

2007.4

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第十六号

評価広報課発行

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

*
*
*
*
*

高知大学学報

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

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 35 号	坪屋 英志	Quantitative sensory testing of cold and vibration perception during experimental compression of median nerve at the wrist (手関節部での実験的正中神経圧迫に対する、定量的感覚検査による冷覚および振動覚閾値の変化：小径および大径有髄感覚神経の易損性比較)	1
甲医博第 36 号	森本 徳仁	Helicobacter pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and low molecular weight H. pylori proteins (<i>Helicobacter pylori</i> 関連慢性特発性血小板減少性紫斑病と <i>H. pylori</i> 低分子蛋白との関連性)	5
甲医博第 37 号	植 博信	Sentinel lymph node detection using computed tomography lymphography is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer (乳癌術前化学療法後におけるCTリンフォグラフィを用いたセンチネルリンパ節同定の正確性)	10
甲医博第 38 号	張亚南	Relationship of IL-8 production and the CagA status in AGS cells infected with <i>Helicobacter pylori</i> exposed to low-pH and activating transcription factor 3(ATF3) (ヘリコバクター・ピロリ感染 AGS 細胞における IL-8 産生と CagA 蛋白 (病原因子) 動態との関連性および activating transcription factor 3(ATF3) 転写発現の解析)	15
甲医博第 39 号	Olga Zinchuk	Dynamics of PAF-induced conjunctivitis reveals differential expression of PAF receptor by macrophages and eosinophils in the rat (PAF により誘導したラット結膜炎の動態解析-PAF レセプターの発現はマクロファージと好酸球とで異なる)	22
甲医博第 40 号	野口 徹	Regulation of proopiomelanocortin gene transcription during single and repeated immobilization stress (単回および反復拘束ストレス下におけるプロオピオメラノコルチン遺伝子転写調節)	27

甲医博第 41 号	Parijatha Rao	Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma (ヒト腺癌に対するビリルビンの抗腫瘍活性)	3 3
甲医博第 42 号	Barroso Paola Andrea	The identification of sandfly species, from an area of Argentina with endemic leishmaniasis, by the PCR-based analysis of the gene coding for 18S ribosomal RNA (アルゼンチンのリーシュマニア症流行地におけるサシチョウバエ 18S-rRNA 遺伝子の PCR 解析による媒介種鑑別)	3-9
甲医博第 43 号	廣瀬 享	Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat steatohepatitis (非アルコール性脂肪肝炎モデルラットにおけるアンギオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬の肝線維化抑制効果の検討)	4 4
甲医博第 44 号	刘 钢	Characterization of prolidase activity in erythrocytes from a patient with prolidase deficiency: comparison with prolidase I and II purified from normal human erythrocytes (プロリダーゼ欠損症患者の赤血球中のプロリダーゼ活性の特性: 正常人赤血球から精製したプロリダーゼ I と II の比較において)	4 9
甲医博第 45 号	宮田 恵吉	Induction of apoptosis and cellular senescence in mice lacking transcription elongation factor, Elongin A (転写伸長因子 Elongin A 欠失マウスにおけるアポトーシスと細胞老化の誘導)	5 4

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
乙医博第 30 号	奥田 平和	Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene <i>HOXB13</i> in human renal cell carcinoma (ヒト腎細胞癌における癌抑制遺伝子候補 <i>HOXB13</i> のエピジェネティックな不活化)	59
乙医博第 31 号	高木 洋	Postexercise VO_2 "Hump" phenomenon as an indicator for inducible myocardial ischemia in patients with acute anterior myocardial infarction (急性前壁心筋梗塞後患者における誘発心筋虚血指標としての運動負荷後の VO_2 "Hump" 現象)	64
乙医博第 32 号	中島 喜美子	Xanthoma tissue-extracted LDL density substances are the main inducer of myelin-like bodies and ceroid granules in foam cells (泡沫細胞中の myelin-like bodies と ceroid granules は主として黄色腫組織抽出 LDL 比重物質によって誘導される)	69
乙医博第 33 号	中野 琢巳	Effects of geldanamycin and thalidomide on the Th1/Th2 cytokine balance in mice subjected to operative trauma (マウス手術侵襲モデルにおける geldanamycin および thalidomide 投与による Th1/Th2 サイトカイン変動についての研究)	75

氏名(本籍)	坪屋 英志 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第35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19年2月28日
学位論文題目	Quantitative sensory testing of cold and vibration perception during experimental compression of median nerve at the wrist (手関節部での実験的正中神経圧迫に対する、定量的感覚検査による冷覚および振動覚閾値の変化: 小径および大径有髄感覚神経の易損性比較)
発表誌名	Muscle and Nerve 2007(in press)

審査委員	主査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	椋	秀人
	副査	教授	清水	恵司

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 坪屋英志

論文題目




Quantitative sensory testing of cold and vibration perception during experimental compression of median nerve at the wrist

(手関節部での実験的正中神経圧迫に対する、定量的感覚検査による冷覚および振動覚閾値の変化：小径および大径有髄感覚神経の易損性比較)

(論文要旨)

小径および大径有髄神経線維の易損性を比較するために、持続的圧迫により正中神経の伝導ブロックを誘発し、この間、連続的に定量的感覚検査（以下 QST）を行った。15 人の健常成人を対象とし、手関節部で正中神経を 9.8 N の強さで 30 分間経皮的に圧迫し、中指の冷覚閾値（CPT）および振動覚閾値（VPT）の変化を 2 分毎に測定した。これと同時に、中指刺激による正中神経の順行性感覚神経活動電位（SNAP）を手関節部（圧迫部）と肘部で 2 分毎に記録し、圧迫により生じる神経伝導ブロックの推移を観察した。また、圧迫解除後もほぼ 10 分間、CPT、VPT、SNAP の計測を続けた。実験は 2 グループに分けて行った。すなわち、CPT 測定を 12 人のグループで行い、VPT 測定をやはり 12 人の別グループで行った。15 人中 9 人は両グループに被験者として参加し、他の 6 人はどちらか一方のグループのみに参加した。神経圧迫開始後、16 分で CPT は有意な変化を示し始めたが、VPT は 26 分で初めて有意な変化を示した。圧迫解除後、VPT は 2 分で圧迫前の値に回復したが、CPT は VPT よりも 2 分遅れて回復した。手関節部（圧迫部）での SNAP 陰性波の振幅・面積は圧迫開始直後より進行性に減少したが、肘部での SNAP は圧迫開始当初は変化なく、22-24 分後より陽性波や陰性波の面積が有意に減少し、20 分後より潜時の有意な遅延を認めた。CPT および VPT の測定は別グループで行われたが、両グループにおいて SNAP はほぼ同一の（有意差のない）経時的変化を示したため、両グループにおける正中神経の圧迫状態も同様と考えられた。従って、神経圧迫に伴う CPT と VPT の経時的変化の差は冷覚と振動覚の伝導を担う神経線維の易損性の差によるものと結論づけることができると考えられた。一般に圧迫による神経障害では大径線維の方が小径線維よりも易損性が高いと考えられているが、本実験の結果として、Rapidly reversible block を生じる程度の比較的弱い急性圧迫では、振動覚を伝える大径有髄線維よりも、冷覚を伝える小径有髄線維がむしろ先に障害されることが明らかとなった。神経圧迫により誘発されるが急速に回復する症状を評価するための QST としては、VPT よりも CPT の方が有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	坪 屋 英 志
審 査 委 員	主 査 氏 名	佐 藤 隆 幸 
	副 査 氏 名	椛 秀 人 
	副 査 氏 名	清 水 恵 司 

題 目 Quantitative sensory testing of cold and vibration perception during experimental compression of median nerve at the wrist
 (手関節部での実験的正中神経圧迫に対する、定量的感覚検査による冷覚および振動覚閾値の変化：小径および大径有髄感覚神経の易損性比較)

著 者 Hideshi Tsuboya, Toshikazu Tani, Kenji Ishida, Takahiro Ushida, Shinichirou Taniguchi, Jun Kimura

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Muscle and Nerve 2007(in press)

要 旨

手根管症候群をはじめとする絞扼性末梢神経障害は、伝導速度が速く、直径の太い有髄線維から侵されると考えられていた。しかし、申請者らのグループは、これまでに感覚神経の複合誘発電位測定法を用いた研究を行い、障害の初期から順行性誘発電位の振幅低下が見られるが、伝導速度の低下はしばらくは認めないという知見を得た。このことから、絞扼性障害の初期には、伝導速度が遅く、直径の細い有髄神経が侵されやすいという仮説を提唱していた。そこで、申請者は、太い神経線維が情報を伝える振動覚刺激と細い神経線維が情報を伝える冷覚刺激を独立して定量的に行う方法を用いて、本仮説を検証した。

15人の健常成人を対象とし、手関節部で正中神経を9.8ニュートンの力で30分間経皮的に圧迫する方法で神経伝導ブロックモデルとした。複合誘発電位は、中指の電気刺激を行いながら、圧迫部と肘部で計測した。また、市販の振動刺激装置と独自に開発した冷覚精密刺激装置を用いて、中指を刺激し、振動覚閾値と冷覚閾値を測定した。その結果、神経圧迫開始後、すぐに誘発電位の振幅低下がみられたが、伝導速度の低下は、20分後からみられた。これらの所見に合致するように、まず、16分後に冷覚閾値の上昇、ついで、26分後に振動覚閾値の上昇が見られた。すなわち、これらの結果は、申請者の作業仮説を裏付けるように、神経圧迫が最初に細い神経線維の伝導を障害するというを示唆している。

さらに、圧迫解除後の回復過程も観察したところ、まず振動覚閾値ついで冷覚閾値の順で回復したことから、細い神経線維のほうが圧迫による障害を受けやすく、回復も遅れると考えられた。

以上の結果から、申請者は、(1)絞扼性神経障害の早期には、太い神経線維に先立って、細い神経線維の伝導が障害される、(2)早期障害の評価には冷覚閾値の測定が有用である、(3)可逆的な障害から回復する過程の定量的評価にも冷覚閾値の測定が有用である、と結論付けた。

本研究で得られた成果は、絞扼性神経障害に関する診断評価法の発展に大きく貢献するものと考えられる。さらに、作業仮説の検証のため、従来困難であった冷覚の精密刺激装置を独自に開発した点も高く評価される。したがって、審査員一同は、申請者の論文を、本学医学博士の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(本籍)	森本 徳仁(徳島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第36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19年2月28日
学位論文題目	Helicobacter pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and low molecular weight H.pylori proteins (<i>Helicobacter pylori</i> 関連慢性特発性血小板減少性紫斑病と <i>H. pylori</i> 低分子蛋白との関連性)
発表誌名	Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2007年(in press)

審査委員	主査	教授	田口	博國
	副査	教授	今井	章介
	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 森本 徳仁

論文題目

Helicobacter pylori - associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and low molecular weight H. pylori proteins (*Helicobacter pylori* 関連慢性特発性血小板減少性紫斑病と *H. pylori* 低分子蛋白との関連性)

(論文要旨)

【背景】

Helicobacter pylori は消化器疾患の他、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)に関与することも指摘されている。*H. pylori* 感染を合併した慢性ITP(cITP)患者に対し、*H. pylori* の除菌を行うと血小板数回復の認められる症例が多数報告されている。これまでに*H. pylori* 関連cITP発症機序は、抗*H. pylori* 抗体と血小板との交差反応説が有力視されているが、*H. pylori* 除菌後、わずか数週間で血小板数の回復が認められる事実から、交差反応説だけでは説明が不十分である。そこで本研究では、血小板に*H. pylori* 抗原が直接結合し、さらに抗原に対する抗体が結合する抗原抗体複合体説を提唱しその解析を行った。

【方法】

1. 血小板凝集試験: 健常人血小板多血漿に、標準株あるいはcagA遺伝子破壊株等の異なる株の*H. pylori* 菌体溶解液を添加し血小板凝集を経時的に観察した。比較対照として*Campylobacter jejuni* および*Escherichia coli* 菌体溶解液を用いた。
2. 患者: 15名のcITP患者の*H. pylori* 感染の有無は¹³C-尿素呼気試験により診断した。*H. pylori* 感染の有無にかかわらず、全ての患者に対し除菌を行い4ヵ月後に除菌判定を行った。除菌成否および除菌前後の血小板数の結果に基づき、患者を以下の3群に分類した。
 - ① *H. pylori* 陰性群(HP-N群、n = 3)
 - ② *H. pylori* 陽性で除菌後に血小板数の改善が認められた群(CR群、n = 7)
 - ③ *H. pylori* 陽性で除菌後に血小板数の改善が認められなかった群(NR群、n = 5)
 除菌前後の各群患者血清を用いて以下の検討を行った。
3. イムノブロット解析: *H. pylori* 蛋白をSDS-PAGEにて分離し、各患者血清でイムノブロットを行い、*H. pylori* に対する血清中抗体のプロファイルの相違を解析した。
4. ELISA: *H. pylori* 菌体溶解液固層プレート(抗whole-*H. pylori* 抗体)、抗*H. pylori* 抗体(抗J-HM-CAP抗体)および抗CagA抗体をELISA法にて測定した。
5. 免疫沈降: 血小板と*H. pylori* 蛋白との結合を確認するために、健常人血小板と*H. pylori* 溶解液をインキュベートしたのち、抗血小板抗体で免疫沈降を行い、SDS-PAGEで分離し、患者血清を一次抗体としてイムノブロットを行った。

【結果】

1. 血小板凝集試験: 血小板凝集は全ての*H. pylori* 株で認められたが、*C. jejuni* および*E. coli* では認められなかった。
2. イムノブロット: *H. pylori* 蛋白のうち50 kDa以上の高分子蛋白に対する抗体のプロファイルはCRおよびNR群間で差は認められなかったが、低分子蛋白(特に36、27、および17 kDa)では有意

(備考)

論文要旨は、和文1,500字程度にまとめるものとする。
 なお、用紙はA4版とし、適宜補充して差し支えない。

学位論文要旨

にCR群で高頻度に抗体を検出した。




3. ELISA: NR群とCR群の除菌前後の血清中の抗J-HM-CAPおよび抗CagA抗体価に有意差が認められたが、抗whole-*H. pylori* 抗体はCR群のみ有意差が認められた。

4. 免疫沈降: 免疫沈降により血小板に結合した17 kDa-*H. pylori* 低分子蛋白が検出され、17 kDa低分子蛋白に対する抗体は、NR群に比べCR群でより頻繁に検出された。

【結論】

H. pylori 蛋白のうちCagAなどの病原蛋白は血小板凝集に関与しておらず、未知の菌体蛋白が血小板凝集に関与している。17、27および36 kDaの*H. pylori* 低分子蛋白がCR群に関与し、少なくとも血小板に結合する17 kDaを始めとする*H. pylori* 低分子蛋白と、それに対する抗体(免疫複合体)が*H. pylori* 関連cITP発症における新たなメカニズムとして考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	森 本 徳 仁
審 査 委 員	主 査 氏 名	田 口 博 國 
	副 査 氏 名	今 井 章 介 
	副 査 氏 名	山 本 哲 也 

題 目 *Helicobacter pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and low molecular weight *H. pylori* proteins
(*Helicobacter pylori* 関連慢性特発性血小板減少性紫斑病と *H. pylori* 低分子蛋白との関連性)

著 者 Norihito Morimoto, Hiroaki Takeuchi, Toru Takahashi, Tadashi Ueta, Yukio Tanizawa, Yoshitaka Kumon, Michiya Kobayashi, Tetsuro Sugiura

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2007年(in press)

要 旨

*Helicobacter pylori*感染による特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の発症機序として抗*H. pylori*抗体と血小板との交差反応説が唱えられてきた。しかし、*H. pylori*除菌により血小板数が短期間で回復したにもかかわらず、抗*H. pylori*抗体が持続するなどこの説で理解しにくい現象も報告されている。今回申請者らは*H. pylori*関連ITPでは血小板に*H. pylori*蛋白が直接結合し、さらに抗血小板抗体が結合して免疫複合体を形成し、最終的に網内系で血小板破壊が起こるため血小板減少が起こるという説を提示した。申請者らはまず臨床分離株を含む*H. pylori*菌株4種と健康人の血小板を用いて*H. pylori*菌体溶解液による凝集を確認した。ITP患者15例を*H. pylori*陰性群3例、除菌4ヶ月後に血小板数が回復したCR群7例、回復しなかったNR群5例に分け解析した。まず、イムノブロット分析により*H. pylori*蛋白に対する抗体を検索した。高分子蛋白領域ではNR群とCR群で差がなかったため低分子蛋白領域で検討した。その結果17kDaの低分子蛋白に対する抗体が比較的多く認められ、これらのうち少なくとも1つが陽性を示す陽性率が、NR群40.0%に対しCR群100%で有意差が認められた。

次にELISA法で除菌前後の血清中の抗J-HM-CAPおよび抗CagA抗体価をみたところ、両群とも除菌後有意に低下した。一方、抗whole *H. pylori*抗体はCR群では除菌後有意に低下したが、NR群では有意な変化は見られなかった。これはNR群では*H. pylori*の低分子蛋白に対する抗体出現率が低くCR群では高いことを反映しているものと考えられた。

そこで36kDa, 27kDa, 17kDaの低分子蛋白と血小板との結合試験を免疫沈降法で行ったところ、CR群では*H. pylori*溶解液のみで認められる17kDaのバンドが血小板と*H. pylori*溶解液を免疫沈降した6例中5例で検出され血小板のみの免疫沈降では検出されなかった。したがって、少なくとも17kDaの低分子蛋白が血小板に結合することがわかった。申請者らは*H. pylori*関連ITPの発症には、*H. pylori*の17kDaの低分子蛋白が血小板に結合し、これと抗*H. pylori*抗体とで構成された免疫複合体が関与している可能性がある結論した。

以上のように本論文は従来の*H. pylori*関連ITPの成因としての*H. pylori*抗体と抗血小板抗体との交差反応説よりはより合理的に血小板減少を説明できる免疫複合体説を新しく提唱し、血小板の17kDaの低分子蛋白に対する抗体を検出することにより*H. pylori*陽性のITPのうち除菌によって治癒させることのできる群を診断できるという新しい検査法の開発への発展が期待される優れた研究であり、審査員一同は本論文が高知大学博士(医学)に相応しいものであることを認めた。

氏名(本籍)	植 博信 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第37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19年3月23日
学位論文題目	Sentinel lymph node detection using computed tomography lymphography is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer (乳癌術前化学療法後におけるCTリンフォグラフィを用いたセンチネルリンパ節同定の正確性)
発表誌名	Oncology Reports 2007年(掲載予定)

