

[原著]

上顎洞内異物を呈した迷入歯科インプラント体に対する治療

三宅 省吾¹⁾, 田中 保子¹⁾, 林 解平²⁾, 楠本 健司¹⁾

¹⁾ 関西医科大学形成外科学講座

²⁾ 林歯科クリニック

Treatment of a Dental Implant Fallen into the Maxillary Sinus

Shogo MIYAKE, Yasuko TANAKA, Kaihei HAYASHI, Kenji KUSUMOTO

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University

要 旨

近年、歯科治療において歯科インプラント治療が確立されたものとして行われているが、合併するトラブルの中に上顎洞へのインプラント体の迷入の報告も散見される。今回、歯科医院にて歯科インプラント体のケア中にインプラント体の上顎洞内迷入をきたし、その摘出を経験したので報告する。

症例は 67 歳女性。歯科処置中に見失ったインプラントを他院歯科にて局麻下に摘出手術が試みられたが所在不明で摘出できなかった。

その後、当科へ紹介され X-P と CT にて右上顎洞内臼歯部相当部に洞粘膜に半ば埋入したインプラント体を認めた。全身麻酔下に口腔内より右上顎洞前壁を開窓し直視下にインプラント体を摘出した。その際に、右上顎洞内に副鼻腔炎を生じており粘膜肥厚を認めた。術後感染等生じることなく術後経過は良好である。

上顎洞内に迷入したインプラント体に対し、本例のような洞粘膜にインプラント体が埋入した場合には内視鏡による摘出より、口腔内より上顎洞前壁からの直視下アプローチがより安全で確実な摘出法と考えられた。

Key words: foreign body, maxillary sinus, dental implant, direct open approach

Abstract

Recently dental implant therapy becomes much popular especially in aged people. At the same time, some complications, infection, gingivitis, mobility, and foreign body, occur.

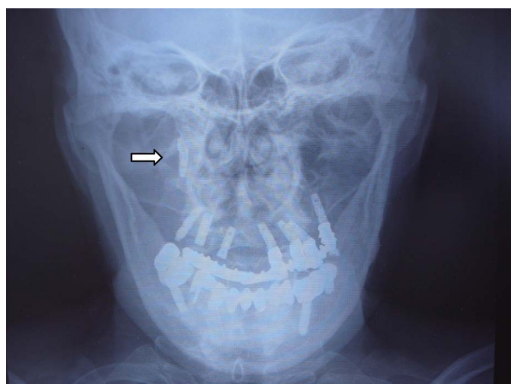
Here we report the treatment for a 67-year-old woman, whose dental implant fell into the maxillary sinus during the dental care. The patient was introduced to our out-patient clinic by the dental doctor, to find out the missing implant and to treat cheek dull pain, bad smelling in right nasal cavity and liquid leakage from oral cavity to nasal cavity. The findings of plain radiographs and CT showed a dental implant was buried partially in swelling mucosa of the right maxillary sinus. In the operation, after opening the anterior wall of maxillary sinus the dental implant was taken out from swelling mucosa of the sinus. At the same time, a fistula at right maxillary molar area, which had been made at the implantation, was closed with the advanced alveolar mucosa. After the operation, cheek dull pain, bad smelling and the liquid leakage disappeared completely.

It is discussed that dental implants should be carefully indicated in the condition of maxillary bony floor and treated at implanting procedures, and direct open approach through the anterior sinus window is an appropriate method for this condition of implant buried in the sinus mucosa comparing with endoscopic procedure.

症例；67 歳女性。

現病歴；約 10 年前に上顎へのインプラント治療を行い、その後近医歯科にて定期的にインプラント体のケアを行っていた。平成 20 年 2 月 14 日、

人工歯を脱着しインプラントのケア中にインプラント体が動揺して所在が不明となった。その後、2 月 16 日他院歯科にて、局麻下にインプラント体の摘出手術が試みられたが周囲粘膜、骨膜下には



a



b

図1 初診時X-PおよびCT

- a 右上顎洞の透過性の低下とインプラント体を認めた。
b 右上顎洞内の粘膜肥厚と半ば埋入したインプラント体を認めた。

インプラント体を見つけることができず摘出を断念した。2月25日当科へ紹介され、初診時右頬部鈍痛と右鼻腔の異臭を訴えた。X-PおよびCTにて右上顎洞臼歯部よりインプラント体が右上顎洞内に迷入しているのを認めた(図1)。右上顎洞は上顎洞粘膜が肥厚した副鼻腔炎の所見を呈していた。また、インプラント挿入時の歯槽部の穴が上顎洞に開存しており、うがいや液体物を食すると鼻から水や液体が漏れる状態で日常生活にも困っていた。

手術所見；平成20年4月25日、全身麻酔下にて口腔前庭右犬歯窩に横切開加え、スパーテルを用いて骨膜を剥離し右上顎骨前壁を露出し、カッティングバー及びフィッシャーバーを用いて上顎

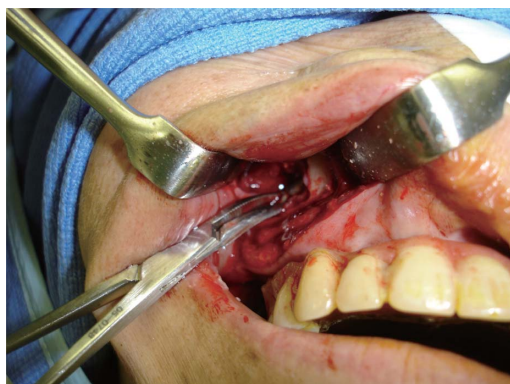


図2 術中写真

開窓部からインプラント体を把持して粘膜を損傷しないように摘出した。



図3 摘出したインプラント

サイズ 長さ12 mm×径4 mmであった。

骨前壁を2×1.5 cm 開窓した(図2)。上顎洞粘膜は炎症のため肥厚しており、わずかに排膿を認めた。同時に迷入したインプラント体の一部を認めたが、洞粘膜に埋入していた。これをモスキートペアンで把持し、洞粘膜を損傷しないように可及的に摘出した。

摘出した異物は長さ12 mm 径4 mmのチタン製インプラントであった(図3)。右上顎臼歯部のインプラント挿入時の歯槽の穴は歯肉粘膜を伸展させ縫合閉鎖した。

上顎洞粘膜の一部を病理検査行ったところ、上皮下にリンパ球、形質細胞の高度の浸潤を認め、間質は浮腫状であり上顎洞炎の所見であった(図4)。

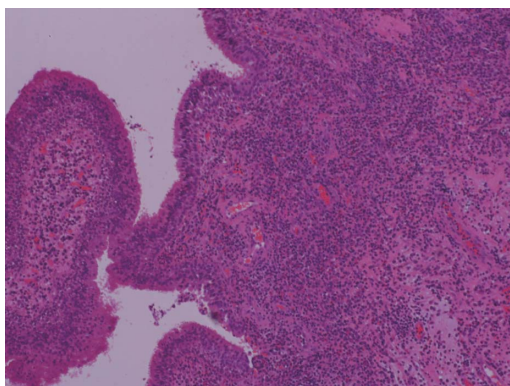
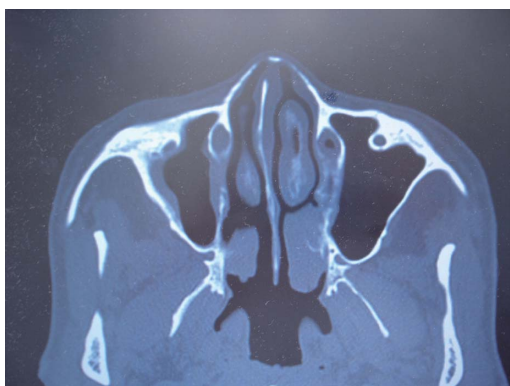


図 4 上顎洞粘膜の病理写真 (HE 染色, ×40)
上皮下にリンパ球, 形質細胞の高度の浸潤を認めた。



a



b

図 5 術後 6ヶ月の CT および口腔内所見
a 右上顎洞内は粘膜肥厚が軽減した。
b 口腔前庭, 歯槽部も良好に創治癒している。

術後経過；術後感染等生じることなく術後 6ヶ月で経過は良好であり, 右眼窩下神経領域の知覚鈍麻も認めていない。右上顎洞内の炎症も軽減している (図 5)。また, うがい時や摂食時に口腔内の液状物が鼻から出ることもなくなった。

考 察

上顎洞内異物は外傷性と医原性に大別される。以前は木片, 鉄片, 硝子片, 銃弾などの外傷性のものが多かったが, 近年は医原性異物が増加している。医原性異物としては迷入歯牙, 歯根が多く, 歯科材料としては根管充填材, インプラントが多い。今後, 歯科治療におけるインプラント需要が増加するにともない, インプラントがさらに増えると予想されている¹⁾。

インプラントは歯牙の欠損部に口腔機能と審美性の回復を目的として用いられる人工歯根である。上顎洞へのインプラント迷入は臼歯部における埋入時に多いが, その原因として, 上顎の臼歯部では上顎洞底が低位となり, 臼歯部歯槽頂から上顎洞底間の距離が近接している。歯牙の喪失にともなう歯槽骨の吸収も加わり, 歯槽頂から上顎洞底の垂直方向の骨量が不足しているためインプラントを埋入しても初期固定が不足する。インプラントの固定部分であるフィクスチャーをねじ込むと上顎洞内へ突出し, その後荷重が加わり上顎洞内へ落ち込むことがあるとされる²⁾。

これらの合併症を避けるためには十分な問診と綿密な口腔内精査や CT などの画像検査を行い三次元的な評価から, 骨の厚さが不十分な場合は上顎洞底挙上術であるサイナスリフトや骨誘導再生法 (GBR) などの骨の増生を図る方法を適宜選択すべきである³⁾。

上顎洞異物の臨床症状は上顎洞炎をきたすことによる一側性の鼻閉, 鼻漏, 頬部痛であることが多い⁴⁾。本症例では生体親和性が高いと言われるチタン製の迷入異物であったが, 感染が惹き起こされ副鼻腔炎による右頬部鈍痛, 右鼻腔の異臭があった。また, うがいや液状物の食事をするときインプラント挿入した際の歯槽の穴を経て鼻から水や液状物が出てくるため日常生活で支障をきたす状態であった。以上の病歴と画像所見から右上顎洞内異物と診断し摘出を検討した。

治療は外科的治療が原則であるが, 従来, 上顎

洞異物の摘出方法には、抜歯窩を拡大して除去する Alveolar approach と犬歯窩より上顎洞を開放する Caldwell-Luc approach が用いられ、さらに上顎洞の処置としては洞粘膜を温存する上顎洞開放術と、洞粘膜を摘出する上顎洞根治術が行われてきた。近年、内視鏡の普及に伴い耳鼻科領域では、上顎洞炎に対して上顎洞根治術よりも鼻内内視鏡が選択され、低侵襲に行える手術として臨床的有用性が高く評価されている⁵⁾。

川原ら⁶⁾は鼻内内視鏡下に歯性の上顎洞異物を摘出したことから、よほど巨大な上顎洞でない限り、上顎洞内腔のほとんどの部分は操作しうるとし、上顎洞異物が疑われた場合は、内視鏡下鼻内手術を第一選択に考慮すべきと報告している。しかし、上顎洞異物が粘膜内に存在する場合もあり、内視鏡単独での摘出が困難な場合もあるとの報告例もある⁷⁾。

我々の症例では CT 所見より右上顎洞炎のため粘膜肥厚が生じており、インプラント体が部分的に粘膜あるいは肉芽に埋もれており安全に確実な全摘出をめざし、上顎洞を開窓しインプラント体を摘出する方法を選択した。

今後、歯科治療に関連した上顎洞の医原性異物は歯科インプラントを代表としてさらに増加すると思われる、歯科のみならず形成外科、耳鼻科等に

においても今回のような症例に遭遇する機会が増加するものと思われる。医原性異物の治療においては患者とのトラブルへ発展する可能性も配慮し、異物の大きさ、位置、性状を正しく診断し、患者への十分な説明と安全確実で、低侵襲な手術方法が選択される必要があると考える。

本論文の要旨は第 26 回日本頭蓋顎顔面外科学会（2008.10.17. 於：盛岡市）にて発表した。

文 献

- 1) 堀川 勲, 達富真司, 吉崎智一, 他: 術前に発見が困難であった上顎洞異物例. 耳鼻臨床, 93: 749-755, 2000.
- 2) 長谷川和樹: 歯根やインプラントが上顎洞内に迷入したら. デンタルダイヤモンド, 28: 62-65, 2003.
- 3) 田村暢章, 竹島 浩, 谷口展子, 他: インプラント体が上顎洞内に迷入した 4 例. 日口腔インプラント誌, 20: 471-476, 2007.
- 4) 岸本 曜, 河田恭孝, 鈴木慎二, 他: 咬筋内木片異物例. 耳鼻臨床, 96: 549-552, 2003.
- 5) 鈴木豊典, 小林 隆, 戸塚靖則: 上顎洞内に迷入したインプラントを内視鏡下鼻内手術により摘出した 1 例. 日口腔インプラント誌, 14: 54-57, 2001.
- 6) 川原結華, 春名眞一, 添田一弘, 他: 鼻内内視鏡下に摘出し得た上顎洞歯性異物の 3 症例. 耳展, 41: 496-501, 1998.
- 7) 藤盛真樹, 大坪誠治, 松田光悦: 上顎洞に迷入した医原性異物の 3 例. 日口外誌, 51: 524-527, 2005.

関西医科大学医学会賞

「関西医科大学医学会賞」は関西医科大学医師会の後援のもと、当該年本学で学位を授与された若手研究者を鼓舞し、更なる飛躍を期待するために設けられた賞である。

応募者は医学会賞選考委員会の厳正なる審査のもと、優秀賞と奨励賞が決定される。

平成19年は7名の応募者の内から1名に優秀賞と2名に奨励賞が交付された。

本号に掲載の受賞者研究内容を参照されたい。

医学会会長 山下 敏夫

関西医科大学医学会賞交付規程

第一章 総 則

(目的)

第1条 本規程は本学の学術研究振興を目的として、関西医科大学医学会（以下「医学会」という）が当該年度の優秀学位論文ならびに関連業績に対して褒賞するために定めた規程である。

(後援)

第2条 前条の褒賞にあたっては、関西医科大学医師会（以下「医師会」という）が後援する。

(財源)

第3条 本賞の財源としては医学会、医師会双方の予算をもってあてる。

(交付対象)

第4条 研究業績および将来性を含めて本学学術集談会での講演内容を審査して毎年若干名に交付する。

第二章 交 付 手 続

(交付申込)

第5条 本賞の応募者は医学会事務室に備え付けの所定の申込書に必要事項を記入し、関連論文3篇以内を添えて毎年1月15日迄に医学会に提出する。

第三章 選 考

(選考委員の構成)

第6条 選考委員会は、次の委員で組織する。

(1) 職務上委員となるもの

医学会会長

医学会委員長

(2) 選挙により委員となるもの

教授会 4名

助講会 5名

関西医科大学医師会 教授3名

第7条 委員の任期は2年間とし、再任を妨げない。ただし、2期を超えないものとする。

(選考委員会の開催)

第8条 毎年学術集談会開催日に選考委員会を催し講演内容と業績内容について選考を行う。

(審査会の成立)

第9条 選考委員会は選考委員の3分の2以上の出席をもって成立する。

(審査会の議長)

第10条 原則として医学会会長が議長となる。

(審査会の議決)

第11条 議決は出席選考委員の投票により決定する。

第四章 そ の 他

(本規程変更)

第12条 本規程の変更は医学会委員の3分の2以上の承認を得なければならない。

細則 1. 選考結果は毎年学術集談会終了時に発表し交付金を支給する。

なお、受賞者は関西医大誌誌上に講演内容を寄稿することとする。

付則 本規程は平成13年9月1日から施行する。

付則 本規程は平成15年10月10日から施行する。

[受賞]

プロテオミクスによる末梢神経特異的な 新規 CRMP-2 アイソフォームの同定

片野 泰代

(関西医科大学医化学講座)

Proteomic Identification of a Novel Isoform of Collapsin Response Mediator Protein-2 (CRMP-2) in Spinal Nerves Peripheral to Dorsal Root Ganglia

Tayo KATANO

Department of Medical Chemistry, Kansai Medical University

はじめに

神経細胞は高度に分化した細胞であり、軸索と樹状突起という極性の異なる神経突起を有する。一次求心性線維は、偽単極性ニューロンであり細胞体である後根神経節（DRG）から起始した神経突起は一方が末梢組織で自由神経終末として停止し、他方は脊髄後角で二次ニューロンとシナプスを形成する¹⁾。そして神経の伝達方向は末梢から中枢への一方向性であるが、DRGで合成された物質輸送には極性があり、サブスタンス P は合成された95%が末梢側へ輸送されることが報告²⁾されていることなどからも知られるように、生理機能に伴い合成された生理活性物質は、末梢あるいは中枢側へ分別輸送される。これら分子の輸送は、末梢あるいは中枢での生理現象を反映するものである。

末梢組織が傷害されると痛みは1次求心性線維をとおり脊髄後角へ伝達される。侵害刺激によって生じる痛みには、組織損傷時に発生し速やかに消失する限局した1次痛と、遅れて発生し持続する局在性の曖昧な2次痛があり、2次痛は組織修復に伴い緩解する。しかしながら、このような警告信号として機能する生理的な痛みと異なり、組織損傷の治癒後も持続する慢性疼痛は、臨床上大きな問題となっている。慢性疼痛時には自由神経終末（末梢）および脊髄後角（中枢）での感作が

生じるが³⁾、その機序の全ては未だ明らかではない。侵害刺激に伴うこれらの感作における生理活性物質がDRGで産生、分別輸送されることから、極性の異なる物質の解析が感作機序の解明に寄与すると考えられる。

ポストゲノム解析として近年多くの研究機関においてプロテオミクス解析が行なわれている。遺伝子解析と異なり、動物、あるいは細胞内で発現している蛋白が対象となることから、生理機能に依存した蛋白の機能や局在、翻訳後修飾解析が可能となる。プロテオミクス解析は、全ての発現蛋白を同定することを目的とする網羅的な解析である。近年、蛋白の分離、同定のための骨子となる技術の著しい進歩によって発現量の少ない分子や翻訳後修飾を検出同定することが可能となった。我々は分離、比較解析に、2次元電気泳動法を選択し、より多くの蛋白を検出、分離することを目的とし、高解像度のラージサイズ（70 cm×20 cm）ゲル⁴⁾を解析に用いた。蛋白の電気泳動上の移動度は、リン酸化などの翻訳後修飾によって変化することが知られている。しかしながら、異なるゲル間での僅かな移動度の変化を検出することは困難であることから、異なる2種の試料に異なる蛍光標識を行ない同一ゲルで泳動することによって僅かな発現量差と移動度の変化を検出することが可能な実験系である2D-ディファレンシャルゲル

