

2012. 9
特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人
高知大学学報

高知大学学位授与記録第五十七号

法人企画課広報戦略室発行

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14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 140 号	曳田 知紀	Immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies on noninvasive and invasive extramammary Paget's disease (非浸潤性および浸潤性乳房外パジェット病についての免疫組織化学およびFISHによる研究)	1
甲医博第 141 号	山中 茂雄	Link between Pericardial Effusion and Attenuation of QRS Voltage in Patients with Hypothyroidism (甲状腺機能低下症における心嚢液貯留とQRS 電位低下との関係)	6
甲総医博第 9 号	緒方 巧二	Upregulation of HNF-1 β during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration (HNF-1 β の発現増加は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)	11
乙総医博第 20 号	横川 真紀	Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells (イミキモドはTh1/Th17細胞を介してマウスにおける紫外線誘導性有棘細胞癌の進展を妨げる)	16

氏名(本籍)	曳田 知紀(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第140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24年7月31日
学位論文題目	Immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies on noninvasive and invasive extramammary Paget's disease (非浸潤性および浸潤性乳房外パジェット病についての免疫組織化学およびFISHによる研究)
発表誌名	The International Journal of Surgical Pathology(in press)

審査委員	主査	教授	李	康弘
	副査	教授	佐野	栄紀
	副査	教授	花崎	和弘

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 曳田 知紀

論文題目

Immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies on noninvasive and invasive extramammary Paget's disease (非浸潤性および浸潤性乳房外パジェット病についての免疫組織化学および FISH による研究)

(論文要旨)

【背景】乳房外パジェット病(EMPD)は胞巣状に表皮内に増殖する稀な悪性腫瘍である。高知大学医学部附属病院(高知医科大学附属病院の時代を含む)では 1981 年から 2011 年まで約 30 年間に病理組織検査の対象となった症例は重複を除いて 65 例であった。1 年間の発症例は凡そ 2、3 件で推移していたことになる。性別では男性は 36 症例で、女性は 29 症例であった。年齢分布は最少年令が 54 歳で、最高年令が 93 歳であった。平均年齢は 75.1 歳で、70 歳代から 80 歳代に症例の多数が存在した。しかし EMPD は纏まった数の症例を検討した報告が少なく、予後因子を決定できない状況にある。

【目的】EMPD は会陰部や陰嚢部に見られる表皮内で増殖する悪性腫瘍であり、しばしば表皮内における腫瘍細胞浸潤の境界や真皮内浸潤の有無に確定が困難なことがある。現在までに EMPD の腫瘍細胞マーカーとして CK7、CEA、MUC1 などが報告されている。今回種々のマーカーのうち、有効なものはどれなのかを検討して、合わせて蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)を含めた HER2 の検索も実施した。




【方法】上記の当院の症例および他施設の症例を合わせて、17 例について免疫組織学的検索を行なった。年齢分布は 57 歳から 87 歳までで、男性 7 例、女性 10 例であった。発生部位は会陰部 14 例、陰嚢部 3 例であり、表皮内のみの増殖例が 13 例、真皮内浸潤を伴ったものが 4 例であった。切除皮膚組織はホルマリン固定後、型のごとく HE 染色標本を作成し、次に示す抗体を使用して、LSABC 法による免疫染色を行なった。使用した抗体は①CK7、②CK19、③CK20、④CAM5.2、⑤EMA、⑥CEA、⑦MUC1、⑧HER2、⑨Cyclin D1、⑩ER、⑪PGR の 11 種類であった。HER2 については、免疫染色陽性例と

陰性例に対して、FISH 法による遺伝子増幅の検索も試みた。

【結果】17例全ての症例について免疫組織化学法(IHC)が陽性を呈したものは、①CK7、②CK19、④CAM5.2、⑦MUC1であった。特に①CK7、②CK19では常に全ての腫瘍細胞が陽性であった。④CAM5.2、⑦MUC1は、陽性例のほかに陽性と陰性細胞が混在した例を認めた。⑤EMA、⑥CEAは明白な陰性例がともに6例ずつ認められた。③CK20は陰性であった。⑨Cyclin D1は少数例で少数の核が陽性であった。⑩ER、⑪PGRは検索した6例全て陰性であった。

【考察】EMPDの腫瘍細胞マーカーとしては、①CK7が有用であり、④CAM5.2、⑦MUC1も良い腫瘍マーカーであったが、②CK19は①CK7と並んで極めて有用なものであった。一方、⑤EMA、⑥CEAは陰性例も見られ、不均一な染色性を示した。⑨Cyclin D1は有意な結果は得られなかった。乳腺のパジェット病は⑩ER、⑪PGRが陽性であり、表皮内乳管上皮由来とされるが、EMPDでは表皮内汗管上皮由来であると考えられて、⑩ER、⑪PGRは検索症例では全て陰性であった。EMPDではIHCで40-60%が⑧HER2陽性であるとの報告は認められるが、FISH陽性で遺伝子が増幅されているという報告は見られない。浸潤性EMPDで陽性率が高く、今回も4/4(100%)であり、非浸潤性EMPDは8/13(61%)であった。CISH(chromogenic *in situ* hybridization)でのHER2遺伝子増幅の報告は認められる(10/23,43%)。FISHではIHC(++)陽性の症例も含めて今回の検索では全て陰性であった。HER2遺伝子/タンパク過剰発現の状況を検索し、確認することは分子標的薬剤の応用に関連する可能性も想定される。従って真にHER2遺伝子増幅が生じていないのかどうかについての更なる今後の検索が必要と思われる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	曳田 知紀
審 査 委 員	主 査 氏 名	李 康 弘 
	副 査 氏 名	佐 野 栄 紀 
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘 