審査委員	主査	教授	花崎	和弘
	副査	教授	降幡	陸夫
	副査	教授	杉浦	哲朗

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 植博信

論文題目

Sentinel lymph node detection using computed tomography lymphography is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer

(乳癌 術前化学療法後における CT リンフォグラフィーを用いたセンチネルリンパ節同定の正確性)

(論文要旨)

センチネルリンパ節生検とは、がんの周りに色素やRIで標識した粒子などを注入することにより、癌が最初に転移するリンパ節と考えられるがんからのリンパ流が最初に流れ着くリンパ節(センチネルリンパ節)を探し出し、転移があるかどうかを確認する方法で、近年、施行される症例が増え、センチネルリンパ節に転移がない場合は残りのリンパ節にも転移がないと考えられるので、リンパ節郭清を省略することができるため、従来の腋窩リンパ節郭清と比べ、術後の合併症も有意に少ない。乳がんの手術は低侵襲化の方向にあり、術前化学療法により、局所・腋窩のコントロールがなされる症例が増え、乳房温存療法の適応はより拡大しつつある。

しかし、術前化学療法後のセンチネルリンパ節生検は化学療法による繊維化の影響によるリンパ流の阻害や偽陰性の増加などが問題点とされ、術前化学療法施行例はセンチネルリンパ節生検の適応外となっている。

これまで術前化学療法前後でのリンパ流の変化を比較することができず、化学療法によるリンパ流の阻害の証明は困難であった。今回、少量のヨード造影剤を注射することにより、センチネルリンパ節を同定できる CT リンフォグラフィー(当院倫理委員会での承諾を得ている)を用いて、術前化学療法前後でのリンパ流の変化、センチネルリンパ節の同定率を比較し、術前化学療法施行例におけるリンパ流の阻害の有無を確認し、センチネルリンパ節生検の安全性について検討した。

2004年5月から2006年4月までの間に当院において、CT リンフォグラフィーを施行された乳がん症例 53例(計 75回)を対象(術前化学療法前もしくは未施行例が 44例、術前化学療法施行後の症例が 31例。そのうち、術前化学療法前後ともにCT リンフォグラフィーを施行された症例が 22例)

CT リンフォグラフィーを用いたセンチネルリンパ節の同定率は術前化学療法前の症例は 35/44(79.5%)、術前化学療法後の症例は 28/31(90.3%)であり、化学療法前に比して、化学療法後の症例で同定率の上昇が見られた。




術前化学療法前後で施行された 22症例においても、化学療法後の方がより同定率が高く、また、化学療法前後でその同定センチネルリンパ節数を比較した場合、増加した症例が 6例みられ、減少した症例はなく、化学療法によるリンパ流の阻害は証明されなかった。

この結果により、術前化学療法前の時点でセンチネルリンパ節生検の適応となるような症例は術前化学療法後にセンチネルリンパ節生検を施行しても、手技的に問題ないものと思われる。

術前化学療法症例におけるセンチネルリンパ節生検のもうひとつの問題点として、腋窩リンパ節転移が複数見られる場合の化学療法による効果の不均一性による偽陰性の増加が挙げられる。術前化学療法によりすべてのリンパ節転移が消失する場合は問題ないが、センチネルリンパ節に見られた転移が消失し、それ以外のリンパ節への転移が残存した場合、偽陰性となってしまう。この問題点に関してもCTリンフォグラフィーでは術前にセンチネルリンパ節、それ以外のリンパ節のサイズの確認が可能であり、リンパ節転移診断に有用である。術前化学療法前後にリンパ節のサイズを比較し、変化が見られたものは転移陽性であったと判断し、センチネルリンパ節生検の適応外とすれば、術前化学療法施行例でのセンチネルリンパ節生検においても偽陰性は減少するものと思われる。

化学療法前後において、CTリンフォグラフィーでリンパ流やリンパ節のサイズ変化を検討することは腋窩リンパ節転移の診断の補助にも有用であり、術前化学療法施行例におけるセンチネルリンパ節生検の適応拡大に有用であると思われる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	植 博 信
審 査 委 員	主 査 氏 名	花 崎 和 弘 
	副 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 Sentinel lymph node detection using computed tomography lymphography is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer
(乳癌術前化学療法後におけるCTリンフォグラフィを用いたセンチネルリンパ節同定の正確性)

著 者 Hironobu Ue, Yasuhiro Ogawa, Shinji Kariya, Kimiko Nakatani, Kazuhiro Tsuzuki, Kana Miyatake, Hironori Maeda, Yosuke Tanaka, Shiro Sasaguri

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Oncology Reports 2007年(掲載予定)

要 旨

[研究背景と目的] センチネルリンパ節生検とは、がんの周りに色素やRIで標識した粒子などを注入することにより、癌が最初に転移するリンパ節と考えられるがんからのリンパ流が最初に流れ着くリンパ節(センチネルリンパ節)を探し出し、転移があるかどうかを確認する方法で、近年、施行される症例が増えてきている。センチネルリンパ節に転移がない場合は残りのリンパ節にも転移がないと考えられるので、リンパ節郭清を省略することができるため、乳がん手術においては従来の腋窩リンパ節郭清と比べ、術後の合併症も有意に少ない。乳がんの手術は低侵襲化の方向にあり、術前化学療法により、局所・腋窩のコントロールがなされる症例が増え、乳房温存療法の適応はより拡大しつつある。しかし、術前化学療法後のセンチネルリンパ節生検は化学療法による繊維化の影響によるリンパ流の阻害や偽陰性の増加などが問題点とされ、術前化学療法施行例はセンチネルリンパ節生検の適応外となっている。

これまで術前化学療法前後でのリンパ流の変化を比較する有用な検査法はなく、化学療法によるリンパ流の阻害の証明は困難であった。申請者らのグループは、少量のヨード造影剤を注射することにより、センチネルリンパ節を同定できるCTリンフォグラフィを用いて、術前化学療法前後でのリンパ流の変化、センチネルリンパ節の同定率を比較し、術前化学療法施行例におけるリンパ流の阻害の有無を確認し、センチネルリンパ節生検の安全性について検討した。

[対象と方法] 2004年5月から2006年4月までの間に当院において、CTリンフォグラフィが施行された乳がん症例53例(計75回)を対象とした。術前化学療法前もしくは未施行例が44例、術前化学療法施行後の症例が31例で、そのうち、術前化学療法前後ともにCTリンフォグラフィが施行された症例は22例であった。

[結果] CTリンフォグラフィを用いたセンチネルリンパ節の同定率は術前化学療法前の症例は35/44(79.5%)、術前化学療法後の症例は28/31(90.3%)であり、化学療法前に比して、化学療法後の症例で同定率の上昇が見られた。術前化学療法前後で施行された22症例においても、化学療法後の方がより同定率が高く、また、化学療法前後でその同定センチネルリンパ節数を比較した場合、増加した症例が6例みられ、減少した症例はなく、化学療法によるリンパ流の阻害は証明されなかった。

この結果により、術前化学療法前の時点でセンチネルリンパ節生検の適応となるような症例は術前化学療法後にセンチネルリンパ節生検を施行しても、手技的に問題ないものと思われた。

[結論と本研究の意義] 術前化学療法症例におけるセンチネルリンパ節生検のもうひとつの問題点として、腋窩リンパ節転移が複数見られる場合の化学療法による効果の不均一性による偽陰性の増加が挙げられる。術前化学療法によりすべてのリンパ節転移が消失する場合は問題ないが、センチネルリンパ節に見られた転移が消失し、それ以外のリンパ節への転移が残存した場合、偽陰性となってしまう。

この問題点に関してもCTリンフォグラフィでは術前にセンチネルリンパ節、それ以外のリンパ節のサイズの確認が可能であり、リンパ節転移診断に有用である。術前化学療法前後にリンパ節のサイズを比較し、変化が見られたものは転移陽性であったと判断し、センチネルリンパ節生検の適応外とすれば、術前化学療法施行例でのセンチネルリンパ節生検においても偽陰性は減少するものと思われる。

以上、本研究によって化学療法前後において、CTリンフォグラフィを用いてリンパ流やリンパ節のサイズ変化を検討することは腋窩リンパ節転移の診断の補助にも有用であることが判明した。この新知見は乳がん術前化学療法施行例におけるセンチネルリンパ節生検の適応拡大に有用である。本論文は従来困難であった課題を克服し、臨床的に意義の高い新知見も含まれているため、学位を授与するに値するものと判定した。

氏名(国籍)	張亞南(中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第38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19年3月23日
学位論文題目	Relationship of IL-8 production and the CagA status in AGS cells infected with <i>Helicobacter pylori</i> exposed to low-pH and activating transcription factor 3(ATF3) (ヘリコバクター・ピロリ感染 AGS 細胞における IL-8 産生と CagA 蛋白(病原因子)動態との関連性および activating transcription factor 3(ATF3)転写発現の解析)
発表誌名	Microbiological Research 2007(in press)

審査委員	主査	教授	小林	道也
	副査	教授	今井	章介
	副査	教授	麻生	悌二郎

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 張 亞南

論文題目

Relationship of IL-8 production and the CagA status in AGS cells infected with *Helicobacter pylori* exposed to low-pH and activating transcription factor3 (ATF3)
(ヘリコバクター・ピロリ感染AGS細胞におけるIL-8産生とCagA蛋白(病原因子)動態との関連性およびactivating transcription factor3 (ATF3)転写発現の解析)

(論文要旨)

【背景】

Helicobacter pylori (ピロリ菌)は世界人口の約半数のヒト胃内に感染していると推定され、消化器疾患に止まらず種々の疾患に関与することが報告されている。CagA(病原因子)はIV型分泌機構を介して菌体内から胃上皮細胞に直接注入され、SFKを介し宿主細胞内でチロシンのリン酸化を受ける。リン酸化チロシンはSHP-2と結合し種々のsignal pathwayを介して、細胞形質変化(樹枝状突起・伸長: hummingbird)やinterleukin (IL)-8を含む炎症性サイトカインの誘導を惹起する。しかし、ピロリ菌は強酸性(low-pH)下で生息しているにも関わらず、low-pH環境とピロリ菌CagA動態(細胞内移行性やリン酸化、形質変化の出現および炎症性サイトカイン誘導)は不明である。一方で、刺激・ストレス誘導性の急性期因子で細胞内シグナル伝達や分子動態に関与するactivating transcription factor (ATF3)がピロリ菌(欧米型: WSS type CagAを保有)感染後48時間という遅い時期に誘導される事が初めてマイクロアレイの結果として報告された。そこで、申請者らは、low-pH環境がピロリ菌CagA動態に及ぼす影響とCagAおよびそのタイプ(欧米型とアジア型: ESS type CagA)によるATF3発現への影響を解析する事を目的に本研究を行った。

【方法】

1. 細胞・ピロリ菌株: 感染細胞にはAGS細胞(ヒト胃癌細胞株)を用いた。ピロリ菌は野生株2株(HPK5株(ESS type CagA)と26695株(WSS type CagA))と各野生株で作製したcagA遺伝子破壊株(HPK5CAと26695CA)を用いた。
2. 感染実験: 感染はピロリ菌: AGS(MOI=150:1)で行い、経時的に培養上清とAGS細胞を採取した。上清(遠心(7000rpm, 5分)後、ピロリ菌を除去)はIL-8測定(ELISA)に使用し、PBS洗浄後に採取したAGS細胞はwestern blotting法にてCagAおよびそのリン酸化CagAの解析を行った。また、ピロリ菌の運動性による影響を避ける目的で、菌とAGS細胞を混和後、直ちにプレートを600xgで5分間遠心し、synchronized感染も実施し評価した。
3. Sampleの調整: AGS細胞はPRIA緩衝液(溶解液)に混和後、ホモジナイザーで破碎し細胞融解液を作製し、95°Cで5分間の熱処理後、western blottingに使用した。
4. Western blotting解析: 試料は5%SDS-PAGEにて電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体としてPY99抗体(抗リン酸化抗体)と抗CagA抗体を使用した。二次抗体にはanti-mouse IgG抗体とanti-rabbit IgG抗体をそれぞれ用いた。
5. 免疫沈降: 必要に応じて抗PY99抗体あるいは抗CagA抗体で免疫沈降を行い解析を行った。
6. IL-8測定: IL-8は(Biosource International)のELISAキットを使用してマイクロプレートリーダーにて測定した。

(備考)

論文要旨は、和文(日本語)書式にまとめるものとする。
なお、題名はA可取とし、感字種を「」で括弧しない。

7. 形態観察: ピロリ菌感染後は経時的にAGS細胞の形態変化を顕微鏡にて解析した。特に細胞内CagA機能を反映・特徴付けるhummingbirdやneedle-like細胞の出現に注目した。

8. low-pH環境: 通常のブルセラ培養液(pH 6)に塩酸を添加し、酸性ブルセラ培養液(pH 3)を作製した。酸性培養液には尿素(5mM)添加(pH3-U+)と無添加(pH3-U-)の2種類を作製し、合計3種類の培養液中にピロリ菌を15分間暴露させ、それらを感染実験に用いた。(酸性培養液中で15分間暴露後の生存ピロリ菌数はブルセラ培地に塗布し培養後確認(CFUカウント)したが影響はなかった。)

9. Sequence analysis: 26695(WSS type CagA)のcagA遺伝子配列は既に報告されているが、HPK5(ESS type CagA)のcagA配列は不明であり、塩基配列を解析した。QIAamp®DNA Mini KitにてHPK5のgenomic DNAを抽出し、作製プライマーにてPCRを実施した。得られた約3.5kbのPCR産物はpGEM-T-Easyベクターに挿入しpCAH5ZNを作製した。Erase-a-Base® system kitにてpCAH5ZNから種々のdeletion plasmidを作製し、シークエンス用PCRにて全3.5kbの塩基配列を決定した。

10. ATF3の転写発現解析: 経時的にピロリ菌感染AGS細胞を採取し、TRIzol reagent (Invitrogen)にて総RNAを抽出後、ATF3特異的プライマーを使用しRT-PCR(PowerScript™ Clontech)にて転写発現量を解析した。

【結果】

1. IL-8生産: 両野生株(26695とHPK5)共に時間依存性にIL-8値は増加するが、26695は12時間で、HPK5は48時間で最高値を示し、最高値も26695の方が高く、その動態は異なっていた。両cagA破壊株共、感染初期(12時間)までIL-8産生が野生株の50%以下に抑制されていたが、後期(48時間)は同程度の測定値を示した。

2. IL-8生産(low-pHの影響): pH3-U-溶液に暴露した株は通常溶液(pH6)よりも、IL-8分泌量は有意に低く、pH3-U+溶液では完全に回復しpH6溶液と同レベルであった。

3. CagA細胞内移行とそのリン酸化: 野生株2株のCagAおよびリン酸化CagA蛋白は経時的に増加し、時間依存性に細胞内へ移行している事が示された。しかし、HPK5(ESS type)は12時間と24時間後にCagAとリン酸化CagAのピークを示したが、26695(WSS type)では共に既に6時間後でピークを示し、その動態に差を認めた。cagA破壊株(HPK5CA, 26695CA)では共に検出できなかった。low-pH環境は両株間で差を認めるものの共に両蛋白量の減少と検出時期の遅延が著しかった。しかし尿素存在下(pH3-U+)では回復した。特に、26695株(pH3-U-)の両蛋白は感染6時間後まで著しく減少しその後増加するが、HPK5(pH3-U-)は終始増加せずリン酸化CagAは検出できなかった。両株ともpH3-U+ではCagAは完全に回復するにも関わらずリン酸化CagAは通常培養溶液(pH6)レベルまでには達しなかった。

4. HPK5 CagAのアミノ酸配列解析: CagA蛋白のリン酸化領域は3つのmotif(EPIYA, TPMおよびCPM)が判明し分類されている。今回の解析より、HPK5 CagAには3つのEPIYA motifがC末端領域に存在しESS type CagAである事を確認した。一方で26695(WSS type CagA)は2つのEPIYAと1つのEPIYT motifを持っている。両CagA配列を比較すると、共にTPM motifのY-122とY-899は活性型で、C末端領域のTPM motifは不活性型であった。さらに4つのCPM motif中、2つ(K-223とK-923)はHPK5で活性型を示し、3つ(K-223, K-454およびK-904)の活性型が26695では認められた。

5. 形態学的観察: 各々4株をAGS細胞に感染後、経時的に2日間顕微鏡下にて形態学的特徴(hummingbirdやneedle-like)の出現を観察した。その結果、26695のみで感染後6時間からhummingbirdの出現が確認できた。low-pH条件下ではhummingbirdの出現は24時間後であり著しく遅延しており、pH3-U+では明らかに改善されるもののpH 6同等までには回復しなかった。

6. ATF3転写発現: 両野生株ではATF3の転写発現は感染後徐々に増加し、報告と同様に感染後期(48時間)に最高値を示した。しかし、両cagA破壊株では感染前期(6-12時間後)と後期(48時間)に最高値を示し2峰性の転写発現パターンを示す事が明らかとなった。

【結論】




1. IL-8産生誘導とCagAとの関連性については議論があるが、今回の結果より、CagA依存性と非依存性のIL-8産生誘導が認められ(WSSおよびESS typeに無関係)、特に感染初期はCagA依存性にIL-8が産生分泌されている事が示唆された。但し、IL-8産生誘導の効率およびその分泌量はCagAタイプにより異なると思われる。

2. low-pH暴露ピロリ菌の解析結果から、CagA依存性IL-8誘導にはCagAのリン酸化が重要であり、low-pH条件では尿素がCagA発現に影響する事が判明し、その結果IL-8分泌亢進を認めた。

学位論文要旨

3. また、ピロリ菌体内ではlow-pH条件下でCagAは十分に産生されているにも関わらず、感染AGS細胞ではそれが反映されていなかった事より、ピロリ菌体内でのCagA動態(シャペロンに関する因子やIV分泌機構)に影響していると考えられた。
4. 異なるCagA type株(26695とHPK5)間でそのIL-8産生動態に差を認めた事より、リン酸化部位のEPIYA (T)のmotifは感染初期のピロリ菌に対する早期宿主免疫応答(炎症性サイトカインIL-8誘導)に影響する可能性が示唆された。
5. 刺激・ストレス応答因子として早期に誘導されるATF3はCagA (type無関係)の影響を受けており、CagA-ATF3を介する新たな細胞内シグナル伝達経路がピロリ菌の病原性に関与する可能性を始めて示した。

