

2009. 1

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第三十号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *

高知大学学報

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

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第70号	井口 みつこ	Acute Inactivation of the <i>VHL</i> gene Contributes to Protective Effects of Ischemic Preconditioning in the Mouse Kidney (<i>VHL</i> 遺伝子の不活性化はマウス腎虚血再灌流障害を抑制する)	1
甲医博第71号	川村 博文	Cortical neurophysiological modification after peripheral neuronal sensitization (末梢神経感作が引き起こす大脳皮質の神経生理学的機能変化)	6
甲医博第72号	森下 佐織	Cloning, polymorphism, and inhibition of β -carbonic anhydrase of <i>Helicobacter pylori</i> (ヘリコバクターピロリ β 炭酸脱水酵素の遺伝子クローニング, 遺伝子多型, 酵素阻害の検討)	12
甲医博第73号	次田 誠	Differential regulation of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells (血管平滑筋細胞において炎症性サイトカインは 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 及び type-2 遺伝子の転写を異なった機序で調節する)	17

氏名(本籍)	井口 みつこ (広島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第70号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成20年10月31日
学位論文題目	Acute Inactivation of the <i>VHL</i> gene Contributes to Protective Effects of Ischemic Preconditioning in the Mouse Kidney (VHL遺伝子の不活性化はマウス腎虚血再灌流障害を抑制する)
発表誌名	Nephron Experimental Nephrology 2008; Vol.110: e82-e90
	審査委員 主査 教授 李 康弘 副査 教授 麻生 悌二郎 副査 教授 寺田 典生

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 井口 みつこ

論文題目

Acute Inactivation of the *VHL* gene Contributes to Protective Effects of Ischemic Preconditioning in the Mouse Kidney
(*VHL* 遺伝子の不活性化はマウス腎虚血再灌流障害を抑制する)

(論文要旨)

【目的】

腎障害の進行要因として糸球体障害のほかに近年では尿細管障害が注目され、加えて組織低酸素の重要性が報告されてきた。組織中酸素分圧低下は、HIF (hypoxia-inducible factor) の蛋白レベルを増加させ、EPO (erythropoietin)、HO-1 (hemeoxygenase)、VEGF (vascular endothelial growth factor)などの下流標的遺伝子発現を亢進させ低酸素障害を回避する。*VHL* 遺伝子は癌抑制遺伝子として知られているが、このHIFの蛋白量制御因子の一つでもある。今回我々は*VHL* gene conditional knockout mouseを用いて虚血再灌流による急性腎障害における効果を検討した。

【方法】

初期発生からの*VHL* 遺伝子欠損は胎生致死となるため、個体発生後に*VHL* 遺伝子を後天的に欠失させるマウスを作成した。Cre recombinase transgeneを持ち、遺伝子座の一方にloxP配列で挟まれた*VHL* 遺伝子アレルをもち、他方に*VHL* 遺伝子を欠失させたマウスに、タモキシフェンを腹腔内投与しCreにより*VHL* 遺伝子を欠失させた(ノックアウト群)。*VHL* 遺伝子量が半減したコントロール群との比較を行った。生後8週から12週のマウスを使用し、両側腎動脈のクリッピングによる虚血再灌流を行った(30分間虚血後、24時間再灌流)。

【結果】



腎臓におけるCre recombinaseの発現は腎組織全体にびまん性に認められた。コントロール群に対しノックアウト群では*VHL* 蛋白量は有意に減少した。一方でHIF蛋白発現や、HIFの下流標的遺伝子であるEPO、HO-1、VEGFの発現もノックアウト群で有意に増加した。虚血再灌流後の血中尿素窒素(BUN)と血清クレアチニン(CRN)値の上昇は、ノックアウト群で各々 52.12 ± 6.61 , 0.24 ± 0.04 であり、コントロール群(138.10 ± 13.03 , 0.72 ± 0.16 , $P < 0.05$)と比べて腎障害はより軽度であった。同様に、病理学的には尿細管上皮の核腫大や変性、つまり尿細管障害の程度はノックアウト群において軽度であった(尿細管障害スコア:0.90)

±0.12 vs コントロール(2.40±0.08), $P < 0.05$)。両群で尿細管円柱はみられなかった。それと同じ部位において、尿細管上皮細胞の VHL 発現はノックアウト群で有意に減少し、結果として TUNEL 法でのアポトーシス陽性細胞が、ノックアウト群で減少していた。

【考察】

VHL 遺伝子の不活性化は、マウス腎虚血再灌流障害において尿細管障害を抑制した。VHL 蛋白は通常酸素濃度下でユビキチン-プロテアソームを介する HIF の分解に重要な働きをしている。それには HIF のプロリン・アスパラギン酸残基水酸化酵素が必要となる。この水酸化酵素が酸素分圧センサーとして働き、低酸素下ではその酵素活性が低下して HIF の分解が抑制され、虚血耐性を獲得する。したがって、今回の実験では VHL 欠失により HIF 蛋白量が増加し、その下流の低酸素応答遺伝子群(EPO, HO-1, VEGF など)の発現が上昇することにより、虚血耐性となったと考えられた。すなわち VHL は、この虚血耐性においては負に働くことが示唆された。なお、今回の実験で示した一過性の VHL 欠失は低酸素障害を確かに抑制するが、しかし長期的な場合、つまり HIF が恒常的に存在する状況が生体にとってどのような影響を及ぼすかについては、今後の研究が待たれる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	井 口 みつこ
審 査 委 員	主 査 氏 名 李 康 弘	
	副 査 氏 名 麻 生 悌二郎	印
	副 査 氏 名 寺 田 典 生	