題 目 Immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies on noninvasive and invasive extramammary Paget's disease (非浸潤性および浸潤性乳房外パジェット病についての免疫組織化学およびFISHによる研究)

著 者 Tomonori Hikita, MD, Yuji Ohtsuki, MD, Toshiharu Maeda, MD, Mutsuo Furihata, MD

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
The International Journal of Surgical Pathology (in press)

要 旨

【背景と目的】

乳房外パジェット病は会陰部や陰嚢に好発する皮膚悪性腫瘍であり、腺癌形質を有する腫瘍細胞が胞巣状の表皮内進展を示すことを特徴とする。病変の進行により、真皮浸潤を生じ、転移を起こす例もある。比較的稀な疾患であることから、病理学的研究の報告は少なく、組織診断の実践に関わる情報が不足している。本学附属病院の病理診断記録では、1981年から2011年までの約30年間に65名の患者が確認可能であった。これら65名の性別は男性36名、女性29名であり、全患者の平均年齢は75.1歳であった。

乳房外パジェット病の腫瘍細胞は表皮内でしばしば非連続性の散在性分布を示す。よって、通常のHE染色標本の観察では、腫瘍細胞分布の把握と外科切除断端における病変の有無の判断に悩む場合がある。また、腫瘍細胞の真皮浸潤の判定も時として難しい。このような症例では、腫瘍細胞の免疫組織化学マーカーが診断に役に立つものと考えられる。パジェット病細胞については、現在までに、CK7、CEA、MUC1などのマーカーが報告されているが、その有効性は未だ確立しているとは言い難い。

申請者は、乳房外パジェット病細胞の同定に応用可能と考えられる複数の候補マーカーを本学附属病院の症例を中心に精査し、最良のマーカーの抽出を試みた。また、近年注目されている乳房外パジェット病の分子標的治療に関連して、HER2蛋白の発現とその遺伝子の増幅についても分析を加えた。

【方法】

本学症例および他施設症例を合わせ、計 17 例について解析を行なった。年齢分布は 57 歳から 87 歳、性別は男性 7 例、女性 10 例、発生部位は会陰部 14 例、陰囊部 3 例であった。これらの中には、明らかな真皮内浸潤を伴うものが 4 例含まれていた。切除皮膚組織のホルマリン固定パラフィンブロックから HE 染色標本を作成するとともに、以下に示すマーカーに関して LSABC 法による免疫組織化学染色を行なった。すなわち、CK7、CK19、CK20、CAM5. 2、EMA、CEA、MUC1、HER2、Cyclin D1、ER、PGR の 11 種類である。HER2 については、免疫組織化学染色および FISH 法による遺伝子増幅の検索も行った。

【結果】

17 例全ての症例について陽性を呈したマーカーは、CK7、CK19、CAM5. 2、MUC1 の 4 種類であった。特に CK7、CK19 では全ての腫瘍細胞が常に陽性像を示した。CAM5. 2、MUC1 では、陽性細胞と陰性細胞が混在する例が多く存在した。EMA、CEA は陰性例がともに 6 例ずつ認められた。CK20 は全例で陰性であった。Cyclin D1 は一部症例で少数の腫瘍細胞核が陽性を示すのみであった。ER、PGR については、17 例中 6 例のみを検討したが、全例で陰性であった。一方、HER2 の免疫組織化学染色に関しては、真皮浸潤を示す 4 例では全例 (100%) が陽性、非浸潤性の 13 例では 8 例 (61%) が陽性を示した。しかし、FISH 法では全例が *HER2* 遺伝子の増幅陰性であった。

【考察】

乳房外パジェット病のマーカーとしては、CK7 および CK19 が最良と結論された。CK19 の有効性については、本研究で初めて明らかにされた。CAM5. 2、MUC1 も利用可能ではあるが、腫瘍細胞の一部のみが陽性の例があり、有効性において劣っていた。EMA、CEA、Cyclin D1 はマーカーとして不適切と判断された。また、乳房パジェット病の腫瘍細胞は通常 ER、PGR が陽性であるが、今回検討した乳房外パジェット病では全例が陰性であった。これは、前者が表皮内乳管上皮由来であるのに対し、後者は表皮内汗管上皮由来との定説に合致する。一方、乳房外パジェット病症例の半数前後が免疫組織化学的に HER2 タンパク陽性であるとの既存の報告に一致し、本研究でも 17 例中 12 例が HER2 陽性を示した。特に、真皮浸潤を示す 4 例では全例が陽性であり、非浸潤例よりも陽性率が高かった。ただし、FISH 法では全 17 例が *HER2* 遺伝子増幅陰性であった。欧州の研究グループは乳房外パジェット病症例の約 4 割で *HER2* 遺伝子増幅が陽性であったことを報告している。この違いの原因は今のところ不明であり、今後さらなる分析を要する。しかしながら、HER2 タンパクの過剰発現を認める点においては、共通しており、HER2 を分子標的とするハーセプチン治療の根拠を強化する結果と言える。