電気泳動 (2D-DIGE) 法を併用した。

本解析内で我々は、DRG の末梢側に特異的な分子として、collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2, TODA-64, Ulip2, DRP-2) を同定した。CRMP-2は、高い相同性を有するCRMP1~CRMP5のCRMP familyの一つであり⁵⁾、初期培養細胞を用いた解析で、成長円錐に濃縮して存在し⁶⁾、また、tubulin ヘテロダイマーと結合し、それらを軸索尖端へ輸送することによって軸索伸張を促進させる機能を有するなど、極性決定分子であることが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。

今回、我々は同定した電気泳動上異なる移動度を示す CRMP-2 を、periCRMP-2 と名付けた。慢性疼痛時には、極性の異なる感作が生じることから、本解析内で、periCRMP-2 の末梢神経損傷に伴う発現量変化を解析した。これは、1 次求心性線維を用いた *in vivo* での神経細胞の極性について解析、さらには、末梢神経損傷に伴う変化に焦点をあてたユニークな解析である。

方 法

動物

5 週齢の雄性 Wistar ラットをエーテル麻酔下にて断頭し、DRG の末梢側と中枢側の脊髄神経組織 (末梢側画分、中枢側画分) をそれぞれ摘出した。末梢神経損傷モデル作製は、50 mg/kg のペントバルビタール麻酔下にて、坐骨神経を 4-0 シルク糸で完全に結紮した。結紮 1, 3, 7 日後、エーテル麻酔下にて断頭し末梢側画分を摘出した。

ラージサイズ 2 次元電気泳動 (2-DE)

摘出した神経組織を 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 μ M PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で速やかにホモゲナイズ後、0.25% SDS を含むサンプル調整液 (7 M urea, 2 M thio-urea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100) にて可溶化し試料を調製した。2 次元電気泳動に影響を与える塩および脂質等を除去するために、Clean-Up kit (Amerham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) を用いて処理後、0.04% SDS を含むサンプル調整液で可溶化した。定量し、各 360 μ g の蛋白を 1 回分とし高解像度の 2 次元電気泳動 (2-DE) 行なった。

1 次元目の等電点電気泳動は 24 cm, pH 5-6 の IPG ストリップを使用し、Ettan IPGphor にて泳動

を行なった。電圧は 6 時間かけてリニアで 500 V から 3,500 V まで上昇させ、その後 3,500 V で 40-45 時間泳動した。1 次元目の泳動後、ストリップは 65 mM DTT を含む平衡化緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue) 中で 15 分間、次に 135 mM iodoacetamide を含む平衡化緩衝液で 15 分間震盪した。平衡化したストリップはラージサイズ (横 22 cm×縦 70 cm) の 13.5% のポリアクリルアミドゲルにて 2 次元目の SDS-PAGE を行なった。泳動後、蛋白スポットは Vorum らによって報告された質量分析に影響を及ぼさない銀染色法¹¹⁾にて可視化し、目視および、2-DE ゲル解析ソフト、PDQuest にて比較解析を行なった。一方の画分に特異的、あるいは有意に発現量に増加あるいは減少が認められ、またその再現性が確認されたスポットを解析対象とした。

質量分析

ゲルスポットからのペプチド回収は、in-gel digestion 法¹²⁾ にて行なった。銀染色にて可視化されたゲルを切り出し、脱銀染色後ゲル中の蛋白を、10 mM DTT 存在下で還元、55 mM iodoacetamide 存在下でアルキル化した。その後 10 μ g/ml トリプシンでゲル内消化を行なった。消化したペプチドは 50% アセトニトリル (ACN), 1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 中にて抽出し、Speed Vac にて濃縮、アセトニトリルの除去を行ない、逆相クロマトグラフィー単体、POROS 20 R2 を用いて脱塩、濃縮後、1 mg/ml の CHCA を含む 50% ACN, 1% TFA にて測定用のプレート上に溶出した。溶出したペプチドは MALDI-TOF MS (Voyager DE-Pro, Applied Biosystems) を用いてその質量 (peptide mass) を測定した。

LC-ESI MS/MS (LCQ-Deca, ThermoElectron) 解析にはゲルから抽出したペプチド溶液をそのまま解析に用いた。ペプチドの分離には RP キャピラリーカラム (nanocolumnC₁₈, 0.1 mmid, 50 mm long, GL science) を使用し、流速 300 nL/min で行なった。移動層には、溶剤 A (H₂O/ACN/formic acid, 98/2/0.1 v/v) と溶剤 B (H₂O/ACN/formic acid, 10/90/0.1 v/v) を用いて 5% 溶剤 B から 65% 溶剤 B へ 40 分間でリニアグラディエントにて溶出する。分離された画分中のペプチドはナノ ESI (長さ

20 mm, 内径 20 μ m) でイオン化し, 質量を測定した。

得られたペプチドの質量データを MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) と NCBI protein database によるデータベースサーチを用いて同定した¹³⁾。

ウェスタンブロッティング

ラージサイズ 2-DE の項で述べた方法にて調整した試料 (15–50 μ g) をスタンダードサイズ (横 9 cm $\times$ 縦 7 cm) の SDS-PAGE および 2-DE 後ウェスタンブロッティングを行なった。分離されたゲル中の蛋白は PVDF 膜へ転写後, 3% スキムミルクを含む TBS-T (0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)) でブロッキング後, 1 次抗体 (マウス抗 CRMP-2 モノクローナル抗体 C4G; $\times 10000$ ¹⁴⁾, ウサギ抗 #N17aa CRMP-2/3 抗体; $\times 1000$ ¹⁵⁾) 反応を行なった。PVDF 膜は TBS-T にて洗浄後, 2 次抗体 (マウス IgG-HRP; $\times 20000$, ウサギ IgG-HRP; $\times 10000$) 反応を行ない, 再度 TBS-T にて洗浄し ECL (Amersham Biosciences) と反応させ検出した。

2D-DIGE

坐骨神経の結紮側 (左) と疑処置側 (右) の末梢側画分をそれぞれ摘出, Clean-Up kit にて処理後 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS にて可溶化後, 400 pmol の Cy3 あるいは Cy5 でそれぞれ標識を行なった。標識後, 2 つの試料を併せて同一のゲルで 2 次元電気泳動を行なった。1 次元目は 24 cm, pH 3–10NL の IPG ストリップを使用し, Ettan IPGphor にて計 60 kVhrs 泳動した。1 次元目の泳動後, ストリップは 65 mM DTT を含む平衡化緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue) 中で 15 分間, 次に 135 mM iodoacetamide を含む平衡化緩衝液で 15 分間震盪した。平衡化されたストリップはラージサイズ (横 24 cm $\times$ 縦 20 cm) の 10% のポリアクリルアミドゲルにて 2-DE を行なった。

Cy3 および Cy5 で標識された蛋白スポットは, 走査性蛍光イメージャー Typhoon 9410 にてそれぞれ検出し, 比較解析ソフト DeCyder (Amersham Biosciences) を用いて解析した。

脱リン酸化酵素処理

末梢側画分を摘出し, 組織重量の 3 倍量の 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$, 250 mM sucrose, 10 μ M PMSE, 1 μ g/ml leupeptin を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中でホモゲナイズ後, サンプル溶液 (50 μ l) を 2 ml の反応緩衝液 (2 mM $MnCl_2$, 5 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) にて希釈し, 25°C で予備加温した。その後, λ PPase (New England BioLabs, Herts, UK) を加え, 25°C で脱リン酸化反応を行なった。対照群は 5 mM Na_3VO_4 と 50 mM NaF 存在下で λ PPase を含まないものとした。対照群, 処理後 1 時間および処理後 24 時間のそれぞれの試料 50 μ g を 2-DE ウェスタンブロットを行ない, 脱リン酸化による蛋白スポットの移動度の変化を検出した。

結 果

末梢側画分に特異的な分子として CRMP-2 を同定

中枢, および末梢側画分各 360 μ g 中の蛋白をラージサイズの 2-DE で分離した。分離された蛋白スポットを銀染色にて可視化し, 比較解析を行なった (図 1)。この実験系において, 2-DE 解析ソフト, PDQuest を用いて解析すると, pI 5–6 間のみの解析でおおよそ 800 の蛋白スポットがそれぞれの画分から検出された。これらの蛋白スポットの発現量差を目視にて解析し, 画分間での発現量差が有意, あるいはいずれかの画分に特異的なスポットを検出した (図 1B)。これらのスポットを対象とし, 質量分析器 MALDI-TOF MS を用いて同定した。その結果, 図 1B の a で示した P 画分に特異的に発現していたスポットからトリプシンを用いた in-gel digestion 法にて得られた 27 ペプチドが CRMP-2 由来であることをデータベース, Mascot にて確認し, MOWSE スコア 200 の高い値で, CRMP-2 であることを同定した (図 2)。同様に末梢側画分より collagen $\alpha 1$ (図 1A-c, B-c), α -tubulin (図 1A-d, B-d) を含む 12 の分子と, 中枢側画分より tubulin $\beta 3$ (図 1A-b 矢尻, B-b 矢尻) と tubulin $\beta 15$ (図 1A-d 矢印, B-d 矢印) を含む 3 分子をそれぞれの画分にユニークな分子あるいは発現量の異なる分子として同定した。

periCRMP-2 は末梢側画分に特異的に発現する

CRMP-2 は, 1995 年に反発性ガイダンス因子で

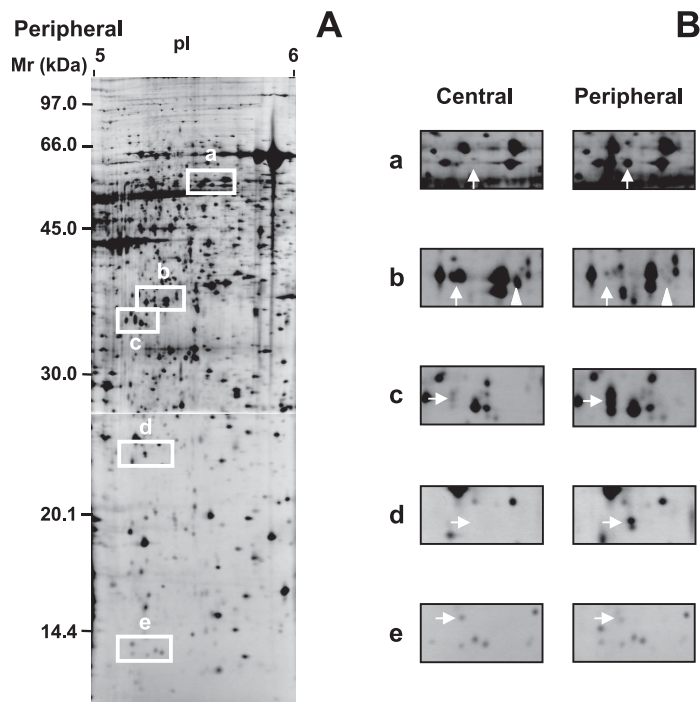


図1 ラージサイズ2-DEによる中枢側および末梢側画分の比較解析.

(A) DRGの末梢側画分(360 μ g)をpH 5-6間の13.5%のラージサイズゲル(22 cm $\times$ 70 cm)で分離し、銀染色で可視化. 約800の蛋白スポットを2次元解析ソフトPDQuestによって検出. a-eの四角内は中枢側画分との比較解析にていずれかの画分に特異的あるいは有意な発現量差のあったスポットを示す. (B) Aのデータの四角内の拡大を示す.

あり成長円錐を退縮させるセマフォリン3の細胞内シグナル伝達に関与する分子として同定された分子である^{16,17}. また海馬を用いた初期培養細胞において、神経の成長円錐部に濃縮して存在することから神経系の極性を決定し、軸索伸張を促進する重要な因子であり、神経の発生および傷害後の再生に関わる機能を担うと考えられる¹⁸. そして興味深いことに、CRMP-2は神経系に広く存在する分子でありながら、本解析内でDRGの末梢側の画分にのみ特異的に認められたことは既存の報告にはない新しい知見である.

そのことから、CRMP-2の神経組織における局在を明らかにする目的でCRMP-2の特異的な抗体C4Gを用いてウェスタンブロットを行なった. その結果、CRMP-2は脊髄、DRG、中枢側画分、そして末梢側画分のいずれの神経組織からも異なる分子量を有する複数のバンド、あるいは異なる分子量、等電点を有する10以上のスポットとして検出された(図3). しかしながら、今回我々が同

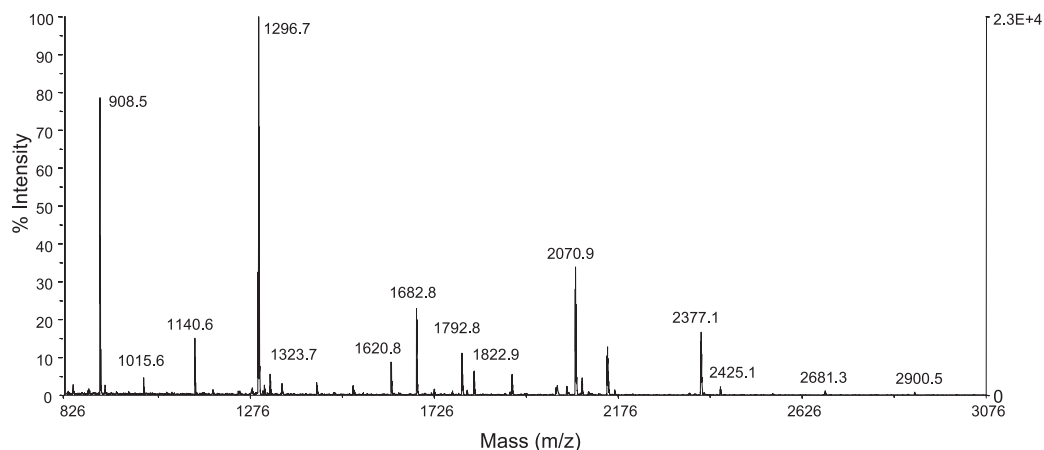
定した末梢側画分に特異的な蛋白スポットとして同定したCRMP-2と同じ移動度(分子量、等電点)を有するスポットは脊髄、DRGそして中枢側画分のいずれからも検出されなかった(図3). これらの画分中で、同定したCRMP-2と同じ分子量のバンドが最も多い(図3A)脊髄画分をラージサイズのゲルを用いて解析したが、ウェスタンブロットの結果と同様に同じ移動度を示すCRMP-2(図4矢印)は検出されなかった. さらに、大脳、小脳、延髄を用いて行なったウェスタンブロットでも同様の結果を示した(図5). そのことからこのCRMP-2(M_r 60 kDa, pI 5.6)は末梢側の画分に特異的であることから、我々はperiCRMP-2と名付けた.

periCRMP-2は既知の翻訳後修飾を有さないN末端の切断フォームである

リン酸化などの翻訳後修飾をうけた分子は、今回我々が図3, 5で示したCRMP-2スポットのよ

MALDI-TOF MS by Voyager DE-Pro

A



MASCOT search result

B

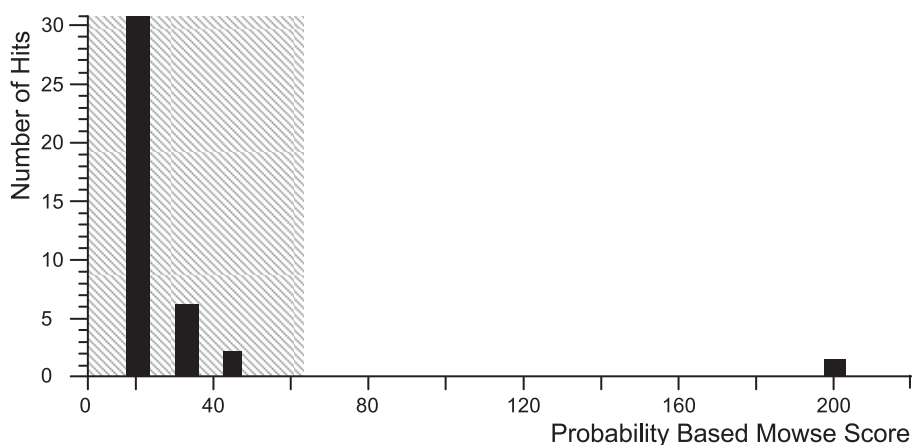


図2 末梢側画分に特異的なスポット，CRMP-2を同定。

(A) 末梢側画分に特異的なスポット図 1A, B-a に示したゲルスポットより Ingel digestion によりペプチドを回収，MALDI-TOF MS で測定。(B) A で測定されたペプチドの質量を MASCOT search で NCBI のデータベースを用いペプチドマスフィンガープリント法 (PMF) にて同定，高い MOWSE Score が得られた。

うに，分子量，および等電点に変化し，電気泳動上で複数のバンド，あるいはスポットとして検出されることが知られる。また CRMP-2 はすでに明らかにされたリン酸化部位が^{10,14,19-22)}知られていることから，今回明らかにした periCRMP-2 の性格付けを目的とし，まず脱リン酸化酵素 λ PPase 処理を行ない periCRMP-2 の移動度を解析した。その結果，高分子量かつ，酸性側に認められた CRMP-2 スポットは既知の報告²⁰⁾同様に，処理後

1 時間で完全に消失した(図 6B)ことから，脱リン酸化し塩基性側のスポットに収束したと考えられる。しかしながら，periCRMP-2 を含む低分子側の CRMP-2 スポットは処理後 24 時間でもその移動度は全く変化しなかった(図 6C)ことから，periCRMP-2 はリン酸化蛋白ではなく，他の翻訳後修飾を受けている可能性が示された。

他方，periCRMP-2 は脊髄や DRG などの全ての画分で検出されるメジャーな CRMP-2 スポットに

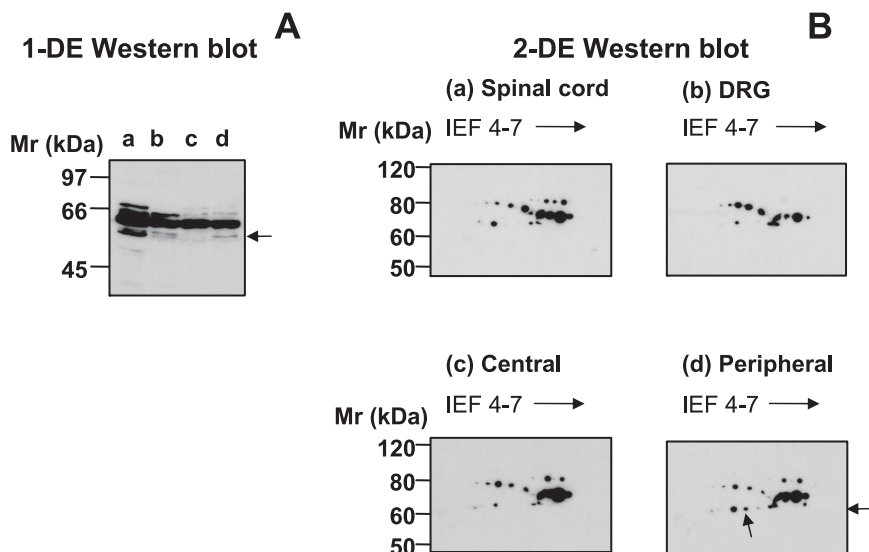


図3 ウェスタンブロットによる脊髄, DRG, 中枢側そして末梢側画分からの CRMP-2 の検出.

