮疹の改善を認めた後、維持療法の可能性を、アダパレン (レチノイン酸) を用いて行った。

### 方法 1 : 二重盲検無作為化比較試験

#### ・ 施術方法

試験期間は 10 週間とし、2 週間毎に計 5 回の CP を施行した。使用薬剤は、40%GA (pH2.0) と、プラセボとして HCL で pH を 2.0 に合わせた製剤を無作為に左右に割り付けた。

#### ・ 対象

2010 年から 2012 年までの 20 歳以上の中等症以上の尋常性痤瘡患者 25 例 (男性 9 例、女性 16 例) 対象で、平均年齢は  $25 \pm 4.5$  歳であった。除外基準としては、20 歳未満の男女、妊娠中の女性または授乳中の女性とした。

#### ・ 評価

ざ瘡重症度は日本皮膚科学会尋常性ざ瘡ガイドラインに基づき診断し、2 週間毎に炎症性皮疹、非炎症性皮疹数を判定した。皮膚生理機能解析として、マルチプローブアダプター (Courage + Khazaka 社、ケルン、ドイツ) を用い、角質水分量、皮脂量、水分蒸散量、pH を測定した。測定は試験前、試験開始 8 週間後、試験終了後 (10 週間後) の計 3 回行った。試験前後に STAI と Skindex-16 のアンケートを行った。

#### ・ 統計解析

Tukey's test と Paired-t にて検定した。すべて  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 方法 2 : 維持療法の検討

#### ・ 施術方法

試験期間は 12 週間とした。スケジュールは 2 週毎に計 3 回の 40%グリコール酸 (pH3.2) による CP



を施行した。その後、半顔にアダパレンとプラセボ製剤をそれぞれ二重盲検で無作為に割り付け、6週間毎日就寝前に塗布させた。

・対象

2009年から2010年にかけて、軽症から中等症の尋常性痤瘡患者23例（男性1例、女性22例）対象で、平均年齢は25.3±5.8歳であった。除外基準は、方法1と同様である。

・評価

ざ瘡重症度、皮膚生理機能解析は方法1と同様の方法を用いた。皮膚生理機能の測定は試験開始時、CP3回終了2週間後、アダパレンまたはプラセボ外用6週間後の計3回行った。また、CP後、アダパレンまたはプラセボ外用後に患者満足度アンケートを行った。

・統計解析

Wilcoxon t-testを用いて統計学的検討を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

なお、方法1、方法2は、和歌山県立医科大学倫理委員会による審査で試験の目的および内容について承認を得た。

### 結果1：二重盲検無作為化比較試験

1) 皮疹の結果

GA群では、炎症性皮疹数、非炎症性皮疹数ともに、試験開始2週間後から有意に減少した。また、全ての観察日でGA群とプラセボ群間に有意な差を認めた。

2) 皮膚生理機能の結果

角質水分量・TEWL・pHを検討したところ、GAとプラセボ群とも有意な変化は認めなかった。皮脂量に関してはGAおよびプラセボ群の両群において、試験開始8週間後、10週間後で有意差を認めた。両群間の有意な差は認めなかった。

3) アンケート結果

Skindex-16では、「感情」と「全体」において試験前後に有意な改善を認めた。STAIでは試験前後で変化は認められなかった。

### 結果2：維持療法の結果

1) 皮疹数の結果

炎症性皮疹数、非炎症性皮疹ともにCP3回終了後、試験前と比較して有意な減少を認めた。その後アダパレン6週間外用後、CP3回終了後と比較すると皮疹の増加は認めず、試験前と比較して有意な減少を認めた。一方、プラセボ群ではCP3回終了後、プラセボ6週間外用で皮疹の有意な増加を認めた。

2) 皮膚生理学的機能解析

皮脂量は試験前と比較すると、CP3回終了後に有意に減少し、その後アダパレン群、プラセボ群ともに有意差は認めなかった。TEWLでは、試験前と比較すると、CP3回終了後の値は有意に減少し、その後アダパレン群、プラセボ群ともに有意な増加を認めた。

3) 患者満足度アンケート結果

ざ瘡に関しては、即効性のあるCPに満足度が高い結果が得られた。肌のきめ、はりなど美容的効果に関してもわずかではあるがCPに満足度が高い結果が得られた。くすみに関しては、アダパレンに満足度が高い結果となった。

### 結語

1) グリコール酸ケミカルピーリング（CP）による無作為化二重盲検比較試験において、炎症性皮疹数、非炎症性皮疹数ともに、グリコール酸（GA）群で試験開始2週間後から有意な減少を認め、GAとプラセボ群間にも有意な差を認めた。また、維持療法としての検討においても、CPは開始2週間後に皮疹の有意な改善を認めた。以上2つの研究結果から、尋常性ざ瘡に対するCPの有効性が明らかとなった。

- 2) CP後の維持療法として、アダパレンを外用した結果、試験前と比較すると皮疹の有意な減少を認めた。CPで早期にざ瘡が寛解した後、エビデンスレベルが高いアダパレンを維持療法目的として外用することが、患者の早く綺麗に治したいという願望に応えることができる有効な治療法であると考えた。
- 3) 患者満足度アンケートでは、ざ瘡に関して、CPはアダパレンと比較すると満足度が高い結果となった。

以上の研究結果から、ケミカルピーリングは、即効性が高く、患者満足度も高いEBMに基づいた治療法であることを初めて明らかにした。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年2月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

グリコール酸（GA）はケミカルピーリング（Chemical peeling; CP）剤の一つで、ざ瘡に対しては、毛漏斗部の角化異常を是正し、面皰を改善する効果があるといわれている。しかし、CPの有効性を二重盲検で検討した報告は今までにないため、エビデンスレベルは極めて低い。本研究では、ざ瘡患者に対して二重盲検にてCPの効果を検討した。また、CPは持続性が弱いいため、CPで皮疹の改善を認めた後、維持療法の可能性を、アダパレン（レチノイン酸）を用いて行った。

無作為化二重盲検比較試験：試験期間は10週間で、20歳以上の中等症以上の尋常性痤瘡患者25例を対象に、2週間毎に計5回のCPを施行した。使用薬剤は、40%GA(pH2.0)と、プラセボとしてHCLでpHを2.0に合わせた製剤を無作為に左右に割り付け、炎症性皮疹、非炎症性皮疹数を判定した。皮膚生理機能解析は、角質水分量、皮脂量、水分蒸散量、皮表pHを試験前、試験開始8週間後、試験終了後の計3回行った。QOLの効果を検討するために試験前後にSTAIとSkindex-16を行った。

維持療法の検討：試験期間は12週間で、軽症から中等症の尋常性痤瘡患者23例を対象に2週間毎に計3回の40%グリコール酸(pH3.2)によるCPを施行した。その後、半顔にアダパレンとプラセボ製剤を二重盲検で無作為に割り付け、6週間毎日就寝前に塗布させた。2週間毎に皮疹数を判定した。皮膚生理機能解析は二重盲検の検討と同様の方法を用い、試験開始時、CP3回終了2週間後、アダパレンまたはプラセボ外用6週間後の計3回行った。CP後、アダパレンまたはプラセボ外用後に患者満足度アンケートを行った。

その結果、無作為化二重盲検比較試験と維持療法の検討において、炎症性皮疹数、非炎症性皮疹数ともに、試験開始2週間後から有意な減少を認めたことから、尋常性ざ瘡に対するCPの有効性が明らかとなった。CP後の維持療法として、アダパレンを外用した結果、試験前と比較すると皮疹の有意な減少を認めた。CPで早期にざ瘡が寛解した後、エビデンスレベルが高いアダパレンを維持療法目的として外用することが、患者の早く綺麗に治したいという願望に応えることができる有効な治療法であると考えられた。

本研究および論文はケミカルピーリング治療がざ瘡に対し、即効性が高く、患者満足度も高いEBMに基づいた治療法であることを初めて明らかにしたことから、学位論文として価値あるものとして認めた。

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第514号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月17日  |          |          |
| 氏名      | 金井一修  |          |          |
| 学位論文の題目 | Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells<br><br>(タバコ煙の気道上皮における TLR3-EGFR 経路を介した MUC5AC 産生増強に関する検討) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 古川 福実 |          |
|         | 副査  | 教授 前田 正信 | 教授 山本 信之 |

## 論文内容の要旨

### 諸言

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は世界における死因の第4位で、慢性疾患の主な原因となっている。COPD は、タバコ煙のような有害なガスに長期間暴露されることによって惹起される好中球、マクロファージ、CD8 陽性 T リンパ球性の特異的な炎症パターンという特徴がある。杯細胞の過形成や粘液の過分泌は、特に増悪している時には COPD の一般的な特徴である。粘膜の繊毛による排除は、細菌やウイルスなど外因性の障害因子に対して潜在的、かつ生得的な防御機構である。しかし、過剰に産生された粘液は気道閉塞を引き起こし、COPD 急性増悪となる可能性があり、罹患率と致死率と関係している。それにも関わらず、この粘液過剰産生のメカニズムはまだ十分に解明されていない。MUC5AC ムチンは気道上皮細胞で産生される粘液の主要な構成成分の1つで、炎症性サイトカインや細菌の分泌物質を含む様々な刺激により気道の粘液産生が誘導されることが証明された。タバコ煙には、多くの粒子や過酸化水素を含む酸化物質が含まれていて、酸化ストレスが気道の粘液産生を増強することが証明されている。EGFR と ERK シグナル経路を含めた MAPK が増悪の機序に大きく関わっていることが、これまでの研究で証明されている。

ウイルス感染は COPD 増悪の主因である。TLRs は病因関連分子パターンを認識し自然免疫系で重要な役割を果たすことが証明された。TLR3 はウイルス由来の dsRNA と相互反応し、ウイルスによって起こる免疫反応に重要と考えられている。TLR3 は主に気道上皮細胞や樹状細胞、マクロファージ内のエンドソーム上に認められ、その活性化により炎症性サイトカインや IFN-1 が放出される。ウイルス感染やウイルス由来の dsRNA が、TLR3 や EGFR、ERK の活性化を介して気道の粘液産生を誘導し、MUC5AC 遺伝子の発現を増強することが証明された。以前に、我々や他の研究者によって、酸化ストレスやタバコ煙によって気道上皮細胞で TLR3 を介した反応が増強されることを証明した。タバコ煙は、炎症性の刺激物質により MUC5AC ムチン産生を増強することが報告された。しかし、ウイルス由来の dsRNA が気道上皮細胞における TLR3-EGFR 経路を介したムチン産生に対し、タバコ煙がどのような影響を及ぼすかは明らかにされていない。したがって、この研究では、ウイルス感染を模倣して合成 dsRNA、すなわち polyinosine-polycytidylic acid [poly(I:C)]を用いて以下の、1) タバコの煙は、気道上皮細胞において poly(I:C)が誘導する MUC5AC ムチン産生に影響を及ぼすかどうか、2) タバコの煙は、poly(I:C)が誘導する TLR3-EGFR シグナル経路を修飾するかどうか、を明らかにするようデザインした。

### 方法

poly(I:C)が誘導する MUC5AC 産生について検討するため、ヒトの肺粘膜表皮癌の cell line である NCI-H292 細胞を用いて、MUC5AC に対する免疫染色を施行した。また刺激後の上清を用いて ELISA で測定し検討を行った。中和抗体などの阻害剤は様々な濃度で、タバコの抽出液 (CSE) あるいは

poly(I:C)で処理する 60 分前に加えた。タバコ煙の影響を調べるためにタバコの抽出液 (CSE) を作成し、poly(I:C)で処理する 15 分前に加えた。MUC5AC の産生を検討するため、poly(I:C)や CSE で刺激をした後、上清中の EGFR のリガンドである TGF- $\alpha$  や amphiregulin を ELISA で評価した。さらに、EGFR や ERK の活性化の関与を検討するため、細胞溶解物中の pEGFR/EGFR、pERK/ERK を western blot 法で検討した。また、タバコ煙中の酸化物質の影響を検討するため、N-acetylcysteine (NAC)を 60 分前に加え、MUC5AC やリン酸化 ERK について ELISA や western blot 法で検討した。さらに別のドナー 3 人からのヒト正常気管支上皮細胞を購入し、Air-liquid Interface (ALI) にて分化させた気道上皮細胞を用いて poly(I:C)や CSE で刺激を行い、MUC5AC の mRNA、Protein を RT-PCR や ELISA で測定し、再現性について検討した。

## 結果

はじめに、NCI-H292 の細胞に TLR3 が発現しているか確かめるために、免疫組織化学及び免疫ブロットで調べた。TLR3 を細胞内に同定した。次に、TLR3 のリガンドである poly(I:C)で NCI-H292 細胞から MUC5AC が放出されるかどうかを調べた。poly(I:C)によって MUC5AC 遺伝子発現は容量依存性に、また MUC5AC 放出は容量かつ時間依存性に増加した。TLR3 はエンドソームに存在し、活性化のためには酸性の環境である必要が報告されている。poly(I:C)の効果が TLR3 を介するものかどうかを確かめるために、バフィロマイシンを用いた。バフィロマイシンはエンドソームの酸性化を阻害することで、TLR3 誘導の生物学的反応を抑制する。バフィロマイシン前処置により、容量依存性に poly(I:C)による MUC5AC 放出を抑制した。CSE 前処置により、濃度依存性に MUC5AC 遺伝子発現および蛋白放出は増加した。5% CSE で前処理することで、poly(I:C)誘導性 MUC5AC 遺伝子発現および蛋白放出が濃度および時間依存性に増強した。また、この増強効果は免疫組織化学的にも確認した。さらに、poly(I:C)存在下で、タバコ煙の MUC5AC 遺伝子発現と蛋白放出に対する増強効果は、分化したヒト気道上皮細胞でも確認された。次に poly(I:C)刺激後の MUC5AC 放出を CSE が増強する機序を調べるために、CSE の EGFR リガンド放出に対する影響を NCI-H292 細胞を用いて調べた。CSE で前処置することで poly(I:C)刺激後の EGFR リガンドである TGF- $\alpha$  や amphiregulin の放出を有意に増強した。TGF- $\alpha$  や amphiregulin に対する中和抗体、また EGFR に対するブロッキング抗体で前処置することで、poly(I:C)誘導性 MUC5AC 放出の CSE による増強を有意に抑制した。また、EGFR シグナル経路と、TNF- $\alpha$  変換酵素 (TACE/ADAM17) による EGFR のリガンドを制御していることの関係が以前に報告されており、特異的 TACE 阻害薬である TAPI、さらに metalloprotease の非特異的な阻害薬である GM6001 を用いて検討を行った。TAPI および GM6001 での前処置により、poly(I:C)刺激後の MUC5AC 放出の CSE による増強を有意に抑制した。