【審査結果】

申請者は、乳房外パジェット病の腫瘍細胞マーカーとして、CK7 と CK19 の有用性を確立した。また、HER2 の分析結果は、国内症例に対する今後の分子標的治療方針に大きな示唆を与えるものである。よって、審査員一同は高知大学医学博士の称号に値する研究内容と判断した。

氏名(本籍)	山中 茂雄(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第141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24年9月28日
学位論文題目	Link between Pericardial Effusion and Attenuation of QRS Voltage in Patients with Hypothyroidism (甲状腺機能低下症における心嚢液貯留とQRS電位低下との関係)
発表誌名	Cardiology 116 :32~36, 2009年12月

審査委員	主査	教授	高田	淳
	副査	教授	寺田	典生
	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 山中 茂雄

論文題目 Link between Pericardial Effusion and Attenuation of
QRS Voltage in Patients with Hypothyroidism

甲状腺機能低下症における心嚢液貯留とQRS電位低下との関係

(論文要旨)

【背景】

甲状腺機能低下症の特徴的な臨床所見は、徐脈、拡張期高血圧、心嚢液貯留 (PE)、低電位心電図などがある。甲状腺機能低下症の約1/3の症例で心エコー図にてPEを認めるが、低電位心電図とPEとの関係は明らかではない。そこで、甲状腺機能低下症患者におけるPEおよび低電位の発生頻度と、その発生に寄与する関連要因について検討した。

【方法】

高知大学医学部附属病院検査部で心電図、心エコー図および血液検査を施行した、連続64名の甲状腺機能低下症の患者を対象とした。心疾患、肺疾患、肝硬変、ネフローゼ症候群および慢性腎不全の患者は除外した。QRS波は12誘導心電図において測定し、QRS波の高さが四肢誘導で5mm未満、胸部誘導で10mm未満を低電位とした。血液は肘静脈から採取し、アルブミン (BCG法) とCRP (免疫比濁法) はH-747 (日立株式会社) を用いた。白血球数 (半導体レーザを用いたフローサイトメトリー法) とヘマトクリット (赤血球パルス波高値検出法) はSE9000 (シスメックス株式会社) を、FT4 (ECLIA法) とTSH (ECLIA法) はE170 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) にてそれぞれ測定した。M-モードと2D-心エコー図検査は東芝SSH160A (東芝社) またはセコイア512 (シーメンス社) を用いた。連続波ドップラー法を用いて三尖弁逆流ジェット の最大速度を測定し、肺動脈収縮期圧を求めた ($4 \times$ 三尖弁逆流最大流速² + 右房圧)。PEはM-モード法を用い、HorowitzやWeitzmanらの方法にて評価した。2群間の比較はStudent t検定またはMann-Whitney検定により行った。PE貯留と低電位に関連する要因をロジスティック回帰分析により求めた。

【結果】

PEは24例 (38%) に、低電位は16例 (25%) に認めた。3変数 (FT4、肺動脈収縮期圧、アルブミン) を用いた多変量解析では、FT4 ($p=0.007$ 、オッズ比=0.032) と

肺動脈収縮期圧 ($p=0.020$ 、オッズ比=1.085) とがPEと有意な関連を示した。一方、低電位と4変数 (FT4、アルブミン、肺動脈収縮期圧およびPE) との関連では、FT4 ($p=0.014$ 、オッズ比=0.029) とアルブミン ($p=0.036$ 、オッズ比=0.255) とが重要な関連因子であった。しかし、低電位とPEは有意な関係 ($p=0.424$) は示さなかった。

【考 察】




PE貯留の機序として炎症性と非炎症性があり、非炎症性PE貯留は、血行動態要因、血管透過性亢進、膠質浸透圧低下などによる。本研究では、PE有無の2群間にCRP、白血球数、左室駆出率、左房径に有意差はなく、多変量解析の結果、FT4と肺動脈収縮期圧がPE貯留に対する重要な因子であった。したがって、甲状腺機能低下症におけるPEは漿液性 (非炎症性) で、甲状腺ホルモン低下による心筋毛細血管透過性亢進による心筋間質液の増加が心外膜側に流出し、PE貯留につながることを示唆された。また、肺動脈収縮期圧の上昇は右心室の後負荷増大による右心系圧の上昇をきたし、PEのクリアランスに影響を与え、PE貯留に寄与したと考えられた。