CRMP-2 の特異的な抗体, C4G を用いて CRMP-2 を検出.

(A) 脊髄, DRG, 中枢側および末梢側から 1D-E ウェスタンブロット (10%ゲル) にて CRMP-2 の発現を解析. 末梢側画分に特異的な CRMP-2 スポットと同分子量のバンド (矢印)

(B) 脊髄, DRG, 中枢側および末梢側から 2D-E ウェスタンブロット (pH 4-7, 10%ゲル; 9 cm×7 cm) にて CRMP-2 の発現を解析. 末梢側画分に特異的な CRMP-2 スポット (矢印)

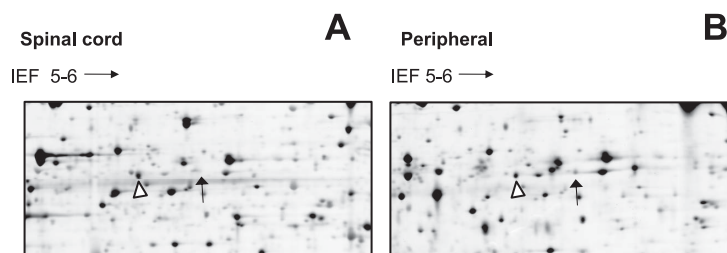


図4 ラージサイズゲルを用いた脊髄と末梢側画分の比較解析.

脊髄と末梢側画分 (360 μ g) を pH 5-6 間の 13.5% のラージサイズゲル (22 cm×70 cm) で分離し, 銀染色で可視化. 図3のいずれの画分にも共通して認められた CRMP-2 スポット (白矢尻) periCRMP-2 (B 黒矢印).

比べ電気泳動上, およそ 2 kDa 低分子量側に位置する. そのことから N あるいは C 末端の切断が予想される. また CRMP-2 は異なる第一エクソンからなる長い N 末端を有するアイソフォーム, CRMP-2A と, 従来より報告のある CRMP-2B の 2 つのアイソフォームの報告がなされている^{15,23)} ことから, まず CRMP-2B の N 末端に特異的な抗体 #N17 を用いて解析した. その結果, periCRMP-2 を含む C4G で検出された全てのスポットが #N17 で検出された (図 7A, B) ことから, periCRMP-2 に N 末端の切断は認められないことがわかった.

さらに, CRMP-2 は糖鎖修飾^{22,24,25)} が報告されていることから, 糖鎖を含む翻訳後修飾のさらなる性格付けを行なうために, periCRMP-2 (図 7A, B 矢印) と他の CRMP-2 スポット (図 7A, B 矢尻) の Matrix assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF-MS) および Liquid Chromatography electrospray ionization (LC-ESI) MS/MS を用いたフラグメント解析を行なった. 2 種の質量分析器を用いた測定の結果, periCRMP-2 スポットからは 66%, またメジャーな CRMP-2 からは 60% のシークエンスを

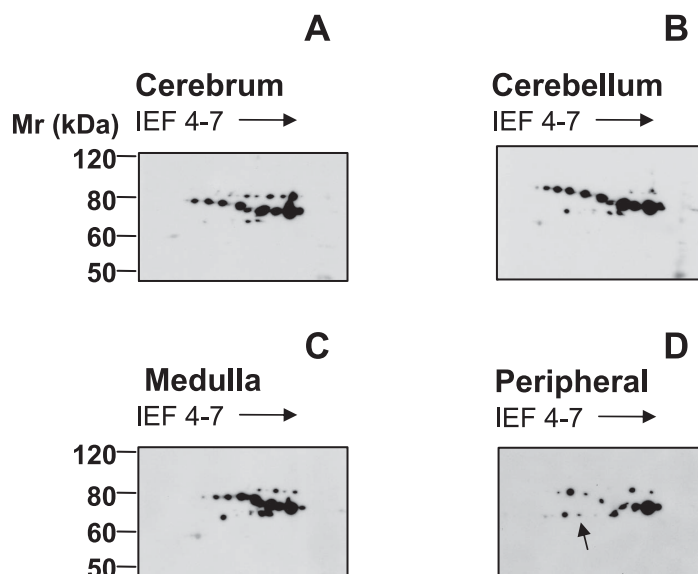


図5 ウェスタンブロットによる大脳、小脳、延髄そして末梢側面分からの CRMP-2 の検出。CRMP-2 の特異的な抗体、C4G を用いて CRMP-2 を検出。大脳 (A)、小脳 (B)、延髄 (C) そして末梢側面分 (D) の 2-DE ウェスタンブロット (pH 4-7, 10%ゲル; 9 cm×7 cm) にて CRMP-2 の発現を解析。末梢側面分に特異的な CRMP-2 スポット (D 矢印)

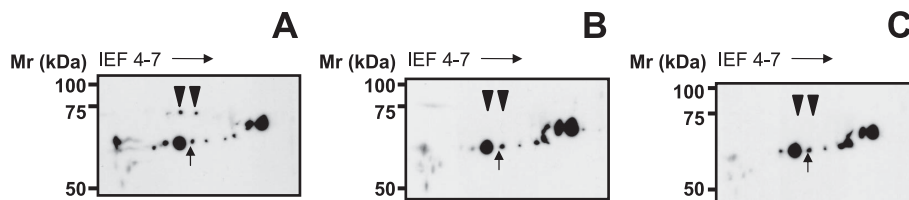


図6 λ PPase を用いた脱リン酸化 CRMP-2 の検出。50 μ l の末梢性面分の λ PPase 処理を行なった。無処理 (A)、処理後 1 時間 (B)、処理後 24 時間 (C) の試料 (50 μ g) の 2-DE ウェスタンブロット (pH 4-7, 10%ゲル; 9 cm×7 cm) を行なった。脱リン酸化によって移動度の変化したスポット (黒矢尻), periCRMP-2 (矢印)

カバーするフラグメントを検出した。検出された periCRMP-2 の peptide mass は、既知のリン酸化部位のフラグメントはリン酸化による質量を含まないアミノ酸のみの質量として検出され、また既知の糖鎖修飾部位に関しても、糖鎖修飾による質量の増加を持たないアミノ酸のみの質量として検出された。さらに、大変興味深いことに、periCRMP-2 からは、カバー率がメジャーな CRMP-2 より僅かに高かったにも関わらず、N 末端の糖鎖修飾を含む配列は検出されず、分子量の大きい白の矢尻で示したメジャーな CRMP-2 スポット (図 7A, B) からは N 末端の配列 (ANITSLG) が検出された

(図 7E)。さらに、periCRMP-2 の泳動上の移動度は N-glycosidase 処理によっても変化しなかった (データ非表示) ことから、periCRMP-2 は既知のリン酸化および糖鎖修飾を有さず、また N 末端が切断された新規アイソフォームであることがわかった。

periCRMP-2 は末梢神経損傷に伴い減少する

末梢神経損傷後、損傷部位へは末梢性感作あるいは神経修復に関与する機能性分子が輸送される。他方 CRMP-2 は神経系の発生および回路網形成に関与する分子であり、末梢神経損傷時には損

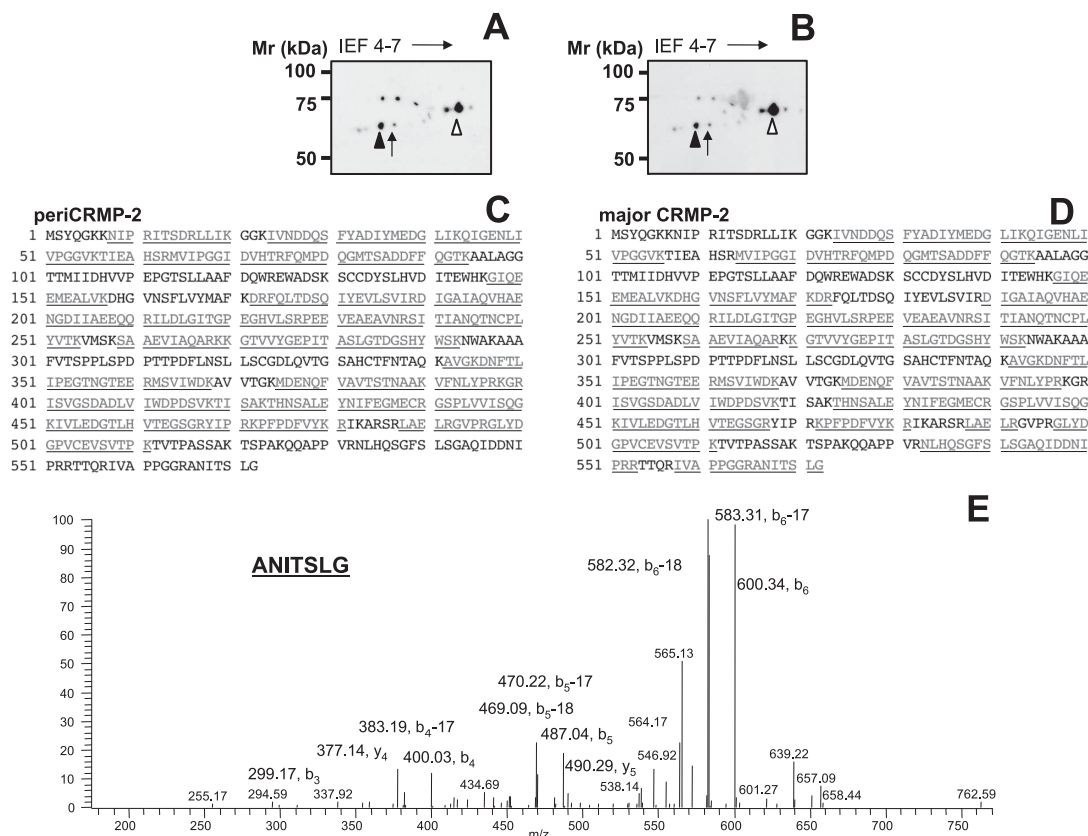


図7 ウェスタンブロットおよび質量分析器を用いた periCRMP-2 の解析。
 末梢側画分の 2-DE ウェスタンブロットを C4G (A) および #N17 (B) 抗体を用いて行なった。periCRMP-2 (矢印)、共通の CRMP-2 スポット (矢尻) C4G で認識される全てのスポットは #N17 でも認識された。periCRMP-2 (A, B 矢印) (C) とメジャーな CRMP-2 (A, B 白矢尻) (D) の MALDI TOF-MS と LC-ESI MS/MS で検出されたシーケンスカバーを下線で示す。periCRMP-2 で 66%, メジャー CRMP-2 で 60% のシーケンスを検出。C 末端のフラグメントはメジャー CRMP-2 からのみ検出 (D, E)。

傷部位に輸送される¹⁷⁾ことが知られている。そのことから、末梢神経損傷に伴う periCRMP-2 の関与を明らかにする目的で、ラット坐骨神経を完全に結紮し、末梢神経損傷モデルを作製し、末梢側画分における periCRMP-2 の発現量変化を解析した。末梢側画分は結紮 1, 3, 7 日後に摘出し、解析に使用した。対照群は偽処置を行なった反対側の末梢側画分とした。全 CRMP-2 の発現量解析は 1-DE ウェスタンブロットにて解析したが、その発現量に有意差は認められなかった (図 8A)。一方 periCRMP-2 の発現量を 2-DE ウェスタンブロット法にて解析した結果、periCRMP-2 は結紮 1, 3, 7 日後のいずれでも有意に減少することが解った (図 8B)。また最も有意に減少した 3 日後の末梢側

画分を用いて 2D-DIGE 解析を行なった。また periCRMP-2 を同定するために、Typhoon による Cy3 および Cy5 イメージの検出後、同ゲルを用いてウェスタンブロットを行なった。その結果から図 8B で示した 2-DE ウェスタンブロットの結果同様に periCRMP-2 スポットは、結紮 3 日後での減少が示された (図 8C, D)。

考 察

我々は、CRMP-2 の C 末端が切断された新しいアイソフォームが DRG の末梢側に特異的に発現しており、神経損傷に伴って発現量変化を生じることを明らかにした。本解析は *in vivo* で極性の異なる神経突起を回収するために、1 次求心性線

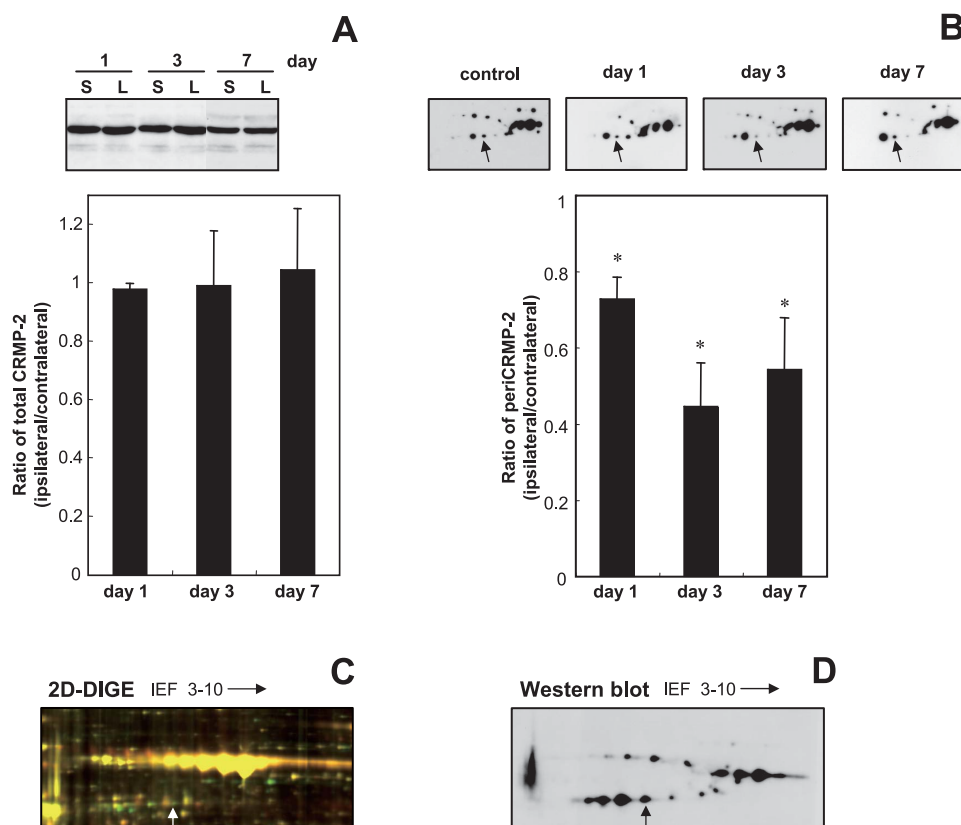


図8 末梢神経損傷に伴う periCRMP-2 の発現量変化の解析.

- (A) 末梢側画分に含まれる全 CRMP-2 量を 1-DE ウェスタンブロットにて解析. 神経結紮 1, 3, 7 日後で CRMP-2 量に変化は認められない.
- (B) 末梢側画分に含まれる periCRMP-2 量を 2-DE ウェスタンブロットにて解析. 神経結紮 1 日後から有意に減少, この減少は 7 日後でも継続.
- (C, D) 末梢側画分に含まれる periCRMP-2 量を 2D-DIGE にて解析. 結紮 3 日後の組織を用いて行なった. 減少するスポットとして periCRMP-2 を検出.

維を用いて行なっている. 海馬初期培養細胞などを用いた極性決定に関する解析, および虚血刺激や薬物を用いた病態モデル解析など, 多くの解析結果が報告されている. しかしながら, *in vivo* における病態には多くの因子が関与しており, *in vitro* での培養細胞による生化学的な事象が, *in vivo* のそれを正確に反映しているとは限らない. 我々の実験系では, 動物モデルを使用していることから, 病態を正確に反映した条件下での解析といえる.

今回我々が解析対象とした CRMP-2 は, 神経系に広く存在し²²⁾, Rho-kinase, GSK3 β および Cdk5 といった複数のリン酸化酵素によって, 成長円錐の退縮^{16,17)}, および軸索の伸展^{7,9,10,21,22)} といった

2 つの異なる機能調節を受け, 神経系の回路網形成に関与する分子である.