論文審査の結果の要旨

	氏 名
張 亞 南	張 亞 南
審 査 委 員	主 査 氏 名 小 林 道 也 
	副 査 氏 名 今 井 章 介 
	副 査 氏 名 麻 生 悌 二 郎 

題 目 Relationship of IL-8 production and the CagA status in AGS cells infected with *Helicobacter pylori* exposed to low-pH and activating transcription factor 3(ATF3)
 (ヘリコバクター・ピロリ感染 AGS 細胞における IL-8 産生と CagA 蛋白 (病原因子) 動態との関連性および activating transcription factor 3(ATF3) 転写発現の解析)

著 者 Yanan Zhang, Hiroaki Takeuchi, Mitsuaki Nishioka, Norihito Morimoto, Mikio Kamioka, Yoshitaka Kumon, Tetsuro Sugiura

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Microbiological Research 2007(in press)

要 旨 [背景および目的]

Helicobacter pylori (以下、ピロリ菌)は世界人口の約半数のヒト胃内に感染していると推定され、消化器疾患以外にも種々の疾患に関与することが報告されている。CagA(病原因子)はIV型分泌機構を介して菌体内から胃上皮細胞に直接注入され、SFKを介し宿主細胞内でチロシンのリン酸化を受ける。リン酸化チロシンはSHP-2と結合し種々の signal pathway を介して、細胞形質変化(樹枝状突起・伸長: hummingbird type)や interleukin (IL)-8を含む炎症性サイトカインの誘導を惹起する。しかし、ピロリ菌は強酸性(low-pH)下で生息しているにも関わらず、low-pH環境とピロリ菌 CagA 動態(細胞内移行性やリン酸化、形質変化の出現および炎症性サイトカイン誘導)は不明である。一方で、刺激・ストレス誘導性の急性期因子で細胞内シグナル伝達や分子動態に関与する activating transcription factor (ATF3)がピロリ菌(欧米型: WSS type の CagA 保有)感染後48時間という遅い時期に誘導される事が初めてマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析の結果として報告された。そこで、申請者らは、low-pH環境がピロリ菌 CagA 動態に及ぼす影響と CagA およびそのタイプ(欧米型とアジア型: ESS type の CagA)による ATF3 発現への影響を解析する事を目的に本研究を行った。

[方法]

1. 細胞・ピロリ菌株：感染細胞は AGS 細胞（ヒト胃癌細胞株）を使用した。ピロリ菌は野生株 2 株（HPK5 株(ESS type CagA)と 26695 株(WSS type CagA)）と各野生株の *cagA* 遺伝子破壊株（HPK5CA と 26695CA)を使用した。
2. 感染実験：感染はピロリ菌：AGS（MOI=150：1）で行い、経時的に培養上清（遠心：7000rpm, 5分）と AGS 細胞（PBS 洗浄後スクレイパー使用）を採取した。上清は IL-8 の測定（ELISA）、AGS 細胞は western blotting 法にて CagA およびリン酸化 CagA の解析を行った。また、本菌の運動性による影響を避ける目的で、ピロリ菌と AGS 細胞を混和後、直ちにプレートを 600xg で 5 分間遠心し、synchronized 感染も実施し評価した。
3. Sample 調整：AGS 細胞は PRIA 緩衝液（溶解液）に混和後、ホモジナイザーで破碎し、95℃で 5 分間の熱処理後、western blotting に使用した。
4. Western blotting：5%SDS-PAGE にて電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写、一次抗体として PY99 抗体（抗リン酸化抗体）と抗 CagA 抗体を使用した。二次抗体には anti-mouse IgG 抗体と anti-rabbit IgG 抗体を各々使用した。
5. 免疫沈降：必要に応じ PY99 抗体あるいは抗 CagA 抗体で免疫沈降を行った。
6. IL-8 測定：IL-8 は ELISA キット(Biosource International)を使用しマイクロプレートリーダーにて測定した。
7. 形態観察：ピロリ菌感染後、経時的に AGS 細胞の形態変化を顕微鏡にて観察した。特に細胞内 CagA 機能を反映・特徴付ける hummingbird や needle-like 細胞の出現に注目し実施した。
8. ピロリ菌培養 (low-pH)：通常のプルセラ培養液(pH 6)、塩酸を添加した酸性プルセラ培養液(pH 3)とそれに尿素(5mM)添加した酸性培養液の合計 3 種類を使用した。ピロリ菌は各培養液中に 15 分暴露後、感染実験に用いた。（15 分暴露後の生存ピロリ菌数は 3 種類間で差が無い事を確認済み。）
9. Sequence analysis：HPK5 (ESS type CagA)の *cagA* 配列を解析し決定した。HPK5 の genomic DNA を抽出(QIAamp®DNA Mini Kit)し、作製プライマーにて PCR を実施した。約 3.5kb の PCR 産物は pGEM-T-Easy ベクターに挿入し pCAH5ZN を作製、種々の deletion plasmid を作製(Erase-a-Base® system kit)後にシーケンスを行い全 3.5kb の塩基配列を決定した。
10. ATF3 転写発現解析：AGS 細胞は、TRIzol reagent (Invitrogen)にて総 RNA を抽出後、ATF3 特異的プライマーを使用し RT-PCR(PowerScript™ Clontech)にてその転写発現量を解析した。

[結果]

結果として以下の 5 点が明らかにされた。

1. IL-8 産生誘導と CagA との関連性については議論があるが、本研究結果より、CagA 依存性と非依存性の IL-8 産生誘導が存在した（WSS および ESS 型に無関係）。特に感染初期は CagA 依存性に IL-8 が産生分泌されている事が示唆された。
2. 但し、IL-8 産生誘導の効率およびその分泌量は CagA タイプ(WSS と ESS 型、もしくはリン酸化部位の EPIYA (T)の motif)あるいは菌株間の固有因子により異なると考えられた。

3. low-pH 暴露ピロリ菌の研究結果から、low-pH 環境ではピロリ菌の AGS からの IL-8 誘導が抑制（特に感染初期）されるが、尿素存在下では回復する事より、IL-8 誘導亢進には尿素が必要であると考えられた。

4. また、low-pH 条件下でもピロリ菌体内での CagA は十分に産生されているにも関わらず、感染 AGS 細胞ではそれが反映されていなかった事より、ピロリ菌体内での CagA 動態(シャペロンに関する因子や IV 分泌機構)に low-pH は著しく影響すると考えられた。

5. 刺激・ストレス応答の早期誘導因子である ATF3 は CagA (WSS および ESS 型に無関係)の影響を受けており（特に感染初期、CagA は ATF3 に抑制的に作用）、CagA-ATF3 を介する新たな細胞内シグナル伝達経路を見出した。

申請者らは、炎症性サイトカイン(IL-8)の産生誘導が CagA 依存性と非依存性にピロリ菌感染後の一連の経過中で起っている事を初めて証明し、これまでの議論に一つの結論を示した。low-pH 環境はこの IL-8 誘導を減弱するが、尿素存在では回復する事から尿素の新たなヒト胃内での病原性・組織障害性を示したと考えられる。また、low-pH 環境は CagA の感染細胞内への移行効率が極めて低下する事を明らかにし、同時にその機序がピロリ菌体内での CagA 蛋白のホールディング、シャペロンあるいは分泌機構の構成に影響する事を示唆した。この事は胃内での CagA による病原性・障害の進展は非常にゆっくりしたものであり、慢性持続感染後に高度胃病変の出現を認める臨床病態と一致する事象の可能性があり、臨床的にも興味深い結果である。さらに、新たな細胞内シグナル伝達経路（CagA-ATF3）の存在を示唆したことは本菌の胃内感染・定着および病原性を解明する重要な知見であり、学術的評価も高く、本論文は高知大学医学部博士（医学）に値すると評価された。

氏名(国籍)	Olga Zinchuk (ウクライナ)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第39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19年3月23日
学位論文題目	Dynamics of PAF-induced conjunctivitis reveals differential expression of PAF receptor by macrophages and eosinophils in the rat (PAFにより誘導したラット結膜炎の動態解析-PAFレセプターの発現はマクロファージと好酸球とで異なる)
発表誌名	Cell Tissue Research 317(3), 265-277 2004年9月

審査委員	主査	教授	今井	章介
	副査	教授	小玉	肇
	副査	教授	竹田	泰三




論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

PAFは好酸球の遊走因子であるため、未刺激の状態での好酸球におけるPAF-Rの存在は、PAFによる炎症の過程において、好酸球の浸潤する数がマクロファージに比べ、急激(PAF刺激後30分より開始)かつ有意に増加する理由と考えられる。今回の実験から、PAFの点眼により、臨床的に明らかな結膜炎が起り、浸潤細胞におけるPAF-Rの発現が増加することがわかった。また、その結膜炎の過程において、PAF-Rの発現の程度や発現するタイミングおよび浸潤のパターンがマクロファージと好酸球とは異なることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Olga Zinchuk
審査委員	主 査 氏 名 今 井 章 介	
	副 査 氏 名 小 玉 肇	
	副 査 氏 名 竹 田 泰 三	

題 目 Dynamics of PAF-induced conjunctivitis reveals differential expression of PAF receptor by macrophages and eosinophils in the rat
(PAFにより誘導したラット結膜炎の動態解析-PAFレセプターの発現はマクロファージと好酸球とで異なる)

著 者 Olga Zinchuk, Atsuki Fukushima, Eric Hangstefer, Hisayuki Ueno

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Cell Tissue Research 317(3), 265-277 2004年9月

要 旨

Platelet-activating factor (PAF) は、多様な生物学的反応を引き起こすリン脂質メディエーターである。PAF は、血小板、マクロファージ (Mφ)、好酸球、多核白血球の遊走因子として、また様々なサイトカインの合成や放出に関与し、血管透過性亢進作用も有する。PAFの機能は細胞の PAF-receptor (PAF-R ; G 蛋白関連受容体) を介して発揮される。眼炎症性疾患の病態において PAF の重要性は知られており、PAF-R は様々な眼組織で同定されているが、結膜での PAF-R に関する研究はない。

本研究は PAF により誘導される結膜炎の過程において、好酸球とマクロファージの遊走、ならびに PAF-R 陽性細胞の動態を検討、PAF の病態学的役割を明らかにすることを目的とした。方法は、1%PAF 溶液を雄の Brown Norway ラットに点眼し、点眼前、点眼 30 分後、2 時間後、6 時間後、24 時間後に結膜を採取し、組織学および免疫組織化学的手法、共焦点免疫蛍光顕微鏡 (定量的 colocalization 解析)、reverse transcription (RT)-PCR を用いて検討した。

結果の要点は以下のようにまとめられる。

- 1) PAF 刺激による臨床徴候 (結膜の充血、浮腫性変化等) は、2 時間後で最も顕著で、6 時間後から漸次軽減し始めた。炎症反応の程度の組織学的指標として浸潤細胞数を評価した結果、臨床徴候にほぼ一致して時間依存的に増減した。

- 2) PAF 刺激後の各時間において、Mφ、好酸球、リンパ球、樹状細胞数の変化を特異抗体を用いて検討した結果、結膜に浸潤する Mφの数は、いずれの時間においても増加していたが、好酸球数は6時間後まで急激に増加し、その後 24 時間まで減少した。
- 3) PAF-R 陽性細胞の数は PAF 投与後 6 時間目に急激に増加し、24 時間目にはさらに増加していた。
- 4) 定量的 colocalization 解析により、好酸球は未刺激の状態でも PAF-R を発現しており、PAF 刺激で PAF-R の発現はさらに増加した。この結果は、好酸球が未刺激状態で既に PAF-R を発現していること、PAF が好酸球の遊走因子でもあることから、PAF 誘発結膜炎において、好酸球浸潤が急激（PAF 刺激後 2 時間より）に増加する理由と考えられる。
- 5) 一方、Mφの動態は好酸球のそれとは異なり、未刺激の状態では PAF-R 陰性であったが、PAF 刺激により ED1 陽性 Mφと ED2 陽性 Mφともに一部のポピュレーションではあるが PAF-R 陽性となった。また PAF 刺激後の各時間において ED2 陽性 Mφは ED1 陽性 Mφの約半数程度しか検出されなかったが、24時間後にはほぼ同レベルとなった。つまり PAF 刺激24時間後までは ED1(+)/PAF-R(+) の Mφの方が ED2(+)/PAF-R(+) の Mφよりも多いという Mφの結膜への浸潤動態が明らかとなった。

申請者は本実験で、PAF 点眼により症候的に明らかな結膜炎が誘発されることを示し、このモデルを用いて、当該組織における免疫担当細胞とくに好酸球と Mφの局所動態を明らかにした。また、その結膜炎の過程で、浸潤細胞における PAF-R の発現が増加することに加え、PAF-R 発現のタイミング、PAF-R 陽性細胞の浸潤パターンが Mφと好酸球とは異なることを明らかにした。特に PAF 関連結膜炎の病態において、Mφのサブセットにより異なる機能特性を発揮している可能性を示したことは興味深い知見と言える。

以上から、審査員一同は当論文を高知大学大学院博士（医学）に値するものと判断した。

氏名(本籍)	野口 徹(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第40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19年3月23日
学位論文題目	Regulation of proopiomelanocortin gene transcription during single and repeated immobilization stress (単回および反復拘束ストレス下におけるプロオピオメラノコルチン遺伝子転写調節)
発表誌名	Neuroendocrinology 84(1):21~30 2006年12月

審査委員	主査	教授	由利	和也
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	高尾	俊弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 野口 徹

論文題目

Regulation of proopiomelanocortin gene transcription during single and repeated immobilization stress

(単回および反復拘束ストレス下における
プロオピオメラノコルチン遺伝子転写調節)

(論文要旨)

【目的】視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 系は、ストレス時の神経内分泌反応の根幹をなし、生体のストレスに対する適応に関与している。HPA 系の反応性はストレスの種類によって異なっており、特に慢性ストレスでは、HPA 系が持続的に活性化され生体が不適応状態に陥るストレスや生体の適応により HPA 系の反応性が収束するストレスなど多様である。HPA 系の下垂体レベルでの反応性については、視床下部からの刺激と血中ステロイドによる負のフィードバックのバランスで決まるとされているが、下垂体前葉 (AP) の proopiomelanocortin (POMC) の転写調節についてはいまだ十分な検討がなされていない。そこで本研究では、HPA 系が持続的に活性化することが知られている反復拘束ストレス下における POMC の *in vivo* での遺伝子転写調節について詳細な検討を行なった。

【方法】Wistar 系雄ラットを用い、2 時間の拘束ストレスを 1 日だけ負荷する単回拘束 (sIMO) ストレス群、ならびに 1 日 2 時間の拘束ストレスを 7 日間にわたって負荷する反復拘束 (rIMO) ストレス群を作成し、AP の POMC messenger RNA (mRNA) および heteronuclear RNA (hnRNA) の経時的動態を *in situ* hybridization 法にて測定するとともに、視床下部室傍核 (PVN) の corticotropin releasing hormone (CRH) mRNA および hnRNA の動態との比較検討を行なった。




【結果】ストレス後の血中 ACTH 値は、sIMO、rIMO とともに拘束開始後 15 分を頂値とする著明な上昇を示し、rIMO が sIMO に比して 5 分値で有意に高値を示した。コルチコステロン値は両群で拘束開始後 60 分を頂値とする著明な上昇を示し、最終拘束開始前から 60 分にかけて、sIMO に比して rIMO が高値を示していた。sIMO では、PVN の CRH hnRNA は拘束開始後 15 分を頂値とする著明な上昇を示し、CRH mRNA は 120 分にかけて緩徐ながら有意な上昇を示した。AP の POMC hnRNA は、CRH と同様に 15 分を頂値とする著明な上昇を示したが、POMC mRNA には変化が認められなかった。一方 rIMO では、反復拘束 7 日目の CRH hnRNA 基礎レベルは非拘束群に比して高値を示し、かつ最終拘束開始後 15 分を頂値とする有意な上昇を示した。CRH mRNA に関しては、7 日目の基礎レベルは非拘束群より高いものの、最終拘束ストレスによる上昇は認められなかった。AP の POMC hnRNA は、反復拘束 7 日目の基礎レベルは非拘束群と差を認めなかったが、最終拘束ストレスに対しては sIMO と同様に 15 分を頂値とする著明な上昇を示した。POMC mRNA は最終拘束前の基礎レベルは非拘束群よりも高値を示しており、拘束ストレス

に対しては、sIMO とは異なり拘束開始後 60 分を頂値とする有意な上昇を示した。

【考察】sIMO では、POMC hnRNA の増加に POMC mRNA の変化が伴わないことから、POMC hnRNA の転写後プロセシングの抑制、もしくは POMC mRNA の degradation の亢進により POMC mRNA が増加していないものと考えられる。一方、rIMO では転写後プロセシングの亢進、もしくは POMC mRNA の安定性の増加によって、POMC mRNA レベルが上昇すると考えられる。CRH の反復投与は POMC hnRNA ならびに POMC mRNA を増加させることが知られているが、今回の検討では CRH mRNA にさらなる増加がみられなかったことから、最終拘束時の POMC mRNA の増加に CRH の関与は少ないと考えられる。一方、反復ストレスでは HPA 系を活性化させる因子が CRH から AVP へシフトすることが多数報告されており、我々も既に反復拘束ストレスで PVN 小細胞領域の AVP mRNA が著明に上昇することを見出している。AVP は CRH による POMC 遺伝子転写活性を増強することはないが、POMC mRNA の安定性の増加、POMC hnRNA のプロセシングの亢進を惹起するとの報告があることから、今回の rIMO においても POMC mRNA の増加に AVP が部分的に関与しているものと考えられる。

【結語】反復拘束ストレス下においては、視床下部からの刺激に対し、下垂体の ACTH 産生細胞は POMC hnRNA の転写後プロセシングを亢進させること、あるいは POMC mRNA の安定性を増すことによって POMC mRNA の基礎レベルならびにストレス後のレベルを上昇させており、その結果として下垂体 - 副腎系が持続的に活性化されていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	野 口 徹
審 査 委 員	主 査 氏 名 由 利 和 也	
	副 査 氏 名 椛 秀 人	
	副 査 氏 名 高 尾 俊 弘	

題 目 Regulation of proopiomelanocortin gene transcription during single and repeated immobilization stress
 (単回および反復拘束ストレス下におけるプロオピオメラノコルチン遺伝子転写調節)

著 者 Tohru Noguchi, Shinya Makino, Hiroshi Maruyama, Kozo Hashimoto

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Neuroendocrinology 84(1):21~30 2006年12月