さらに下流の経路における MUC5AC 増強効果の機序を明らかにするために、EGFR-ERK シグナル経路に対する CSE の影響を検討した。poly(I:C)刺激後の NCI-H292 細胞で EGFR、ERK およびリン酸化 EGFR、リン酸化 ERK を western blot 法で評価した。poly(I:C)や CSE 単独で刺激した場合、EGFR や ERK1/2 のリン酸化が、時間依存性に有意に増加した。予想に反し、CSE を前処置していても、poly(I:C)刺激でリン酸化 EGFR は増強されなかった。しかし、リン酸化 ERK1/2 は時間依存性に増強された。EGFR のリン酸化阻害薬である AG1478 で前処置すると ERK1/2 のリン酸化の CSE による増強効果を抑制した。また AG1478 と ERK1/2 のリン酸化阻害薬である U0126 で前処置すると、容量依存性に MUC5AC 遺伝子発現、蛋白放出の CSE による増強効果を抑制した。異なる部位の EGFR リン酸化阻害剤である BIBX1382 や、Bafilomycin による前処置でも、MUC5AC 放出の CSE による増強効果は有意に抑制された。CSE による増強効果の機序に関しては、酸化ストレスの関与について検討を行うため抗酸化作用を有する N アセチルシステイン (NAC) を前処置し、MUC5AC 放出やリン酸化 ERK について ELISA や western blot 法で評価した。10mM の NAC を前処置することで、MUC5AC 放出の CSE による増強効果は抑制され、そしてリン酸化 ERK は、NAC で前処置した poly(I:C)単独刺激のみのリン酸化 ERK と同程度にまで抑制された。

## 考察

CSEは、気道上皮細胞で poly(I:C)が誘導する MUC5AC 放出を増強することを示したが、主に ERK シグナルを増強することで増幅することを示した。このことから、ウイルス感染の際、喫煙者や COPD 患者の気道では粘液産生が増強される可能性が示唆された。この経路を抑制することが、COPD 増悪に対し治療標的となる可能性が示唆された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 2 月 20 日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

慢性閉塞性肺疾患（COPD）はタバコ煙のような有害なガスに長期間暴露されることで生じる肺の炎症性疾患で、杯細胞の過形成や粘液の過分泌は、COPD 増悪時の一般的な特徴である。粘膜の繊毛による排除は、細菌やウイルスなど外因性の障害因子に対して潜在的、かつ生得的な防御機構である。しかし、過剰に産生された粘液は気道閉塞を引き起こし、COPD 急性増悪となる可能性がある。また、COPD 増悪の主因の 1 つであるウイルス感染に対してヒトは、病因関連分子パターンを認識する TLRs が自然免疫系で重要な役割を果たしている。特に TLR3 はウイルス感染時に産生される dsRNA を認識し、EGFR、ERK の活性化を介して、気道粘液の主要な構成要素の 1 つである MUC5AC 遺伝子発現を増強することが証明されている。しかし、ウイルス由来の dsRNA が誘導する気道上皮細胞におけるムチン産生に対し、タバコ煙がどのような影響を及ぼすかは明らかにされていない。

本論文では、ウイルス感染を模倣した合成 dsRNA、すなわち polyinosine-polycytidylic acid [poly(I:C)]を用いて以下の、1) タバコの煙は、気道上皮細胞において poly(I:C)が誘導する MUC5AC ムチン産生に影響を及ぼすかどうか、2) タバコの煙は、poly(I:C)が誘導する TLR3-EGFR シグナル経路を修飾するかどうか、を明らかにするようデザインした。

5%に調整したタバコの抽出液（CSE）で前処理することで、poly(I:C)存在下では MUC5AC 産生が時間依存性に増強した。さらに、poly(I:C)存在下で、タバコ煙の MUC5AC 遺伝子発現と蛋白産生に対する増強効果は、分化したヒト気道上皮細胞でも確認された。CSE で前処置し poly(I:C)で刺激すると EGFR リガンドである TGF $\alpha$  や amphiregulin の放出が有意に増強され、TGF $\alpha$  や amphiregulin に対する中和抗体、また EGFR に対するブロッキング抗体で前処置することで、その増強効果は有意に抑制された。EGFR、ERK およびリン酸化 EGFR、リン酸化 ERK を western blot 法で評価した。poly(I:C)や CSE 単独で刺激した場合、EGFR や ERK1/2 のリン酸化が、時間依存性に有意に増加したが、CSE を前処置後の poly(I:C)刺激で、リン酸化 EGFR は増強されなかった。しかし、リン酸化 ERK1/2 は時間依存性に増強された。EGFR のリン酸化阻害薬である AG1478、ERK1/2 のリン酸化阻害薬である U0126 で前処置すると、容量依存性に MUC5AC 産生の CSE による増強効果を抑制した。さらに N アセチルシステイン (NAC) を前処置することで、リン酸化 ERK、MUC5AC 産生増強は抑制された。

以上のように、CSE は、気道上皮細胞で poly(I:C)が誘導する MUC5AC ムチン産生を、ERK シグナルを増強することで増幅することを初めて示した論文である。このことから、ウイルス感染の際、喫煙者や COPD 患者の気道では粘液産生が増強される可能性が示唆され、この経路を抑制することが COPD 増悪に対し治療標的となる可能性が示唆され、学位論文に値するものと認めた。

|         |  |          |        |
|---------|--|----------|--------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第515号   |          |        |
| 学位授与の日  | 平成27年3月24日   |          |        |
| 氏名      | 佐々木 有見子  |          |        |
| 学位論文の題目 | Weight loss intervention reduces the risk of kidney stone formation in a rat model of metabolic syndrome.<br>(肥満の予防/改善が尿路結石形成リスクに及ぼす影響についての検討) |          |        |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 重松 隆  |        |
|         | 副査   | 教授 赤水 尚史 | 教授 原 勲 |

## 論文内容の要旨

### 緒言

メタボリックシンドローム（以下 MetS と省略）モデルラットを用いて、食事制限や運動による肥満の予防/改善が尿路結石形成リスクに及ぼす影響について検討した。

### 方法

【実験動物】ヒトの MetS に類似した病態を示す OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty) ラットを使用した。

【実験群・評価項目】雄 OLETF ラットを、コントロール群 (C 群: 通常飼育)、食事制限群 (D 群: コントロール群の 70% 食事制限)、食事制限+運動群 (E 群: 70% 食事制限に加えて回転ゲージによる自由運動を行わせる) の 3 群に分類し、体重・血液検査・24 時間尿化学検査の変化を観察した。

【プロトコール】

- ① MetS 予防実験: MetS 未発症の 4 週齢雄 OLETF ラットを 20 週齢まで観察した。
- ② MetS 治療実験: MetS 発症後の 24 週齢雄 OLETF ラットを 40 週齢まで観察した。

### 結果

- 1) 体重: MetS 予防実験では、D 群および E 群の体重増加は C 群に比べ有意に抑制された。MetS 治療実験では、C 群と比較し、E 群で有意な体重減少がみられた。
- 2) インスリン抵抗性: 両プロトコールにおいて、実験終了時の HOMA-IR は C 群に比較して D 群および E 群で有意に低かった。
- 3) 尿 pH: MetS 予防実験では、C 群で尿 pH が経時的に低下したのに対し、D 群、E 群では低下は見られず、C 群と比較して有意に高かった。MetS 治療実験では、D 群および E 群の尿 pH は経時的に上昇し、C 群に比べて有意に高くなった。
- 4) 尿中結石関連物質: 実験終了時の尿中クエン酸排泄量は、両プロトコールとも C 群に比較して D 群および E 群で有意に多かった。シュウ酸カルシウム結石形成の指標である AP(CaOx)index は、MetS 予防実験では C 群に比較して D 群および E 群で有意に低かった。MetS 治療実験では、C 群に対して E 群でのみ有意に低かった。

### 結論

肥満・インスリン抵抗性の予防/改善は、尿酸結石およびシュウ酸カルシウム結石形成リスクを低下させることが示されたことから、食事制限および運動による減量指導は MetS を合併した尿路結石患者の再発予防に有用であると考えられた。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年3月12日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

食事制限や運動による肥満の予防／改善が尿路結石形成リスクに及ぼす影響について、ヒトのメタボリックシンドローム（以下 MetS と省略）に類似した病態を示す OLETF ラットを用いて検討し、これまで報告のなかった食事制限や運動による減量が、尿路結石形成を抑制する可能性について追求した。

OLETF ラットをコントロール群（通常飼育）、食事制限群（コントロール群の 70%食事制限）、食事制限＋運動群（70%食事制限に加えて回転ゲージによる自由運動を行わせる）の 3 群に分類し、体重・血液検査・24 時間尿化学検査の変化を観察した。

まず、MetSの予防が結石形成に及ぼす影響を検討するため、糖尿病をまだ発症していない4週齢のOLETFラットを20週齢まで観察するMetS予防実験を行った。結果は以下の4点であった。1.食事制限群および食事制限＋運動群の体重増加はコントロール群に比べ有意に抑制された。2.実験終了時のHOMA-IRはコントロール群に比較して食事制限群および食事制限＋運動群で有意に低かった。3.コントロール群では尿pHが経時的に低下したのに対し、食事制限群、食事制限＋運動群では低下は見られず、コントロール群と比較して有意に高かった。4.実験終了時の尿中クエン酸排泄量は、コントロール群に比較して食事制限群および食事制限＋運動群で有意に多く、シュウ酸カルシウム結石形成の指標であるAP(CaOx) indexは、コントロール群に比較して食事制限群および食事制限＋運動群で有意に低かった。

続いて、MetSの改善が結石形成に及ぼす影響を検討するため、すでにMetSを発症している24週齢雄OLETFラットを40週齢まで観察するMetS治療実験を行った。結果は以下の4点であった。1. コントロール群と比較し、食事制限＋運動群でのみ有意な体重減少がみられた。2. 実験終了時のHOMA-IRはコントロール群に比較して食事制限群および食事制限＋運動群で有意に低かった。3. 食事制限群および食事制限＋運動群の尿pHは経時的に上昇し、コントロール群に比べて有意に高くなった。4. 実験終了時の尿中クエン酸排泄量は、コントロール群に比較して食事制限群および食事制限＋運動群で有意に多く、AP(CaOx)indexはコントロール群に対して食事制限＋運動群でのみ有意に低かった。

本論文は、食事制限および運動が肥満・インスリン抵抗性を予防／改善させ、尿酸結石およびシュウ酸カルシウム結石形成リスクを低下させることから、食事制限および運動による減量指導が MetS を合併した尿路結石患者の再発予防に有用である可能性を示唆しており、学位論文として価値あるものとして認められた。

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)甲第516号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月24日   |          |          |
| 氏名      | 小池 有美  |          |          |
| 学位論文の題目 | Cilnidipine but not amlodipine suppresses sympathetic activation elicited by isometric exercise in hypertensive patients<br>(等尺性運動による自律神経活動の変化に及ぼすカルシウム拮抗薬の影響<br>～瞳孔機能計を用いた自律神経機能評価による検討～) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 田島 文博 |          |
|         | 副査   | 教授 前田 正信 | 教授 羽野 卓三 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

高血圧治療において、ジヒドロピリジン(DHP)系カルシウム拮抗薬(CCB)は広く使用されているが、短時間作用型のものでは降圧に伴い、交感神経の活性化を介した反射性頻拍を惹起し、心事故のリスクを上げることが報告されている。このリスクを軽減するために、アムロジピン(AM)やシルニジピン(CL)といった長時間作用型のDHP系CCBが開発された。両薬はいずれも主に血管平滑筋に存在するL型と主に交感神経末端に存在するN型のカルシウムチャネルの両方を抑制して降圧効果を発揮するが、AMは高血圧患者の交感神経活動や心拍数を上昇させるという報告がある一方、CLはこれらを上昇させるという報告はない。しかし以上の報告は、それぞれの薬剤の投与前後や他の降圧薬との比較により得られた結果を示したものであり、運動時の交感神経や心拍数の変化に与えるAMやCLの影響についての報告はない。

瞳孔は副交感神経と交感神経のそれぞれ独立した経路により調節されており、自律神経機能の評価するための適切な末端器官と考えられる。光刺激を用いた瞳孔機能検査は、非侵襲的で簡便かつ短時間で、両神経の機能を評価できる。これまで本態性高血圧症患者の自律神経機能評価に瞳孔機能検査が用いられた報告はない。

以上より本研究は、本態性高血圧患者を対象に、等尺性運動により惹起される自律神経活動の変化に及ぼすAMとCLの影響を、瞳孔機能計を用いて検討することを目的とした。

### 【対象と方法】

予備研究として、本研究で行う運動負荷(後述)が交感神経活動や血圧に影響する適切な量であるかを確認するため、健常男性9名を対象に、後述の研究方法に加えて安静時と負荷直後の血中エピネフリンとノルエピネフリンを測定した。本研究では、6か月以上AMもしくはCLを服用している本態性高血圧症の通院患者37名(AM群19例、CL群18例)を対象とした。研究は本学の倫理委員会により承認されており、被験者には研究内容を事前に説明し文書で承諾を得た。

方法は、15分間の安静後に安静時の血圧や脈拍、瞳孔機能の測定および脈波解析を同時に2分以内で実施し、その後ハンドグリップ負荷を1分間実施した。負荷終了直後に安静時と同様の測定を行った。負荷量は油圧握力計を用いて、右手最大握力の70%とした。血圧と脈拍は左上腕で自動血圧計により測定した。瞳孔機能については瞳孔機能計を用いて、1秒間の赤色光刺激で得られる瞳孔径の変化から縮瞳速度(VC)と散瞳速度(VD)を算出し、それぞれを副交感神経機能と交感神経機能の指標とした。脈波解析は加速度脈波測定システムを用いて、左中指から得られる脈波間隔の高速フーリエ変換により低周波成分と高周波成分の比(LF/HF)を算出し、これを交感神経機能の指標とした。



各群での負荷前後間の血圧、脈拍、瞳孔機能、LF/HF の比較は対応のある Student's *t*-test を用いた。2 群間の VC、VD、LF/HF の変化度は、2 元配置分散分析によって評価された。有意水準 5%未満を有意差ありとした。

### 【結果】

健常者を対象にした予備研究では、最大握力の 70%を負荷量としたハンドグリップ負荷により、収縮期および拡張期血圧、脈拍、血中エピネフリン値は有意に上昇したが、ノルエピネフリン値や VC、VD、LF/HF は変化しなかった。

本研究では、2 群間において男女比、年齢、BMI、最大握力および併用降圧薬服用者数の差はなかった。収縮期血圧と脈拍は両群とも負荷後に有意に上昇したが、拡張期血圧は AM 群のみで有意に上昇した。VC は両群とも負荷後に有意に上昇したが、その変化度は CL 群より AM 群の方が有意に大きかった。VD は CL 群では変化しなかったが AM 群で有意に上昇した。LF/HF も CL 群では変化しなかったが AM 群では有意に上昇した。