低電位心電図は甲状腺機能低下症で比較的良好にみられる所見であるが、PE貯留により起こるかどうかは不明である。多変量解析の結果、PEは低電位に関連した独立因子ではなく、FT4とアルブミンの低下が低電位に関連する重要な因子であった。すなわち、甲状腺ホルモン低下と膠質浸透圧の低下による心筋間質液の増加は、細胞外空間の電気抵抗を増加させQRS電位の減衰となったことが示唆された。

【結 論】

PEと低電位は、甲状腺機能低下症で比較的良好にみられる所見であった。甲状腺ホルモン低下による心筋間質液の増加に加え、PEには肺動脈収縮期圧の上昇が、低電位心電図には膠質浸透圧の低下が、それぞれ関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	山中 茂雄
審 査 委 員	主 査 氏 名	高 田 淳 
	副 査 氏 名	寺 田 典 生 
	副 査 氏 名	土 居 義 典 

題 目 Link between Pericardial Effusion and Attenuation of QRS Voltage in patients with Hypothyroidism
 (甲状腺機能低下症における心嚢液貯留とQRS 電位低下との関係)

著 者 Shigeo Yamanaka, Yoshitaka Kumon, Yoshihisa Matsumura, Mikio Kamioka, Hiroaki Takeuchi, Tetsuro Sugiura

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Cardiology 116 :32~36, 2009年12月

要 旨

本論文の公開審査は、平成24年8月6日午後6時より大学院セミナー室で行われた。

発表の要旨

【研究の背景】

甲状腺ホルモンが循環系におよぼす影響については、広く知られるところである。甲状腺機能異常の中で、甲状腺機能低下症の特徴的な臨床所見は、徐脈、拡張期高血圧、心嚢液貯留(PE)、低電位心電図などがある。一般に甲状腺機能低下症の約1/3の症例で心エコー図にてPEを認めると報告されているが、低電位心電図とPEとの関係は明らかではない。今回、甲状腺機能低下症患者におけるPEおよび低電位の発生頻度と、その発生に寄与する関連要因について検討した。

【方法】

高知大学医学部附属病院検査部で心電図、心エコー図および血液検査を施行した、連続64名の甲状腺機能低下症の患者を対象とした。心疾患、肺疾患、肝硬変、ネフローゼ症候群および慢性腎不全の患者は除外した。QRS波は12誘導心電図において測定し、QRS波の高さが四肢誘導で5mm未満、胸部誘導で10mm未満の両方、またはいずれかを満たすものを低電位とした。血液検査ではアルブミン(BCG法)とCRP(免疫比濁法)(日立株式会社H-747で測定)、白血球数(半導体レーザを用いたフローサイトメトリー法)とヘマトクリット(赤血球パルス波高値検出法)(シスメックス株式会社SE9000で測定)、FT4(ECLIA法)とTSH(ECLIA法)

は（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 E170 で測定）の各項目を測定した。Mモードと 2D 心エコー図検査には東芝 SSH160A（東芝社）またはセコイア 512（シーメンス社）を用い、また連続波ドップラー法を用いて三尖弁逆流ジェットの最大速度を測定し、肺動脈収縮期圧も求めた（ $4 \times$ 三尖弁逆流最大流速² + 右房圧）。

PE は M モード法を用い、Horowitz や Weitzman らの方法にて半定量的に評価した。

2 群間の比較は Student t 検定または Mann-Whitney 検定により行い、PE 貯留と低電位に関連する要因の多変量解析にはロジスティック回帰分析を用いた。

【結果】

PE は 24 例（38%）に、低電位は 16 例（25%）に認めた。3 変数（FT4、肺動脈収縮期圧、アルブミン）を用いた多変量解析では、FT4（ $p=0.007$ 、オッズ比=0.032）と肺動脈収縮期圧（ $p=0.002$ 、オッズ比=1.085）とが PE と有意な関連を示した。一方、低電位と 4 変数（FT4、アルブミン、肺動脈収縮期圧および PE）との関連では、FT4（ $p=0.014$ 、オッズ比=0.029）とアルブミン（ $p=0.036$ 、オッズ比=0.255）とが重要な関連因子であった。しかし、低電位と PE は有意な関係（ $p=0.424$ ）は示さなかった。

【考察】

PE 貯留の機序として炎症性と非炎症性があり、非炎症性 PE 貯留は、血行動態要因、血管透過性亢進、膠質浸透圧低下などによる。本研究では、PE 有無の 2 群間に CRP、白血球数、左室駆出率、左房径に有意差はなく、多変量解析の結果、FT4 と肺動脈収縮期圧が PE 貯留に対する重要な因子であった。したがって、甲状腺機能低下症における PE は漿液性（非炎症性）で、甲状腺ホルモン低下による心筋毛細血管透過性亢進によって増加した心筋間質液が心外膜側に流出し、PE 貯留につながることを示唆された。また、肺動脈収縮期圧の上昇は右心室の後負荷増大による右心系圧の上昇をきたし、PE のクリアランスに影響を与え、PE 貯留に寄与したと考えられた。

