

2013. 4

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六十号

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143号	川 西 裕	Regulatory effects of Spirulina complex polysaccharides on growth of murine RSV-M glioma cells through toll-like receptor 4 (マウスグリオーマに対するスピルリナ複合多糖体のTLR4を介した抗腫瘍効果)	1
甲医博第144号	植 瑞 希	Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis : characteristic feature of chronic hepatitis C patients on haemodialysis (透析C型慢性肝炎患者における肝病変進展評価に関する検討)	6
甲医博第145号	麻 植 啓 輔	Clinical effects of fenofibrate on serum uric acids, triglyceride, and creatinine in patients with hypertriglyceridemia (高中性脂肪血症患者においてフェノフィブラートが血清尿酸値、中性脂肪値、クレアチニン値に及ぼす臨床効果)	11
甲医博第146号	市 川 賢 吾	Branched-chain amino acid-enriched nutrients stimulate antioxidant DNA repair in a rat model of liver injury induced by carbon tetrachloride (分岐鎖アミノ酸製剤はラット四塩化炭素慢性肝障害に対する酸化ストレスによるDNAの損傷を修復させる)	16
甲総医博第10号	王 宇 杰	Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity (幼若ラットの嗅球内ヒストンアセチル化反応は嗅覚嫌悪学習およびシナプス可塑性を促進する)	21

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総医博第11号	DUMAVIBHAT, NARONGPON	Radiographic progression of silicosis among Japanese tunnel workers in Kochi (高知県における日本人隧道工事従事者の珪肺症のエックス線画像の進行について)	26
甲総医博第12号	MUZEMBO BASILUA ANDRE	Serum selenium and selenoprotein P in patients with silicosis (珪肺患者における血清セレンウムとセノプロテインP)	31
甲総医博第13号	楊 晶	AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells. (新規Jak2阻害剤AZ960は成人T細胞白血病細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導する)	36
甲総医博第14号	大 田 学	Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury (エダラボンは頭部外傷後の軸索損傷と酸化ストレスを抑制し、認知機能障害を予防する)	42
甲総医博第15号	酒 井 瑞	A Novel Lung Injury Animal Model Using KL-6-Measurable Human MUC1-Expressing Mice (ヒトMUC1発現マウスを用いたKL-6測定可能新規肺障害動物モデル)	46
乙総医博第23号	馬 場 裕 一	Usefulness of High-sensitive Cardiac Troponin T for Evaluating the Activity of Cardiac Sarcoidosis (心サルコイドーシスの活動性評価に対する高感度心筋トロポニンTの有用性)	53
乙総医博第24号	小 谷 典 弘	Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) associated with the CD20 antigen regulates the rituximab-induced proliferation inhibition in B-cell lymphoma cells (リツキシマブ誘導B細胞リンパ腫細胞増殖抑制におけるFGFR3-CD20分子間相互作用複合体の関与)	58

氏名(本籍)	川西裕 (徳島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第143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25年1月31日
学位論文題目	Regulatory effects of Spirulina complex polysaccharides on growth of murine RSV-M glioma cells through toll-like receptor 4 (マウスグリオーマに対するスピルリナ複合多糖体のTLR4を介した抗腫瘍効果)
発表誌名	Microbiology and Immunology(in press)

審査委員	主査	教授	佐野	栄紀
	副査	教授	大畑	雅典
	副査	教授	宇高	恵子

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 川西 裕

Regulatory effects of *Spirulina* complex polysaccharides on growth of murine RSV-M glioma cells through toll-like receptor 4
論文題目 (マウスグリオーマに対するスピルリナ複合多糖体の TLR4 を介した抗腫瘍効果)

(論文要旨) *Spirulina* はラン藻類 (藍色細菌) に分類され、その細胞外膜は強力な免疫賦活作用を持つ *E. coli* LPS (lipopolysaccharide) に類似の構造を有すると考えられている。*Spirulina* CPS (complex polysaccharide) は *E. coli* LPS と同様に TLR4 (Toll-like receptor 4) を介した作用で自然免疫系を賦活するとされているが、悪性グリオーマに対する作用は明らかになっていない。本研究ではマウスグリオーマ細胞株 RSV-M を用いて悪性グリオーマに対する *Spirulina* CPS の作用機序について検証することを目的とした。

RSV-M を C3H/HeN マウスの皮下に移植し、対照群と *Spirulina* CPS, *E. coli* LPS を投与する群に分け、1 週間毎に腹腔内投与した。経時的に腫瘍径を測定すると C3H/HeN では *E. coli* LPS と *Spirulina* CPS を投与した群で有意に腫瘍増殖が抑制された。同様の実験を TLR4 に変異を持つ C3H/HeJ で行ったが、*Spirulina* CPS, *E. coli* LPS を投与しても、対照群と比較して腫瘍抑制効果は認めなかった。以上の結果より、*Spirulina* CPS, *E. coli* LPS はともに TLR4 を介して抗腫瘍効果を発揮することが確かめられた。獲得免疫について調べる目的で RSV-M 移植後 3 週間で腫瘍摘出を行い、1 週間後に C3H/HeN へ再移植を行った。*Spirulina* CPS 投与群は抗腫瘍効果を保持していたが、*E. coli* LPS 投与群では抗腫瘍効果は認められなかった。

血清中のサイトカインを測定すると C3H/HeN マウスの *E. coli* LPS 投与群では、顕著に IFN- γ と IL-17 のレベルが上昇したのに対し、*Spirulina* CPS 投与群では IFN- γ のレベルがわずかに上昇するだけで、IL-17 のレベルはほとんど変化しないか、低下した。グリオーマに対する IL-17 の作用を明らかにする目的で、RSV-M を移植したマウスに IL-17 に対する抗体を投与した。C3H/HeN においては、抗 IL-17 抗体は *Spirulina* CPS と同様に腫瘍抑制効果を示した。C3H/HeJ においては、*Spirulina* CPS 投与群では抗腫瘍効果を認めなかったが抗 IL-17 抗体投与群では腫瘍抑制効果を認め、グリオーマの増殖には IL-17 の産生が関与していることが示唆された。

IL-17 は血管新生を促進することで腫瘍増殖に関与すると報告されており、血管内皮マーカーである CD31 に対する免疫染色を行い血管新生について評価した。*Spirulina* CPS 投与群では、対照群に比較して優位に血管新生が抑制されている所見を認めた。*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には IL-17 の産生抑制による血管新生の抑制が関与しているものと考えられた。

グリオーマに対する抗腫瘍効果を担うエフェクター細胞を同定する目的で、自然免疫系の免疫担当細胞である NK 細胞やマクロファージのマーカである asialo GM1 に対する抗体を *Spirulina* CPS とともに投与すると対照群に比べて早期に腫瘍増殖が認められ、*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には NK 細胞やマクロファージなどが関与していることが示唆された。*Spirulina* CPS では獲得免疫も賦活されたため、T リンパ球のマーカである CD4, CD8 に対する抗体を *Spirulina* CPS とともに投与したところ、anti-asialo GM1 Ab 投与群にやや遅れて腫瘍増殖を認め、*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には CD4 陽性, CD8 陽性 T リンパ球も関与していることが示唆された。

Spirulina CPS はグリオーマに対して自然免疫のみならず細胞性免疫応答も賦活することで抗腫瘍免疫応答を増強することを解明した。さらに、抗腫瘍効果の発現には IL-17 の分泌制御による血管新生の抑制が関与することも見出した。悪性グリオーマに対して手術後の補助療法として行われる放射線療法、化学療法では重篤な副作用の可能性があるが、*Spirulina* CPS により免疫系を賦活し抗腫瘍効果を発揮させる免疫療法は、既存の治療方法に比べ副作用が少ないと考えられる。現在の標準治療やワクチン療法のアジュバントとして併用することも可能であると思われ、今後の研究により悪性グリオーマに対する新たな治療の選択肢となり得る可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

		氏名	川西 裕
審査委員	主査氏名	佐野 栄紀	
	副査氏名	大畑 雅典	
	副査氏名	宇高 恵子	

題目 Regulatory effects of *Spirulina* complex polysaccharides on growth of murine RSV-M glioma cells through toll-like receptor 4

(マウスグリオーマに対するスピルリナ複合多糖体のTLR4を介した抗腫瘍効果)

著者 Yu Kawanishi, Akira Tominaga, Hiromi Okuyama, Satoshi Fukuoka, Takahiro Taguchi, Yutaka Kusumoto, Toshio Yawata, Yasunori Fujimoto, Shiro Ono, Keiji Shimizu

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Microbiology and Immunology(in press)

要 旨

Spirulina はラン藻類(藍色細菌)に分類され、その細胞外膜は強力な免疫賦活作用を持つ *E. coli* LPS (lipopolysaccharide) に類似の構造を有すると考えられている。*Spirulina* CPS (complex polysaccharide) は *E. coli* LPS と同様に TLR4 (Toll-like receptor 4) を介した作用で自然免疫系を賦活するとされているが、悪性グリオーマに対する作用は明らかになっていない。本研究ではマウスグリオーマ細胞株 RSV-M を用いて悪性グリオーマに対する *Spirulina* CPS の作用機序について検証することを目的とした。

RSV-M を C3H/HeN マウスの皮下に移植し、対照群と *Spirulina* CPS, *E. coli* LPS を投与する群に分け、1週間毎に腹腔内投与した。経時的に腫瘍径を測定すると C3H/HeN では *E. coli* LPS と *Spirulina* CPS を投与した群で有意に腫瘍増殖が抑制された。同様の実験を TLR4 に変異を持つ C3H/HeJ で行ったが、*Spirulina*

CPS, *E. coli* LPS を投与しても、対照群と比較して腫瘍抑制効果は認めなかった。以上の結果より、*Spirulina* CPS, *E. coli* LPS はともに TLR4 を介して抗腫瘍効果を発揮することが確かめられた。獲得免疫について調べる目的で RSV-M 移植後 3 週間で腫瘍摘出を行い、1 週間後に C3H/HeN へ再移植を行った。*Spirulina* CPS 投与群は抗腫瘍効果を保持していたが、*E. coli* LPS 投与群では抗腫瘍効果は認められなかった。

血清中のサイトカインを測定すると C3H/HeN マウスの *E. coli* LPS 投与群では、顕著に IFN- γ と IL-17 のレベルが上昇したのに対し、*Spirulina* CPS 投与群では IFN- γ のレベルがわずかに上昇するだけで、IL-17 のレベルはほとんど変化しないか、低下した。グリオーマに対する IL-17 の作用を明らかにする目的で、RSV-M を移植したマウスに IL-17 に対する抗体を投与した。C3H/HeN においては、抗 IL-17 抗体は *Spirulina* CPS と同様に腫瘍抑制効果を示した。C3H/HeJ においては、*Spirulina* CPS 投与群では抗腫瘍効果を認めなかったが抗 IL-17 抗体投与群では腫瘍抑制効果を認め、グリオーマの増殖には IL-17 の産生が関与していることが示唆された。

IL-17 は血管新生を促進することで腫瘍増殖に関与すると報告されており、血管内皮マーカーである CD31 に対する免疫染色を行い血管新生について評価した。*Spirulina* CPS 投与群では、対照群に比較して優位に血管新生が抑制されている所見を認めた。*Supirulina* CPS の抗腫瘍効果には IL-17 の産生抑制による血管新生の抑制が関与しているものと考えられた。

グリオーマに対する抗腫瘍効果を担うエフェクター細胞を同定する目的で、自然免疫系の免疫担当細胞である NK 細胞やマクロファージのマーカーである asialo GM1 に対する抗体を *Spirulina* CPS とともに投与すると対照群に比べて早期に腫瘍増殖が認められ、*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には NK 細胞やマクロファージなどが関与していることが示唆された。*Spirulina* CPS では獲得免疫も賦活されたため、T リンパ球のマーカーである CD4, CD8 に対する抗体を *Spirulina* CPS とともに投与したところ、anti-asialo GM1 Ab 投与群にやや遅れて腫瘍増殖を認め、*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には CD4 陽性、CD8 陽性 T リンパ球も関与していることが示唆された。

Spirulina CPS はグリオーマに対して自然免疫のみならず細胞性免疫応答も賦活することで抗腫瘍免疫応答を増強することを解明した。さらに、抗腫瘍効果の発現には IL-17 の分泌制御による血管新生の抑制が関与することも見出した。悪性グリオーマに対して手術後の補助療法として行われる放射線療法、化学療法では重篤な副作用の可能性があるが、*Spirulina* CPS により免疫系を賦活し抗腫瘍効果を発揮させる免疫療法は、既存の治療方法に比べ副作用が少ないと考えられる。現在の標準治療やワクチン療法のアジュバントとして併用することも可能であると思われ、今後の研究により悪性グリオーマに対する新たな治療の選択肢となり得る可能性があると考えられた。

氏名(本籍)	植 瑞 希 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第144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25年2月28日
学位論文題目	Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis : characteristic feature of chronic hepatitis C patients on haemodialysis (透析C型慢性肝炎患者における肝病変進展評価に関する検討)
発表誌名	Journal of Viral Hepatitis(in press)

審査委員	主査	教授	花崎	和弘
	副査	教授	杉浦	哲朗
	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 植 瑞希

論文題目

Hepatocyte Destruction with Enhanced Collagen Synthesis: Characteristic Feature of Chronic Hepatitis C Patients on Hemodialysis

透析 C 型慢性肝炎患者における肝病変進展評価に関する検討

(論文要旨)

透析患者では非透析患者に比べ、C 型慢性肝炎の罹患率は高率であることが知られている。近年、透析技術の向上により透析患者の長期生存が可能になってきている。そのため透析患者においても、肝硬変や肝細胞癌など C 型慢性肝炎に関連した死亡例の増加が報告され、抗ウイルス治療の重要性が認識されるようになってきた。

透析中の C 型慢性肝炎患者に対し必要な治療を行って予後を改善するため、その臨床的特徴を把握する目的で本研究を行った。

透析中の患者 98 人 (HCV 以外の肝疾患罹患患者; HBs 抗原陽性、アルコール多飲、肝細胞癌合併、自己免疫性肝炎、薬剤性肝障害、原発性胆汁性肝硬変症、硬化性胆管炎、ヘモクロマトーシス、ウィルソン病、は除く) に対し AST、ALT、血小板数、アルブミン値、P-III-P、IV型コラーゲン 7S、ヒアルロン酸などを測定した。患者を①HCV 抗体陽性かつ HCV-RNA 陽性; 43 人②HCV 抗体陽性かつ HCV-RNA 陰性; 5 人③HCV 抗体陰性; 50 人の 3 群に分け、臨床背景やそれぞれの検査項目につき単変量解析、多変量解析を行った。

