

2015. 6

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七十三号

総務課広報戦略室発行

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153号	河野 充彦	Hippocampal Subfield Volumes in First Episode and Chronic Schizophrenia (統合失調症初回エピソード患者と慢性期患者の海馬亜領域容量)	1
甲医博第154号	藤戸 良子	Comparison of driving behaviors between individuals with frontotemporal lobar degeneration and those with Alzheimer's disease (前頭側頭葉変性症患者とアルツハイマー型認知症患者の運転行動の比較)	6
甲総医博第26号	野中 大伸	Elevated Cell Invasion in a Tumor Sphere Culture of RSV-M Mouse Glioma Cells (RSV-Mマウスグリオーマ細胞のスフェロイド培養における細胞浸潤能の上昇)	12
甲総医博第27号	橋田 裕美子	Detection of Merkel cell polyomavirus with a tumor-specific signature in non-small cell lung cancer (非小細胞肺癌における腫瘍特異的特徴を有するメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出)	17
甲総医博第28号	樋口 琢磨	High expression of nuclear factor 90 (NF90) leads to mitochondrial degradation in skeletal and cardiac muscles (骨格筋及び心筋における nuclear factor 90 (NF90) の過剰発現はミトコンドリア変性を引き起こす)	22
甲総医博第29号	青山 信隆	Therapeutic response to a new enzyme-targeting radiosensitization treatment (KORTUC-SC) for patients with chemotherapy-resistant supraclavicular lymph node metastasis (化学療法に抵抗性の鎖骨上窩リンパ節転移を有する患者達を対象とした新しい酵素標的増感剤併用下での放射線治療成績について)	26

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第30号	石田 わか	Inhibition of very late antigen-4 and leukocyte function-associated antigen-1 in experimental autoimmune uveoretinitis (very late antigen-4とleukocyte function-associated antigen-1による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制効果)	31
甲総医博第31号	危 士虎	Terrestrosin D, a steroidal saponin from <i>Tribulus terrestris</i> L., inhibits the growth and angiogenesis of human prostate cancer <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (前立腺癌に対するシツリシ由来テリストロシン Dの抗腫瘍効果及び血管新生阻害作用の検討)	36
甲総医博第32号	杉村 夏樹	Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia (関節内繰り返し酸投与は長期持続する広範な痛覚過敏を引き起こす)	41
甲総医博第33号	田村 貴彦	Oral carbohydrate loading with 18% carbohydrate beverage alleviates insulin resistance (18%炭水化物含有飲料の経口摂取がインスリン抵抗性を改善する)	47
甲総医博第34号	熊谷 直子	Simulation Program to Determine Sample Size and Power for a Multiple Logistic Regression Model with Unspecified Covariate Distributions (ロジステック回帰モデルのための検出力推定とサンプルサイズ推定プログラム)	52
乙総医博第30号	田中 加緒里	Quantitative evaluation of age-related alteration of swallowing function: videofluoroscopic and manometric studies (嚥下機能の加齢変化：嚥下造影検査と嚥下圧検査による定量的解析)	56
乙総医博第31号	米田 剛	Automated hyperemia analysis software: reliability and reproducibility in healthy subjects (自動化された充血解析ソフト：健常人における信頼性と再現性)	61
乙総医博第32号	青木 三恵子	Lower expressions of the human bitter taste receptor TAS2R in smokers: reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis (喫煙者におけるヒト苦味受容体TAS2Rの低発現性：逆転写ポリメラーゼ連続反応 (RT-PCR法) による分析)	66

氏名(本籍)	河野 充彦 (徳島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第153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27年3月5日
学位論文題目	Hippocampal Subfield Volumes in First Episode and Chronic Schizophrenia (統合失調症初回エピソード患者と慢性期患者の海馬亜領域容量)
発表誌名	PLOS ONE (Publish in press)

審査委員	主査	教授	古谷	博和
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	山上	卓士

## 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 河野 充彦

論文題目 Hippocampal Subfield Volumes in First Episode and Chronic Schizophrenia (統合失調症初回エピソード患者と慢性期患者の海馬亜領域容量)

(論文要旨)

## [目的]

統合失調症発病後の脳の形態学的変化についてはさまざまな報告がされている。その中で、海馬容量減少は再現性の高い所見である。慢性期患者の海馬容量は、初回エピソード患者よりも減少傾向にあると報告されている。海馬を構成する亜領域容量が全体的に減少しているのか、それとも特有の亜領域容量が局所的に減少しているか、については明らかでなかった。画像解析の発達でこれまで検出が困難であった海馬亜領域容量の評価が可能となった。本研究では、統合失調症患者の海馬亜領域容量と罹患期間や臨床症状、抗精神病薬量との関連について横断的、縦断的研究を行った。

## [方法]

34例の統合失調症患者と15例の健常群が、1.5T MRI scannerを用いて撮影された。海馬亜領域容量測定については自動解析ソフトのFreeSurferを使用した。FreeSurferにより海馬亜領域は歯状回(CA4-DG)、アンモン角亜領域(CA1、CA2-3)、前海馬台、海馬台に分割された。34例の統合失調症患者を罹患期間により初回エピソード患者群(19例)、亜慢性期患者群(6例)、慢性期患者群(9例)に分類して、それぞれ海馬亜領域容量について測定した。初回エピソード患者の10例と健常群の12例については初回撮影の半年後に再撮影を行った。

統合失調症の臨床症状はPANSS (Positive and Negative Syndrome Scale), CGI (Clinical Global Impression), GAF (Global Assessment of Functioning), SCoRS (Schizophrenia Cognition Rating Scale)で評価した。抗精神病薬はクロルプロマジン等価換算を用いて評価した。




## [結果]

左総海馬容量は亜慢性期群と慢性期患者群で健常群と比較して小さかった。慢性期患者の左CA2-3亜領域容量は健常群と比較すると有意に減少していた。統合失調症患者の左CA4-歯状回亜領域は3つの群それぞれで健常群と比較すると有意に減少していた。2つの亜領域容量は陰性症状の重症度と逆の相関があった。発病初期6ヶ月間で左CA4-DG亜領域容量に統計学的有意な減少があった。

## 【結論】

横断研究では、健常群、初回エピソード群、亜慢性期群、慢性期患者群の左海馬亜領域容量における段階的な容量減少があり、横断研究では、治療開始後半年間で左 CA4・歯状回亜領域容量の進行性減少が認められた。統合失調症において、進行性の海馬亜領域の形態学的変化が、罹患期間や精神症状の重症度に関連があると示唆される。統合失調症において、幼少期の心的外傷や虐待が、大人になってから、左海馬の容量低下と関連すると報告されている。今回の左右非対称的な海馬容量変化は、心理社会的ストレスや感情障害などによる影響を表しているのかもしれない。FreeSurfer を用いた新しい画像解析方法が、統合失調症の海馬領域の構造的変化と疾病との関連を明らかにした。今後、より多くの症例を集めることによって、精神症状、治療期間、心理社会的因子、薬物療法などと海馬亜領域との関連を確認する必要がある。将来には、海馬亜領域の変化が、診断、治療効果判定などに役立つか評価を行いたい。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	河野 充彦
審査委員	主査氏名	古谷 博和 
	副査氏名	椛 秀人 
	副査氏名	山上 卓士 

**題 目**

Hippocampal Subfield Volumes in First Episode and Chronic Schizophrenia

(統合失調症初回エピソード患者と慢性期患者の海馬亜領域容量)

**著 者**

Mitsuhiko Kawano, Ken Sawada, Shinji Shimodera, Yasuhiro Ogawa, Shinji Kariya, Donna J. Lang, Shimpei Inoue, William G. Honer

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

PLOS ONE  
(Publish in press)

**要 旨**

統合失調症発病後の脳の形態学的変化についてはさまざまな報告がされているが、その中で海馬容量減少は再現性の高い所見といえる。これまでに慢性期統合失調症患者の海馬容量は、初回エピソード患者よりも減少傾向にあると報告されているが、海馬を構成する亜領域容量が全体的に減少しているのか、それとも特有の亜領域容量が局所的に減少しているかについては明らかになっていない。一方、画像解析技術の発達で、これまで検出が困難であった海馬亜領域容量の評価が可能となってきている。

そこで申請者は、統合失調症患者の海馬亜領域容量と罹患期間や臨床症状、抗精神病薬量との関連について、横断的、縦断的研究を行った。具体的には 34 例の統合失調症患者と 15 例の健常群の脳を 1.5T MRI scanner を用いて撮影し、その海馬亜領域容量を自動解析ソフトの FreeSurfer を用いて解析した。海馬亜領域は歯状回 (CA4-DG)、ア

ンモン角亜領域(CA1、CA2-3)、前海馬台、海馬台に分割し、それぞれ Freesurfer で解析を行った。34例の統合失調症患者を罹患期間により初回エピソード患者群(19例)、亜慢性期患者群(6例)、慢性期患者群(9例)に分類し、それぞれ海馬亜領域容量を測定した。初回エピソード患者の10例と健常群の12例については初回撮影の半年後に再撮影を行った。

統合失調症の臨床症状は PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale), CGI (Clinical Global Impression), GAF (Global Assessment of Functioning), SCoRS (Schizophrenia Cognition Rating Scale)で評価した。抗精神病薬はクロルプロマジン等価換算を用いて評価した。

得られた結果をまとめると以下ようになった。

1. 左総海馬容量は亜慢性期群と慢性期患者群で健常群と比較して小さかった。
2. 慢性期患者の左 CA2-3 亜領域容量は健常群と比較すると有意に減少していた。
3. 統合失調症患者の左 CA4-歯状回亜領域は 3 つの群それぞれで健常群と比較すると有意に減少していた。
4. 2 つの亜領域容量は陰性症状の重症度と逆の相関があった。
5. 発病初期 6 ヶ月間で左 CA4-DG 亜領域容量に統計学的有意な減少があった。

以上の結果から、本横断研究により健常群、初回エピソード群、亜慢性期群、慢性期患者群の左海馬亜領域では段階的に容量減少が進行し、特に治療開始後半年間で左 CA4-歯状回亜領域容量が進行性に減少する事が明らかになった。この事から、統合失調症では進行性の海馬亜領域の形態学的変化が、罹患期間や精神症状の重症度と関連する事が示唆された。

これまでに統合失調症では、幼少期の心的外傷や虐待が、大人になってから左海馬の容量低下と関連することが報告されている。今回の研究により、左右非対称的な海馬容量の変化が、心理社会的ストレスや感情障害などによる影響を反映している可能性が示唆され、さらに FreeSurfer を用いた新しい画像解析方法で、統合失調症の海馬領域の構造的変化と疾病との関連を明らかにすることが出来たと言える。

本論文は統合失調症の画像解析に新たな方法を開発したことを示しており、さらに多くの症例を集め、精神症状、治療期間、心理社会的因子、薬物療法などと海馬亜領域との関連を確認する必要があるとはいえ、将来的にこの方法が、海馬亜領域の変化を用いての診断、治療効果の判定などを行う時に役立つ可能性が期待され、審査員一同は本論文が高知大学課程博士に相応しい価値あるものと判断した。



氏名(本籍)	藤戸 良子 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第154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27年3月5日
学位論文題目	Comparison of driving behaviors between individuals with frontotemporal lobar degeneration and those with Alzheimer's disease (前頭側頭葉変性症患者とアルツハイマー型認知症患者の運転行動の比較)
発表誌名	Psychogeriatrics(in press)

審査委員	主査	教授	安田	誠史
	副査	教授	古谷	博和
	副査	教授	上羽	哲也

## 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 藤戸 良子

論文題目 Comparison of driving behaviors between individuals with frontotemporal  
lobar degeneration and those with Alzheimer's disease  
(前頭側頭葉変性症患者とアルツハイマー型認知症患者の運転行動の比較)

(論文要旨)

認知症患者の自動車運転は、患者本人および公共の安全にとって重要な課題である。現在、わが国の法律では、75歳以上の高齢者は運転免許更新時に簡易認知機能検査を受け、その結果により認知症が疑わしいものは臨時適性検査と専門医の診断を受け、認知症と診断されれば運転免許の停止または取り消しがなされる。しかし実際には認知症患者の高速道路逆走事故などの報道が後を絶たず、認知症患者の自動車運転にはいまだ残された課題が多いのが現状である。

これまでの認知症患者の自動車運転に関する研究は、アルツハイマー型認知症(AD)を対象としたものが主体で、前頭側頭葉変性症(FTLD)について報告されたものは極めて少ない。しかし、FTLDは若年期の認知症の原因として2番目に多い変性疾患と報告されており、見逃すことのできない非常に重要な疾患である。そこで我々は、FTLD患者とAD患者それぞれの運転行動について調査し、自動車事故を起こすまでの期間と事故のリスクを比較した。対象者は高知大学医学部附属病院の精神科を初診した患者で、初診時に自動車免許を保有していたFTLD 28名、AD 67名とした。その結果、両群とも運転行動変化は発症前と比較し高率に報告された(FTLD群 89%、AD群 76%)。運転行動の内容では、FTLD群では車間距離の維持困難(50%)、道路標識・信号の無視(61%)、わき見運転(50%)が高率に報告され、AD群では行き先忘れ(61%)や車庫入れの失敗(25%)が比較的多かった。事故を起こした者はFTLD群では75%、AD群では22%、認知症発症から事故を起こすまでの期間は、FTLD群は平均1.35年、AD群では平均3年と有意な差が認められた。事故のリスクは、FTLD群はAD群と比較し、オッズ比10.4(95%信頼区間= 3.7- 29.1)であった。

FTLDは、精神症状・行動障害を臨床症状の主体とし、前頭葉または側頭葉の変性を伴う疾患群である。臨床的に、前頭側頭型認知症(bvFTD)、意味性認知症(SD)、進行性非流暢性失語(PNFA)の3つに分けられる。FTLDの臨床症状として、攻撃性、衝動性、落ち着きのなさ、脱抑制および被影響性の亢進が特徴的である。精神症状や行動障害が目立つために、他の精神疾患と誤診されやすく、適切な診断に至るまでに時間を要する可能性が指摘されている。

本研究で報告された車間距離の維持困難、道路標識・信号の無視、わき見運転といったFTLDの特徴的な運転行動は、FTLDで認められる精神症状・行動障害が誘因となっている可能性が考えられる。AD群に多く認められた行き先忘れが、FTLD群では少なかったことは、ADで認めら

れる記憶障害や視空間機能障害が、FTLD では初期には認められにくいためと考えられる。また、SD では行動障害に加えて、意味記憶障害のため信号・道路標識の意味が理解できなくなり、危険運転につながる可能性がある。

FTLD ではADと比較して、その行動障害・精神症状が誘因と考えられる危険な運転行動が有意に多く認められ、かつ発症初期から自動車事故を起こす可能性が高いことが分かった。また、FTLD では事故を起こすまでの平均期間が1.35年で、認知症発症から初診までの平均期間1.7年よりも短かったことは特に注目すべき点で、初診時にすでに事故を起こしている患者がいる可能性もある。そのため、臨床医がFTLDと診断した際には、速やかに患者とその家族に運転の危険性を説明し、運転中断を勧告すべきである。

今後は、認知症の適切な診断と早期発見に加えて、認知症患者とその家族が運転に依存しなくとも生活できる社会制度づくりが重要である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	藤戸 良子
審査委員	主査氏名	安田 誠史 <span style="float: right;">印</span>
	副査氏名	古谷 博和 <span style="float: right;">印</span>
	副査氏名	上羽 哲也 <span style="float: right;">印</span>

題 目      Comparison of driving behaviors between individuals with frontotemporal lobar degeneration and those with Alzheimer' s disease

(前頭側頭葉変性症患者とアルツハイマー型認知症患者の運転行動の比較)

著 者      Ryoko FUJITO, Naoto KAMIMURA, Manabu IKEDA,  
Asuka KOYAMA, Shinji SHIMODERA, Shigeru MORINOBU,  
and Shimpei INOUE