要 旨

寒冷、高熱、放射線、筋労作、炎症、感染、怒り、不安などの物理的、化学的および精神的な刺激が生体に加わると、生体は刺激の種類に応じた特異的反応と、刺激の種類とは無関係な一連の非特異的生体反応(ストレス)を生ずる。このようなストレスは主として視床下部—下垂体—副腎(HPA)系が中心となっており、各種疾患の原因とも関係を有していると考えられている。HPA系は、生体がストレスに対して適応できるようにホルモンを分泌している。すなわち、視床下部からの corticotropin-releasing hormone (CRH) により下垂体前葉から adrenocorticotrophic hormone (ACTH) が分泌され、副腎皮質より corticosterone (CORT) が分泌され生体のホメオスタシスの維持に作用するのである。過去の研究から HPA 系の反応性はストレスが急性か慢性か、あるいは軽微であるか重度であるか

によって異なっていることが知られており、視床下部からの CRH 分泌調節機構を中心に研究が進められてきた。その結果、慢性ストレスにおいては、CRH だけではなく arginine vasopressin (AVP) も関与していることが報告された。下垂体前葉では、proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子が転写され、イントロンとエキソンからなる heteronuclear RNA (hnRNA) が生じ、プロセッシングにより messenger RNA (mRNA) が作成され、翻訳によってできた POMC が加水分解されて ACTH が完成することは周知の事実であるが、下垂体における各種ストレスによる反応性の違いについては、十分には解明されていない。このような背景から申請者らは、急性ストレスと慢性ストレスにおける下垂体の POMC 遺伝子転写調節について詳細な検討を行った。

実験にはウイスター系雄ラットを用いた。急性ストレスのモデルとしては 1 日 2 時間の拘束ストレスを 1 回のみ負荷する単回拘束ストレス群を、慢性ストレスのモデルとしては 7 日間にわたり 7 回の拘束ストレスを負荷する反復拘束ストレス群を作成した。下垂体前葉の POMC hnRNA および mRNA の観察には ^{35}S でラベルされたプローブを用いて in situ hybridization 法を施行し、フィルムの黒化度を定量した。視床下部の CRH hnRNA および mRNA についても同様の検討を行った。また、血漿 ACTH、CORT 量を immunoradiometric assay 法および radioimmunoassay 法にて測定した。

その結果、下垂体前葉の POMC hnRNA の発現量は、単回拘束ストレス群および反復拘束ストレス群ともにストレス終了後 15 分をピークとする有意な増加を示した。POMC mRNA の発現量は、単回拘束ストレス群では変化が認められなかったが、反復拘束ストレス群では 60 分をピークとする有意な増加が認められた。反復拘束ストレス群における POMC mRNA の発現量の基礎レベルは単回拘束ストレス群と比べて有意に増加していた。また、反復拘束ストレス群の視床下部における CRH hnRNA 発現量は単回拘束ストレス群に比べて有意に減少し、CRH mRNA 発現量は有意に増加していた。血漿 ACTH、CORT 量の変化は単回拘束ストレス群および反復拘束ストレ

ス群ともに同様のパターンであったが、反復拘束ストレス群の血漿 ACTH 量は単回拘束ストレス群と比べて拘束後 5 分で、CORT 量は拘束後 5 分から 60 分にかけて有意に増加していた。

本研究より単回拘束ストレス群では下垂体前葉において POMC hnRNA 発現量は増加するが、POMC mRNA 発現量は増加しないことが明らかとなった。一方、反復拘束ストレス群では POMC hnRNA および POMC mRNA 発現量がともに増加していたことより、POMC hnRNA から POMC mRNA が生成され POMC に翻訳されるのであると考えられた。最近、慢性ストレスで HPA 系を活性化させる要因として AVP が注目されており、AVP が POMC mRNA の安定性を増加する、あるいは POMC hnRNA のプロセッシングを促進するという報告があることから、本研究においても反復拘束ストレス群における POMC mRNA の増加に AVP が関与している可能性がある。反復拘束ストレス群では下垂体前葉における POMC mRNA の発現量が増加することにより、HPA 系の反応性が維持されていることが示唆された。

以上のように、本研究はストレスにおける下垂体前葉の POMC mRNA の発現が急性および慢性ストレスによって異なることを明らかにし、種類の異なるストレスに対する HPA 系の反応性が中枢神経系で制御されているだけでなく、下垂体レベルにおいても制御されている可能性を示唆した点で高く評価できるものと判断し、審査員一同は本論文内容が高知大学博士 (医学) に相応しい研究であるものと認めた。

氏名(国籍)	Parijatha Rao (インド)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第41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19年3月23日
学位論文題目	Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma (ヒト腺癌に対するビリルビンの抗腫瘍活性)
発表誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications 342:1279-1283 2006年2月

審査委員	主査	教授	大西	三朗
	副査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	花崎	和弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏 名

パリジャタ ラオ
Parijatha Rao

論文題目

Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human
adenocarcinoma

ヒト腺癌に対するビリルビンの抗腫瘍活性

(論文要旨)

【はじめに】

フリーラジカルは癌の発生因子の一つであり、抗酸化作用を有する物質は細胞内に存在するフリーラジカルの作用を抑制し、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。ビリルビンは、ヘムタンパク質の代謝産物の色素であり、生体には無用な物質あるいは好ましくない物質という理解が長い間されてきた。しかし、近年、生理的濃度 (17 μM) のビリルビンは優れた抗酸化作用を発揮することが判明し、その生体内における役割が注目されるようになってきた。

一方、胆汁酸がミトコンドリアの permeability transition pore の開孔を介して、肝腫瘍細胞 HepG2 にアポトーシスおよびネクローシスを誘導すること、ビリルビンとその前駆体であるビリベルジンは Cu(II) とともに DNA に傷害を誘導することが報告されている。

これらのことより我々は、ビリルビンが腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍作用を発揮するかどうか、およびその作用メカニズムについて解析を行うことを目的とし本実験を行った。

【実験方法】

ヒト由来胃癌細胞株 (TMK-1) を用い、ビリルビン添加 (pH 7.9, 17 μM) にて 48 時間培養し、トリパンブルー染色での生細胞数計測にて細胞増殖抑制を評価した。対照としてウロピリン (pH 7.9, 17 μM) および PBS (17 μM) を添加した。腫瘍細胞周期に与える影響はビリルビンまたウロピリン存在下に 24 時間培養し propidium iodide 染色後、FACS で解析した。細胞内ラジカルは RedCC-1 染色での FACS 解析、DNA 傷害は single cell gel electrophoresis、またアポトーシス誘導は DAPI 染色にてそれぞれ評価した。さらにミトコンドリア電位の変化を Mitotracker Green FM 染色での FACS 解析にて検討した。in vivo でのビリルビン抗腫瘍効果の検討では、雄性ヌードマウス腹腔内に TMK-1 を移入 (5×10^6 cells/0.5ml) し、移入直後に 200 $\mu\text{g/ml}$ のビリルビンを腹腔内に注入した。その後、ビリルビンの腹腔内投与を 1 日 2 回、7 日間継続する群と、一日のみビリルビン投与を 4 回実施する群の 2 つの投与プロトコールを実施し、抗腫瘍効果は腫瘍マーカーの GEA により評価した。

(備考)

論文要旨は、和文1,500字程度にまとめるものとする。
なお、用紙はA4版とし、適宜補充して差し支えない。




【実験結果】

- 1) ビリルビンは、胃癌細胞株の増殖を生理的濃度において抑制した ($p < 0.05$ Vs PBS 処理群、ウロピリン処理群)。ウロピリン処理群、PBS 処理群では腫瘍細胞は抑制を認めなかった。DAPI 染色では、ビリルビン処理群で核の濃縮像を認め、アポトーシス誘導活性が示唆された。
- 2) ビリルビンの添加により細胞周期の G0/G1 での停止が認められた。
- 3) 細胞内ラジカルはビリルビン添加により著明に上昇し、ビリルビンの腫瘍細胞内でのラジカル誘導が示された。ウロピリン添加ではラジカルは産生されなかった。
- 4) ノードマウス腹腔内への TMK-1 移入モデルでは、コントロール群の血中 CEA は 9.96ng/ml であったが、移入直後にビリルビン投与を行った場合、血中 CEA は 5.85ng/ml と抑制を認めた。
- 5) 腫瘍細胞播種翌日にビリルビン投与を実施した場合は、コントロール群とビリルビン投与群間に有意差を認めなかった。

【考察および結論】

これらの結果より、ビリルビンによる腫瘍細胞の増殖抑制が示され、その作用に細胞内のラジカルの増加と細胞周期の G0/G1 期での停止が関与していることが示唆された。また、ビリルビンによるラジカルの産生にミトコンドリアが標的となっていることが示された。In vivo において、腫瘍細胞の播種直後におけるビリルビン処理は腫瘍細胞の増殖を抑制したが、播種直後でない場合は抑制効果は著明ではなかったことから、腫瘍細胞の着床後には効果が限定されることがわかった。臨床応用の可能性としては、胃癌手術直後の腹腔内のビリルビンでの洗浄等が考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Parijatha Rao
審 査 委 員	主 査 氏 名	大 西 三 朗 
	副 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘 

題 目 Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma
(ヒト腺癌に対するビリルビンの抗腫瘍活性)

著 者 Parijatha Rao, Ryoko Suzuki, Shunji Mizobuchi, Tokio Yamaguchi,
Shiro Sasaguri

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Biochemical and Biophysical Research Communications 342:1279-1283
2006年2月

要 旨

フリーラジカルは癌の発生病因子の一つであると共に癌細胞の増殖に関与する。一方、抗酸化物質は細胞内に生じたフリーラジカルを消去し、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。ビリルビンは、ヘムタンパク質の代謝産物の色素であり、新生児核黄疸で代表されるようにその細胞毒性は良く知られている。しかし、近年、生理的濃度のビリルビンは優れた抗酸化作用を発揮することが判明し、その生体内における役割が注目されている。

本研究は、ビリルビンが腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍作用を発揮するかどうか、およびその作用メカニズムについて解析し、ビリルビンの新しい生物学的活性を報告した論文である。

in vitro の実験では、腫瘍細胞としてヒト由来胃癌細胞株 (TMK-1) と肝癌細胞株 (HepG2)、そして正常細胞として線維芽細胞株を用いている。方法としては、まず各細胞をビリルビン添加 (17 μ M, pH 7.9) にて 48 時間培養し、トリパンブルー染色での生細胞数計測にて細胞増殖抑制を評価している。腫瘍細

胞周期に与える影響はビリルビン存在下に 24 時間培養し、propidium iodide 染色後、FACS で解析し、細胞内ラジカルは Red CC-1 染色での FACS 解析、DNA 傷害は single cell gel electrophoresis、またアポトーシス誘導は DAPI 染色にてそれぞれ評価している。ミトコンドリア電位の変化は Mitotracker Green FM 染色での FACS 解析にて検討している。in vivo の実験 では、雄性ヌードマウスの腹腔内に TMK-1 を移入(5×10^6 cells/0.5ml)し、その後、 $200 \mu\text{g/ml}$ のビリルビンを腹腔内に注入し、1 週間後に屠殺し、抗腫瘍効果を腫瘍形成数、腫瘍径および血中 CEA 値で評価している。

その結果、in vitro において、ビリルビンは生理的濃度で TMK-1 の増殖を有意に抑制し、G0/G1 arrest の細胞数の増加が認められた。ビリルビン添加により、TMK-1 細胞内での著明なラジカル産生の誘導が示された。さらに、single cell gel electrophoresis にて DNA 障害が、DAPI 染色にて核の濃縮像、すなわちアポトーシスの誘導が認められた。ミトコンドリア膜電位の低下も観察されている。ビリルビンの代謝産物であるウロビリリンにかかる活性は認められなかった。一方、HepG2 に対しては、増殖を抑制したが、細胞内のラジカル産生は増強せず、アポトーシスは認められなかった。正常細胞である線維芽細胞株に対しては、ビリルビンは増殖抑制を認めなかった。in vivo においては、腹腔内にビリルビン投与により、腹腔内腫瘍形成の抑制が認められた。

以上の結果から、ビリルビンが特定の腫瘍細胞に対して増殖抑制作用を発揮することが示された。すなわち、ビリルビンによる TMK-1 細胞の増殖抑制には、細胞周期の G0/G1 arrest とアポトーシス誘導を伴い、そのメカニズムにはビリルビンによるラジカル産生の増強により、ミトコンドリア機能の障害が関与することが示唆された。したがって、ビリルビンは TMK-1 細胞に対しては既報の anti-oxidant ではなく、prooxidant として細胞内ラジカルを誘導し、抗腫瘍活性を示すと考えられた。in vivo の結果からは、臨床における胃癌切除時の腹膜播種再発予防目的に、閉腹時ビリルビン散布などの臨床応用の可能性が示唆された。

本論文はビリルビンが細胞種によりラジカル産生に biphasic 作用を発揮する事を初めて見出しており、大変興味深い。

公开发表における質疑に対しては、申請者から説得力のある説明と解答が得られた。研究計画、実験方法また実験結果の解釈はいずれも妥当であり、研究の成果は今後に期待をつなぐものと考えられた。したがって、全審査委員が一

致し、本論文は本学の医学博士論文に値すると判定した。

氏名(国籍)	Barroso Paola Andrea (アルゼンティン)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第42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19年3月23日
学位論文題目	The identification of sandfly species, from an area of Argentina with endemic leishmaniasis, by the PCR-based analysis of the gene coding for 18S ribosomal RNA (アルゼンチンのリーシュマニア症流行地におけるサンショウバエ 18S-rRNA 遺伝子の PCR 解析による媒介種鑑別)
発表誌名	Annals of Tropical Medicine and Parasitology 2007年掲載予定

審査委員	主査	教授	谷口	武利
	副査	教授	小玉	肇
	副査	教授	杉浦	哲朗

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 Barroso Paola Andrea

論文題目

The identification of sandfly species, from an area of Argentina with endemic leishmaniasis, by the PCR-based analysis of the gene coding for 18S ribosomal RNA

(アルゼンチンのリーシュマニア症流行地におけるサシチョウバエ 18S-rRNA 遺伝子の PCR 解析による媒介種鑑別)

(論文要旨)

リーシュマニア症は世界保健機関(WHO)が Improved Control of TDR Diseases (2000) に定めた 8 大ターゲット疾患の 1 つで、吸血昆虫のサシチョウバエによって媒介される。サシチョウバエは世界で約 700 種が報告されているが、そのうち *Leishmania* 原虫を媒介するものは 30 数種に限られ、旧大陸では *Phlebotomus* 属、新大陸では *Lutzomyia* 属のものが関与している。1980 年～1990 年代にかけてアルゼンチン北部のサルタ県では 3 回にわたるリーシュマニア症のアウトブレイクが起こり、その病原虫としては *Leishmania (Viannia) braziliensis* がおもに関与しており、ほかに *L. (V.) guyanensis* や *L. (Leishmania) amazonensis* も分布していることが報告されている。一方、流行地のサシチョウバエについては *Lutzomyia neivai*, *Lu. migonei*, *Lu. cortelezzi*, *Lu. punctigeniculata* 及び *Lu. shannoni* の 5 種が知られているが、これらの種のリーシュマニア症媒介者としての役割については不明である。また、媒介サシチョウバエの検索には高度の鑑別能力と、微小昆虫の解剖に多くの時間と労力を必要とするため、流行地での疫学調査やマススクリーニングに適さないばかりか近似種間の鑑別は不可能である。アイソザイム電気泳動法やガスクロマトグラフィーによるキチン質の炭化水素分析は形態的に鑑別困難な種も含め極めて有用であるが、いずれの手法も実施に際しては資料の特別な保存法が要求され、熱帯地域での使用に適さない。このため、分子生物学的手法による簡便かつ正確なサシチョウバエ鑑別法の確立が急務である。

目的：近年、旧大陸の *Phlebotomus* 属のサシチョウバエに関しては 18S-rRNA 遺伝子の PCR 増幅産物を用いた制限酵素切断片長多型 (RFLP: restriction-fragment-length-polymorphism) 解析による種レベル(species level)での鑑別に成功している。そこで、著者らは特別な保存法や高度の鑑別技術を必要としない本法を改良することによって、新大陸の *Lutzomyia* 属とくにアルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地に分布するサシチョウバエに応用し、本症の伝播・疫学あるいは将来のサーベイランスに役立てることを目指した。

材料及び方法：アルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地 3 地区 5 箇所サシチョウバエの活動ピーク時である同国夏季の 12 月-1 月にかけて調査を実施した。実験に用いたすべての




サシチョウバエは夜間 (20:30~22:30) に Shannon trap を用いて採取したものである。サンプルの一部は *Leishmania* 原虫による自然感染の検索や内部形態による種の鑑別に供するため低温(4°C)下に保存し、残りの大半は PCR-RFLP 解析を行なうため、70%エタノールに固定して実験に供した。形態的に *Lu. naevai* と同定されたサシチョウバエ検体から DNA を抽出し、作製した *Lutzomyia* 属 18S rRNA 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を市販のベクター(pGEM-T Easy Vector; Promega, Madison, WI)に挿入し、塩基配列の決定および制限酵素地図の作成を行った。決定した塩基配列は BLAST プログラムにより相同性検索を行い、*Lu. shannoni*, *Lu. geniculata*, *Lu. vattieri*, *Lu. toroensis*, *Lu. verrucarum* 及び *Lu. longipalpis* 18S-rRNA 遺伝子との間でホモロジー解析を行なった。また、エタノール固定した個々のサシチョウバエ検体から DNA を抽出し、同様に PCR を行い、18S-rRNA 遺伝子の増幅を行った。得られた PCR 産物各 5µl を *AfaI* 及び *HapII* の単独又は両方を用いて制限酵素切断片長多型解析を行った。なお、今回採取したサシチョウバエの形態的鑑別は、雌個体では貯精囊その他の内部形態、雄個体では外部形態とくに生殖器の形態に基づいて行なわれた。

結果：得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 新大陸の *Lutzomyia* 属サシチョウバエ 18S-rRNA 遺伝子の増幅には、旧大陸 *Phlebotomus* 属で用いられたプライマーは不適であった。このため、*Lu. 18S 1S* (5'-TGC CAG TAG TTA TAT GCT TG-3') 及び *Lu. 18S AR* (5'-CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC-3') の 2 つの新しいプライマーを作成した。
- 2) RFLP 解析では *AfaI* 及び *HapII* 制限酵素による single 及び double digestion 産物を 3% 又は 4% アガロース下で電気泳動して分離した。
- 3) 今回の DNA 切断片パターンの結果に基づき、リーシュマニア症流行地で採集されたサシチョウバエのほとんどは *Lu. naevai* と同定され、形態的鑑別と一致した。
- 4) アルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地では *Lu. naevai* 以外に *Lu. cortelezzii* や *Lu. sallesi* の 2 種も採取されたが、これらの種は個体数が少なかったため形態学的鑑別のみを行なった。
- 5) *AfaI* 又は *HapII* による 18S-rRNA 遺伝子断片の single digestion はアルゼンチン北部 Salta 県に分布する *Lu. naevai* 以外の *Lutzomyia* 属サシチョウバエの鑑別にも有用であることが示唆された。