題 目 Acute Inactivation of the *VHL* gene Contributes to Protective Effects of Ischemic Preconditioning in the Mouse Kidney
(*VHL* 遺伝子の不活性化はマウス腎虚血再灌流障害を抑制する)

著 者 Mitsuko Iguchi, Yoshihiko Kakinuma, Atsushi Kurabayashi, Takayuki Sato, Taro Shuin, Seung-Beom Hong, Laura S. Schmidt, Mutsuo Furihata

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Nephron Experimental Nephrology 2008年

要 旨

【背景・目的】急激な腎虚血による尿細管の障害は、急性腎不全をもたらす病態として極めて重要である。虚血を原因とする組織の低酸素状態は尿細管上皮細胞の変性、壊死を惹き起こし、尿量の極端な減少とともに生体に重篤な影響を及ぼす。しかしながら、多くの細胞には低酸素障害に抗すべき回避機構が備わっている。その代表的なものとして、低酸素環境下における *HIF* (hypoxia-inducible factor) 遺伝子の発現誘導が挙げられる。*HIF* 蛋白は *EPO* (erythropoietin)、*HO-1* (hemeoxygenase)、*VEGF* (vascular endothelial growth factor) など、細胞障害回避に役立つ遺伝子群の発現を促し、生体への悪影響を最小限に食い止めるべく作用する。近年、*HIF* 自身の発現制御機構についても研究が進んでいる。がん抑制遺伝子である *VHL* (*von Hippel-Lindau*) は *HIF* 機能抑制因子の一つとして注目されている。申請者らの研究では、急性腎不全の分子病態の一端を明らかにするとともにその治療戦略の糸口を探る目的で、*VHL* conditional knockout mouse を使用した腎動脈結紮再灌流実験が行われ、*VHL* 蛋白欠損が低酸素性腎障害に与える影響が精査された。

【方法】 *VHL* 遺伝子のホモ欠失は胎生致死となるため、ノックアウト群マウスとして Ma らによって樹立された *VHL* conditional knockout mouse を使用した。このマウスの *VHL* 遺伝子はヘテロ欠失状態にあり、残存する *VHL* アレルの両端には Cre recombinase によって切断と再結合を生じる loxP 配列が組み込まれている。同マウスはタモキシフェン存在下でのみ Cre recombinase 活性を発揮する CreERTM 酵素の transgene を同時に有するため、タモキシフェンを投与することで後天的に *VHL* 遺伝子のホモ欠失を誘発できる。一方、コントロール群として、loxP 配列を有する *VHL* アレルと野生型 *VHL* アレルを有し、かつ、CreERTM transgene をもつマウスを使用した。

ノックアウト群およびコントロール群のマウスにタモキシフェンを腹腔内投与し、前者には *VHL* のホモ欠失、後者には *VHL* のヘテロ欠失をそれぞれ誘発した。生後 8 週から 12 週の間、全てのマウスに対して両側腎動脈のクリッピングによる 30 分間の虚血とクリッピング解除後 24 時間の再灌流を行った。再灌流終了後、マウスを安楽死させ、腎における *VHL*、*HIF* および *HIF* 下流の遺伝子群の動向を免疫染色、ウェスタンブロット、RT-PCR 法などで解析した。また、尿細管障害を上皮細胞の変性や核腫大などの組織所見により 0~3 のスコアで数値化するとともに、腎不全の程度を血中尿素窒素と血清クレアチニンの測定によって評価した。尿細管上皮のアポトーシスは TUNEL 法で組織学的に同定した。

【結果】 免疫染色にて *VHL* conditional knockout mouse の腎組織における CreERTM 酵素の発現を調べたところ、酵素蛋白は腎全体にびまん性に認められた。また、*VHL* 蛋白量はコントロール群に比してノックアウト群で有意に減少していることが、ウェスタンブロットと免疫染色によって確認された。一方、*HIF* 遺伝子とその下流標的である *EPO*、*HO-1* 遺伝子の蛋白発現、および、*VEGF* 遺伝子の mRNA 発現はノックアウト群で有意に増加していた。

虚血再灌流後の血中尿素窒素と血清クレアチニンの値は、ノックアウト群で各々 52.12 ± 6.61 mg/dl、0.24 ± 0.04 mg/dl、コントロール群では各々 138.10 ± 13.03 mg/dl、0.72 ± 0.16 mg/dl であり、ノックアウト群の腎障害はコントロール群に比べ軽度であることが明らかとなった ($P < 0.05$)。同様に、組織学的尿細管障害スコアはノックアウト群では 0.90 ± 0.12、コントロール群では 2.40 ± 0.08 であり、やはりノックアウト群において比較的軽度であった ($P < 0.05$)。さらに、アポトーシスに陥った尿細管上皮細胞はコントロール群でのみ観察され、ノックアウト群ではほとんど認められなかった。