### 【考察】

健常者では等尺性運動負荷による副腎由来のエピネフリンの増加が血圧、脈拍の上昇に反映される一方、瞳孔の交感神経活動は代償的に抑制されることが示唆された。本態性高血圧症患者を対象にした本研究では、AM 群で等尺性負荷により瞳孔の交感神経活動の亢進がみられた。一方 CL 群では、負荷によるこの亢進は完全に抑制された。AM、CL とも L 型と N 型のカルシウムチャネルの両方を阻害するが、CL は交感神経末端に分布する N 型チャネルを阻害する割合が AM より大きいことが示唆された。LF/HF の上昇も CL 群で抑制されたことはこの結果と合致する。この CL の交感神経活動抑制作用が負荷による拡張期血圧の上昇を抑制したのかもしれない。両群とも収縮期血圧および脈拍は負荷により有意に上昇したが、これには負荷による副腎活性化の関与が示唆された。

### 【結論】

本態性高血圧症患者において、CL は等尺性ハンドグリップ負荷による交感神経の賦活化を、AM に比べて強く抑制した。瞳孔機能計を用いた自律神経機能測定は同患者の等尺性運動負荷時にも有用であることが示された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 3 月 13 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

わが国では高血圧症に罹患している患者は約 4,000 万人と推定され、フラミンガム研究において収縮期血圧ではそのレベルが高いほど、冠動脈疾患発症率等のリスクが高くなることが報告されている。高齢化が進行するなか健康寿命を延ばすために適切な降圧治療薬の選択が重要である。

本論文は、本態性高血圧症患者を対象に、等尺性運動により惹起される自律神経活動変化に及ぼすジヒドロピリジン(DHP)系カルシウム拮抗薬(CCB)のアムロジピン(AM)とシルニジピン(CL)の影響を、瞳孔機能計を用いて検討している。AM は高血圧患者の交感神経活動や心拍数を上昇させるという報告がある一方、CL はこれらを上昇させるという報告はない。瞳孔径は、副交感神経と交感神経のそれぞれ独立した経路により調節されており、自律神経機能の評価するための適切な末端器官と考えられる。光刺激を用いた瞳孔機能検査は、非侵襲的で簡便かつ短時間で、両神経の機能の評価できるが高血圧患者を対象とし、降圧治療薬の交感神経への効果をみた報告はない。

等尺性運動負荷は、15 分間の安静後に血圧や脈拍、瞳孔機能測定および脈波解析を同時に実施し、その後 1 分間の最大握力の 70%でのハンドグリップ負荷終了直後に安静時と同様の測定を行った。光刺激で得られる瞳孔径の変化から縮瞳速度 (VC) と散瞳速度 (VD) を算出し、それぞれを副交感神経機能と交感神経機能の指標とした。また脈波解析から低周波成分と高周波成分の比 (LF/HF) を算出し、これを交感神経機能の指標とした。その結果、収縮期血圧と脈拍は両群とも負荷後に有意に上昇したが、拡張期血圧は AM 群のみで有意に上昇した。VC は両群とも負荷後に有意に上昇したが、その変化度は CL 群より AM 群の方が有意に大きかった。VD は CL 群では変化しなかったが AM 群で有意に上昇した。LF/HF も CL 群では変化しなかったが AM 群では有意に上昇した。

以上より AM、CL とも L 型と N 型のカルシウムチャネルの両方を阻害するが、CL は交感神経末端に分布する N 型チャネルを阻害する割合が AM より大きいことが示唆された。LF/HF の上昇も CL 群で抑制されたことはこの結果と合致する。このことから CL の交感神経活動抑制作用がハンドグリップ負荷による拡張期血圧の上昇を抑制したと結論づけた。また、両群とも収縮期血圧および脈拍がハンドグリップ負荷により有意に上昇したが、これにはハンドグリップ負荷による副腎の活性化の関与が示唆された。

以上のように本態性高血圧症患者において、CL は等尺性ハンドグリップ負荷による交感神経の賦活化を AM に比べて強く抑制すること、瞳孔機能計を用いた自律神経機能測定は同患者の等尺性運動負荷時にも有用であることが示され、学位論文に値するものと認めた。

|         |  |          |           |
|---------|--|----------|-----------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第908号   |          |           |
| 学位授与の日  | 平成26年4月8日  |          |           |
| 氏名      | 三木 康弘  |          |           |
| 学位論文の題目 | Prevalence and Characterization of Enterotoxin Gene-Carrying <i>Clostridium perfringens</i> Isolates from Retail Meat Products in Japan.<br><br>(市販肉製品におけるウェルシュ菌の汚染状況に関する研究) |          |           |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 宮下 和久 |           |
|         | 副査   | 教授 前田 正信 | 教授 西尾 真智子 |

## 論文内容の要旨

### [緒言]

食中毒の原因の約60%が細菌によるもので、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)もその原因細菌の1つである。芽胞を形成する偏性嫌気性菌であるウェルシュ菌は下水や土壌などの環境中に広く分布しており、ヒトや動物の腸管内にも常在する。

産生する毒素によりウェルシュ菌はA~E型に分類され、ヒトの病原菌となるのはほとんどがA型である。A型菌の一部の株はエンテロトキシン遺伝子(*cpe*)を持っており、食中毒の原因となる。ウェルシュ菌は発育に不適当な環境におかれると芽胞状態となり、発育条件が良くなる(5~50℃)と通常の栄養型と呼ばれる菌体に戻り増殖する(発芽)。*cpe* 遺伝子を保有しているウェルシュ菌は数%と言われているが、染色体上に保有している株とプラスミド上に保有している株があり、染色体上に保有している株の方が耐熱性が高いとされている。エンテロトキシンは本菌の他の毒素と異なり、芽胞形成時に菌体内で産生され、発芽や菌体が自己融解すると菌体外へ放出される。食品とともに摂取された菌が小腸で芽胞を形成するときエンテロトキシンが産生され、食中毒を起こすとされている。

ウェルシュ菌による食中毒は世界各国で発生しており、アメリカやイギリスでは3番目に多い食品媒介感染症原因菌として認識されているが、市販肉の汚染状況はアメリカ、ピッツバーグ大学の Q. Wen らが2004年に報告した調査があるだけで、ほとんど行われていない。そこで、今回我々は、国内での市販肉におけるウェルシュ菌による汚染状況の調査することを目的とした。さらに検出されたウェルシュ菌の *cpe* 遺伝子保有率、遺伝子の保有場所、芽胞の耐熱性などを検討する事にした。

### [方法]

2006年4~9月の間にスーパーマーケット、食肉店から食肉200サンプル(鶏肉、牛肉、豚肉、鴨肉、羊肉)を購入し、検討した。比較のため、日本で発生した食中毒事例から分離された9株(*cpe* 遺伝子を染色体上に保有する5株、プラスミド上に保有する4株)、ヨーロッパで発生した食中毒事例から分離された2株(*cpe* 遺伝子を染色体上に保有する)、ヨーロッパでの散发性下痢症の患者から分離された3株(*cpe* 遺伝子をプラスミド上に保有する)、アメリカで食品より分離された2株(*cpe* 遺伝子を染色体上に保有する)、ガス壊疽患者から分離された1株(*cpe* 遺伝子を保有していない)を使用した。

ウェルシュ菌の検出方法: 食肉100gまたは一塊をストマッチャーバッグに入れ、チオグリコール酸培地II 100mlを加え、45℃で嫌氣的に一晩増菌培養した。それをウェルシュ菌選択培地であるSFP寒天培地に塗布し、37℃で一晩嫌氣的に培養し、菌の分離を行った。菌数測定はMost Probable number(MPN)法を用いた。この方法は、クロストリジウム選択培地(DRCM培地)にサンプルの10段階希釈液を加え嫌氣的に培養し、陽性の出現率から検体中の菌数を確率論的に推計する方法である。

分離菌株の遺伝学的検討: SFP寒天培地を使用し分離した菌を、TGY培地を用い純培養した。純培養した菌を増菌したもの、もしくは、上記のチオグリコール酸培地IIで増菌したものからInstaGene

matrix (BioRad 社製)を用い、DNA を分離し、Multiplex PCR を行った。これにより、ウェルシュ菌の型の同定、*cpe* 遺伝子の有無と保有場所を検討した。さらに、ハウスキーピング遺伝子の1つである *sod* 遺伝子を基にした SLST(Single Locus Sequence Typing)法による系統樹を作製し、今回分離した菌株と比較に使用した菌株の分子疫学的解析を行った。

芽胞の耐熱性(D<sub>100</sub> 値：100℃で細菌数を 1/10 に減少させる時間(分))とエンテロトキシン産生能の検討：純培養した菌を芽胞形成用培地である DS 培地を用い 37℃、24 時間培養後、75℃、20 分加熱し、芽胞の状態にする。芽胞の状態になった菌を 100℃で様々な時間加熱後、BHI 寒天培地に培養し、生き残った数より D 値を計算した。エンテロトキシン産生能は感作ラテックスによる検出法を利用したウェルシュ菌エンテロトキシン検出用キット(PET-RPLA:デンカ生研)にて毒素を検出し、評価した。

#### [結果]

食肉 200 サンプル中 142 サンプルからウェルシュ菌が検出された。検出率は 71%で、アメリカの調査(31~80%)と比較し、同程度であった。食肉中に含まれる菌数は鶏挽肉が 3.6 cfu(colony forming unit)/g 未満で、その他は 3 cfu/g 未満であった。アメリカの調査結果は 3~36 cfu/g で、日本は非常に少ないと言える。

純培養した菌 212 株は全て A 型であり、そのうち *cpe* 遺伝子を保有している株は 3 株であった。サンプルから分離、純培養した菌を使用する検出方法は複雑な行程を経ており、サンプル中の全ての菌を分離出来ていないと考えられる。そこで、増菌培養したチオグリコール酸培地 II より直接 DNA を分離し、型の同定、*cpe* 遺伝子保有の有無も検討した。この方法では 147 サンプルが A 型ウェルシュ菌陽性(73.5%)となり、分離した場合の検出率(71%)とほぼ一致した。また、*cpe* 遺伝子の保有は 8 サンプルあり、*cpe* 遺伝子保有率は 4%で、アメリカの調査(5%)と同程度であった。

次に、*cpe* 遺伝子の下流配列を検出する方法により、*cpe* 遺伝子が染色体上にあるタイプ(*IS1470*)か、プラスミド上にあるタイプ(*IS1151* あるいは *IS1470-like*)かを検討した。8 サンプル中 4 サンプルはプラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有している株であり、すべて *IS1470-like* タイプであった。残り 4 サンプルは PCR による検出が出来ず、不明と言う結果になった。

細菌の生存の根幹に係る遺伝子で、進化上の変異が少ないと言われているハウスキーピング遺伝子の1つである *sod* を利用し系統樹を作製し、今回得られた分離株の分子疫学的分析を行なった。染色体上に *cpe* 遺伝子を保有する株は日本、ヨーロッパ、アメリカいずれの地域で分離された株であっても 1 つの cluster 群に集まった。プラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有する株では、同一の地域(富山)で発生した 1980 年と 2001 年の食中毒事例の 2 株、ヨーロッパで分離された散発性下痢症由来の 3 株と今回検出された株は同じ cluster 群に属していた。したがって、今回検出された株は食中毒を起こす可能性があると考えられる。

最後に、プラスミド上に *cpe* 遺伝子が存在することが明らかになった 3 株について、芽胞の耐熱性を検討した。D<sub>100</sub> 値は染色体上に *cpe* 遺伝子を保有している株では 16.5 と高い値を示す。今回我々が分離した株の D<sub>100</sub> 値は 1.3~1.9 で、過去の食中毒事例あるいは下痢症患者からの分離株でプラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有している株の値(2.2~2.5)と比較し、少し低い値であった。また、我々が分離した株はエンドトキシンを産生する事を確認した。

#### [結論]

市販の食肉の約 70%からウェルシュ菌が検出され、その内約 4%が *cpe* 遺伝子を保有していた。挽肉の方が汚染率が高く、個体の小さな鶏、鴨が高い汚染率を示した。これは小さい動物ほど解体時に腸管を傷つける恐れがあり、腸管に常在しているウェルシュ菌に汚染される確率が上がるためと考えられる。アメリカでの市販食肉の調査と比較すると汚染率はほぼ同じであるが、菌量は約 1/10 であり、日本の方が安全であると言える。また、アメリカで検出された *cpe* 保有株はすべて染色体上に *cpe* 遺伝子を保有しており、我々の調査とは違う結果となった。

染色体上に *cpe* 遺伝子を保有しているウェルシュ菌は 100℃で 15 分以上の耐熱性を示すのに比べ、プラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有する菌は約 2 分の耐熱性である。食中毒株は染色体上に *cpe* 遺伝子を保有し、環境や消化管などに存在する株ではプラスミドに存在すると考えられてきたが、近年プラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有する株が原因と考えられる食中毒事例の存在が報告されてきた。今回検

出した株も食中毒を起こす可能性があると考えられる。

しかし、市販の食肉中に含まれる菌量は0~3.6 cfu/gと極めて少なく、食中毒を起こすとされている摂取量 $10^8\sim 10^9$ cfu/gとはかけ離れている。不完全な調理と不適当な食品の保存が菌の増殖、生存に好都合であるので、正しく管理、調理すれば問題ないと考えられる。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年3月31日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文内容について審査を行なった。

ウェルシュ菌による食中毒は世界各国で発生しており、食品媒介感染症原因菌として認識されているが、市販肉の汚染状況はアメリカ、ピッツバーグ大学のQ. Wenらが2004年に報告した調査があるだけで、ほとんど行われていない。今回、国内での市販肉のウェルシュ菌による汚染状況の調査をすることを目的に本研究を行った。

スーパーマーケット、食肉店から食肉200サンプル（鶏肉、牛肉、豚肉、鴨肉、羊肉）を購入し、ウェルシュ菌汚染率、食中毒の原因となるエンテロトキシン(*cpe*)遺伝子保有率を検討した。増菌培養から分離、純培養する検出方法と増菌培養したものから直接PCRによる検出方法を行なったが、共にウェルシュ菌検出率は約70%であった。また、直接PCRによる検出方法により、*cpe*遺伝子保有率は約4%という結果となった。この結果はアメリカでの調査とほぼ同程度であったが、菌量は0~3.6個/gと極めて少なく、アメリカの結果と比較すると約1/10程度であった。食中毒を起こすとされている摂取量は $10^8\sim 10^9$ 個/gと言われており、食肉より検出された菌量はかけ離れて少ない事が明らかとなった。