リゾフォスファチジン酸刺激によって活性化した Rho-kinase は, 555 番目のスレオニンをリン酸化し成長円錐を退縮させる機能を, 活性型にする^{7,22)}. 他方, Cdk-5 は, 522 番目のセリンをリン酸化し, このリン酸化引き金とし, GSK3- β は 518 番目のセリン, 514 番目のスレオニンと段階的にリン酸化をおこし, 軸索伸張の機能を不活性型にする¹⁰⁾ ことが明らかにされている. そして, periCRMP-2 は λ PPase 処理によって 2-DE での移動度が変化しなかった (図 6) ことから, これらのリン酸化を受けず, その調節を受けないことが示唆された. しかしながら, 他の CRMP-2 スポッ

トとは異なる等電点を持つこと、また神経損傷に伴って発現量変化が生じることなどから、機能に伴う別の翻訳後修飾をおけることが考えられる。

CRMP-2 は一次構造上から予測される 5 ヲ所の N 型糖鎖の修飾部位を有する糖タンパクであることが知られている。この糖鎖修飾の生理的意義として、神経変性疾患の一つアルツハイマー病との関与が報告されている。CRMP-2 はリン酸化されると軸索伸張に対して不活性型となり、脱リン酸化されることによって活性型となることを先に述べた。CRMP-2 を glycosidase で処理することによって不活性型となることから、糖鎖修飾がリン酸化の調節を介して CRMP-2 の活性制御を行なっていることが報告されている^{24,25)}。そして、我々の解析では N-glycosidase F、および質量分析のデータから N 型の糖鎖修飾は検出され無かった(図 7) ことから、periCRMP-2 には明らかにされていない糖鎖修飾部位の存在、あるいは O 型糖鎖の可能性²⁴⁾が残る。また、periCRMP-2 では予想される最も N 末端側にある糖鎖修飾部位の一つが、切断により欠損している C 末端フラグメントに含まれることから、この糖鎖修飾による制御は受けないと考えられる。

本研究内で、我々は CRMP-2 が組織特異的に、また機能に依存して切断されることを明らかにしてきたが、このような CRMP アイソフォームが切断される報告は 2005 年および 2006 年に、我々の報告と時期を同じくして、相次いでなされた。*in vitro* で、虚血など細胞への侵害刺激によって活性化した NMDA 受容体の下流で、活性化したカルシウム依存性のプロテアーゼ、calpain によって CRMP-3、-4 さらには -2 でも C 末端の切断が生じることがそれぞれ報告された²⁶⁻²⁹⁾。この切断は細胞死、成長円錐の退縮および NMDA 受容体の細胞表面への発現調節といった生理機能に関与することが示されている。しかしながら、今回我々が同定した periCRMP-2 は SDS-PAGE の分子量から 20 前後のアミノ酸が欠損していると予想されるが、同サイズでの切断は、*in vivo*、*in vitro* のいずれでも報告は現在認められておらず、その機能は明らかでない。この部位には Rho-kinase によるリン酸化部位が含まれており、このリン酸化によって神経突起の退縮が生じることから、この部位の欠損ではこの機能を失うと考えられる。また、*in vitro*

では、野生型の CRMP-2 を過剰発現すると、複数の軸索が形成されるが、C 末端の 24aa の欠損体の過剰発現させたものでは、複数の軸索形成は抑制され、1 本の軸索のみが形成され神経細胞の成熟に伴い形成される極性を、保持することが報告されている⁶⁾。

これらのことから *in vivo* で末梢神経損傷後の正常な神経回路網形成に基づく再生に、periCRMP-2 は他の CRMP-2 と異なる機能を有し、神経損傷後の末梢組織に特異的なキャリア分子として神経再生に関与することが示唆された。

文 献

- 1) Tandrup, T.: J Comp Neurol, 357: 341-347, 1995.
- 2) Brimijoin, S., Lundberg, J. M., Brodin, E., Hökfelt, T., et al.: G., Brain Res, 191: 443-457, 1980.
- 3) Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A. and Woolf, C. J.: Trends Neurosci, 26: 2003.
- 4) Oguri, T., Takahata, I., Katsuta, K., Nomura, E., et al.: Proteomics, 2: 666-672, 2002.
- 5) Wang, L. H. and Strittmatter, S. M.: J Neurosci, 16: 6197-6207, 1996.
- 6) Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Ménager, C., et al.: Nat Neurosci, 4: 781-782, 2001.
- 7) Arimura, N., Menager, C., Fukata, Y. and Kaibuchi, K.: J Neurobiol, 58: 34-47, 2004.
- 8) Gu, Y. and Ihara, Y.: J Biol Chem, 275: 17917-17920, 2000.
- 9) Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Menager, C., et al.: Nat Cell Biol, 4: 583-591, 2002.
- 10) Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., et al.: Cell, 120: 137-149, 2005.
- 11) Mortz, E., Krogh, T. N., Vorum, H. and Gorg, A.: Proteomics, 1: 1359-1363, 2001.
- 12) Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., et al.: Electrophoresis, 20: 601-605, 1999.
- 13) Nomura, E., Katsuta, K., Ueda, T., Toriyama, M., et al.: J Mass Spectrom, 39: 202-207, 2004.
- 14) Gu, Y., Hamajima, N. and Ihara, Y.: Biochemistry, 39: 4267-4275, 2000.
- 15) Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., et al.: Eur J Neurosci, 17: 2329-2343, 2003.
- 16) Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P. and Strittmatter, S. M.: Nature, 376: 509-514, 1995.
- 17) Liu, B. P. and Strittmatter, S. M.: Curr Opin Cell Biol, 13: 619-626, 2001.
- 18) Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., et al.: J Neurochem, 86: 1042-1050, 2003.
- 19) Yoshida, H., Watanabe, A. and Ihara, Y.: J Biol Chem, 273: 9761-9768, 1998.

- 20) Tahimic, C. G. T., Tomimatsu, N., Nishigaki, R., Fukuhara, A., et al.: *Biochem Biophys Res Commun*, 340: 1244–1250, 2006.
- 21) Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Ménager, C., et al.: *J Biol Chem*, 275: 23973–23980, 2000.
- 22) Charrier, E., Reibel, S., Rogemond, V., Aguera, M., et al.: *Mol Neurobiol*, 28: 51–64, 2003.
- 23) Bretin, S., Reibel, S., Charrier, E., Maus-Moatti, M., et al.: *J Comp Neurol*, 486: 1–17, 2005.
- 24) Cole, R. N. and Hart, G. W.: *J Neurochem*, 79: 1080–1089, 2001.
- 25) Kanninen, K., Goldsteins, G., Auriola, S., Alafuzoff, I., et al.: *Neurosci lett*, 367: 235–240, 2004.
- 26) Kowara, R., Chen, Q., Milliken, M. and Chakravarthy, B.: *J Neurochem*, 95: 466–474, 2005.
- 27) Bretin, S., Rogemond, V., Marin, P., Maus, M., Torrens, Y., et al.: *J Neurochem*, 98: 1252–1265, 2006.
- 28) Kowara, R., Moraleja, K. L. and Chakravarthy, B.: *Brain Res*, 1119: 40–49, 2006.
- 29) Hou, S. T., Jiang, S. X., Desbois, A., Huang, D., et al.: *J Neurochem*, 26: 2241–2249, 2006.

[受 賞]

H-RAS^{V12} 導入癌細胞の Smad 依存性癌化シグナルは リンカー部リン酸化を阻害すると 細胞増殖抑制シグナルに回帰する

関本 剛

(関西医科大学内科学第三講座)

Reversible Smad-Dependent Signaling between Tumor Suppression and Oncogenesis

Go SEKIMOTO

Department of Gastroenterology and Hepatology, Kansai Medical University

背景と目的

Smad を介した TGF- β 細胞内シグナル伝達は、癌化過程において中心的な役割を果たしているが、その分子機構は不明な点が多い。TGF- β シグナル伝達因子 Smad2 ならびに Smad3 は、TGF- β 刺激により I 型 TGF- β 受容体 (T β RI) によってリン酸化されたアイソフォーム (pSmad2C ならびに pSmad3C) と、c-Jun N-terminal kinase (JNK) でリン酸化されたアイソフォーム (pSmad2L ならびに pSmad3L) に変換される¹⁾。

我々は pSmad3C を介するシグナルは、細胞の増殖抑制に働き、JNK 依存性の pSmad2L ならびに pSmad3L を介するシグナルは、細胞の浸潤能を高めると報告してきた²⁻⁸⁾ (図1)。さらにヒトの大腸ならびに肝発癌過程において、上皮細胞の TGF- β シグナル伝達が、pSmad3C から pSmad3L カスケードへシフトしている事象を観察した^{9,10)}。

そこで今回我々は、癌細胞における Smad2 ならびに Smad3 リンカー部リン酸化の果たす役割と、癌に対する新たな標的分子を明らかにする目的

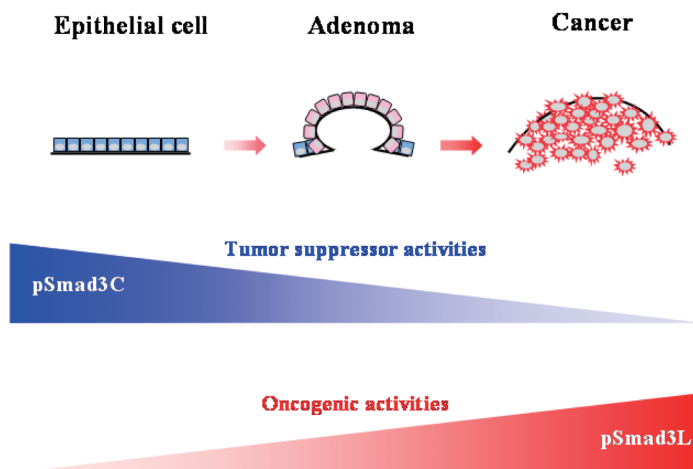


図 1

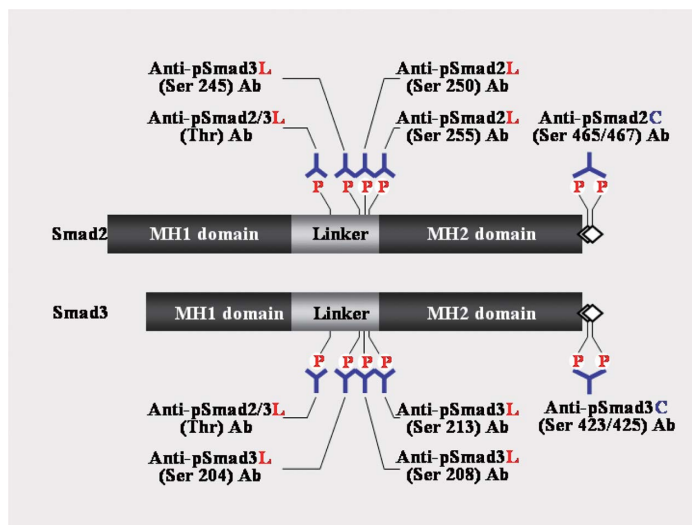


図 2

で、まず正常胃上皮細胞に前癌遺伝子として広く知られているH-RASをレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、癌細胞を作り出した。次に、Smad3 リンカー部がリン酸化しない変異遺伝子 (Smad3 EPSM) を、別の抗生物質耐性レトロウイルスを用いて遺伝子導入し、この細胞における TGF- β シグナル伝達ならびに生物学的機能を解析した。

方 法

我々は Smad2 ならびに Smad3 リンカー部に存在する 4カ所のリン酸化部位を特異的に認識する 7 種類の抗体を新たに作成し、以前より使用していた C 末端部のリン酸化を認識する 2 種類と合わせて、計 9 種類の抗体を用いて細胞内 TGF- β シグナル伝達を解析した (図 2)。

まずラット正常胃上皮細胞 (RGM-1) に Blasticidin 耐性 retrovirus を用いて活性型 H-RAS^{V12} を導入した細胞株を作成した。この RAS 導入癌細胞に、Smad3 リンカー部がリン酸化されない変異遺伝子 (Smad3EPSM) を、Puromycin 耐性 retrovirus を用いて遺伝子導入した。

リン酸化と標的遺伝子発現は Western blot 法で、核移行は Immunofluorescence 法で解析した。生物学的機能として、DNA 合成能と細胞浸潤能を調べた。

結 果

H-RAS^{V12} 導入癌細胞 (RGM-Ras) において Smad2/3 リンカー部は、活性化した JNK により恒常的にリン酸化されていた。核移行した pSmad2/3L は、PAI-1 や MMP1,2,9 の発現を誘導し、細胞浸潤能を高めていた。TGF- β で親株 RGM-1 細胞を刺激すると、Smad3C がリン酸化され、細胞増殖が抑制されたのに対し、RGM-Ras 細胞では TGF- β で刺激しても Smad3C はリン酸化されず、細胞増殖は抑制されなかった。

RGM-Ras 細胞に Smad3L がリン酸化されない変異遺伝子 (Smad3EPSM) を導入した細胞においては、内在性 Smad2/3L リン酸化および細胞浸潤能が著しく阻害された。一方、RGM-Ras 細胞で一旦認められなくなっていた TGF- β 依存性の Smad3C リン酸化および pSmad3C を介する細胞増殖抑制は、親株 RGM-1 細胞と同等に認められるようになった (図 3)。

考 察

これまで Smad リンカー部のリン酸化は、Smad の核移行を阻害し、すべての TGF- β シグナルを遮断させると考えられてきた¹¹⁾。しかし今回の研究では、H-RAS^{V12} 遺伝子を導入した癌細胞において、pSmad2/3L は、積極的に細胞増殖や浸潤能を高めており、pSmad2/3L を介するシグナル伝達は、

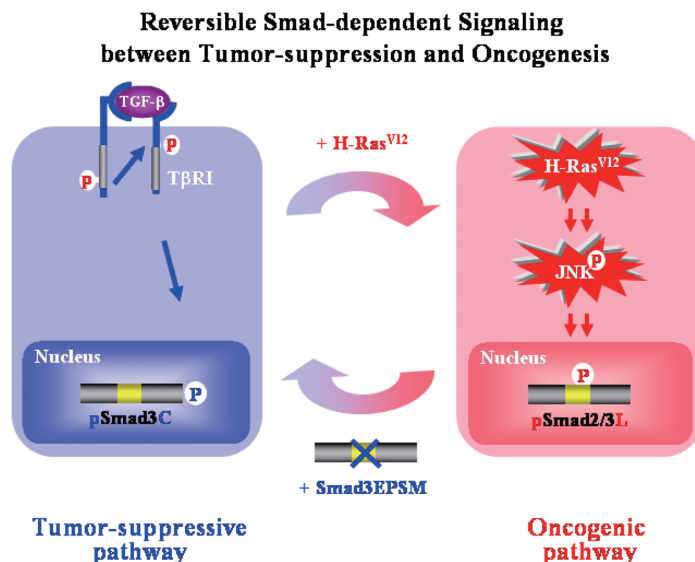


図 3

癌の進展を促進する『癌化シグナル』であると結論した¹²⁾。

さらに JNK/pSmad3L 経路を阻害すると、この癌化シグナルは、pSmad3C を介する細胞抑制シグナルに回帰したことから、リンカー部リン酸化の抑制は、ヒト癌に対する新たな治療法になり得、又、その際 Smad2/3L ならびに Smad3C リン酸化の解析は、治療効果を評価する良いバイオマーカーとなるであろう。

文 献

- 1) Matsuzaki, K.: *a review* Smad3 phosphoisoform-mediated signaling during human sporadic colorectal carcinogenesis. *Histology and Histopathology*, 21: 645–662, 2006.
- 2) Matsuzaki, K., Date, M., et al.: Autocrine stimulatory mechanism by TGF- β in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 60: 1394–1402, 2000.
- 3) Matsuzaki, K., Date, M., et al.: Regulatory mechanisms for TGF- β as autocrine inhibitor in human hepatocellular carcinoma: Implications for roles of smads in its growth. *Hepatology*, 32: 218–227, 2000.
- 4) Tahashi, Y., Matsuzaki, K., et al.: Differential regulation of autocrine transforming growth factor β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injuries. *Hepatology*, 35: 49–61, 2002.
- 5) Sugano, Y., Matsuzaki, K., et al.: Distortion of autocrine transforming growth factor β signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF productions in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, 22: 2309–2321, 2003.
- 6) Furukawa, F., Matsuzaki, K., et al.: p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology*, 38: 879–889, 2003.
- 7) Mori, S., Matsuzaki, K., et al.: TGF- β and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene*, 23: 7416–7429, 2004.
- 8) Yoshida, K., Matsuzaki, K., et al.: TGF- β and PDGF signal via JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *American Journal of Pathology*, 166: 1029–1039, 2005.
- 9) Yamagata, H., Matsuzaki, K., et al.: Acceleration of Smad2 and Smad3 phosphorylation via c-Jun N-terminal kinase during human colorectal carcinogenesis. *Cancer Research*, 65: 157–165, 2005.
- 10) Matsuzaki, K., Murata, M., et al.: Chronic inflammation associated with HCV infection perturbs hepatic TGF- β signaling, promoting cirrhosis and HCC. *Hepatology*, 46: 48–57, 2007.
- 11) Shi, Y. and Massague, J.: Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685–700, 2003.
- 12) Sekimoto, G., Matsuzaki, K., et al.: Reversible Smad-dependent signaling between tumor suppression and oncogenesis. *Cancer Research*, 67: 5090–5096, 2007.

[受賞]

超音波によるマイクロバブル破壊波を用いた骨髄単核球細胞の 標的領域への移植は血管新生と動脈新生を促進させる

今田 崇裕, 岩坂 壽二

(関西医科大学循環器・腎・内分泌代謝内科)

Targeted Delivery of Bone Marrow Mononuclear Cells by Ultrasound Destruction of Microbubbles Induces both Angiogenesis and Arteriogenesis Response

Takanobu IMADA, Toshiji IWASAKA

Department of Medicine II, Kansai Medical University

はじめに

虚血下肢に対する骨髄単核球細胞 (BM-MNC)・末梢血単核球細胞移植による血管新生療法における血管前駆細胞の遊走・接着のメカニズムは十分に解明されていない。また臨床における細胞移植による血管新生療法に関しても虚血下肢が主流でありその応用範囲は限られている。これは細胞移植が局所注射によって行われることに問題がある。

超音波 (US) によるコントラストマイクロバブル (Bubble) 破壊衝撃波は局所における微小血管を傷害し arteriogenesis を引き起こす。一方、骨髄単核球細胞の筋肉注射による細胞移植は angiogenesis を引き起こす。そこで US によるマイクロバブル破壊衝撃波と BM-MNC 移植を組み合わせることで arteriogenesis と angiogenesis による血流改善効果の検討を行った。

研究方法

ラット右大腿動静脈を結紮剥離し虚血下肢モデルを作成した。虚血作成4日目に健常側大腿静脈から bubble を静注後、虚血下肢に US (1 MHz, 2 W/cm², Beam Nonuniformity Ratio) を照射した。刺激直後に蛍光染色した BM-MNC (2×10⁷ 個) を経静脈的 (i.v.) に移植した後、血流改善効果を

レーザードップラー (下肢虚血作成当日と移植 0, 1, 2, 3, 4 週目)、血管/筋繊維比・下肢血管造影 (移植 4 週目) を用いて比較検討した。また Bubble+US 刺激による局所の変化を電子顕微鏡において確認した。

次にヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、Bubble+US 刺激後に発現する接着因子を蛍光染色で確認するとともに flow assay を行い、その発現効果を検討した。

結 果

レーザードップラーでは Bubble+US+BM-MNC infusion により未治療群に比し 34%, Bubble+US 群からは 25%増の著明な血流改善効果がみられた (P<0.05) (図 1)。筋繊維あたりの第 VIII 因子陽性の微小血管比 (capillary/muscle fiber ratio) では、Bubble+US 群が未治療群に比し (172%増) であったのに対し Bubble+US+BM-MNC-i.v. 群では (260%増, P<0.01) (angiogenesis) に改善していた (図 2)。Smooth muscle α -actin-陽性の血管/筋繊維比 (arteriole/muscle fiber ratio) の増加も同様にみられ血管造影においても側副血行の増加が確認された (arteriogenesis)。電子顕微鏡において Bubble+US 刺激により局所の血管内皮に血小板の接着・フィブリンネットの形成と同時に単

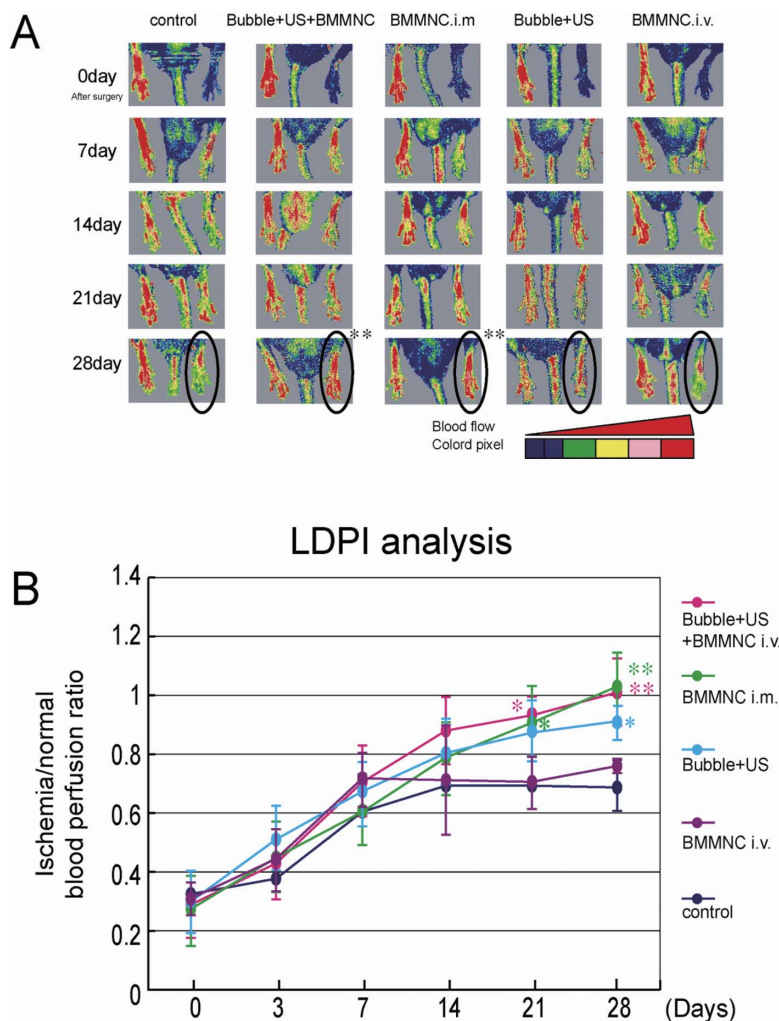


図1 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 25(10) 2128–2134, 2005.