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

### 要 旨

#### 【背景と目的】

認知症患者の自動車運転は、患者本人および公共の安全にとって重要な課題である。現在、わが国の法律では、75歳以上の高齢者は、自動車運転免許更新時に簡易認知機能検査を受け、その結果により認知症が疑われる者は、臨時適性検査と専門医の診断を受け、認知症と診断されれば運転免許の停止または取り消しがなされる。しかし実際には認知症患者の高速道路逆走事故などの報道が後を絶たず、認知症患者の自動車運転に対する医学的対応と社会的規制には、残された課題が多い。

これまでの認知症患者の自動車運転に関する研究は、アルツハイマー型認知症(AD)を対象としたものが主体で、前頭側頭葉変性症(FTLD)について報告されたものは極めて少ない。FTLDは、精神症状・行動障害を臨床症状の主体とし、前頭葉または側頭葉の変性を伴う疾患群である。臨床的に、前頭側頭型認知症、意味性認知症、進行性非流暢性失語の3つに分けら

れる。FTLD は 65 歳未満の成人における認知症の原因として 2 番目に多い変性疾患と報告されており、見逃すことのできない非常に重要な疾患である。

申請者は、先行研究が乏しい、FTLD を原因とする認知症患者の自動車運転行動と自動車事故経験の状況を、AD を原因とする認知症患者を比較対照に置いて明らかにした。

#### 【方法】

対象者は、1995 年 9 月から 2012 年 12 月までに高知大学医学部附属病院の精神科を初診し、初診時に自動車運転免許を保有し、Neary らによる FTLD の診断基準か、National Institute of Neurological and Communicative Disease and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association による AD の診断基準を満たし、認知症を診断されてから 1 年以上の期間について自動車運転の状況を調査できた、FTLD の患者 28 名と AD の患者 67 名とした。申請者らが、患者の主たる介護者または患者の同居家族に対して半構造化面接を行い、患者が認知症と診断された時期、患者の自動車運転行動（結果の節に記載する 6 項目）に認知症発症後に生じた変化、患者が認知症発症後に引き起こし、患者に責任があるとされた、警察によって処理された交通事故の有無、そのような交通事故を起こした場合は事故を起こした時期と事故の状況を調査した。

#### 【結果】

初診時の平均年齢は FTLD 群 67.9 歳、AD 群 69.8 歳、男性の割合は FTLD 群 64%、AD 群 63%、診断からの平均病期期間は FTLD 群 2.0 年、AD 群 1.7 年、Mini-Mental State Examination の平均スコアは FTLD 群 19.6、AD 群 19.5 であった。FTLD 群と AD 群との間に、これら基本的特性については有意な差は認められなかった。

両群ともで、認知症と診断されてから運転行動が変化したという回答が高率に報告された (FTLD 群 89%、AD 群 76%)。運転行動の項目別に検討すると、FTLD 群では車間距離の維持困難(50%)、道路標識・信号の無視(61%)、わき見運転(50%) が高率に報告され、AD 群では行き先忘れ(61%)と車庫入れの失敗(25%)が、FTLD 群においてより高率に報告された。

自動車事故を起こした患者の割合は FTLD 群では 75%で AD 群での 22%より有意に高く、FTLD 群は AD 群と比較して何倍交通事故のリスクが高いかを表すオッズ比は 10.4 (95%信頼区間= 3.7- 29.1) であった。

認知症発症から事故を起こすまでの期間は、FTLD 群では平均 (標準偏差) 1.35 (0.83) 年、AD 群では平均 (標準偏差) 3.0 (1.36) 年で、2 群の間に有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。

#### 【考察】

FTLD の臨床症状の特徴は、攻撃性、衝動性、落ち着きのなさ、脱抑制および被影響性の亢進である。認知症発症後に変化したと報告された自動車運転行動のうち、FTLD 群の方で高率に選択された車間距離の維持困難、道路標識・信号の無視、わき見運転は、FTLD で認められ

る精神症状・行動障害が誘因となっている可能性が考えられた。また、FTLD 群 28 名のうち 13 名が FTLD の下位分類で意味性認知症に分類されたが、これらの者では、行動障害に加えて、意味記憶障害のため信号・道路標識の意味が理解できなくなり、危険運転につながった可能性が考えられた。なお、行き先忘れが AD 群の方で高率に選択されたのは、AD で認められる記憶障害や視空間認知障害が、FTLD では初期には認められにくいためと考えられた。

FTLD 群では、自動車事故を起こすまでの平均期間が 1.35 年で、認知症発症から初診までの平均期間 2.0 年よりも短かったことから、FTLD を原因とする認知症患者が専門外来を初診した時には、すでに自動車事故を起こしている場合があると考えられた。

### 【結論】

FTLD では AD と比較して、その行動障害・精神症状が誘因と考えられる危険な運転行動のために、発症初期から自動車事故を起こす可能性が高いことが明らかになった。専門医が FTLD と診断した際には、速やかに患者とその家族に自動車運転の危険性を説明し、自動車運転中断を勧告すべきである。

本研究は、これまで系統的な検討が行われてこなかった、FTLD を原因とする認知症患者の自動車運転行動の特徴と自動車事故のリスクを、AD を原因とする認知症患者を比較対照に置いて定量的に記述したユニークな臨床研究である。FTLD を原因とする認知症患者では、発症初期から危険な運転行動が増え、自動車事故を起こすリスクが高まることを、AD と FTLD の病態と臨床症状の違いを踏まえて解釈できており、学術的な意義は高い。また、認知症患者の自動車運転に対する規制を、年齢ではなく、認知症の原因疾患別に行う必要があるという新しい観点を社会に提言するものにもなっている。

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)	野中 大伸 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第26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27年2月17日
学位論文題目	Elevated Cell Invasion in a Tumor Sphere Culture of RSV-M Mouse Glioma Cells (RSV-Mマウスグリオーマ細胞のスフェロイド培養における細胞浸潤能の上昇)
発表誌名	Neurologia medico-chirurgica Vol. 55, No. 1, 20152015年1月

審査委員	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	花崎	和弘
	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 野中 大伸

論文題目 Elevated Cell Invasion in a Tumor Sphere Culture of RSV-M  
Mouse Glioma Cells (RSV-Mマウスグリオーマ細胞のスフェ  
ロイド培養における細胞浸潤能の上昇)

(論文要旨)

がん幹細胞仮説では、腫瘍内に僅かに存在する幹様細胞は、放射線治療や化学療法に対する抵抗性を示し、結果として様々な治療後の腫瘍再発の原因となることを提唱している。また、このがん幹細胞は、腫瘍内で唯一、造腫瘍性を示す集団であり、この撲滅こそが、がんの根治に繋がると考えられている。

膠芽腫は、極めて予後の悪い原発性脳腫瘍であり、現在の標準治療を施した患者の平均余命は、14.6ヶ月である。その原因の一つは、膠芽腫細胞が正常脳組織へ活発に浸潤するために完全な外科的切除を困難にしていることがある。膠芽腫は、がん幹細胞（膠芽腫幹細胞）を含んでいる代表的な腫瘍であり、この細胞が放射線治療や化学療法に対する抵抗性に関わっていることが報告されている。膠芽腫幹細胞の免疫反応、移動及び様々な反応を生体内の複雑な環境で解析するためには、ヒト細胞株ではなく、マウス細胞株の樹立が必要である。




RSV-M細胞は、ラウス肉腫ウイルスのマウス脳内への投与によって形成された腫瘍から樹立されたグリオーマ細胞株であり、ウシ胎児血清を含む培養液で培養した場合、紡錘状の形態を示した付着細胞である。この細胞をEGF（上皮成長因子）とFGF-2（線維芽細胞増殖因子2）とLIF（白血病阻止因子）を含む無血清の神経幹細胞用の培養液で3週間、培養すると細胞の大部分は、培養皿に付着せず浮遊し、正常神経幹細胞の培養時に観察されるニューロスフェアに類似して数十個から千個程度の細胞により構成されるスフェロイド

(RSV-M-TS)として観察された。神経幹細胞や多くのヒト膠芽腫幹細胞は、EGFやFGF-2依存性の増殖を示すことが知られているが、予想に反し、RSV-M-TSは、増殖における増殖因子の要求性を示さなかった。自己複製性は、RSV-Mと比較して亢進しており、血清を含む培養液で培養すると再び親株（RSV-M）と同様の形態を示した。RSV-MとRSV-M-TSにおける幹



細胞や分化細胞マーカーの発現を解析するとCD133やNestinでは差が無かったが、SOX2はRSV-M-TSにおいて発現が亢進していることが分かった。RSV-MとRSV-M-TS細胞を同系マウスの皮下に移植し、造腫瘍性を観察するとRSV-M-TSで腫瘍の形成が顕著であった。また、僅か100個のRSV-M-TS細胞をマウス脳内に移植し、腫瘍形成を観察すると3週間後には、浸潤性に富む腫瘍像が得られた。次に、スフェロイド細胞の浸潤性を調べるために蛍光色素でRSV-M細胞または、RSV-M-TS細胞を標識し、同系マウス脳内の線条体に移植した。RSV-M-TS細胞は、親株と比較して線条体に沿ってより速やかに浸潤した。また、*in vitro* において3Dコラーゲンゲルアッセイでも同様の結果が得られたことから、RSV-M細胞に由来するスフェロイド細胞では、浸潤性が亢進していることが考えられた。次に、この高い浸潤性に関与している分子をがんの転移や浸潤に関わる遺伝子を含むPCRアレイを用いて検索すると親株に対して、スフェロイド細胞は、転移や浸潤を正に制御している多くの遺伝子を発現亢進している結果が得られた。これらの遺伝子のうち、ヒト膠芽腫の浸潤に関与することが報告されているtenascin-Cの発現をRSV-M-TSを移植後に形成された腫瘍組織において観察するとtenascin-C陽性細胞は、腫瘍塊周辺部に多く見られ、移植部位から離れた部位にも存在した。これらの結果から、本研究で構築したマウスグリオーマ細胞の幹細胞モデルは、高い浸潤能を示し、多くの転移、浸潤に関連する遺伝子を高発現することが示唆された。また、このモデルは、さらなる研究が必要ではあるが、がん幹細胞の浸潤の制御や免疫療法の開発に有用であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	野中 大伸
審査委員	主査氏名	降幡 睦夫 
	副査氏名	花崎 和弘 
	副査氏名	執印 太郎 

題 目    Elevated Cell Invasion in a Tumor Sphere Culture of RSV-M Mouse Glioma Cells

(RSV-Mマウスグリオーマ細胞のスフェロイド培養における細胞浸潤能の上昇)

著 者

Motonobu Nonaka, Toshio Yawata, Mitsuhiro Takemura, Youichirou Higashi, Eiichi Nakai, Keiji Shimizu, Tetsuya Ueba

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Neurologia medico-chirurgica Vol. 55, No. 1, 2015  
 2015年1月

要 旨

【背景・目的】 がん幹細胞は腫瘍内で唯一造腫瘍性を示す集団であり、放射線治療や化学療法に対する抵抗性を示し、様々な治療後の腫瘍再発の原因となるため、がん幹細胞撲滅こそが、がん根治に繋がると考えられている。膠芽腫は極めて予後不良の原発性脳腫瘍で、正常脳組織へ広範に浸潤し、完全な外科的切除を困難にしている。膠芽腫でのがん幹細胞（膠芽腫幹細胞）も放射線治療や化学療法に対する抵抗性を示し、膠芽腫の浸潤能への影響、炎症、免疫反応等の生体内環境への対応に関与しているが、その詳細は不明である。我々は膠芽腫幹細胞の腫瘍動態への関与を解析可能な細胞株樹立を目的とし、マウス膠芽腫幹細胞を効率に含有するニューロスフェア類似の細胞集団を樹立し、その機能解析を行った。

【方法】ラウス肉腫ウイルスのマウス脳内への投与によって形成された腫瘍から樹立されたグリオーマ細胞株のRSV-M細胞を、EGF（上皮成長因子）とFGF-2（線維芽細胞増殖因子2）とLIF（白血球阻止因子）を含む無血清の神経幹細胞用の培養液で3週間培養した。細胞の大部分は培養皿に付着せず浮遊し、正常神経幹細胞の培養時に観察されるニューロスフェアに類似した、数十個から千個程度の細胞集塊により構成されるスフェロイド（RSV-M-TS）が得られた。これを同系マウスの皮下及び脳内に移植し造腫瘍性及び浸潤能を評価した。

【結果】神経幹細胞や多くのヒト膠芽腫幹細胞は、EGFやFGF-2依存性の増殖を示すことが知られているが、予想に反し、RSV-M-TSは、増殖における増殖因子の要求性を示さなかった。自己複製性は、RSV-Mと比較して亢進しており、血清を含む培養液で培養すると再び親株（RSV-M）と同様の形態を示した。RSV-MとRSV-M-TSにおける幹細胞や分化細胞マーカーの発現を解析するとCD133やNestinでは差が無かったが、SOX2はRSV-M-TSにおいて発現が亢進していることが分かった。RSV-MとRSV-M-TS細胞を同系マウスの皮下に移植し、造腫瘍性を観察するとRSV-M-TSで腫瘍の形成が顕著であった。また、僅か100個のRSV-M-TS細胞をマウス脳内に移植し、腫瘍形成を観察すると3週間後には、浸潤性に富む腫瘍像が得られた。次に、スフェロイド細胞の浸潤性を調べるために蛍光色素でRSV-M細胞または、RSV-M-TS細胞を標識し、同系マウス脳内の線条体に移植した。RSV-M-TS細胞は、親株と比較して線条体に沿ってより速やかに浸潤した。また、*in vitro* において3Dコラーゲンゲルアッセイでも同様の結果が得られたことから、RSV-M細胞に由来するスフェロイド細胞では、浸潤性が亢進していることが考えられた。次に、この高い浸潤性に関与している分子をがんの転移や浸潤に関わる遺伝子を含むPCRアレイを用いて検索すると親株に対して、スフェロイド細胞は、転移や浸潤を正に制御している多くの遺伝子を発現亢進している結果が得られた。これらの遺伝子のうち、ヒト膠芽腫の浸潤に関与することが報告されているtenascin-Cの発現をRSV-M-TSを移植後に形成された腫瘍組織において観察するとtenascin-C陽性細胞は、腫瘍塊周辺部に多く見られ、移植部位から離れた部位にも存在した。

【結論】これらの結果から、本研究で構築したマウスグリオーマ幹細胞類似モデルは、高い浸潤能を示し、多くの転移、浸潤に関連する遺伝子を高発現することが示唆された。また、このモデルは、さらなる研究が必要ではあるが、がん幹細胞の浸潤の制御や免疫療法の開発に有用であると考えられる。

氏名(本籍)	橋田 裕美子 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第27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27年3月23日
学位論文題目	Detection of Merkel cell polyomavirus with a tumor-specific signature in non-small cell lung cancer (非小細胞肺癌における腫瘍特異的特徴を有するメルケル細胞ポリオマーウイルスの検出)
発表誌名	British Journal of Cancer 108 (3): 629-637 2013年 2月

審査委員	主査	教授	藤枝	幹也
	副査	教授	小林	道也
	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

橋田 裕美子

## 論文題目

**Detection of Merkel cell polyomavirus with a tumor-specific signature in non-small cell lung cancer.**

(非小細胞肺癌における腫瘍特異的特徴を有するメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出)

(論文要旨)

### 【背景と目的】

がんは世界的に死因の上位を占め、中でも最も死亡数が多いのは肺癌である。肺癌の最大の原因は喫煙であるが、近年喫煙者数は減少傾向にある。一方で、非喫煙者の非小細胞肺癌が増加しており、この傾向はアジアで顕著にみられる。これらの疫学的調査結果は、肺癌発症に喫煙以外の因子の関与を示唆している。