【考察】 *VHL* 遺伝子のホモ欠失がマウス腎虚血再灌流による尿細管障害を抑制することが明らかとなった。言い換えるならば、*VHL* は低酸素障害の促進因子である。*VHL* 蛋白はユビキチン-プロテアソームを介して *HIF* 蛋白を分解することが知られている。よって、ノックアウト群における *HIF* 蛋白量の増加と *HIF* 下流の低酸素応答遺伝子群 (*EPO*、*HO-1*、*VEGF* など) の発現上昇は *VHL* 蛋白欠損に伴う *HIF* 蛋白の分解阻害が原因と考えられる。なお、*VHL* 欠失が少なくとも短期的に低酸素障害を抑制することは明白となったが、*VHL* 欠失の長期的な効果については今後のさらなる検討が必要である。

<審査結果> 以上のように、本論文は腎尿細管の低酸素性障害の分子機構の一端を明らかにし、急性腎不全の新規治療開発に一石を投じる基礎研究データを提示した。よって、審査委員一同は本論文が医学博士の学位に値する内容を含むものと判断した。

氏名(本籍)	川村 博文 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第71号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成20年11月28日
学位論文題目	Cortical neurophysiological modification after peripheral neuronal sensitization (末梢神経感作が引き起こす大脳皮質の神経生理学的機能変化)
発表誌名	Journal of Physical Therapy Science, Vol.20(4): 191-196 2008
	審査委員 主査 教授 八木 文雄 副査 教授 椛 秀人 副査 教授 加藤 邦夫

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 川村博文

論文題目 Cortical neurophysiological modification after peripheral neuronal sensitization
(末梢神経感作が引き起こす大脳皮質の神経生理学的機能変化)

(論文要旨)

近年、末梢の侵害刺激が、末梢神経系と中枢神経系の感作を引き起こし、脳への神経系の伝達に影響を及ぼすことが報告されてきた。本研究の目的は、電気刺激による脳の反応がカプサイシンのような痛みを引き起こす薬品の末梢への塗布によりどのように影響されるかを研究することである。

対象は6名の健常成人ボランティアであり、全ての対象者から書面でインフォームドコンセントを得、また、広島大学医学部附属病院倫理委員会で承認されたのちに本研究を行った。

脳活動の変化は、脳磁図(MEG)を用いて脳磁場の変化を測定することによって捉えた。MEGの記録は204ch全頭型脳磁計を用い、座位で安静・閉眼・覚醒状態にて行った。電気刺激は左前腕背側近位部に設置した表面電極を用い、刺激条件は持続時間0.2msの矩形波、強度5mA、頻度2Hzであり、この電気刺激のみでは被験者は痛みを感じないことを確認した。この電気刺激をトリガーとしてMEGを記録した。サンプリング周波数は300Hz、記録周波数帯域は0.1~25Hz、加算平均は100回行ない、等価電流双極子(ECDs)の位置、潜時、モーメント(Q)はGOF (goodness of fitting) が70%以上かつ最大になる時点のものを用いた。

カプサイシクリームは、濃度1%のものを用い、500mgのカプサイシン粉末、95%の0.8mgのエチルアルコール、および49.5gの親水軟膏を混合することによって調剤し、そのクリームの0.5gを左前腕背側で手関節の近位部に横10cm、縦5cmの範囲に塗布した。MEGの記録は、(1)カプサイシクリームを塗布する直前(対照)、(2)塗布後のvisual analogue scale (VAS)が2に達した時(状態A)、(3)VASが4に達した時(状態B)の3時点とした。

ECDsの潜時は、対照群で 84.0 ± 32.4 (51-141) ms、状態A群で 117.0 ± 25.5 (87-143) ms、状態B群で 104.8 ± 25.7 (74-140) msと、いずれの状態でも類似の潜時であり($p > 0.1$)、カプサイシンの影響は認められなかった。




ECDsの位置変化に関しては、カプサイシクリーム塗布前にECDsの位置が第1次体性感覚野に認められた4例中3例で塗布後にその位置が前運動野に変化し、前運動野と痛覚系の密接な関係を示唆する先行研究を支持する所見と考えられた。

Q値は、対照群で 12.2 ± 6.5 nAm、状態A群で 18.8 ± 14.0 nAm、状態B群で 21.2 ± 15.1 nAmであり、状態B群では対照群と比べて有意に増加した($p < 0.05$)。Q値は痛覚過敏との関連が注目されてお

り、本研究では両者の相関が示唆され、痛覚過敏の定量的評価法として期待される。

以上の結果は、痛みを感じない程度の同一強度の電気刺激により誘発される大脳皮質活動が末梢へのカプサイシンクリーム塗布により過反応となることを示し、その背景として神経感作が生じていることが示唆される。治療的な電気刺激を感作後に使用する時には、本実験と同様な大脳皮質活動の変化が生じると考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	川 村 博 文
審 査 委 員	主 査 氏 名	八 木 文 雄 
	副 査 氏 名	梶 秀 人 
	副 査 氏 名	加 藤 邦 夫 

題 目 Cortical neurophysiological modification after peripheral neuronal sensitization
 (末梢神経感作が引き起こす大脳皮質の神経生理学的機能変化)