核球細胞の接着も確認することができた。このことから血小板の活性化が移植 BM-MNC と血管内皮の接着に重要な役割をもつと考えた。培養細胞において、Bubble+US 刺激を行うことにより活性化された血小板由来 pro-inflammatory factor が接着因子 (P-selectin・ICAM-1) を局所に発現し、flow assay により BM-MNC が内皮細胞に有意に接着することが確認された (図3)。

考 察

筋肉注射による自己骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生療法は、関西医科大学のみの症例でも2000年7月～2006年4月までに68例行われてい

る。結果62%の症例に Ankle-brachial blood pressure index (ABI) において 0.1 以上の血流改善効果が得られた。しかし移植の際に局所に痛みを伴うなど問題は今も残っており、非侵襲的な目的領域への細胞移植法の確立は血管新生療法において大きなメリットがある。近年、標的臓器への遺伝子・薬物の輸送方法の一手段として US 刺激によるマイクロバブル衝撃波が注目されている。US 刺激でマイクロバブルを破壊するとバブルが壊れた際に生じる Jet が局所の微小血管を障害し arteriogenesis を生じさせることは報告されていた。しかしこれまで、細胞の輸送方法としてマイクロバブル衝撃波が有用かどうか検討されていない。本研

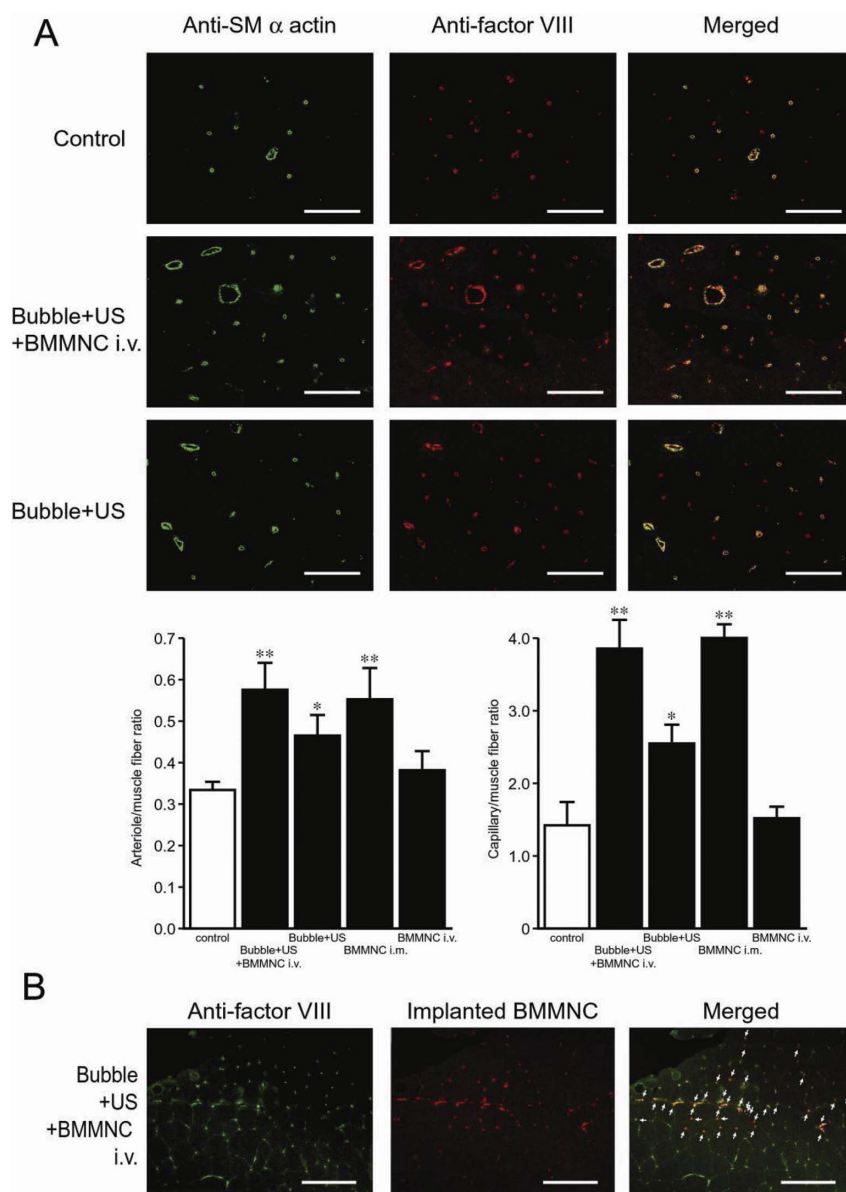


図 2 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 25(10) 2128–2134, 2005.

究では、ラット虚血下肢モデルにおいて Bubble+US 刺激後に経静脈的に BM-MNC 移植しても BM-MNC-i.m. 群と同等の血流改善効果があることを明らかにした。そのメカニズムとして Bubble+US 刺激直後の電子顕微鏡像で障害をうけた血管内皮にフィブリンネットの形成と血小板の接着像が見られたことから、マイクロバブルが血管内で壊れた際に生じる Jet が局所の血管内皮と血管内を流

れる血小板を活性化させ局所に接着因子を発現させると考えた。このことは HUVEC を用いた実験系において、血小板を含んだ培養液に Bubble+US 刺激を加えた時のみ有意に接着因子が発現し、かつ flow assay でも BM-MNC が接着することからも証明することができた。以上の結果から、従来行われている骨髓単核球細胞の筋肉注射による移植と比較しても、より低侵襲かつ効果的な血管新生

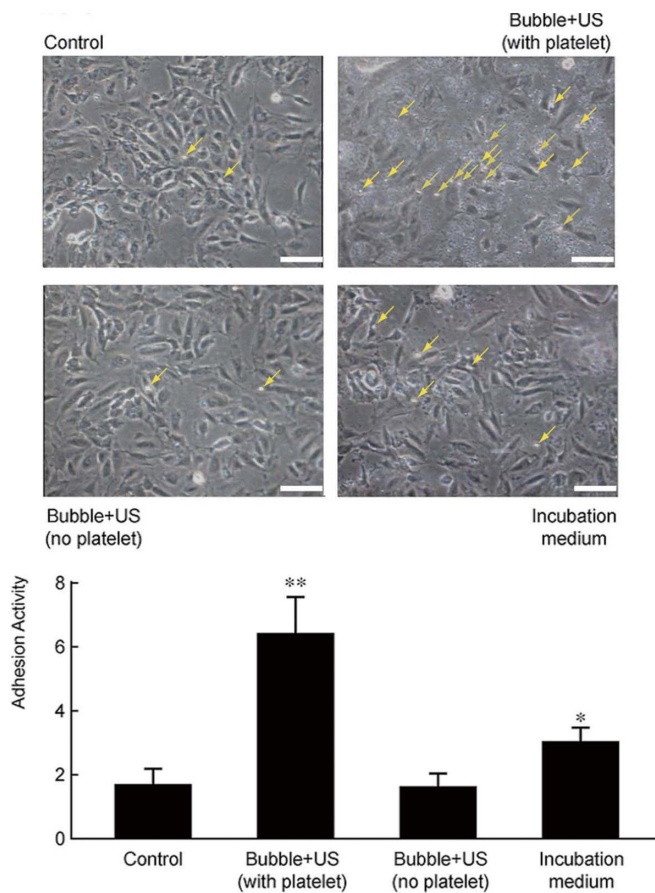


図3 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 25(10) 2128–2134, 2005.

療法が行える可能性が示唆された。また血管内皮と BM-MNC の接着には Bubble+US 刺激により活

性化された血小板由来の pro-inflammatory factor が重要な役割を果たしていることも判明した。

第124回 関西医科大学学内学術集談会

日 時：平成20年3月28日（金） 午後1時00分～午後4時00分
会 場：関西医科大学附属滝井病院 南館 臨床講堂

特別講演

1. サルコイドーシスにおける皮膚病変と多核巨細胞
皮膚科学講座 教授 岡本 祐之
2. 高大接続 ―関西医科大学・英語科目の場合―
英 語 教授 中川 淳

一般演題

1. Targeted delivery of bone marrow mononuclear cells by ultrasound destruction of microbubbles induces both angiogenesis and arteriogenesis response (超音波によるマイクロバブル破壊波を用いた骨髓単核球細胞の標的領域への移植は血管新生と動脈新生を促進させる)
内科学第二講座 今田 崇裕
2. プロテアーゼ活性化受容体4の情報伝達機構と肺線維化への関与に関する研究
内科学第一講座 安藤 性實
3. 網膜色素上皮細胞におけるオルニチン細胞傷害機構の解析：アミノ酸トランスポーター CAT-1 のスペルミンによる誘導
眼 科 学 講 座 金子 志帆
4. 橋核へのコリン作動性入力：Vesicular acetylcholine transporter 抗体を用いた研究
脳構築学（解剖学第二講座） 堤 俊之
5. Proteomic identification of a novel isoform of collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in spinal nerves peripheral to dorsal root ganglia (プロテオミクスによる末梢神経特異的な新規 CRMP-2 アイソフォームの同定)
医 化 学 講 座 片野 泰代
6. Effectiveness of treatment with donepezil hydrochloride and changes in regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease (アルツハイマー病患者における塩酸ドネペジルの治療効果と局所脳血流の変化について)
精神神経科学講座 吉田 常孝
7. H-RAS^{V12} 導入癌細胞の Smad 依存性癌化シグナルは、リンカー部リン酸化を阻害すると細胞増殖抑制シグナルに回帰する
男山病院内科 関本 剛
8. ヒト脂肪組織由来幹細胞の分離と脂肪・骨・軟骨への分化
形成外科学講座 覚道奈津子

9. 出血性ショック後早期の胸腺および脾臓において高張食塩液蘇生がCD4 + CD25 + 制御性T細胞及び $\gamma\delta$ T細胞とアポトーシスに及ぼす影響

救急医学科

諫山 憲司

10. ロールシャッハテストからみた性同一性障害 ～日本人一般成人との比較～

精神神経科学講座

吉野 真紀

特別講演

1. サルコイドーシスにおける皮膚病変と多核巨細胞

皮膚科学講座 岡本 祐之

サルコイドーシスは皮膚、リンパ節、肺、眼など多臓器を侵す原因不明の全身性肉芽腫性疾患で、組織学的には活性化Tリンパ球の集積を伴う非乾酪壊死性類上皮細胞肉芽腫を特徴とする。複数の臓器を侵す疾患であるが、各臓器の症状は多彩で、人種、民族による臨床症状の差も大きい。診断は、臨床像、組織像、血清ACE高値などの検査所見を合わせて行う。サルコイドーシスの皮膚病変は、胸郭内病変、リンパ節病変、眼病変の次に多く、本症の発見時症状の中では眼病変について2番目に多い。また、他臓器に比べ容易に生検を行えるため、肉眼的、組織学的情報を提供しうる皮膚病変はサルコイドーシスの診断に極めて重要である。サルコイドーシスの皮膚症状は多彩であり、それを理解しやすいように、わが国では、臨床症状に組織学的特徴を加味した福代の分類が用いられている。すなわち、1) 組織学的に肉芽腫を認めない非特異的病変である結節性紅斑。2) 組織学的に肉芽腫とともに異物が証明される癰痕浸潤。3) 組織学的に肉芽腫を認める特異的病変の皮膚サルコイドに大別されている。そして、皮膚サルコイドはその臨床症状から結節型、局面型、びまん浸潤型、皮下型、その他のまれな病型に細分されている。

皮膚サルコイドの組織像は、そのような臨床症状を反映し病型により多様性がある。基本的には類上皮細胞が集合して種々の大きさの肉芽腫を形成し、不規則に真皮から時に皮下組織に分布する。肉芽腫内にはLanghans型、異物型多核巨細胞が存在する。そして、このような多核巨細胞は単球から*in vitro*においても誘導することができる。

今回、サルコイドーシスの皮膚病変を供覧し、*in vitro*での多核巨細胞形成系で得た知見について紹介する。

2. 高大接続

—関西医科大学・英語科目の場合—

英語教室 中川 淳

関西医科大学に勤務してまもなく1年になります。この1年間の英語教育について先生方にお話しさせていただきたいと思います。

英語科目の目的は、大学入学を境に変わります。大学入学以前は読み方・書き方等の習得が目的であるのに対し、入学後は内容を読み取り、書けることが目的になります。つまりハウツーからコンテンツに移ります。大学向けの英語教材は、それまで文学が主流であったのに対し、大綱化以来、学部の内容に合わせてさまざまな教材が開発されるようになりました。残念ながら医学部向けはまだほとんどありませんが、平成19年度の1年生には、English for Medical StudentsとEnglish Medical Terminologyという教材を中心に行いました。ただ、日本の高等学校の英語の教科書には、理系の内容が6分の1しか入っていないことから、医学部も含めて理系の学部の学生は、理系の表現に対応できず、苦勞を強いられることになります。

前期・後期試験の平均点は74点でしたが、この試験を通して、本学の学生の特徴が明らかになりつつあります。例えば、次のように空所に適語を入れる問題ですと、ほぼ全員が正解になります。

By preventing blood from pooling, cooling down helps the bloodstream to speed up its removal of < > acid.

ところが、次のように空所に適当な英文を自由に書く問題になりますと、正解は20パーセント程度に大きく下がります。

Water aerobics is an excellent choice for older people because ().

英文が書けない理由として、次の2点が考えられます。第1点目は、大学受験勉強の弊害です。大学入試に出題される英語構文・表現は限られているため、その習熟にこれまで力を注いできたため、それ以外のことに対応できなくなっています。第2点目は、英語に接する絶対的な時間と量が少ないことです。英語教育で日本と同じ言語環境にあり、よく比較される韓国では教材は日本の3倍近くになり、同様の上海では小・中・高等学校の授業時間は週に7時間あり、英語に接する時間を確保しています。

そこで、英語に接する時間と量を増やすために、授業以外にe-ラーニングの利用を考えています。ただ、さらに不安材料が見え始めています。コンテンツです。医学部の学生とはいえ、意外に社会の常識の欠如が気にかかっています。

どうするのか、迷いながら、まもなく新しい1年が始まります。

一般演題

1. Targeted delivery of bone marrow mononuclear cells by ultrasound destruction of microbubbles induces both angiogenesis and arteriogenesis response

内科学第二講座 今田 崇裕

はじめに 我々は世界で初めて、人の虚血下肢に対して骨髓単核球細胞(BM-MNC)・末梢血単核球細胞移植による血管新生療法の臨床応用に成功した。しかし、細胞を用いた血管新生療法における血管前駆細胞の遊走・接着のメカニズムは現在まで十分に解明されていない。また、臨床における骨髓単核球細胞移植による血管新生療法に関しても虚血下肢が主流でありその応用範囲は限られている。これには現在行われている細胞移植が筋肉内注射(i.m.)によって行われるなど、侵襲や痛みを伴うことに問題があると考えている。

超音波(US)によるコントラストマイクロバブル(Bubble)破壊衝撃波は局所における微小血管を傷害し arteriogenesis を引き起こす。一方、骨

髄単核球細胞の筋肉注射による細胞移植は angiogenesis を引き起こす。そこでUSによるマイクロバブル破壊衝撃波と BM-MNC 移植を組み合わせることで arteriogenesis と angiogenesis による血流改善効果の検討を行った。

研究方法 ラット右大腿動静脈を結紮剥離し虚血下肢モデルを作成した。虚血作成4日目に健常側大腿静脈から bubble を静注後、虚血下肢にUSを照射した。刺激直後に蛍光染色した BM-MNC (2×10^7 個)を経静脈的(i.v.)に移植した後、血流改善効果をレーザードップラー(下肢虚血作成当日と移植0, 1, 2, 3, 4週目)、血管/筋繊維比・下肢血管造影(移植4週目)を用いて比較検討した。また Bubble+US 刺激による局所の変化を電子顕微鏡において確認した。

次にヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、Bubble+US 刺激後に発現する接着因子を蛍光染色で確認するとともに flow assay を行い、その発現効果を検討した。