ウェルシュ菌には、*cpe*遺伝子を染色体上に保有する株とプラスミド上に保有する株(*IS1151*あるいは*IS1470-like*)があるが、我々が分離した株はプラスミド上にある*IS1470-like*タイプであった。また、我々の分離した株が実際にエンテロトキシンを産生する事を確認した。さらに、芽胞の耐熱性を検討した所、 $D_{100}$ 値(100℃の加熱で、細菌が1/10に殺菌される時間)が1.3~1.9分であった。プラスミド上に*cpe*遺伝子を保有する過去の食中毒患者からの分離株の値(2.2~2.5分)と比較すると、少し低い値であった。

次に、過去の食中毒患者から分離された株や、散发性下痢症から分離された株と共に今回分離した61株を用い、系統樹を作製した。その結果、染色体上に*cpe*遺伝子を保有する株は日本、ヨーロッパ、アメリカいずれの地域で分離された株であっても、1つのクラスターに集まった。また、プラスミド上に*cpe*遺伝子を保有する株はどちらのタイプであっても、同じクラスターに属し、同一の地域（富山）で発生した1980年と2001年の食中毒事例からの分離株、ヨーロッパで分離された散发性下痢症由来の株と今回分離された株が同じクラスターに属していた。したがって、今回検出された株は食中毒を起こす可能性が十分あると考えられる。

本研究によって、日本の市販食肉の約70%からウェルシュ菌が検出され、その内約4%が*cpe*遺伝子を保有する株である事が明らかになった。本結果はウェルシュ菌による食中毒発生に関しての新たな知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

|         |   |          |          |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第909号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成26年6月3日   |          |          |
| 氏名      | 石黒 真理子  |          |          |
| 学位論文の題目 | Evaluation of the quality of life of lupus erythematosus patients with cutaneous lesions in Japan<br><br>(日本における皮膚病変を有するループス関連疾患患者の QOL に対する検討) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 宮下 和久 |          |
|         | 副査  | 教授 重松 隆  | 教授 古川 福実 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) や皮膚ループスエリテマトーデス (cutaneous lupus erythematosus; CLE) を含むループス関連疾患 (以下、LE) の多くは皮膚症状を有し、急性期・慢性期を通じて皮膚病変が出没する。治療の発展により LE の生命予後は大幅に改善し、今後は患者の quality of life (QOL) の向上が期待されている。しかしながら、欧米では LE 患者の QOL は低いといわれており、その程度は他の重症疾患と同等、あるいはそれ以上であるという報告もある。一方、アジアでは LE 患者の QOL についての報告は少なく、特に本邦ではその実態や関連要因についての検討はなされていない。

本研究では、皮膚疾患の QOL 評価ツールである Skindex-29 日本語版を用いて、LE の皮膚症状が QOL に及ぼす影響を検討し、また皮膚病変の重症度との相関についても Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index (CLASI) を用いて解析を行った。

### 【対象・方法】

皮膚科を受診した皮疹を有する LE 患者 54 例を対象とした。

外来初診時あるいは治療前に、患者は Skindex-29 日本語版に回答し、同時に、主治医は CLASI を用いて皮膚病変の重症度を評価した。治療介入後も同様に Skindex-29 の回答と CLASI の評価を行い、もっとも最近のデータを使用した。

Skindex-29 とは皮膚疾患の QOL 評価を目的とした質問表で、30 項目の質問で構成されている。各質問項目は、「感情 (Emotions)」、「症状 (Symptoms)」、「機能 (Functioning)」の 3 つの下位尺度のいずれかに含まれる。各尺度の回答は 0 点から 100 点までの点数に換算され、得点が高いほど日常生活が障害される程度が高い (QOL が低い) ことを表す。また、CLASI は、新しく提唱された皮膚 LE の重症度評価ツールで、活動性スコア (activity score) は紅斑、鱗屑・肥厚、粘膜病変、脱毛、慢性病変スコア (damage score) は色素異常、瘢痕形成・萎縮・脂肪織炎、頭部瘢痕の病変で評価され、各スコアは病変の程度を数値化したものを合算する。

### 【結果】

#### 1) 患者背景

患者は女性 46 名、男性 8 名、平均年齢は  $48.4 \pm 13.3$  歳 (平均  $\pm$  標準偏差) であった。全体の平均罹病期間は  $11.2 \pm 6.8$  年で、SLE で  $11.6 \pm 7.5$  年、CLE で  $9.6 \pm 5.7$  年であった。疾患の内訳は、SLE 34 名、CLE 18 名 (うち、広汎型円板状ループスエリテマトーデス 9 名、限局型円板状ループスエリテマトーデス 2 名、凍瘡状ループスエリテマトーデス 4 名、深在性ループスエリテマトーデス 2 名、lupus erythematosus tumidus 1 名)、混合性結合組織病 1 名、SLE と全身性強皮症のオーバーラップ症候群 1 名から成った。SLE の疾患活動性は、Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

(SLEDAI) で  $6.7 \pm 4.3$  であった。炎症性脱毛は 18 名が、光線過敏は 21 名が、診察時に症状あるいは過去に既往を有した。

## 2) 治療前後の Skindex-29 の変化

治療前後で Skindex-29 の値は、「感情」で  $52.6 \pm 27.3$  から  $24.5 \pm 22.5$ 、「症状」で  $42.9 \pm 23.8$  から  $27.9 \pm 21.7$ 、「機能」で  $33.0 \pm 22.5$  から  $14.2 \pm 17.1$  にいずれの下位尺度でも有意に低下していた ( $p < 0.000001$ )。

### a) 性差

女性ではいずれの下位尺度でも治療前後で有意に Skindex-29 の値が低下したが ( $p < 0.005$ )、男性では「感情」と「機能」のみで有意な低下がみられた ( $p < 0.05$ )。また、「機能」では有意差をもって女性が男性より高得点で、「感情」でも同様の傾向がみられた。

### b) 病型

対象の大多数を占める SLE と CLE で検討した。SLE、CLE とともに、すべての下位尺度において治療前後で有意に Skindex-29 の値が低下した ( $p < 0.005$ )。SLE と CLE を直接比較したところ、差はみられなかった。

### c) 炎症性脱毛

炎症性脱毛の有無にかかわらず、治療前後で「感情」と「機能」は明らかな有意差をもって Skindex-29 の値が低下したが ( $p < 0.0005$ )、脱毛を有する群の「症状」では差は認められたもののやや弱かった ( $p < 0.05$ )。炎症性脱毛の有無と Skindex-29 との統計学的相関は認めなかったが、全体的に脱毛を有するほうの得点が高かった。

### d) 光線過敏

光線過敏の有無にかかわらず、治療前後ですべての下位尺度において有意に Skindex-29 の値が低下した ( $p < 0.001$ )。光線過敏の有無と Skindex-29 との統計学的相関は認めなかったが、全体的に光線過敏を有するほうが高得点であった。

### e) その他の関連項目

治療前の「症状」面で、高齢であるほうが QOL が障害される傾向があり、その傾向は CLE より SLE に強いようであった。また、治療後の「機能」面で、罹病期間が長いほうが SLE の QOL が障害される傾向にあった。

## 3) QOL と CLASI

治療前後で CLASI の activity score は  $12.6 \pm 8.4$  から  $2.0 \pm 2.6$  に有意に低下し、damage score は  $1.4 \pm 2.0$  から  $2.7 \pm 3.9$  に有意に増加した。

さらに Skindex-29 と CLASI との相関を解析した。治療前において、「感情」と「機能」では有意に、activity score の上昇とともに QOL が障害されていた。治療前の damage score、治療後の activity score および damage score と Skindex-29 は関連を認めなかった。

### 【考察・結語】

1) 治療介入によって、皮膚疾患を有する LE 患者の QOL は向上していた。治療前においては、女性であることは「機能」面の QOL 低下のリスクファクターであることがわかった。また、治療前において女性は「感情」面で、高齢は「症状」面で、治療後においては SLE の長い罹病期間が「機能」面で、低 QOL に影響する傾向が示唆された。

2) CLASI を用いた解析では、急性期の皮膚病変の重症度が、「感情」面および「機能」面で QOL 低下と相関することが明らかになった。

本研究は、本邦で初めて皮膚疾患を有する LE 患者の QOL について評価したものであり、本邦の LE 診療の基礎データになるであろう。また、CLASI は皮膚症状の重症度評価や治療効果判定だけでなく、患者の QOL 評価にも有用であることを支持する結果となった。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年4月10日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus; SLE）や皮膚ループスエリテマトーデス（cutaneous lupus erythematosus; CLE）を含むループス関連疾患（以下、LE）の多くは皮膚症状を有し、急性期・慢性期を通じて皮膚病変が出現する。LE患者の quality of life (QOL) は低下しているといわれているが、本邦ではその実態や関連要因についての検討はなされていない。本研究では、皮膚疾患の QOL 評価法である Skindex-29 を用いて、LE の皮膚症状が QOL に及ぼす影響を検討し、また皮膚病変の重症度との相関についても Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index (CLASI) を用いて解析を行った。

皮膚科を受診した皮疹を有する LE 患者 54 例を対象とした。外来初診時あるいは治療前に、患者は Skindex-29 に回答し、同時に、主治医は CLASI を用いて皮膚病変の重症度を評価した。治療介入後も同様に Skindex-29 の回答と CLASI の評価を行った。

患者全体において、治療前後で Skindex-29 の下位尺度「感情」「症状」「機能」のすべてで、有意に QOL は改善した。続いて、性別、病型、炎症性脱毛や光線過敏の有無、年齢、罹病期間の各因子でも QOL を評価検討した。治療前においては、女性であることは「機能」面の QOL 低下のリスクファクターであることが明らかになった。また、治療前において女性は「感情」面で、高齢は「症状」面で、治療後においては SLE の長い罹病期間が「機能」面で、QOL の低下に影響する傾向が示唆された。

さらに、CLASI と QOL との関連を分析した。CLASI とは皮膚 LE の新たな指標で、activity score（活動性スコア）と damage score（慢性病変スコア）に分けて皮疹重症度をスコア化したものである。治療前において、CLASI の activity score の重症度は、「感情」面および「機能」面で QOL の低下と相関することが明らかになった。

本研究は、本邦で初めて皮膚疾患を有する LE 患者の QOL について評価したものであり、本邦の LE 診療の基礎データになるであろう。また、CLASI は皮膚症状の重症度評価や治療効果判定だけでなく、患者の QOL 評価にも有用であることを支持する結果となった。

本研究および論文は、今後の QOL の維持・向上を考慮した診療の一助となることが大いに期待され、学位論文として価値あるものとして認めた。



|         |  |          |           |
|---------|--|----------|-----------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第910号   |          |           |
| 学位授与の日  | 平成26年6月3日  |          |           |
| 氏名      | 金子 郁子  |          |           |
| 学位論文の題目 | Detection of Enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> in Meat Samples by Using Molecular Methods<br>(分子生物学的手法を用いた食肉中の腸管病原性 <i>Clostridium Perfringens</i> の検出) |          |           |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 宮下 和久 |           |
|         | 副査   | 教授 平井 秀一 | 教授 西尾 真智子 |

## 論文内容の要旨

### [緒言]

近年、微生物汚染源追跡 (Microbial Source Tracking: MST) と呼ばれる方法により、環境における微生物の広がりを追跡し、汚染源を正確に特定することによって、水質改善やリスクアセスメントに役立つ情報を得る事が出来る。食品の微生物汚染を追跡し、食品由来の細菌性疾患を予防するためにも MST は大変有用である。しかし、細菌性食中毒の原因の1つである *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) は、環境に広く存在するため、特定して追跡する事が困難であり、MST を用いるには適した菌ではないと考えられている。

ウェルシュ菌は、芽胞を形成するグラム陽性嫌気性桿菌で、日本において原因物質別で毎年 3~4 位の食中毒患者が発生する。食中毒の病原因子は本菌が産生するエンテロトキシン (CPE) であるが、*cpe* 遺伝子を保有している本菌はごく一部で、*cpe* 遺伝子を染色体上に保有している株とプラスミド上に保有している株がある事が解っている。以前、市販肉製品の本菌による汚染状況を検討したところ、約 70% と高い汚染率であった。しかし、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はそのうち約 5% であり、菌量は非常に少なく、多い物でも 3 個/g であった。したがって、汚染食品の摂取により食中毒が発生するにもかかわらず、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の検出は容易ではなく、現在、決まったプロトコールもない状況である。

*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は環境中に存在するウェルシュ菌の一部にすぎない事から、この *cpe* 遺伝子を利用し、MST に基づいた疫学的調査を実施する事で、本菌による食中毒発生の防止が可能であると着想した。疫学調査では同時に多数のサンプルを検査する必要があり、非常に少ない *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を検出するための高感度で特異性の高い分子生物学的検出法を検討した。

### [材料と方法]

1. *cpe* 遺伝子を検出する分子生物学的手法として、PCR 法、nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法を用い、比較した。
2. DNA の調整には QIAamp DNA stool minikit (Qiagen)、ISOGEN (WAKO)、InstaGene (BioRad) の3種類のキットを使用し、比較した。
3. ウェルシュ菌は染色体上に *cpe* 遺伝子を保有する食中毒株 NTCT8239 株とプラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有する食中毒株 T16 株を使用した。  
特異性を判定するための陰性コントロールとして食中毒由来 *Bacillus cereus* 分離株 4 株、*Clostridium botulinum* 5 株、食肉由来分離株 (*Clostridium* 属 5 株と連鎖球菌 1 株)、*cpe* 遺伝子を保有しないウェルシュ菌 4 株 (タイプ B~E) を使用した。
4. 食肉サンプルから *cpe* 遺伝子検出に必要な菌数の推定: NTCT8239 株を TGY 培地 (嫌気性菌増菌用培地) で一晚増菌し、その段階希釈液を食肉に添加混和した後、抽出液から DNA を調整し、*cpe* 遺伝子を検出し、検討した。

5. 食肉サンプルから *cpe* 遺伝子検出に必要な培養時間の推定：NTCT8239 株または T16 株を用い、TGY 培地もしくは DS 培地(芽胞形成用培地)で一晩増菌し、同様に検討した。