2008年にヒトにがんを惹起する新規ウイルスとして、皮膚がんの一種であるメルケル細胞がんからメルケル細胞ポリオーマウイルス (Merkel cell polyomavirus: MCPyV) が発見された。MCPyV はメルケル細胞がんの原因因子として研究が行われているが、感染ルートやメルケル細胞がん以外の腫瘍化に関する可能性、詳細な発がん機構は未だ解明されていない。最近では、一部の無症候性者の下気道から MCPyV の DNA 断片が検出されたとの報告がなされた。肺癌と MCPyV の関係性については、MCPyV ゲノムの検出報告はあるものの、頻度には差異があり、病因への関与は不明である。また、これまでの報告は全て欧米からであり、アジアにおける非小細胞肺癌の MCPyV 蔓延性は明らかにされていない。そこで本研究では、本邦の非小細胞肺癌における MCPyV の感染頻度と感染形態を解析し、肺癌の病因への関与を調査した。

### 【方法】

本邦の非小細胞肺癌112症例 (喫煙症例85例、非喫煙症例27例) の新鮮凍結組織より DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、PCR による MCPyV ゲノムの検出およびリアルタイム PCR による MCPyV の定量を行った。MCPyV 陽性例については RNA を抽出し、RT-PCR によって腫瘍組織・非腫瘍組織における LT 抗原遺伝子 (MCPyV 由来がんタンパクをコードする遺伝子) および VP1 遺伝子 (ウイルスカプシドタンパクをコードする遺伝子) の発現を調べた。また、タンパクレベルでの発現を確認するため、パラフィン包埋組織切片を用い、免疫組織染色によって腫瘍細胞での LT 抗原の検出を行った。さらに、がん化に重要とされる MCPyV の細胞染色体への組込みと、LT 抗原遺伝子の変異を調べるため、それぞれ DIPS (detection of integrated papilloma sequence)-PCR と呼ばれる解析と PCR ダイレクトシーケンスによる解析を行った。

### 【結果と考察】

非小細胞肺癌112例中20例 (陽性率17.9%)、うち喫煙症例85例中12例 (陽性率14.1%)、非喫煙症例

27例中8例（陽性率29.6%）において MCPyV ゲノムが検出された。陽性率と細胞あたりのウイルスコピー数は共に、メルケル細胞がんからの検出値と比べると低い値であった。また、統計的に有意差は無いものの喫煙者に比べて非喫煙者で陽性率の高い傾向が認められた。

RT-PCR の結果、RNA 抽出が可能であった MCPyV 陽性10例中4例では LT 抗原の発現が認められたが、VP1の発現は認められなかった。さらに免疫組織染色による確認の結果、LT 抗原は腫瘍細胞の核で強い免疫反応が観察された。これまでに、MCPyV 陽性のメルケル細胞がんでは、がん化に LT 抗原の発現が必須である上に、ウイルス関与の腫瘍では共通してウイルス複製能の欠如が報告されている。実際に、ほとんどの MCPyV 陽性メルケル細胞がんでは、LT 抗原は発現しているが、ウイルス粒子形成に必要な VP1は発現していないことが報告されている。これらのことから、本結果でも LT 抗原の発現とウイルス複製能の欠如が示唆された。

メルケル細胞がんのがん化メカニズムには、LT 抗原の発現に加え、LT 抗原遺伝子の腫瘍特異的な変異、そして細胞染色体への MCPyV ゲノムの組込みが重要であることが明らかになっている。MCPyV 陽性例の中で解析可能であった11例について DIPS-PCR を行った結果、2例において細胞染色体への MCPyV ゲノムの組込みが明らかになった。さらにシーケンス解析の結果、両例において LT 抗原遺伝子の腫瘍特異的な変異が認められた。これは、非小細胞肺がんの発がんに MCPyV が関与していることを示唆するものであり、メルケル細胞がん以外では初となる証拠となった。

#### 【まとめ】

本研究成果は、非小細胞肺がんにおける MCPyV の検出だけではなく、LT 抗原の転写・発現を証明し、MCPyV の腫瘍細胞への組込み、LT 抗原遺伝子の腫瘍特異的な変異を明らかにした。非小細胞肺がんの病因に MCPyV の潜在的な関与を示す結果であり、今後非小細胞肺がんの病因との関係性を詳細に調べる必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	橋田 裕美子
審査委員	主査氏名	藤枝 幹也 印
	副査氏名	小林 道也 印
	副査氏名	佐野 栄紀 印

題 目     Detection of Merkel cell polyomavirus with a tumor-specific signature in non-small cell lung cancer.

(非小細胞肺癌における腫瘍特異的特徴を有するメルケル細胞ポリオーマウイ  
ルスの検出)

著 者     Yumiko Hashida, Masayuki Imajoh, Yuiko Nemoto, Mikio Kamioka, Ayuko  
Taniguchi, Takahiro Taguchi, Motohiko Kume, Kazumasa Orihashi, Masanori  
Daibata

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    )、    年    月  
British Journal of Cancer 108 (3): 629-637  
2013年 2月

### 要 旨

#### 背景と目的

肺癌の最大危険因子は喫煙であるが、近年、喫煙者は減少傾向にある。一方で、非喫煙者の非小細胞肺癌は増加しており、特に、アジアでこの傾向が顕著である。これらのことから、肺癌発症に喫煙以外の因子が関与している可能性がある。

メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)は、メルケル細胞がんの原因ウイルスとして発見され、最近では、一部の無症候性者の下気道から同ウイルスのDNA断片が検出されたと報告されている。肺癌とMCPyVの関連については、ゲノム検出の報告はあるが、その頻度は種々でありがん発症への関与は不明なままである。かつ、これまでの報告は全て、欧米からであり、アジアからの非小細胞肺癌におけるMCPyVの蔓延性は報告されていない。本研究は、日本の非小細胞肺癌におけるMCPyVの感染頻度と感染形態を解析し、疾患への同ウイルスの関与を検討した。

## 方法

日本人非小細胞肺癌患者 112 例で、内訳は、扁平上皮がん 32 例、腺がん 45 例、大細胞がん 32 例および多型性がん 3 例から得られた組織で検討した。喫煙は 85 例、非喫煙は 27 例であった。Stage は I-II が 54 例、III-IV が 4 例、不明は 17 例であった。新鮮凍結組織から DNA を抽出し、PCR 法による MCPyV ゲノムの検出と real-time PCR 法によるゲノムの定量を実施した。MCPyV 陽性例については、RNA を抽出し、reverse transcription-PCR 法により組織中に MCPyV 由来がん蛋白をコードする LT 遺伝子、およびウイルスカプシド蛋白をコードする VP1 遺伝子の発現を調べた。免疫組織染色により腫瘍細胞での LT 抗原の検出も行った。さらに、がん化に重要とされる MCPyV の細胞染色体への組込みと、LT 遺伝子の変異を detection of integrated papilloma sequence (DIPS)-PCR 法と PCR ダイレクトシーケンス法で解析した。

## 結果と考察

1. 非小細胞肺癌組織中 20/112 例 (17.9%) さらに、喫煙 12/85 例 (14.1%)、非喫煙 8/27 例 (29.6%) において MCPyV ゲノムが検出された。非喫煙例が喫煙例に比して陽性率が高い傾向にあった。しかし、非小細胞肺癌における陽性率と細胞あたりのゲノム数はメルケル細胞がん に比して、双方とも低値であった。
2. RNA 抽出が可能であった MCPyV 陽性の 10 例中 4 例で、LT 抗原は認められたが、VP1 抗原は認められなかった。免疫組織染色では、LT 抗原は腫瘍細胞の核で強く染色された。これらのことから、がん化に必須である LT 抗原は認められたが、VP1 抗原は認められないことからウイルス複製能は欠如していることが示唆された。このことは、他のウイルス関与腫瘍に認められる事象と同様であった。
3. MCPyV 陽性で DIPS-PCR 法で解析可能であった 11 例において、2 例で細胞染色体への同ウイルスの組込みが証明され、LT 遺伝子の腫瘍特異的な変異が認められた。これらのことから、非小細胞肺癌のがん化に MCPyV が関与している可能性が示唆された。

## まとめ

本研究は、日本における非小細胞肺癌において、MCPyV の検出に加えてがん化に必須である LT 抗原の転写・発現を証明し、同ウイルスの腫瘍細胞染色体への組込み、さらに LT 遺伝子の腫瘍特異的な変異も明らかにした。非小細胞肺癌のがん化に MCPyV が関与している可能性を示した研究である。

以上のように、本論文は非小細胞肺癌の発症(がん化)に MCPyV が関与している可能性を示し、今後の同疾患の病因解明に大きく寄与する貴重な研究である。よって、審査員一同は、本論文が高知大学博士(医学)に相応しい価値のあるものと判断した。



氏名(本籍)	樋口 琢磨 (山梨県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第28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27年3月23日
学位論文題目	High expression of nuclear factor 90 (NF90) leads to mitochondrial degradation in skeletal and cardiac muscles (骨格筋及び心筋における nuclear factor 90 (NF90) の過剰発現はミトコンドリア変性を引き起こす)
発表誌名	PLoS ONE 7 (8): e43340 2012年8月17日

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	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 樋口 琢磨

## 論文題目

High expression of nuclear factor 90 (NF90) leads to mitochondrial degradation in skeletal and cardiac muscles

〔骨格筋及び心筋における nuclear factor 90 (NF90) の過剰発現は  
ミトコンドリア変性を引き起こす〕

### (論文要旨)

二本鎖 RNA 結合タンパク質である nuclear factor 90 (NF90) は、in vitro において転写や翻訳の制御、非翻訳性 RNA である microRNA の生合成抑制等の機能を有することが知られている。しかしながら in vivo における NF90 の機能については未だ不明な点が多い。近年、我々や他の研究グループにより様々な組織における腫瘍部で NF90 が高発現していることが見出され、NF90 の高発現と疾患発症の関連が注目されている。そこで我々は、全身で NF90 を過剰に発現させた遺伝子改変マウス(NF90 Tg マウス)を作成し、表現型解析を通して疾患発症と NF90 の過剰発現との関連性を解析した。野生型マウスと比較し、NF90 Tg マウスは骨格筋、心臓、眼等において顕著な NF90 の発現増加が認められた。また、NF90 Tg マウスでは体重減少、骨格筋萎縮、心拍及び血圧の低下という筋組織由来の疾患様表現型を示した。NF90 Tg マウスの筋組織における異常の原因を探るため、骨格筋及び心筋における組織学的・生化学的解析を行った。その結果、NF90 Tg マウスの筋組織では自食作用(オートファジー)によるミトコンドリアの変性が生じていることを見出した。通常、生体内で劣化したミトコンドリアはオートファジーにより選択的に除去されることが知られている。従って、NF90 Tg マウスの骨格筋及び心筋ではミトコンドリアの品質劣化が起きていると考えられる。ミトコンドリアの品質劣化の原因を明らかにするため、質量分析を用いて NF90 と相互作用する因子の網羅的同定を行った。興味深いことに、同定した NF90 の相互作用因子の半数がリボソーム構成因子であった。加えてマウスの骨格筋より単離した初代培養細胞のタンパク質合成能を解析した結果、NF90 Tg マウスの骨格筋由来の初代培養細胞では野生型マウスと比較し有意にタンパク質合成能が低下していることが明らかとなった。これらの結果は、NF90 がリボソーム構成因子と相互作用することでリボソームの機能を抑制することを示唆している。さらに我々は、野生型マウスと比較し NF90 Tg マウスの骨格筋において核由来のミトコンドリア生合成マスター制御因子である PGC-1 及び NRF-1 の発現が翻訳レベルで低下していることを見出した。以上の結果より、NF90 Tg マウスにおける骨格筋萎縮及び心機能低下の発症は、過剰発現した NF90 がリボソーム構成因子と相互作用することで PGC-1、NRF-1 の翻訳を抑制しミトコンドリアを変性させることに深く関連しているものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	樋口 琢磨
審査委員	主査氏名	梶 秀人 印
	副査氏名	麻生 悌二郎 印
	副査氏名	寺田 典生 印

題目 High expression of nuclear factor 90 (NF90) leads to mitochondrial degradation in skeletal and cardiac muscles

(骨格筋及び心筋における nuclear factor 90 (NF90) の過剰発現はミトコンドリア変性を引き起こす)

著者 Takuma Higuchi, Shuji Sakamoto, Yoshihiko Kakinuma, Shoko Kai, Ken-ichi Yagyū, Hiroshi Todaka, Eunsup Chi, Shoshiro Okada, Takako Ujihara, Keiko Morisawa, Masafumi Ono, Yasunori Sugiyama, Waka Ishida, Atsuki Fukushima, Masayuki Tsuda, Yasutoshi Agata, Taketoshi Taniguchi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

PLoS ONE 7 (8): e43340

2012年8月17日

### 要旨

真核細胞や原核細胞、ウイルスのタンパク質が二本鎖 RNA に特異的に結合し、細胞のシグナル伝達経路や遺伝子発現を制御することが知られている。これらの二本鎖 RNA 結合タンパク質 (double-stranded RNA binding proteins: DRBPs) は、その構造上に二本鎖 RNA 結合ドメインを有し、二本鎖核酸に結合することで、結合した核酸が関与する細胞内イベントを制御し、老化やがん化といった様々な生命現象に影響を及ぼす。

DRBPs のひとつである Nuclear Factor 90 (NF90) は、その構造上に 2 つの二本鎖 RNA 結合ドメインを有し、主に核に局在する。申請者が所属する研究グループはすでに、NF90 と結合パートナーである NF45 との複合体 (NF90-NF45) が microRNA の前駆体に結合し、そのプロセッシングを抑制することで microRNA の生合成を負に制御することを明らかにしている。microRNA は翻訳抑制能を有する機能性 RNA であり、腫瘍化や分化といった多様な生命現象に関与していることが知られている。興味深いことに、様々なタイプのがん組織で多数の microRNA が低下しており、それらの microRNA はがん抑制因子として機能していると考えら

れている。microRNA とは逆に、NF90 はがん部で発現が高く、NF90 の高発現と疾患発症との関連が注目されている。そこで申請者らは、NF90 を過剰発現させた遺伝子改変マウス (NF90 Tg マウス) を作出し、表現型解析を通して疾患発症と NF90 過剰発現との関連性を検討した。

具体的には、NF90 Tg マウスと野生型マウスにおいて、1) RT-PCR、immunoblot 法、免疫組織化学的手法による NF90 の発現解析、2) 体成長率の測定、3) X線 CT による骨格筋体積の測定、4) 心拍数と血圧の測定、RT-PCR による心不全マーカー脳性ナトリウム利尿ペプチドの発現解析、5) 骨格筋と心筋の HE 染色による組織学的検査、電顕による解析、6) immunoblot 法によるオートファゴソームマーカー LC3 やアポトーシスマーカー cleaved caspase-3 と cleaved caspase-6 の発現解析、7) 骨格筋由来の初代培養細胞における [<sup>3</sup>H]-メチオニンのタンパク質への取り込みによるタンパク質合成速度の測定、8) immunoblot 法及び定量 RT-PCR によるミトコンドリア生合成に重要な役割を果たしている転写因子 PGC-1、NRF-1 の発現解析などを行った。また、9) NF90 と相互作用するタンパク質の解析では、HEK293 細胞に FLAG タグを付加した、ネオマイシン耐性遺伝子を有する pcDNA3-Flag-NF90b 発現ベクターを導入し、ネオマイシンで NF90 安定発現株を選択した。得られた細胞の核抽出液中の NF90 に結合したタンパク質を抗 FLAG 抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGE で分離し、さらに質量分析によるタンパク質の同定を行った。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) NF90 Tg マウスは、骨格筋、心臓、眼に NF90 の著明な発現増加を示した。
- 2) NF90 Tg マウスは、体重減少、骨格筋萎縮、心拍数と血圧の低下という筋組織由来の疾患様表現型を示した。
- 3) オートファジーが誘起されると、LC3-I が LC3-II に転換されることが知られている。野生型マウスに比べ NF90 Tg マウスは、骨格筋に LC3A/B-II の著明な発現増大を示す一方、アポトーシスの所見を示さなかったことから、NF90 Tg マウスの筋組織ではオートファジーによるミトコンドリアの除去が起こっていることが判明した。
- 4) ミトコンドリア除去の原因を明らかにするために、NF90 と相互作用するタンパク質を解析したところ、半数がリボソーム構成因子であった。
- 5) 野生型マウスに比べ NF90 Tg マウスの骨格筋由来の初代培養細胞ではタンパク質合成能が有意に低下していたことから、NF90 がリボソーム構成因子と相互作用することでリボソームの機能を抑制することが示唆された。
- 6) 野生型マウスに比べ NF90 Tg マウスの骨格筋において PGC-1 及び NRF-1 の発現が翻訳レベルで低下していた。