結果 レーザードップラーでは Bubble+US+BM-MNC infusion により未治療群に比し34%、Bubble+US 群からは25%増の著明な血流改善効果がみられた($P < 0.05$)。筋繊維あたりの第VIII因子陽性の微小血管比(capillary/muscle fiber ratio)では、Bubble+US 群が未治療群に比し(172%増)であったのに対し Bubble+US+BM-MNC-i.v. 群では(260%増, $P < 0.01$) (angiogenesis)に改善していた。Smooth muscle α -actin- 陽性の血管/筋繊維比(arteriole/muscle fiber ratio)の増加も同様にみられ血管造影においても側副血行の増加が確認された(arteriogenesis)。電子顕微鏡において Bubble+US 刺激により局所の血管内皮に血小板の接着・フィブリンネットの形成と同時に単核球細胞の接着も確認することができた。このことから血小板の活性化が移植 BM-MNC と血管内皮の接着に重要な役割をもつと考えた。培養細胞において、Bubble+US 刺激を行うことにより活性化された血小板由来 pro-inflammatory factor が接着因子(P-selectin・ICAM-1)を局所に発現し、flow assay により BM-MNC が内皮細胞に有意に接着することが確認された。

考察 我々が初めて臨床応用した筋肉注射による自己骨髓単核球細胞移植を用いた血管新生療法は、関西医科大学のみの症例でも2000年7月～

2006 年 4 月までに 68 例行われている。結果 62% の症例に Ankle-brachial blood pressure index (ABI) において 0.1 以上の血流改善効果が得られた。しかしながら移植の際に局所に痛みを伴うなどの問題は今も残っており、非侵襲的な目的領域への細胞移植法の確立は血管新生療法において大きなメリットがあると考えている。近年、標的臓器への遺伝子・薬物の輸送方法の一手段として US 刺激によるマイクロバブル衝撃波が注目されている。US 刺激でマイクロバブルを破壊するとバブルが壊れた際に生じる Jet が局所の微小血管を障害し arteriogenesis を生じさせることは報告されていた。しかしながらこれまで、細胞の輸送方法としてマイクロバブル衝撃波が有用であるかどうか検討はされていない。本研究では、ラット虚血下肢モデルにおいて Bubble+US 刺激後に経静脈的に BM-MNC 移植しても BM-MNC-i.m. 群と同等の血流改善効果があることをレーザードップラー・muscle fiber-ratio・血管造影の結果から明らかにした。そのメカニズムとして Bubble+US 刺激直後の電子顕微鏡像で障害をうけた血管内皮にフィブリンネットの形成と血小板の接着像が見られたことから、マイクロバブルが血管内で壊れた際に生じる Jet が局所の血管内皮と血管内を流れる血小板を活性化させ局所に接着因子を発現させると考えた。このことは、HUVEC を用いた実験系において、血小板を含んだ培養液に Bubble+US 刺激を加えた時のみ有意に接着因子が発現し、かつ flow assay でも BM-MNC が接着することからも証明することができた。以上の結果から、従来行われている骨髄単核球細胞の筋肉注射による移植と比較しても、より低侵襲かつ効果的な血管新生療法が行える可能性が示唆された。また血管内皮と BM-MNC の接着には Bubble+US 刺激により活性化された血小板由来の pro-inflammatory factor が重要な役割を果たしていることも判明した。

2. プロテアーゼ活性化受容体 4 の情報伝達機構と肺線維化への関与に関する研究

内科学第一講座 安藤 性實

研究目的 プロテアーゼ活性化受容体 (Protease activated receptor; PAR) はトロンビン、トリプシンなどのセリンプロテアーゼで活性化される新規

G 蛋白共役型受容体で、4 つの分子種 (PAR1~4) が同定されている。肺で高く発現する PAR4 は PAR1 と同様にトロンビンで活性化されるが、その生理作用および情報伝達機構については不明である。近年、肺線維症などの呼吸器疾患とトロンビンとの関連が指摘されている。肺の線維化の一因として最近、上皮細胞の筋線維芽細胞への形質転換 (上皮-間葉転換; epithelial mesenchymal transition; EMT) が注目されていることから、今回、呼吸器における PAR4 の病態生理学的意義として肺線維化進展への関与について、肺胞上皮細胞を用いて研究を行なった。実験では EMT 誘導に着目し、その細胞内機序を Ca^{2+} シグナルおよび上皮成長因子受容体 (EGFR) のトランスアクチベーションの観点から検討した。

研究方法 1) 初代培養マウス肺胞上皮細胞での PAR4 発現を免疫細胞化学法と RT-PCR 法で検討した。

2) PAR 刺激による Ca^{2+} シグナルは、fura 2-AM で負荷した単一肺胞上皮細胞をトロンビン (1 U/ml)、PAR4 アゴニストペプチド (AYPGKF-NH₂, 10 μM) で刺激し、高速顕微鏡測光による fura 2 蛍光変化から解析した。

3) 初代培養マウス肺胞上皮細胞およびヒト肺胞上皮癌由来細胞株 (A549 cell line) をトロンビン (1 U/ml)、PAR4 アゴニストペプチド (AYPGKF-NH₂, 100 μM) で 72-96 時間刺激し、E-カドヘリン (上皮細胞マーカー) と α -平滑筋アクチン (α -SMA, 筋線維芽細胞マーカー) の発現変化を免疫細胞化学法と Western blot 法で観察した。E-カドヘリンの発現減少と α -SMA 発現増大を上皮-間葉転換の指標とした。

4) 細胞内情報伝達分子である EGFR および Src の活性化は各々のチロシンリン酸化抗体を用いた Western blot 法で検討した。

結果 1) 初代培養マウス肺胞上皮細胞で PAR4 の存在 (mRNA および蛋白質) が確認された。

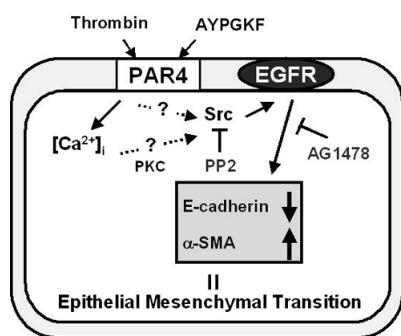
2) 肺胞上皮細胞の PAR4 アゴニスト AYPGKF およびトロンビンによる刺激は、2 相性 Ca^{2+} 反応 (一過性ピークに続く緩徐下降相) を惹起し、比較的長い反応持続時間を有した。PAR4 由来の Ca^{2+} 反応は、ホスホリパーゼ C 阻害薬 (U-73122) および貯蔵 Ca^{2+} 枯渇薬 (thapsigargin) で抑制された。細胞外 Ca^{2+} 除去や Ca^{2+} 貯蔵共役型 Ca^{2+} 流入阻害

薬 (trans-resveratrol) 前処置下では、第1相の一過性 Ca^{2+} ピーク値は変わらず、反応持続時間のみが短縮された。

3) 初代培養マウス肺胞上皮細胞と A549 細胞をトロンビン、PAR4 アゴニスト AYPGKF で 72–96 時間刺激すると、E-カドヘリンの減少と α -SMA の増大が誘導された。これらの変化は、Ca キレート剤 (BAPTA) 存在下で抑制され、EGFR キナーゼ阻害薬 (AG1478) および Src ファミリーチロシンキナーゼ阻害薬 (PP2) により有意に抑制された。

4) A549 細胞でのトロンビン、PAR4 アゴニスト AYPGKF-NH2 による PAR4 刺激は、EGFR および Src の活性化を惹起し、EGFR の活性化は Src 阻害薬 PP2 により抑制された。

結論と考察 肺胞上皮細胞での PAR4 刺激による 2 相性 Ca^{2+} 反応は、イノシトールリン脂質代謝回転の促進を介して、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員と Ca^{2+} 貯蔵共役型 Ca^{2+} 流入により生じた。こうした Ca^{2+} シグナルおよび PAR4 刺激に連動して活性化される Src/EGFR シグナル経路は上皮細胞から筋線維芽細胞への形質転換を誘導することが示された (図)。本研究結果は、肺線維化の病態生理の理解および新規治療法に対する実験的基盤になるものと考えられる。



3. 網膜色素上皮細胞におけるオルニチン細胞傷害機構の解析：アミノ酸トランスポーター CAT-1 のスペルミンによる誘導

眼科学講座 金子 志帆

脳回転状脈絡網膜変性症 (Gyrate atrophy: GA) は、ornithine aminotransferase (OAT) 遺伝子の変

異が原因で生じる、常染色体劣性を呈する進行性の網脈絡膜変性疾患である。小児期に夜盲で発症し、患者の多くは 50 才代までに失明に至るが、網脈絡膜障害の原因については不明である。これまで我々は、OAT の特異的阻害剤 5-fluoromethylornithine (5-FMO) とオルニチンにより網膜色素上皮細胞が傷害される本疾患の *in vitro* モデルを確立した (Ueda et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39: 820–827)。さらに中性アミノ酸による障害の保護効果を見だし、RPE 細胞障害にアミノ酸輸送が関与することを明らかにした (Nakauchi et al. *ibid.* 2003; 44: 5023–5028)。細胞傷害のメカニズムを解明するため、RPE 細胞におけるアミノ酸トランスポーター (AAT) の発現および機能解析を行い、オルニチンの主要な輸送担体の同定を行った。また、オルニチンと、オルニチンの代謝産物であるポリアミンによる、AAT の発現制御及び細胞傷害について検討した。

ヒト RPE 細胞株 hTERT-RPE において 6 種類の AAT (LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, CAT-1, b⁰+AT) と 2 種類の補助因子 (4F2hc, rBAT) の発現が RT-PCR およびノーザンブロット法を用いて確認された。その中で、CAT-1 および y+LAT2 の siRNA を用いた発現抑制により、それぞれ 46.6% と 22.0% オルニチンの細胞内への取り込みは減少した。さらに CAT-1 発現抑制により、オルニチン及び 5-FMO 添加による細胞の変性、脱落は抑制された。hTERT-RPE 細胞においては、CAT-1 を介したオルニチンの取り込みが、細胞傷害を誘導していることが示唆された。

さらに hTERT-RPE 細胞では、5-FMO とオルニチン処理にてオルニチンの取り込みが増加した。また、CAT-1 mRNA の発現上昇が認められ、この発現誘導はポリアミンの合成酵素 ornithine decarboxylase (ODC) の阻害剤にて抑制された。ODC の発現抑制により、オルニチンの細胞内への取り込みが減少し、オルニチンによる細胞障害も抑制された。5-FMO とオルニチン添加では、細胞内のスペルミンは増加しており、また、スペルミン添加により、CAT-1 mRNA の発現が上昇した。さらに転写因子 c-myc mRNA の発現もまたオルニチン及びポリアミン添加により増加し、c-myc の発現抑制によって、CAT-1 mRNA の発現誘導が抑制された。

5-FMO とオルニチン処理後の hTERT-RPE 細胞では、CAT-1 の発現誘導を介して、オルニチンの取り込みが増加すると考えられた。hTERT-RPE 細胞では、オルニチンの主要なトランスポーターは CAT-1 であり、CAT-1 がオルニチンによる細胞傷害に関与していた。CAT-1 の発現誘導には、ポリアミン、特にスペルミンの増加が重要であり、転写因子 c-myc を介した CAT-1 の発現量の増加が、細胞障害誘導に関与することが示唆された。

CAT-1 の発現量を調節することで、オルニチンによる RPE 細胞障害を抑制できる可能性があり、CAT-1 の発現制御の機構をさらに明らかにすることで、現在治療法のない GA の治療法確立に貢献できると考えられた。

4. 橋核へのコリン作動性入力：

Vesicular acetylcholine transporter 抗体を用いた研究

脳構築学（解剖学第二講座） 堤 俊之

橋核には他の小脳前核にみられない特徴として、コリン作動性入力が豊富なことを見出した。本研究では 8～10 週齢の ddY 雄性マウスを用いて、橋核におけるコリン作動性線維の局在を、小胞膜アセチルコリントランスポーター（VACht）抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。橋核では多数の瘤状線維が VACht 免疫陽性を示した。光顕ならびに電顕観察を行い、三次元構築法を用いて詳細分布をマッピングした。つぎにこれらの瘤状線維を供給する VACht 免疫陽性ニューロンを脳内に特定した。実験には、片側の橋核に WGA-HRP を予め注入したマウスを用い、WGA-HRP で逆行性に標識された VACht 免疫陽性ニューロンを検出した。橋核における VACht 免疫陽性線維の分布に関しては、吻側から尾側までを通して辺縁領域（特に内側、腹側）に高密度に認められた。電顕像では VACht 免疫陽性産物はシナプス小胞のほか瘤状終末の内部の管腔状小器官に局在した。VACht 免疫陽性の軸索終末は pleomorphic synaptic vesicle を有し、樹状突起に対して symmetrical synapse を形成していた。橋核に線維を送る VACht 免疫陽性ニューロンは脚橋被蓋核と背外側被蓋核にいずれも両側性に分布した。以上より脚橋被蓋核と背外側被蓋核のニューロンが直接、皮質—橋—

小脳路を介する運動経路を抑制的に制御することがはじめて形態学的に示された。橋核ニューロンには抑制性ムスカリン性受容体 m2 サブタイプが豊富に存在することから、今回見出したコリン入力は、橋小脳路を介する脳幹機能の発現と病態の調節に重要な影響を与えるものと考えられる。

5. Proteomic identification of a novel isoform of collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in spinal nerves peripheral to dorsal root ganglia

医化学講座 片野 泰代

はじめに 神経細胞は高度に分化した細胞であり、軸索と樹状突起という極性の異なる神経突起を有する。神経の伝達方向が一方向であるのに対し、合成された物質はそれぞれの神経突起に分別輸送される。他方、慢性疼痛は末梢性および中枢性の2つの感作機構によって発症することが知られており、このような生理機能変化に伴う1次求心性線維による機能性分子の輸送は変化する。そのことから1次求心性線維の極性を明らかにする目的でその細胞体が存在する後根神経節（DRG）の中核側と末梢側の神経組織を用いたプロテオミクス解析をおこなった。

研究方法 5 週齢の Wistar ラットから DRG の末梢側（P 画分）と中枢側（C 画分）の神経組織をそれぞれ回収しホモゲナイズ後、7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100 と 0.25% SDS を含むバッファーにて可溶化し試料を調製した。各 360 μg の蛋白を高解像度（1 次元目 24 cm, pH 5–6, 2 次元目 22×70 cm ポリアクリルアミドゲル）の 2 次元電気泳動（2DE）を行なった。蛋白スポットは銀染色にて可視化し比較解析を行なった。一方の画分に特異的、あるいは有意に発現量変化が認められ、再現性が確認されたスポットを MALDI-TOF MS を用いて測定、ペプチドマスフィンガープリント法にて同定した。同定分子の局在および発現量解析をウェスタンブロット法にて行なった。翻訳後修飾および、蛋白を構成するペプチド断片の特異性を明らかにするために、脱リン酸化酵素を用いた解析、MS および MS/MS 解析をおこなった。末梢神経損傷に伴う発現量変化を、2D-ディファレンシャルゲル電気泳動（2D-DIGE）

法およびウェスタンブロット法にて解析した。

結果 2つの画分のゲルからそれぞれおよそ800個の蛋白スポットを検出し、各画分に特異的な分子の検出および同定を行なった。DRGの末梢側の神経組織に特異的な蛋白スポットの一つを collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) と同定した。CRMP-2は特異的な抗体を用いた2DEウェスタンブロットにて異なる分子量、等電点をもつ複数のスポットとして、脳、脊髄、DRGそして末梢神経組織に認められた。しかしながら、同定したCRMP-2スポット (*Mr* 60 kDa, *pI* 5.6) はDRGの末梢側の神経組織にのみ検出されたことから periCRMP-2 と名付けた。リン酸化修飾の有無を明らかにする目的で脱リン酸化酵素処理を行なった結果、すでにリン酸化修飾が報告されている高分子量のCRMP-2スポットは塩基性側へ収束したが、periCRMP-2の等電点は変化しなかった。MSおよびMS/MSを用いた解析から糖鎖の修飾は認められず、既知のCRMP-2より電気泳動上、低分子量に検出されるperiCRMP-2はC末端の切断フォームであることが示唆された。またperiCRMP-2は末梢神経結紮3および7日後では発現量が減少することがわかった。

考察 CRMP-2は神経の発生および再生に関与する分子であり、神経系に広く存在することが知られており、セマフォリンシグナルの下流で作用し、成長円錐を退縮させる機能を有する。一方、海馬を用いた初期培養細胞で成長円錐に濃縮して存在し、軸索決定および伸展、神経の回路網形成に関与する極性決定分子としての機能も報告されている。CRMP-2の機能はRho-kinase, GSK3 β およびCdk5といった複数のリン酸化酵素によって調節されることが知られている。そして、神経変性疾患であるアルツハイマー患者脳でCRMP-2の糖鎖修飾は減少し、リン酸化が増加していることから糖鎖修飾によるリン酸化調節が示唆されている。これらの報告から、CRMP-2の機能調節における翻訳後修飾の重要性がわかる。他方、我々の結果と時期を同じくして、CRMP-2が*in vitro*で虚血による神経細胞死に伴いプロテアーゼで切断されることが報告された。periCRMP-2の切断が示唆されたC末端部位には、糖鎖修飾部位と機能が明らかされているRho-kinaseのリン酸化部位が含まれ、またperiCRMP-2と類似した分子量を示すC

末端24残基の欠損体を*in vitro*で過剰発現させると複数形成される軸索が単一となる。これらのことから、*in vivo*においてもperiCRMP-2は他のCRMP-2と異なる機能を有し、神経損傷後の末梢組織に特異的な機能性分子として神経再生に関与することが示唆された。

6. Effectiveness of treatment with donepezil hydrochloride and changes in regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease

精神神経科学講座 吉田 常孝

研究目的 塩酸ドネペジルは、アルツハイマー病（以後AD）治療薬であり、コリンエステラーゼ阻害作用により脳内のアセチルコリン作用を高め、認知機能を維持する効果がある。この研究の目的は、塩酸ドネペジルの認知機能に対する効果と脳血流の関係を明らかにし、治療効果の判定及び治療効果予測に関する脳血流画像の有用性を評価することである。

研究方法 対象者はNINCDS-ADRDAによってADと臨床的に診断された29人の外来患者である。（男性12人、女性17人、50歳から82歳、平均69.2歳）ドネペジル投与前、投与1ヶ月後、投与3ヶ月後、投与6ヶ月後、投与1年後に、それぞれADAS-cogと脳血流SPECT像で評価した。観察期間中にADASが3点以上の改善を認めたグループをレスポnderとし、改善を認めなかったグループをノンレスポnderとした。