単変量解析では AST、ALT、P-III-P、IV型コラーゲン 7S、ヒアルロン酸が HCV 持続感染患者で有意に高く、血小板数、アルブミン値が有意に低かった。

多変量解析では、ALT と P-III-P、IV型コラーゲン 7S が HCV 持続感染患者で有意に高かった。

また、ROC 曲線から 4 型コラーゲン 7 S 5 ng/mL 以上、P-III-P 5 U/mL 以上は HCVRNA 陽性患者を鑑別する指標として有用で、感度 91%、特異度 91%、陽性的中率 89%、陰性的中率 93%であった。また、AST/血小板比 index (APRI) (HEPATOLOGY 2007;46:307) を用いた肝線維化進展度と、4 型コラーゲン 7 S および P-III-P との相関関係は認めなかったが、肝線維化進展群 (APRI:0.4 以上)

では多くの症例の血小板が既に10万以下となっており、インターフェロン治療が既に容易ではない症例が多く存在することが明らかとなった。

透析患者においても、HCV持続感染者ではP-III-P、IV型コラーゲン7Sなどの肝線維化マーカーが高い傾向にあり、肝線維化の進展がHCVの持続感染の特徴であることが明らかになった。

多くの透析C型慢性肝炎患者ではトランスアミナーゼが正常範囲にあるためインターフェロン治療開始の判断が難しい。が、トランスアミナーゼ正常でも肝線維化が進展している可能性が高く、心疾患の合併がなく5年以上の生命予後が期待でき、年齢が比較的若い患者に対しては、治療を積極的に考慮したほうがよいと思われた。

論文審査の結果の要旨

	氏名	植 瑞 希
審査委員	主査氏名	花崎 和弘 
	副査氏名	杉浦 哲朗 
	副査氏名	執印 太郎 

題 目 Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis : characteristic feature of chronic hepatitis C patients on haemodialysis

(透析C型慢性肝炎患者における肝病変進展評価に関する検討)

著 者

M. Ue, N. Ikebe, K. Munekage, T. Ochi, A. Hirose, H. Kataoka, S. Fujimoto, K. Kikuchi, Y. Okuhara, M. Ono, and T. Saibara

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

要 旨

[研究背景と目的]

C型慢性肝炎は非透析患者に比べて、透析患者での罹患率が高いことは良く知られている。透析患者におけるC型慢性肝炎関連死亡例は近年増加しており、抗ウイルス治療の重要性が認識されている。しかし、透析C型慢性肝炎患者における抗ウイルス治療の適応に関する明らかな指標は未だ確立されていない。本研究は透析C型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス治療の適応をより明確にするために行われた。

[対象と方法]

HBs抗原陽性、アルコール多飲、肝細胞癌合併、自己免疫性肝炎、薬剤性肝障害、原発性胆汁性肝硬変症、硬化性胆管炎、ヘモクロマトーシス、Wilson病の肝臓疾患を除く、透析中の患者98人を対象とした。患者を①HCV抗体陽性かつHCV-RNA陽

性；43人②HCV抗体陽性かつHCV-RNA陰性；5人③HCV抗体陰性；50人の3群に分け、AST、ALT、血小板数、アルブミン値、P-III-P、IV型コラーゲン7S、ヒアルロン酸、AST/血小板 index (APRI)などを測定した。臨床背景やそれぞれの検査項目につき単変量解析、多変量解析を行った。

[結果]

- ① 単変量解析ではAST、ALT、P-III-P、IV型コラーゲン7S、ヒアルロン酸がHCV持続感染患者で有意に高く、血小板数、アルブミン値が有意に低かった。
- ② 多変量解析では、ALTとP-III-P、IV型コラーゲン7SがHCV持続感染患者で有意に高かった。
- ③ ROC曲線からIV型コラーゲン7S 5 ng/mL以上、P-III-P 5 U/mL以上はHCV-RNA陽性患者を鑑別する指標として有用であり、感度91%、特異度91%、陽性的中率89%、陰性的中率93%であった。
- ④ APRIを用いた肝線維化進展度と、IV型コラーゲン7SおよびP-III-Pとの相関関係は認めなかったが、肝線維化進展群 (APRI: 0.4以上)では、多くの症例の血小板が既に10万以下となっており、インターフェロンを用いた抗ウイルス治療が既に容易ではない症例が多く存在することが明らかとなった。

[結論と本研究の意義]

透析C型慢性肝炎患者における抗ウイルス治療に関する従来の適応は、①比較的若い、②5年以上の生命予後が期待できる、③心疾患の合併がみられないことであった。本研究によってこれらの3点に加えて、新たな指標として肝線維化マーカーであるIV型コラーゲン7S、P-III-PおよびAPRIが有用であることが判明した。特にIV型コラーゲン7Sが5 ng/ml以上 and/or P-III-Pが5 U/ml以上の症例は、早期に抗ウイルス治療を開始することが予後向上に寄与する可能性が高いことが示唆された。

以上、本研究によって透析C型慢性肝炎患者における抗ウイルス治療の適応がより明確となった。したがって本論文は透析C型慢性肝炎患者の予後向上に寄与する臨床的に意義の高い貴重な研究成果を報告しており、審査員一同は本論文が高知大学博士(医学)に相応しいものと判断した。

氏名(本籍)	麻 植 啓 輔 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第145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25年2月28日
学位論文題目	Clinical effects of fenofibrate on serum uric acids, triglyceride, and creatinine in patients with hypertriglyceridemia (高中性脂肪血症患者においてフェノフィブラートが血清尿酸値、中性脂肪値、クレアチニン値に及ぼす臨床効果)
発表誌名	International Medical Journal(in press)

審査委員	主査	教授	藤本	新平
	副査	教授	横谷	邦彦
	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 麻植 啓輔

論文題目

Clinical effects of fenofibrate on serum uric acids, triglyceride, and creatinine in patients with hypertriglyceridemia

(高中性脂肪血症患者においてフェノフィブラートが血清尿酸値、中性脂肪値、クレアチニン値に及ぼす臨床効果)

(論文要旨)

血清中性脂肪値の上昇はメタボリックシンドロームにおける重要な構成因子として注目を受けることが多い。血清中性脂肪値が上昇すると動脈硬化のリスクが高まることが知られており、冠動脈疾患の独立した危険因子であるとの報告もある。内臓肥満に伴う高中性脂肪血症はインスリン抵抗性を合併し糖尿病を合併しやすく、また急性膵炎の発症に関与するといった様に各疾患との関わりが強くなることが現在示されている。そのため、高中性脂肪血症の治療ニーズは以前にも増して高まっている。

高尿酸血症は腎機能低下、高血圧症との関連や心血管イベントや脳卒中による死亡の独立した危険因子であるため、積極的な治療の取り組みが必要とされる。しかし高尿酸血症の成因は一様ではなく、現代ではメタボリックシンドロームと診断される患者数が増加している中で、高尿酸血症を伴う症例が少なからず認められる。高尿酸血症は単独で発症する症例よりも、メタボリックシンドロームに合併する症例が多いと言われている。

抗中性脂肪薬として頻用される選択性の高い PPAR- α ligand である fenofibrate には血清尿酸値を低下させる効果があることが知られていたが、その機序は長らく不明であった。その後、近位尿細管における尿酸の再吸収に Urate transporter1 (URAT1) の関与することが明らかにされた。そして近年 fenofibrate のもたらす血清尿酸値低下作用がこの URAT1 の阻害によるということも明らかとなった。

今回我々は高中性脂肪血症のために fenofibrate を投与された症例を retrospective に検索し、血清中性脂肪値と血清尿酸値に与える効果を経時的に観察し、また血清尿酸値と血清クレアチニン値の相関についても検討を行った。1999年6月から2010年9月の期間で、当施設の外来において高中性脂肪血症の治療のみを目的として fenofibrate を投与された症例を retrospective に検索し、6カ月以上服用した症例の内治療開始直前の3カ月間の血清中性脂肪値の平均値が 150mg/dl 以上の 50 症例を抽出した。同症例について治療開始後 6 カ月

間における血清中性脂肪値、尿酸値の変動を観察し、血清クレアチニン値との関連についても検討した。

fenofibrate での治療開始前 3 ヶ月間の血清中性脂肪値の平均値が 150mg/dl 以上の 50 症例に対して、治療を開始した後 6 ヶ月間の経過を観察すると、血清中性脂肪値の低下は顕著であった。投与前の血清中性脂肪値の平均値は 2802.47 mg/dl (± 84.45 mg/dl)であったのに対して、投与開始 1 ヶ月後には 225.99 mg/dl (± 83.50 mg/dl)と明らかな低下傾向を示した。(P<0.001) さらにその 1 ヶ月後には血清中性脂肪値の平均値は 192.46mg/dl まで低下したが、その後は plateau となり変化を示さなくなった。また、治療開始前の各血清中性脂肪の値毎に、fenofibrate 投与による血清中性脂肪値が 150 未満となる割合を検討したところ、治療開始前値が高値であるほど低下率が大きい傾向を示した。

全 50 症例について fenofibrate での治療前と治療開始後 5 ヶ月間の血清尿酸値の経時的変化を検討したところ、血清尿酸値も fenofibrate を投与することで低下傾向を示した。fenofibrate 投与前後の血清尿酸値と血清クレアチニン値の相関について検討を行ったところ、血清尿酸値は開始前 6.33 mg/dl (± 1.24 mg/dl) から開始後 5 か月の平均値が 4.81mg/dl (± 1.06 mg/dl)と低下したのに対して、血清クレアチニン値は治療開始前後で変化がなくこれらの間に相関を認めない結果となった。

fenofibrate の投与で血清中性脂肪値は有意に低下し、血清尿酸値についてもその減少が顕著であった。血清クレアチニン値に関しては治療前後で有意な変化を認めず、また治療前の血清クレアチニン値と血清尿酸値の変化率にも相関はなく、fenofibrate が腎機能を改善させることで尿酸排泄を促進させているというメカニズムではないということが予測される。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	麻植 啓輔
審 査 委 員	主 査 氏 名	藤本 新平 
	副 査 氏 名	横谷 邦彦 
	副 査 氏 名	執印 太郎 

題 目 Clinical effects of fenofibrate on serum uric acids, triglyceride, and creatinine in patients with hypertriglyceridemia
 (高中性脂肪血症患者においてフェノフィブラートが血清尿酸値、中性脂肪値、クレアチニン値に及ぼす臨床効果)

著 者 Keisuke Oe, Masafumi Ono, Tsunehiro Ochi, Kensuke Munekage, Hiroshi Mizuta, Kosei Masuda, Nobuto Okamoto, Toshiji Saibara

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
 International Medical Journal (in press)

要 旨

【背景・目的】

血清中性脂肪値の上昇はメタボリックシンドロームにおける重要な構成因子である。高尿酸血症は単独で発症する症例よりも、メタボリックシンドロームに合併する症例が多く、腎機能低下や動脈硬化性疾患による死亡の独立した危険因子である。抗中性脂肪薬として使用される PPAR- α ligand である fenofibrate には血清尿酸値低下作用があることが知られていたが、その機序は長らく不明であった。近年、fenofibrate による血清尿酸値低下作用は、近位尿細管における尿酸の再吸収を担う Urate transporter 1 (URAT1) の阻害によることが明らかとなった。しかし、高中性脂肪血症患者における fenofibrate の血清尿酸値に対する効果は明らかでない。今回、申請者らは高中性脂肪血症患者において、fenofibrate による臨床的な血清尿酸値低下作用を検討した。

【方法】

1999年6月から2010年9月の期間で、高知大学医学部附属病院の外来において高中性脂肪血症の治療を目的として fenofibrate を投与された症例を retrospective に検索し、6カ月以上服用

した症例の内治療開始直前の3カ月間の血清中性脂肪値の平均値が150mg/dl以上の50症例を抽出した。同症例について治療開始後6カ月間における血清中性脂肪値、尿酸値の変動を観察し、血清クレアチニン値との関連についても検討した。

【結果】

投与前の血清中性脂肪値は 282.47 ± 84.45 mg/dl (mean \pm SD)であったが、投与開始1ヵ月後には 225.99 ± 83.50 mg/dlと有意に低下した($p < 0.001$)。さらにその1ヵ月後には血清中性脂肪値の平均値は192.46mg/dlまで低下したが、その後はplateauとなった。

血清尿酸値は投与前 6.19 ± 1.28 mg/dlから投与開始後1ヵ月には 4.55 ± 1.20 mg/dlと有意に低下し($p < 0.001$)、以後plateauとなった。投与前の血清尿酸値と投与後の血清尿酸値の変化(治療前値-治療中の平均値)の相関についても検討した所、投与前値が高いほど投与開始後の血清尿酸値の低下が大きく、両者は有意に相関していた($r = 0.60$, $p < 0.01$)。一方、血清クレアチニン値は経過中変化なく、投与前血清クレアチニン値と投与前後の血清尿酸値の変化に相関は見られず、fenofibrateによる血清尿酸値低下作用が腎機能改善によるものではないことが示唆された。

本論文で、高中性脂肪血症患者におけるfenofibrateの血清尿酸値低下作用が明らかになり、メタボリックシンドロームにおける高尿酸血症治療手段として有効である可能性が示された。よって、本論文は、高知大学博士(医学)に値すると判断した。

氏名(本籍)	市川賢吾 (高知県)															
学位の種類	博士(医学)															
学位記番号	甲医博第146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25年2月28日															
学位論文題目	Branched-chain amino acid-enriched nutrients stimulate antioxidant DNA repair in a rat model of liver injury induced by carbon tetrachloride (分岐鎖アミノ酸製剤はラット四塩化炭素慢性肝障害に対する酸化ストレスによるDNAの損傷を修復させる)															
発表誌名	Molecular Biology Reports、39(12)、(10803~10810)、2012年12月															
	<table> <tr> <td>審査委員</td> <td>主査</td> <td>教授</td> <td>西原</td> <td>利治</td> </tr> <tr> <td></td> <td>副査</td> <td>教授</td> <td>降幡</td> <td>睦夫</td> </tr> <tr> <td></td> <td>副査</td> <td>教授</td> <td>渡橋</td> <td>和政</td> </tr> </table>	審査委員	主査	教授	西原	利治		副査	教授	降幡	睦夫		副査	教授	渡橋	和政
審査委員	主査	教授	西原	利治												
	副査	教授	降幡	睦夫												
	副査	教授	渡橋	和政												

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 市川賢吾

論文題目

Branched-chain amino acid-enriched nutrients stimulate antioxidant DNA repair in a rat model of liver injury induced by carbon tetrachloride