#### [結果]

1. PCR 法、nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法の 4 種類のいずれの方法でも NTCT8239 株より *cpe* 遺伝子を検出できた。タイプ E のウェルシュ菌以外の陰性コントロールに使用した全ての菌は、いずれの方法でも陰性となった。タイプ E のウェルシュ菌は PCR 法と nested PCR 法で陽性となったが、これは *cpe* 遺伝子の相同配列を検出したと考えられる。
2. *cpe* 遺伝子検出に必要な菌数は PCR 法では  $10^4 \sim 10^8$  個/g、nested PCR 法では  $10^2 \sim 10^7$  個/g、real time PCR 法では  $10^4 \sim 10^7$  個/g、そして LAMP 法では  $10^4 \sim 10^7$  個/g であった。これらの結果より、人工的に汚染させた肉サンプルから *cpe* 遺伝子検出するためには  $10^3$  個/g より多くの菌数がないと検出できない事が明らかになった。
3. *cpe* 遺伝子検出のための DNA の調整に必要な菌数と手技の数は QIAamp DNA stool minikit で  $10^4 \sim 10^8$  個/g (18~19 ステップ)、ISOGEN で  $10^3 \sim 10^5$  個/g (7 ステップ)、InstaGene で  $10^2 \sim 10^6$  個/g (2 ステップ) であった。必要な菌数と作業の複雑さを考慮すると、InstaGene が最も適していると考えられた。
4. 検出するためには菌数が  $10^3$  個/g より多く必要なことより、肉サンプルに少量の菌数しか存在しない *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を、検出可能な菌数まで増やす必要がある。その必要培養時間を明らかにするため、市販肉製品汚染状況の結果より 3 個/g 以下の菌を挽肉に混ぜ、*cpe* 遺伝子検出陽性となるまでの時間を検討した。染色体上に *cpe* 遺伝子を保有する株でもプラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有する株でもほぼ同様の時間が必要であり、また栄養型 (TGY 培地) でも芽胞状態 (DS 培地) でもほぼ同様の時間が必要と言う結果になり、全てのサンプルが陽性になるには 7 時間以上の培養が必要であった。

#### [考察]

菌数が 3 個/g 以下というサンプルでも、7 時間以上培養し、InstaGene のキットを使用する事で 4 ステップで DNA 調整ができ、PCR 法、nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法の 4 種類のいずれの方法でも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を効率よく検出できる事が解った。この方法は、特異性も優れており、きわめて高感度であると言える。また、疫学調査は大量のサンプルを扱う事になるため、手技が多いと効率が悪く、汚染の危険性も大きくなるが、この点においても、本方法は優れた方法と言える。

今回検討したプロトコールを利用した分子生物学的手法を MST に用いる事により、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の食品への汚染や媒介食物の確認が可能になり、食中毒の予防のためのデータ収集に非常に役立つと考えられる。

本研究の内容は、第 85 回日本細菌学会総会 (2012 年)、長崎で発表した。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 26 年 5 月 20 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

近年、微生物汚染源追跡 (Microbial Source Tracking: MST) と呼ばれる方法により、環境における微生物の広がりを追跡し、汚染源を特定することによって、水質改善やリスクアセスメントに役立つ情報を得る事が出来る。食品の微生物汚染を追跡し、食品由来の細菌性疾患を予防するためにも MST は大変有用である。細菌性食中毒の原因の 1 つである *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) は、環境に広く存在するため、特定して追跡する事が困難であり、MST を用いるには適した菌ではないと考えられている。しかし、腸管毒素を作る *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は環境中に存在するウェルシ

ユ菌の一部にすぎない事から、この *cpe* 遺伝子を利用し、MST に基づいた疫学的調査を実施する事が可能であると着想した。混入菌量も少ない *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の検出は容易ではなく、現在、決まったプロトコールもない状況である。そこで、今回、非常に少ない *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を検出するための高感度で特異性の高い分子生物学的検出法を検討した。

*cpe* 遺伝子を検出する分子生物学的手法として、PCR 法、nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法を用い、比較した。ウェルシュ菌は染色体上に *cpe* 遺伝子を保有する株とプラスミド上に *cpe* 遺伝子を保有する株を使用した。

まず、特異性を判定するために、陰性コントロールとして *Bacillus cereus*、*Clostridium botulinum*、食肉由来分離株(*Clostridium* 属と連鎖球菌)、*cpe* 遺伝子を保有しないウェルシュ菌 4 株を使用して検討したところ、4 種類のいずれの方法でも *cpe* 遺伝子を検出できた。タイプ E のウェルシュ菌以外の陰性コントロールに使用した全ての菌は、いずれの方法でも陰性となった。タイプ E のウェルシュ菌は PCR 法と nested PCR 法で陽性となったが、これは *cpe* 遺伝子の相同配列を検出したと考えられた。

次に、人工的に汚染させた肉サンプルから *cpe* 遺伝子検出するための菌数を検討した。大量の資料を対象とする DNA の調整には QIAamp DNA stool minikit(Qiagen)、ISOGEN LS(WAKO)、InstaGene matrix(BioRad)の 3 種類のキットを使用し、4 つの分子生物学的手法と組み合わせて比較したところ、*cpe* 遺伝子検出のための DNA の調整に必要な菌数と手技の数から InstaGene matrix が最も適していると考えられ、 $10^3$  個/g より多くの菌数がないと検出できない事が明らかになった。

さらに、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を、検出可能な菌数まで増やすための必要培養時間を明らかにするため、市販肉製品汚染状況の結果より 3 個/g 以下の菌を挽肉に混ぜ、*cpe* 遺伝子検出陽性となるまでの時間を検討した。*cpe* 遺伝子を染色体上に保有する株、プラスミド上保有する株、芽胞状態の株でもほぼ同様の時間が必要という結果になり、全てのサンプルが陽性になるには 7 時間以上の培養が必要であった。

菌数が 3 個/g 以下というサンプルでも、7 時間以上培養し、InstaGene のキットを使用する事で 4 ステップで DNA 調整ができ、PCR 法、nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法の 4 種類のいずれの方法でも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を効率よく検出できる事が解った。この方法は、特異性も優れており、きわめて高感度であると言える。今回検討したプロトコールを利用した分子生物学的手法を MST に用いる事により、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の食品への汚染や媒介食物の確認が可能になり、食中毒の予防のためのデータ収集に非常に役立つと考えられる。

本研究は、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の疫学調査のための分子生物学的手法に新たなプロトコールを示し、学位論文として価値あるものと認めた。

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第911号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成26年7月8日  |          |          |
| 氏名      | 桐山 茂久  |          |          |
| 学位論文の題目 | CEACAM1 Long Cytoplasmic Domain Isoform is Associated with Invasion and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma.<br>(CEACAM1 細胞内ドメイン long isoform と肝細胞癌の浸潤・転移に関連する検討) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 一瀬 雅夫 |          |
|         | 副査   | 教授 近藤 稔和 | 教授 山上 裕機 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

肝細胞癌は非常に予後不良な悪性疾患の一つであり、肝細胞癌における新規の悪性度評価の開発が期待されている。I型膜貫通型糖蛋白の接着分子である carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)は、細胞内ドメインが長いCEACAM1-Long cytoplasmic domain (CEACAM1-L)と細胞内ドメインが短いCEACAM1-Short cytoplasmic domain (CEACAM1-S)の2つのcytoplasmic domain isoformを有している。

現在まで、正常肝や肝細胞癌でCEACAM1が発現しており、CEACAM1の発現低下が肝細胞癌の予後不良因子となることは報告されている。しかしながら、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceが肝細胞癌悪性度にどのように影響しているかの報告はない。本研究では、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceが肝細胞癌において悪性度や予後に関与するかどうかを臨床的に検討し、さらにCEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceが肝細胞癌の浸潤等に関与するか、さらにそのメカニズムについて基礎的に検討を行った。

### 【方法】

実験 I. 肝細胞癌におけるCEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceと悪性度との検討

#### 1. 免疫組織化学染色

和歌山県立医科大学第二外科にて肝切除術を施行した肝細胞癌症例154例のホルマリン固定組織標本よりパラフィン包埋切片を作製し、酵素標識ポリマー法にて免疫組織化学染色を行った。1次抗体はCEACAM1抗体(29H2)、CEACAM1-L抗体、及びCEACAM1-S抗体(Dr. JE. Shively, City of Hopeより供与)を用いた。染色結果は染色強度と染色範囲でスコア化し統計学的検討を行った。

#### 2. 細胞増殖アッセイ、細胞死アッセイ、細胞浸潤アッセイ

CEACAM1を発現していない肝細胞癌細胞株のうち、浸潤能が強いHLFと浸潤能が低いPLC/PRF/5にそれぞれCEACAM1-4L、CEACAM1-4Sを強制発現させ、細胞増殖アッセイ(BrdU Labeling and Detection Kit III)と細胞死アッセイ(Cell Death Detection Elisa kit)を行い、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceの細胞増殖・細胞死への影響を検討した。さらに上記のCEACAM1 cytoplasmic domain isoform強制発現細胞株に加え、CEACAM1を強く発現している肝細胞癌細胞株HepG2のCEACAM1ノックダウン細胞株を作製し、細胞浸潤アッセイ(Biocoat Matrigel invasion chamber)を行い、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceの浸潤能への影響を検討した。

実験 II. CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceとTGF- $\beta$ シグナルとの関連性の検討

CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceが浸潤の分子機構である上皮間葉転換(EMT)に関与するかどうかを検討するため、EMTを誘導するTGF- $\beta$ シグナルとの関連性を検討した。TGF- $\beta$ シグナルに関しては $\beta$ 2-spectrin発現と、Smad3の核内移行に関して検討した。

### 1. 免疫組織化学染色

実験 I で CEACAM1 cytoplasmic domain isoform の免疫組織化学染色を施行した症例を対象とし、1 次抗体に  $\beta$ 2-spectrin 抗体 (Dr. L. Mishra, MD Anderson より供与) を用いて免疫組織化学染色を行った。染色結果は染色強度と染色範囲でスコア化し CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance との関連性を検討した。

### 2. 共免疫沈降

CEACAM1 cytoplasmic domain isoform 発現を遺伝子導入で変化させた肝細胞癌細胞株 HLF と PLC/PRF/5 の全細胞抽出液に CEACAM1 抗体 (GM8G5) もしくは  $\beta$ 2-spectrin 抗体 (ab72239) を添加し、磁気ビーズ法 (Universal Magnetic Co-IP Kit) を用いてタンパク複合体を抽出した。得られたタンパク複合体を用い Western-blotting 法で結合した抗原の確認を行った。

### 3. 免疫蛍光細胞染色

CEACAM1 cytoplasmic domain isoform 発現を遺伝子導入で変化させた肝細胞癌細胞株 PLC/PRF/5 を 4%ホルマリン/PBS で固定し、1 次抗体に Smad3 抗体 (51-1500)、蛍光標識 2 次抗体に Alexa Fluor-488 を使用し免疫蛍光細胞染色を行い、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance の変化と Smad3 核内発現の関連性を検討した。

## 【結果】

### 実験 I.

1. 肝切除症例 154 例のうち 131 例で CEACAM1 発現が見られ、うち 67 例が CEACAM1-L 優位発現、61 例が CEACAM1-S 優位発現であった。患者背景因子、腫瘍の臨床病理学的因子でそれぞれの cytoplasmic domain isoform の群間比較を行ったところ、CEACAM1-L 優位群で有意に多発腫瘍、被膜浸潤、血管浸潤が多いという結果であった。また、再発危険因子の単変量解析、及び多変量解析では腫瘍個数 ( $p < 0.0001$ , Relative Risk 2.45: 95% Confidence Interval 1.59-3.78)、主腫瘍最大径 ( $p = 0.01$ , RR 1.70: 95% CI 1.13-2.55)、CEACAM1-L 優位発現 ( $p = 0.04$ , RR 1.49: 95% CI 1.01-2.1) が独立した因子であった。CEACAM1-L 優位発現群と CEACAM1-S 優位発現群の長期予後を Kaplan-Meier 曲線で比較したところ、CEACAM1-L 優位発現群は無病再発期間、疾患特異的生存期間ともに不良であった。
2. 細胞増殖アッセイでは HLF, PLC/PRF/5 とともに、CEACAM1-4L, CEACAM1-4S を強制発現させても増殖能の変化は認められなかった。一方、細胞死アッセイでは HLF, PLC/PRF/5 とともに CEACAM1-4L を強制発現させた細胞株では vector control と比較して apoptosis が抑制されていた。細胞浸潤アッセイでは、HLF, PLC/PRF/5 とともに CEACAM1-4L を強制発現させた細胞株で浸潤能が増強しており、HLF の CEACAM1-4S を強制発現させた細胞株では逆に浸潤能が抑制されていた。また、CEACAM1 をノックダウンした HepG2 細胞株は control と比較して浸潤能が抑制されていた。

### 実験 II.

1. CEACAM1 cytoplasmic domain isoform の免疫組織化学染色を施行した 128 例のうち、 $\beta$ 2-spectrin が強発現していたものは 70 例、弱発現であったものは 58 例であった。CEACAM1-L 発現優位症例では 67 例中 44 例で  $\beta$ 2-spectrin が強発現していたのに対し、CEACAM1-S 発現優位症例では 61 例中 26 例のみであり、CEACAM1-L 優位発現は CEACAM1-S 優位発現に比べ有意に  $\beta$ 2-spectrin を強く発現していた。
2.  $\beta$ 2-spectrin の共免疫沈降で得られたタンパク複合体に CEACAM1 抗体を用いて Western-blotting を行ったところ、PLC/PRF/5, HLF とともに CEACAM1-4L を強制発現させた細胞株では vector control と比較してより多くの  $\beta$ 2-spectrin と CEACAM1 の複合体が形成されていた。逆に、CEACAM1 の共免疫沈降で得られたタンパク複合体を  $\beta$ 2-spectrin 抗体を用いて Western-blotting を行ったところ、やはり PLC/PRF/5, HLF とともに CEACAM1-4L を強制発現させた細胞株では vector control と比較してより多くの  $\beta$ 2-spectrin と CEACAM1 の複合体が形成されていた。
3. CEACAM1-4L を強制発現させた PLC/PRF/5 では、vector control や CEACAM1-4S を強制発現させたものに比べ、核内に Smad3 発現がより強く認められた。

## 【考察・結論】

本研究にて、CEACAM1-L は肝細胞癌細胞において浸潤能を増強させ、肝細胞癌症例において浸潤・転移・再発等に関連し、cytoplasmic domain isoform balance が CEACAM1-L 優位であることは独立した予後不良因子であることを明らかにした。さらに、CEACAM1-L の肝細胞癌悪性度増強の機序の一つとして、CEACAM1-L が  $\beta$ 2-spectrin 発現を増強、相互作用することにより、TGF- $\beta$  シグナルを介して浸潤が増強されている可能性が示唆された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年5月26日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

I 型膜貫通型糖蛋白の接着分子である carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)は、腫瘍悪性度との関連性が報告されているが、悪性度増強もしくは抑制に作用するかは一定の見解が得られていない。近年になり CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が腫瘍悪性度に重要な役割を果たしているという報告がなされるようになった。本研究は CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が肝細胞癌において悪性度や予後に関与するかどうかを臨床的に検討し、さらに CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が肝細胞癌の浸潤等に関与するか、さらにそのメカニズムについて基礎的に検討を行ったものである。