著 者 Hirobumi Kawamura, Takahiro Ushida, Hiroshi Yamamoto, Katsuhide Ito,
 Satoshi Imaizumi, Akira Hashizume, Toshikazu Tani

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、年 月
 Journal of Physical Therapy Science 2008 Vol. 20 No. 4 (in press)

要 旨

筋骨格系の各種疾患に派生することが多く、不快な情動経験を伴う“痛み”を緩和することは、運動機能を最良の状態に維持するとともにQOLを高める上できわめて重要であることから、除痛を主目的とした種々の治療的戦略が、神経生理学的事実にもとづきこれまでに模索されてきた。その中でも、現段階で最も一般的である経皮的通電刺激法 (TENS: Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation) は、Melzack, R., and Wall, P. D. (1965) により提唱されたgate control theoryにもとづき考案され、その後gate control theory自体は種々の理由から撤回を余儀なくされたものの、临床上の有用性から現在でも未だに広く適用されている除痛法である。このgate control theoryにもとづく経皮的通電刺激法による除痛の原理は以下のとおりである。たとえば、皮膚に“痛み”を伴う傷害がある場合、その部位の周辺を撫でたり擦ったりすると“痛み”が和らぐことは誰しも経験済みの事実である。この経験的事実は神経生理学的に次のように解釈される。末梢組織から脊髄へ投射する細い侵害受容性 (“痛み”を伝達する) 線維 (有髄性のA δ 線維, 無髄性のC線維) と脊髄後角ニューロンの間に形成されているシナプスにはかなりの可塑性があり、“痛み”に関する上行性情報はこの部位で様々な修飾を受ける。つまり、“痛み”が生じている末梢組織周辺からの非侵害性情報 (触・

圧覚情報などを脊髄へ伝達する太い求心性線維 (A_{α} , A_{β}) の活動が“痛み”を脊髄へ伝える細い侵害性線維 (A_{δ} , C) の活動を上回ると、脊髄膠様質の抑制性介在ニューロンが活性化することにより、脊髄後角の求心性侵害受容ニューロンから脊髄視床路ニューロンへの“痛み”情報の伝達が阻害され“痛み”が緩和される。TENSはこの仮説的原理を臨床に導入した除痛法であり、“痛み”の閾値未満の強度をもつ皮膚電気刺激により“痛み”が緩和されることが一般的な事実としてすでに確認されている。

そもそも、末梢の自由神経終末で受容された侵害刺激は、侵害受容性ニューロン (A_{δ} , C) により脊髄を介して中枢神経系に伝達され、嫌悪性の情動を伴う主観的な感覚経験としての“痛み”が生じる。その“痛み”の知覚を支配する脳領域は、近年における種々の脳機能イメージング法により次第に明らかにされつつあるが、その中でも、脳の電氣的活動により生じる磁場を非常に感度の高い超伝導量子干渉計 (SQUIDS) を用いて計測する脳磁図 (MEG: magnetoencephalography) は、現在のところ空間分解能と時間分解能の両側面において優れた特性をもつ有用な脳機能イメージング法である。この手法を用いた最近の研究から、電氣的な侵害刺激が末梢組織に加えられると、まず最初に反対側の一次体性感覚野 (SI) に、次いで、両側の二次体性感覚野 (SII), 島, 帯状皮質などに活動が誘起されることが明らかにされている。

一方、臨床面において直面する現実の大きな問題は、筋骨格系疾患に派生する“痛み”の増悪および慢性化であり、これには末梢組織に強い侵害刺激が加えられた場合に引き起こされる感作 (末梢神経系および中枢神経系の閾値が低下し、通常は“痛み”を知覚しない程度の弱い刺激によっても“痛み”が知覚されるようになる痛覚過敏状態) が重要な役割を担うことが、近年の神経生理学的研究から明らかにされつつある。こうした感作による“痛み”の増悪は誰しも経験済みであるが、その詳細な中枢神経機構については未だ不明な点が多く残されているのが現状である。そこで申請者らは、末梢組織に加えられた侵害刺激に対する感作が、“痛み”の知覚を支配する中枢神経系に及ぼす効果を、MEGを駆使することにより詳細に解析した。

赤唐辛子に含まれる発痛物質であるカプサイシン (capsaicin) は末梢神経系および脊髄に感作を引き起こすことが広く知られていることから、健常成人6名について、カプサイシンクリームを左前腕背側部の10×5 cmの範囲に塗布することにより、神経感作状態を誘導した。電気刺激はカプサイシンクリームを塗布した皮膚上に設置した表面電極を介して、強度5mA, 頻度2Hz, 持続時間0.2msecの矩形波として提示したが、カプサイシンクリーム塗布以前はこの電気刺激では被験者は“痛み”を知覚しないことを予め確認した。この電気刺激をトリガーとして、204ch全頭型脳磁計により、座位、安静、閉眼、覚醒状態でのMEGをサンプリング周波数300Hz, 記録周波数帯域0.1~25Hz, 加算平均100回の条件で記録し、最大発火部位の指標となる等価電流双極子 (ECDs: equivalent current dipoles) の位置、潜時、発火強度の指標であるモーメント (Q) を求めた。また、カプサイシンクリーム塗布後の電気刺激に伴い知覚される主観的な“痛み”の程度を、VAS (visual analogue scale) により0~10の10段階で各被験者に評価してもらった。そしてMEGを①カプサイシンクリーム塗布直前, ②塗布後の電気刺激によりVASが2に達した時点, ③VASが4に達した時点でそれぞれ記録し、感作に伴う中枢神経系の活動の変化について解析した。