(分岐鎖アミノ酸製剤はラット四塩化炭素慢性肝障害に対する酸化ストレスによる DNA の損傷を修復させる)

(論文要旨)

背景と目的：酸化ストレスとは活性酸素が産生され障害作用を発現する生体作用と、生体システムが直接活性酸素を解毒したり、生じた障害を修復する生体作用との間で均衡が崩れた状態のことである。生体組織の通常の酸化還元状態が乱されると、過酸化物質やフリーラジカルが産生され、タンパク質、脂質そして DNA が障害されることで、さまざまな細胞内器官が障害を受ける。肝臓においては酸化ストレスによって低アルブミン血症を含む慢性肝障害が惹起されることが知られている。分岐鎖アミノ酸の長期間の経口補給は肝障害を抑制するが、酸化ストレスを軽減させ肝線維化や肝障害の予防に関する役割は不明である。本研究の目的は、分岐鎖アミノ酸が酸化ストレスから肝機能を保護する機序を解明することである。

対象と方法：ラット四塩化炭素慢性肝障害モデルを用いて酸化ストレスに関する分岐鎖アミノ酸経口補給の効果を評価した。10匹のオスの Sprague-Dawley ラットに対して、12週間の四塩化炭素投与により慢性肝障害を引き起こした。四塩化炭素投与したラットをコントロール群 (n=5) と分岐鎖アミノ酸投与群 (n=5) に割り振った。肝障害の程度を HE 染色およびマッソントリクローム染色で確認し Ischack スコアで評価した。分子生物学的に線維化マーカー (CD133, SMA) および肝障害度マーカー (IL-6, TNF- α , IFN- γ) を評価し、さらに本研究では酸化ストレスに注目し 8-OHdG/OGG1 修復機構の動向を追うことによって、分岐鎖アミノ酸製剤の酸化ストレス抑制によつての肝障害抑制についての有用性について検討した。

結果：分岐鎖アミノ酸投与群では有意に血漿アルブミン濃度が保たれており、HE 染色およびマッソントリクローム染色では有意に肝臓の線維化を抑制していた。肝臓線維化の指標である Ischack スコアの結果、コントロール群では4匹が Stage 2 そして1匹が Stage 1 であったのに対し、分岐鎖アミノ酸投与群では2匹が Stage 1 そして3匹が Stage 0 と、肝臓の線維化が抑制されていた。リアルタイム PCR で肝臓線維化の観点からみると、分岐鎖アミノ酸投与群では肝線維化のマーカーである SMA および肝臓癌の癌幹細胞と言われる CD133 の発現も有意に抑制されていた。さらに肝障害度の観点からみても、分岐鎖アミノ酸投与群では、生体内における様々な炎症症状を引き起こす原因因子として関与する活性化マクロファージや活性化血管内皮細胞から産生される IL-6, TNF- α の発現も有意に抑制されており、ウイルス増殖の阻止や細胞増殖の抑制・免疫系および炎症の調節などの働きを

するサイトカインの一種である IFN- γ の発現が有意に上昇していた。酸化ストレスの点では、免疫染色においてコントロール群では、DNA の構成成分であるデオキシグアノシン (dG) が活性酸素などのフリーラジカルにより酸化されて分子内に生成する物質である 8-OHdG 陽性細胞が著名に出現していたのに対し、分枝鎖アミノ酸投与群では 8-OHdG 陽性細胞の出現が有意に抑制されていた。DNA 中の 8-OHdG を除去し修復する酵素であり、染色体 3p26 領域に存在する OGG1 の発現は、RNA レベルおよびタンパクレベルにおいてもコントロール群に比べて分枝鎖アミノ酸群で上昇していた。

結語：分枝鎖アミノ酸製剤は酸化ストレスを抑制し、低アルブミン血症や組織障害の発生の減少をもたらした。我々の研究結果で、分枝鎖アミノ酸製剤は、四塩化炭素によって引き起こされた肝障害ラットモデルにおいて酸化ストレスによる DNA の損傷を修復し肝機能を保持することを立証した。

論文審査の結果の要旨

		氏名	市川 賢吾
審査委員	主査氏名	西原 利治	
	副査氏名	降幡 睦夫	
	副査氏名	渡橋 和政	

題 目 Branched-chain amino acid-enriched nutrients stimulate antioxidant DNA repair in a rat model of liver injury induced by carbon tetrachloride
 (分岐鎖アミノ酸製剤はラット四塩化炭素慢性肝障害に対する酸化ストレスによるDNAの損傷を修復させる)

著 者 Kengo Ichikawa, Takehiro Okabayashi, Yasuo Shima, Tatsuo Iiyama, Yuka Takezaki, Masaya Munekage, Tsutomu Namikawa, Takeki Sugimoto, Michiya Kobayashi, Toshiki Mimura, Kazuhiro Hanazaki

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Molecular Biology Reports、39(12)、(10803~10810)、2012年12月

要 旨

分岐鎖アミノ酸製剤の長期内服は慢性肝疾患におけるアルブミン合成能を高める効能を有することは広く知られているが、慢性肝疾患における肝細胞障害や肝臓の線維化進展を防ぐ機序については、未だ十分に理解されているとは言い難い。そこで、申請者らは酸化ストレスが慢性肝疾患の進展に重要な役割を果たすことに着目し、酸化ストレスに曝された肝臓の機能維持に分岐鎖アミノ酸製剤がどのような機序を介して寄与しているか雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて検討した。

実験では四塩化炭素を12週間皮下投与して作成した肝障害モデルを用い、肝細胞壊死を反映するALT値、肝臓の蛋白合成能を反映する血清アルブミン濃度、炎症性サイトカインであるIL-6やTNF- α の発現量を指標として、分岐鎖アミノ酸製剤を経口投与した群での改善効果を検証した。また、酸化ストレスを受け傷害を受けた肝細胞DNAのマーカーである8-OHdG量や傷害を受けたDNAの修復を司るOGG1の発現量等についても検討がなされた。

実験は以下の4群(各群5匹)での群間比較により行われた。

- 1) 四塩化炭素を皮下投与した対照群
- 2) 四塩化炭素の皮下投与に加え、分岐鎖アミノ酸製剤を経口投与した治療群

- 3) 分岐鎖アミノ酸製剤を経口投与した対照群
- 4) 無処置の対照群

これらの群について、血液生化学検査、肝臓の組織学的・免疫組織学的検索、肝臓の homogenate を用いた Western blot を行い、以下のような成績を得た。

- 1) 四塩化炭素投与により ALT 値の上昇を伴う肝障害を認めた
- 2) 分岐鎖アミノ酸製剤投与により ALT 値の上昇が軽減された
- 3) 四塩化炭素投与により IL-6 や TNF- α の発現量の増加傾向を認めた
- 4) 四塩化炭素投与により血清アルブミン濃度の低下を認めた
- 5) 分岐鎖アミノ酸製剤投与により血清アルブミン濃度の改善傾向を認めた
- 6) 四塩化炭素投与により傷害された DNA の指標である 8-OHdG 生成量の増加傾向を認めた
- 7) 四塩化炭素投与により傷害された DNA の修復に関与する OGG1 の発現量の減少傾向を認めた

四塩化炭素は肝小葉の中心静脈領域に存在する肝細胞の P450 により代謝され、フリーラジカルを産生することにより肝細胞傷害をきたす。今回の検討では、分岐鎖アミノ酸製剤の経口投与により肝細胞傷害の指標である ALT 値の上昇抑制や低下した血清アルブミン濃度の改善傾向が示された。この成績は四塩化炭素を投与された雄性 Sprague-Dawley ラットの肝病変に対する分岐鎖アミノ酸製剤の保護作用を示唆するものであり、本論文はこのような作用を記載した最初の報告となった。また、傷害された DNA の修復を司る OGG1 の発現低下と四塩化炭素投与により惹起される肝細胞傷害との間に、密接な関連が存在することも示された。これは、恒常的な OGG1 の発現が正常な肝細胞機能の維持に寄与している可能性を示唆する重要な所見と考えられた。

以上より、申請者の論文は、四塩化炭素を投与された雄性 Sprague-Dawley ラットの肝臓における病変に対する分岐鎖アミノ酸製剤の保護作用を観察した最初の論文であるのみならず、DNA の修復を司る OGG1 の恒常的な発現が正常な肝細胞機能の維持に重要であることを示唆するものとなった。よって、審査員一同は本論文を高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと認定した。

氏名(本籍)	王宇杰 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第10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25年3月22日
学位論文題目	Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity (幼若ラットの嗅球内ヒストンアセチル化反応は嗅覚嫌悪学習およびシナプス可塑性を促進する)
発表誌名	Neuroscience(in press)

審査委員	主査	教授	由利	和也
	副査	教授	井上	新平
	副査	教授	宮村	充彦

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 王宇杰

論文題目

Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity (幼若ラットの嗅球内ヒストンアセチル化反応は嗅覚嫌悪学習およびシナプス可塑性を促進する)

(論文要旨)

未開眼の幼若ラットはその生存戦略として、聴覚・体性感覚・嗅覚に依存して母ラットに近づく。母性行動の際に母ラットが子をなめるといった体性感覚刺激を無条件刺激として、そのとき対提示される母ラットの匂いを条件刺激として、この匂いに対して嗜好学習が容易に成立する。この古典的条件付けのパラダイムを用い、申請者らのグループは幼若ラットにシトラルの匂いと電撃を対提示することによって成立する嗅覚嫌悪学習の神経基盤を明らかにしてきた。

これまでの結果から、嗅球内僧帽細胞-顆粒細胞間の樹状突起間シナプスにおけるシナプス可塑性が、この学習の基礎過程であることを明らかにし、さらに、その分子メカニズムとして ERK (extracellular-signal regulated kinase) によってリン酸化された転写調節因子 CREB (cyclic-AMP response element binding protein) が関与することを明らかにしてきた。CREB はその後細胞内でヒストンアセチル化酵素を活性化し、ヒストンにエピジェネティックな変化を誘導する。これまでに海馬のシナプス可塑性や空間記憶にエピジェネティックメカニズムが重要な役割を果たすことが明らかになっている。特にヒストンが関連したヘテロクロマチンは長期記憶成立の初期段階で構造変化を起こしている。申請者は嗅覚嫌悪学習モデルにおいてエピジェネティックメカニズムの関与について、多角的に検索を行った。

まず行動薬理学手法を用い、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を嗅球内に注入して学習への影響を検討した。匂いと電撃の対提示トレーニング時に TSA を注入すると濃度依存性に嗅覚嫌悪反応は増強され、また匂いの単独トレーニングでも動物は嫌悪反応を示した。TSA の注入は嫌悪学習を長期に保持する効果を示した。

次にウェスタンブロットおよび免疫組織学的手法を用い、匂いと電撃の対提示トレーニングにより嗅球におけるヒストンのアセチル化反応の経時的変化ならびに空間的パターンの検索を行った。ヒストン H4 のアセチル化が匂いと電撃の対提示トレーニング後 4 時間にわたり、嗅球内僧帽細胞および顆粒細胞の両方において、有意に増強していた。一方でヒストン H3 はトレーニング後 2 時間でコントロールレベルまで低下した。さらに学習成立を促進する TSA の注入により、H4 および H3 のアセチル化が増強およびトレーニング後 6 時間まで保持されていた。

さらに嗅球スライス標本を用いて、僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達における長期増強 (long-term potentiation; LTP) 現象に対する TSA の添加の影響を電気生理学的に解析した。外側嗅

索の電気刺激によって顆粒細胞に誘発される単シナプス応答を細胞外からフィールド電位として記録し、その電位の立ち上がりの勾配をシナプス伝達の強さの指標とした。外側嗅索の 100Hz・1 秒×5 回のテタヌス刺激によって LTP が誘導されるが、TSA の添加は増強の程度を増大させるのみならず、本来は LTP をおこさない閾値下の 100Hz・1 秒×3 回のテタヌス刺激でも LTP を誘導させた。

以上の結果は、TSA がヒストン H4 および H3 のアセチル化を持続させることにより、嗅覚嫌悪学習ならびに嗅球内シナプス可塑性の成立に促進効果を持つことを示している。本研究より、幼若ラットの嗅球におけるヒストン H4 および H3 のアセチル化反応が嗅覚嫌悪学習およびシナプス可塑性のエピジェネティックメカニズムとして関与することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

		氏名	王 宇 杰
審査委員	主査氏名	由利 和也	
	副査氏名	井上 新平	
	副査氏名	宮村 充彦	

題 目 Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity
(幼若ラットの嗅球内ヒストンアセチル化反応は嗅覚嫌悪学習およびシナプス可塑性を促進する)

著 者 Y.-J. WANG, F. OKUTANI, Y. MURATA, M. TANIGUCHI, T. NAMBA, AND H. KABA

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
Neuroscience(in press)

要 旨

エピジェネティック制御は、DNA の塩基配列の変化を伴わないが細胞世代を超えて維持される遺伝子発現の変化であり、初期発生や生殖細胞形成において重要な役割を担っていることが知られている。近年、脳神経系機能においても記憶や学習などの高次脳機能においてエピジェネティック制御が機能していることが報告され、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などの化学的修飾の関与が示唆された。本研究において、申請者らはラットの嗅覚嫌悪学習におけるエピジェネティック制御についてヒストン 3, 4 のアセチル化を指標に検討を行った。

方法は、生後 10 日目のラットの嗅球にカニューレを低体温麻酔下に挿入し、生後 11 日目にカニューレよりヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を嗅球内に注入してシトラスの匂いと同時に足への電撃刺激の対提示トレーニングを施行した。生後 12 日目にシトラスの匂いによる行動実験(匂いの嗜好テスト)を行い CCD カメラにてラットの行動を記録して video-tracking program により解析した。また、嗅球におけるヒストンのアセチル化

の程度とその局在を検討するため生後 11 日目のトレーニング終了後 10 分、1、2、4、6 時間後に嗅球を摘出し、抗ヒストン 3, 4 アセチル化抗体を用いてウェスタン・ブロッティングおよび免疫組織化学法を施行した。長期増強 (long-term potentiation; LTP) への関与を検討するため、生後 11 日目のラットをエーテル麻酔下に嗅球を摘出しスライス標本を作成し、外側嗅索を電気刺激し顆粒細胞に誘発されるシナプス後電位を測定し、TSA による LTP への影響を電気生学的に解析した。