結論：本研究は、18S-rRNA 遺伝子の PCR-RFLP 解析がアルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地に分布する *Lutzomyia* 属サシチョウバエ種の鑑別に有用であることを明らかにした。また、今回確立された 18S-rRNA 遺伝子解析によるリーシュマニア症媒介サシチョウバエ種の鑑別法は、アルゼンチン北部に限らず新大陸のほかの流行地においても早急に検討すべきである。なお、今回リーシュマニア症流行地で採取したサシチョウバエ 279 個体について解剖及び PCR によって *Leishmania* 原虫の寄生状況を検索したが陽性個体は認められず、本流行地での自然感染率は極めて低率であることが推測された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Barroso Paola Andrea
審 査 委 員	主 査 氏 名	谷 口 武 利 
	副 査 氏 名	小 玉 肇 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 The identification of sandfly species, from an area of Argentina with endemic leishmaniasis, by the PCR-based analysis of the gene coding for 18S ribosomal RNA
(アルゼンチンのリーシュマニア症流行地におけるサシチョウバエ 18S-rRNA 遺伝子の PCR 解析による媒介種鑑別)

著 者 P. A. Barroso, J. D. Marco, H. kato, R. Tarama, P. Rueda, S. P. Cajal, M. A. Basombrio, M. Korenaga, N. J. Taranto, Y. Hashiguchi

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
Annals of Tropical Medicine and Parasitology 2007 年掲載予定

要 旨

本研究の背景：リーシュマニア症は昆虫媒介性寄生虫感染症で、世界保健機関 (WHO) が西暦 2000 年に Improved Control of Tropical Disease Research (TDR Diseases) に定めた 8 大ターゲット疾患の 1 つである。その媒介昆虫は微小な吸血昆虫のサシチョウバエで、世界で約 700 種が知られているが、*Leishmania* 原虫を媒介する種類は 30 数種と考えられている。この特定種のサシチョウバエと原虫種間の複雑な宿主寄生体関係により増殖、分化するものと考えられているが、その詳細は未だ明らかではない。リーシュマニア症流行地やその周辺地域における媒介サシチョウバエの調査研究は、本症の伝播疫学上重要であるばかりでなく疾病の流行予測や予防対策を講ずる上でも重要であるが、現在、媒介昆虫の調査は、流行地で採取した個体を顕微鏡下で解剖し、その内部、外部形態に基づいて種類鑑別を行い、消化管内寄生の *Leishmania* 原虫を検索する方法がとられている。しかし、この方法は専門的な分類学的知識や熟練した微小昆虫解剖手技等が要求され、流行地の保健医療従事者が容易にかつ大規模に実施できるものではない。このような背景下で、申請者らは分子生物学的手法を用い、媒介昆虫の種鑑別を簡便で、一度に大量の検体が処理できる手技を開発したものである。

研究内容：旧大陸の *Phlebotomus* 属のサシチョウバエに関しては、18S rRNA 遺伝子の PCR 増幅産物を用いて、制限酵素切断片長多型 (RFLP: restriction-fragment-length-polymorphism) 解析による種の鑑別に成功している。しかし、新大陸の *Lutzomyia* 属サシチョウバエ 18S-rRNA 遺伝子の増幅には、旧大陸 *Phlebotomus* 属で用いられたプライマーは不適であった。このため、Blast Search を基に *Lutzomyia* 属に共通する領域で Lu. 18S 1S (5'-TGC CAG TAG TTA TAT GCT TG-3') 及び Lu. 18S AR (5'-CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC-3') の 2 つの新しいプライマーを作成した。その結果、新大陸の *Lutzomyia* 属サシチョウバエ 18S-rRNA 遺伝子の増幅が可能となった。そこで、*Lutzomyia neivai* など数種のサシチョウバエの 18S-rRNA 遺伝子の配列を用いて、*AfaI* 及び *HapII* の単独又は両方で消化し、RFLP 解析を行うとそれぞれ特有の切断長パターンが得られるため、分別可能と判断された。今回、申請者らは新大陸の *Lutzomyia* 属、特に、アルゼンチン北部の流行地に分布する検体を用いて、RFLP 解析を行なった。その結果、アルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地のサシチョウバエのほとんどは *Lu. naevai* と鑑別され、この結果は形態学的鑑別とも一致した。アルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地では *Lu. naevai* 以外に *Lu. cortelezzii* や *Lu. sallesi* の分布も確認されたが、採取個体数が少なく今回は形態学的鑑別にとどまったが、新大陸の *Lutzomyia* 属の鑑別に本研究により開発された PCR-RFLP 法が有効であることが証明された。

審査結果：本研究は 18S-rRNA 遺伝子の PCR-RFLP 解析がリーシュマニア症流行地における媒介昆虫の種鑑別に有用であることを明らかにしたものである。確立された手法は、アルゼンチン北部に限らず新大陸の他の流行地への応用が期待され、リーシュマニア症の伝播疫学、ひいては流行予測や予防 (媒介昆虫) 対策の立案に寄与するところ大であり、その有用性が高く評価される。採取したサンプルを従来低温保存で持ち帰らないと判定できなかつたが、70%エタノール中で保存すれば本解析が可能であるため、今後大規模かつ広範な種鑑別が可能となり、より詳細な流行地の実態把握に基づく効果的な疾病対策に寄与できるので、この成果は大きい。流行地における媒介昆虫の自然感染率は低率であることが推測されるが、今後は媒介昆虫種の鑑別のみならず、*Leishmania* 原虫感染の有無も同時に検出できる簡便かつ正確で大量処理が可能な分子生物学的手法を確立したいとの意向であり、将来展望にも大いに期待が持てる。以上の審査結果から、本研究が本学の医学博士の学位に値するものであると判断した。

氏名(本籍)	廣瀬 享(福岡県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第43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19年3月23日
学位論文題目	Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat steatohepatitis (非アルコール性脂肪肝炎モデルラットにおけるアンギオテンシンIIタイプ1受容体拮抗薬の肝線維化抑制効果の検討)
発表誌名	HEPATOLOGY 2007(in press)

審査委員	主査	教授	本家	孝一
	副査	教授	李	康弘
	副査	教授	花崎	和弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 廣瀬 亨

論文題目

Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis.
in rat steatohepatitis
(非アルコール性脂肪肝炎モデルラットにおけるアンギオテンシン II
タイプ I 受容体拮抗薬の肝線維化抑制効果の検討)

(論文要旨)

【背景】非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は最も一般的な慢性肝障害の原因の1つで、最終的に肝硬変から肝不全に導く。しかしながら、未だ肝線維化に対する有効な治療は確立されていない。最近の研究により、肝星細胞にアンギオテンシンIIタイプIレセプターが発現しており、レニン-アンギオテンシン系(RAS)が、肝星細胞の活性化を介して肝線維化に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかしながら、NASHにおける線維化進展において、RAS systemとの関係を含めて、その機序は明らかにされていない。そこでわれわれは、NASHのコリン・メチオニン欠乏食(MCD食)投与モデルでの肝線維化の進展において、アンギオテンシンIIタイプIレセプターブロッカー(ARB)であるオルメサルタンの線維化抑制効果と、線維化、炎症の進展に寄与する mediator の発現について検討した。




【方法】6週令の雄 Wistar rat を、1)コントロール食+普通水を投与した群、2)MCD食+普通水を投与した群、3)MCD食+0.005%オルメサルタン含有水(0.75mg/kg/day)を投与した群、の3群に分類し、15週間飼育した。肝線維化、肝脂肪滴量評価のため、それぞれアザン染色、オイルレッドO染色を行い、面積率をイメージアナライザーで算出した。transforming growth factor-beta1(TGF- β 1)、tumor necrosis factor-alpha(TNF- α)、I型コラーゲン α 1、tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)、connective tissue growth factor(CTGF)の肝における mRNA 発現量を Real-Time RT-PCR にて定量した。肝星細胞の活性化の評価として α 平滑筋アクチンを、酸化ストレスによるDNA障害度の指標として8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)、脂質過酸化マーカーとして4-hydroxy-nonenal protein(4-HNE)をそれぞれ免疫染色にて評価した。また、肝線維化の強い促進因子であるTGF- β 1の発現、およびその分布について免疫染色にて評価した。

【成績】肝線維化進展および肝脂肪滴量は、MCD食+普通水投与群に対してMCD+ARB投与群で有意に抑制された($p < 0.001$)。TGF- β 1($p < 0.001$)、TNF- α ($p < 0.03$)、I型コラーゲン α 1($p < 0.05$)、TIMP-1($p < 0.001$)のいずれもMCD+ARB投与群で明らかな抑制効果が認められたが、CTGFについては、有意差は見られなかった。また α 平滑筋アクチン、8-OHdGに対する免疫染色では、MCD食+普通水投与群に対してMCD+ARB投与群で有意に抑制された($p < 0.001$)。4-HNE、TGF- β 1に対する免疫染色でもMCD食+普通水投与群に対してMCD+ARB投与群で

抑制傾向を示した。

【考察】MCD 食投与による NASH モデルラットにおいて、ARB は肝星細胞の活性化を抑制することで、肝線維化進展を抑制した。さらに、ARB は NASH における first hit である肝の脂肪化を抑制するとともに、second hit のひとつである酸化ストレスも抑制することが示された。TNF- α は ROS 産生を導き、脂肪肝から脂肪肝炎への進展に重要な因子のひとつであり、TNF- α の重要な産生細胞は Kupffer 細胞と脂肪細胞であることが知られている。われわれの実験結果では ARB により TNF- α 産生が抑制されることが示されたが、肝脂肪化の改善が関与した可能性がある。NASH における線維化進展の実験結果より、NASH 患者の線維化進展抑制に対しても、ARB が有効な治療法となりうる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名
審 査 委 員	主 査 氏 名 本 家 孝 一 
	副 査 氏 名 李 康 弘 
	副 査 氏 名 花 崎 和 弘 

題 目 Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat
teatohepatitis
(非アルコール性脂肪肝炎モデルラットにおけるアンギオテンシンIIタイプ1
受容体拮抗薬の肝線維化抑制効果の検討)

著 者 Akira Hirose, Masafumi Ono, Toshiji Saibara, Jude A Oben, Yasuko Nozaki,
Kosei Masuda, Akemi Yoshioka, Masaya Takahashi, Naoaki Akisawa,
Shinji Iwasaki, Saburo Onishi

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
HEPATOLOGY 2007(in press)

要 旨

【背景・目的】非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、最も一般的な慢性肝障害の原因の1つで、肝線維化を来して最終的には肝硬変の転帰をとる。最近、肝星細胞にアンギオテンシンIIタイプI(AT1)レセプターが発現しており、レニン-アンギオテンシ系を介する肝星細胞の活性化が肝線維化に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかしながら、NASHにおける肝線維化の機序は不明で、有効な治療法も確立されていない。本論文は、NASHのモデル動物であるコリン・メチオニン欠乏食(MCD食)投与ラットにおける、AT1レセプターブロッカー(ARB)であるオルメサルタンの肝線維化抑制効果と、線維化・炎症メディエーターの発現について検討することにより、NASHにおける肝線維化の機序を明らかにするとともに治療法を開発することを目的とした。

【方法】6週令の雄Wistarラットを、1)コントロール食+普通水を投与した群、2)MCD食+普通水を投与した群、3)MCD食+0.005%オルメサルタン含有水を投与した群の3群に分類し、15週間飼育した。肝線維化、肝脂肪滴量評価のため、それぞれアザン染色、オイルレッドO染色を行い、面積率をイメージアナライザーで算出した。肝線維化メディエー

ターとして、transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1)、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、I型コラーゲン α 1、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)、connective tissue growth factor (CTGF) の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR にて定量するとともに、TGF- β 1 の発現分布を免疫染色で調べた。肝星細胞の活性化の指標として、 α 平滑筋アクチンを、酸化ストレスの指標として、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) と 4-hydroxy-nonenal 修飾タンパク質 (4-HNE) の発現を免疫染色で調べた。

【結果・考察】肝線維化進展および肝脂肪滴量は、MCD 食+普通水投与群に対して MCD +ARB 投与群で有意に抑制された ($p < 0.001$)。TGF- β 1 ($p < 0.001$)、TNF- α ($p < 0.03$)、I型コラーゲン α 1 ($p < 0.05$)、TIMP-1 ($p < 0.001$) のいずれも ARB 投与群で明らかな抑制効果が認められたが、CTGF については差が見られなかった。また α 平滑筋アクチン、8-OHdG の発現は、ARB 投与群で有意に抑制された ($p < 0.001$)。4-HNE、TGF- β 1 に対する免疫染色でも ARB 投与群で抑制傾向を示した。

以上のように、NASH モデル動物である MCD 食投与ラットにおいて、ARB は (1) 肝における脂肪蓄積、(2) 酸化ストレス、(3) 肝星細胞の活性化を抑制することで、肝線維化進展を抑制した。ARB の具体的な作用点は不明であるが、広範な肝線維化進展抑制作用を有することが明らかになったことから、レニン-アンギオテンシ系が NASH の肝線維化機序に関わっており、ARB が有効な治療法となりうる可能性が示された。

本論文は、NASH の肝線維化進展機序の一端を明らかにし、治療法開発の道を開いた。よって、本論文は本学の学位に値すると判断した。

氏名(国籍)	刘 钢 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第44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19年3月23日
学位論文題目	Characterization of prolidase activity in rythrocytes from a patient with prolidase deficiency: comparison with prolidase I and II purified from normal human erythrocytes (プロリダーゼ欠損症患者の赤血球中のプロリダーゼ活性の特性：正常人赤血球から精製したプロリダーゼIとIIの比較において)
発表誌名	Clinical Biochemistry 38(7), 625-631 2005年7月

審査委員	主査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	大西	三朗
	副査	教授	小玉	肇

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 劉 鋼

論文題目 Characterization of prolidase activity in erythrocytes from a patient with prolidase deficiency: comparison with prolidase I and II purified from normal human erythrocytes.

(プロリダーゼ欠損症患者の赤血球中のプロリダーゼ活性の特性: 正常人赤血球から精製したプロリダーゼIとIIの比較において)

(論文要旨)

[目的]

プロリダーゼ欠損症患者は X-Pro を加水分解するプロリダーゼが欠損しているために、尿中に多量のイミノジペプチドを排泄していることが報告された。その後、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを用いて、正常人赤血球よりプロリダーゼのアイソゼイム PD I と II が部分精製され、これらの酵素の $MnCl_2$ に対する反応、基質特異性、熱に対する安定性及び PD I と II 活性に対する種々のアミノ酸の効果を調べた。しかし、これまでは精製した PD I と II 活性に対する種々のアミノ酸の詳細な効果及び PD II のサブユニットは明らかでなかった。

そこで申請者は本研究において、改良された方法で正常人赤血球より、PD I と II を分離・精製し、PD I と II の活性及び患者の赤血球中のプロリダーゼ活性に対する種々のアミノ酸といくつかの代謝物質の効果を調べると共に、PD II のサブユニット構造及び患者の酵素の性質についても研究した。

[方法]

1) 正常人赤血球からの PD I と II の分離・精製

正常人の血液から分離された赤血球を 0.9% NaCl で洗い、10 分間 $1000\times g$ で遠心し、その赤血球に 3 倍量の純水を加えて溶血し、溶血したサンプルを等量の 10mM メルカプトエタノールを含む 50mM Tris-HCl Buffer (Buffer A) で希釈し、 $15000\times g$ で 10 分間遠心し、その上澄を DEAE-cellulose, Sephadex G-150, ヒドロキシアパタイトの樹脂を用いて PD I と II を分離・精製した。蛋白質の濃度は Lowry の方法で測定した。

2) プロリダーゼ活性の測定

プロリダーゼ活性は種々のイミノジペプチドを用いて測定した。反応液には $10\mu l$ の酵素液、 $80\mu l$ の 50mM Tris-HCl (pH 7.8) と $10\mu l$ の 20mM $MnCl_2$ を含み、 $37^\circ C$ で 10 分間プレインキュベートし、10mM 基質 $100\mu l$ を加え、 $37^\circ C$ で 30 分間反応した。その反応液に 10% TCA $200\mu l$ を加えて反応を止めた。

遊離したプロリンは Chinard の方法を用いて、分光光度計で測定した。プロリダーゼ欠損症患者

(備考)

論文要旨は、和文1,500字程度にまとめるものとする。
なお、用紙はA1版とし、定直挿入して差し支えない。

のプロリダーゼ活性は患者の赤血球の lysate を用いて測定した。精製されたプロリダーゼ I と II の反応速度論はラインウェーバーバークの式をもちいて測定した。

[結果と考察]

精製された PD I と II は native PAGE でそれぞれ single band であった。SDS-PAGE でも single band を示した。PD I の分子量はこれまで報告されているようにサブユニットは 56 kDa の homodimer であった。一方 PD II のサブユニットは 95 kDa の homodimer と推定された。

我々はこれまでに Gly-Pro に対する PD I の活性が $MnCl_2$ の存在下でグリシンによって強く上昇するが、PD II の活性は上昇しなかった。しかし、Met-Pro に対する活性はグリシンによって約 3 倍に上昇することを報告した。

本研究において PD I と II 及び患者のプロリダーゼ活性に対する種々の L-及び D-アミノ酸の効果を調べた。Gly-Pro に対する PD I の活性は $MnCl_2$ の存在下でグリシン、L-, D-アラニン、L-, D-セリンによって上昇した。D-分枝鎖アミノ酸は低濃度で少し上昇を示したが、L-分枝鎖アミノ酸は濃度依存的にその活性を抑制した。その効果の強さは L-バリン、L-イソロイシン、L-ロイシンの順であった。一方、Gly-Pro に対する PD II と患者のプロリダーゼ活性はグリシンによって効果は認められなかった。Met-Pro に対する PD I, PD II 及び患者のプロリダーゼ活性は種々のアミノ酸によって上昇した。

Met-Pro に対する PD I の活性は L-分枝鎖アミノ酸によって著しく抑制されたが、D-分枝鎖アミノ酸はその活性を上昇させた。PD II と患者プロリダーゼ活性は L-, D-分枝鎖アミノ酸によって上昇した。