以上の成績は、NF90 Tg マウスにおける NF90 の過剰発現がりボソーム構成因子と相互作用することで PGC-1、NRF-1 の翻訳を抑制し、ミトコンドリアを変性させることを示唆している。

以上のように、本論文は二本鎖 RNA 結合タンパク質である NF90 の機能解明のみならず、NF90 過剰発現と筋疾患発症との関連性を示したことで今後様々な疾患の予防と治療の向上にも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)	青山 信隆 (奈良県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第29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27年3月23日
学位論文題目	Therapeutic response to a new enzyme-targeting radiosensitization treatment (KORTUC-SC) for patients with chemotherapy-resistant supraclavicular lymph node metastasis (化学療法に抵抗性の鎖骨上窩リンパ節転移を有する患者達を対象とした新しい酵素標的増感剤併用下での放射線治療成績について)
発表誌名	Journal of Cancer research & therapy, 2013, 1(9):215-219 2013年10月16日

審査委員	主査	教授	花崎	和弘
	副査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	前田	長正

## 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 青山 信隆

## 論文題目

(論文要旨)

Therapeutic response to a new enzyme-targeting radiosensitization treatment (KORTUC-SC) for patients with chemotherapy-resistant supraclavicular lymph node metastasis (化学療法に抵抗性の鎖骨上窩リンパ節転移を有する患者達を対象とした新しい酵素標的増感剤併用下での放射線治療成績について)

診断技術の進歩により、原発性腫瘍やその転移巣の早期発見が可能となっている。そのような腫瘍に対しては、放射線治療などによる局所的治療が行えることが多く、患者を寛解に導けることも多い。我が国では放射線治療には、X線や電子線が用いられている。しかしX線や電子線は低LET放射線であり、低酸素状態にあたり多量の抗酸化酵素を有する悪性腫瘍に対しては比較的弱い抗腫瘍効果しか示せない。そのような悪性腫瘍の例として、①悪性黒色腫、②種々の肉腫、③多形膠芽腫、④長径が数cmを超える悪性腫瘍などがある。悪性腫瘍内の酸素濃度を高め、放射線治療を増感することを目的として多くの薬剤が開発されてきた。しかし著明な放射線増感効果は確認されていないのが現状である。有効な抗腫瘍効果を上げるには、低酸素状態にある悪性腫瘍を高酸素状態にすると同時に、悪性腫瘍が大量に有する抗酸化酵素を不活化することが必要である。そのようなことが可能な物質として、過酸化水素が存在する。しかし過酸化水素を悪性腫瘍に局注すると、短時間で分解されてしまうと同時に、皮膚炎や粘膜炎などの強い副作用が起こり、単剤での使用は困難であった。我々は過酸化水素の分解を遅延させ、同時に皮膚や粘膜への刺激を緩和できる物質としてヒアルロン酸を発見した。ヒアルロン酸との同時使用により過酸化水素は安全に局所に注射できるようになり、腫瘍内でも48時間以上にわたり安定して放射線の増感効果を示せるようになった。以上のような経緯で我々は過酸化水素とヒアルロン酸からなる新しい増感剤「KORTUC II」を開発した。KORTUC IIの主成分は1%のヒアルロン酸2.5mlと3%の過酸化水素0.5mlである。




本研究は、化学療法に抵抗性の鎖骨上窩リンパ節転移を有する患者達に対して本増感剤「KORTUC II」の有効性と安全性を示すことである。2006年9月～2010年3月にかけて本研究は施行された。十分なインフォームドコンセントを得た上で、12人の鎖骨上窩リンパ節転移を有する患者達を被験者とした。患者の年齢は58～77歳であった。放射線治療のレジメンは4Gy/回、3回/週、4週間の合計12回、48Gyであった。増感剤3～6mlの注射

は、5回目の放射線治療後より週2回のペースで行った。患者達には、治療前と治療後3～8ヶ月でPET-CTの撮影を行い、治療効果判定を行った。本治療は大きな副作用を見ることなく完遂できた。12人の患者の内、4人がCR(complete response)、5人がPR(partial response)、2人がSD(stable disease)、1人がPD(progressive disease)であった。治療効果は満足のものであり、治療に伴う副作用も治療部位の発赤や注射時の疼痛など軽微なものであった。1年生存率は83%、2年生存率は75%であった。

本増感剤は安全で、しかも極めて安価であり放射線治療に抵抗性を示す多くの悪性腫瘍に対して有効であると考えられる。本増感剤の使用に当たっては、血管内への直接的な注入は避けることと、エコー又はCTガイド下で腫瘍内で酸素が発生することを確認することが必要である。

本研究は被験者が少数な上、経過観察期間も十分ではなく、また二重盲検試験でもないため厳密な有効性の判定は困難である。本研究で使用した増感剤の有効性を正しく評価するには今後大規模な二重盲検試験が必要である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	青山 信隆
審査委員	主査氏名	花崎 和弘 
	副査氏名	宇高 恵子 
	副査氏名	前田 長正 

題目 Therapeutic response to a new enzyme-targeting radiosensitization treatment (KORTUC-SC) for patients with chemotherapy-resistant supraclavicular lymph node metastasis  
(化学療法に抵抗性の鎖骨上窩リンパ節転移を有する患者達を対象とした新しい酵素標的増感剤併用下での放射線治療成績について)

著者 Aoyama N, Ogawa Y, Kubota K, Ohgi K, Kataoka Y, Miyatake K, Tadokoro M, Yamanishi T, Ohnishi T, Hamada N, Kariya S, Tamura T, Nogami M, Nishioka A, Onogawa M and Miyahara M

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Journal of Cancer research & therapy、2013、1(9):215-219  
2013年10月16日

### 要旨

#### 【背景・目的】

診断技術の進歩に伴い、原発性腫瘍やその転移巣の早期発見が可能となり、放射線治療の果たす役割は益々大きくなってきている。我が国の放射線治療はX線や電子線が用いられることが多い。しかしX線や電子線は悪性黒色腫、肉腫、多形膠芽腫、腫瘍径の大きな癌腫に代表される様な低酸素状態かつ多量の抗酸化酵素を有する悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果が低い弱点を有している。申請者らはこうした問題点を克服する目的で、低酸素状態にある悪性腫瘍を高酸素状態にすると同時に、悪性腫瘍が大量に有する抗酸化酵素を不活化する治療法として1%のヒアルロン酸 2.5ml、3%の過酸化水素 0.5ml および1%キシロカイン 1ml から構成された新しい増感剤を用いた治療法 KORTUC II を開発した。過酸化水素はヒアルロン酸との同時使用によって安全に局所注射できるようになり、腫瘍内でも 48 時間以上にわたり安定して放射線の増感効果を示せるようになった。本研究の目的は、化学療法に抵抗性を示す各種癌腫からの鎖骨上窩リンパ節転移に対する KORTUC II (KORTUC-SC) の有効性と安全性について検証することである。



### 【方法】

2006年9月から2010年3月にかけて本研究は施行された。十分なインフォームドコンセントを得た後に、化学療法に抵抗性を示す12名の鎖骨上窩リンパ節転移患者(乳癌6名、膵癌、肝細胞癌、甲状腺癌、子宮癌、下咽頭癌、原発巣不明癌は各1名ずつ)を被験者とした。患者の年齢は58歳から77歳であった。放射線治療のレジメンは4Gy/回、3回/週、4週間の合計12回で行い、放射線総量は48Gyであった。5回目の放射線治療後からKORTUC-SCの増感剤3mlから6mlの注射投与を週2回のペースで行った。治療効果判定はPET-CT検査を用いて評価され、治療前と治療3ヶ月後から8ヶ月後の最大腫瘍径の比較検討にて行われた。

### 【結果】

治療中断となるような大きな副作用はなく、全例に治療を完遂することができた。その結果、12名の被験者のうち、4名(33%)がCR (complete response)、5名(42%)がPR (partial response)、2名(17%)がSD (stable disease)、1名(8%)がPD (progressive disease)であった。奏効率(CR+PR)は75%であり、従来の放射線化学療法が施行された報告と比べても、治療効果は概ね良好であった。また治療に伴う副作用も治療部位の発赤や注射時の疼痛など軽微な放射性皮膚炎のみであった。1年生存率83%、2年生存率75%と良好であった。

### 【結論】

高知大学で開発されたKORTUC-SCは化学療法に抵抗性を示す鎖骨上窩リンパ節転移症例に対して安全かつ有効であることが示唆された。また他の治療法に比べて安価である点も魅力的である。本増感剤の使用に当たっての注意点は、①血管内への直接注入により全身に増感剤が拡散することを避ける、②正確なエコーまたはCTガイド下穿刺を行い、腫瘍内に酸素が発生することを確認することである。本研究は症例数が少なく、観察期間が短だけでなく、二重盲検試験でもないため、今後大規模な二重盲検の前向き比較試験を行う必要がある。

氏名(本籍)	石田 わか (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第30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27年3月23日
学位論文題目	Inhibition of very late antigen-4 and leukocyte function-associated antigen-1 in experimental autoimmune uveoretinitis (very late antigen-4とleukocyte function-associated antigen-1による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制効果)
発表誌名	Clinical Immunology, 153 (1) : 136~144 2014年4月27日

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	佐野	栄紀
	副査	教授	山本	哲也

## 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 石田 わか

## 論文題目

Inhibition of very late antigen-4 and leukocyte function-associated antigen-1 in experimental autoimmune uveoretinitis.

(very late antigen-4 と leukocyte function-associated antigen-1 による実験的  
自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制効果)

(論文要旨)

### 【目的】

ぶどう膜炎とは、血管とメラニンに富む虹彩・毛様体・脈絡膜からなる組織「ぶどう膜」に炎症が生じ、隣接する組織の網膜にも炎症が波及する疾患である。網膜などに炎症が及び組織障害が生じると、恒久的な視力低下をきたす可能性のある重篤な疾患である。ぶどう膜炎の原因は内因性と外因性に大別される。外因性ぶどう膜炎は、細菌・ウイルス・寄生虫など病原微生物の感染によって生じ、その治療は原因病原体に対する抗微生物薬によりなされる。一方、サルコイドーシスやベーチェット病などの内因性ぶどう膜炎の原因は未だ解明されておらず、治療法も副腎皮質ステロイド薬による対症療法によって行われることが多い。内因性ぶどう膜炎の発症メカニズムを解明するために、動物モデルを用いた実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)が確立され、EAUを用いた研究から、内因性ぶどう膜炎の発症には自己反応性 T 細胞が関与することが明らかとなった。最近の研究成果から、interferon (IFN)- $\gamma$ を産生する T-helper 1 cell (Th1 細胞)と interleukin (IL)-17 を産生する Th17 細胞が、ぶどう膜炎の発症に必須であることが証明された。

接着分子である very late antigen-4 (VLA-4)および leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)は、白血球が血管外に浸潤する際に重要な役割を果たす。EAU の発症においても、活性化された抗原特異的 T 細胞が網膜に浸潤するために細胞表面の接着分子が関与していると考えられる。したがって接着分子を標的とする治療法は、内因性ぶどう膜炎にも効果があることが推察される。そこで本研究では、EAU の発症における VLA-4 および LFA-1 の関与を検討した。

### 【方法】

B10. RIII マウスに、ヒト光受容体間レチノイド結合蛋白 (human interphotoreceptor retinoid binding protein, hIRBP)ペプチド 161-180 を完全フロイントアジュバントに懸濁し皮下注射した後、百日咳毒素を腹腔内投与し EAU を発症させた。抗 VLA-4 抗体、抗 LFA-1 抗体、あるいは抗 VLA-4/LFA-1 抗体 (両抗体の併用投与)を、EAU 発症 5 日後より隔日、合計 5 回腹腔内投与した。対照として正常ラット IgG を投与した。免疫後 14 日目と 28 日目に眼球、脾臓を採取した。眼球は EAU 組織スコアの評価および眼内サイトカインの定量的 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)解析を行い、脾細胞は抗原再刺激によるサイトカイン産生量の測定、およびフローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン発現を評価した。

### 【結果】

EAU 発症 14 日後の平均組織スコアにおいて、対照群と比較して、抗 VLA-4 抗体投与群では EAU の発症は有意に抑制されなかったが、抗 LFA-1 抗体投与群および併用投与群で EAU の発症が有意に抑制された。眼内のサイトカイン mRNA 発現は、対照群と比較して抗 LFA-1 抗体投与群で IL-17F が有意に抑制され、併用投与群で IFN- $\gamma$ 、IL-17A、IL-17F と transforming growth factor (TGF)- $\beta$  が有意に抑制された。一方、抗原再刺激による脾細胞のサイトカイン産生評価においては、対照群と比較して併用投与群で IL-2、IL-4、IL-10、IL-13 と IFN- $\gamma$  が有意に増加し、細胞内サイトカイン解析では CD4 陽性 T 細胞における IFN- $\gamma$  と IL-17A が有意に増加した。

しかしながら、併用投与を中止し 14 日経過した免疫後 28 日目の EAU 平均組織スコア、眼内のサイトカイン mRNA 発現、抗原再刺激による脾細胞のサイトカイン産生量および細胞内サイトカイン発現のいずれの評価項目においても、対照群と併用投与群との間に有意差は認められなかった。




### 【考察】

IL-17 産生 Th17 細胞は EAU 発症の引き金となる細胞であり、IL-17A および IL-17F は EAU 発症早期に眼内で増加する。免疫 14 日後の脾細胞の細胞内サイトカイン解析の結果、併用投与群における CD4 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  と IL-17A は、対照群と比較して有意に発現が高かった。この結果から、抗体の併用投与により、抗原特異的 Th1 細胞と Th17 細胞の両者が脾臓から炎症の場である網膜への遊走が抑制されていると考えられた。この仮説は、抗体の併用投与を中止した 14 日後に、抑制されていた網膜の炎症が発症したことによっても確認された。本研究においては、抗 LFA-1 抗体投与および併用投与により EAU の発症が抑制されたことから、抗体による LFA-1 の障害が LFA-1 を介する Th17 細胞の網膜への浸潤を阻害し、EAU の発症を抑制した可能性が考えられた。

### 【結語】

接着分子である VLA-4 と LFA-1 は EAU 発症に重要な役割を果たす。VLA-4 や LFA-1 分子に特異的な中和抗体の投与は、ぶどう膜炎患者の治療に効果がある可能性が考えられた。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

	氏 名	石田 わか
審 査 委 員	主 査 氏 名	宇高 恵子 
	副 査 氏 名	佐野 栄紀 
	副 査 氏 名	山本 哲也 

**題 目** Inhibition of very late antigen-4 and leukocyte function-associated antigen-1in experimental autoimmune uveoretinitis  
 (very late antigen-4と leukocyte function-associated antigen-1による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制効果)