その結果、シトラスの匂いと電撃刺激を提示した群では、シトラスの匂いのみのコントロール群に比べて匂いゾーンでの滞在時間が減少し、嗅覚嫌悪学習が成立していることが確認された。シトラスの匂いと電撃刺激を提示した群に TSA を注入すると濃度依存的に匂いゾーンでの滞在時間が顕著に減少した。また、シトラスの匂いのみのコントロール群に TSA を単独で注入した場合も匂いゾーンでの滞在時間が減少した。この TSA 単独の効果はトレーニング前の注入では認められず、トレーニング後の注入の場合に観察され、この効果は生後 13 日目まで持続した。ヒストンのアセチル化は、シトラスの匂いと電撃刺激の対提示トレーニング後 10 分から認められ、ヒストン 4 では 4 時間、ヒストン 3 では 1 時間まで認められた。TSA の注入により、ヒストン 4 のアセチル化はトレーニング後 6 時間まで保持されていた。免疫組織化学法では、ヒストン 3, 4 のアセチル化は嗅球内僧帽細胞および顆粒細胞の両者において認められた。嗅球スライス標本を用いた電気生学的解析では、外側嗅索のテタヌス刺激によって LTP が誘導されるが、TSA の添加は LTP を増大させるのみならず、LTP の刺激閾値を低下させた。

以上の結果より、嗅覚嫌悪学習が成立する際には嗅球内の僧帽細胞および顆粒細胞においてヒストン H4 および H3 のアセチル化が起こることが明らかとなった。また脱アセチル化を抑制する TSA により嗅球内のヒストン H4 および H3 のアセチル化が維持されると、嗅覚嫌悪学習や嗅球内シナプス可塑性の成立がさらに促進されることが示唆された。本研究は、幼若ラットの嗅覚嫌悪学習およびシナプス可塑性において、エピジェネティック制御機構が関与することを明らかにした点で神経科学の発展に貢献したと評価し、審査員一同は高知大学博士 (医学) に相応しい優れた研究であると判断した。

氏名(本籍)	DUMAVIBHAT, NARONGPON (タイ王国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第11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25年3月22日
学位論文題目	Radiographic progression of silicosis among Japanese tunnel workers in Kochi (高知県における日本人隧道工事従事者の珪肺症のエックス線画像の進行について)
発表誌名	Journal of Occupational Health(in press)

審査委員	主査	教授	小川	恭弘
	副査	教授	高田	淳
	副査	教授	横山	彰仁

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 Narongpon Dumavibhat

論文題目 **Radiographic progression of silicosis among Japanese tunnel workers in Kochi**
(高知県における日本人隧道工事従事者の珪肺症のエックス線画像の進行について)

(論文要旨)

背景：職業病の中でも最古の疾患のひとつである珪肺症は、浮遊性結晶性シリカの吸入により発症する線維増殖性結節性肺疾患である。この難治性疾患は結晶性シリカへの曝露終了後も進行するため、曝露中及び曝露後の長期的な障害や死亡につながる可能性がある。国際がん研究機関(IARC)は、結晶性シリカをヒトへの発がん性が確実なグループ1に指定しており、珪肺症は、職業性肺疾患という位置付けに加え、肺がんリスクという観点に加わり、労働衛生上の問題として重要性が増している。このため、ILO と WHO は世界珪肺撲滅作戦(Global Programme for Elimination of Silicosis) を展開するに至っている。

これまで、珪肺症予防のための対策はある程度実施されてきたが、世界中で数千万の労働者がシリカ曝露による健康影響を受けている。近年において、予防対策が成功している国では、珪肺症患者は減少傾向にあるものの、過去に長期曝露をしたことによる新たな珪肺症の登録患者が毎年出現している。日本や韓国等アジアの先進国においては、毎年、約 1000 人のじん肺患者が補償を受けており、その大半が珪肺症と炭鉱夫肺の患者である。

今日、異なった職業に就労する集団を個別に長期追跡する調査は殆ど実施されておらず、珪肺症を発症するリスクの高い隧道工事従事者についてもエックス線画像の進行についての研究は行われていない。

目的：本研究の目的は、胸部エックス線画像の変化を経時的に観察することにより、日本人隧道工事従事者の珪肺症の自然経過を明らかにすることである。

方法：2008年1月から2011年6月までの間に、嘗て隧道工事に従事していた者で珪肺症として勤労クリニックに受診した患者を対象として後方視的観察研究を実施した。調査対象者の初診から直近までの胸部エックス線画像を後ろ向きに評価し、珪肺症の進

行の有無を調査した。

ILO 国際じん肺エックス線分類(ILO/ICRP)に関する読影訓練を受けた 2 人の医師が ILO/ICRP の基準に従い、全ての画像を評価した。小陰影の密度については、0 型、1 型、2 型、3 型の 4 段階尺度に分類し、さらにそれぞれを 3 つに分けることで、12 段階尺度(0/-, 0/0, 0/1, 1/0, 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/2, 3/3, and 3/+)に分類した。大陰影については、A,B,C の 3 段階に分類した。

得られた時系列の胸部画像の読影結果を基に、陰影密度の 12 段階尺度を数値化して生存分析を実施し、珪肺の画像上の進行を分析した。対象のうち、珪肺症が進行していたサブグループに関して、各症例について進行までの期間を比較検討した。この分析では大陰影は、我が国のじん肺法に従って、小陰影密度の 4 段階尺度 0 型、1 型、2 型、3 型につづく 4 型として数値化した。

結果・考察：調査開始の時点で既にシリカ曝露が終了していた計 65 名の患者がこの調査に参加した。初診時の平均年齢 58.60±7.10、進行の発生率 1,000 人年中 42 人、進行までの期間の中央値は 17 年であった(95% CI: 12.30-20.46)。喫煙者・非喫煙者の進行の発生率はそれぞれ 1000 人年中 47 人と 27 人であった。シリカ曝露が 15 年以下・15 年より長い患者の発生率はそれぞれ 1000 人年中 38 人と 51 人であった。33 症例(51%)に進行が見られ、1 型から 4 型、2 型から 4 型への平均進行期間は、それぞれ 14.55 年と 10.65 年であった。86%の患者が 1 型あるいは 2 型から直接 4 型に進行した。86%の患者において、胸部エックス線画像の 1 型あるいは 2 型から 4 型への進行があった。

職場を求めて移動がすることが多い隧道工事者に対する長期的調査は難しく、離職や退職後の追跡も困難である。今日わかっている範囲では、本研究は、隧道工事従事者の珪肺症に関しては、エックス線画像進行に関する最初の長期的研究であり、1 型から段階的に進行せずに 4 型に移行するという異例のパターンを明らかにした最初の調査である。

本調査により、先進国における隧道工事従事者の珪肺症の長期経過を明らかにすることで、発展途上国における隧道工事従事者の珪肺症に経過の予測がつく可能性があり、より効果的な予防措置につながる。

結論：本研究により、最長 34 年間の追跡調査の結果、シリカ曝露終了後も比較的高い確率で隧道工事就労者の珪肺症が進行したことが解明された。また、長期的・定期的な患者の追跡の重要性も確認された。高い確率で 1 型から 4 型にそのまま進行していることから、その進行についての解明及び珪肺症予防のための更なる調査が必要である。

キーワード：エックス線・国際じん肺エックス線分類・じん肺・進行・珪肺症・隧道工事従事者

論文審査の結果の要旨

	氏名	Dumavibhat, Narongpon
審査委員	主査氏名	小川 恭弘 印
	副査氏名	高田 淳 印
	副査氏名	横山 彰仁 印

題目 Radiographic progression of silicosis among Japanese tunnel workers in Kochi

(高知県における日本人隧道工事従事者の珪肺症のエックス線画像の進行について)

著者 Narongpon Dumavibhat, Tomomi Matsui, Eri Hoshino, Sasivimol Rattanasiri, Dittapol Muntham, Ryoji Hirota, Masamitsu Eitoku, Momo Imanaka, Basilua Andre Muzembo, Nlandu Roger Ngatu, Shinichi Kondo, Norihiko Hamada, Narufumi Suganuma

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

要旨

背景: 職業病の中でも最古の疾患のひとつである珪肺症は、浮遊性結晶性シリカの吸入により発症する線維増殖性結節性肺疾患である。この難治性疾患は結晶性シリカへの曝露終了後も進行するため、曝露中及び曝露後の長期的な障害や死亡につながる可能性がある。国際がん研究機関 (IARC) は、結晶性シリカをヒトへの発がん性が確実なグループ 1 に指定しており、珪肺症は、職業性肺疾患という位置付けに加え、肺がんリスクという観点が加わり、労働衛生上の問題として重要性が増している。このため、ILO と WHO は世界珪肺撲滅作戦 (Global Programme for Elimination of Silicosis) を展開するに至っている。

これまで、珪肺症予防のための対策はある程度実施されてきたが、世界中で数千万の労働者がシリカ曝露による健康影響を受けている。予防対策が成功している国では近年、珪肺症患者は減少傾向にあるものの、過去に長期曝露をしたことによる新たな珪肺症の登録患者が毎年出現している。日本や韓国等アジアの先進国においては、毎年、約 1000 人のじん肺患者が補償を受けており、その大半が珪肺症と炭鉱夫肺の患者である。

今日、異なった職業に就労する集団を個別に長期追跡する調査は殆ど実施されておらず、珪肺症を発症するリスクの高い隧道工事従事者についてもエックス線画像の進行についての研究は行われていない。

目的: 本研究の目的は、胸部エックス線画像の変化を経時的に観察することにより、日本人隧道工事従事者の珪肺症の自然経過を明らかにすることである。

方法: 2008年1月から2011年6月までの間に、嘗て隧道工事に従事していた者で珪肺症として勤労クリニックに受診した患者を対象として後方視的観察研究を実施した。調査対象者の初診から直近までの胸部エックス線画像を後ろ向きに評価し、珪肺症の画像上の進行の有無を調査した。

ILO 国際じん肺エックス線分類 (ILO/ICRP) に関する読影訓練を受けた2人の医師がILO/ICRPの基準に従い、全ての画像を評価した。小陰影の密度については、0型、1型、2型、3型の4段階尺度に分類し、さらにそれぞれを3つに分けることで、12段階尺度 (0/-, 0/0, 0/1, 1/0, 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/2, 3/3, and 3/+) に分類した。大陰影については、A,B,Cの3段階に分類した。

得られた時系列の胸部画像の読影結果を基に、陰影密度の12段階尺度を数値化して生存分析を実施し、珪肺の画像上の進行を分析した。対象のうち、珪肺症が進行していたサブグループに関して、各症例について進行までの期間を比較検討した。この分析では大陰影は、我が国のじん肺法に従って、小陰影密度の4段階尺度0型、1型、2型、3型につづく4型として数値化した。

結果・考察: 調査開始の時点で既にシリカ曝露が終了していた計65名の患者がこの調査に参加した。初診時の平均年齢 58.60 ± 7.10 、進行の発生率1,000人中42人、進行までの期間の中央値は17年であった (95% CI: 12.30-20.46)。喫煙者・非喫煙者の進行の発生率はそれぞれ1000人中47人と27人であった。シリカ曝露が15年以下・15年より長い患者の発生率はそれぞれ1000人中38人と51人であった。33症例 (51%) に進行が見られ、1型から4型、2型から4型への平均進行期間は、それぞれ14.55年と10.65年であった。86%の患者が1型あるいは2型から直接4型に進行した。86%の患者において、胸部エックス線画像の1型あるいは2型から4型への進行があった。

職場を求めて移動することが多い隧道工事者に対する長期的調査は難しく、離職や退職後の追跡も困難である。今日わかっている範囲では、本研究は、隧道工事従事者の珪肺症に関しては、エックス線画像進行に関する最初の長期的研究であり、1型から段階的に進行せずに4型に移行するという異例のパターンを明らかにした最初の調査である。

本調査により、先進国における隧道工事従事者の珪肺症の長期経過を明らかにすることで、発展途上国における隧道工事従事者の珪肺症に経過の予測がつく可能性があり、より効果的な予防措置につながる。

結論: 本研究により、最長34年間の追跡調査の結果、シリカ曝露終了後も比較的高い確率で隧道工事就労者の珪肺症が進行したことが解明された。また、長期的・定期的な患者の追跡の重要性も確認された。高い確率で1型から4型にそのまま進行していることから、その進行機序の解明及び珪肺症予防のための更なる調査が必要である。

本研究は、珪肺症の進行に関して重要な臨床知見を提示するとともに、長期的・定期的な患者の追跡の重要性も確認し、進展形式に関しても新知見を示した。以上の内容を踏まえ、審査員全員が、本研究は、高知大学博士 (医学) の学位授与に値するものであると判断した。

氏名(本籍)	MUZEMBO BASILUA ANDRE (コンゴ民主共和国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第12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25年3月22日
学位論文題目	Serum selenium and selenoprotein P in patients with silicosis (珪肺患者における血清セレンウムとセレノプロテインP)
発表誌名	Journal of Trace Elements in Medicine and Biology[Epub ahead of print]、2012年5月3日

審査委員	主査	教授	横山	彰仁
	副査	教授	安田	誠史
	副査	教授	藤枝	幹也

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 MUZEMBO BASILUA ANDRE

論文題目

Serum selenium and selenoprotein P in patients with silicosis
珪肺患者における血清セレンウムとセレノプロテインP

(論文要旨)

【緒言】

珪肺は、遊離珪酸の吸入によって生じる肺線維症である。近年、日本では珪肺の新規発症は減少しているが、過去のシリカ粉塵曝露による珪肺は、今なお公衆衛生上の課題の一つである。この疾患は進行性かつ不可逆性であり、現在、確立された治療法はない。セレンウムは、必須微量元素である一方、多量では毒性を持つ。セレンウムは、酸化還元触媒として酸化ストレスによるタンパク質損傷を修復する酵素の活性中心を構成している。セレンウムは進行性の慢性炎症によって減少し、また、セレンウムの減少は、炎症の悪化の誘引となる。そこで、我々は珪肺患者における血清セレンウムとセレノプロテインPの濃度を測定することを目的とした。

【方法】

我々は、78名の珪肺患者(男性、年齢中央値73.5歳)と20名の健常者(男性、年齢中央値72.5歳)の血清中のセレンウムとセレノプロテインPの濃度を測定する後ろ向きの症例対照研究を行った。また、被験者には、既往歴や職歴の問診、呼吸機能検査、胸部レントゲン検査を行った。