Gly-Pro 及び Met-Pro に対する PD I と PD II の活性は L-glutamine と L-glutamic acid によって上昇したが、GABA, NAc-glycine, NAc-glutamic acid の効果は認められなかった。これらの結果はアミノ酸の α -炭素にアミノ基とカルボキシル基が必要であることを示している。

次に種々のイミノジペプチドに対する PD I と PD II 及び患者プロリダーゼ活性に対するグリシンと L-バリンの効果を調べた。種々のイミノジペプチドに対するこれらのプロリダーゼ活性はグリシンによって上昇した。一方 L-バリンは PD I の活性、特に Gly-Pro に対する活性を強く抑制した。Met-Pro, Gly-Pro, Ala-Pro, Ser-Pro, Pro-Pro に対する PD II の活性は L-バリンによって抑制された、しかし、Val-Pro と Phe-Pro に対する活性には効果を認めなかった。これらのイミノジペプチドに対する患者のプロリダーゼ活性は PD II のそれとほぼ同じであった。

次に PD I, PD II 及び患者プロリダーゼの性質とプロリダーゼに対するアミノ酸の作用機構を調べるために、これらのプロリダーゼの Kinetics も調べた。

本研究によって、患者プロリダーゼに対する詳細な作用機構は明らかではないが、ある種々アミノ酸を加えることによって、患者における種々のアミノ酸の再利用を改善し、慢性の下腿潰瘍の治療に役立つことが期待される。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	劉 鋼
審 査 委 員	主 査 氏 名 横 谷 邦 彦	
	副 査 氏 名 大 西 三 朗	
	副 査 氏 名 小 玉 肇	

題 目 Characterization of prolidase activity in erythrocytes from a patient with prolidase deficiency: comparison with prolidase I and II purified from normal human erythrocytes
 (プロリダーゼ欠損症患者の赤血球中のプロリダーゼ活性の特性：正常人赤血球から精製したプロリダーゼ I と II の比較において)

著 者 Gang Liu, Kazuko Nakayama, Yasuhiro Sagara, Shiro Awata, Koichi Yamashita, Masanobu Manabe, Hiroyuki Kodama

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Clinical Biochemistry 38(7), 625-631 2005年7月

要 旨

プロリダーゼ欠損症はイミノジペプチド(X-Pro)を加水分解するジペプチダーゼ(プロリダーゼ)を欠損した常染色体性劣性遺伝性疾患であり、尿中へ多量のイミノジペプチドを排泄する。そのため、患者は生体内プロリンのリサイクル障害により、プロリン含有量の高いコラーゲン等の生成が障害され、難治性の皮膚潰瘍、精神発育の遅延等をきたす。そこで申請者は、高度に分離・精製した正常人プロリダーゼ-I と II、およびプロリダーゼ欠損症患者から得られたプロリダーゼ(患者プロリダーゼ)の、種々のイミノジペプチドに対する酵素活性(加水分解能)およびその活性に対する種々のアミノ酸およびその代謝物質の効果を解析した。

具体的には、正常人赤血球を溶血し、遠心後の上清を DEAE-cellulose、Sephadex G-150、ヒドロキシアパタイト樹脂を用いて、プロリダーゼ-I と II を分離・精製した。患者プロリダーゼは、患者赤血球の溶血液を用いた。プロリダーゼ活性は、基質として種々のイミノジペプチドを用い、インクベーション後に遊離したプロリン(Pro)を分光高度計で測定し算出した。

プロリダーゼ-I と II は、それぞれ 56 kDa, 95 kDa の homodimer であった。次に、プロリダーゼ-I、II、および患者プロリダーゼの活性に対する L-, D-アミノ酸および分枝鎖アミノ酸(L-,D-バリン、L-,D-ロイシン、L-,D-イソロイシン)の効果を解析した。(1) Gly-Pro に対するプロリダーゼ活性：プロリダーゼ-I 活性は、グリシン、L-,D-アラニン、L-,D-セリン、D-

分枝鎖アミノ酸により軽度上昇し、L-分枝鎖アミノ酸により抑制された（抑制効果；L-バリン>L-イソロイシン>L-ロイシン）。一方、プロリダーゼ-II および患者プロリダーゼ活性は、グリシンにより影響されなかった。（2）Met-Pro に対するプロリダーゼ活性：プロリダーゼ-I 活性は L-分枝鎖アミノ酸により抑制され、D-分枝鎖アミノ酸により上昇した。プロリダーゼ-II および患者プロリダーゼの活性は種々のアミノ酸により上昇した。（3）アミノ酸代謝物質のプロリダーゼ活性への効果：Gly-Pro および Met-Pro に対するプロリダーゼ-I、II の活性は、GABA、NAc-glycine, NAc-glutamic acid には影響されなかった。（4）プロリダーゼに対するグリシンとL-バリンの効果：種々のイミノジペプチドに対するプロリダーゼ-I、II および患者プロリダーゼの活性はグリシンにより上昇した。一方、L-バリンは Gly-Pro に対するプロリダーゼ-I 活性を強度に抑制した。種々のイミノジペプチドに対する患者プロリダーゼ活性はプロリダーゼ-II のそれとほぼ同じであった。（5）酵素反応の速度論的解析：Gly-Pro に対するプロリダーゼ-I の K_m 値はグリシンにより低下し、 V_{max} 値は L-valine により低下した。Met-Pro に対するプロリダーゼ-II および患者プロリダーゼの K_m 値は共にグリシンおよび L-valine により低下した。

本論文は、詳細な作用機序は明らかではないが、ある種のアミノ酸の投与がプロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼ活性を促進することを明らかにした。さらに、本患者の慢性下腿潰瘍等の治療にそれらアミノ酸投与の有用性が示唆された。そこで、審査員一同は、本論文が高知大学博士（医学）の学位の授与に値すると判断する。

氏名(本籍)	宮田 恵吉(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第45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19年3月30日
学位論文題目	Induction of apoptosis and cellular senescence in mice lacking transcription elongation factor, Elongin A (転写伸長因子 Elongin A 欠失マウスにおけるアポトーシスと細胞老化の誘導)
発表誌名	Cell Death & Differentiation 2007(in press)

審査委員	主査	教授	執印	太郎
	副査	教授	降幡	睦夫
	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

宮田 恵吉

論文題目

Induction of apoptosis and cellular senescence in mice
lacking transcription elongation factor, Elongin A
(転写伸長因子 Elongin A 欠失マウスにおける
アポトーシスと細胞老化の誘導)

(論文要旨)

⇒ 【背景と目的】

真核生物の転写反応は、開始、伸長、終結、リサイクリングの4つのステップから成り、RNA polymerase II (pol II) と複数の転写因子との複合体によって制御される。最近、転写の伸長過程は、pol II による単純な RNA 鎖合成伸長の段階ではなく、転写された RNA 鎖の成熟や傷害 DNA 鎖の修復の過程ともリンクした遺伝子発現の主要な制御の場であることが明らかになってきた。真核生物ではこれまでに、この段階の反応を促進する転写伸長因子が 10 種余報告されているが、各々の因子が特有の機能をもつことが示唆されている。

転写伸長因子の1つである Elongin は、伸長活性をもつサブユニット Elongin A と調節機能をもつサブユニット Elongin B、C とのヘテロ三量体で構成され、試験管内転写アッセイで pol II の mRNA 合成反応を促進する。我々はこれまでに、Elongin A を欠失したマウス ES 細胞を作製し、ホモ欠失型が著しい増殖遅滞の表現型を示すことを報告しているが、この因子の生物機能については、依然不明な点が多く残されている。

そこで、本研究では、転写伸長因子 Elongin の高等真核生物における生物学的機能と意義の解明を目指して、Elongin A を欠失したマウスを作製し、種々の解析を行った。

【結果】

(1) Elongin A の転写活性に必要な領域をコードする遺伝子部分を欠失させた ES 細胞を用いて、Elongin A 欠失マウスを作製した。Elongin A ヘテロ欠失 (Elongin A^{+/−}) マウスには異常を認めなかったが、Elongin A ホモ欠失 (Elongin A^{−/−}) マウスはアポトーシス亢進を伴う全身性の低形成のために胎生 10.5 日頃に致死となった。また、Elongin A^{−/−} 胎仔由来の線維芽細胞 (MEF) は、アポトーシス細胞比率の増加に加えて、平坦で腫大した細胞形態、SA-β-galactosidase 活性高値、等、早期老化の表現型を示した。

(2) Elongin A^{−/−} と他の遺伝子型の胎仔との間で、RNA 総量に占める mRNA の割合には差を認めなかった。また、野生型と比べて Elongin A^{−/−} 胎仔において発現量が有意に低下している遺伝子は、解析した遺伝子全体の僅か 0.3% であった。発現量が有意に増加している遺伝子も 0.4% に過ぎなかったが、注目すべきは、その内の大部分が低酸素により誘導される遺伝子群であったことである。そこで、低酸素誘導遺伝子の活性化に重要な転写因子 HIF-1α および HIF-2α 蛋白の発現レベルを調べたが、Elongin A^{−/−} 胎仔における有意な上昇は認められなかった。

(備考)

論文要旨は、和文1,500字程度にまとめるものとする。
なお、用紙はA4版とし、適宜補充して差し支えない

学位論文要旨

(3) Elongin A^{-/-} 胎仔におけるアポトーシス誘導の経路を探るため、アポトーシス促進にはたらく癌抑制蛋白である p53 の活性化に重要な p53 Ser18 のリン酸化の程度について調べたところ、Elongin A^{-/-} 胎仔において同修飾が有意に亢進していることが判明した。続いて、MEF における細胞老化関連マーカーの発現について解析した結果、Elongin A^{-/-} の MEF において、p16^{INK4a}、p19^{ARF} ならびに cyclin D1 の劇的な増加、p53 および p21^{WAF1} の中等度の増加、さらには、高リン酸化型 Retinoblastoma 蛋白 (pRb) の減少を認めることが判明した。さらに、細胞老化の誘導には p38 MAPK が重要な役割を演じることが知られているので、活性化 p38 MAPK すなわちリン酸化型 p38 MAPK の量を調べたところ、Elongin A^{-/-} MEF において有意に増加していることが判明した。しかしながら、Elongin A^{-/-} 胎仔においては増加を認めなかった。




(4) Elongin A^{-/-} MEF の表現型誘導における p53 ならびに p38 MAPK 活性化の意義について明らかにするため、各々の阻害剤である pifithrin- α と SB203580 とを用いて救済実験を行ったところ、細胞早期老化は両剤の添加により救済されたが、アポトーシスは救済されなかった。次いで、Elongin A^{-/-} 胎仔の表現型発現における p53 経路の意義を明らかにするため、p53 欠失マウスとの交配により遺伝的背景が p53^{-/-} のマウスを作製したが、Elongin A^{-/-} マウスの胎生致死、胎仔におけるアポトーシス亢進の何れも救済されなかった。

(5) 細胞老化およびアポトーシスの誘導と Elongin A 欠失との関連をより明確にするため、RNAi 法を用いて野生型 MEF の Elongin A をノックダウンしてみた。その結果、ノックダウン細胞は、Elongin A^{-/-} 胎仔由来の MEF と同様に、早期に細胞老化に陥り、リン酸化型 p38 MAPK の増加と共に、一連の細胞老化マーカーの発現上昇を示した。一方、Elongin A^{-/-} 胎仔とは異なり、p53 Ser18 のリン酸化の増加、低酸素誘導遺伝子の発現上昇、ならびにアポトーシスの亢進は認めなかった。

【考察】

我々は、高等真核生物であるマウスの Elongin A の生物学的機能と意義について解析した。Elongin A^{-/-} マウスはアポトーシス亢進によると考えられる発育遅滞のために胎生 10.5 日頃に致死となり、同胎仔由来の MEF は細胞早期老化の表現型を示した。表現型誘導に関わるシグナル経路の解析の結果、細胞老化には p53 と p38-MAPK の両者が、アポトーシス誘導には p53 に加えて低酸素刺激により活性化される未知の因子が関与していると考えられた。また、Elongin A^{-/-} 胎仔においては、細胞増殖性の低下やリン酸化型 p38-MAPK の増加が認められないことから、細胞の老化は MEF 調製後の培養ストレスにより誘導されたものであることが示唆された。最後に、野生型および Elongin A^{-/-} 胎仔の遺伝子発現プロファイルの解析結果から、Elongin A は、基本転写因子としてゲノム全体の遺伝子の発現を制御するのではなく、初期発生あるいはストレス耐性に関わる遺伝子等、選択的な遺伝子の転写に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏名	宮田 恵吉
審査委員	主査氏名 執印 太郎	
	副査氏名 降幡 睦夫	
	副査氏名 山本 哲也	

題 目 Induction of apoptosis and cellular senescence in mice lacking transcription elongation factor, Elongin A
(転写伸長因子 Elongin A 欠失マウスにおけるアポトーシスと細胞老化の誘導)

著 者 K Miyata, T Yasukawa, M Fukuda, T Takeuchi, K Yamazaki, K Sakumi, M Tamamori-Adachi, Y Ohnishi, Y Ohtsuki, Y Nakabeppu, S Kitajima, S Onishi, T Aso

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Cell Death & Differentiation 2007(in press)

要 旨

真核生物の転写反応は RNA polymerase II と複数の転写因子との複合体で制御される。最近、転写伸長過程は、RNA polymerase II により転写された RNA 鎖の成熟や傷害 DNA 鎖の修復過程と関連した遺伝子発現の制御の場であると明らかになってきた。この段階の反応を促進する転写伸長因子が 10 種余報告されて各因子が特有の機能をもつとされている。転写伸長因子の 1 つである Elongin は、伸長活性をもつサブユニット Elongin A と調節機能をもつサブユニット Elongin B、C の三量体で構成され、試験管内転写アッセイで pol II の mRNA 合成反応を促進する。Elongin A を欠失するマウス ES 細胞ではホモ欠失型が著しい増殖遅滞を示すことが報告されているが、Elongin A の機能については不明な点が多い。申請者らは転写伸長因子 Elongin の真核生物における生物学的機能の解明を目的として、Elongin A knockout マウスを作製して *in vivo*, *in vitro* の各々の実験により Elongin A の機能解析を行った。

その結果

- (1) Elongin A ヘテロ欠失 (Elongin A^{+/-}) マウスには異常を認めなかったが、Elongin A ホモ欠失 (Elongin A^{-/-}) マウスは全身細胞のアポトーシス亢進を伴う全身性低形成のために胎生 10.5 日頃に致死であった。Elongin A^{-/-} 胎仔由来の線維芽細胞 (MEF) は、アポトーシス細胞比率の増加に加えて、平坦で腫大した細胞形態、SA-β-galactosidase 活性が高値であり、早期老化の表現型を示した。
- (2) Elongin A^{-/-} と他の遺伝子型の胎仔との間で、RNA 総量に占める mRNA の割合には差を認めなかった。また、野生型と比べて Elongin A^{-/-} 胎仔において発現量が有意に低下している遺伝子は、解析した

遺伝子全体の僅か 0.3%であった。発現量が有意に増加している遺伝子も 0.4%であったが、その内の大部分が低酸素により誘導される遺伝子群であった。しかし、低酸素誘導遺伝子の活性化に重要な転写因子 HIF-1 α 及び HIF-2 α 蛋白の発現レベルを調べたが、Elongin A^{-/-} 胎仔で有意な上昇はなかった (3) Elongin A^{-/-} 胎仔におけるアポトーシス誘導の経路を探るため、アポトーシス促進にはたらく癌抑制蛋白である p53 の活性化に重要な p53 Ser18 のリン酸化の程度について調べたところ、Elongin A^{-/-} 胎仔において p53 Ser18 のリン酸化が有意に亢進していることが判明した。続いて、MEF における細胞老化関連マーカーの発現について解析したが、Elongin A^{-/-} の MEF において、p16^{INK4a}、p19^{ARF} ならびに cyclin D1 の劇的な増加、p53 および p21^{WAF1} の中等度の増加、さらには、高リン酸化型 Retinoblastoma 蛋白 (pRb) の減少を認めることが判明した。さらに、Elongin A^{-/-} MEF において細胞老化の誘導に強く関わるリン酸化型 p38 MAPK が有意に増加していることが判明した。しかしながら、Elongin A^{-/-} 胎仔においては増加を認めなかった。

(4) Elongin A^{-/-} MEF における p53 ならびに p38 MAPK 活性化の意義について明らかにするため、各々の阻害剤である pifithrin- α と SB203580 とを用いて阻害実験を行ったところ、細胞の早期老化は両剤の添加により阻害されたが、アポトーシスは阻害されなかった。また、Elongin A^{-/-} 胎仔の表現型発現における p53 経路の意義を明らかにするため、p53 欠失マウスとの交配により遺伝的背景が p53^{-/-} のマウスを作製したが、Elongin A^{-/-} マウスの胎生致死、胎仔におけるアポトーシス亢進の何れも救済されなかった。

(5) 細胞老化およびアポトーシスの誘導と Elongin A 欠失との関連をさらに検討するため、RNAi 法を用いて野生型 MEF の Elongin A をノックダウンしてみた。その結果、ノックダウン細胞は、Elongin A^{-/-} 胎仔由来の MEF と同様に、早期に細胞老化に陥り、リン酸化型 p38 MAPK の増加と共に、一連の細胞老化マーカーの発現上昇を示した。一方、Elongin A^{-/-} 胎仔とは異なり、p53 Ser18 のリン酸化の増加、低酸素誘導遺伝子の発現上昇、ならびにアポトーシスの亢進は認めなかった。

これらのことから Elongin A^{-/-} マウスはアポトーシス亢進によると考えられる発育遅滞のために胎生 10.5 日頃に致死となり、同胎仔由来の MEF は細胞早期老化の表現型を示し、表現型誘導に関わるシグナル経路の解析の結果、細胞老化には p53 と p38 MAPK の両者が、アポトーシス誘導には p53 に加えて低酸素刺激により活性化などの未知の因子が関与していると考えられた。また、Elongin A^{-/-} 胎仔においては、細胞増殖性の低下やリン酸化型 p38 MAPK の増加が認められないことから、細胞の老化は MEF 調製後の培養ストレスにより誘導されたものであることが示唆された。また、野生型および Elongin A^{-/-} 胎仔の遺伝子発現プロファイルの解析結果から、Elongin A は、基本転写因子としてゲノム全体の遺伝子の発現を制御するのではなく、初期発生あるいはストレス耐性に関わる遺伝子等、選択的な遺伝子の転写に関与していることが示唆された。これらのことから転写伸長因子 Elongin A の生物学的機能について、多くの新規知見を発表した優れた内容であり学位論文に値すると評価した。