**著 者** Waka Ishida, Yosuke Harada, Ken Fukuda, Osamu Taguchi, Hideo Yagita, Atsuki Fukushima

**発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月**  
 Clinical Immunology, 153 (1) : 136~144  
 2014年4月27日

**要 旨**

石田わかさんの学位審査は、平成27年2月16日17時より約1時間にわたり行った。まず、公開で研究内容の発表を行った。

**【背景と目的】**

病原微生物の感染によらない内因性ブドウ膜炎については、病因や治療法が確立していない。近年の報告から、Th1、Th17細胞がブドウ膜炎の発症に必須であることがわかっている。そこで、網膜抗原を標的抗原とした実験的ブドウ膜炎の実験系で、それぞれのT細胞サブセットの抗原認識に関わるインテグリン分子であるLFA-1、VLA-4に対するブロッキング抗体を用い、病態生理の解明と治療法の開発に向けた研究を行った。

**【方法】**

実験的ブドウ膜炎の起因抗原のひとつであるIRBPペプチドをフロイントコンプリート

アジュバント (FCA) に懸濁して B10.RIII マウスを免疫し、同時に百日咳毒素 (PTX) を腹腔内注射して反応性 T 細胞の中樞神経系への浸潤を促すモデル実験系を使って、T 細胞の抗原認識に関わるインテグリンの関与を調べた。

#### 【結果】

IRBP ペプチドを免疫したマウスでは、網膜色素細胞層の外側にある脈絡叢や、眼内の網膜神経細胞層に、顕著なリンパ球浸潤がみられた。また、それら浸潤箇所には、T 細胞の接着分子である、VLA-4 や LFA-1、および、それらのリガンドである VCAM-1、ICAM-1 の高発現がみられた。そこで、それらインテグリンの会合を阻害するブロッキング抗体を投与すると、

1. 抗 LFA-1 抗体投与群および、抗 LFA-1 抗体と抗 VLA-4 抗体の併用群において、組織学的にブドウ膜炎の発症が抑えられた。
2. 眼内のサイトカイン産生は、抗 LFA-1 抗体投与群で IL-17F の産生が低下し、併用群では、さらに IFN- $\gamma$ 、IL-17A、TGF- $\beta$  の産生も有意に抑制された。
3. 一方、抗原再刺激後の脾細胞のサイトカイン産生は、併用投与群で、対照群に比べ、IL-1、IL-4、IL-10、IL13 と IFN- $\gamma$  の産生が有意に増加していた。
4. 免疫開始後 5 日目から 13 日目まで 1 日おきに腹腔注射していた抗体療法を中止後、14 日目に調べると、抗体の抗炎症効果が消失していた。

#### 【考察】

以上の結果から、自己反応性 T 細胞のブドウ膜への浸潤を抗 LFA-1、抗 VLA-4 抗体製剤による制御の可能性が示唆された。一方、抗体療法の間も全身的には自己反応性 T 細胞が存続し、抗体製剤の中止とともに再燃が予期されることも明らかとなった。

#### 【審査報告】

審査員からは、図に示される経時的なサイトカインの絶対量の違いから、眼球へのリンパ球の浸潤数が抗体投与群と対照群では大きく異なる可能性が示唆されることから、データの提示方法や結果の解釈について、議論があった。また、眼病変を起こす他の自己免疫である Behçet 病や Vogt-小柳-原田氏病における眼病変との違いについてもディスカッションがあった。

総じて、臨床応用を視野においた研究で、ブドウ膜炎の治療法開発のために意義ある成果が得られている。学位論文に加え、石田氏は 13 報の参考文献の研究にも関与し、優れた研究能力を有する。以上をふまえ、審査員一同、申請者の研究は、高知大学博士 (医学) の学位を授与するにふさわしい内容であると判断した。

氏名(本籍)	危士虎 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第31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27年3月23日
学位論文題目	Terrestrosin D, a steroidal saponin from <i>Tribulus terrestris</i> L., inhibits the growth and angiogenesis of human prostate cancer <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (前立腺癌に対するシツリシ由来テリストロシン Dの抗腫瘍効果及び血管新生阻害作用の検討)
発表誌名	Pathobiology; 81(3): 123-132. 2014年3月

審査委員	主査	教授	齊藤	源頭
	副査	教授	花崎	和弘
	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 危士虎

## 論文題目

Terrestrosin D, a steroidal saponin from *Tribulus terrestris* L., inhibits the growth and angiogenesis of human prostate cancer *in vitro* and *in vivo* (前立腺癌に対するシツリシ由来テリストロシン D の抗腫瘍効果及び血管新生阻害作用の検討)

### (論文要旨) (目的)

前立腺癌は泌尿器科癌において罹患率及び死亡率の高い癌種である。アンドロゲン遮断法は前立腺癌に対して有効な治療であるが、一定の奏功期間後は転移を来すホルモン抵抗性前立腺癌となることが問題である。このホルモン抵抗性前立腺癌に対して、アンドロゲン合成を標的とした新規分子標的薬が出現している。これらの新規薬剤もまた治療効果は限定的で、一定の治療奏功後は進行を来す。このようにホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規分子標的及び新規治療法の開発は急務である。長年にわたり、天然物質より抽出された化合物は、様々な病気の治療に貢献してきた。特に、中国における漢方薬は長い歴史を有している。シツリシは漢方薬の一種であるが、利尿、降圧及び鎮静効果を有している。化学成分研究によって、様々な生理活性を有しているステロイドサポニンシツリシの主な成分である。これまでの研究でステロイドサポニンにおける抗腫瘍効果を確認してきた。今回はホルモン抵抗性前立腺癌に対するシツリシ由来テリストロシン D (TED) の抗腫瘍効果及び血管新生阻害効果についての解析を行う。

### (方法)

主に前立腺癌細胞株 PC-3 細胞及びヒト血管内皮細胞株 HUVEC 細胞を用いて実験を行った。まず MTT アッセイを用いて細胞増殖を測定し、続いて flow cytometry を用いて TED により誘導される細胞周期及び細胞死を測定した。細胞死に関わる因子として、caspase-3 活性・ミトコンドリア膜電位などの測定を行い、誘導される細胞死の経路の同定・解析を行った。引き続き ELISA を用いて TED により誘導される VEGF 分泌の測定を行った。これらの結果をもとにして、マウスの担癌モデルを用いて TED の治療実験を行い、治療後組織(腫瘍)における不可逆変性部位の割合を 2 次元体積で評価するとともに、anti-single



stranded DNA(ssDNA)及び CD31 抗体を用いた免疫染色法による組織学的評価を行い、その抗腫瘍効果及抗血管新生阻害効果を解析した。




(結果)

TED は濃度依存的に前立腺癌細胞株の増殖を抑制する事が確認できた。さらに増殖抑制メカニズムの解析では、TED は PC-3 細胞の G1 期停止やアポトーシス発生を誘導した。続いて血管新生阻害効果の検討として、TED は HUVEC 細胞の S 期停止やアポトーシスの発生を誘導し、濃度依存的に血管内皮細胞の増殖を抑制する事を確認した。さらに、TED により誘導される細胞死はミトコンドリア膜電位の低下を認めたが、カスパーゼ非依存的なアポトーシスである事が判明した。引き続きヌードマウスを用いた動物実験においては、TED による腫瘍縮小効果を認めた。アポトーシス (ssDNA 染色) や血管新生のマーカー (CD31 染色) による腫瘍組織の病理学的な検討では、TED は腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し、血管新生を抑制する事が判明した。

(結論)

本研究により TED 治療は、前立腺癌に対する新規治療法となる可能性が示された。この TED は作用機序から現在のホルモン療法と違って、性機能を温存できる可能性がある。特に比較的若い性機能温存に希望のある前立腺癌患者に対しては福音となる可能性があり、さらなる詳細な検討が必要であると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	危士虎
審査委員	主査氏名	齊藤 源顕 
	副査氏名	花崎 和弘 
	副査氏名	宮村 充彦 

**題 目** Terrestrosin D, a steroidal saponin from *Tribulus terrestris* L., inhibits the growth and angiogenesis of human prostate cancer in vitro and in vivo  
 (前立腺癌に対するシツリシ由来テリストロシン Dの抗腫瘍効果及び血管新生阻害作用の検討)

**著 者** Shihu Wei, Hideo Fukuhara, Guang Chen, Chiaki Kawada, Atsushi Kurabayashi, Mutsuo Furihata, Keiji Inoue and Taro Shuin

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Pathobiology; 81(3): 123-132.  
 2014年3月

**要 旨**  
 (目的)

前立腺癌は泌尿器科癌において罹患率及び死亡率の高い癌種である。アンドロゲン遮断法は前立腺癌に対して有効な治療であるが、一定の奏功期間後は転移を来すホルモン抵抗性前立腺癌となることが問題である。このホルモン抵抗性前立腺癌に対して、アンドロゲン合成を標的とした新規分子標的薬が出現している。これらの新規薬剤もまた治療効果は限定的で、一定の治療奏功後は進行を来す。このようにホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規分子標的及び新規治療法の開発は急務である。長年にわたり、天然物質より抽出された化合物は、様々な病気の治療に貢献してきた。特に、中国における漢方薬は長い歴史を有している。シツリシは漢方薬の構成生薬の一つであるが、利尿、降圧及び鎮静効果を有している。シツリシは、様々な生理活性を有し、その成分研究によってシツリシは、主成分としてステロイドサポニンを含有する。これまで

の研究でステロイドサポニンにおける抗腫瘍効果を確認してきた。今回はホルモン抵抗性前立腺癌に対するシツリシ由来テリストロシン D (TED) の抗腫瘍効果及血管新生阻害効果についての解析を行う。

#### (方法)

主に前立腺癌細胞株 PC-3 細胞及びヒト血管内皮細胞株 HUVEC 細胞を用いて実験を行った。まず MTT アッセイを用いて細胞増殖を測定し、続いて flow cytometry を用いて TED により誘導される細胞周期及び細胞死を測定した。細胞死に関わる因子として、caspase-3 活性・ミトコンドリア膜電位などの測定を行い、誘導される細胞死の経路の同定・解析を行った。引き続き ELISA を用いて TED により誘導される VEGF 分泌の測定を行った。これらの結果をもとにして、マウスの担癌モデルを用いて TED の治療実験を行い、治療後組織(腫瘍)における不可逆変性部位の割合を 2 次元体積で評価するとともに、anti-single stranded DNA(ssDNA)及び CD31 抗体を用いた免疫染色法による組織学的評価を行い、その抗腫瘍効果及抗血管新生阻害効果を解析した。

#### (結果)

TED は濃度依存的に前立腺癌細胞株の増殖を抑制する事が確認できた。さらに増殖抑制メカニズムの解析では、TED は PC-3 細胞の G1 期停止やアポトーシス発生を誘導した。続いて血管新生阻害効果の検討として、TED は HUVEC 細胞の S 期停止やアポトーシスの発生を誘導し、濃度依存的に血管内皮細胞の増殖を抑制する事を確認した。さらに、TED により誘導される細胞死はミトコンドリア膜電位の低下を認めたが、カスパーゼ非依存的なアポトーシスである事が判明した。引き続きヌードマウスを用いた動物実験においては、TED による腫瘍縮小効果を認めた。アポトーシス(ssDNA 染色)や血管新生のマーカー(CD31 染色)による腫瘍組織の病理学的な検討では、TED は腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し、血管新生を抑制する事が判明した。

#### (結論)

本研究により TED 治療は、前立腺癌に対する新規治療法となる可能性が示された。この TED は作用機序から現在のホルモン療法と違って、性機能を温存できる可能性がある。特に比較的若い性機能温存に希望のある前立腺癌患者に対しては福音となる可能性があり、さらなる詳細な検討が必要であると思われた。

以上のように、本論文はシツリシ由来テリストロシン D が、ホルモン抵抗性前立腺癌の治療薬になる可能性および新薬の開発が期待される。以上を総合的に判断し、審査員一同は申請者の学力および研究遂行能力が高知大学博士(医学)の学位を授与されるに相応するものと判断した。

氏名(本籍)	杉村 夏樹 (埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第32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27年3月23日
学位論文題目	Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia  (関節内繰り返し酸投与は長期持続する広範な痛覚過敏を引き起こす)
発表誌名	European Journal of Pain (Epub ahead of print)

審査委員	主査	教授	由利	和也
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	古谷	博和

## 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

杉村 夏樹

## 論文題目

Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia

(関節内繰り返し酸投与は長期持続する広範な痛覚過敏を引き起こす)

(論文要旨)

### 【目的】

変形性膝関節症や関節リウマチにおける慢性関節痛は時に長期持続し、関連痛や対側に及ぶ痛みを認めることもあり、慢性関節痛の背景に中枢神経系の感作が関与していることが示唆されるが、その機序は不明な点が多い。こうした背景から神経系の変化による慢性関節痛モデルを作成することは、慢性関節痛の機序解明、治療法開発に有用であると考えられる。

関節炎では関節液 pH が低下することが知られている。局所酸性化は酸感受性イオンチャンネル(ASICs)や Transient Receptor Potential Vanilloid 1(TRPV1)などを介して末梢神経を脱分極させる。またヒトや動物実験において酸による痛みが知られており、近年ラット線維筋痛症モデルとして、筋肉へ繰り返し酸投与により局所組織損傷を伴わない長期持続する痛覚過敏モデルが報告されている。しかし関節内酸投与による関節痛の研究はこれまでに認められない。本研究の目的は、酸投与による慢性関節痛モデルを作成し、本モデルの末梢および中枢性感作の機序を明らかにすることである。

### 【方法】

8週齢の雄SDラット(n=14)を使用した。0日目と5日目に酸(pH4.0、100 $\mu$ l)を左膝関節に投与する Acid-acid 群(n=15)、0日目に酸を投与し5日目には生理食塩水(pH7.2、100 $\mu$ l)を投与する Acid-saline 群(n=10)、0日目、5日目に生食を投与する Saline-saline 群(n=10)に分けた。行動学的評価として、0、5日の酸注入前、注入後4時間と、35日まで経時的に Von frey filament(VFF)足底刺激による足引込め反射閾値、Incapacitance Testerによる荷重分布、圧センサー付き撮子による膝圧痛閾値を測定した。酸受容体(ASIC1a、ASIC3、TRPV1)の関与を評価するため、Acid-acid 群に対して選択的酸受容体ブロッカー(PcTx1、APETx2、BCTC、50 $\mu$ l)または Vehicle(生食50 $\mu$ l)を5日目の酸投与前または14日目に左膝関節内に投与した。Acid-acid 群と Saline-saline 群の14日目の膝関節と滑膜を摘出し、膝関節にサフランin-O染色、HE染色を施し組織学的評価を、滑膜は炎症性マーカーIL-1をELISAで定量評価した。IL-1 $\beta$ 定量については、関節炎を惹起するカラゲナン(3mg/100 $\mu$ l)を膝関節内投与し翌日の膝関節滑膜を陽性対象とした。酸による膝関節支配神経の活動を検討するため、伏在神経膝蓋下枝を同定しC繊維のsingle fiber recordingを行った。関節内に APETx2 または Vehicle を先行投与し、続いて pH4.0 の酸を投与し発火頻度を

計測した。中枢性感作の指標として、6、14日目に第3、4腰髄を摘出して痛覚過敏の指標となる脊髄後角における cAMP 経路の下流の転写因子 pCREB を免疫組織化学染色し、単位面積当たりの陽性細胞数を計測した。