【結果】

患者群と健常対照群における血清所見

血清中のセレンウムとセレノプロテインPの濃度は、患者群(それぞれ74 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、4.2 mg/l)で対照群(それぞれ116 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、5.8 mg/l)と比較して有意に低かった。患者群で、血清Se値は血清SeP値と正の相関($\rho=0.781$ 、 $p<0.001$)があった。対照群でも同様の相関($\rho=0.768$ 、 $p<0.001$)が見られた。珪肺患者の内、35人(44.87%)は血清Se値が生理的下限値の70 $\mu\text{g}/\text{l}$ を下回っており、16人(20.51%)は血清Se値がセレンウム欠乏の基準と考えられている50 $\mu\text{g}/\text{l}$ を下回っていた。これに対し、対照群には低Se血症の者は一人もいなかった。患者群と対照群の両方で血清Se濃度と年齢との間に有意な相関があった。患者群の59~69歳の群では、70歳以上の群より血清Se値が高かった($P=0.033$ 、83.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ 対70.3 $\mu\text{g}/\text{l}$)。同様に、対照群にお

いても、79歳以上の群において血清Se値は最も低かった($P=0.041$ 、 $121.8\mu\text{g}/\text{l}$ 対 $109.5\mu\text{g}/\text{l}$)。患者群において血清SeとSePの濃度を胸部X線所見との関係で分析すると、血清SeおよびSePは、カテゴリ4の患者でカテゴリ2や3の患者と比較して有意に低いことがわかった。患者群において、長期(11~44年間)の曝露歴がある群と、数年(≤ 10 年間)の曝露歴の群を比較すると、両群間で血清SeとSePの濃度に統計的な有意差はなかった。

【考察と結論】

今回の研究で、平均血清Se濃度は $70\mu\text{g}/\text{l}$ という生理的下限値を上回っているものの、Se濃度が $80\mu\text{g}/\text{l}$ 以下では一般的にセレンウムの摂取状態は不良とみなされることから、珪肺患者群では至適Se濃度を保っていないと考えられた。セレンoenザイムの最適な酵素活性に必要な血清Se濃度は、それに関する国際的合意はないが、 $70\text{-}118\mu\text{g}/\text{l}$ と考えられている。また、珪肺患者における血清SeP濃度は、健康な日本人の被験者について文献に報告された値($5.3\pm 1.1\text{ mg}/\text{l}$)と比較して低かった。珪肺症に関連するセレンopロテインPの低下は、珪肺患者の食習慣よりむしろ珪肺症によるものと考えられた。

本研究で最も重要な発見は、珪肺患者における血清セレンおよびセレンopロテインPの濃度が不十分なレベルであることと、疾患の重症度に伴って有意に低下していることが判明したことである。珪肺症と喫煙歴により肺癌のリスクが上昇するため、更なる研究によって、低Se血症を呈する珪肺患者に対してセレンウムの栄養補助食品を使用することが、肺癌予防のために有用か否かを判断できると思われる。

論文審査の結果の要旨

	氏名	MUZEMBO BASILUA ANDRE
審査委員	主査氏名	横山 彰仁 
	副査氏名	安田 誠史 
	副査氏名	藤枝 幹也 

題目

Serum selenium and selenoprotein P in patients with silicosis

(珪肺患者における血清セレンウムとセレノプロテインP)

著者

Basilua Andre Muzembo, Narongpon Dumavibhat, N' landu Roger Ngatu, Masamitsu Eitoku, Ryoji Hirota, Shinichi Kondo, Yoji Deguchi, Yoshiro Saito, Kazuhiko Takahashi, Narufumi Suganuma

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology
[Epub ahead of print], 2012年5月3日

要旨

珪肺症は、遊離珪酸（シリカ；ケイ酸）の吸入によって生じる肺線維症である。トンネル工事、採掘・採石、研磨、鑄造など、シリカへの職業性曝露により生じる。本症には、続発性気管支炎、肺泡マクロファージの機能障害による結核、またシリカの発がん性による肺癌を合併しうる。本邦では近年、発症対策が進み新規発症は殆どいないが、過去の粉塵曝露による珪肺症は、今なお大きな社会的問題である。本症は進行性かつ不可逆性であり、さらなる曝露がなくても線維化は進行する。現在、対症的治療以外に確立された治療法はない。

一方、セレンウム（セレン）は古くから毒性の強い元素として知られていたが、比較的最近になり人にとって必須の微量元素であることが認識されるようになった。生体内では、酵素やたんぱく質の一部を構成し、抗酸化反応において重要な役割を担っている。しかしながら、欠乏症であるKeshan病は知られているものの、セレンの臨床的な研究はわずかしかない。

過去に炭坑夫肺やアスベスト肺においてセレンの血中濃度が低下することが報告されているが、類似病態と考えられる珪肺症での検討はなされていない。そこで今回、申請者らは珪肺患者における血清セレンとセレノプロテインP（セレンウムを含むタンパク質のうちで最も量が多いタンパク質）の濃度を測定し、その意義を検討した。

研究の方法として、高知県で塵肺診療を行っている主要な医療機関の一つである勤労クリニックの外来に通院する78名の珪肺患者（年齢中央値73.5歳）の既往歴や職歴の問診、呼吸機能検査、胸部レントゲン検査を行ない、血清中のセレンウムとセレノプロテインPの濃度を測定した。後ろ向き症例対照研究として20名の健常者（男性、年齢中央値72.5歳）についても血清中の濃度を測定した。

以下に結果を箇条書きにする。

1. 血清中のセレンとセレノプロテインPの濃度の中央値は、珪肺患者群（それぞれ74 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、4.2 mg/l ）で対照群（それぞれ116 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、5.8 mg/l ）と比較して有意に低かった。
2. 珪肺患者群のうち、35名（44.87%）は血清セレン値が下限値の70 $\mu\text{g}/\text{l}$ を下回り、16名（20.51%）は血清セレン値が欠乏の基準と考えられている50 $\mu\text{g}/\text{l}$ を下回った。これに対し、対照群には低セレン血症の者はいなかった。
3. 両群において血清セレン値は血清セレノプロテインP値と有意な正の相関を認めた。また、両群で血清セレン濃度と年齢との間に有意な負の相関があった（両群に有意な年齢差はない）。
4. 胸部X線所見・肺機能との関連を解析すると、血清セレンおよびセレノプロテインPは進行したカテゴリ4の患者でカテゴリ2や3と比較して有意に低かった。
5. また、シリカへの曝露期間は血清セレンとセレノプロテインPの濃度に影響しなかった。

今回の研究で、珪肺患者では血清セレン濃度が低下し、一部の患者では欠乏状態にあることが明らかとなった。国際的にみて日本人は、その食習慣からセレン摂取量が多い事実があるにもかかわらず、なぜセレン濃度が低下するのかは本研究では明らかにされておらず、今後の検討課題とされた。珪肺患者における血清セレノプロテインP濃度も、健康な日本人の被験者について文献に報告された値と比較して低い。珪肺症においては、肺胞マクロファージがシリカを貪食し活性化され、炎症性サイトカイン（TNF- α やIL-1など）やオキシダントを産生し、組織障害・炎症を生じるとされており、珪肺症におけるセレノプロテインPの低下は、珪肺患者の食習慣よりむしろサイトカインやオキシダントによる可能性が考えられた。

またこのような知見から、①患者のセレン濃度が低い理由を明らかにするため、食習慣やセレン摂取量を検討すること、②珪肺患者には喫煙者も多く喫煙によるCOPDのセレンへの影響、③珪肺患者におけるセレン含有の栄養補助食品あるいは漢方薬による肺癌の化学予防の可否など、興味ある研究の展開が期待できる。

以上のように、本論文において申請者らは、珪肺患者における血清セレンおよびセレノプロテインPの濃度が不十分なレベルであることと、疾患の進行度に伴って有意に低下することを初めて明らかにした。審査員一同は、本論文は今後の展開も大いに期待できる医学的に高い価値を有するものであると認め、高知大学博士（医学）の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(本籍)	楊 晶 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第13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25年3月22日
学位論文題目	AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells. (新規Jak2阻害剤AZ960は成人T細胞白血病細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導する)
発表誌名	Mol Cancer Ther、9(12) : 3386-95、2010年12月
	審査委員 主査 教授 宇高 恵子 副査 教授 大畑 雅典 副査 教授 佐野 栄紀

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 楊 晶

論文題目

AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells.

(新規 JAK2 阻害剤 AZ960 は成人 T 細胞白血病細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導する。)

(論文要旨)

【目的】成人 T 細胞性白血病 (ATL) は、四国や九州で感染者が多い human T lymphotropic virus-1 (HTLV-1) がその発症に関わっている極めて予後不良な血液悪性腫瘍であり、強力な抗がん剤治療を行っても生存期間の中央値は僅か 13 か月に留まる。従って、ATL に対する新たな治療法の開発は急務である。今回、我々は JAK2/STAT5 の ATL 細胞増殖機構への関与を調べる目的で、ATL 細胞を新規 JAK2 キナーゼ阻害剤 AZ960 に暴露しそれらの細胞増殖やアポトーシスにおける影響を検討した。

【方法】細胞は患者から採取した ATL 細胞、HTLV-1 感染 T 細胞株 (MT-1 と MT-2)、HTLV-1 陰性 MOLT-4 細胞、健常人から採取したリンパ球を用いた。ATL 細胞における JAK2/STAT の活性化はこれらの蛋白のリン酸化フォームを特異的に認識する抗体を用いて Western blot 法と FACS で解析した。細胞増殖抑制効果については MTT 法と thymidine uptake 法を用いた。アポトーシス誘導効果については Annexin V 染色を用いた。細胞を JAK2 阻害剤 AZ960 に暴露 48 時間後に蛋白質を抽出してアポトーシス関連蛋白質の発現レベルの変化を Western blot 法で解析した。細胞周期の変化は FACS を用いて解析した。Bcl-xL siRNA を electroporation 法で MT-1 細胞に遺伝子導入を行い、その発現を減弱させた。Bcl-xL のプロモーター領域における cAMP 応答配列結合蛋白質 (CREB) の結合についてはクロマチン免疫沈降法を用いた。

【結果】健常人から採取したリンパ球や HTLV-1 陰性 MOLT-4 細胞と比較して ATL 細胞や HTLV-1 感染 T 細胞では JAK2 と STAT3/5 が構成的に活性化していた。次にこれらの細胞を AZ960 (0.03-1 μ M/L、48h) で処理後細胞増殖抑制効果について検討した。ATL 細胞や HTLV-1 感染 T 細胞の JAK2/STAT5 のリン酸化は阻害され、これらの増殖は AZ960 濃度依存的に抑制された。一方、AZ960 は健常人の末梢血から分離したリンパ球の細胞増殖は抑制しなかった。また同時に、これらの細胞にアポトーシスが誘導され、抗アポトーシス蛋白質である XIAP、Mcl-1 や Bcl-2 の発現が減弱した。しかし一方、興味深いことに、抗アポトーシス蛋白質である Bcl-xL の発現は増強した。MT-1、MT-2 細胞において、JAK2 を阻害すると Bcl-xL のプロモーター領域に結合する CREB が蓄積し、それに伴い Bcl-xL レベルが増加することをクロマチン免疫沈降法を用いて見出した。そこで次に MT-1 細胞に Bcl-xL siRNA を遺伝子導入し、Bcl-xL の発現を減弱させた後に AZ960 に暴露すると MT-1 細胞の増殖が相乗的に抑制された。

【考察】ATL 細胞や HTLV-1 感染 T 細胞では JAK2/STAT3/5 が構成的に活性化していた。JAK2 を阻害すると、抗アポトーシス蛋白質 XIAP、Mcl-1 や Bcl-2 の発現が減弱し、アポトーシスが誘導されたこと

から、ATL細胞においてJAK/STATsシグナルはこれらBcl-2ファミリー蛋白質の発現を増強させ、細胞増殖を刺激している可能性が示唆された。しかしながらJAK2阻害でBcl-xLの発現は増強した。HTLV-1感染T細胞においてJAK2を阻害するとBcl-xLのプロモーター領域に結合するCREBのレベルが増加したことから、JAK2阻害によって誘導されたCREBの活性化を介して、Bcl-xL発現が増加した可能性が示唆された。

【結論】 HTLV-1 感染細胞では JAK2/STAT3/5 が構成的に活性化していた。JAK2 と Bcl-xL を同時に阻害することで ATL 細胞に効果的にアポトーシスを誘導可能であり、新たな治療戦力となりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏名	楊 晶
審査委員	主査氏名	宇高 恵子 
	副査氏名	大畑 雅典 
	副査氏名	佐野 栄紀 

題目 AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells.
 (新規Jak2阻害剤AZ960は成人T細胞白血病細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導する)

著者 Jing Yang, Takayuki Ikezoe, Mutsuo Furihata, Chie Nishioka, Akihito Yokoyama

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
 Mol Cancer Ther、9(12) : 3386-95、2010年12月

要 旨

楊晶さんの学位審査は、平成24年2月4日16時から、約1時間にわたって行いました。まず、公開で口頭による研究紹介をしました。

【背景と目的】

HTLV-1の感染により発症するATLの腫瘍細胞では、Jak/Stat pathwayの定常的な活性化が起こっていることが、FranchiniやSchindlerのグループから報告されている。そこで今回、Jak2特異的inhibitorであるAZ960の抗腫瘍効果を調べる目的で、ATL腫瘍細胞株および、患者から採取された新鮮ATL細胞について、Jak2/Stat系の活性化の程度を調べ、続いてAZ960に対する反応を調べた。

【方法と材料、結果】

高知大血液呼吸器内科学教室で樹立されたHTLV感染T細胞株であるMT-1, MT-2に加え、2症例から採取された新鮮ATL細胞を用いた。対照には、HTLV-1陰性のMOLT-4 T

細胞腫瘍株および、健常人末梢血単核球を PHA で刺激した T 細胞 blasts を含む細胞群を用いた。

まず、Western blot により、Jak2/Stat3, 5 のリン酸化の程度を調べたところ、HTLV-1 陽性腫瘍細胞では、リン酸化が増加していた。そこで、培養細胞に AZ960 を添加した場合の細胞増殖 (3H-thymidine uptake) , flow cytometer による apoptosis の定量解析、Bcl-2 をはじめとする apoptosis 関連タンパク質の Western blot による解析を行った。その結果、AZ960 は、腫瘍の増殖を抑えるばかりでなく、腫瘍細胞に積極的に apoptosis を誘導することがわかった。

しかし、この apoptosis 誘導は限定的であり、AZ960 は一方で、apoptosis を抑える働きのある Bcl-xL の発現を高めることがわかった。これは、HTLV-1 陽性腫瘍細胞にはもとより Bcl-xL の高発現があることに加えて、AZ960 が Bcl-xL の発現をさらに高めることがわかった。Bcl-xL の発現を誘導する転写因子として、Stat3、NF- κ B と CREB が知られている。順に調べたところ、AZ960 は NF- κ B の発現には影響せず、CREB のリン酸化を増強することが明らかとなった。Chromatin 沈降法により Bcl-xL 遺伝子への CREB 結合を定量したところ、AZ960 を投与することにより、Bcl-xL 遺伝子の proximal promoter へのリン酸化 CREB の結合が増し、Bcl-xL の転写が高まっていた。siRNA を用いて Bcl-xL のノックダウンをすると、予想通り、AZ960 の apoptosis 誘導活性が増強した。