低電位心電図は甲状腺機能低下症で比較的良好にみられる所見であるが、PE 貯留に起因するかどうかは不明である。多変量解析の結果、PE は低電位に関連した独立因子ではなく、FT4 とアルブミンの低下が低電位に関連する重要な因子であった。すなわち、甲状腺ホルモン低下と膠質浸透圧の低下による心筋間質液の増加は、細胞外空間の電気抵抗を増加させ QRS 電位の減衰となったことが示唆された。

【結論】

PE と低電位は、甲状腺機能低下症で比較的良好にみられる所見であった。甲状腺ホルモン低下による心筋間質液の増加に加え、PE には肺動脈収縮期圧の上昇が、低電位心電図には膠質浸透圧の低下が、それぞれ関連していることが示唆された。

本研究の今後の展望としては、診断後の治療による、心嚢液貯留や心電図変化の経過追うと共に、甲状腺機能低下症だけでなく機能亢進症も対象として、甲状腺ホルモンのみならず、自己抗体等との関連も含めて症例を重ねて検討する計画である。

氏名(本籍)	緒方 巧二 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第9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24年9月28日
学位論文題目	Upregulation of HNF-1 β during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration (HNF-1 β の発現増加は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)
発表誌名	American Journal of Physiology (in press)

審査委員	主査	教授	藤枝	幹也
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	執印	太郎

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 緒方 巧二

論文題目 Upreulation of HNF-1 β during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration
(HNF-1 β の発現亢進は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)

(論文要旨)

[背景] 虚血性急性腎障害は、成人人口における急性腎障害 (AKI) の最も一般的な病態である。AKI 後の腎機能は約 3 割の症例で回復するが、障害を受けた尿細管の再生につながるメカニズムは不明な点が多い。虚血性 AKI の新たな治療戦略を検討する前に、腎細胞の増殖や再生につながるメカニズムの解明が必要である。尿細管上皮細胞は、細胞の損傷の後に脱分化 (dedifferentiation) し、Wnt-4 や Notch-2 などの胎生期の遺伝子が再発現し再生と修復に重要な役割を果たしていることを我々の研究室は報告している。Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) は腎臓、肝臓、膵臓及び他の上皮組織に発現する転写因子である。HNF-1 β の遺伝子変異は若年性糖尿病と腎や生殖器の先天性奇形を引き起こす。最近では、HNF-1 β は、SOCS-3 の転写を抑制するとともに、多発性嚢胞腎の責任遺伝子 (PKD2) を誘導し尿細管細胞の極性の形成に重要な役割を果たすとの報告されている。しかし、腎の虚血/再灌流で HNF-1 β によって制御されるシグナル伝達経路および転写プログラムは不明である。

今回、AKI 後の尿細管の損傷における HNF-1 β 、SOCS-3、STAT3 の機能的な役割を検討するとともに、尿細管細胞における HNF-1 β 、SOCS-3、STAT3、Pkd1 のシグナル伝達経路を検討した。

[方法] ラット左腎動脈を 1 時間虚血後に再灌流し、2-48 時間後に HNF-1 β 、SOCS3、PKD2 の蛋白発現を Western Blot と免疫組織学的に検討した。また培養近位尿細管細胞に HNF-1 β を強制発現し、SOCS-3 の転写活性と蛋白発現を測定し、細胞増殖を検討した。3D ゲルの培養系において構造的に非活性化と野生型の HNF-1 β を強制発現した尿細管細胞の形態を検討した。

[結果] 虚血再灌流後の腎において、HNF-1 β の発現と PKD2 の発現がそれぞれ 2-12 時間、6-24 時間で亢進し、組織学的にも近位尿細管で HNF-1 β の発現亢進を認めた。一方 SOCS3 の発現は 6-24 時間で低下した。HNF-1 β の強制発現により SOCS3 のプロモーター活性と蛋白発現は低下し、STAT3 のリン酸化は亢進した。また HNF-1 β の強制発現で、

3D ゲル内における尿細管構造の発育は亢進した。それに対して構造的非活性型の HNF-1 β を強制発現した尿細管細胞では 3D ゲルでの尿細管構造は形成されなかった。

[考察] 我々のグループによる以前の研究では、虚血性 AKI における Wnt-4 の発達遺伝子の発現を明らかにし、この遺伝子が腎尿細管細胞の増殖を促進することを確認した。また、Delta-1/Notch-2/Hes-1 経路は AKI の回復期近位尿細管において発現が増加していることを報告した。これらの論文から、胎生期遺伝子が AKI からの回復時に再発現し脱分化をおこすことが、尿細管の再生において重要な要因であることが考えられた。この仮説を確認するために、我々は、AKI モデルと腎尿細管細胞における HNF-1 β の発現パターンとその伝達経路を検討した。

尿細管細胞再生のメカニズムとしては、HNF-1 β は虚血/再灌流傷害後の近位尿細管細胞においてその発現が増加し、HNF-1 β は SOCS-3 の発現および STAT3 の活性化を調節することにより、細胞増殖と尿細管形成を制御している。また HNF-1 β / SOCS-3 の伝達経路は AKI 後の再生と腎尿細管細胞の増殖を調節している。今後虚血/再灌流傷害後の腎機能回復の分子機構のより正確な理解を得るためにさらなる検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	緒方 巧二
審 査 委 員	主 査 氏 名	藤 枝 幹 也 印
	副 査 氏 名	椛 秀 人 印
	副 査 氏 名	執 印 太 郎 印