まずは、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が肝細胞癌において悪性度や予後に関与するか免疫組織化学染色で検討した。結果、CEACAM1-L 優位群で有意に多発腫瘍、被膜浸潤、血管浸潤が多く、無病再発期間、疾患特異的生存期間ともに不良であり、CEACAM1-L 優位発現は独立した再発危険因子であるということが明らかとなった。さらに、CEACAM1-L が浸潤に関与しているかを検討するため CEACAM1-4L、CEACAM1-4S を強制発現させた肝細胞癌細胞株を作成し、細胞浸潤アッセイを行った。結果、CEACAM1-4L を強制発現させた細胞株で浸潤能が増強し、CEACAM1-4S を強制発現させた細胞株では逆に浸潤能が抑制されていた。次に、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が浸潤の分子機構である上皮間葉転換(EMT) に関与するかどうかを検討するため、EMT を誘導する TGF- $\beta$  シグナルとの関連性を検討した。TGF- $\beta$  シグナルに関しては  $\beta$ 2-spectrin 発現と、Smad3 の核内移行に関して検討した。 $\beta$ 2-spectrin 免疫組織化学染色での検討では、CEACAM1-L 優位発現群は CEACAM1-S 優位発現群に比べ有意に  $\beta$ 2-spectrin を強く発現していた。さらに、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance と  $\beta$ 2-spectrin の相互作用の検討のため CEACAM1 cytoplasmic domain isoform を強制発現させた肝細胞癌細胞株で共免疫沈降法を行ったところ、CEACAM1-4L を強制発現させた細胞株でより多く  $\beta$ 2-spectrin と CEACAM1 の複合体が形成されていた。さらに、TGF- $\beta$  シグナル伝達の検討のため Smad3 の免疫蛍光細胞染色を行ったところ、CEACAM1-4L を強制発現させた細胞株において、より核内に Smad3 発現が強く認められた。

以上の結果より、CEACAM1-L は肝細胞癌細胞株において浸潤能を増強させ、肝細胞癌症例において浸潤・転移・再発等に関連し、cytoplasmic domain isoform balance が CEACAM1-L 優位であることは独立した予後不良因子であることが明らかとなった。さらに、CEACAM1-L の肝細胞癌悪性度増強の機序の一つとして、CEACAM1-L が  $\beta$ 2-spectrin 発現を増強、相互作用することにより、TGF- $\beta$  シグナルを介して浸潤が増強されている可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

|         |   |         |          |
|---------|---|---------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第912号  |         |          |
| 学位授与の日  | 平成26年8月5日   |         |          |
| 氏名      | 中田元子  |         |          |
| 学位論文の題目 | Diabetes mellitus suppresses hemodialysis-induced increases in tear fluid secretion<br><br>(糖尿病は、血液透析後に生じる涙液分泌の増加を抑制する) |         |          |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 赤水尚史 |          |
|         | 副査  | 教授 岸岡史郎 | 教授 雑賀司珠也 |

## 論文内容の要旨

### 緒言

慢性腎不全患者での血液透析は種々の合併症を伴う。全身的には不均衡症候群や、動静脈グラフトの感染、心血管障害、自律神経の機能障害、精神的問題、副甲状腺機能亢進などの合併症が、眼科領域においては視力障害、眼圧の変動、黄斑浮腫、角結膜の石灰沈着、結膜上皮の扁平上皮化生などが含まれる。また、慢性腎不全ではドライアイ（涙液分泌減少症とそれに伴う角膜上皮障害）が多いと報告されている。血液透析を施行されている慢性腎不全の患者の中で、糖尿病腎症を原因とする症例で、そうでない症例より角膜上皮障害を呈する割合が多いとの報告がされている。しかし、糖尿病の有無が血液透析後の涙液の分泌変化にどのように影響するかということを調査した報告は無かった。今回、我々は、慢性腎不全で血液透析を受けている症例で、透析前後での涙液量を測定し、血液透析の涙液量に対する影響を、糖尿病の有無に注目して検討した。

### 対象

対象は、名手病院透析内科に通院する透析患者の中で同意を得られた36人71眼(男性26人51眼、女性10人20眼、42~87歳、平均68.9±10.2歳)で、糖尿病が32眼、非糖尿病が39眼であった。本研究は、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。

### 方法

すべての患者に対して、説明し同意を得た。シルマーI法変法を用いて血液透析の直前および直後に涙液量を調べた。シルマーI法変法は、局所麻酔剤（オキシブプロカイン点眼液）を点眼し、5分後に下眼瞼に細長い濾紙を挟み、5分後に濡れた濾紙の長さを測定する方法である。この方法を選んだのは、シルマーI法原法では、局所麻酔剤を用いないため刺激性の分泌を同時に測定することになるためである。今回は、涙液の基礎分泌のみを調べるために局所麻酔剤を用いる変法を採用した。統計的解析はStatcel 2を用いて行った。P < 0.05で有意差が有るとした。血液透析前後の涙液基礎分泌量の検定にはウィルコクソン順位和検定を、糖尿病、非糖尿病のグループ間の違いについてはマン・ウィットニーU検定を用いた。

### 結果

非糖尿病患者においては血液透析後に涙液基礎分泌量が増加していた（ウィルコクソン順位和検定、 $p < 0.05$ ）が、糖尿病患者では変化なかった。平均年齢は、非糖尿病患者において高かった。（マン・ウィットニーU検定、 $p < 0.01$ ）血清クレアチニン値、除水量、治療期間については、非糖尿病患者、糖尿病患者の間で有意差は検出されなかった。

## 考察

涙腺における自律神経支配は、涙液分泌において重要な役割を果たしている。慢性腎不全による尿素の増加は、自律神経障害を引き起こし、涙腺からの涙液分泌が障害されると言われている。今回、慢性腎不全のある糖尿病患者では血液透析の前後で涙液分泌量は変化しないが、非糖尿病患者では血液透析後に涙液基礎分泌量が増加することを認めた。この相違は、糖尿病は、涙液分泌を支配する自律神経に対して不可逆的な障害を与えるということを示唆していると考えられた。

涙液は、ムチン、水分および蛋白質、脂肪よりなる。水分の分泌は、主涙腺および副涙腺よりなされ、trigeminal-parasympathetic nerve reflexにより変化する。求心性の感覚神経、遠心性の交感神経および副交感神経によりコントロールされている。中でも副交感神経が主に水分分泌をコントロールしている。糖尿病患者において、血液透析後に涙液基礎分泌量が増加しなかったのは、糖尿病が涙液量を維持するための自律神経の信号入力を阻害するものである可能性がある。

我々は、刺激性の分泌を排除し、自律神経系による涙液分泌を評価するために、局所麻酔剤を使用する方法を採用した。非糖尿病患者においてのみ、血液透析後に涙液分泌が増加していることを認めしたが、このことは、血液透析が一時的に腎不全による不均衡を改善することによる可能性がある。慢性腎不全患者においては、血液透析の合間の期間に自律神経障害が生じるが、尿毒症が主たる原因である。例えば、慢性腎不全患者の高血圧は、循環量の増加によるものではなく、交感神経の overactivity によるものであり、また交感神経の hyperactivity は、短時間の毎日の血液透析により改善されることが報告されている。

過去の報告で慢性腎不全患者では血液透析前には交感神経が有意であるが、透析後には副交感神経が有意になる。非糖尿病患者での自律神経障害は尿毒症が原因とされるが、糖尿病患者においては、尿毒症だけでなく糖尿病（高血糖）も自律神経障害の原因となり、より重篤である可能性が唱えられている。血液透析後の涙液量の増加は、尿毒症による自律神経障害が改善したことによる可能性がある。一方、糖尿病患者においては血液透析による自律神経障害の改善の程度が低かったことが想定される。このことは、非糖尿病患者に比べて、糖尿病患者ではドライアイ（涙液分泌減少症とそれに伴う角膜上皮障害）の有病率が高いこととも関連すると考察できる。今回、透析直前には糖尿病患者、非糖尿病患者の涙液量には有差がなかったが、年齢による涙腺の萎縮や、透析後の涙液量を考慮すると以前の報告と矛盾しないと考えられた。

## 結論

慢性腎不全のある糖尿病患者では血液透析の前後で涙液分泌量は変化しないが、非糖尿病患者では血液透析後に涙液基礎分泌量が増加した。糖尿病（糖尿病腎症）を合併している場合、血液透析による自律神経障害の機能回復が障害されている可能性が考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 26 年 7 月 14 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

慢性腎不全患者での血液透析は種々の合併症を伴う。全身的には不均衡症候群や、動静脈グラフトの感染、心血管障害、自律神経の機能障害、精神的問題、副甲状腺機能亢進などの合併症が、眼科領域においては、眼圧の変動、黄斑浮腫、角結膜の石灰沈着、結膜上皮の扁平上皮化生などが含まれる。また、慢性腎不全ではドライアイ（涙液分泌減少症とそれに伴う角膜上皮障害）が多いと報告されている。血液透析を施行されている慢性腎不全の患者の中で、糖尿病腎症を原因とする症例では、そうでない症例より角膜上皮障害を呈する割合が多いとの報告がされている。しかし、糖尿病の有無が血液透析後の涙液の分泌変化にどのように影響するかということを調査した報告は無かった。



本研究は、慢性腎不全で血液透析を受けている症例で、透析前後での涙液基礎分泌量を測定し、血液透析の涙液量に対する影響を、糖尿病の有無に注目して検討を行ったものである。その結果、

- 1) 慢性腎不全のある糖尿病患者では血液透析の前後で涙液分泌量は変化しないが、非糖尿病患者では血液透析後に涙液基礎分泌量が増加することを認めた。
- 2) その原因として糖尿病（糖尿病腎症）を合併している場合、血液透析による自律神経障害の機能回復が障害されている可能性が考えられた。

という知見が得られ、血液透析を受けている慢性腎不全患者の中でも、糖尿病患者と非糖尿病患者では血液透析による涙液量の変化に違いがあり、これは透析による自律神経障害の改善の有無により生じるものとの仮説を立て得た。

以上、本論文は、糖尿病患者と非糖尿病患者では血液透析による涙液基礎分泌量の変化に違いがあることを初めて明らかにしたものであり学位論文として価値あるものと認めた。

|         |  |          |        |
|---------|--|----------|--------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第913号   |          |        |
| 学位授与の日  | 平成26年10月14日  |          |        |
| 氏名      | 西畑 雅也  |          |        |
| 学位論文の題目 | Effect of Kampo extracts on urinary stone formation:<br>An experimental investigation<br><br>(尿路結石症に対する漢方治療についての基礎的検討) |          |        |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 重松 隆  |        |
|         | 副査   | 教授 吉川 徳茂 | 教授 原 勲 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

尿路結石症は、生涯罹患率が男性で9%、女性で3.8%と極めて頻度の高い疾患であり、低侵襲治療が確立されているが、再発率が50%にもおよぶことから結石形成そのものを阻止する治療法が求められている。尿路結石の約80%を占める尿酸カルシウム結石は、尿中での結晶形成、成長、凝集した結晶が、尿細管細胞へ付着することによって臨床的結石の形成に至る。これらの結石形成過程を漢方治療によって抑制し、再発予防の可能性を追究するため検討した。

### 【方法】

14種類の漢方成分（沢瀉、猪苓、茯苓、阿膠、滑石、金錢草、芍薬、甘草、山梔子、地黄、当帰、木香、黄芩、木通）と2種類の漢方製剤（猪苓湯、五淋散）を溶解し、水溶性成分を実験に使用した。

#### 1) 結晶凝集阻止能の検討

漢方成分溶液 50 $\mu$ l と 7.5mM 塩化カルシウム溶液 100 $\mu$ l 及び 5mM 尿酸ナトリウム溶液 150 $\mu$ l を混合し、尿酸カルシウム結晶を形成させ、血小板凝集を測定する aggregometer を用いて漢方溶液の凝集阻止能を測定した。

#### 2) 尿細管細胞への結晶付着阻止能の検討

遠位尿細管由来の MDCK 細胞に 0.5mg/ml 尿酸カルシウム結晶を加え反応させた後、細胞表面を洗浄し、細胞に付着していない結晶を除去。細胞表面に付着した結晶は 5N 塩酸で溶解し、そのカルシウム濃度を原子吸光分析で定量化した。各種漢方成分は細胞に反応させる直前に結晶懸濁液に添加し、その結晶付着阻止能を測定した。さらに、漢方成分溶液で尿酸カルシウム結晶を 15 分間前処理した場合と、MDCK 細胞を 15 分間前処理した場合の結晶付着阻止能を比較することによって、漢方成分が結晶あるいは細胞のいずれに作用しているのかについても検討した。

#### 3) ラット腎結石モデルにおける結晶沈着抑制効果の検討

ラットにエチレングリコール水と活性型ビタミン D3 を強制投与することによってラット腎結石モデルを作成し、山梔子を 10mg/body、20mg/body、50mg/body 各群 4 匹に対して経口投与して、腎組織内のカルシウム濃度を測定することによって、腎に沈着した尿酸カルシウム結晶を定量し、結晶沈着抑制効果を検討した。

### 【結果】

#### 1. 結晶凝集阻止能の結果

各種漢方成分 10 $\mu$ g/ml で尿酸カルシウム結晶の凝集に対する影響を検討したところ、山梔子が 84.5% と最も強い結晶凝集阻止能を示し、次いで地黄、沢瀉、金錢草がそれぞれ 64.2%、64.19%、63.0% であった。最も強い効果のみられた山梔子の結晶凝集阻止能は濃度依存性であり、1 $\mu$ g/ml で 35.3%、10 $\mu$ g/ml で 84.5% であった。

## 2. 尿細管細胞への結晶付着阻止能の結果

各種漢方成分 10 $\mu$ g/ml で結晶付着阻止能を検討したところ、山梔子が 88.2%と最も強い結晶付着阻止能を示し、次いで沢瀉、当帰、金錢草がそれぞれ 54.6%、36.6%、32.6%であった。最も強い効果のみられた山梔子は濃度依存性であり、6.67 $\mu$ g/ml で 27.1%、33.3 $\mu$ g/ml で 94.6%であった。漢方方剤である猪苓湯および五淋散の影響を検討したところ、50 $\mu$ g/ml では猪苓湯の結晶付着阻止能は 48.9%であったのに対し、山梔子、沢瀉、当帰を含有する五淋散では 91.3%とより強い阻止能が認められた。また、漢方成分による結晶付着抑制機序を明らかにするため、10 $\mu$ g/ml の山梔子および沢瀉で蓚酸カルシウム結晶を前処理した場合の結晶付着阻止能を検討したところ、それぞれ 86.4%、64%であり、細胞を前処理した場合に比べ有意に強い抑制活性が認められた。したがって、山梔子および沢瀉は結晶に作用して尿細管細胞への付着を抑制するものと考えられた。