【考察】

以上の結果から、HTLV-1 陽性腫瘍細胞では、Jak2/Stat3,5 系の活性が一般に高まっており、腫瘍増殖の一因となっていることが示唆された。そして、Jak2 特異的インヒビターである AZ960 の抗腫瘍効果が明らかとなった。しかし、AZ960 は同時に、apoptosis に抑制的に働く Bcl-xL の発現誘導も起こして抗腫瘍効果を減弱させることがわかった。今後、Jak2 と Bcl-xL の両方を抑える治療法の開発ができれば、高い抗腫瘍活性が得られることが示唆された。

【審査員からの質問・コメント】

審査員からは、HTLV-1 の研究では細胞株のコンタミが問題となっており、論文発表の際には、遺伝子解析による細胞の異同の証明が必要になってきている、とアドバイスがあった。また、技術的な問題として、ATL 患者から採った新鮮な腫瘍細胞は、細胞時に速やかに細胞死が起こるため、apoptosis の解析には万全の注意が必要である、と指摘があった。実際、Flow cytometer を用いた apoptosis の解析は、遺伝子断片化の比較のみであり、差もわずかであることから、Annexin V 等、他の apoptosis の指標も測定する方がのぞましいという意見が他の審査員からも出た。さらに審査員からは、Tax の Jak/Stat pathway や CREB に及ぼす影響について解析をしたかどうか質問があった。また、対照サンプルの精製度や刺激後の時間が適当であったかどうか、siRNA によるノックダウン実験では、対照群でも細胞死

が起りやすいため、正確な比較のためにどのような工夫をしたのか、について質問があった。

これらの質問や議論に、申請者はおおむね適切に回答をし、議論することができ、審査員一同、学位論文に足る研究内容であると判断した。

氏名(本籍)	大田 学 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第14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25年3月29日
学位論文題目	Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury (エダラボンは頭部外傷後の軸索損傷と酸化ストレスを抑制し、認知機能障害を予防する)
発表誌名	Brain research、1490: 184-192、2013年1月15日

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	横山	正尚
	副査	教授	谷	俊一

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 大田 学

Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury

論文題目

(エダラボンは頭部外傷後の軸索損傷と酸化ストレスを抑制し、認知機能障害を予防する)

(論文要旨)

【目的】びまん性軸索損傷は頭部外傷による死亡の主な要因の一つであり、さらに後遺症として認知機能低下などの高次脳機能障害に大きく関与していると考えられている。また、この病態はその診断の難しさから適切な医療や保障が受けられず医学的のみならず社会的問題となっている。近年、頭部外傷後の病態にフリーラジカルが関与することや軸索輸送障害が軸索損傷に寄与することが指摘されているが、明らかな臨床的に有効な治療法または治療薬は未だ存在していない。エダラボンはフリーラジカルスカベンジャーとして神経保護的に機能することが知られており、すでに急性期脳梗塞の治療薬として臨床の現場で用いられている。今回の研究はエダラボンの頭部外傷後の軸索損傷に対する効果を明らかにすることを目的とした。

【対象・方法】 C57BL/6マウスを用いてweight drop 法により頭部外傷を与え、受傷直後にエダラボンあるいは生理食塩水を尾静脈より投与した。マウスは①頭部外傷+生理食塩水投与群、②頭部外傷+エダラボン (3 mg/kg) 投与群、③非外傷+生理食塩水投与群、④非外傷+エダラボン (3 mg/kg) 投与群に分けた。頭部外傷24時間後に大脳皮質、脳梁、海馬における軸索損傷とフリーラジカルによって引き起こされる酸化ストレスをそれぞれ抗アミロイド前駆タンパク質 (APP) 抗体と抗 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) 抗体を用いて免疫組織化学染色法により検討した。また、エダラボンの治療開始時間と投与量依存的効果についても検討した。認知機能に関しては物体認識試験により頭部外傷後9日目の学習・記憶能力を検討した。

【結果】頭部外傷+生理食塩水投与群では大脳皮質、脳梁、海馬における APP の細胞内蓄積が認められ、8-OHdG 陽性細胞数が増加した。これに対し、頭部外傷+エダラボン投与群では同部位における APP の細胞内蓄積および 8-OHdG 陽性細胞の数が減少していた。また、APP の細胞内蓄積の減少は少なくとも1 mg/kg 以上の投与量で、もしくは外傷6時間後までの投与によっても確認された。さらに、物体認識試験において頭部外傷+生理食塩水投与群では著しく物体認識能力が低下していたが、頭部外傷+エダラボン投与群では非外傷群とほぼ同様の学習・記憶能力を維持していた。

【結論】エダラボンは頭部外傷後の軸索損傷と酸化ストレスを抑制し、認知機能障害を阻止できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏名	大田 学
審査委員	主査氏名	梶 秀人 
	副査氏名	横山 正尚 
	副査氏名	谷 俊一 

題 目 Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury
 (エダラボンは頭部外傷後の軸索損傷と酸化ストレスを抑制し、認知機能障害を予防する)

著 者 Manabu Ohta, Youichirou Higashi, Toshio Yawata, Masahiro Kitahara, Atsuya Nobumoto, Eri Ishida, Masayuki Tsuda, Yasunori Fujimoto, Keiji Shimizu

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
 Brain research、1490: 184-192、2013年1月15日

要 旨

近年、交通事故やスポーツ事故時の頭部外傷を原因とする高次脳機能障害が大きな社会問題となっている。頭部外傷で認められる高次脳機能障害の症状は、記憶障害、注意障害、遂行障害、社会的行動障害などの認知障害であり、その主因はびまん性軸索損傷である。頭部外傷後の炎症反応、イオン環境の変化等によって、軸索流は阻害され、軸索は膨化・切断される。この軸索輸送障害はアミロイド前駆タンパク質 (amyloid precursor protein; APP) の蓄積として観察される。また頭部外傷後、フリーラジカルが産生され、外傷後の病態に関わることが示唆されている。フリーラジカルの産生はDNAのグアノシンを8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)に修飾することが知られている。びまん性軸索損傷の病態が複雑であるがゆえに確立した治療法も明らかに有効な治療薬もない。

そこで申請者らは、著明な病理組織学的変化を伴わないでAPPを蓄積する頭部外傷マウスモデルを作成し、そのマウスの頭部外傷後の軸索損傷に対するフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの効果を検討した。具体的には、麻酔下の雄マウ

スの頭蓋中央部に7 mm × 7 mm、厚さ 1 mm のステンレススチールヘルメットを固定し、90 cm の高さから 20 g の重りをヘルメットに落として頭部外傷マウスモデルを作成した。受傷直後にエダラボンあるいは生理食塩水を尾静脈より投与した。頭部外傷 24 時間後の大脳皮質、脳梁、海馬における APP と 8-OHdG の各々の免疫活性を免疫組織化学的に測定した。また、エダラボンの用量依存性、投与開始時間の影響についても検討を行った。認知機能に関して物体認識試験により頭部外傷後 9 日目の学習・記憶能力を評価した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 頭部外傷により大脳皮質、脳梁、海馬の APP 免疫活性および 8-OHdG 免疫活性がともに有意に増加した。
- 2) 頭部外傷による大脳皮質、脳梁、海馬の APP 免疫活性および 8-OHdG 免疫活性の増加はエダラボン投与により有意に抑制された。
- 3) エダラボンによる APP 細胞内蓄積の抑制は 1 mg/kg の投与量でも、外傷 6 時間後の投与でも観察された。
- 4) 頭部外傷により物体認識能力が有意に低下した。エダラボンはこの低下を完全に阻止した。

以上の成績は、エダラボンが頭部外傷後の軸索損傷と酸化ストレスを抑制することにより認知機能障害を阻止することを示唆している。

以上のように、本論文は頭部外傷による高次脳機能障害の病態解明のみならず、治療の向上にも大きく寄与することが期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	酒井 瑞 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第15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25年3月29日
学位論文題目	A Novel Lung Injury Animal Model Using KL-6-Measurable Human MUC1-Expressing Mice (ヒトMUC1発現マウスを用いたKL-6測定可能新規肺障害動物モデル)
発表誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications(in press)

審査委員	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	本家	孝一
	副査	教授	菅沼	成文

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 酒井 瑞

論文題目 A Novel Lung Injury Animal Model Using
KL-6-Measurable Human MUC1-Expressing Mice
(ヒト MUC1 発現マウスを用いた KL-6 測定可能新規肺障害動物モデル)
(論文要旨)

緒言

KL-6 は糖蛋白質ムチン的一种である MUC1 に存在するシアル化糖鎖抗原であり、ヒトのⅡ型肺胞上皮細胞や細気管支上皮に発現しており、間質性肺炎の診断や病型鑑別、治療効果判定、予後予測に役立つ優れたバイオマーカーとして、保険適用をうけ広く測定されている。しかし、KL-6 の基礎的な機能や血中への増加機序は、いまだ十分にはわかっていない。KL-6 の発現はヒトなどの高等霊長類に限られていることから、これまで動物モデルを用いた実験を行うことはできなかった。われわれは、ヒト MUC1 をヒトと同様の臓器に同レベルで発現しているヒト MUC1 発現マウスに着目し、KL-6 の発現および肺障害モデルにおける KL-6 の動態を解析した。

方法

ヒト MUC1 発現マウス (C57BL/6 バックグラウンド) は確立グループの Dr. Hollingsworth より譲り受け、ヘテロで自家繁殖させた。本マウスはヒト MUC1 遺伝子領域の前後を含む 10.6 kB の genomic DNA を導入して作成されており、ヒト MUC1 をヒト MUC1 発現臓器特異的に発現し、かつ過剰発現はしない。年齢・性別をあわせた野生型マウス (C57BL/6) を対照とし、高知大学動物実験管理規則に従い取り扱った。マウス (各群 $n = 7 \sim 13$) は安楽死後、血清、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織を回収し検体とした。KL-6 は全自動化学発光酵素免疫測定システムであるルミパルス®KL-6 で測定し、アルブミン、TNF- α 、SP-D は ELISA キットを用いて測定した。マウスは7つのグループ (0, 3, 6, 24, 48, 72, 96 時間) にわけ、腹腔内麻酔後リポ多糖体 (LPS) 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) をマイクロスプレーを用い気管内投与し、LPS モデルを作成し各時間に検体を採取した。またマウスに腹腔内麻酔後ブレオマイシン (BLM) を 2 mg/kg または同量の PBS を同様に気管内投与し BLM モデルを作成し、day 1, 8, 22 に安楽死後検体を回収した。肺組織の一部を HE 染色、マッソントリクロム染色し、Ashcroft

スコアを用いて線維化を評価した。抗 KL-6 モノクローナル抗体による免疫組織化学染色を行った。BLM モデル day 22 の肺で可溶性コラーゲンを測定した。全肺組織より抽出した全 RNA より cDNA を合成し、ヒト MUC1 の RT-PCR を行い、G3PDH 発現レベルで補正し発現強度を比較した。また、全肺組織より標準的方法にてライセートを抽出し、ウェスタンブロット解析を行い、同様に発現強度を比較しβアクチン発現量で補正した。データは平均±標準誤差で表示し、2群間の解析には Mann-Whitney U 検定、相関性は Spearman の相関係数を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

ヒト MUC1 発現マウスの KL-6 値は血清で 221 ± 18 U/ml、BALF では 2121 ± 129 U/ml ($n = 13$) (Wt は測定限界以下) であった。免疫組織化学ではヒト MUC1 発現マウスはⅡ型肺胞上皮細胞や細気管支上皮細胞、肺胞被覆液中に KL-6 が陽性であり、本マウスにおけるヒト MUC1 の分布、ヒト肺における KL-6 発現分布と一致していた。LPS 肺障害モデルでは形態的にも BALF 細胞数も野生型とヒト MUC1-Tg マウスで差がなく、ともに既報同様 24 時間後にピークのある好中球性炎症を認めた。免疫組織化学 (KL-6)、半定量的 RT-PCR (ヒト MUC1)、ウェスタンブロット (KL-6、ヒト MUC1) いずれも有意な変化を指摘できなかった。一方 KL-6 値は、血清で緩徐に 1.8 倍増加 ($p = 0.008$)、BALF でも 1.6 倍増加し ($p < 0.001$)、ともに 72 時間後にピークを認めた。BALF 中の TNF- α 値は 6 時間後にピークを認めたが、アルブミン濃度の有意な変化は指摘できなかった。

BLM モデルでもヒト MUC1 発現マウスは野生型と同様に day 8 に炎症性変化、day 22 に線維化を示し、マッソントリクロム染色、コラーゲン定量、Ashcroft スコアで評価した結果、線維化の程度に有意な差はみられなかった。一方 KL-6 値は、BLM モデルでは血清、BALF ともに大きな変動がみられ、炎症期には血清 KL-6 値は約 10 倍に上昇し ($p < 0.001$)、BALF は 0.77 倍に減少した ($p = 0.009$)。線維化期には血清 KL-6 は炎症期より減少したものの day 1 よりは高値であった ($p = 0.006$)。BALF 中のアルブミン値は BALF 中の KL-6 と反対の変化を示し、血清 KL-6 値と BALF 中のアルブミン値の間には正の相関が見られた ($r = 0.767, p < 0.001$)。免疫染色でも同様に、炎症期には部分的に KL-6 の発現が低下し、線維化期には day 1 より KL-6 の発現は増強していた。半定量的 RT-PCR ではヒト MUC1 の発現レベルに有意差をみとめなかった。ウェスタンブロット (KL-6、ヒト MUC1) では線維化期の KL-6 の増加傾向とヒト MUC1 の有意な増加 ($p < 0.01$) を認めた。