題 目 Upregulation of HNF-1 β during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration
 (HNF-1 β の発現増加は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)

著 者 Koji Ogata, Yoshiko Shimamura, Kazu Hamada, Masayuki Hisa, Masayuki Bun, Nazuki Okada, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Masayuki Ishihara, Toru Kagawa, Taro Horino, Shimpei Fujimoto, Yoshio Terada

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、年 月
 American Journal of Physiology (in press)

要 旨

〔背景〕 虚血性急性腎障害は、成人人口における急性腎障害 (AKI) の最も一般的な病態である。AKI 後の腎機能は約 3 割の症例で回復するが、障害を受けた尿細管の再生につながるメカニズムは不明な点が多い。尿細管上皮細胞は、細胞の損傷の後に脱分化 (dedifferentiation) し、Wnt-4 や Notch-2 などの胎生期の遺伝子が再発現し再生と修復に重要な役割を果たしていることを著者らは報告している。Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) は腎臓、肝臓、膵臓及び他の上皮組織に発現する転写因子である。HNF-1 β の遺伝子変異は若年性糖尿病 (MODY5) と腎や生殖器の先天性奇形を引き起こす。最近では、HNF-1 β は、suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) の転写を抑制するとともに、多発性嚢胞腎の責任遺伝子 (*Pkd2*) を誘導し尿細管細胞の極性の形成に重要な役割を果たすとの報告されている。しかし、腎の虚血/再灌流で HNF-1 β によって制御されるシグナル伝達経路および転写プログラムは不明である。

今回、AKI 後の尿細管の損傷における HNF-1 β 、SOCS-3、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の機能的な役割を検討するとともに、尿細管細胞における HNF-1 β 、SOCS-3、STAT3、*Pkd2* のシグナル伝達経路を検討した。

[方法] ラット左腎動脈を1時間虚血後に再灌流し、2-48時間後にHNF-1 β 、SOCS-3、PKD2の蛋白発現をWestern Blotと免疫組織学的に検討した。また培養近位尿細管細胞にHNF-1 β を強制発現し、SOCS-3の転写活性と蛋白発現を測定し、細胞増殖を検討した。3Dゲルの培養系において構造的非活性化と野生型のHNF-1 β を強制発現した尿細管細胞の形態を検討した。

[結果] 虚血再灌流後の腎において、Western blot解析でHNF-1 β の発現とPKD2の発現がそれぞれ3-12時間、6-48時間で亢進し、組織学的にも近位尿細管でHNF-1 β の発現亢進を認めた。一方SOCS-3の発現は3-48時間で低下した。ラット近位尿細管細胞(NRK-52細胞)でHNF-1 β の強制発現によりSOCS3のプロモーター活性と蛋白発現は低下し、STAT3のリン酸化は亢進した。さらに、hepatocyt growth factor (HGF)の存在下でHNF-1 β の発現が増加し、SOCS-3の発現は抑制された。またHNF-1 β の強制発現で、3Dゲル内における尿細管構造の発育は亢進したが、構造的非活性化型のHNF-1 β を強制発現した尿細管細胞では3Dゲルでの尿細管構造は形成されなかった。

[考察] 著者らのグループは、以前、虚血性AKIにおけるWnt-4の発達遺伝子の発現を明らかにし、この遺伝子が腎尿細管細胞の増殖を促進することを確認している。また、Delta-1/Notch-2/Hes-1経路はAKIの回復期近位尿細管において発現が増加していることも報告している。これらの結果から、著者らは、AKIからの回復時に、胎生期遺伝子が再発現し脱分化をおこすことが、尿細管の再生において重要な要因であることを証明した。今回、この仮説を確認するために、AKIモデルと腎尿細管細胞におけるHNF-1 β の発現パターンとその伝達経路を検討した。

その結果、HNF-1 β は虚血/再灌流傷害後の近位尿細管細胞においてその発現が増加し、HNF-1 β はSOCS-3の発現およびSTAT3の活性化を調節することにより、細胞増殖と尿細管形成を制御していることを示した。これらの事から、HNF-1 β /SOCS-3の伝達経路は、AKI後の尿細管細胞の再生と増殖を調節していることを証明した。今後、虚血/再灌流傷害後の腎機能回復の分子機構のより正確な理解を得るために、さらなる検討が必要である。

以上、本論文は、AKI後の尿細管細胞の再生と増殖メカニズムを、HNF-1 β /SOCS-3シグナル伝達系で証明した重要かつ貴重な研究であると考えられる。さらに、掲載誌も世界的に権威のあるjournalであり、今回の研究は、大学院博士(医学)の学位を授与されるに値する内容と思われる。