#### 【結果】

行動学的評価では、Acid-saline 群は5日目以降で元の値に改善したが、Acid-acid 群は2回目の酸投与から28日目まで持続する両側性の痛覚閾値低下を認めた( $p < 0.01$ )。各ブロッカー投与後、APETx2 を5日目に投与した群のみ Vehicle 投与群と比較し患側の痛覚閾値の上昇を認め( $p < 0.01$ )、7日目で Saline-saline 群と同等になった。他のブロッカーは Vehicle と比較し有意な変化を認めなかった。Acid-acid 群は Saline-saline 群と比較して明らかな軟骨損傷、滑膜炎は認めなかった。IL-1 $\beta$  定量は Acid-acid 群  $0.59 \pm 0.53$  pg/mg (平均 $\pm$ SE) は、Saline-saline 群  $0.0 \pm 0.0$  pg/mg と有意差認めず、陽性対象(カラゲナン)  $31.1 \pm 2.4$  pg/mg より有意に低値であった( $p < 0.01$ )。伏在神経膝蓋下枝の single fiber recording では酸関節注射後4-6分で神経発火頻度は最大に達し、その後約20分で持続した。APETx2 先行投与によりこの酸による神経発火頻度の増加は半減した( $p < 0.01$ )。pCREB は6日目で Acid-acid 群患側  $2135 \pm 161$  /mm<sup>2</sup> (平均 $\pm$ SE)、健側  $2025 \pm 119$  /mm<sup>2</sup>、Saline-Saline 群は患側  $1365 \pm 80$  /mm<sup>2</sup>、健側  $1419 \pm 94$  /mm<sup>2</sup> であり、Acid-acid 群は Saline-saline 群と比較して有意に増加を認めた( $p < 0.01$ )が、左右差は認めなかった。14日目の pCREB は両群間に有意差を認めなかった。

#### 【考察】

繰り返し関節内酸投与により、長期持続する両側性の痛覚過敏を認めた。この痛覚過敏は ASIC3 阻害薬により抑制され、また膝関節支配末梢神経の酸による活動電位も ASIC3 阻害薬により抑制されたことから、本モデルの痛覚過敏惹起に末梢神経 ASIC3 が重要なイオンチャンネルと考えられた。明らかな局所の組織損傷を伴わないにも関わらず、両側性の脊髄後角の pCREB 発現増加を認めた。また pCREB 発現増加は6日目に認め14日目に認められなかった。このことから、本モデルの痛覚過敏惹起に脊髄後角の cAMP 経路を介した中枢性感作が関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	杉村 夏樹
審査委員	主査氏名	由利 和也 印
	副査氏名	梶 秀人 印
	副査氏名	古谷 博和 印

題目 Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia

(関節内繰り返し酸投与は長期持続する広範な痛覚過敏を引き起こす)

著者

Natsuki Sugimura, Masahiko Ikeuchi, Masashi Izumi, Takashi Kawano, Koji Aso, Tomonari Kato, Takahiro Ushida, Masataka Yokoyama, Toshikazu Tani

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

European Journal of Pain (Epub ahead of print)

要旨

一般に疼痛は組織の炎症や変形によって生じる侵害受容性疼痛、中枢神経や末梢神経が損傷されることによって起こる神経障害性疼痛、感情やストレスなどによって起こる心因性疼痛に分類される。変形性膝関節症や関節リウマチにおける慢性関節痛は、関節や軟骨の変性によって生じる侵害受容性疼痛が主たる原因と考えられるが、関連痛や反対側に疼痛を認めることがあり、滑液の pH 低下による神経障害性疼痛が関与していることが示唆されている。今回の研究では実験的に酸を用いて慢性関節痛モデルを作成し、末梢神経系および中枢神経系に及ぼす作用について検討した。

実験では 8 週齢の雄ラットを用い、0 日目(実験開始時)と 5 日目に左膝関節腔に pH4.0 の酸を投与する acid-acid 群、0 日目に酸を投与し 5 日目に pH7.4 の生理

食塩水 (saline) を投与する acid-saline 群、対照として 0 日目および 5 日目に saline を投与する saline-saline 群の 3 群を作成した。その後、経時的に疼痛の行動学的評価を行い、足底刺激による足引っ込め反射閾値、後肢の荷重分布および膝圧痛閾値を測定した。また、酸感受性イオンチャンネル (acid-sensing ion channel: ASIC1a, ASIC3) およびカプサイシン受容体 (Transient receptor potential Vanilloid1: TRPV1) の選択的酸受容体ブロッカーである PcTx1, APETx2, BCTC をそれぞれ 5 日目または 14 日目に左膝関節内に投与し同様に疼痛の程度を評価した。組織学的には acid-acid 群と saline-saline 群の 14 日目の膝関節と滑膜の切片を作成しサフラニン-O 染色等を行い関節炎の程度を評価した。また、滑膜における炎症性マーカー IL-1 $\beta$  を ELISA を用いて定量し評価した。膝に分布する伏在神経を同定し single fiber recording を行い、酸による神経活動の変化を検討した。さらに中枢神経系への影響を検索するため、6 日目および 14 日目に第 3-4 腰髄を摘出し、転写因子 pCREB に対する抗体を用いて免疫組織化学法を施行し、脊髄後角における単位面積当たりの pCREB 免疫陽性細胞数を計測した。

その結果、行動学的評価では、acid-acid 群は saline-saline 群と比べて 6 日目から 28 日目まで持続する有意な痛覚閾値の低下を認めた。この痛覚閾値の低下は酸の投与側だけではなく反対側にも認められた。acid-saline 群では 0 日目から 5 日まで一過性に痛覚閾値の低下を認めたが、saline-saline 群と比べて有意な差は観察されなかった。acid-acid 群に認められた持続する有意な痛覚閾値の低下は選択的酸受容体ブロッカー APETx2 により投与側および反対側とも抑制されたが、他のブロッカーでは疼痛閾値に変化は認められなかった。組織学的には acid-acid 群は saline-saline 群と比べて明らかな軟骨損傷、滑膜炎は存在しなかった。IL-1 $\beta$  の定量では acid-acid 群は、saline-saline 群と有意差を認めなかった。伏在神経の single fiber recording では酸の関節腔投与後 4-8 分で神経発火頻度は最大に達したが、この神経発火は APETx2 投与により抑制された。脊髄後角における pCREB 免疫陽性細胞数は acid-acid 群において酸投与後 24 時間で投与側および反対側とも saline-saline 群と比較して有意に増加を認めた。また、増加の程度は投与側および反対側との間で差は認められなかった。

以上の結果より、長期間持続する両側性の痛覚過敏は酸を繰り返して関節内に投与することにより生じることが明らかとなった。この痛覚過敏は ASIC3 ブロッカーである APETx2 により抑制されたこと、また酸投与による伏在神経の活動電位も APETx2 により抑制されたことから、痛覚過敏の発症に ASIC3 が関与していることが



示唆された。酸投与後に組織学的には損傷を伴わないにも関わらず、両側性に脊髄後角の pCREB 発現増加を認めたことから、酸による痛覚過敏発症に脊髄後角ニューロンにおける cAMP 経路を介したシグナル伝達系が関与している可能性が示唆された。

本論文は、関節腔内に酸を投与して慢性関節痛のモデル動物を作成し、広範囲に及ぶ疼痛発症のメカニズムとして末梢神経系における酸感受性イオンチャンネル ASIC3 および中枢神経系における cAMP シグナル伝達系の関与を示唆した。今後臨床的に慢性疼痛の治療法の開発に発展する可能性があり、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評価した。

氏名(本籍)	田村 貴彦 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第33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27年3月23日
学位論文題目	Oral carbohydrate loading with 18% carbohydrate beverage alleviates insulin resistance  (18%炭水化物含有飲料の経口摂取がインスリン抵抗性を改善する)
発表誌名	Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2013; 22: 48~53. 2012年11月10日

審査委員	主査	教授	藤本	新平
	副査	教授	菅沼	成文
	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 田村 貴彦

## 論文題目

Oral carbohydrate loading with 18% carbohydrate beverage alleviates insulin resistance. (18%炭水化物含有飲料の経口摂取がインスリン抵抗性を改善する)

(論文要旨)

緒言： Enhanced Recovery After Surgery (ERAS)プロトコールは、エビデンスに基づく管理により手術患者の回復を早めることを目的として近年、世界中で実践されている。このプロトコールの1つに、術前の12.6%炭水化物含有飲料の経口摂取があり、絶食と比して術後のインスリン抵抗性を改善すると言われている。しかしながら、日本において、術前炭水化物含有飲料として一般的に使用されている18%炭水化物含有飲料については、インスリン抵抗性の改善効果があるかについて調べられていない。そこで、今回、18%炭水化物含有飲料にもインスリン抵抗性改善効果を有するという仮説を立て、検証することとした。

方法： 本学医学部倫理委員会の承認後に研究を行った。対象は6名の健常ボランティアで、クロスオーバー研究として行った。被験者は炭水化物含有飲料摂取群(A群)と絶食群(B群)の2群の処置を1-4週あけて両群とも受けた。A群は、前日の21時より絶食とし、21時から24時の間に18%炭水化物含有飲料(ArginaidWater™; Nestle, 東京)を375ml、当日の6時30分に250mlを摂取した。一方、B群は、前日の21時より絶食とし、当日6時30分まで水のみ摂取可能とした。当日8時30分に人工膵臓(日機装, 東京)を使用して、高インスリン正常血糖クランプ法を行った。10分間のインスリンのプライミング注入の後に、インスリンを1.25mU/kg/minで持続静注した。ブドウ糖は血糖値が95mg/dlとなるように自動的に注入され、定常状態のブドウ糖の注入率(Glucose Infusion Rate; GIR)をインスリン抵抗性の指標とした。さらに、高インスリン正常血糖クランプ前の血糖値、血中インスリン濃度、血中ケトン体、血中サイトカ



イン (IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) の測定を行った。統計は、対応のある t 検定で行い、 $p < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。

結果： 高インスリン正常血糖クランプ前の血糖値、血中インスリン濃度は、血中サイトカイン濃度に両群間において有意な差はなかった。GIR は、B 群に対して A 群の方が有意差に高かった ( $11.5 \pm 2.4$  vs.  $6.2 \pm 2.2$  mg/kg/min,  $P = 0.005$ )。血中ケトン体は、A 群で有意差に低くかった ( $22 \pm 4$  vs.  $124 \pm 119$   $\mu$ mol/l,  $P = 0.04$ )。

考察： 本研究では、ERAS で推奨している 12.6%炭水化物飲料と同様に、健常被験者において、18%炭水化物含有飲料を経口摂取することで、絶食と比してインスリン抵抗性が改善することが明らかになった。周術期のインスリン抵抗性とは手術侵襲や周術期絶食に対する生体の代謝性反応であり、インスリン抵抗性悪化の度合いは、手術侵襲の大きさに比例すると言われる。インスリン抵抗性の悪化による高血糖は、術後死亡率を上昇させる可能性があり、周術期合併症を軽減するために、術前の経口炭水化物摂取は非常に有用であるとされる。また絶食群で、飢餓状態を示す血中ケトン体が有意に高かったことより、18%炭水化物含有飲料の経口摂取は、術前の飢餓状態も改善することが分かった。サイトカインに有意差がなかったことより、術前のインスリン抵抗性の悪化に対するサイトカインの関与は少ないと考えられた。

結論： 本研究では、健常被験者において、18%炭水化物含有飲料を経口摂取することで、インスリン抵抗性が改善し、飢餓状態を抑制することが明らかになった。実際に、18%炭水化物含有飲料の術前摂取が術後のインスリン抵抗性を改善するかについては、さらなる臨床研究が必要であるが、本研究は日本版 ERAS プロトコール作成の際に有用となると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	田村 貴彦
審 査 委 員	主 査 氏 名	藤本 新平 
	副 査 氏 名	菅沼 成文 印
	副 査 氏 名	渡橋 和政 

題 目     Oral carbohydrate loading with 18% carbohydrate beverage alleviates insulin resistance  
            (18%炭水化物含有飲料の経口摂取がインスリン抵抗性を改善する)

著 者     Takahiko Tamura, Tomoaki Yatabe, Hiroyuki Kitagawa, Koichi Yamashita, Kazuhiro Hanazaki, Masataka Yokoyama

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
            Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2013; 22: 48~53.  
            2012年11月10日

### 要 旨

【背景・目的】 Enhanced Recovery After Surgery (ERAS)プロトコールは、患者予後改善を目的とし世界中の病院で用いられるエビデンスに基づいた周術期管理の方法として、近年注目されている。このプロトコールでは術前の経口炭水化物摂取を推奨している。さらにERASプロトコールでは手術の結果生じるインスリン抵抗性の悪化を防ぐことが示されている。インスリン抵抗性は高血糖を生じうる可能性があり、高血糖は炎症性サイトカインの増加や免疫抑制をきたし、術後創感染の重要な危険因子である。従ってインスリン抵抗性の改善は、周術期管理の重要な構成要素となる。ERASプロトコールで推奨されている術前の12.6%の炭水化物含有飲料の経口摂取は、インスリン抵抗性を改善し、臨床的アウトカムの改善と関連していることが示されている。しかし、我が国では12.6%炭水化物含有飲料は入手困難であり、入手可能な18%炭水化物含有飲料についてはインスリン抵抗性改善作用についての研究はない。18%炭水化物含有飲料の摂取がインスリン感受性減少を予防できるかについて検証することが本研究の目的である。

【方法】対象は6名の健常人でクロスオーバー試験を実施した。被験者は炭水化物含有飲料摂取群(A群)と絶食群(B群)の2群の処置を1~4週の間隔で受けた。A群は、前日21時より絶食とし、21時から24時の間に18%炭水化物と2%のアルギニンを含有する飲料(Argina

id Water™; Nestle, 東京) を375ml、当日の6時30分に250mlを摂取した。一方B群は、前日21時より絶食とし、当日6時30分まで水のみ摂取可能とした。当日8時30分に人工膵臓 (日機装、東京) を使用して、高インスリン正常血糖クランプを実施した。定常状態のブドウ糖の注入率(Glucose Infusion Rate; GIR)をインスリン抵抗性の指標とした。この指標においてはインスリン感受性がよい(インスリン抵抗性が少ない)ほど、GIRは大となる。クランプ開始時の血糖値、血中ケトン体値、血中サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )値の測定を行なった。統計解析は、対応のあるt検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計値は平均値 $\pm$ SD値で示した。

【結果・結論】高インスリン正常血糖クランプ開始時の血糖値、血中インスリン値は両群間で有意差はなかった。GIRは、B群に対してA群で有意に高く、(A群:  $11.5 \pm 2.4$  vs. B群:  $6.2 \pm 2.2$  mg/kg/min,  $p=0.005$ )、絶食時のインスリン抵抗性が18%炭水化物含有飲料摂取で改善することが示された。血中ケトン体値は、B群で有意に高く、(A群:  $22 \pm 4$  vs. B群:  $124 \pm 119$   $\mu$ mol/L,  $p=0.04$ )、B群での飢餓反応がA群では抑制されていた。血中サイトカイン値は両群で有意差はなく、絶食時のインスリン抵抗性悪化におけるサイトカインの関与は少ないと考えられた。

本論文で、18%炭水化物含有飲料摂による絶食時のインスリン抵抗性改善作用が明らかとなり、我が国での周術期管理プロトコール作成におけるエビデンス構築に寄与するものと考えられる。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)	熊谷 直子 (富山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第34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27年3月23日
学位論文題目	Simulation Program to Determine Sample Size and Power for a Multiple Logistic Regression Model with Unspecified Covariate Distributions (ロジステック回帰モデルのための検出力推定とサンプルサイズ推定プログラム)
発表誌名	Health, 2014, 6, 2973-2998 2014年12月

<b>審査委員</b>	主査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	古谷	博和
	副査	教授	栗原	幸男

## 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 熊谷 直子

## 論文題目

Simulation Program to Determine Sample Size and Power for a Multiple Logistic Regression Model with Unspecified Covariate Distributions

(ロジスティック回帰モデルのための検出力推定とサンプルサイズ推定プログラム)

### (論文要旨)

ロジスティック回帰モデルは、医学及び疫学的研究などの分野では、予後因子、予測因子を決定するために頻繁に使用されている。しかし、その得られた結果については、同じ仮説に対して、相反する結論を示す論文が存在する。