SP-D に関してはヒト MUC1-Tg マウスと野生型の間に明らかな差はなく、LPS モデル、BLM モデルともに血清、BALF で有意に増加した。

考察

ヒト MUC1 発現マウスでは KL-6 を ELISA や免疫組織化学で検出することが可能であり、血清 KL-6 値は健常人と同レベルであった。免疫染色の結果では、KL-6 はヒトと同様に主としてⅡ型肺胞上皮細胞から産生されていることが示唆された。本マウスを用いた肺障害モデルでは、LPS モデル、BLM モデルともに従来同様の形態的変化や SP-D の変動に加えて、KL-6 が肺障害に応じ変動した。LPS モデルでの KL-6 の変動は軽度であったが、BLM モデルでは大きく変動した。炎症期の BALF 中の KL-6 減少、血清での増加は肺胞被服液から血中への急激な移行を反映していると考えられ、免疫組織化学でも合致する所見が得られた。以上の結果より、ヒト MUC1 発現マウスを用いた肺障害モデルでは、KL-6 がバイオマーカーとして使用可能と考えられた。KL-6 が血流へ移行する詳細な機序には不明な点が多いが、これまで毛細血管透過性の亢進が最も大きな理由であるといわれてきた。BALF 中のアルブミン濃度は透過性亢進の指標になるため、本実験で BLM モデルで血清 KL-6 値と BALF アルブミン濃度に正の相関を認めたことは、毛細血管透過性の亢進による機序を支持している。KL-6 変動の他の可能性として、再生Ⅱ型肺胞上皮細胞からの産生亢進が考えられる。免疫組織化学では BLM モデルの線維化期に強い KL-6 の発現がみられ、産生亢進が示唆された。しかし、線維化期に MUC1 蛋白の有意な増加がみられただけで、ヒト MUC1 mRNA や KL-6 蛋白の有意な増加は指摘できなかった。これは炎症細胞を含む全肺組織を用いたため、ハウスキーピング遺伝子で標準化するとシグナルが薄まってしまう可能性が考えられる。その他、エピジェネティックな要素やリンパ管を介したクリアランスの関与も考えられる。また、2つの肺障害モデルでの SP-D と KL-6 の変動は異なっており、この差は両者の分子量によるところが大きいと考えられる。KL-6 のような巨大分子が透過性亢進によって血流へ多く移行するためには、より重篤なバリア機構の破壊が必要であり、加えて肺胞被服液から消失してから再び蓄えられるまでに、より時間がかかる可能性も考えられる。これらについては今後のさらなる研究が必要である。

結論

ヒト MUC1 発現マウスが KL-6 を産生し、肺障害により血清 KL-6 値が増加することを見出した。また肺胞-毛細血管の透過性の亢進は、血清 KL-6 を増加させるための主要なメカニズムであることが示唆された。本マウスは肺障害や KL-6 の機序を研究するのに有用なモデルになると考えられた。

論文審査の結果の要旨

	氏名	酒井 瑞
審査委員	主査氏名	降幡 陸夫 
	副査氏名	本家 孝一 
	副査氏名	菅沼 成文 

題目 A Novel Lung Injury Animal Model Using KL-6-Measurable Human MUC1-Expressing Mice

(ヒトMUC1発現マウスを用いたKL-6測定可能新規肺障害動物モデル)

著者

Mizu Sakai, Tetsuya Kubota, Hiroshi Ohnishi, Akihito Yokoyama

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月

Biochemical and Biophysical Research Communications(in press)

要旨【背景・目的】

KL-6は糖蛋白質ムチン的一种であるMUC1に存在するシアリル化糖鎖抗原であり、ヒトII型肺胞上皮細胞や細気管支上皮に発現しており、間質性肺炎の診断や病型鑑別、治療効果判定、予後予測に役立つ優れたバイオマーカーとして保険適用をうけ広く臨床応用されている。しかし、KL-6の機能や血中増加機序は不明で、KL-6発現はヒト等高等霊長類に限られているため、動物モデルを用いた実験を行うことはできなかった。今回ヒトMUC1をヒトと同様の組織に同レベルで発現しているヒトMUC1発現マウスにてKL-6発現を検討し、同マウスを用いた肺障害モデルにおけるKL-6発現動態を解析した。

【材料・方法】

用いたヒトMUC1発現マウス(C57BL/6 バックグラウンド)は、ヒトMUC1領域の前後を含む10.6 kBのgenomic DNAを導入して作成されており、ヒトMUC1を組織特異的に発現し、かつ過剰発現はしない。これらマウス(各群n = 7~13)と、対照として用いた年齢・性別をあわせた野生型マウス(C57BL/6)は、高知大学動物実験管理規則に従い取り扱い、安楽死後、血清、気管支肺胞洗浄液(BALF)、肺組織を回収し検体とした。KL-6は全自動化学発光酵素免疫測定システムであるルミパルス®KL-6で測定し、アルブミン、TNF- α 、

SP-D は ELISA キットを用いて測定した。各マウスは、腹腔内麻酔後リポ多糖体 (LPS) 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を気管内投与して LPS モデルを作成し、各 0, 3, 6, 24, 48, 72, 96 時間に検体を採取した。またマウスに腹腔内麻酔後ブレオマイシン (BLM) を 2 mg/kg 気管内投与して BLM モデルを作成し、各 1, 8, 22 日に検体を回収した。肺組織の一部は HE 染色、マッソントリクロム染色後、Ashcroft スコアを用いて線維化を評価し、抗 KL-6 モノクローナル抗体により免疫組織化学的に検討した。BLM モデル 22 日の肺では可溶性コラーゲンも測定した。全肺組織より抽出した全 RNA より RT-PCR にてヒト *MUC1* cDNA を合成し、G3PDH 発現レベルで補正し発現強度を比較した。また全肺組織よりライセートを抽出し、ウェスタンブロット解析を行い、同様に発現強度を比較し β アクチン発現量で補正した。データは平均 \pm 標準誤差で表示し、2 群間の解析には Mann-Whitney U 検定、相関性は Spearman の相関係数を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

ヒト *MUC1* 発現マウスの KL-6 値は血清で $221 \pm 18 \text{ U}/\text{ml}$ 、BALF では $2121 \pm 129 \text{ U}/\text{ml}$ ($n = 13$) (Wt は測定限界以下) であった。抗 KL-6 モノクローナル抗体による免疫組織化学では、ヒト *MUC1* 発現マウスは II 型肺胞上皮細胞や細気管支上皮細胞、肺胞被覆液中に陽性を呈し、本マウスにおけるヒト *MUC1* の分布、ヒト肺における KL-6 発現分布と一致していた。LPS 肺障害モデルでは形態的にも BALF 細胞数も野生型とヒト *MUC1*-Tg マウスで差がなく、ともに既報同様 24 時間後にピークのある好中球性炎症を認めた。免疫組織化学 (KL-6)、半定量的 RT-PCR (ヒト *MUC1*)、ウェスタンブロット (KL-6、ヒト *MUC1*) いずれも有意な変化を指摘できなかつた。一方 KL-6 値は、血清で 1.8 倍に増加 ($p = 0.008$)、BALF でも 1.6 倍に増加し ($p < 0.001$)、ともに 72 時間後にピークを認めた。BALF 中の TNF- α 値は 6 時間後にピークを認めたが、アルブミン濃度の有意な変化は指摘できなかつた。

BLM モデルでもヒト *MUC1* 発現マウスは野生型と同様に 8 日目に炎症性変化、22 日に線維化を示し、マッソントリクロム染色、コラーゲン定量、Ashcroft スコアで評価した結果、線維化の程度に有意差はみられなかつた。一方 KL-6 値は、BLM モデルでは血清、BALF 値ともに大きな変動がみられ、炎症期には血清 KL-6 値は約 10 倍に上昇し ($p < 0.001$)、BALF 値は 0.77 倍に減少した ($p = 0.009$)。線維化期には血清 KL-6 値は炎症期より減少したものの 1 日より高値であった ($p = 0.006$)。BALF 中のアルブミン値は BALF 中 KL-6 値と反対の変化を示し、血清 KL-6 値と BALF 中アルブミン値の間には正相関が見られた ($r = 0.767$, $p < 0.001$)。免疫組織化学的検討でも、炎症期には KL-6 発現が低下し、線維化期には 1 日より KL-6 発現は増強していた。半定量的 RT-PCR ではヒト *MUC1* 発現レベルに有意差を認めず、ウェスタンブロット (KL-6、ヒト *MUC1*) では線維化期の KL-6 とヒト *MUC1* の有意な増加 ($p < 0.01$) を認めた。

SP-D に関してはヒト *MUC1*-Tg マウスと野生型の間に明らかな差はなく、LPS モデル、BLM モデルともに血清、BALF で有意に増加した。

【考察・結語】

ヒト *MUC1* 発現マウスにおいては、KL-6 は ELISA 法や免疫組織化学的方法にて検出可能であり、血清 KL-6 値は健常人と同レベルで、KL-6 はヒトと同様に主として II 型肺胞上皮細胞から産生されていることが示唆された。本マウスを用いた肺障害モデルでは、LPS モデル、BLM モデルともに従来同様の形態的変化や SP-D の変動に加えて、KL-6 値が肺障害に応じ変動し、LPS モデルに比較し BLM モデルでの変動が顕著であった。炎症期での BALF 中 KL-6 減少、血清での増加は肺胞被覆液から血中への移行を反映していると考えられ、免疫組織化学でも支持する所見が得られた。以上より、ヒト *MUC1* 発現マウスを用いた肺障害モデルでは、KL-6 が炎症性肺病変の血中マーカーとして使用可能と考えられた。KL-6 が血流へ移行する詳細な機序には不明点が多いが、毛細血管透過性亢進が最大理由であるとされてきた。BALF 中のアルブミン濃度は毛細血管透過性亢進の指標になるため、本実験 BLM モデルで血清 KL-6 値と BALF アルブミン濃度に正の相関を認めたことは、透過性亢進機序を支持している。KL-6 変動における他の可能性として、再生 II 型肺胞上皮細胞からの産生亢進が考えられる。免疫組織化学では BLM モデルの線維化期に KL-6 強発現がみられ、産生亢進が示唆された。しかし、線維化期に *MUC1* の有意な増加がみられたが、ヒト *MUC1* mRNA や KL-6 の有意な増加は確認できなかった。これは炎症細胞を含む全肺組織を用いたため、ハウスキーピング遺伝子での標準化によりシグナル自体が減弱した可能性や、その他エピジェネティックな要素やリンパ管を介したクリアランスの関与も考えられる。また、2つの肺障害モデルでの SP-D と KL-6 の変動は異なっており、この差は両者の分子量によるところが大きいと考えられる。KL-6 のような巨大分子が透過性亢進によって血流へ多量移行するためには、より重篤なバリア機構の破壊が必要であり、加えて肺胞被覆液から消失後再度貯留されるまでに、長時間が必要とされる可能性も考えられる。

本論文はヒト *MUC1* 発現マウスが KL-6 を産生し、肺障害に伴い血清 KL-6 値が増加することを見出した。また肺胞-毛細血管の透過性亢進は、血清 KL-6 増加の主要メカニズムであることが示唆された。詳細な機序については今後さらなる研究が必要であるが、本マウスは肺障害における KL-6 上昇の機序を研究する有用な実験モデルになり得ると考えられた。

氏名(本籍)	馬場裕一 (愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第23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25年1月22日
学位論文題目	Usefulness of High-sensitive Cardiac Troponin T for Evaluating the Activity of Cardiac Sarcoidosis (心サルコイドーシスの活動性評価に対する高感度心筋トロポニンTの有用性)
発表誌名	International Heart Journal、53(5): 287~292、2012年9月

審査委員	主査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	横山	彰仁
	副査	教授	渡橋	和政

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 馬場 裕一

論 文 題 目 Usefulness of High-sensitive Cardiac Troponin T for Evaluating the Activity of Cardiac Sarcoidosis
心サルコイドーシスの活動性評価における高感度心筋トロポニンTの有用性

(論文要旨)

背景

サルコイドーシスは、感染や環境因子等の関与が疑われるも、いまだ明確な原因が不明の肉芽腫性疾患である。剖検例では25-79%に心病変の合併が報告されている。日本では西欧と比較して心病変の合併が多く、死亡原因の多くが、心不全や不整脈等の心イベントである。心サルコイドーシス患者において、ステロイドで早期に治療することで予後が改善することが知られており、早期に正確な診断をすることが重要である。しかし、臨床において心サルコイドーシスの活動性を正確に評価することは未だに困難である。高感度心筋トロポニンT (hs-TnT) は、心筋の微細な障害を感度良く特異的に検出可能であり、急性冠症候群ではすでに有用性が確立されている。本研究の目的は、hs-TnTが、心サルコイドーシス患者の標準的な評価に付加的な指標となり得るかを検討することである。

方法

当施設で、心サルコイドーシスと診断された12例(男性1例、女性11例、年齢51-79歳、平均66.9 ± 9.8歳)を後ろ向きに解析した。心サルコイドーシスの診断は、2006年のサルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会の診断基準に従った。評価項目として、臨床経過、心電図、心臓超音波検査、ガリウムシンチグラフィ、フルオロデオキシグルコース-ポジトロン断層法(FDG-PET)、hs-TnT、アンギオテンシン変換酵素(ACE)、リゾチーム、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)を含む血液検査を検討した。

結果

hs-TnT値は、0.008 ~ 0.076 ng/mL (基準値0.014ng/ml以下)であり、平均0.028 ± 0.020 ng/mL、中央値0.024 ng/mLであった。8例で異常値を認めた。hs-TnTは、ACEおよびリゾチームと関連していたが、BNPや左室駆出率(LVEF)との関連は認めなかった。心サルコイドーシスの活動性は主にFDG-PETを使用し、活動性のある心サルコイドーシスと判断する局所的なFDGの集積は8例に認めた。PETの陽性所見を基準にすると、hs-TnTの感度87.5%、特異度75.0%、陽性適中率、87.5%、陰性適中率75.0%であった。一方で、リゾチームやBNPはhs-TnTほど陽性適中率、陰性適中率ともに高くなかった。ACEおよびガリウムシンチグラフィの特異度および陽性適中率は100%であったが、感度および陰性適中率は、37.5%であった。hs-TnTは、ステロイド治療にて低下することが、数例で確認された。

議論

hs-TnTは心筋障害のみでなく、心不全の影響をうける可能性がある。しかし、本研究では、hs-TnT

はBNPと相関はなく、hs-TnTは、BNPが低下する前に正常化していた。つまり、hs-TnTは、心不全が十分コントロールされていない状態でも進行性の心筋細胞障害を反映している可能性がある。また、hs-TnTは心サルコイドーシスの活動性表すと考えられるACEやリゾチームと相関していたが、心不全を反映したBNPや、収縮能の指標であるLVEFとは相関しなかった。例えば、hs-TnT低値、BNP高値、LVEF低値は、いわゆる燃え尽きた心サルコイドーシスの可能性があり、hs-TnT高値、BNP低値、LVEFが保たれた症例は、早期で活動性が高いことを意味するかもしれない。

結語

hs-TnTは心サルコイドーシスの活動性を感度、特異度ともに高く評価可能で、ステロイド治療の効果判定として、有用な指標と考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏名	馬場 裕一
審査委員	主査氏名	佐藤 隆幸 
	副査氏名	横山 彰仁 
	副査氏名	渡橋 和政 