本研究において得られた主な結果は以下の3点に要約することができる。

(1) 等価電流双極子 (ECDs) の平均ピーク潜時は3記録条件で差がなく、カプサイシ

ンクリーム塗布後の神経感作による影響が認められなかった。

(2)最大発火部位の指標となるECDsの位置に関しては、カプサイシンクリーム塗布前にECDsの位置が一次体性感覚野に認められた4例中3例で、塗布後にその位置が運動前野に移動したことから、運動前野と痛覚系との密接な関係が先行研究と同様に示唆された。

(3)発火強度の指標であるQ値は、カプサイシンクリーム塗布直前に較べてVASが4に達した時点で有意に増加した。発火強度の指標であるQ値は痛覚過敏との関連が注目されており、本研究では両者の相関関係が示唆されたことから、このQ値は痛覚過敏の定量的評価法として大いに期待される。

以上のように本研究は、“痛み”が知覚されない程度の電気刺激により誘発される大脳皮質活動が、末梢へのカプサイシンクリームの塗布により増大するのに伴い、“痛み”が知覚されるようになることを確認したものであるとともに、こうした現象出現の背景として神経感作が生じていることを強く示唆するものである。また、このような神経感作は四肢に“痛み”を有する患者によく見られることが知られており、このような症例に経皮的通電刺激法による除痛を適用する場合には、本研究と同様に、通常は“痛み”が知覚されない程度の弱い電気刺激強度であっても中枢神経系の活動は増強されているため、“痛み”の知覚につながる可能性があることも本研究から示唆される。したがって、本研究は高知大学博士（医学）の授与に十分値するものであると評価することができる。

氏名(本籍)	森下 佐織 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第72号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成20年11月28日
学位論文題目	Cloning, polymorphism, and inhibition of β -carbonic anhydrase of <i>Helicobacter pylori</i> (ヘリコバクターピロリ β 炭酸脱水酵素の遺伝子クローニング, 遺伝子多型, 酵素阻害の検討)
発表誌名	Journal of Gastroenterology 2008; Vol.43(11): 849-857

審査委員	主査	教授	小林	道也
	副査	教授	花崎	和弘
	副査	教授	西岡	豊

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 森下 佐織

論文題目

Cloning, polymorphism and inhibition of β -carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*

(ヘリコバクターピロリ β 炭酸脱水酵素の遺伝子クローニング, 遺伝子多型, 酵素阻害の検討)

(論文要旨)

【目的】

現行の除菌治療に抵抗性を示す *Helicobacter pylori* 菌の増加が問題となっており、新しい薬理作用を持つ薬剤の開発が望まれている。本研究では *H. pylori* 菌の酸順応性に必要な β クラス炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase ; CA)に注目し、胃粘膜病変と β -CAの遺伝子多型の関連について検討した。さらに、*H. pylori*の α -および β -CAに対して阻害活性を有するsulpirideを用い、*H. pylori*培養株に対する増殖阻害効果を検討し、CA阻害薬の除菌療法への応用について基礎的検討を行なった。

【方法】

種々の胃粘膜病変症例(胃炎15人、胃潰瘍6人、胃癌16人)の胃内から採取した *H. pylori* の全 β -CA遺伝子配列を解析し、アミノ酸多型と病変との関連について検討した。また、多剤耐性菌を含む5種類の *H. pylori*培養株を用い、CA阻害剤sulpirideの増殖抑制効果をkilling assayにて検討した。さらに、sulpirideに対し高感受性と低感受性を示す *H. pylori* 培養株において、 α および β -CA遺伝子の発現を半定量PCRで比較検討した。

【結果】

(1) 37人の胃粘膜病変から得られた β -CA *H. pylori*の遺伝子はすべて221アミノ酸残基の蛋白をコードしていた。得られたアミノ酸配列はこれまで報告された他の細菌の β -CAとの分子相同性を保持していた。

(2) *H. pylori* β-CA アミノ酸配列の48カ所に合計57種類のアミノ酸置換が確認されたが、酵素活性に必須である2カ所の亜鉛結合ドメイン領域 (42Cys-44Asp, 98His-101Cys) に多型は見られなかった。1症例の *H. pylori* 菌では他の36症例の *H. pylori* には見られずイギリスの症例で報告された *H. pylori* 菌と同一の5種類の多型が確認された。

(3) *H. pylori* β-CA の多型⁷⁹Met:Ileは胃炎および胃癌症例から得られた *H. pylori* の40% (6/15) と6% (1/16) に認められ、統計学的な有意差が確認された (P=0.025)。他のアミノ酸多型と胃粘膜病変との間に有意な関連はなかった。