モデル解析における因子決定は、有意水準によって判定されるが、その解析における結果の頑健性は、サンプルサイズと検出力に大きく依存する。ロジスティック回帰モデルにおけるサンプルサイズと統計的検出力推定との正確な関係を評価するための理論式、基準、およびソフトウェアアプリケーションが、これまでに開発されてきているが、検出力は、同じサンプルサイズでも共変量の分布の形状に応じて異なることが明確である。実際の解析における多くの因子は、連続分布をとる。その分布の形状は、多様である。また、効果の大きさが、アウトカムと共変量との間で比例関係でない場合がある。例えば、J字型の関係などがよく知られている。これらのデータの場合は、これまで開発されてきた手法では、サンプルサイズと検出力の関係を正確に評価することは不可能である。正しい推定結果を得るためには、共変量の分布形状と効果の大きさを慎重に考慮しなければならない。




こうした問題の解決のため、我々は、実際のデータ構造に対応して、サンプルサイズを決定した時に検出力の推定を正確に行うシミュレーションソフトウェアを、モンテカルロ法を活用して構築した。

本ソフトウェアを SAS / STAT / IML 言語を用いて構築し、292 日本人男性の急性アテローム血栓性脳卒中後の 90 日の結果に喫煙の影響に関する研究から得られた実際のデータへシミュレーション回数を 1000 回とし適用した。その結果、喫煙の検出力は、0.686 であった。

構築したソフトウェアは、現実のデータの複雑な構造に対応しうる。分布形状と効果サイズに柔軟に対応可能である。また、修正が必要ではあるが、様々な統計的方法、ベイズ推定などの他のシミュレーションの適用が可能である。今後、ランダム化比較試験のみならず、観察研究、ベイズ推定など複数の場面で実用可能なプログラムである。



## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	熊谷 直子
審 査 委 員	主 査 氏 名	菅沼 成文 
	副 査 氏 名	古谷 博和 
	副 査 氏 名	栗原 幸男 

題 目     Simulation Program to Determine Sample Size and Power for a Multiple Logistic Regression Model with Unspecified Covariate Distributions  
             (ロジステック回帰モデルのための検出力推定とサンプルサイズ推定プログラム)

著 者     Naoko Kumagai, Kohei Akazawa, Hiromi Kataoka, Yutaka Hatakeyama,  
             Yoshiyasu Okuhara

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ),    年 月  
             Health, 2014, 6, 2973-2998, 2014年12月

### 要 旨

#### 【背景】

ロジスティック回帰モデルは、医学及び疫学的研究などの分野では、予後因子、予測因子を決定するために頻繁に使用されている。しかし、その得られた結果については、同じ仮説に対して、相反する結論を示す論文が存在する。モデル解析における因子決定は、有意水準によって判定されるが、その解析における結果の頑健性は、サンプルサイズと検出力に大きく依存する。ロジスティック回帰モデルにおけるサンプルサイズと統計的検出力推定との正確な関係を評価するための理論式、基準、およびソフトウェアアプリケーションが、これまでに開発されているが、検出力は、同じサンプルサイズでも共変量の分布の形状に応じて異なることが明確である。実際の解析における多くの因子は、連続分布をとる。その分布の形状は、多様である。また、効果の大きさが、アウトカムと共変量との間でJ字型の関係などのように比例関係でない場合がある。これらのデータの場合は、これまで開発されてきた手法では、サンプルサイズと検出力の関係を正確に評価することは不可能である。

#### 【方法・結果】

こうした問題の解決のため、申請者らは、実際のデータ構造に対応して、サンプルサイズを決定した時に検出力の推定を正確に行うシミュレーションソフトウェアを、モンテカルロ法を活用して構築した。今回の検討では、共変量の分布形状と効果の大きさを慎重に考慮し、検出力の妥当な推定を行うソフトウェアを開発した。

開発したソフトウェアを SAS / STAT/ IML 言語を用いて構築し、292 日本人男性の急性アテローム血栓性脳卒中後の 90 日の予後に喫煙の影響に関する研究から得られた実際のデータに適用し、モンテカルロ法を用いたシミュレーション回数を 1000 回として検討をおこなった。その結果、喫煙の予後に対する関連についての検出力は 0.686 となったが、これまでの研究でもあまり高くなかったので妥当な値が推定された。

#### 【考察】

今回申請者らが構築したソフトウェアは、現実のデータの複雑な構造、分布形状と効果サイズに柔軟

に対応可能である。また、修正を行うことにより、様々な統計的方法、ベイズ推定などの他のシミュレーションの適用が可能である。今後、ランダム化比較試験のみならず、観察研究、ベイズ推定など複数の場面で実用可能なプログラムであり、実際の研究結果の頑強性の指標として妥当な検出力を推定することの出来るものとして活用が期待され、よって本論文は、高知大学医学(博士)に値すると判断した。

氏名(本籍)	田中 加緒里 (山口県) (旧姓:西窪)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第30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27年2月9日
学位論文題目	Quantitative evaluation of age-related alteration of swallowing function: videofluoroscopic and manometric studies  (嚥下機能の加齢変化: 嚥下造影検査と嚥下圧検査による定量的解析)
発表誌名	Auris Nasus Larynx. Available online 6 September 2014

審査委員	主査	教授	梶	秀人
	副査	教授	西原	利治
	副査	教授	古谷	博和

## 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 西窪 加緒里

論文題目 Quantitative evaluation of age-related alteration of swallowing function: videofluoroscopic and manometric studies.

嚥下機能の加齢変化：嚥下造影検査と嚥下圧検査による定量的解析

(論文要旨)

【目的】日本は超高齢社会を迎え、高齢者の嚥下障害は医療的にも社会的にも問題になっており、加齢による嚥下機能変化を把握し、予防や治療に取り組む事が急務となっている。高齢者の嚥下障害は、脳血管障害などの原疾患、呼吸障害、身体機能、内服薬の副作用など様々な要因が重なり合って発症することが多い。そのため、その病態は非常に複雑になっており、加齢そのものによる嚥下機能変化様式は明らかになっていないのが現状である。今回、健常高齢者の嚥下機能を、嚥下造影検査、嚥下圧検査により多角的かつ客観的に評価することで、加齢に伴う嚥下機能の障害様式を明らかにすることを目的として臨床研究を行った。

【対象・方法】対象は、脳血管障害等の嚥下障害を来しうる疾患の既往や嚥下障害の自覚症状のない健常ボランティア 71 例。内訳は若年群 8 例、60 歳代群 39 例、70 歳以上群 24 例とした。嚥下造影検査では、立位側面像にて硫酸バリウム 10cc を口腔保持後に指示嚥下させ、舌骨・甲状軟骨移動距離、喉頭挙上遅延時間：LEDT（造影剤が下咽頭梨状陥凹に達してから最大喉頭挙上位に達するまでの時間）、咽頭通過時間：PTT（造影剤の先端が下咽頭梨状陥凹に達してから後端が通過するまでの時間）、喉頭挙上度：%LE（造影剤が下咽頭梨状陥凹に達したときの最大喉頭挙上に対する喉頭の挙上度）を測定した。嚥下圧検査では、経鼻的に圧トランスデューサーを一旦頸部食道まで挿入し、頸部食道から軟口蓋部まで 1cm 毎に stationary pull-through 法にて嚥下圧を測定し、軟口蓋、中咽頭、下咽頭、食道入口部の嚥下圧測定、中下咽頭・食道入口部の嚥下圧伝搬速度、食道入口部弛緩時間を測定した。また、嚥下圧波形パターンについても検討を行った。

【結果および結論】嚥下造影検査では、加齢により LEDT の延長傾向、PTT の有意な延長（若年群  $0.51 \pm 0.06$ sec、60 歳代群  $0.58 \pm 0.09$ sec、70 歳以上群  $0.60 \pm 0.12$ sec）、%LE の有意な低下（若年群  $59.02 \pm 12.36$ sec、60 歳代群  $52.13 \pm 17.81$ sec、70 歳以上群  $41.15 \pm 21.94$ sec）を認め、嚥下反射惹起遅延や、咽頭期の喉頭挙上速度の低下が明らかであった。咽喉頭感覚低下や嚥下反射惹起遅延は、上喉頭神経のミエリン線維減少や、咽喉頭における末梢神経知覚神経線維の神経伝達物質であるサブスタンス P の減少により生じるものと考えた。また喉頭挙上速度

の低下は、喉頭挙上に関わる舌骨上筋群の収縮速度および収縮力の低下によると考えられた。嚥下圧検査では、加齢に伴い食道入口部弛緩時間は有意に短縮を認めた。食道入口部の嚥下圧パターンでは、食道入口部括約帯部の平圧化不全や括約帯部の拡大を認める例が、高齢になるほど多かった。また軟口蓋、中咽頭、食道入口部の嚥下圧値には有意な差を認めないものの、下咽頭部の嚥下圧は加齢に伴い有意な上昇を認め、これは食道入口部開大障害に対する代償機転によるものと考えられた。食道入口部開大障害は、喉頭挙上距離の低下により生じることもあるが、本研究では喉頭挙上距離には加齢による変化は認めなかった。過去の報告で、下咽頭収縮筋の加齢変化として、甲状咽頭筋・輪状咽頭筋ともにタイプ 2 線維（速筋）の割合が減少し、タイプ 1 線維（遅筋）が増加するとされている。これにより、甲状咽頭筋は食塊駆動機能を減弱する一方、輪状咽頭筋側では機能的に括約筋化すると考えられる。その結果、食道入口部における食塊通過の抵抗性が増大して嚥下障害につながっているものと考えた。

以上の結果より、加齢による嚥下機能変化としては、咽喉頭感覚低下、嚥下反射惹起遅延、喉頭挙上に関わる収縮速度・収縮力の低下および食道入口部の解剖学的機能的変化による食道入口部開大障害が挙げられ、高齢者の嚥下機能低下の原因になっていると結論した。これらの病態を基にした加齢による嚥下障害予防および治療としては、咽喉頭感覚機能を刺激することを目的とした咽喉頭の温度感受性受容体刺激法や、頭部挙上の促進を目的とした舌骨上筋群の機能訓練などが有効と考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	田中 加緒里
審査委員	主査氏名	梶 秀人 印
	副査氏名	西原 利治 印
	副査氏名	古谷 博和 印

題 目      Quantitative evaluation of age-related alteration of swallowing function: videofluoroscopic and manometric studies

(嚥下機能の加齢変化：嚥下造影検査と嚥下圧検査による定量的解析)

著 者      Kaori Nishikubo, Kazuyo Mise, Misato Ameya, Kahori Hirose, Taisuke Kobayashi, Masamitsu Hyodo

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    )、    年    月

Auris Nasus Larynx. Available online 6 September 2014

### 要 旨

日本における死因の第3位である肺炎の約95%を65歳以上の高齢者が占め、その大部分が誤嚥性肺炎によるといわれ、高齢者の嚥下障害が医療的にも社会的にも大きな問題となっている。しかし、高齢者の嚥下障害は、様々な要因が重なり合って発症することが多いため、嚥下機能の加齢変化様式は明らかになっていない。そこで申請者らは、健常者における嚥下機能の加齢変化様式を嚥下造影検査および嚥下圧検査により定量的に評価することで、加齢による嚥下障害の病態を明らかにしようとした。

嚥下は、食塊を口腔から咽頭へ送り込み(口腔期)、嚥下反射による咽頭から食道入口への移動(咽頭期)を経て、食塊が食道を通過し胃に入る(食道期)までの連続動作である。これらのうち最も複雑で緻密な運動が咽頭期に咽喉頭に分布する感覚受容器が刺激されて反射的に起こる。舌骨が最大挙上することにより、喉頭は前方に引き上げられる。喉頭が上前方に挙上する一方で、舌根部は後下方に進むことにより喉頭蓋が後屈して喉頭口を閉鎖する。ここでの喉頭がやや前方へ挙上する運動は、気道を閉鎖して誤嚥を防ぎ、同時に食道入口部を開き食塊を食道へ進めることを可能にす

るので重要である。

対象は、脳血管障害等の嚥下障害をきたしうる疾患の既往や嚥下障害の自覚症状のない健常な若年群 8 例、60 歳代群 39 例、70 歳以上群 24 例の計 71 例であった。硫酸バリウム 10 cc を嚥下させて行った嚥下造影検査により、舌骨・甲状軟骨移動距離、喉頭挙上遅延時間 (LEDT)、咽頭通過時間 (PTT)、喉頭挙上度 (%LE) を測定した。経鼻的に圧トランスデューサーを挿入して行った嚥下圧検査により、軟口蓋、中咽頭、下咽頭、食道入口部の嚥下圧測定、中下咽頭・食道入口部の嚥下圧伝搬速度、食道入口部弛緩時間を測定した。また、嚥下圧波形パターンについても検討を行った。

得られた成績を纏めると次のようになる。

1) 嚥下造影検査により、加齢による喉頭挙上遅延時間の延長傾向、咽頭通過時間の有意な延長、喉頭挙上度の有意な低下を認め、嚥下反射惹起遅延や咽頭期の喉頭挙上速度の低下が明らかとなった。

2) 嚥下圧検査により、加齢による食道入口部弛緩時間の有意な短縮を認めた。また、食道入口部括約帯部の平圧化不全や括約帯部の拡大を認める例が高齢になるほど多かった。

3) 軟口蓋、中咽頭、食道入口部の嚥下圧値には有意な差を認めないものの、下咽頭部の嚥下圧は加齢に伴い有意な上昇を認めたことから、これは食道入口部開大障害に対する代償機転によることが示唆された。

加齢による嚥下反射惹起遅延は、上喉頭神経のミエリン線維減少や咽喉頭に分布する感覚神経の神経伝達物質であるサブスタンス P の減少により生じ、喉頭挙上速度の低下は、喉頭挙上に関わる舌骨上筋群の収縮速度および収縮力の低下によると考察している。

下咽頭収縮筋の加齢変化として、甲状咽頭筋・輪状咽頭筋のタイプ 2 線維 (速筋) が減少し、タイプ 1 線維 (遅筋) が増加すると報じられていることから、甲状咽頭筋は食塊駆動機能を減弱する一方、輪状咽頭筋は機能的に括約筋化して、食道入口部における食塊通過の抵抗性が増大し、嚥下障害につながっていると考察している。

以上の成績より、申請者らは、加齢による嚥下機能変化として、咽喉頭感覚低下、嚥下反応惹起遅延、喉頭挙上に関わる収縮速度・収縮力の低下および食道入口部の解剖学的機能的変化による食道入口部開大障害が挙げられ、高齢者の嚥下機能低下の原因になっていると結論した。

以上のように、本論文は加齢に伴う嚥下機能の変化様式の解明のみならず、加齢による嚥下障害に対する予防と治療の向上に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)	米田 剛 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第31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27年2月17日
学位論文題目	Automated hyperemia analysis software: reliability and reproducibility in healthy subjects  (自動化された充血解析ソフト：健常人における信頼性と再現性)
発表誌名	Japanese Journal of Ophthalmology, 56(1): 1~72012年1月

審査委員	主査	教授	奥原	義保
	副査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	佐藤	隆幸

## 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 米田 剛

## 論文題目

Automated hyperemia analysis software: reliability and reproducibility in healthy subjects

(自動化された充血解析ソフト: 健常人における信頼性と再現性)

### (論文要旨)

結膜充血は、眼表面の炎症(角膜感染症、アレルギー性結膜炎など)や眼内の炎症(ぶどう膜炎や強膜炎など)で認められ、炎症の程度を反映する。結膜充血を定量的に評価することは、眼炎症の程度の判定、ならびに薬物に対する治療効果を判断する際の必須項目である。

現在、結膜充血の臨床評価は、McMonnies/Chapman-Davies scale や Institute for Eye Research scale、Efron scale、Validated bulbar redness scale などのグレーディングスケールを用いることが一般的である。しかし、これらの評価方法は充血の程度を 4~5 段階の順位尺度で評価する主観的な判断であり、充血の程度を詳細に把握することはできない。そこで、我々は結膜充血の程度を詳細に、かつ客観的に定量評価できる充血解析ソフトの開発を試みた。