結果 対象者29人中22人がレスポnder（男性7人、女性15人、50歳から82歳、平均69.0歳）、7人がノンレスポnder（男性5人、女性2人、61歳から80歳、平均70.0歳）であった。レスポnderでは、すべての領域で投薬後1年間を通して血流増加を認めた。特に、前頭葉（前方）、頭頂葉において、投薬後1ヶ月で有意な ($p<0.05$) 血流増加を示した。ノンレスポnderでは、すべての領域において投薬後1ヶ月で有意な ($p<0.05$) 血流低下を認めた。特に、海馬領域では、投薬後3ヶ月まで有意な ($p<0.05$) 血流低下を認めた。また、ドネペジル投薬後の局所脳血流をレスポnderとノンレスポnderで比較すると、投薬後1ヶ月では基底核に、3ヶ月では基底核と視床に有

意な ($p<0.05$) 血流の差を認めた。

考察 レスポンダーとノンレスポンダーの違いは、ドネペジルに対する基底核、視床の反応性と、投薬後 1ヶ月目の前頭葉、頭頂葉の血流増加が関与していることが示唆された。また、このことから投薬後 1ヶ月目の脳血流量の変化は、レスポンダーとノンレスポンダーを区別し、治療薬の有効性を予測しうることが示唆された。コリン作動性ニューロンは、前脳基底部に存在するマイネルト基底核を起始核とし、海馬、扁桃核および新皮質全体に投射しており、前頭葉にも多くの軸索を投射している。AD では、初期からこのマイネルト基底核において病変が進行し、それに応じて認知機能障害が惹起される。また、コリン作動性ニューロンは、マイネルト基底核の他に、大脳基底核と外側被蓋野にも存在し、記憶以外の脳機能に関与していると考えられている。外側被蓋野を起始核とするコリン神経細胞は頭側には大脳基底核や視床に軸索を投射している。我々の研究結果で、ドネペジルのレスポンダーにおいて血流が保たれた領域は、コリン作動性ニューロンの主な投射路であった。つまり、レスポンダーでは、コリン作動性ニューロンが温存されていたため、治療開始早期の血流増加を認めたのではないかと考察する。

まとめ 29 人すべての患者に対してドネペジルは効果的であったが、著効を示したレスポンダーは 22 人であった。著効したレスポンダーは、投薬後 1ヶ月で脳血流の増加がみられ、特に、前頭葉、頭頂葉において有意に血流が増加した。レスポンダーでは、認知機能検査も、主に前頭葉機能を反映する項目に改善が見られた。レスポンダーはノンレスポンダーに比して、投薬初期に基底核、視床の有意な血流増加を認めることから、基底核や視床のドネペジルに対する良好な反応性が、結果的に前頭葉機能へ影響し、レスポンダーとノンレスポンダーを分けているのではないかと考えられた。

7. H-RAS^{V12} 導入癌細胞の Smad 依存性癌化シグナルは、リンカー部リン酸化を阻害すると細胞増殖抑制シグナルに回帰する

男山病院内科 関本 剛

TGF- β は、多岐にわたる生物活性を有するサイトカインである。

正常上皮細胞および初期の腫瘍に対しては細胞増殖抑制活性を示す。一方、腫瘍の悪性化と比例して癌細胞の浸潤、転移を促進する。この TGF- β の相反する腫瘍への作用を分子的に分離する事ができれば、その細胞増殖抑制効果を障害する事なく、特異的に悪性化を抑制しうる分子標的療法剤を提示できる可能性がある。

我々はこれまで、ヒト大腸ならびに肝の癌化過程において、TGF- β のシグナルが、C 末端がリン酸化したシグナル伝達因子 Smad3 (pSmad3C) を介するシグナルから JNK 依存性のリンカー部リン酸化 Smad2/3 (pSmad2/3L) を介するシグナルに偏向している事象を報告してきた。

これまで Smad リンカー部のリン酸化は、Smad の核移行を阻害し、TGF- β シグナルを全体的に shut down させると考えられてきた。しかし今回の我々の研究では、正常上皮細胞へ H-RAS^{V12} 遺伝子を導入すると、JNK/Smad2/3L 経路の恒常的なリン酸化を介して恒常的な細胞増殖や浸潤能の促進を来とし、これこそが癌化シグナルであると考えられた。更に、JNK/pSmad3L 経路を阻害する事により Smad3C の TGF- β 刺激によるリン酸化が復活し、H-RAS^{V12} 遺伝子導入により導いた癌化シグナルは細胞増殖抑制シグナル、つまり癌抑制シグナルへと可逆的に回帰した。

以上の事より JNK/pSmad3L 経路の阻害はヒト癌に対する新たな分子標的治療となり得、その際、我々の作成した抗リン酸化抗体を用いた Smad2/3L ならびに Smad3C のリン酸解析は治療効果を評価するバイオマーカーとして有用となるであろうと考えた。

8. ヒト脂肪組織由来幹細胞の分離と脂肪・骨・軟骨への分化

形成外科学講座 ○覚道奈津子
鈴木 健司, 楠本 健司

近年、脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells; ASCs) が発見され、骨髓間葉系幹細胞と同様の多分化能をもつと報告されている。今回我々は、走査電子顕微鏡でのヒト正常脂肪組織の観察を行い、ヒト腹部皮下脂肪組織から分離したASCsを用いた脂肪・骨・軟骨への分化誘導を行った。さらに、アテロハニカムコラーゲンに播種したASCsに骨分化誘導を行うことにより、3次元形状をもつ誘導骨の作成を行い、その骨組織再生能を検討した。ASCsは、脂肪・骨・軟骨すべての成熟細胞へ分化可能であることが各種特殊染色により証明された。また、*in vitro*・*in vivo*においてアテロハニカムコラーゲン多孔体上でASCsは骨芽細胞へと分化し新生骨を形成することが確認できた。脂肪組織は、再生医療において用いられる間葉系幹細胞の供給源として有用であると考えられる。

9. 出血性ショック後早期の胸腺および脾臓において高張食塩液蘇生がCD4+CD25+制御性T細胞及び $\gamma\delta$ T細胞とアポトーシスに及ぼす影響

救急医学科 ○諫山 憲司, 村尾 佳則
平川 昭彦, 中谷 壽男

目的 出血性ショック後の免疫抑制状態に胸腺および脾臓でどの程度CD4+CD25+制御性T細胞と $\gamma\delta$ T細胞に関与しているか、またiNOSとアポトーシスの関連を検討した。

方法 wild typeとしてのC57BL6/JマウスとiNOSノックアウトマウス(B6.129P2(NOS2))を用いた。全身麻酔下で左大腿動脈にPE10のカテーテルを挿入し、ヘパリン100 U/Kgを投与後脱血し血圧を 40 ± 5 mmHgに60分保つ。蘇生液として4 ml/Kgの7.5%NaClとSB(Shed blood: 脱血血液); HS群と脱血血液の2倍量のラクテートリンゲル液と脱血血液; 2LR群を作製し、無処置のControl群とHS群と2LR群の蘇生後2 h, 6 h, 24 h, 48 hの時点でのCD4+CD25+制御性T細胞とCD3

+ $\gamma\delta$ T細胞の脾臓及び胸腺での蘇生後の変化を検討した。

結果 CD4+CD25+制御性T細胞は脾臓においてiNOSノックアウトマウスでは48 h時点で24 h時点と比較し有意($P < 0.01$)に減少し、アポトーシスは脾臓においてwild type, iNOSノックアウトマウスともに6 h, 24 h, 48 h時点でコントロール群と比較して有意に増加。HS群と2LR群の有意差は認められなかった。CD3+ $\gamma\delta$ T細胞はwild type, iNOSノックアウトマウスともに脾臓においてcontrol群に比較して6 h, 24 hで有意に増強していた($P < 0.01$)。CD3+ $\gamma\delta$ T細胞のアポトーシスは胸腺において48 hでiNOSノックアウトマウスがwild typeより有意($P < 0.01$)に増強していたがHS群と2LR群の有意差は認められなかった。

10. ロールシャッハテストからみた性同一性障害～日本人一般成人との比較～

精神神経科学講座 ○吉野 真紀, 中平 暁子
織田 裕行, 鈴木 朋子
田近 文, 有木 永子
木下 利彦

性同一性障害(GID)を有する者は、性同一性にまつわる社会生活上の葛藤を抱えている。彼らはその生きにくさを独自の防衛で対処していると考えられる。本研究の目的は、GIDを有する者の心理的特性を日本人一般成人と比較検討することである。専門的治療を求めて受診したGID患者82名と日本人一般成人160名との包括システムによるロールシャッハテストの主要変数を比較した。

GIDを有する者の心理的特性として次のことが挙げられる。第1に、物事を詳細にみたり関連づけたりすることが少ない傾向があり、現実検討の低下がみられた。慣習的ではない独自の思考や価値観を持っているが、精神病水準の思考障害は示唆されなかった。第2に、他者への関心や関与が乏しく、複雑な感情をかき立てられるような状況を避ける傾向がみられた。また、対人関係の希薄さの背景に、否定的な自己像を持ちやすい側面がうかがえた。第3に、不快な状況に屈することなく、問題解決に尽力する積極性がうかがえた。

平成 20 年度予算

収入の部	
科 目	予 算 額
前年度繰越金	8,263,311 円
会 費	1,500,000 "
投 稿 料	120,000 "
広 告 料	0 "
預 金 利 息	769 "
大学補助金	950,000 "
寄 付 金	0 "
雑 収 入	0 "
収 入 合 計	10,834,080 円

支出の部	
科 目	予 算 額
印刷製本費	9,134,080 円
通信運搬費	400,000 "
消耗品費	300,000 "
会 合 費	500,000 "
雑 費	500,000 "
支 出 合 計	10,834,080 円
収支差引残	0 円

平成 19 年度決算

収入の部		
科 目	予 算	決 算
前年度繰越金	7,301,477 円	7,301,477 円
会 費	1,500,000 "	1,479,000 "
投 稿 料	120,000 "	12,600 "
広 告 料	396,000 "	0 "
預 金 利 息	769 "	11,242 "
大学補助金	950,000 "	950,000 "
寄 付 金	500,000 "	0 "
雑 収 入	0 "	157 "
収 入 合 計	10,768,246 円	9,754,476 円

支出の部		
科 目	予 算	決 算
印刷製本費	9,068,246 円	980,805 円
通信運搬費	400,000 "	6,640 "
消耗品費	300,000 "	2,620 "
会 合 費	500,000 "	0 "
雑 費	500,000 "	501,100 "
小 計	10,768,246 "	1,491,165 "
次年度繰越金		8,263,311 "
支 出 合 計	10,768,246 円	9,754,476 円
収支差引残	0 円	0 円

投 稿 規 定

1. 投稿者は原則として会員に限る。ただし原稿の採否および会員以外の投稿については編集委員に委任する。
2. 原稿の内容は総説・原著・臨床・症例・経験・速報・業績抄録・寄稿・その他とし特に紙数を制限しない。
3. 原稿は他の雑誌などに未掲載のものに限る。
4. 投稿論文の採否・掲載順位・印刷方法・体裁は編集委員会において決定する。
5. 原著・臨床・症例・経験については必ず欧文抄録を添付する。その他の原稿についても編集委員が必要と認めた場合は欧文抄録の提出を依頼することがある。
6. 原稿の執筆はつぎの要領に従う。
 - a. 原稿は青または黒で楷書、横書きとし、常用漢字、新かなづかいを用いる。欧語はすべて活字体とし、日本語で書く場合にはかたかなを用いる。
 - b. ワードプロセッサを使用する場合は、B5 または A4 の大きさの用紙に字間および行間をあけて 20 字 × 20 行で記すこと。
 - c. 論文の記載順序は①表題②著者名③所属④内容要旨 (600 字以内) ⑤ Key Words (5 語以内) ⑥ 本文 (原著の場合は原則として緒言・材料と方法・成績・考察・結論の順) ⑦文献⑧図表およびその説明⑨英文抄録とする。
 - d. 学術用語、諸単位は各学会所定のものに従い、数字は算用数字、数量の単位は下記による。
m, cm, mm, l, ml, kg, g, °C, % など。
 - e. 表・図・写真などは鮮明なものでなければならない。その種類別の一連番号を記入する。
表・図・写真は別紙に記入もしくは貼付し、説明をつけて本文原稿の最後にまとめる。アート紙希望のものはその旨記入する。本文の欄外にそれらの挿入箇所を指定する。
 - f. 引用文献は最後に一括し、下の順序に従って書く。
雑誌については、
著者名 (共著者の場合は全名を記載する) :

表題、雑誌名 (正規の略名) 巻数 : 初頁—終頁、西暦年次、とする。

例 藤田達士 : 細胞外液をめぐる諸問題。麻酔, 17 : 1108-1119, 1968.

例 Magoun, H. W.: The ascending reticular activating system. Res Ass Nerv ment Dis, 30: 480-492, 1951.

単行本については、

著者名 : 表題、書名 (編者名)、版数、巻数、発行社名、発行地名、初頁—終頁、西暦年次、とする。

例 木村 淳 : 神経刺激法と誘発電位。誘発電位と筋電図—理論と応用、医学書院、東京、pp 115-219, 1990.

例 Marty, A. and Neher, E.: Tight-seal whole—cell recording. Single—Channel Recording (Sakmann, B. and Neher, E. eds.), Plenum Press, New York, pp 107-122, 1983.

g. 英文抄録の記載順序は、表題、氏名、所属、内容要旨 (500 語以内) とする。英文は専門的知識のある人の校正を経たものでなければならない。

7. 原稿の提出は編集委員宛とし、受付順に掲載するのを原則とする。

8. 原稿は原著3部、その他の論文は2部を提出する。

9. 著者による校正は原則として2回とする。校正に際して組版面積に影響を与える改変や極端な組替えは許されない。

10. 原稿の届け先は下記とする。

〒 570-8506 大阪府守口市文園町 10 番 15 号

関西医科大学内

関西医科大学医学会編集委員会宛

電話 (06) 6992-1001 (大代表)

掲載料について

原著及び症例報告等の投稿については、投稿料が必要であるが、その他のものについては原則として無料とする。

1. 和文普通組、欧文、文献組、組表、トレース、凸版、写真版 (カラーを含む) 等はすべて時価 (実費負担) とする。

2. 別刷は 30 部まで贈呈、それ以上は実費負担。

3. 学内会員については、各頁につき、和文 500 円、欧文 800 円の割引を行う。

編 集 委 員 (ABC 順)

足立 靖, 藤澤 順一, 稲葉 宗夫, 稲垣 隆介,
木下 利彦, 中井 吉英, 緒方奈保子, 岡崎 和一,
高屋 淳二, 螺良 愛郎, 山田 久夫, 山内 康雄
会費 年間 3,000 円

関 西 医 科 大 学 雑 誌

第 60 卷 第 2, 3, 4 合併号

平成 20 年 12 月 18 日印刷

平成 20 年 12 月 30 日発行

編 集 発 行 所

〒570-8506 大阪府守口市文園町 10 番 15 号

関西医科大学医学会

TEL 06-6992-1001 内 2216

FAX 06-6992-1409

igakkai@takii.kmu.ac.jp

<http://www3.kmu.ac.jp/igakukai/>

印刷：中西印刷株式会社

〒602-8048 京都市上京区下立売通小川東入

TEL 075-441-3155 (代)

FAX 075-417-2050

<http://www.nacos.com/nakanishi>

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 の 結 果 の 要 旨

平成19年度

平成20年12月30日

関 西 医 科 大 学

は し が き

本集は学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 7 条による公表を目的として平成 20 年 3 月 31 日までに本学で学位を授与した者の論文内容の要旨および審査の結果の要旨を収録したものである。

————— 目 次 —————

◎ 医 学 博 士

掲載順	学位記番号	氏 名	論 文 題 目	頁
1442	甲第 788 号	上 田 祐 輔	Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice.....	1
1443	甲第 789 号	松 井 康 輔	Effect of Active Hexose Correlated Compound on the Production of Nitric Oxide in Hepatocytes	2
1444	甲第 790 号	尾 崎 岳	Effect of thiol-containing molecule cysteamine on the induction of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes	3
1445	甲第 791 号	秋 田 雄 三	Exercise-induced Activation of Cardiac Sympathetic Nerve Triggers Cardioprotection via Redox-sensitive Activation of eNOS and Up-regulation of iNOS.....	4
1446	甲第 792 号	今 田 崇 裕	Targeted Delivery of Bone Marrow Mononuclear Cells by Ultrasound Destruction of Microbubbles Induces Both Angiogenesis and Arteriogenesis Response	5
1447	甲第 793 号	堤 俊 之	Vesicular acetylcholine transporter-immunoreactive axon terminals enriched in the pontine nuclei of the mouse	7
1448	甲第 794 号	福 井 淳 一	Prevention of Graft-Versus-Host Disease by Intra-Bone Marrow Injection of Donor T cells	8
1449	甲第 795 号	金 子 志 帆	Characterization of the molecular mechanism of ornithine cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells: induction of cationic amino acid transporter-1 by spermine.....	9
1450	甲第 796 号	関 本 剛	Reversible Smad-Dependent Signaling between Tumor Suppression and Oncogenesis.....	11
1451	甲第 797 号	三 木 克 朗	Role of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors on <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced retinal degeneration and cataractogenesis in rats.....	12
1452	甲第 798 号	柳 田 英 佐	Administration of rhHGF-Activator Via Portal Vein Stimulates the Regeneration of Cirrhotic Liver After Partial Hepatectomy in Rats.....	14
1453	甲第 799 号	向 出 裕 美	Immunotherapy for malignant tumors using combination of allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation, donor lymphocyte infusion and dendritic cells	15

1454	甲第 800 号	横井川 規 巨	Enhanced Production of Interleukin 6 in Peripheral Blood Monocytes Stimulated with Mucins Secreted into the Bloodstream.....	16
1455	甲第 801 号	山 田 正 法	Characterization of alternatively spliced isoforms of the type I interleukin-1 receptor on iNOS induction in rat hepatocytes.....	17
1456	甲第 802 号	津 田 雅 庸	Activation of granulocytes by direct interaction with dendritic cells	18
1457	甲第 803 号	五 十 野 剛	Nicorandil suppressed myocardial injury after percutaneous coronary intervention	19
1458	甲第 804 号	伊 藤 健 一	Relationship between ultrasonography of knee cartilage and physical characterization.....	21
1459	甲第 805 号	大 前 麻 理 子	Long-term maintenance of donor-derived hemopoiesis by intra-bone marrow-bone marrow transplantation	22
1460	甲第 806 号	安 藤 性 實	Protease-activated receptor4-mediated Ca^{2+} signaling in mouse lung alveolar epithelial cells	23
1461	甲第 807 号	池 浦 司	Effects of sensory denervation by neonatal capsaicin administration on experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride	24
1462	甲第 808 号	肱 川 健	Insulin-like growth factor-I prevents liver injury through the inhibition of TNF- α and iNOS induction in D-galactosamine and lipopolysaccharide-treated rats	25
1463	甲第 809 号	田 中 宏 典	Na^+/H^+ exchanger inhibitor, FR183998, has protective effect in lethal acute liver failure and prevents iNOS induction in rats.....	26
1464	甲第 810 号	島 野 直 人	Effects of Prepubertal Indole-3-carbinol Treatment on Development of <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced Mammary Carcinomas in Female Sprague-Dawley Rats	28
1465	甲第 811 号	宮 宗 武 史	EDARVONE PREVENTS FAS-INDUCED FULMINANT HEPATIC FAILURE IN MICE BY REGULATING MITOCHONDRIAL BCL-XL AND BAX.....	29
1466	甲第 812 号	高 木 邦 夫	Interleukin-1 is not essential for expression of inducible NOS in hepatocytes induced by lipopolysaccharide <i>in vivo</i>	30
1467	甲第 813 号	羽 原 弘 造	Pitavastatin up-regulates the induction of iNOS through enhanced stabilization of its mRNA in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes	32
1468	甲第 814 号	串 田 温 子	Enhancement of Antitumor Immunity after Propofol Treatment in Mice.....	33