題 目 Usefulness of High-sensitive Cardiac Troponin T for Evaluating the Activity of Cardiac Sarcoidosis

(心サルコイドーシスの活動性評価に対する高感度心筋トロポニンTの有用性)

著 者 Yuichi BABA, Toru KUBO, Hiroaki KITAOKA, Makoto OKAWA, Shigeo YAMANAKA, Yasumasa KAWADA, Naohito YAMASAKI, Yoshihisa MATSUMURA, Takashi FURUNO, Tetsuro SUGIURA, Yoshinori L. DOI

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 International Heart Journal、53(5): 287~292、2012年9月

要 旨

サルコイドーシスは原因不明の肉芽種性疾患で、わが国では心病変の合併例が多く、心不全死や不整脈突然死の死因となっている。心サルコイドーシス合併例であっても早期に診断し、ステロイド治療を行うことによって、生命予後が改善することから、早期診断および病変部活動性評価法の確立は重要な課題である。申請者は、急性冠症候群において心筋傷害の高感度・特異的血中マーカーとしてその有用性が確立されている高感度心筋トロポニンに着目し、これが、心サルコイドーシスにおける病変部活動性の指標になるか否かを後ろ向き調査により検討した。

高知大学医学部附属病院で、心サルコイドーシスと診断され、高感度心筋トロポニン測定を実施した12例(女性11例、51-79歳)を対象とし、心電図、心臓超音波検査、ガリウムシンチグラフィ、フルオロデオキシグルコースポジトロン断層法(FDG-PET)、アンジオテンシン変換酵素(ACE)、リゾチーム、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)などの所見と高感度心筋トロポニン数値を比較検討した。高感

度心筋トロポニン値は、0.008～0.076 ng/mL（基準値 0.014 ng/mL 以下）で、8例で陽性であった。心サルコイドーシスの病変部活動性の指標とされる FDG の局所集積像、すなわち PET 陽性所見は 8 例で認められた。PET 所見を基準とした場合、高感度心筋トロポニンは、感度 88%、特異度 75%、陽性適中率 88%、陰性適中率 75%であった。ACE およびガリウムシンチグラフィーは特異度・陽性適中率がともに 100%であったが、感度および陰性適中率が 40%未満であった。リゾチームや BNP は陽性適中率・陰性適中率が高感度心筋トロポニンに比べて低値であった。また、ステロイド療法により心病変が改善した例では、心筋トロポニンが速やかに低下することを見いだした。

以上の結果から、申請者は、高感度心筋トロポニンが、心サルコイドーシスの病変部活動性の指標として有用であると結論付けた。

審査員一同は、本研究が、高感度心筋トロポニン測定が心サルコイドーシスの病変部活動性を評価する低コストなスクリーニング法となり得ることを見いだしていることを高く評価し、申請者の論文を、高知大学博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判断した。

氏名(本籍)	小谷典弘 (京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第24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25年2月19日
学位論文題目	Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) associated with the CD20 antigen regulates the rituximab-induced proliferation inhibition in B-cell lymphoma cells (リツキシマブ誘導B細胞リンパ腫細胞増殖抑制におけるFGFR3-CD20分子間相互作用複合体の関与)
発表誌名	Journal of Biological Chemistry、 287(44)、37109~37118、2012年8月29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	横山	彰仁

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 小谷典弘

論文題目

Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) associated with the CD20 antigen regulates the rituximab-induced proliferation inhibition in B-cell lymphoma cells
(リツキシマブ誘導B細胞リンパ腫細胞増殖抑制におけるFGFR3-CD20分子間相互作用複合体の関与)

(論文要旨)

抗体医薬は、悪性腫瘍などの治癒困難な疾病の有望な治療薬として開発が行われてきた。現在では、alemtuzumab (Campath-1H)、trastuzumab (Herceptin®)、rituximab (Rituxan®)などが代表的な抗体医薬として知られている。これらの抗体医薬は一般的にantibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) もしくはcomplement-dependent cytotoxicity (CDC)を介して効果を発揮すると言われている。近年、これらに加えてアゴニスト・アンタゴニスト抗体などの標的細胞のシグナルを制御する「シグナル抗体医薬」が精力的に開発されている。これらシグナル抗体医薬は今までの抗体医薬にない効能・効果が期待されるが、反面、その作用機序については依然不明な点が多く、安全性の面で懸念もある。

本研究では、これらシグナル抗体医薬の作用機序に関与する分子の探索を行うことを目的とし、我々が過去に開発したEMARS反応 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7405-7409 (2008)) を用いて、抗体医薬の作用機序に関与する細胞膜上シグナル分子の同定を試みた。EMARS反応は細胞膜上でHRP標識した任意の分子と相互作用している分子を特異的に標識できる反応である。本研究では抗体医薬-抗原分子複合体(抗体医薬の作用シグナルの出発点と考えられる)と相互作用する細胞膜上シグナル分子の同定を行った。抗体医薬としては、B細胞リンパ腫治療に用いられる抗CD20抗体、rituximabをモデル抗体として用いた。rituximabは上述したとおり、ADCCやCDC活性を主な作用機序としているが、近年の研究により細胞内シグナル経路を介して標的細胞の増殖阻害を惹起するシグナル抗体の役割も担う事が分かっている。

まず、rituximab-CD20複合体と相互作用している分子を同定するため、rituximab及びコントロール抗体として2H7(抗CD20抗体ではあるが、治療には用いられない)をそれぞれHRP標識した後、Raji細胞やBJAB細胞に処理しEMARS反応を行った。その試料を受容体型チロシンキナーゼ(RTK)および免疫受容体抗体アレイ(R&D社製)にて解析し、標識された分子の同定を試みた。その結果、rituximabはFGFR3やROR1などの複数のRTKや免疫受容体と相互作用することが分かった。一方、2H7ではPDGFRなどrituximabとは異なるRTKや免疫受容体と相互作用することが分かった。従って、作用する抗体の種類によって異なった分子間相互作用が誘導される可能性が示唆された。次に、

rituximab-CD20複合体に相互作用する分子として、FGFR3に着目し実験を進めた。FGFR3のリン酸化阻害剤であるPD173074によってFGFR3活性を阻害すると、rituximabにより誘導される細胞増殖阻害活性が減弱された。また、FGFR3をsiRNAによりknockdownした細胞でも、同様に細胞増殖阻害が減弱された。よって、本研究の結果によりFGFR3が抗体医薬rituximabの細胞増殖阻害導に関与する分子、ひいてはrituximabの効能を制御する分子であることが示唆された。また、rituximabによる免疫沈降実験の結果、PD173074はrituximab-CD20複合体の下流のシグナル分子の会合状態に影響を与えている事が示され、FGFR3のリン酸化がCD20の下流のシグナル分子を介して細胞増殖阻害効果に影響を与えている可能性が示唆された。

現在、抗体医薬は個人差や病態の進行度によって効能が減衰されることがあるため、他の医薬品などを組み合わせた併用療法が盛んに研究されている。しかし、抗体医薬、特にシグナル抗体医薬の作用機序に直接作用する併用薬はほとんどなく、将来これらの併用薬開発も重要になると予想される。本研究のEMARS反応を用いた解析法により、様々なシグナル抗体医薬の作用機序に影響を与える分子を同定することができれば、それらを標的とした併用薬の創薬に大きく寄与できる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

	氏名	小谷典弘
審査委員	主査氏名	宇高 恵子 
	副査氏名	大畑 雅典 
	副査氏名	横山 彰仁 

題目 Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) associated with the CD20 antigen regulates the rituximab-induced proliferation inhibition in B-cell lymphoma cells
(リツキシマブ誘導B細胞リンパ腫細胞増殖抑制におけるFGFR3-CD20分子間相互作用複合体の関与)

著者 Norihiro Kotani, Yoshihito Ishiura, Ryusuke Yamashita, Tomoko Ohnishi, Koichi Honke

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
Journal of Biological Chemistry、287(44)、37109~37118、2012年8月29日

要旨

小谷典弘さんの学位審査は、平成24年1月29日16:00より、約1時間にわたって行いました。まず、研究内容の公開発表を行いました。

【背景と目的】

抗CD20モノクローナル製剤である rituximab は、悪性リンパ腫の治療に使われるが、その抗腫瘍活性の機序がすべて明らかになっているわけではない。マクロファージやNK細胞による抗体依存的細胞傷害や、補体による細胞傷害のメカニズムがこれまでに認識されている。小谷らは、その他に、rituximab を腫瘍細胞株の培養に加えると、細胞増殖が抑制されることに注目した。そして、そのメカニズムを明らかにするべく、rituximab が結合する細胞膜上の局所環境を調べたいと考えた。この目的のために、小谷らが開発した EMARS (Enzyme-mediated activation of radical sources, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 7405-7409, 2008) 法を活用すれば、HRP (Horse Radish Peroxidase) 標識抗体を使って

抗体が認識する標的分子の近傍に存在する分子を biotin 化することができる。そこで、rituximab および、同じく CD20 を認識するマウスのモノクローナル抗体 2 種 (B-Ly1, 2H7) を HRP 標識してリンパ腫細胞に結合させ、標的分子の周辺に存在する分子の同定を試みた。

【材料と方法】

抗体製剤である Rituximab、マウスの抗ヒト CD20 mAb である B-Ly1, 2H7 をそれぞれ HRP 標識し、Burkitt lymphoma (B 細胞腫瘍) の細胞株である Raji および BJAB に 37°C 15-30 分結合させ、EZ-Link biotin-LC-ASA 試薬を加えて EMARS 反応を 37°C 15 分行った。Biotin 化された細胞膜タンパク質を、Western blot および抗体アレイにより解析した。

Rituximab、2H7 が結合した Raji 細胞上の CD20 の局在は、FITC および Alexa647 で蛍光標識したそれぞれの抗体の分布を confocal fluorescence microscopy により観察した。

抗 CD20 抗体による細胞増殖の抑制は、trypan blue 染色後、生きた細胞数を顕微鏡下で計数することにより行った。

FGFR3 ノックダウン細胞は、あらかじめ siRNA 処理を行った Raji 細胞について生細胞数と、Western blot による FGFR3 タンパク量を調べた。続いて、抗 CD20 抗体を結合させた B 細胞腫瘍株におけるチロシンリン酸化の程度を、抗 CD20 抗体で免疫沈降後、Western blot により解析した。

【結果】

Rituximab および B-Ly1 抗体を結合させた場合に EMARS 反応により biotin 化された分子として、チロシンキナーゼ抗体アレイ解析では、FGFR3、ROR1、Dtk、ErbB4 が、また免疫レセプター抗体アレイ解析では、CD23、FcRIIA、FcRH5、CD22、TREM-2 が主にあがってきた。一方、2H7 を結合させた場合には、チロシンキナーゼ抗体アレイ解析では、rituximab や B-Ly1 で観察された分子は観察されず、代わりに PDGFR β が、また、免疫レセプター抗体アレイでは、CD23 は共通に見られたものの、FcR 関連分子は検出されず、代わりに SHP-2 が検出された。このことより、同一の標的分子 CD20 を認識するモノクローナル抗体であっても、近傍に存在する分子が異なることが示唆された。Rituximab や B-Ly1 で検出された FGFR3 は、Raji 細胞の raft 分画に存在し、2H7 を結合した Raji 細胞の raft 分画にも存在するため、EMARS による biotin 化の違いを説明する可能性として、異なる抗体で架橋されると、異なる組成の raft に CD20 が移動することが示唆された。

さらに、抗 CD20 抗体を Raji 細胞に加えると、直接増殖抑制がみられ、rituximab が 2H7 より抑制活性が強かった。そのメカニズムのひとつとして FGFR3 を介したシグナル受容が関係する可能性を考え、FGF ファミリーのチロシンキナーゼインヒビターである PD173074 を加えて反応をみたところ、増殖抑制が濃度依存的に解除された。また、siRNA による FGFR3 のノックダウンをすると、増殖抑制が解除された。ただし、BJAB 細胞では、PD173074 は逆に増殖抑制を強くした。この Raji と BJAB の違いは、rituximab-CD20 の免疫沈降によるリン酸化の結果とよく一致しており、Raji では CD20 のリン酸化が

PD173074 の添加により抑制されたが、BJAB では、影響がなかった。

【考察】

今回の研究から、同じ CD20 を標的とする抗体であっても、使う抗体によって影響される分子間の会合や、raft 会合性が異なることが明らかとなった。また、抗体製剤による直接的な腫瘍細胞の増殖阻害活性にも、標的となる CD20 と会合する FGFR3 等の分子に違いが出ることが明らかとなった。今後、抗体製剤ごとに、腫瘍制御効果に関連する分子の活性を制御する製剤と併用をするなど、工夫が考えられる。このようなアプローチにより新規併用療法を開発する上で、EMARS 法による分子会合の解析が役に立つと考えられる。

【聴衆および審査員からの質問やコメント】

In vivo における抗腫瘍活性に、どれくらい今回解析した増殖抑制活性が効いているのかわからない、例えばヌードマウスにヒトの B リンパ腫を接種して、in vivo 効果を調べるような実験系を組んだ方がよかったのではないかと、というコメントがあった。また、抗体製剤の抗腫瘍活性を調べる実験では、抗体濃度が重要で、濃度依存的に細胞の溶解が起こりがちであり、2次抗体で架橋するとさらに細胞が溶解する場合が多い。今回の抗腫瘍効果にも、架橋による影響が除外できないのではないかとコメントがあった。

また、rituximab と 2種のマウス抗体との比較をする研究であれば、キメラ抗体である rituximab よりも、その元となったマウスの mAb と活性を比較するべきではなかったか、という指摘があった。

さらに、今回標的として使われた B 細胞腫瘍株はいずれも FcR (Fc receptor) を有することから、抗体の Fc 部分を介した FcR の凝集および FcR から発せられるシグナルの影響が除外できない実験系となっている、という指摘があった。実際、Fig. 1D や Fig. 5 の結果は、FcR への抗体の結合と、それに続くシグナルの発信を示唆するデータとなっている。しかも、今回使った mAb のうち、同じ振る舞いを示した Rituximab と B-Ly1 がいずれも FcR に結合する IgG subclass であるのに対し、異なる結果をもたらした 2H7 は、FcR に結合しない IgG2b subclass であることから、今回の結果の違いの一部が使った抗体の FcR への会合性の違いを反映するものである可能性が否定できない。

以上の質問や議論に、小谷さんはおおむね適切な回答をし、実験の過程で経験した観察や考察を引いて、議論をした。これらをふまえて、審査員一同、学位に値する研究内容であると判断した。