充血解析ソフトは、スリットランプで撮影した耳側眼球結膜の写真を用いて、デジタル処理によって充血の程度を数値化するソフトウェアである。スリットランプによる写真の解像度は  $2,000 \times 1,312$  pixels で、Region of interest (ROI) は耳側眼球結膜を  $400 \times 300$  pixels の範囲で選択した。結膜血管の抽出方法は、RGB カラーモデルを用いた独自のアルゴリズムで解析し、ROI における血管占有率 (%) で結膜充血を評価した。




これまで、結膜充血の程度を画像処理によって客観的に評価するシステムは確立されていなかった。そこで、我々は結膜充血を認めない健常人の血管占有率の正規性とその分布を確認した。対象は屈折異常以外に眼科的疾患を有さない 20~46 歳 (平均  $25.4 \pm 4.2$  歳) の健常成人 89 名で、右眼の耳側結膜を撮影して充血解析ソフトで解析した。その結果、健常成人の血管占有率は平均  $4.4 \pm 0.9\%$  であり、平均値をピークとした正規分布を示すことがわかった ( $P > 0.05$ , Kolmogorov-Smirnov test)。結果の再現性を評価するために、各被験者で耳側結膜の写真を 2 枚撮影して、解析結果の相関を検討したところ、相関係数は  $r^2 = 0.79$  であり再現性を確認することができた ( $P < 0.01$ , Pearson's moment correlation coefficient、 $P < 0.01$ , Interclass correlation coefficient)。

緑内障治療の点眼薬であるプロスタグランジン製剤は、結膜充血を生じることが報告されている。プロスタグランジン製剤の 1 つであるビマトプロストを被験者 3 名に点眼して充血の程度の変化を点眼前と点眼 12 時間後で比較した。点眼前の血管占有率は平均  $4.4 \pm 0.8\%$  で、点眼 12 時間後は平均  $13.4 \pm 1.1\%$  であり、ビマトプロスト点眼により血管占有率が有意に増加した ( $P < 0.001$ , Wilcoxon signed-rank test)。また、アレルギー性結膜炎の患者 3 名の血管占有率を充血解析ソフトで定量した。

3名の血管占有率の結果は、23.9%、25.3%、26.5%であり、健常成人の値と比較すると約5~6倍の高値を示した。以上の結果から、充血解析ソフトは結膜充血を数値化して定量的に評価できると考えられる。

現在、結膜充血は、医師が主観的に評価しており、半定量的で客観性に欠ける。眼炎症の程度評価や薬剤の効果判定、副作用の程度などを把握するうえで、結膜充血の定量化は必要不可欠である。今回我々が開発した充血解析ソフトは、結膜充血の程度を数値として評価することができ、再現性も高いソフトウェアである。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	米田 剛
審査委員	主査氏名	奥原 義保 
	副査氏名	杉浦 哲朗 
	副査氏名	佐藤 隆幸 

題 目 Automated hyperemia analysis software: reliability and reproducibility in healthy subjects

(自動化された充血解析ソフト：健常人における信頼性と再現性)

著 者 Tsuyoshi Yoneda, Tamaki Sumi, Ayako Takahashi, Yasuhiro Hoshikawa, Masahiko Kobayashi, Atsuki Fukushima

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Japanese Journal of Ophthalmology, 56(1): 1~7  
 2012年1月

**要 旨**

【背景と目的】結膜充血は、眼表面の炎症（角膜感染症、アレルギー性結膜炎など）や眼内の炎症（ぶどう膜炎や強膜炎など）で認められ、炎症の程度を反映する。結膜充血を定量的に評価することは、眼炎症の程度の判定や薬物による治療効果を判断する際に必須である。しかしながら、現在結膜充血の臨床評価に使われる方法は、Monnies/Chapman-Davies scale や Institute for Eye Research scale、Efron scale、Validated bulbar redness scale など、いずれも充血の程度を4~5段階の順位尺度で評価する主観的な判断方法であり、充血の程度を詳細に把握することはできない。このため、申請者等は結膜充血の程度を詳細に、かつ客観的に定量評価できる充血解析ソフトの開発を試みた。

【対象と方法】申請者等が開発した解析ソフトは、スリットランプで撮影した耳側眼球結膜の写真を用いて、デジタル処理によって充血の程度を数値化するソフトウェアである。スリットランプによる写真の解像度は2,000×1,312 pixelsで、Region of interest (ROI) は耳側眼球結膜を400×300 pixelsの範囲で選択した。結膜血管の抽出方法は、RGBカラーモデルを用いた独自のアルゴリズムで解析し、ROIにおける血管占有率(%)で結膜充血を

評価した。この方法によって、屈折異常以外に眼科的疾患を有さない20~46歳(平均25.4±4.2歳)の健常成人89名を対象に、右眼の耳側結膜の写真を解析し、結膜充血を認めない健常人の血管占有率の分布を確認した。次に、結膜充血を生じることが報告されている緑内障治療点眼薬：ビマトプロストを被験者3名に点眼して、充血の程度の変化を点眼前と点眼12時間後で比較した。さらに、アレルギー性結膜炎の患者2名と春季カタルの患者1名の結膜充血の血管占有率を定量した。また、これらの結果の再現性を評価するために、各被験者で耳側結膜の写真を2枚撮影して、解析結果の相関を検討した。

【結果】解析の結果、再現性評価の相関係数は $r^2=0.79$ であり再現性が確認された( $P<0.01$ , Pearson's moment correlation coefficient,  $P<0.01$ , Interclass correlation coefficient)。健常成人の血管占有率は平均4.4±0.9%であり、平均値をピークとした正規分布を示すことがわかった( $P>0.05$ , Kolmogorov-Smirnov test)。ビマトプロスト点眼では、点眼前の血管占有率は平均4.4±0.8%で、点眼12時間後は平均13.4±1.1%であった。ビマトプロスト点眼後で血管占有率は有意に増加した( $P<0.001$ , Wilcoxon signed-rank test)。アレルギー性結膜炎の患者2名と春季カタルの患者の血管占有率は、それぞれ23.9%、25.3%、26.5%であり、健常成人の値と比較すると約5~6倍の高値を示した。

【考察】この結果から、本ソフトウェアを使うことによって、様々な症例の結膜充血を客観的に数値によって評価できる可能性が示された。過去にコンピュータを用いて前眼部の特性を画像解析する研究はいくつか報告されているが、いずれも実験方法が複雑であり、臨床使用に至っていない。いくつかの報告は結膜充血を評価できるソフトウェアとして適用の可能性を示しているが、運用や開発コストの問題で臨床応用まで至っていない。申請者等が開発したソフトウェアは、解析方法を簡略化し、スリットランプで撮影された画像を速やかに分析することができる。操作が簡便であるにもかかわらず再現性や信頼性が高く、臨床に応用できる結膜充血解析ソフトウェアである。

以上をまとめると、申請者等は、結膜充血を客観的に評価できる方法を目指して、結膜充血を評価できるソフトウェアを開発した。申請者等が、このソフトウェアを使って行った解析のROIの最適化や、時間をおいた2つの測定結果の相関関係は、このソフトウェアによる解析の信頼性と再現性が高いことを示している。また、ビマトプロスト点眼により誘発される結膜充血と健常成人の血管占有率の比較、正常値とアレルギー性結膜炎と春季カタルの患者の血管占有率の比較の結果は、様々な症例の結膜充血を数値によって評価できる可能性を示した。このソフトウェアは、眼科検査で一般的に使用される機器により撮影される前眼部デジタル画像を速やかに解析でき、申請者等が目指した、日常の臨床現場で簡便に使用可能な信頼性と再現性の高いシステムを実現したと言える。

本論文は、眼炎症の程度の判定や薬物による治療効果を判断する際に重要な結膜充血の評価を、客観的に数値によって行う方法の確立に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)	青木 三恵子 (広島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第32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27年2月17日
学位論文題目	Lower expressions of the human bitter taste receptor TAS2R in smokers: reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis (喫煙者におけるヒト苦味受容体TAS2Rの低発現性: 逆転写ポリメラーゼ連続反応(RT-PCR法)による分析)
発表誌名	Tobacco Induced Diseases, 2014, 12:122014 年8月15日

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	兵頭	政光
	副査	教授	奥谷	文乃

## 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

青木 三恵子

論文題目

Lower expression of the human bitter taste receptor TAS2R in smokers:  
reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis  
(喫煙者におけるヒト苦味受容体 TAS2R の低発現性：逆転写ポリ  
メラーゼ連続反応 (RT-PCR 法) による分析)

(論文要旨)




喫煙が悪性新生物や冠動脈疾患など致死性病態を引き起こすリスク因子であることは広く知られており、喫煙指数の上昇とともに、これらの発症リスクも高まるという量反応関係も示されている。一方、これまであまり重要視されてこなかった喫煙と抑うつや味覚障害などへの影響が注目されるようになった。味覚の中では、喫煙が特に苦味知覚を障害することが知られ、苦味知覚の障害が喫煙行動を継続させる促進因子となっている可能性も示唆されている。喫煙行動の継続を防ぎ、長期喫煙とそれに伴い増大する致死性病態のリスクを軽減するという観点から、苦味知覚の障害は重要な機能障害であるといえる。しかし、これまで喫煙者の苦味知覚に関して、その生物学的レベルからは充分明らかにはされていない。喫煙は遺伝子やタンパク発現に影響することが知られていること、タバコの煙は舌に直接、接触することなどから、我々は、まず、舌の苦味受容体 (TAS2R) の発現が喫煙者では非喫煙者のそれより少ないという仮説を立てた。また、TAS2R の発現はさまざまな苦味の経験で増加するため、一般に年齢とともに増加することが知られている。このことから、喫煙者においても、この苦味知覚獲得の生物学的基盤である TAS2R の年齢に伴った増加が見られると考えた。

これら 2 つの仮説を検証するために、喫煙者 (22 名；男性 20 名・女性 2 名；年齢  $46.0 \pm 11.4$  歳) と年齢、性別などの背景情報をマッチさせた非喫煙者 (22 名；男性 19 名・女性 3 名；年齢  $41.5 \pm 15.8$  歳) の舌から検体を採取した。検体採取は、バイオプシーでの検体とよく一致し、且つ、採取が容易な粘膜擦過法を選択し、舌側面葉状乳頭を狙って擦過・採取し適切に保存した。その後、逆転写ポリメラーゼ連続反応 (RT-PCR 法) を用いて TAS2R の発現量を計測した。この際に、体細胞由来の DNA が混入していないことを確認した。このようにして得られた TAS2R の発現量を 2 群間で独立 t 検定を用いて比較した。サブ解析として、TAS2R の 21 のサブファミリーについても比較を行った。次に、喫煙者・非喫煙者の 2 群でそれぞれ TAS2R の発現数と年齢の関係を検討し、その発現数・年齢の關係に 2 群間で有意な差がないかをフィッシャーの Z 変換で検討した。有意水準は、2 群比較においては  $p=0.05$  とし、サブファミリー解析では、0.05 を多重比較の回数 21 で除して Bonferroni 補正を行い  $p=0.0024$  とした。

その結果、TAS2R 全体の発現量は喫煙者では  $2.09 \pm 2.81$ 、非喫煙者では  $11.36 \pm 6.04$  で、有意に喫煙者の方が少なかった ( $t$  値 = 6.525、 $p < 0.0001$ )。また、21 の TAS2R のサブファミリーのうちつで喫煙者の方が非喫煙者よりも有意に発現が少なかった。一方で、喫煙者のほうが非喫煙者よりも有意に発現量が多い TAS2R のサブファミリーは一つもなかった。年齢と TAS2R の発現量の関係は、非喫煙者では  $r = 0.642$ 、 $p = 0.001$  の有意な正の相関関係があった。喫煙者においては  $r = 0.124$ 、 $p = 0.584$  で年齢と TAS2R 発現量に有意な関係は見られなかった。また、フィッシャーの Z 変換を用いて、2 群の相関関係は有意に異なることが示された。

この研究から、我々の仮説通り、喫煙者では舌の苦味受容体の発現は非喫煙者のそれよりも小さいことが示され、喫煙者の苦味知覚障害の生物学的基盤である可能性が示唆された。また、喫煙者においては、通常認められる年齢と苦味受容体発現量の正の相関は認められなかった。本研究からは因果関係は検討できないが、喫煙は正常な味覚とその潜在的獲得の両方を阻害することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	青木 三恵子
審査委員	主査氏名	梶 秀人 
	副査氏名	奥谷 文乃 
	副査氏名	兵頭 政光 

**題 目**

Lower expressions of the human bitter taste receptor TAS2R in smokers: reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis

(喫煙者におけるヒト苦味受容体TAS2Rの低発現性：逆転写ポリメラーゼ連続反応(RT-PCR法)による分析)

**著 者**

Mieko Aoki, Tetsuya Takao, Kyoichi Takao, Fumihiko Koike and Narufumi Suganuma

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

Tobacco Induced Diseases, 2014, 12:12  
2014年8月15日

**要 旨**

喫煙が各種臓器や組織を障害し、様々な疾患を引き起こすリスク因子であることは広く知られている。特にがん、虚血性心疾患、慢性閉塞性肺疾患は喫煙による影響が大きく、喫煙三大疾患と呼ばれている。喫煙はまた、抑うつ、睡眠障害や味覚・嗅覚障害などの神経系疾患においても注目されている。味覚の中では、苦味の感受性が特に喫煙の影響を受け、低下することが喫煙行動を継続させる促進因子となっている可能性が示唆されているからである。喫煙行動の継続を防ぎ、習慣性喫煙とそれに伴う重篤な疾患発症のリスクを軽減するという観点から、苦味感受性の低下は重要な機能障害であるといえる。しかし、喫煙による苦味感受性の低下の生物学的基盤は明らかではない。

そこで申請者らは、喫煙が遺伝子発現に影響するとの知見に着目し、舌の苦味受容体の発現が喫煙者では非喫煙者に比べて低下しているのではないかとの作業仮説を立て、それを検証するために、喫煙者 22 人と年齢性別などの背景情報をマッチさせた非喫煙者 22 人の舌の後方側縁に分布する葉状乳頭からサンプルを採取し、RT-PCR 法を用いて苦味受容体の発現数を計測し、比較検討した。味覚受容に関して、近年の分子生物学やゲノミクスの進展により、甘味、旨味、苦味、酸味受容の分子機構が明らかになってきた。多種多様な苦味物質は



ヒトでは 25 種類存在するヒト苦味受容体 (TAS2R) で認識されることが報告されている。申請者らは、25 種類のうち 21 種類の各々に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を実施した。申請者らはまた、TAS2R サブファミリー発現数が様々な苦味の経験を通して年齢と共に増加することを捉えており、この両者の関係についても喫煙者と非喫煙者の 2 群間で比較検討した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

1) TAS2R サブファミリーの発現数は喫煙者では平均  $2.09 \pm 2.81$ 、非喫煙者では平均  $11.36 \pm 6.04$  で、喫煙者の方が有意に低下していた。

2) TAS2R サブファミリーのうち TAS2R4、TAS2R7、TAS2R9、TAS2R30、TAS2R38 及び TAS2R45 の発現は喫煙者の方が非喫煙者よりも有意に低下していた。

3) 年齢と TAS2R サブファミリーの発現数との間に有意な正の相関が非喫煙者に認められたが、喫煙者には認められなかった。また、それぞれの相関関係は有意に異なっていた。この知見は、喫煙が正常な苦味感覚のみならず食経験による苦味受容体の獲得をも阻害することを示唆している。

以上の成績は、非喫煙者に比べ喫煙者の苦味受容体の発現数が有意に低下していることを示しており、この苦味受容体の発現低下が喫煙者の苦味感受性の低下の生物学的基盤である可能性を示唆している。

以上のように、本論文は喫煙が苦味感受性を低下させるメカニズムの解明のみならず、喫煙がリスク因子として発症する様々な疾患の予防の向上にも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。