氏名(本籍)	奥田 平和(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第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19年1月16日
学位論文題目	Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene <i>HOXB13</i> in human renal cell carcinoma (ヒト腎細胞癌における癌抑制遺伝子候補 <i>HOXB13</i> のエピジェネティックな不活化)
発表誌名	Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 125(2)95-101 2005年3月

審査委員	主査	教授	李	康弘
	副査	教授	山本	哲也
	副査	教授	麻生	悌二郎

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 奥田 平和

論文題目

Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene
HOXB13 in human renal cell carcinoma

(ヒト腎細胞癌における癌抑制遺伝子候補 *HOXB13* のエピジェネティックな不活化)

(論文要旨)




腎細胞癌は本邦において年間 7000 例、米国で年間 30000 例以上の新規症例が見つかる一般的な癌であるが、その発症および悪性化のメカニズムは未解明のままである。一方、発癌過程において DNA メチル化等のエピジェネティックな変化に起因して生じる癌関連遺伝子、特に癌抑制遺伝子の不活化が、種々の癌の発達にしばしば関与することがあきらかになってきている。しかし、腎細胞癌においてメチル化により不活化される遺伝子の同定は進んでいない。そこで腎癌細胞株を用いてゲノムワイドな DNA メチル化部位の探索をおこなうことで腎細胞癌において異常なメチル化を受けている遺伝子を同定し、その機能の解析をおこなうことで、腎細胞癌で不活化されている新規癌抑制遺伝子の同定を行った。

まずゲノムワイドなメチル化 CpG 部位単離法である methylated CpG island amplification / representational difference analysis (MCA/RDA) 法による解析を、二系統の腎癌細胞株を用いておこなうことで、27 個の CpG island が単離・同定された。原発性腎細胞癌症例における、これらの CpG island のメチル化状態を combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法により解析したところ 4 つの CpG island が癌特異的なメチル化を示すことがあきらかになった。BLAST search により、このうち一つは human homeo-box gene B13 (*HOXB13*) 遺伝子と同定されたが、残りの三つの CpG island に既知の遺伝子との関係は認められなかった。原発性腎細胞癌症例および腎癌細胞株における *HOXB13* 遺伝子のメチル化頻度は、それぞれ 30% および 73% であった。Bisulfite sequencing 法によるメチル化解析においても癌特異的なメチル化を示す CpG 部位の存在が *HOXB13* 遺伝子の開始コドン上流域に確認された。原発性腫瘍および腎癌細胞株のいずれにおいても、*HOXB13* 遺伝子のメチル化とその発現の消失には相関が認められ、さらにメチル基転移酵素阻害剤 (5-aza-2'-deoxycytidine; 5-aza-dC) 処理により、その発現が顕著に回復することから、*HOXB13* の発現は主としてメチル化により制御されていることがあきらかとなった。*HOXB13* 非発現腎癌細胞に *HOXB13* 遺伝子を導入・発現させたところ、コロニー形成が阻害され細胞の増殖が抑制された。*HOXB13* 発現細胞は核の凝縮・TUNEL 陽性・Caspase 3 の活性化を示しアポトーシスが誘導されることがあきらかになった。また臨床病理学的には *HOXB13* のメチル化と腫瘍グレードおよび静脈浸潤には顕著な正の相関が認められた。

本研究により、*HOXB13* 遺伝子は、アポトーシスを誘導することで細胞増殖を抑制する癌抑制遺伝子として機能し、その不活化が腎癌発症と悪性化に関与することがあきらかになった。また

HOXB13 遺伝子は癌特異的メチル化を示すことから、メチル化を指標とする腎細胞癌に対する新規腫瘍マーカーとして有望であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	奥 田 平 和
審 査 委 員	主 査 氏 名	李 康 弘 
	副 査 氏 名	山 本 哲 也 
	副 査 氏 名	麻 生 悌 二 郎 

題 目 Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene
HOXB13 in human renal cell carcinoma
 (ヒト腎細胞癌における癌抑制遺伝子候補 *HOXB13* のエピジェネティック
 な不活化)

著 者 H Okuda, M Toyota, W Ishida, M Furihata, M Tsuchiya, M Kamada,
 T Tokino, T Shuin

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Oncogene 2006 March 16;25(12) :1733-1742 2006年3月

要 旨

腎細胞癌は本邦において年間 10,000 例の発症を数える最も一般的な悪性腫瘍の一つであるが、その発生の分子機序に関しては不明の点が多く残されている。学位申請者は癌抑制遺伝子のメチル化によるエピジェネティックな不活化に着目し、転写因子遺伝子である *HOXB13* (homeo-box gene B13) を新規腎細胞癌抑制遺伝子として同定した。

ゲノム上の CpG 配列に富む領域は遺伝子発現制御部位を含むことが多く、この領域にメチル化が起こると下流に存在する遺伝子の発現が不活化される。よって、申請者は最初に二系統のヒト腎癌細胞株を利用して腎細胞癌のゲノムにおいて選択的にメチル化を受ける CpG 領域を網羅的にスクリーニングしたのち、候補領域についてさらに原発性腎細胞癌におけるメチル化を検討する戦略を取った。スクリーニングの方法論としては、ゲノムワイドなメチル化 CpG 部位単離法である MCA/RDA (methylated CpG island amplification / representational difference analysis) 法を採用した。陰性対照としては男女 4 人の正常腎組織ゲノム

DNA のプールを用いた。その結果、27 個の CpG 領域が腎癌細胞株でのみメチル化されていることが明らかとなった。これら 27 個の CpG 領域について、原発性腎細胞癌におけるメチル化を COBRA (combined bisulfite restriction analysis)法によって解析したところ、4 個の CpG 領域についてのみ癌特異的なメチル化が確認できた。この 4 個の CpG 領域の塩基配列を BLAST による相同性検索にかけると、1 個に関してはヒト *HOXB13* 遺伝子の配列に一致した。残りの 3 個については、既知遺伝子との相同性は発見できなかった。*HOXB13* のメチル化頻度をさらに多くの原発性腎細胞癌症例および腎癌細胞株で調べると、それぞれ 30%、70%と高頻度であり、この遺伝子変化は腎発癌においてかなり一般的なものであることが判明した。

申請者は *HOXB13* を腎細胞癌抑制遺伝子の有力候補と考え、同遺伝子に絞ってさらに詳細な分析を進めた。まず、bisulfite sequencing 法を利用したメチル化解析によって癌特異的なメチル化を呈する CpG 領域が *HOXB13* の上流に位置することを証明した。また、原発性腫瘍および腫瘍細胞株のいずれにおいても *HOXB13* 遺伝子のメチル化とその発現消失に相関を認めた。*HOXB13* 非発現腎癌細胞株ではメチル化阻害剤存在下で *HOXB13* の発現が回復することより、*HOXB13* の不活化にはメチル化が直接寄与しているものと結論された。*HOXB13* 非発現腎癌細胞株に外来性の *HOXB13* 遺伝子を導入し、強制発現させたところ、試験管内における細胞のコロニー形成が阻害された。この阻害は *HOXB13* 発現によりアポトーシスが誘導されるために起こることを複数のアポトーシス随伴因子の測定により明らかにした。よって、*HOXB13* の不活化は腫瘍細胞のアポトーシスを抑制し、腫瘍の増大をもたらすものと推定された。強制発現による *HOXB13* 蛋白はその転写因子としての機能を反映して、細胞の核内に局在していた。一方、組織病理学的パラメーターと *HOXB13* メチル化の関係を検討すると、同遺伝子のメチル化は組織学的腫瘍悪性度ならびに静脈浸潤と正相関を示すことが分かった。したがって、*HOXB13* のメチル化解析は腎細胞癌の予後判定に応用できる可能性がある。

以上、本研究は新規腎細胞癌抑制遺伝子として *HOXB13* 遺伝子を同定したのみでなく、その腎発癌における生物学的役割についても深く追究し、最終的には *HOXB13* のメチル化が腎細胞癌の予後判定指標になり得ることをも明確に示した。審査委員一同の合議において、研究の意義、完成度ともに極めて高く評価され、医学博士の学位授与に値するとの判定が成された。

氏名(本籍)	高木 洋(福岡県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第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19年2月9日
学位論文題目	Postexercise VO_2 "Hump" phenomenon as an indicator for inducible myocardial ischemia in patients with acute anterior myocardial infarction (急性前壁心筋梗塞後患者における誘発心筋虚血指標としての運動負荷後の VO_2 "Hump" 現象)
発表誌名	International Journal of Cardiology 111:67~74 2006年7月

審査委員	主査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	土居	義典
	副査	教授	笹栗	志朗

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 高木 洋

論文題目

Postexercise VO_2 "Hump" phenomenon as an indicator for inducible myocardial ischemia in patients with acute anterior myocardial infarction

(急性前壁心筋梗塞後患者における誘発心筋虚血指標としての運動負荷後の VO_2 "Hump" 現象)

(論文要旨)

急性心筋梗塞後患者の管理において、残存心筋虚血の有無を評価することは極めて重要である。しかしながら、これら心筋梗塞後患者では、通常の運動負荷心電図による虚血診断能力には限界があり、特に異常q波を有する前壁梗塞例での診断精度は低いことが知られている。一方、呼気ガス分析を併用した運動負荷試験 (CPET) は、従来、運動耐容能の測定、心不全重症度や予後判定を主な目的として施行されてきたが、近年、心臓リハビリテーション適応の拡大や分析装置の普及などにより、これら急性心筋梗塞後患者に対しても本検査を施行する施設は増加している。しかしながら、呼気ガス分析で得られる情報が心筋虚血の診断に有用か否かについての検討はほとんどなされていない。我々の施設ではこれまで多数の急性心筋梗塞後患者でCPETを行ってきたが、そのうち心筋虚血が残存する症例では、運動負荷後回復期の VO_2 減衰曲線の初期部分 (1分前後) に特徴的な瘤状 ("Hump") の形状を呈する異常成分 (指数関数的な減衰を示さない成分) が認められることを観察してきた。本研究の目的は、心筋虚血の心電図診断が困難な急性前壁心筋梗塞後患者を対象として、この "Hump" 現象が誘発心筋虚血の指標として有用か否かを検証することである。

【方法】急性前壁心筋梗塞で入院し退院時にCPETが施行された心不全徴候のない症例から、残存虚血を有する30例 (Group-I) と有さない29例 (Group-N) を対象として選択した。残存虚血の有無は、冠動脈造影と運動負荷心筋シンチグラフィの結果により判定した。CPETは、座位自転車エルゴメーターによる症候限界性のランプ負荷法で行った。運動後の VO_2 減衰曲線における "Hump" を評価するために、まず、運動終了時点から運動後4分までの6秒ごとの VO_2 の時系列データを最高酸素摂取量 (peak VO_2) で標準化した。次に、この時系列データの peak VO_2 (0秒) と90~240秒のデータ (6~84秒のデータは除外) を非線形最小二乗法を用いて指数関数近似することより、"expected VO_2 " を算出した。実測された VO_2 からこの "expected VO_2 " を差し引いた差分を "D-curve" (指数関数的な減衰を示さない成分) と定義して2群間で比較検討した。

備考




この論文は、学位論文の一部として提出されたものである。詳細は、学位論文全文を参照してください。

学位論文要旨

【結果】心筋梗塞による異常 q 波誘導での運動誘発性 ST 上昇は、2 群ともほぼ同頻度に出現した (Group-I で 47%、Group-N で 55%)。一方、運動誘発性の有意な ST 低下は、心筋虚血のない Group-N の 1 例 (3%) に比べ、心筋虚血を有する Group-I でより高頻度 (8/30 例) に見られたものの、その出現頻度は 27% と極めて低率であった。D-curve を 2 群間で比較すると、Group-I は Group-N に比べて、ピークとなる時間が遅く (43 ± 15 vs 31 ± 13 秒、 $p < 0.01$)、かつ、そのピーク値は大きかった (20 ± 8 vs 16 ± 6 %、 $p < 0.05$)。そこで、D-curve がピークを示す時間が 40 秒以上で、かつピーク値が 15% 以上の場合を“Hump”現象陽性と定義すると、この“Hump”現象は、Group-I の 30 例中 17 例 (57%) で陽性であったが、Group-N には 29 例中 1 例 (3%) にみられたのみであった。すなわち、“Hump”現象の有無により、残存虚血の存在を感度 57%、特異度 97% の精度で診断することが可能であった。

【結論】運動負荷後回復期の VO_2 減衰曲線にみられる一過性の“Hump”現象 (運動終了後約 60 秒にピークを有する瘤状の異常成分) は、診断感度は必ずしも高くないものの、誘発心筋虚血の診断指標として特異性の高いものであることが示された。本現象の有無を観察することは、特に異常 q 波を有する前壁梗塞例のような心筋虚血の心電図診断が困難な症例において有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	高 木 洋
審 査 委 員	主 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 
	副 査 氏 名	土 居 義 典 
	副 査 氏 名	笹 栗 志 朗 

題 目 Postexercise VO₂ “Hump” phenomenon as an indicator for inducible myocardial ischemia in patients with acute anterior myocardial infarction
(急性前壁心筋梗塞後患者における誘発心筋虚血指標としての運動負荷後のVO₂ “Hump”現象)

著 者 Hiroshi Takaki, Satoru Sakuragi, Noritoshi Nagaya, Shoji Suzuki, Yoichi Goto, Takayuki Sato, Kenji Sunagawa

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
International Journal of Cardiology 111:67~74 2006年7月

要 旨

【背景および目的】

急性心筋梗塞後、残存心筋虚血の有無を評価することは患者の管理上極めて重要である。しかしながら、異常Q波を有する梗塞例では、通常の運動負荷心電図による虚血の診断精度は低い。一方、呼気ガス分析を併用した運動負荷試験 (CPET) は、従来より心不全患者に対し運動耐容能の測定、重症度や予後判定などを目的に施行されているが、近年、急性心筋梗塞後患者に対しても本検査を施行する施設は増加している。しかしながら、呼気ガス分析で得られる情報が心筋虚血の診断に有用か否かについての検討はほとんどなされていない。申請者らは急性心筋梗塞後患者でCPETを行い、心筋虚血が残存する症例では運動負荷後回復期のVO₂減衰曲線の初期部分(1分前後)に特徴的な瘤状(“Hump”)の形状を呈することを観察してきた。そこで本研究は、心筋虚血の心電図診断が困難な急性前壁心筋梗塞後患者を対象として、この“Hump”現象が運動誘発心筋虚血の指標として有

用か否かを検証することを目的とした。

【方法】

急性前壁心筋梗塞で入院し、退院時に CPET が施行された心不全徴候のない症例を対象とした。冠動脈造影により有意狭窄の有無、運動負荷シンチグラフィにより残存虚血の有無を判定し、有意狭窄と残存虚血を有する 30 例 (Group-I) と有意狭窄を有さない 29 例 (Group-N) の 2 群に分類した。CPET は、座位自転車エルゴメーターによる症候限界性のランブ負荷法で行い、運動後の VO_2 減衰曲線における “Hump” 現象 (運動終了後約 60 秒にピークを有する瘤状の異常成分) を評価するために、運動終了時点から運動後 4 分までの 6 秒ごとの VO_2 の時系列データを最高酸素摂取量 (peak VO_2) で標準化した。この時系列データの peak VO_2 (0 秒) と 90~240 秒のデータを非線形最小二乗法を用いて指数関数近似することより、“expected VO_2 ” を算出した。実測された VO_2 から “expected VO_2 ” を差し引いた差分を “D-curve” と定義して 2 群間で比較検討した。

【結果】

得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 心筋梗塞による異常 Q 波を認める誘導での運動誘発性の ST 上昇は、2 群ともほぼ同頻度に出現した (Group-I で 47%、Group-N で 55%)。一方、運動誘発性 ST 低下は Group-N の 1 例 (3%) に比べ、Group-I で 30 例中 8 例とより高率にみられたが、その出現頻度は 27% と低かった。
- 2) Group-I は Group-N に比べて D-curve のピーク時間が遅く (43 ± 15 vs 31 ± 13 秒、 $p < 0.01$)、そのピーク値は大きかった (20 ± 8 vs 16 ± 6 秒、 $p < 0.05$)。
- 3) D-curve がピークを示す時間が 40 秒以上かつピーク値が 15% 以上を “Hump” 現象陽性と定義すると、この “Hump” 現象は Group-I の 30 例中 17 例 (57%) にみられたが、Group-N では 29 例中 1 例 (3%) のみであった。
- 4) 残存虚血の存在に対する “Hump” 現象の感度は 57%、特異度は 97% で、“Hump” 現象は残存虚血に対して高い特異度を示した。

申請者らは、急性前壁心筋梗塞患者の院内慢性期における残存虚血検出に対する CPET の有用性を検討した。その結果、運動負荷後回復期の VO_2 減衰曲線にみられる一過性の “Hump” 現象は、運動誘発心筋虚血の診断指標として診断感度は必ずしも高くないものの特異性の高いものであることを示した。本現象の有無を観察することは、心筋虚血の心電図診断が困難な症例においても有用であり、心筋梗塞後の残存虚血の非観血的検出法として貢献するところが大きい。したがって、本論文は高知大学博士 (医学) に値すると評価された。

氏名(本籍)	中島 喜美子 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第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19年3月6日
学位論文題目	Xanthoma tissue-extracted LDL density substances are the main inducer of myelin-like bodies and ceroid granules in foam cells (泡沫細胞中の myelin-like bodies と ceroid granules は主として黄色腫組織抽出 LDL 比重物質によって誘導される)
発表誌名	MEDICAL MOLECULAR MORPHOLOGY 2007年掲載予定

審査委員	主査	教授	由利	和也
	副査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	杉浦	哲朗

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 中島喜美子

論文題目

Xanthoma tissue-extracted LDL density substances are the main inducer of myelin-like bodies and ceroid granules in foam cells.
(泡沫細胞中の myelin-like bodies と ceroid granules は主として黄色腫組織抽出 LDL 比重物質によって誘導される。)

(論文要旨)

<目的>

黄色腫は組織学的に泡沫細胞の浸潤を特徴とする。泡沫細胞の微細構造は、membrane-bound lipid vacuoles, membrane-free lipid vacuoles, cholesterol crystals, multivesicular or multilocular lipid bodies, myelin-like bodies および ceroid granules で構成されるが、myelin-like bodies と ceroid granules の由来は明らかではない。本研究は、泡沫細胞における myelin-like bodies と ceroid granules の由来を電子顕微鏡学的に明らかにし、泡沫細胞の超微細構造形成について考察する。