## 3. ラット腎結石モデルにおける結晶沈着抑制効果の結果

山梔子 50mg 投与群の腎組織内カルシウムは平均 190 $\mu$ g/tissue(g)とコントロールの平均 697 $\mu$ g/tissue(g)に比べ有意に低く、蓚酸カルシウム結晶沈着に対する山梔子の抑制効果が認められた。

### 【考察】

山梔子には結石の凝集や細胞への付着を抑制する作用があり、ラットモデルでも結石の形成を抑制した。山梔子を含む漢方製剤が結石の再発予防になりえる可能性が示唆された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 26 年 7 月 30 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

尿路結石の形成過程を漢方治療によって抑制できるか 14 種類の漢方成分（沢瀉、猪苓、茯苓、阿膠、滑石、金錢草、芍薬、甘草、山梔子、地黄、当帰、木香、黄芩、木通）と 2 種類の漢方製剤（猪苓湯、五淋散）を使用して検討し、再発予防としての漢方治療の可能性を追究した。

結石の成長を抑制する蓚酸カルシウム結晶の凝集阻止能の検討では、山梔子が 84.5%と最も強い結晶凝集阻止能を示し、次いで地黄、沢瀉、金錢草がそれぞれ 64.2%、64.1%、63.0%であった。

次に蓚酸カルシウム結晶の尿細管細胞への付着を抑制することが、臨床的結石形成を抑制するため、尿細管細胞への付着阻止能を検討したところ、山梔子が 88.2%と最も強い結晶付着阻止能を示し、次いで沢瀉、当帰、金錢草がそれぞれ 54.6%、36.6%、32.6%であった。漢方方剤である猪苓湯および五淋散 50 $\mu$ g/ml で検討したところ、猪苓湯の結晶付着阻止能は 48.9%であったのに対し、山梔子、沢瀉、当帰を含有する五淋散では 91.3%とより強い阻止能が認められた。また、漢方成分による結晶付着抑制機序を明らかにするため、10 $\mu$ g/ml の山梔子および沢瀉で蓚酸カルシウム結晶を前処理した場合の結晶付着阻止能を検討したところ、それぞれ 86.4%、64%であり、細胞を前処理した場合に比べ有意に強い抑制活性が認められた。したがって、山梔子および沢瀉は結晶に作用して尿細管細胞への付着を抑制するものと考えられた。

最後に、エチレングリコール水と活性型ビタミン D3 を強制投与するラット腎結石モデルで、*in vitro* で最も抑制効果のあった山梔子を経口投与して、ラット腎結石モデルにおける結晶沈着抑制効果を検討した。山梔子 50mg 投与群の腎組織内カルシウムは平均 190 $\mu$ g/tissue(g)とコントロールの平均 697 $\mu$ g/tissue(g)に比べ有意に低く、蓚酸カルシウム結晶沈着に対するラット腎結石モデルでの山梔子の抑制効果が認められた。

本論文は山梔子を含む漢方製剤が結石の再発予防になりえる可能性を示唆し、学位論文として価値あるものとして認めた。

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第914号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成26年11月18日  |          |          |
| 氏名      | 吉村 祥子  |          |          |
| 学位論文の題目 | Identification of an HLA-A2-Restricted Epitope Peptide Derived from Hypoxia-Inducible Protein 2 (HIG2)<br>(低酸素誘導タンパク質2 (HIG2) 由来 HLA-A2 拘束性エピトープペプチドの同定) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 原 勲   |          |
|         | 副査   | 教授 改正 恒康 | 教授 山上 裕機 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

がん免疫療法は、副作用の少ない新規がん治療法として注目されている。本研究では、腫瘍特異的に高発現し、腫瘍の生存に必須の分子である低酸素誘導タンパク質2 (Hypoxia-inducible protein 2; HIG2) を標的抗原とするがん免疫療法の開発を目指した。日本を含むアジア諸国および欧米に高頻度にみられる HLA-A2 サブタイプである HLA-A\*02:01 に結合し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によって認識されるエピトープペプチドの同定を試みた。さらに、がん免疫療法の対象患者拡大のため、同定したエピトープペプチドの HLA-A\*02:06 に対する交差性を検討した。

### 【方法】

- 候補ペプチドの選択と CTL 誘導  
HLA 結合予測アルゴリズムに基づき、HLA-A\*02:01 に親和性の高い HIG2 タンパク由来のエピトープ候補ペプチドを選択した。合成した候補ペプチドを用いて、HLA-A\*02:01 陽性健常人由来の末梢血単核球より、ペプチド特異的 CTL を誘導した。CTL 活性の指標として、ペプチドパルスした HLA-A\*02:01 陽性細胞に対する IFN- $\gamma$  産生を ELISPOT 法にて確認した。ペプチド特異的 IFN- $\gamma$  産生を示した CTL 細胞を拡大培養後、CTL ラインの樹立を IFN- $\gamma$  ELISA にて確認し、限界希釈法により CTL クローンを樹立した。さらに、ペプチド-HLA-A\*0201 分子複合体による Tetramer 染色にてペプチド特異的 T 細胞受容体の存在を確認した。
- CTL による標的細胞の認識と傷害  
HIG2 全長および HLA-A\*02:01 遺伝子を導入した COS7 細胞を用いて、樹立した CTL ラインが HIG2 導入細胞を HLA-A\*02:01 拘束性に認識することを IFN- $\gamma$  ELISA にて確認した。また、樹立した CTL クローンを用いて、HIG2 を発現する HLA-A\*02:01 陽性腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性をクロムリリース法にて確認した。
- HLA-A\*02:06 に対する交差性  
1.および 2.により同定された HLA-A\*02:01 拘束性エピトープペプチドを用いて、HLA-A\*02:06 陽性健常人由来の末梢血単核球より CTL クローンを樹立した。さらに、樹立した CTL クローンが HIG2 全長および HLA-A\*02:06 遺伝子を導入した COS7 細胞を認識することを IFN- $\gamma$  ELISA にて確認した。

### 【結果】

- HLA-A\*02:01 に親和性の高い 12 種のエピトープ候補ペプチドのうち、4 種のペプチドから特異的 CTL ラインが樹立され、そのうち、HIG2-9-4 ペプチド特異的 CTL クローンが樹立された。また、HIG2-9-4 ペプチド特異的 T 細胞受容体の存在を確認した。

2. 樹立した4種のペプチド特異的CTLラインのうち、HIG2-9-4ペプチド特異的CTLラインのみ、HIG2導入細胞をHLA-A\*02:01拘束性に認識した。さらに、HIG2-9-4ペプチド特異的CTLクローンが、HIG2を発現するHLA-A\*02:01陽性腫瘍細胞株に対し細胞傷害活性を示すことを確認した。
3. HLA-A\*02:06陽性健常人由来の末梢血単核球よりHIG2-9-4ペプチド特異的CTLクローンを樹立し、HIG2導入細胞をHLA-A\*02:06拘束性に認識することを確認した。

#### 【結語】

本研究では、HIG2由来のHLA-A\*02:01拘束性エペトープペプチドとしてHIG2-9-4ペプチド(VLNLYLLGV)を同定した。また、同定したHIG2-9-4ペプチドがHLA-A\*02:06に対して交差性を示すことを確認した。これらの結果より、HIG2-9-4ペプチド投与によりペプチド特異的CTLを体内で誘導するがんペプチドワクチン療法への応用や、体外で誘導したHIG2-9-4ペプチド特異的CTLを体内に導入する細胞療法など、がん免疫療法への応用が期待される。HIG2は腫瘍特異的に高発現し、腫瘍の生存に必須の分子であることから、HIG2ペプチドを用いたがん免疫療法は正常臓器に作用せず、また、抗原発現低下による腫瘍の免疫逃避を克服する可能性が示唆され、副作用が少なく有効性の高い新規治療法となる可能性がある。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年10月28日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め上記論文についての審査を行った。

本論文は、腫瘍特異的に高発現し、腫瘍の生存に必須の分子である低酸素誘導タンパク質2(Hypoxia-inducible protein 2; HIG2)を標的抗原とするがん免疫療法の開発を目指したものである。

HLA結合予測アルゴリズムに基づき、HLA-A\*02:01に親和性の高い12種のHIG2由来のエペトープ候補ペプチドを選択し、HLA-A\*02:01陽性健常人由来の末梢血単核球よりペプチド特異的CTLを誘導した。その結果、4種のペプチドから特異的CTLラインが樹立され、そのうち、HIG2-9-4ペプチド特異的CTLクローンが樹立された。また、ペプチド-HLA-A\*0201分子複合体によるTetramer染色にて、HIG2-9-4ペプチド特異的T細胞受容体の存在を確認した。

樹立した4種のペプチド特異的CTLラインのうち、HIG2-9-4ペプチド特異的CTLラインのみ、HIG2導入細胞をHLA-A\*02:01拘束性に認識することをIFN- $\gamma$  ELISAにて確認した。また、HIG2-9-4ペプチド特異的CTLクローンが、HIG2を発現するHLA-A\*02:01陽性腫瘍細胞株に対し細胞傷害活性を示すことをクロムリリース法にて確認した。さらに、HLA-A\*02:06陽性健常人由来の末梢血単核球よりHIG2-9-4ペプチド特異的CTLクローンを樹立し、HIG2導入細胞をHLA-A\*02:06拘束性に認識することをIFN- $\gamma$  ELISAにて確認した。

以上から、HIG2由来のHLA-A\*02:01拘束性エペトープペプチドとしてHIG2-9-4ペプチド(VLNLYLLGV)を同定し、同定したHIG2-9-4ペプチドのHLA-A\*02:06に対する交差性を確認した。これらの結果より、HIG2-9-4ペプチドはがん免疫療法として臨床応用可能であることが示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医)乙第915号   |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月10日   |          |          |
| 氏名      | 前田 真也  |          |          |
| 学位論文の題目 | Roles of the <i>ALDH2</i> and <i>ADH1B</i> Genotypes on the Association Between Alcohol Intake and Serum Adiponectin Levels Among Japanese Male Workers<br><br>(職域男性における <i>ALDH2</i> , <i>ADH1B</i> 遺伝子型と飲酒, 血清アディポネクチン値との関連) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 宮下 和久 |          |
|         | 副査   | 教授 岸岡 史郎 | 教授 竹下 達也 |

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

メタボリックシンドロームは、心血管疾患等に密接に関連する病態として注目されている。その病態に関与するアディポネクチンは、小型の脂肪細胞から分泌される善玉のアディポカインで、インスリン感受性を上昇させ、抗炎症作用、抗動脈硬化作用を示す。内臓脂肪の蓄積によって減少し、循環器疾患や発がんとの関連について報告されている。

現在、飲酒量と血清アディポネクチン値との関係についても、いくつか報告されているが、飲酒習慣のある人は、ない人と比較して、血清総アディポネクチン値が高い、多量飲酒の習慣がある人は、血清総アディポネクチン値・高分子量アディポネクチン値が低い等、その結果は報告により様々である。しかし、*Aldehyde Dehydrogenase-2 (ALDH2)*, *Alcohol Dehydrogenase-1B (ADH1B)* 遺伝子型の解析を含めた研究は、過去に報告がほとんどなく、十分な検討がなされていない。

そこで、本研究は、職域において、*ALDH2*, *ADH1B* 遺伝子型と、飲酒量、血清総アディポネクチン値、さらにその分面との関連を明らかにすることを目的とした。

### 【研究方法】

#### (1) 対象者

ある企業における定期健康診断の受診者で、研究の同意を得ることができ、薬剤治療を受けていない男性 541 人 (51.5 ± 5.9 歳) を解析対象とした。

#### (2) 検査項目

解析に用いた検診項目は、年齢、body mass index (BMI)、血清総アディポネクチン値、高分子量・中分子量・低分子量アディポネクチン値および高血圧・糖尿病・脂質異常症・心血管疾患の薬剤治療の有無、飲酒習慣、飲酒量、喫煙習慣、運動習慣、*ALDH2*, *ADH1B* 遺伝子型であった。

飲酒習慣、喫煙習慣、運動習慣等については、自記式質問票を用いた。飲酒習慣については、0-7 日/週の 8 つの選択肢で、飲酒量については、1-4 合/日の 4 つの選択肢で、回答を得た。

#### (3) 統計解析

各遺伝子型ごとに、飲酒 (3 分位による 3 群; 0-4, 5-11, 12 合/週以上) と総アディポネクチン値、さらにその分面との関連について、単回帰分析および重回帰分析を行った。重回帰分析では、年齢、BMI、喫煙、運動習慣を調整した。

P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とみなした。

### 【結果および考察】

#### (1) 飲酒と血清アディポネクチン値との関連について

全体では、重回帰分析にて、有意差には至らなかったが、12 合/週以上の飲酒と血清総アディポネクチン値との間で負に関連する傾向を認めた。これは、最近の研究で示されている、多量飲酒と血清

総アディポネクチン値との間に負の関連を認めたという結果と一致した。

(2) *ALDH2*, *ADH1B* 遺伝子型ごとの飲酒と血清アディポネクチン値との関連について

*ALDH2* 遺伝子型の間では、飲酒と血清アディポネクチン値との間で、単回帰分析、重回帰分析ともに有意差を認めなかった。*ADH1B* 遺伝子型の間では、*ADH1B\*2/\*2*において、単回帰、重回帰分析にて、12 合/週以上の飲酒と総アディポネクチン値、高分子量、低分子量アディポネクチン値との間に負の関連を認めた ( $p < 0.05$ )。一方 *ADH1B\*1/\*1*において、12 合/週以上の飲酒と中分子量アディポネクチン値との間に正の関連を認めた ( $p < 0.05$ )。

*ADH1B\*2/\*2*では、ADH 活性が高く、飲酒によりアセトアルデヒドが速く生成される。アセトアルデヒドは、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインを誘導し、これらの炎症性サイトカインがアディポネクチンの分泌を抑制する。一方、アセトアルデヒドは、酸化ストレスを亢進させることが報告されている。酸化ストレスによりアディポネクチンの発現量が低下する。これら二つの経路により、血中のアディポネクチン値が低下する可能性が考えられる。また、飲酒と血清アディポネクチン値が負に関連するといった報告は、現段階では、アジアのみである。理由の一つとして、アジア人では、*ADH1B\*2/\*2*の頻度が高いことが影響している可能性が考えられる。