(4) *H. pylori* 培養株に対し100 µg/mlのsulpiride はほとんど増殖抑制を示さなかったが、500 µg/mlで著明な増殖抑制を示し、その増殖抑制効果に濃度依存性が確認された。菌株により感受性の差が見られたが、clarithromycinおよび metronidazoleに耐性の *H. pylori* 培養株 (HPK-5)、この2剤に加えてampicillinにも耐性の培養株 (HPK-510) もsulpirideによる増殖抑制を示した。

(5) Sulpirideに対して比較的高い感受性を示す培養株 (26695) では相対的に抵抗性を示す培養株 (NCTC11637) に比べ、α-およびβ-CAの遺伝子発現が少なかった。


【考察】

H. pylori β-CAのアミノ酸多型 (⁷⁹Met:Ile) と胃癌との関連が示唆されたが、同多型はCAの機能とは関連がなく、他の多型も含めβ-CA遺伝子型と胃粘膜病変との直接の関連は否定的であった。アミノ酸多型の解析から、*H. pylori*は白人と日本人の胃の中で異なった進化を遂げてきたと推察され、検討した中の1症例は海外で *H. pylori* 菌に感染した可能性が考えられた。sulpirideはこれまで胃潰瘍治療薬として臨床応用されてきたが、本研究により確認された *H. pylori* に対する増殖抑制作用が抗潰瘍的な薬理効果に寄与している可能性が示された。

【結論】

本研究によりCA阻害剤の *H. pylori* 除菌治療への臨床応用の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	森 下 沙 織
審 査 委 員	主 査 氏 名 小 林 道 也	
	副 査 氏 名 花 崎 和 弘	印
	副 査 氏 名 西 岡 豊	印

題 目 Cloning, polymorphism and inhibition of β -carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*
 (ヘリコバクターピロリ β 炭酸脱水酵素の遺伝子クローニング, 遺伝子多型, 酵素阻害の検討)

著 者 Saori Morishita, Isao Nishimori, Tomoko Minakuchi, Saburo Onishi, Hiroaki Takeuchi, Tetsuro Sugiura, Daniela Vullo, Andrea Scozzafava, and Claudiu T. Supuran

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Journal of Gastroenterology 2008, vol. 43, no. 11 2008年11月掲載予定

要 旨

【目的】

現行の除菌治療に抵抗性を示す *Helicobacter pylori* 菌の増加が問題となっており、新しい薬理作用を持つ薬剤の開発が望まれている。本研究では *H. pylori* 菌の酸順応性に必要な β クラス炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase ; CA) に注目し、胃粘膜病変と β -CA の遺伝子多型の関連について検討した。さらに、*H. pylori* の α -および β -CA に対して阻害活性を有する sulpiride を用い、*H. pylori* 培養株に対する増殖阻害効果を検討し、CA 阻害薬の除菌療法への応用について基礎的検討を行なった。

【方法】

種々の胃粘膜病変症例(胃炎15人、胃潰瘍6人、胃癌16人)の胃内から採取した *H. pylori* の全 β -CA 遺伝子配列を解析し、アミノ酸多型と病変との関連について検討した。また、多剤耐性菌を含む5種類の *H. pylori* 培養株を用い、CA 阻害剤 sulpiride の

増殖抑制効果をkilling assayにて検討した。さらに、sulpirideに対し高感受性と低感受性を示す*H. pylori* 培養株において、 α および β -CA遺伝子の発現を半定量PCRで比較検討した。

【結果】

(1) 37人の胃粘膜病変から得られた β -CA *H. pylori*の遺伝子はすべて221アミノ酸残基の蛋白をコードしていた。得られたアミノ酸配列はこれまで報告された他の細菌の β -CAとの分子相同性を保持していた。

(2) *H. pylori* β -CAアミノ酸配列の48カ所に合計57種類のアミノ酸置換が確認されたが、酵素活性に必須である2カ所の亜鉛結合ドメイン領域 (⁴²Cys-⁴⁴Asp, ⁹⁸His-¹⁰¹Cys) に多型は見られなかった。1症例の*H. pylori*菌では他の36症例の*H. pylori*には見られずイギリスの症例で報告された*H. pylori*菌と同一の5種類の多型が確認された。

(3) *H. pylori* β -CAの多型⁷⁹Met:Ileは胃炎および胃癌症例から得られた*H. pylori*の40% (6/15) と6% (1/16) に認められ、統計学的な有意差が確認された (P=0.025)。他のアミノ酸多型と胃粘膜病変との間に有意な関連はなかった。

(4) *H. pylori*培養株に対し100 μ g/mlのsulpiride はほとんど増殖抑制を示さなかったが、500 μ g/mlで著明な増殖抑制を示し、その増殖抑制効果に濃度依存性が確認された。菌株により感受性の差が見られたが、clarithromycinおよび metronidazole に耐性の*H. pylori*培養株 (HPK-5)、この2剤に加えてampicillinにも耐性の培養株 (HPK-510) もsulpirideによる増殖抑制を示した。

(5) Sulpirideに対して比較的高い感受性を示す培養株 (26695) では相対的に抵抗性を示す培養株 (NCTC11637) に比べ、 α -および β -CAの遺伝子発現が少なかった。