<方法>

1. 黄色腫組織によって酸化的修飾を受けたLDLの調整

食事性高コレステロール血症ウサギ背部に高分子デキストラン硫酸溶液を皮内注射することによって実験的黄色腫を作製した。健常ヒト空腹時血漿より超遠沈分離 (比重 1.019-1.063) した native LDL (n-LDL) を、実験的黄色腫とともに孵置した後に LDL 分画を超遠沈法にて再分画採取し、黄色腫病変部に漏出して修飾を受けた LDL (xanthoma tissue-modified LDL; x-LDL) のモデルとした。

2. 黄色腫組織中のLDL比重物質および crude materialsの抽出

実験的黄色腫組織を細切、破碎後に、遠心分離した上澄みを crude materials とした。また、さらに超遠沈分離した物質 (比重 1.019-1.063) を黄色腫組織抽出の LDL 比重物質 (xanthoma tissue-extracted LDL density substance; ex-LDL) とした。

3. マクロファージの泡沫細胞への転換




マウスの腹腔マクロファージを 25 μg protein/ml の n-LDL, x-LDL あるいは ex-LDL とともに 24 時間培養することにより泡沫細胞化を誘導した。マクロファージを回収して透過電子顕微鏡により観察した。

<結果および考察>

x-LDL と培養したマクロファージの細胞質には、主に membrane-bound lipid vacuoles が形成され、少数の membrane-free lipid vacuoles も存在した。ex-LDL と培養したマクロファージの細胞質には多数の myelin-like bodies と少数の ceroid granules を認めた。また crude materials と培養したマクロファージには多数の vacuoles containing vesicular structures を認めた。これらの結果から、

泡沫細胞におけるmembrane-bound lipid vacuolesは、黄色腫組織によって酸化的修飾を受けたLDLがマクロファージに取り込まれてライソゾーム中で加水分解されたものと考えられる。また、membrane-free lipid vacuolesは、細胞質に放出された遊離コレステロールが再エステル化され形成されたと考える。また、myelin-like bodiesとceroid granulesは、主として黄色腫組織中のLDL比重物質由来であり、このLDL比重物質は結合組織に存在するものと共に崩壊した泡沫細胞の成分も含まれ、これをマクロファージが取り込むことによって泡沫細胞病変が存続すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	中 島 喜美子
審 査 委 員	主 査 氏 名	由 利 和 也 
	副 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 Xanthoma tissue-extracted LDL density substances are the main inducer of myelin-like bodies and ceroid granules in foam cells
(泡沫細胞中の myelin-like bodies と ceroid granules は主として黄色腫組織抽出 LDL 比重物質によって誘導される)

著 者 Kimiko Nakajima, Mitsunori Ikeda, Ken-ichi Yagyū, Hideki Nakajima, Masaaki Matsumoto, Masahiro Seike, Hajime Kodama

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
MEDICAL MOLECULAR MORPHOLOGY 2007年掲載予定

要 旨

黄色腫は、眼瞼、手掌、指、肘、膝、アキレス腱などに見られる黄色の結節型、発疹型または扁平型の皮膚病変である。組織学的には、細胞体に大量の脂質が蓄積した組織球（マクロファージ）である泡沫細胞が真皮内に多数浸潤することによって生じるものであり、動脈粥状硬化症に類縁する肉芽腫性炎症である。基本的には高脂血症に伴い、臨床型は高脂血症のタイプと強く関連する。

泡沫細胞の細胞質における微細構造は membrane-bound lipid vacuoles、membrane-free lipid vacuoles、コレステロール結晶、multivesicular lipid vacuoles、multilocular lipid vacuoles、myelin-like bodies および ceroid granules などさまざまに分類される。これらのうち lipid vacuoles の形成にはライソゾームが関与すると考えられている。Membrane-bound lipid vacuoles は血管

外に漏出して酸化された低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein, LDL) が scavenger receptor を介してマクロファージに取り込まれ、ライソゾームで処理されたものであり、membrane-free lipid vacuoles は LDL 由来のコレステロールエステルがライソゾームで加水分解され、細胞質内に放出された遊離コレステロールが再エステル化されてできると考えられている。しかしながら myelin-like bodies と ceroid granules の由来については不明な点が多い。本研究において申請者らは、マクロファージを正常 LDL、黄色腫組織で酸化された LDL、黄色腫組織ホモジネートおよびそこから分離した LDL 比重分画とインキュベーションし、その微細構造より myelin-like bodies と ceroid granules の形成機構について検討を行った。

正常 LDL は、健常ヒト空腹時血漿より超遠沈分離したものをを用いた。酸化 LDL は正常 LDL を高コレステロール血症のウサギの皮内にデキストラン硫酸溶液を注射して実験的に作成した黄色腫組織を細切したものと 37 度で 24 時間インキュベーションして作成した。黄色腫由来 LDL 比重分画は実験的に作成した黄色腫を細切したもので超遠沈分離して得た。また、マクロファージはマウスの腹腔内より得られたものをを用いた。マクロファージをこれらの LDL とともに 24 時間インキュベーションした後に固定を行ない、電子顕微鏡にて細胞質内の脂質顆粒の観察を行った。

その結果、正常 LDL とインキュベーションしたマクロファージの細胞質には、少数の lipid vacuoles しか観察されなかった。酸化 LDL と培養したマクロファージの細胞質には、多数の membrane-bound lipid vacuoles が形成され、少数ながら membrane-free lipid vacuoles も認められた。黄色腫組織由来 LDL 比重分画と培養したマクロファージの細胞質には多数の myelin-like bodies と少数の ceroid granules を認めた。また黄色腫由来 LDL 比重分画を含むホモジネートとインキュベートしたマクロファージにおいては multivesicular vacuoles が主体で、myelin-like bodies や ceroid granules も存在した。

酸化 LDL を培養液に添加した時に、多数の membrane-bound lipid vacuoles と少数の membrane-free lipid vacuoles がマクロファージの細胞質に多量に観察されたことは、血管外に漏出した LDL が黄色腫組織内で酸化されてマクロファージに取り込まれ、ライソゾームに転送されて membrane-bound lipid vacuoles になり、放出された遊離コレステロールが再エステル化されて membrane-free lipid vacuoles となる場合と相同であると考えられた。また、正常 LDL や酸化 LDL を培養液に添加しても、myelin-like bodies と ceroid granules はほとんど形成されず、これらの脂質顆粒は、黄色腫由来 LDL 比重分画とインキュベーションした場合に多数観察されたことより、マクロファージが結合組織間に存在する LDL 分画のみならず、アポトーシスに陥った泡沫細胞由来の LDL 比重分画の脂質蛋白複合体を取り込むことにより形成されることが示唆された。黄色腫においては、泡沫細胞はアポトーシスと多種の脂質材料を取り込むことによる新生のリクルートメントが繰り返し起こり、病変が存続しているのではないかと考えられた。

以上のように本研究は黄色腫の本体をなす泡沫細胞における脂質顆粒の形成メカニズムと黄色腫の病態解明に貢献した点で高く評価され、審査員一同は高知大学博士（医学）に相当する研究であると認めた。

氏名(本籍)	中野 琢巳(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第33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19年3月20日
学位論文題目	Effects of geldanamycin and thalidomide on the Th1/Th2 cytokine balance in mice subjected to operative trauma (マウス手術侵襲モデルにおける geldanamycin および thalidomide 投与による Th1/Th2 サイトカイン変動についての研究)
発表誌名	Surgery 2007年(in press)

審査委員	主査 教授	宇高 恵子
	副査 教授	横谷 邦彦
	副査 教授	笹栗 志朗

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 中野琢巳

論文題目

Effects of geldanamycin and thalidomide on the Th1/Th2 cytokine balance in mice subjected to operative trauma

(マウス手術侵襲モデルにおける Geldanamycin および Thalidomide 投与による Th1/Th2 サイトカイン変動についての研究)

(論文要旨)

背景：侵襲後のサイトカインの変動については、従来熱傷モデル、敗血症モデル等での検討はみられるが、手術侵襲の大小が直接、サイトカイン合成に及ぼす影響についての系統だった報告はない。一方、手術による過侵襲は、Th1/Th2 サイトカイン比のバランスの不均衡を生じ、敗血症等の重篤な合併症を高率に発症するとされる。そのため、術後の Th1/Th2 サイトカイン比の不均衡を早期に改善する事は重篤な合併症の発症を軽減、予防する事が期待される。

Hsp90 (Heat Shock Protein90) は細胞内で多くのシグナル伝達を担うタンパク質 (client proteins) と複合体を形成して、種々のシグナルの伝達に関与している。一方、Geldanamycin (benzoquinone ansamycin, GA) はHsp90の阻害剤であるが、Bucci等はマウスでのGeldanamycin投与による抗炎症作用 (Carrageenanによって惹起された足背部の腫脹の軽減) を報告している (Brit J Pharmacol, 2000)。RU486はglucocorticoid receptor (GR) の阻害剤で、Hsp90がclient proteinであるGRよりの解離する事を阻害し、結果GRの核内への移動を妨げる作用を有し、glucocorticoid receptorの活性化のメカニズムの検証に有用とされる。また、Thalidomideは元来、鎮静剤であったが、妊婦での催奇形性のためその後使用される事は稀であった。しかし、近年この薬の持つ抗炎症作用、抗血管新生作用等が再評価され、一部の自己免疫性疾患や悪性腫瘍においての使用が検討されてきている。Haslett等はin vitroでの実験においてThalidomideのIL-2産生の促進効果を報告している (J Exp Med; 1998)。

目的：マウスに大小の手術侵襲を加え、侵襲後24時間の免疫細胞におけるサイトカインの変動を、mRNA発現レベル、細胞内サイトカイン合成レベル、また末梢血の血清サイトカインレベルから観察し、大小の手術侵襲が直接免疫細胞に与える影響を比較検討した。さらに、Geldanamycin及びThalidomideによる手術侵襲後に低下した免疫能改善の可能性についても検討した。

方法：8-12週の雄マウス (C57BL/6, 平均体重23g) を用いて大小の手術侵襲モデルを作製した。大侵襲術として回盲部切除術 (ICR), 小侵襲術として単開腹術 (SL) を行い、主群 (4 subgroups) とコントロール群 (4 subgroups) でのGeldanamycin及びThalidomide投与によるサイトカインの変動、効果を検討した。さらにTNF- α mRNA発現については回盲部切除術 (ICR) にGlucocorticoid receptor (GR) の阻害剤であるRU486を投与したRU486群も追加して検討した。

主群： 1) ICR群：回盲部切除術 (ICR) + DMSO (200ul) i. p. 2) GA群：回盲部切除術 (ICR) + GA (1mg/kg) i. p. 3) THD群：回盲部切除術 (ICR) + THD (1mg/kg) i. p. 4) SL群：単開腹術 (SL) + DMSO (200ul) i. p.

コントロール群： 5) SGA群：単開腹術 (SL) + GA (1mg/kg) i. p. 6) THD群：単開腹術 (SL) + THD (1mg/kg) i. p. 7) AGA群：麻酔 (Anesthesia) + GA (1mg/kg) i. p. 8) ATHD群：麻酔 (Anesthesia) + THD (1mg/kg) i. p.




RU486群：回盲部切除術 (ICR) + RU486 (5mg/kg) (RT-PCRのみ施行)。

各薬剤は、術前日、手術終了時の2回腹腔投与。術後3, 6, 12, 24時間後に麻酔下に頸椎脱臼にてマウスを犠牲死させて脾臓を摘出。採取した脾臓よりFlow cytometryにより細胞内サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α) 合成能を、またReverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) にてサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α) のmRNA発現を検討した。さらに眼窩静脈より採取した血清を用いて、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) で血清サイトカイン値を測定した。

結果： 1) 大侵襲ICR群では術後初期よりのIL-10合成の亢進が認められ、同時にTNF- α とIL-2合成は抑制されていた。2) 小侵襲SL群では術後早期のIL-2合成が認められ、また術後3時間においてIL-4合成の亢進所見が特徴的に認められた。3) 大侵襲にGeldanamycinまたはThalidomideを投与したGA群、THD群においては術後早期のIL-10の発現、合成は減少し、同時に早期の血清IL-2の上昇を認めた。4) Geldanamycin投与により侵襲後3時間において特徴的にTNF- α の発現、合成の亢進所見が認められた。5) 大侵襲にRU486を投与した群では術後3時間から24時間に至るまで著明なTNF- α mRNAの発現を認めた。

考察および結語： 大小の手術侵襲は術後初期において、それぞれ異なったTh1/Th2 サイトカイン変動のパターンを示した。Geldanamycin と Thalidomide は、それぞれ大侵襲後のTh1/Th2 サイトカインの不均衡を改善した。手術侵襲後のTNF- α mRNA発現のメカニズムについては、少なくとも一部はglucocorticoid receptorを含むHsp90のclient proteinが関与している事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名		中 野 琢 己
審 査 委 員	主 査 氏 名	宇 高 恵 子	
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦	
	副 査 氏 名	笹 栗 志 朗	

題 目 Effects of geldanamycin and thalidomide on the Th1/Th2 cytokine balance in mice subjected to operative trauma
(マウス手術侵襲モデルにおける geldanamycin および thalidomide 投与による Th1/Th2 サイトカイン変動についての研究)

著 者 Takumi Nakano, Keiji Araki, Hajime Nakatani, Michiya Kobayashi, Takeki Sugimoto, Yasuo Furuya, Takanori Matsuoka, Toufeng Jin, Kazuhiro Hanazaki

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Surgery 2007年(in press)

要 旨

中野琢己先生の学位論文公開審査は、3月12日18時より、約1時間にわたり行われた。まず、研究内容の発表があった。

外科手術後の抗炎症は、今も改善の余地が残される課題である。これまでに、外傷や熱傷、敗血症モデルを使った研究において、侵襲後には主として Th2 優位のサイトカイン環境が誘導され、逆に Th1 サイトカイン環境は減弱しており、そのことが、術後の易感染性と関連がある、という報告がある。そこで申請者らは、腹腔手術後の脾細胞の Th1/Th2 サイトカインバランスに注目して、Th1 サイトカインの代表として IL-2、TNF α 、Th2 サイトカインの代表として IL-4、IL-10 の発現誘導について調べた。さらに、これらのサイトカイン応答に影響を与える可能性のある薬剤として、Hsp90 の機能を阻害する Geldanamycin (GA) および免疫調節効果が報告されている Thalidomide (THD) について、サイトカイン分泌に対する影響を調べた。

まず、マウスを使った外科手術のモデルとして軽微な侵襲モデルとして simple laparotomy (SL)、より大きな手術侵襲モデルとして ileocecal resection(ICR)を行い、術後のサイトカイン産

生の経時変化を追った。すると、SL では、術後早期(3-12時間)に TNF- α の転写が高まるのに対し、ICR 群では、早期の TNF- α の転写はむしろ抑えられ、12時間後に一過性の転写活性がみられた。ICR 群における術後早期の TNF- α 転写活性の低下は、Geldanamycin (GA)の投与により防がれる傾向があった。この転写活性に対する影響を反映して、血清中の TNF- α 濃度も、本来 ICR 群では SL に比べて低い傾向があったが、GA 投与群では、この傾向が改善され、TNF- α 濃度の低下は、それほど顕著でなくなった。一方、Thalidomide (THD)には初期の TNF- α 転写活性および血清 TNF- α 濃度に対する影響はほとんどなかった。上記で観察された ICR 群による術後早期における TNF- α の転写抑制活性は、手術侵襲が引き金となって glucocorticoid が分泌され、その結果起こった可能性が考えられたので、glucocorticoid receptor のアンタゴニストである RU486 を投与して ICR を行ったところ、術後早期における TNF- α 転写抑制は、それほど顕著には見られなくなった。従って、術後早期の TNF- α 転写抑制の原因のひとつとして、内因性の glucocorticoid 分泌の亢進が考えられ、その結果として起こる TNF- α の転写抑制作用は、GA によりキャンセルされることがわかった。また、この効果は、脾細胞の中の TNF- α 蛋白質産生細胞の数の変化とよい対応がみられた。

同様に、他のサイトカインの転写活性、血清濃度の経時変化を追った。おなじく Th1 タイプのサイトカインである IL-2 の転写活性は、TNF- α 転写活性の亢進に比べて3時間程度遅れて起こったものの、TNF- α 同様、SL 群においては、早期(6-12時間)に起こる転写活性の亢進が、ICR 群では顕著に低下していることがわかった。TNF- α と異なり、この ICR 群における IL-2 の転写抑制は、GA によっては改善されず、THD によって解除された。次に、Th2 タイプのサイトカインである IL-4 の産生を調べたところ、SL 群に比べ、ICR 群では、ごく初期(3時間)に転写抑制があるものの、12時間以降は、むしろ IL-4 の産生は SL 群より亢進傾向があった。この後期の IL-4 産生は、GA あるいは THD 投与により、やや抑えられる傾向があった。おなじく Th2 サイトカインのひとつである IL-10 の産生をしらべたところ、SL 群に比べ ICR 群では、術後早期(3-6時間)に顕著な転写活性の亢進がみられた。この IL-10 転写活性の亢進は GA および THD の投与によって顕著に抑えられることがわかった。

以上の結果を総括すると、手術侵襲の大きい ICR 群では、内因性の glucocorticoid 分泌が1因となって、術後早期に Th1 タイプのサイトカインである TNF- α および IL-2 の転写抑制が、起こり、TNF- α の転写抑制は GA により、IL-2 の転写抑制は THD により緩和されることがわかった。一方、Th2 タイプのサイトカイン産生に関しては、ICR 群では SL 群に比べて、遅延相において IL-4 の産生がやや高くなり、これは、GA および THD により若干抑制される傾向があった。同じく Th2 タイプのサイトカインである IL-10 の産生は、ごく初期(3-6時間)において ICR 群で顕著に亢進しており、この産生の亢進は GA および THD により抑えられる傾向があった。このことから、GA、THD が異なるメカニズムにより、手術侵襲の大きい外科手術後の脾細胞に見られる Th1 劣勢、Th2 優勢のサイトカイン環境を是正する可能性が示唆された。

審査員からは、ICR で予想される腸内細菌による感染の影響と、それが及ぼすサイトカイン分泌への影響について質問があった。また、手術侵襲の大きさを比較するモデルとして SL、ICR が適

当であるかどうか、さらに、手術時間の長さとの関連について、コメントがあった。また、麻酔や、手術前後の絶食、栄養補給の違いがサイトカインバランスに及ぼす影響についても質問があった。これらの質問に対して、申請者は、これらの問題点は自らも実験のデザインをする上で工夫をしなければいけない課題であることを十分理解しており、対照を適正に取るために申請者らが工夫をした点などについて説明をした。