*ADH1B\*1/\*1*は、該当者が少なく、大規模な人数での検証が必要と考えられる。

#### 【結語】

*ADH1B\*2/\*2*において、12 合/週以上の飲酒と血清総アディポネクチン値、高分子量、低分子量アディポネクチン値との間に負の関連を認めた。

今回の研究において、*ADH1B\*2/\*2*と多量飲酒の組み合わせと血清アディポネクチン値低下との関連を明らかにしたことは、横断研究ではあるが、これまで報告のない予防医学的に重要な結果であると考えられる。今後は、このような関連性の機序および健康との関連性について、さらなる検討が必要と考えられる。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成27年2月5日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

メタボリックシンドロームは、心血管疾患等に密接に関連する病態として注目されている。その病態に関与するアディポネクチンは、脂肪細胞から分泌される善玉アディポカインで、インスリン感受性を上昇させ、抗炎症作用、抗動脈硬化作用を示す。内臓脂肪の蓄積によって減少し、循環器疾患や発癌との関連についても報告されている。飲酒量と血清アディポネクチン値との関係について、いくつか報告されているが、その結果は報告により様々である。また、*Aldehyde Dehydrogenase-2 (ALDH2)*, *Alcohol Dehydrogenase-1B (ADH1B)* 遺伝子型の解析を含めた研究は、過去に報告がほとんどなく、十分な検討がなされていない。

そこで、本研究は、職域集団において、*ALDH2*, *ADH1B* 遺伝子型と、飲酒量、血清総アディポネクチン値、さらにその分画との関連を明らかにすることを目的として実施した。対象者は、ある企業における定期健康診断の受診者で、解析対象者は、薬剤治療を受けていない男性 541 人 ( $51.5 \pm 5.9$  歳)であった。各遺伝子型ごとに、飲酒 (0-4, 5-11, 12 合/週以上の 3 群)と総アディポネクチン値、さらにその分画との関連について、単回帰分析および重回帰分析を行った。重回帰分析では、年齢、BMI、喫煙、運動習慣を調整した。

#### 結果

1. 全体では、重回帰分析にて、12 合/週以上の飲酒と総アディポネクチン値との間で負に関連する傾向を認めたが、有意差には至らなかった。また、単回帰、重回帰分析にて、12 合/週以上の飲酒と低分子量アディポネクチン値との間に負の関連を認めた ( $p < 0.05$ )。
2. *ALDH2* 遺伝子型の間では、総アディポネクチン値は、単回帰分析、重回帰分析ともに有意差を認めなかった。

- 3 *ADH1B* 遺伝子型の間では, *ADH1B\*2/\*2* において, 単回帰, 重回帰分析にて, 12 合/週以上の飲酒と総アディポネクチン値, 高分子量, 低分子量アディポネクチン値との間に負の関連を認められた ( $p < 0.05$ )。一方 *ADH1B\*1/\*1* において, 12 合/週以上の飲酒と中分子量アディポネクチン値との間に正の関連を認めた。

以上, 本論文は, *ALDH2*, *ADH1B* 遺伝子型と, 飲酒量, 血清アディポネクチン値との関係という, これまで報告のない予防医学的に重要な課題についてなされた研究であり, *ADH1B\*2/\*2* と多量飲酒の組み合わせと血清アディポネクチン値低下との関連を明らかにした。断面研究という限界はあるものの, 同一職域で 500 人を超える人数を対象に調査を実施し, *ALDH2*, *ADH1B* 遺伝子型と, 飲酒量, 血清総アディポネクチン値, さらにその分画との関連を明らかにしたもので, 学位論文として価値のあるものと認めた。



|         |  |          |          |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号   | 博(医) 乙第916号  |          |          |
| 学位授与の日  | 平成27年3月10日   |          |          |
| 氏名      | 北野 尚美  |          |          |
| 学位論文の題目 | Epidemiologic features and prognostic factors of coronary artery lesions associated with Kawasaki disease based on a 13-year cohort of consecutive cases identified by complete enumeration surveys in Wakayama, Japan<br><br>(川崎病の疫学的特徴と冠動脈障害の予測因子 —和歌山県における13年間の悉皆的調査から) |          |          |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 宮下 和久 |          |
|         | 副査   | 教授 吉川 徳茂 | 教授 竹下 達也 |

## 論文内容の要旨

【緒言】川崎病は乳幼児に好発する急性熱性の全身性血管炎で、診断の手引きの主要6症状によって臨床診断される。その病態は血管炎であるが、動脈炎が主で、冠動脈瘤を引き起こすことが特徴であり後天性心疾患の重要な原因疾患である。川崎病は、環境要因、特に感染因子と遺伝要因の相互作用により発症すると考えられているが、病因は解明されていない。罹患率はアジア、特に日本人で高く、人種・民族間で差がある。日本の川崎病全国調査（以下、全国調査）によると、2012年までの患者報告累積数299,440、死亡報告累積数440で、2012年は0-4歳日本人人口10万対罹患率264.8で1970年に調査開始以来第1位であった。川崎病の心後遺症と関係する要因として、性別、年齢、再発、免疫グロブリン大量療法（以下、IVIG）への不応などがこれまでに報告されている。先行する川崎病の疫学研究は、ほとんどが全国調査データに基く結果で、この場合、研究の限界として、選択バイアスと測定バイアスの影響の制御が課題である。

本研究の目的は、日本の特定地域における悉皆性のある調査に基づいて、川崎病の臨床疫学像と、冠動脈病変の発生予測因子、特に罹患年齢を明らかにすることである。

【方法】本研究の研究デザインは、横断調査に基く観察研究である。本研究では、和歌山川崎病研究会が過去に実施した症例調査のデータを既存資料として用いた。和歌山川崎病研究会では、年1回毎年10月に和歌山県内の小児科を有する病院を対象に、川崎病と新規に診断・治療した症例を調査してきた。調査は後向きで、診療録に基づいて小児科医師が回答した。調査における川崎病の定義と診断は、厚生労働省川崎病研究班による川崎病診断の手引き第4版、2002年以降は第5版を用いた。この調査は、すべての年で回収割合が100%であったため悉皆性がある。本研究では、この調査のデータベースから抽出した連結不可能匿名化されたデータセットを解析に用いた。研究対象期間は、1999年10月1日から2012年9月30日の13年間とした。対象の選択基準は、第1病日（症状出現の初日）が研究対象期間内で、和歌山県内の病院から報告された症例である。両親のいずれかが外国人であった場合を除外基準とした。IVIG不応の判定基準として、初回IVIG投与終了後24時間以内に解熱（37.5℃未満）がえられない場合に実施した、IVIG追加投与の有無を用いた。

本研究の主要評価項目は、発症後1か月の時点（第30病日前後）の冠動脈病変（巨大瘤、中・小瘤、拡大）発生の有無であり、経胸壁二次元心臓超音波検査所見を用いて評価した。1985年の厚生科学研究所の川崎病委員会の報告に準じて、冠動脈の内径>3mm（5歳以上では>4mm）を病変ありと判定し、5mm以上を瘤、8mm以上を巨大瘤とした。

解析は、始めに、対象集団の記述疫学を確認し、初回IVIG投与方法別に、性別、罹患年齢、川崎病既往歴、診断の確実度を比較した（カイ2乗検定、一元配置分散分析）。次に、冠動脈病変発生の有無により、それらおよび治療内容を比較した（Fisher's exact test, Mann-Whitney U test）。その後、

多変量解析により、冠動脈病変発生に対する、罹患年齢、性別、初回 IVIG 投与方法・開始病日、IVIG 追加投与のオッズ比と 95%信頼区間を求めた。解析には SPSS v15 for Windows (Chicago, IL, USA) を用いた。いずれの検定も  $P < 0.05$  をもって統計学的有意差ありとした。

なお、本研究計画は、和歌山県立医科大学が設置する倫理委員会で疫学研究倫理指針に基づく審査を受け、承認を得て実施した（承認番号 794）。

【結果】 研究対象期間に 1,417 例の川崎病発生報告があった。両親のいずれかが外国人であった 2 例を除いた 1,415 例（男 796、女 619）を解析対象とした。罹患年齢は中央値 25 か月であった。再発例は 2.2%で、不全型は 1.8%であった。初回 IVIG 投与方法の間で、不全型の割合を除いて、性別、罹患年齢、再発の割合に有意な差は認めなかった。

治療は、98.4%がアスピリンを内服し、91.9%が初回 IVIG 投与を受け、18.0%は IVIG 追加投与を受けていた。発症後 1 か月の時点で、全体の 3.3%（男 4.0%、女 2.3%； $P=0.080$ ）に冠動脈病変の発生を認めた。巨大瘤発生は全体の 0.42%であった。

冠動脈病変発生のオッズ比は、川崎病既往歴、診断の確実度、アスピリン治療の有無を調整した結果、罹患年齢 11-48 か月（第 2-4 五分位）を基準とした場合、10 か月以下で 3.0（95%信頼区間 1.4-6.6）、49 か月以上で 3.1（1.5-6.6）と、いずれも有意に高値であった。初回 IVIG 投与なしを基準とした場合、2 g/kg/24 時間で 0.11（0.03-0.40）、2 g/kg/48 時間で 0.24（0.07-0.84）と、いずれも有意に低値であった。IVIG 追加投与について、なしを基準とした場合、ありは 19.1（8.7-42.0）で有意に高値であった。今回の検討では、性別と初回 IVIG 投与開始病日は、冠動脈病変発生のオッズ比が有意でなかった。また、罹患年齢と性別の間に交互作用を認めなかった。

【考察】 川崎病では、罹患年齢は冠動脈病変発生の予測因子であり、11-48 か月を底とする U 字型を示すことを明らかにした。我々が調査した範囲では、拡大・瘤・巨大瘤を主評価項目として、川崎病による冠動脈病変について罹患年齢との関連を明らかにした研究はこれまでに報告がなく本研究が初めてである。本研究は、特定地域における悉皆性のある調査に基づくため選択バイアスの影響がほとんどなく、冠動脈病変発生の有無は、小児循環器専門医またはよく訓練された小児科医による判定のため測定バイアスも小さい。

川崎病による巨大瘤と罹患年齢の関係を調べた 3 論文は、いずれも日本からの報告で、全国調査データを用いたネステッド症例対照研究である。本研究では中・小瘤と拡大も含めて検討し、その結果は既報と一致するものであった。韓国、台湾、カナダから、罹患年齢と冠動脈瘤の関係の報告があるが、日本と比べ冠動脈瘤の割合に差がある。研究デザインや医療保険システムなど違いがあり、海外の報告との単純な比較は困難である。

本研究の限界として、対象地域が限定され、日本人の川崎病患者を母集団としたため異なる国・地域、人種・民族への結果の一般化に注意が必要である。評価項目である冠動脈病変発生の有無は、経胸壁超音波の手法がもつ弱点と、同一観察者内変動および観察者間変動を考慮する必要がある。また、冠動脈径は体表面積で補正しない値を用いた。

本研究の結果は、川崎病の発症に、年齢層により異なる病因が関わっている可能性や、環境要因と遺伝要因の相互作用が罹患年齢により影響を受けている可能性を伺わせる。

【結論】 川崎病による冠動脈病変は、低年齢層と高年齢層で発生割合が高く、11-48 か月を底とする U 字型を示した。本研究は、日本の特定地域で 13 年間に発生した連続症例に基づくものであり、選択バイアスの影響がほとんどないことが特徴である。また、得られた結果は全国調査による既報と一致するものであった。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 2 月 17 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

川崎病は病因が解明されておらず、後天性心疾患の重要な原因で将来の循環器疾患発症リスクの点から予防医学的にも重要な疾患である。本研究は、特定地域、具体的には和歌山県全域において実施された悉皆性のある既存調査から構築した電子データベースに基くもので、その解析によって、川崎病の臨床疫学像と、冠動脈病変の発生予測因子を明らかにすることを目的として行った。

和歌山川崎病研究会が和歌山県内の小児科を有する病院を対象に年 1 回実施した調査から、発症日が 1999 年 10 月 1 日から 2012 年 9 月 30 日の期間であった連続する 1417 症例のうち、両親のいずれかが外国人であった 2 例を除いた 1415 例（男 796、女 619）を研究対象とした。川崎病の定義は、川崎病診断の手引き第 4 版、2002 年以降は第 5 版を用いた。冠動脈病変の判定は、経胸壁二次元心臓超音波検査所見を用い、1985 年の厚生科学研究の川崎病委員会の報告に準じた。解析は、まず記述統計量にて対象集団の特徴を把握し、免疫グロブリン大量静注療法 (IVIG) の初回投与方法別に、性別、罹患年齢、川崎病既往、診断の確実度を比較し、冠動脈病変発生の有無によって、それらと治療内容を比較した (Fisher's exact test, Mann-Whitney *U* test)。発症後 1 か月時点の冠動脈病変 (瘤・拡大) 発生の有無を主評価項目とし、川崎病既往、診断の確実度、アスピリン治療の有無を調整した多重ロジスティック回帰分析によって、罹患年齢、性別、IVIG 初回投与方法・開始病日・追加投与のオッズ比(95%信頼区間)を求めた。

結果 1. 罹患年齢は中央値 25 か月、再発例 2.2%、不全型 1.8%であった。アスピリン内服は 98.4%で、初回 IVIG 投与は 91.9%に実施され、IVIG 追加投与は 18.0%であった。初回 IVIG 投与方法の間で、不全型の割合を除き、性別、罹患年齢、再発例の割合に有意な差は認めなかった。発症後 1 か月時点で、全体の 3.3%(男 4.0%、女 2.3%;  $P=0.080$ )に冠動脈病変を認め、巨大瘤発生は全体の 0.42%であった。

結果 2. 冠動脈病変発生のオッズ比は、罹患年齢 11-48 か月を基準とした場合、10 か月以下で 3.0 (1.4-6.6)、49 か月以上で 3.1 (1.5-6.6)と、いずれも有意に高値であった。初回 IVIG 投与なしを基準とした場合、2 g/kg/24 時間で 0.11 (0.03-0.40)、2 g/kg/48 時間で 0.24 (0.07-0.84)と、いずれも有意に低値であった。IVIG 追加投与について、なしを基準とした場合、ありは 19.1 (8.7-42.0)で有意に高値であった。今回の検討では、性別と IVIG 投与開始病日は有意でなく、年齢と性別に交互作用を認めなかった。

川崎病による冠動脈病変は、低年齢層と高年齢層で発生割合が高く、11-48 か月を底とする U 字型を示した。本論文は、悉皆性のある調査に基くため選択バイアスの影響がほとんどないことが特徴で、冠動脈病変の有無の判定は訓練された小児科医と専門医によってなされている。

本論文は、川崎病による冠動脈病変について、拡大・瘤を主評価項目として罹患年齢との関連を明らかにした点に新規性がある。本論文の結果は、川崎病発症に、年齢層により異なる病因が関わっている可能性や、環境要因と遺伝要因の相互作用が罹患年齢により影響を受けている可能性を示唆しており、病因研究に疫学的アプローチから資するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。