本研究で*H. pylori* β -CAのアミノ酸多型 (⁷⁹Met:Ile) と胃癌との関連が示唆されたが、同多型はCAの機能とは関連がなく、他の多型も含め β -CA遺伝子型と胃粘膜病変との直接の関連は否定的であった。アミノ酸多型の解析から、*H. pylori*は白人と日本人の胃の中で異なった進化を遂げてきたと推察され、検討した中の1症例は海外で*H. pylori*菌に感染した可能性が考えられた。

Sulpirideは従来から胃潰瘍治療薬として臨床応用されている。本研究で確認された*H. pylori*に対する増殖抑制作用が抗潰瘍的な薬理効果に寄与している可能性が示された。

H. pylori 除菌に通常用いられているclarithromycin, metronidazol, ampicillin に対する耐性菌が近年徐々に増加しているが申請者らが明らかにしたsulpirideのこれら耐性菌に対する有効性の基礎的データは本薬剤の今後の臨床応用の可能性を示す重要な知見であり学術的評価も高く、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると判断する。

氏名(本籍)	次田 誠 (香川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第73号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成20年11月28日
学位論文題目	Differential regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells (血管平滑筋細胞において炎症性サイトカインは 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 及び type-2 遺伝子の転写を異なった機序で調節する)
発表誌名	Life Sciences, Vol.83: 426-432, 2008年9月
	審査委員 主査 教授 高尾 俊弘 副査 教授 椛 秀人 副査 教授 土居 義典

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 次田 誠

論文題目

Differential regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells

血管平滑筋細胞において炎症性サイトカインは 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1およびtype-2 遺伝子の転写を異なった機序で調節する

(論文要旨)


【背景・目的】 グルココルチコイドホルモンは、その標的臓器である肝臓や下垂体前葉細胞においてステロイド代謝酵素 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD-1) によりコルチゾンからコルチゾールに活性化され、逆にミネラルコルチコイドホルモンの標的臓器である腎臓や大腸の上皮細胞では 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD-2)により不活化される。血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells: VSMC) では11 β -HSD-1および11 β -HSD-2の両酵素の発現が知られているが、その発現調節機構や細胞内ステロイド代謝調節、ならびのその生理的意義は明らかでない。そこで今回我々は、11 β -HSD-1および11 β -HSD-2遺伝子の転写調節、特に炎症性サイトカインの影響と、細胞内ステロイド代謝に及ぼす影響を、ラット大動脈由来血管平滑筋由来細胞株を用いて検討した。

【方法】 ラット血管平滑筋由来細胞 A10 細胞における、内因性グルココルチコイド受容体 (GR)、ミネラルコルチコイド受容体 (MR)の発現を RT-PCR ならびに Western blotting で、また 11 β HSD-1/-2 遺伝子の発現を、RT-PCR 法で検討した。次に代表的な炎症性サイトカインである TNF α が 11 β -HSD-1/-2 遺伝子の転写活性におよぼす効果、ならびに関与する転写因子を、各々の遺伝子の転写調節領域を有するレポーター遺伝子ならびに各種転写因子の発現ベクターを用いて解析した。さらに TNF α が細胞内グルココルチコイド代謝に及ぼす効果を、グルココルチコイド応答エレメントを有するレポーター (GRE-Luc)の発現の有無を調べた。また、11 β HSD-1/-2の両遺伝子の発現動態を各々の遺伝子転写活性を指標として評価した。さらに、11 β HSD-1がコルチゾン (非活性型グルココルチコイド) からコルチゾールへ (活性型グルココルチコイド) 変換、11 β HSD-2がコルチゾールからコルチゾンに変換される。この性質を利用して細胞内におけるコルチゾンからコルチゾールの活性化について Glucocorticoid response element 依存性転写活性を指標としたバイオアッセイ系を確立して解析した。

【結果】 ①血管平滑筋 A10 細胞において GR と MR の mRNA ならびに蛋白の発現を、また 11 β HSD-1 および 11 β HSD-2 mRNA の発現を認めた。②炎症性サイトカイン TNF- α (100pM) の存在下において 11 β HSD-1 の発現は促進させた。③一方 TNF- α は 11 β HSD-2 の発現を有意に抑制し、その効果は誘導性炎症転写抑制因子 Egr-1 が恒常的転写因子 SP1 の作用に競合する形で阻害している可能性が考えられた。④非活性型のコルチゾンは基礎状態ではグルココルチコイド依存性転写活性に有意な効果をもたらさなかったが、TNF- α (100pM, 48 h) の存在下では、著明な転写促進作用を示した。この結果より、炎症性サイトカインの存在下では非活性型のコルチゾンから活性型のコルチゾールへの活性化が亢進していることが明らかとなった。

【結論】炎症性サイトカインは11 β HSD-1の発現を促進し、11 β HSD-2の発現を抑制することにより、細胞内グルココルチコイド濃度を非活性型コルチゾンから活性型コルチゾールに変換することにより細胞内グルココルチコイド濃度を上昇させ、各種遺伝子発現誘導作用を介して血管トーンスの維持など抗ストレス作用を発揮している可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名
審 査 委 員	次 田 誠
	主 査 氏 名 高 尾 俊 弘 
	副 査 氏 名 椛 秀 人 印
	副 査 氏 名 土 居 義 典 印