氏名(国籍)	横川 真紀 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第20号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成24年7月24日
学位論文題目	Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells (イミキモドはTh1/Th17細胞を介してマウスにおける紫外線誘導性有棘細胞癌の進展を妨げる)
発表誌名	Molecular Carcinogenesis (published on line ahead of print) 2012年3月16日

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	大畑	雅典
	副査	教授	執印	太郎

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 横川真紀

論文題目 Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells
(イミキモドは Th1/Th17 細胞を介してマウスにおける紫外線誘導性有棘細胞癌の進展を妨げる)

(論文要旨)

トール様受容体 (TLR)7,8 のアゴニストであるイミキモド (IMQ) はイミダゾキノロン系の新規化合物であり、尖圭コンジローマや表在性皮膚癌の外用薬として臨床に利用されている。IMQ は TLR7,8 を介して自然免疫系および獲得免疫系を活性化することにより抗腫瘍効果を誘導すると考えられているが、その詳細な作用機序は必ずしも明らかではない。

近年、多くの悪性腫瘍で Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) の活性化が報告されており、ヒト皮膚腫瘍においては有棘細胞癌 (SCC)、Paget 病、Bowen 病、日光角化症 (AK) などの腫瘍細胞内で Stat3 の活性化が確認されている。Stat3 は転写因子として働くのみでなく、Stat3 そのものが発癌に直接関与することが明らかになってきた。このため表皮特異的に活性型 Stat3 を恒常的に発現するトランスジェニックマウス (K5.Stat3C) は化学発癌、紫外線誘導性発癌実験系において、野生型マウスに較べ早期に悪性度の高い SCC が多発する。今回、我々はこのマウスを利用して IMQ 外用による TLR を介した抗腫瘍メカニズムを解析した。K5.Stat3C マウスに UVB を 13 週間反復照射することにより耳介皮膚の表皮角化細胞に核異型を誘導できる。これを表皮内 SCC である AK モデルとした。13 週間照射後、右耳介に 6 週間、週 3 回 IMQ を外用し、病理組織学的変化を経時的に検討した。無処置の対照左耳介では、過角化、軽度の表皮肥厚、少数の異型細胞がやがて増殖傾向を示し、浸潤型 SCC に進展した。しかし、このとき真皮の炎症細胞浸潤は軽度であった。一方、IMQ を外用した右耳介では、表皮細胞の腫瘍性増殖は抑制され、経時的に真皮の炎症細胞浸潤が高度となった。免疫組織化学染色にて、IMQ 外用により SCC の TUNEL 陽性を示すアポトーシス細胞数の増加と Ki-67 陽性細胞数の減少、真皮に浸潤する CD3 陽

性 T 細胞数および形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell, pDC) 数の増加がいずれも有意差をもって認められた。次に、より長期である 16 週間 UVB を反復照射することによって基底膜を越えて浸潤する SCC モデルマウスを作製した。照射後、右耳介に同様に IMQ を 4 週間外用した。外用終了時、無処置の左耳介では腫瘍がさらに増大しているが、IMQ を外用した右耳介では 7 匹中 6 匹で対照と比較して著明に腫瘍の増大が抑制され、tumor thickness に有意差が得られた。病理組織学的に、対照群では SCC の進展が著明であるが真皮への炎症細胞浸は少ない一方で、IMQ 投与群では腫瘍細胞の増殖抑制と真皮への強い細胞浸潤がみられた。これら浸潤細胞の多くは T 細胞や pDC であった。さらに詳細に検討したところ、IMQ 外用により退縮する SCC に浸潤する細胞は、CD4 陽性 IL-17 陽性細胞 (Th17)、IFN- γ 産生 T 細胞 (Th1/Tc1)、腫瘍内に CD8 陽性細胞を確認した。また、RT-PCR 法にて、IFN γ 、IL-17A、IL-12、IL-23 の遺伝子発現が増加を real-time RT-PCR で確認した。

以上まとめて、(1) IMQ 外用によってマウス紫外線誘導性 SCC の増殖が抑制された。(2) このとき、真皮に浸潤細胞、特に CD3 陽性 T 細胞、pDC を多数認めた。(3) IMQ 外用部位では IFN γ 、IL-17A、IL-12、IL-23 の mRNA レベルでの発現が増加傾向を示し、真皮に Th17 細胞や IFN γ 産生細胞を認める一方、腫瘍内に CD8 の細胞障害性 T 細胞を検出した。これにより、IMQ による抗腫瘍活性は、従来から想定されていた Th1 細胞、細胞傷害性 T 細胞の活性化のみならず、IL-23 を介して活性化する Th17 細胞も重要な役割を果たしていることが示唆された。IMQ の抗腫瘍免疫能の解析を、マウス de novo carcinogenesis の系で行った研究は例がなく、Th1/Th17 の活性化を示唆した新たな知見である。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	横川 真紀
審 査 委 員	主 査 氏 名	宇 高 恵 子 印
	副 査 氏 名	大 畑 雅 典 印
	副 査 氏 名	執 印 太 郎 印

題 目 Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells
 (イミキモドは Th1/Th17 細胞を介してマウスにおける紫外線誘導性有棘細胞癌の進展を妨げる)