題 目 Differential regulation of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells
(血管平滑筋細胞において炎症性サイトカインは 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 及び type-2 遺伝子の転写を異なった機序で調節する)

著 者 Makoto Tsugita, Yasumasa Iwasaki, Mitsuru Nishiyama, Takafumi Taguchi, Masayuki Shinahara, Yoshinori Taniguchi, Machiko Kambayashi, Yoshio Terada, Kozo Hashimoto

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
Life Sciences 83:426-432 2008年9月

要 旨

【背景・目的】 グルココルチコイドホルモンは、その標的臓器である肝臓や下垂体前葉細胞においてステロイド代謝酵素 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β -HSD-1) によりコルチゾンからコルチゾールに活性化され、逆にミネラルコルチコイドホルモンの標的臓器である腎臓や大腸の上皮細胞では 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β -HSD-2) により不活化される。血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells: VSMC) では 11β -HSD-1 および 11β -HSD-2 の両酵素の発現が知られているが、その発現調節機構や細胞内ステロイド代謝調節、ならびにその生理的意義は明らかでない。そこで今回申請者は、 11β -HSD-1 および 11β -HSD-2 遺伝子の転写調節、特に炎症性サイトカインの影響と、細胞内ステロイド代謝に及ぼす影響を、ラット大動脈由来血管平滑筋由来細胞株を用いて検討した。

【方法】ラット血管平滑筋由来細胞 A10 細胞における、内因性グルココルチコイド受容体 (GR)、ミネラルコルチコイド受容体 (MR) の mRNA および蛋白の発現を RT-PCR 法ならびに Western blotting 法で、また 11β -HSD-1/-2 遺伝子の発現を、RT-PCR 法で検討した。次に代表的な炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ が 11β -HSD-1/-2 遺伝子の転写活性におよぼす効果、ならびに関与する転写因子 AP1, C/EBP, Egr1 を、各々の遺伝子の転写調節領域を有するレポーター遺伝子な

らびに各種転写因子の発現ベクターを用いて解析した。さらに $\text{TNF}\alpha$ が細胞内グルココルチコイド代謝に及ぼす効果を、グルココルチコイド応答エレメントを有するレポーター (GRE-Luc) の発現の有無を調べた。また、 $11\beta\text{-HSD-1/2}$ の両遺伝子の発現動態を各々の遺伝子転写活性を指標として評価した。さらに、 $11\beta\text{-HSD-1}$ は非活性型グルココルチコイドであるコルチゾンから活性型グルココルチコイドのコルチゾールへ変換し、また $11\beta\text{-HSD-2}$ によってコルチゾールからコルチゾンに変換されるという性質を利用して細胞内におけるコルチゾンからコルチゾールの活性化について Glucocorticoid response element 依存性転写活性を指標としたバイオアッセイ系を確立して解析した。

【結果】 結果の要点は以下のようにまとめられる。

- ① 血管平滑筋 A10 細胞において GR と MR の mRNA ならびに蛋白の発現を認めた。また A10 細胞において $11\beta\text{-HSD-1}$ および $11\beta\text{-HSD-2}$ mRNA の発現を認めたことより、血管平滑筋は副腎コルチコステロイドの標的臓器と考えられた。
- ② 炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ (1 nM) の存在下において $11\beta\text{-HSD-1}$ の発現は有意に促進された。その効果には炎症関連転写因子 AP1 および C/EBPs が関与する可能性が考えられた。
- ③ 一方 $\text{TNF-}\alpha$ (1 nM) は $11\beta\text{-HSD-2}$ の発現を有意に抑制し、その効果は誘導性炎症転写抑制因子 Egr-1 が恒常的転写因子 SP1 の作用に競合する形で阻害している可能性が考えられた。
- ④ 非活性型のコルチゾンは基礎状態ではグルココルチコイド依存性転写活性に有意な効果をもたらさなかったが、 $\text{TNF-}\alpha$ (100pM, 48 h) の存在下では、著明な転写促進作用を示した。この結果より、炎症性サイトカインの存在下では非活性型のコルチゾンから活性型のコルチゾールへの活性化が亢進していることが明らかとなった。

以上より炎症性サイトカインは $11\beta\text{-HSD-1}$ の発現を促進し、 $11\beta\text{-HSD-2}$ の発現を抑制することにより、細胞内グルココルチコイド濃度を非活性型コルチゾンから活性型コルチゾールに変換することにより細胞内グルココルチコイド濃度を上昇させ、各種遺伝子発現誘導作用を介して血管トーンスの維持など抗ストレス作用を発揮している可能性が強く示唆された。

本論文は炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ が $11\beta\text{-HSD-1}$ および $11\beta\text{-HSD-2}$ 遺伝子の転写を異なった機序で調節して細胞内グルココルチコイド濃度を調節することを明らかにしたことにより、今後、動脈硬化の治療やメタボリック症候群の発症予防に役立つ可能性を示した。また、MR 阻害薬は GR, MR を介したグルココルチコイド作用のうち MR 依存性作用を阻害することで、これらのホルモンにより惹起されるイオンチャネル遺伝子や炎症関連遺伝子の過剰発現を抑制し、臨床的に有用な結果をもたらす可能性を示した。よって、本論文は本学の学位に値すると判断した。