著 者 Yokogawa Maki, Takaishi Mikiro, Nakajima Kimiko, Kamijima Reiko, DiGiovanni John, Sano Shigetoshi

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Molecular Carcinogenesis (published on line ahead of print) 2012 年 3 月 16 日

要 旨

横川真紀さんの公開学位審査は、2012 年 7 月 2 日 (月) 16:00 より約 1 時間にわたり行った。まず口頭で研究内容の発表を行った。

【背景】

自然免疫系の細胞の異物受容体である TLR7,8 のリガンドであるイミキモド (IMQ) は、イミダゾキノリン系の合成化合物であり、尖圭コンジローマや表在性皮膚癌の外用薬として使われている。申請者らは、keratinocyte 特異的に活性化型 Stat3 を恒常発現する K5.Stat3C トランスジェニックマウスで紫外線誘発性の表在性扁平上皮がん (SCC in situ) の発生が高頻度に見られる (Kim et al., Oncogene, 28, 950-960, 2009) ことを利用して、この SCC 発症マウスモデルを用いて IMQ 外用による TLR を介した抗腫瘍効果のメカニズムを解析した。

【方法と材料】

K5.Stat3C マウスの耳介に 13 週連続で UVB 照射をし、一方の耳介に IMQ を塗り、無処置の対側と SCC の発症を比較した。局所の炎症反応の解析には、免疫組織染色、サイトカイン遺伝子発現のリアルタイム PCR を用いた。

【結果】

K5.Stat3C マウスの耳介に UVB 照射を繰り返すと、角化、表皮の肥厚が起こったのち、次第に異型細胞が出現し、やがて増殖傾向が強まり浸潤型 SCC に発展した。13 週 UVB 連続照射をして表在性腫瘍を発生させる実験系で、一方の耳介に IMQ 塗布すると、無処理の対側に比べて、真皮の炎症細胞浸潤が著明であり、また表皮細胞の腫瘍性増殖が対照に比べて抑えられていた。そのメカニズムを探るため、耳介の免疫組織染色をしたところ、IMQ 塗布により、SCC 細胞のアポトーシス誘導と Ki-67 陽性の分裂能の高い細胞の減少が有意にみられた。また、IMQ 塗布側の耳介では真皮に顕著な CD3 陽性 T 細胞および plasmacytoid dendritic cells (pDCs) の浸潤がみられた。

次に、より長期に16週間UVB照射を行い、基底膜を越えて真皮に浸潤するSCCマウスモデルを作製した。紫外線照射終了後、IMQの塗布を開始し、4週間外用した。この時点で比較すると、無処理の対側に比べ、IMQ塗布をした耳介では7匹中6匹で顕著な腫瘍増殖の抑制がみられた。IMQを塗布した耳介では、真皮への炎症細胞の浸潤が著明で、これら浸潤細胞の大半はCD3陽性のT細胞とpDCであった。これらT細胞には、IFN- γ 陽性細胞や、IL-17の細胞内染色で陽性に染まるTh17細胞へ分化したCD4T細胞が多かった。耳介組織におけるサイトカイン分泌をリアルタイムPCR法により測定したところ、IL-17Aの発現が有意に増加しており、有意レベルには達していないが、IFN- γ 、IL-12、IL-23などの産生が増加していた。さらに、CD8T細胞の細胞浸潤は、真皮の他、表皮内への浸潤も観察された。このことから、IMQを外用した腫瘍の新生部位においては、Th1/Th17基軸の免疫応答が起こっていることが推測された。

【考察】

K5.Stat3Cマウスを利用することにより、UVB照射をして、日光角化症から表在性SCCをへて浸潤性のSCCへ発展する自然な腫瘍発生モデルにおける免疫応答を観察することが可能になった。この実験系を利用して、TLR7,8リガンドであるIMQに誘発される皮膚局所での免疫応答を観察することができた。その結果、腫瘍細胞のapoptosisが増加し、腫瘍細胞の増加、さらなる浸潤性SCCへの進行が有意に抑制されることがわかった。今回の実験では、腫瘍細胞のapoptosisのメカニズムは解析していないが、UVB誘発腫瘍のde novo tumorigenesisの反応の場においては、NK細胞や細胞傷害性T細胞(CTL)による抗原非特異的あるいは抗原特異的な抗腫瘍反応が起こっていることがわかった。さらにTh17細胞の活性化による炎症の惹起が腫瘍制御に働くことが示唆された。

興味深いことに、IMQ反応性の局所に著明なリンパ球の浸潤がみられるにもかかわらず、対側の腫瘍に対する抗腫瘍効果はみられず、浸潤細胞の働きが局所に限定された反応である可能性が示唆された。

K5.Stat3Cマウスは、野生型のマウスに比べてUVB誘導性の腫瘍発生が起こりやすいことから、今後、発癌過程におけるStat3経路の炎症反応の関与と、発生した腫瘍細胞を制御する免疫応答の両方の視点から、in vivoにおける腫瘍発生の研究を進めていく必要性が示唆された。