1469	甲第 815 号	龍	堯	志	Transplantation of newborn thymus plus hematopoietic stem cells can rescue supralethally irradiated mice.....	35
1470	甲第 816 号	寺	川	直	良	Clinical Monitoring of Innate Cellular Immunity of Monocytes/Macrophages by Tumor Necrosis Factor Alpha Productivity in Whole Blood Stimulated by Lipopolysaccharide in Patients with Pancreatic Cancer 36
1471	甲第 817 号	石	崎	守	彦	Protective effect of FR183998, a Na ⁺ /H ⁺ exchanger inhibitor, and its inhibition of iNOS induction in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats 37
1472	甲第 818 号	齊	藤	幸	子	The corpus callosum in obsessive-compulsive disorder: a diffusion tensor imaging study..... 38
1473	甲第 819 号	岡	崎		智	Successful Acceptance of Adult Liver Allografts by Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation 40
1474	甲第 820 号	池	田	耕	造	Clinicopathologic study of small hepatocellular carcinoma with microscopic satellite nodules to determine the extent of tumor ablation by local therapy 41
1475	甲第 821 号	安	藤	祐	吾	Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery from 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)-Induced Colitis in Rats 42
1476	甲第 822 号	坂	口	雄	沢	The Wistar Bonn Kobori rat, a unique animal model for autoimmune pancreatitis with extrapancreatic exocrinopathy 44
1477	甲第 823 号	吉	田	秀	行	Edaravone prevents iNOS expression by inhibiting its promoter transactivation and mRNA stability in cytokine-stimulated hepatocytes 45
1478	甲第 824 号	斎	藤	隆	道	Protective Effect of Fibronectin for Endotoxin-Induced Liver Injury after Partial Hepatectomy in Rats 46
1479	甲第 825 号	三	宅		岳	Prevention of graft- <i>versus</i> -host disease by intrabone marrow injection of donor T cells: Involvement of bone marrow stromal cells 47
1480	甲第 826 号	樋	口	暁	子	Hypericin inhibits pathological retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy 49
1481	甲第 827 号	杉	本	達	哉	Diffusion-weighted imaging for predicting new compression fractures following percutaneous vertebroplasty 50
1482	甲第 828 号	岡	田	隆	之	Role of F-actin organization in p38 MAP kinase-mediated apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes subjected to simulated ischemia and reoxygenation 51

1483	甲第 829 号	金 (德	原	炳 克	克 治)	Rebamipide, anti-gastric ulcer drug, up-regulates the induction of iNOS in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes	53
1484	乙第 656 号	松	下	光	伸	Appendix is a priming site in the development of ulcerative colitis	54
1485	乙第 657 号	山	縣	英	生	Acceleration of Smad2 and Smad3 Phosphorylation via c-Jun NH ₂ -Terminal Kinase during Human Colorectal Carcinogenesis	55
1486	乙第 658 号	稻	見	則	仁	Early prediction of restenosis after percutaneous coronary intervention in patients with stable angina pectoris	56
1487	乙第 659 号	吉	田	常	孝	Effectiveness of treatment with donepezil hydrochloride and changes in regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease	57
1488	乙第 660 号	今	泉	正	仁	Optic nerve compression by normal carotid artery in patients with normal tension glaucoma	59
1489	乙第 661 号	新	井	昇	治	Induction of inducible nitric oxide synthase and apoptosis by LPS and TNF- α in nasal microvascular endothelial cells.....	60
1490	乙第 662 号	佐	藤	正	人	Thoracoscopic surgery under artificial pneumothorax in children: its experimental investigation and clinical application to diaphragmatic procedures.....	61
1491	乙第 663 号	道	浦		拓	Assessment of the Preserved Function of the Remnant Stomach in Pylorus-preserving Gastrectomy by Gastric Emptying Scintigraphy	63

【1442】

氏 名 (本 籍) ^{うえ} 上 ^だ 田 ^{ゆう} 祐 ^{すけ} 輔 (石川県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 788 号

学位授与の日付 平成 19 年 5 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭

(教授) 池原 進 (教授) 飯田寛和

論文内容の要旨

【はじめに】

骨髄内骨髄移植法 (intra-bone marrow-bone marrow transplantation: IBM-BMT) は従来の経静脈的な骨髄移植法 (IV-BMT) に比べて造血幹細胞に加え間葉系幹細胞も効率的にドナー由来細胞に置換させる事ができる効果的な移植法である。これまでの研究で我々は正常 C57BL/6 (B6) マウスから老年性骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP6 に対し IBM-BMT を施行することでその発症の予防及び治療が可能であることを報告し、骨粗鬆症が造血幹細胞および間葉系幹細胞の異常に起因する可能性を指摘してきた。このことを確認するため、今回我々は SAMP6 マウスより正常 B6 マウスに IBM-BMT を施行し骨粗鬆症の発症誘導を検討した。

【研究方法】

- ① SAMP6 から B6 マウスへの骨髄移植により骨粗鬆症が発症し得るか、また IV-BMT を施行した移植宿主と IBM-BMT を施行した移植宿主の骨密度の相違を評価するため、各骨髄移植モデルを作製し、腰椎の組織標本・大腿骨の骨密度を比較検討した。
- ② Flowcytometry 法により脾細胞表面の各成熟分化マーカー・H-2 抗原の発現を解析した。また mixed leukocyte reaction (MLR) によりドナー特異的な免疫寛容の誘導・維持について検討した。
- ③ 骨髄移植宿主の骨芽細胞の由来を in vitro 蛍光

抗体法により検討した。更に骨髄間質細胞・骨芽細胞における IL-11 をはじめとする骨代謝に関与するサイトカイン・接着分子などの遺伝子の mRNA 発現強度を RT-PCR, リアルタイム RT-PCR により検討した。

- ④ 骨髄移植宿主の骨組織における骨吸収能は尿中 deoxypyridinoline (Dpd) 量により評価した。また造血細胞の骨吸収への関与は、脾細胞中の CD4 陽性 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) 陽性細胞の分画を解析することにより検討した。

【結果】

- ① SAMP6 から B6 マウスへの骨髄内骨髄移植を施行した移植宿主では対照群 (同週齢 B6 マウス、もしくは B6 から B6 マウスへ IBM-BMT を施行した群) に比べ、腰椎の組織標本において著明な骨皮質の菲薄化・骨梁の減少を認め、大腿骨々密度の有意な低下を認めた。
- ② 骨髄移植宿主では H-2 抗原の同定により造血細胞がドナー由来細胞により再構築され、またその分化過程も正常であることが確認された。MLR では移植宿主のドナー・宿主・自己に対する免疫寛容が確認された一方、第三者である C3H マウスに対しては通常の免疫応答を示した。
- ③ 骨髄移植宿主の骨髄間質細胞を培養し骨芽細胞へ分化誘導し、オステオカルシンとドナー特異的 H-2 抗原に対する蛍光抗体法により二重染色を施行したところ両者により蛍光が確認された。また IL-11 遺伝子の mRNA 発現の低下が確認された。
- ④ 骨髄移植宿主では尿中 Dpd 量の上昇が認められた。骨組織標本での評価により酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性活性化破骨細胞の増加が確認された。骨髄間質細胞では RANKL 遺伝子の mRNA 発現の亢進が確認され、また脾細胞においても CD4 陽性 RANKL 陽性細胞の分画の増強が確認された。

【考察】

以上より IBM-BMT は、IV-BMT と比較して造血幹細胞に加え間葉系幹細胞をも効率的にドナー由来細胞に置換させ、ドナー由来骨髄間質細胞や骨芽細胞への分化およびこれにより再構築された骨髄微小環境が骨代謝に影響を及ぼし、骨粗鬆症

を惹起したと考えられた。この結果は骨粗鬆症治療にとどまらず、さまざまな骨系統疾患治療に対しても IBM-BMT が応用され得る可能性を示唆するものである。

審査の結果の要旨

著者は造血幹細胞に加え間葉系幹細胞も効率的にドナー由来細胞に置換させる事ができる効果的な移植法である骨髓内骨髓移植法を用いて、老年性骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP6 マウスより正常 B6 マウスに骨髓内骨髓移植を施行し骨粗鬆症の発症誘導を行い成功した。この成果は学位に十分値すると思われた。

【1443】

氏名(本籍) まつ い こう すけ 松 井 康 輔 (大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第789号

学位授与の日付 平成19年5月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Effect of Active Hexose Correlated Compound
on the Production of Nitric Oxide in
Hepatocytes

論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)伊藤誠二 (教授)上山泰男

論文内容の要旨

【研究目的】

Active hexose correlated compounds (AHCC, 活性糖類関連化合物)は、担子菌より抽出された炭水化物を豊富に含む様々な物質の複合体である。糖質の主成分は部分的にアセチル化された分子量5,000程度の α -1,4グルカンであり約70%を占める。AHCCは補完代替医療分野での利用度が急速に高まっており、糖尿病、肝臓病などの成人病の改善、担癌患者の癌細胞増殖抑制や転移抑制などの幅広い効果が報告されている。特に、我々は臨床研究において、肝細胞癌術後患者の生存期間延長に効果があることを明らかにした。さらに、動物実験においても、AHCCは四塩化炭素(CCl_4)

による急性肝炎モデルマウスに対して肝保護作用を示すことが報告されている。しかし、肝保護効果におけるAHCCの分子レベルでの作用機序については未解明な部分が多い。一方、病態時の肝臓において、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の働きにより産生される一酸化窒素(NO)は、様々な肝障害の原因因子の一つと考えられている。特に、多量に産生されたNOは肝細胞のエネルギー代謝異常等を引き起こし、その機能を悪化させる。本研究では、AHCCの肝保護作用のメカニズムの一つとして、iNOSのNO産生誘導に対する制御の可能性を追求した。

【研究方法】

初代培養肝細胞は雄性ラット(Wistar 200g)からコラゲナーゼ灌流法により調製した。細胞をAHCC存在・非存在下にIL-1 β (1nM)で刺激し、NO産生に関与するシグナルを分析した。NO代謝物(NO_2^-)、iNOS protein及びiNOS mRNAの誘導、さらに転写因子NF- κ BやiNOS promoterの活性化について検討した。

【結果】

肝細胞におけるNO産生誘導の経路は以下の通りである。i) IL-1 β は、I型IL-1レセプター(IL-1RI)を介してIkBキナーゼ(IKK)を活性化する、ii) NF- κ Bの阻害蛋白質IkBはIKKによりリン酸化され、プロテオソームにて分解を受ける、iii) IkBの分解に伴いNF- κ Bが核内へ移行し、iNOS遺伝子の発現を誘導する、iv) 誘導されたiNOSは細胞内にあるL-アルギニンよりNOを産生する。AHCC (1-8 mg/ml)はIL-1 β 刺激によるNO産生に対して、濃度依存性に最大約80%の阻害を示した。また、AHCCはiNOS蛋白質およびmRNAの各レベルを抑制した。しかし、NF- κ Bの活性化(核移行とDNA結合)に対しては効果を示さなかった。一方、transfection実験において、AHCCはNF- κ B結合領域(κ B site)を含むiNOS promoter constructに対して効果を示さなかったが、mRNAの安定化に関与する3'側非翻訳領域(3'-UTR; AREモチーフ)を含むconstructに対しては顕著な阻害効果を示した。

【考察】

肝細胞において、AHCCはiNOS/NO産生の誘導を転写段階で阻害することが明らかになった。AHCCはiNOS mRNAの合成阻害よりも、その安

定化を阻害することにより, iNOS mRNA レベルを低下させたと考えられる. 最近, 我々は iNOS mRNA の安定化に関与する iNOS の antisense transcript (AS-T) を同定した. AHCC はこの AS-T の合成を抑制し, iNOS mRNA の分解を促進することが明らかとなった. NO の過剰産生は肝臓の障害に関与していると報告されており, 本研究で明らかとなった AHCC の NO 産生を低下させる新しいメカニズムは肝保護試薬の開発に貢献すると考える.

審査の結果の要旨

機能性食品 Active hexose correlated compounds (AHCC) は臨床的にも基礎研究でも肝保護作用を有することが報告されている. 本研究は肝障害増悪因子の側面を持つ高濃度の一酸化窒素 (NO) 産生を AHCC が抑制すること, その産生抑制は iNOS mRNA の合成阻害によるものではなく, AHCC が iNOS mRNA の安定化に関与する antisense transcript の合成を抑制した結果, iNOS mRNA の分解が促進されている結果であることを明らかにした. 機能性食品 AHCC の肝臓に対する新しい機能とそのメカニズムを解明している.

博士号に値すると認められた.

【1444】

氏 名 (本 籍) お ざき たかし 尾 崎 岳 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 790 号

学位授与の日付 平成 19 年 5 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Effect of thiol-containing molecule cysteamine
on the induction of inducible nitric oxide
synthase in hepatocytes

論文審査委員 主査 (教授) 岡崎和一
(教授) 伊藤誠二 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【目的】

ガス状の一酸化窒素 (NO) は中枢神経系, 血管

系, 免疫系などにおいて生理活性を示す物質である. しかし, 病態時に過剰に産生される NO は様々な臓器障害に関与することが報告されている. NO は一酸化窒素合成酵素 (NOS) により L-アルギニンより合成され, 3 種類のアイソフォームが存在する. 正常時に発現している脳型 (nNOS) と血管型 (eNOS), さらに炎症時に誘導される誘導型 (iNOS) である. 病態時に産生される NO は, 主に iNOS 由来と考えられる. この iNOS 遺伝子の発現誘導には転写因子 NF- κ B の活性化が重要である.

肝臓では炎症, エンドトキシン血症, 虚血再灌流等の傷害時に, 主にクッパー細胞で産生された炎症性サイトカイン (TNF- α や IL-1 β) により, iNOS の誘導と過剰の NO 産生が引き起こされる. 我々はこれまでに, この NO による肝障害のメカニズムの一つとして肝切除, エンドトキシン, 閉塞性黄疸による肝臓のエネルギー代謝異常を報告している. Cysteamine (HS-CH₂-CH₂-NH₂) は生体内での基本的代謝経路の重要な制御物質であり, 抗酸化・抗炎症物質として知られている. また cysteamine は臓器に cystine 結晶が蓄積する cystinosis の治療にも用いられている. 更に, 虚血再灌流, エンドトキシン, 出血性ショック等による障害肝に対しても保護作用が報告されている. 肝障害時にエンドトキシンや炎症性サイトカインによって誘導される iNOS は上述した如く NO を過剰に産生し, 肝の機能低下に関与する重要な因子の一つである. 本研究では cysteamine の保護作用の指標として, 肝細胞での iNOS 誘導に対する効果を検証した.

【方法】

Wistar 系雄性ラット (200-250 g) からコラゲナーゼ灌流法により調製した初代培養肝細胞を 37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養した. 細胞を cysteamine の存在・非存在下でインターロイキン 1 β (IL-1 β ; 1 nM) で刺激した. IL-1 β 刺激後の NO 産生, iNOS 誘導, iNOS プロモーター活性や I κ B および NF- κ B 等のシグナル分子を解析した.

【結果】

IL-1 β は I κ B/NF- κ B 経路を刺激し, NF- κ B の活性化 (核内移行と DNA 結合) を引き起こし, iNOS および NO 産生を誘導した. Cysteamine は IL-1 β 刺激後の NO 産生を濃度依存性に阻害し, 4 mM

で最大効果(90%阻害)を示した。Cysteamine は iNOS の蛋白質および mRNA の増加を抑制した。Luciferase reporter constructを用いたトランスフェクション実験より, cysteamine は iNOS プロモーター活性を阻害することが明らかとなった。EMSA 実験より, cysteamine は NF- κ B の活性化を抑制した。また, cysteamine は p65 (NF- κ B のサブユニット) mRNA の発現を抑制する一方, NF- κ B の抑制因子である I κ B α の mRNA 発現を増強した。

【考察】

Cysteamine と同じくチオール基を有する phenylarsine oxide は, そのチオール基を介して, 肝細胞において NF- κ B の DNA 結合を阻害し, iNOS 誘導を抑制する。Cysteamine は NF- κ B の活性化を抑制し, p65 mRNA 発現を抑制する一方で, I κ B α mRNA 発現を促進させた。しかし, I κ B α 蛋白質レベルには変化を認めなかった。従って, cysteamine は phenylarsine oxide と同様に, NF- κ B 活性を抑制することにより iNOS プロモーター活性を阻害し, その結果 iNOS 誘導を抑制し NO 産生の阻害をもたらすと考えられる。NF- κ B 制御における cysteamine の分子メカニズムを明らかにすることにより, 新しい iNOS 誘導抑制剤の開発が期待される。

審査の結果の要旨

病態肝で産生される NO (一酸化窒素) は肝機能の増悪因子となる。本研究は肝保護作用をする Cysteamine の病態肝での NO 産生抑制のメカニズムを検討している。Cysteamine には炎症性サイトカイン存在下の iNOS 蛋白の合成を mRNA の発現の抑制, iNOS プロモーター活性の阻害, NF- κ B の活性化の抑制等の作用があることを明らかにした。これらの抑制の分子メカニズムの解明は新しい NO 産生抑制剤の開発につながる重要な基礎的データとなる。博士号に値すると認められた。

【1445】

氏名(本籍) ^{あき}秋 ^た田 ^{ゆう}雄 ^{ぞう}三 (大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第791号

学位授与の日付 平成19年5月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Exercise-induced Activation of Cardiac

Sympathetic Nerve Triggers Cardioprotection

via Redox-sensitive Activation of eNOS

and Up-regulation of iNOS

論文審査委員 主査(教授) 松田博子

(教授) 今村洋二 (教授) 岩坂壽二

論文内容の要旨

【はじめに】

虚血性心疾患は先進国における主要な死因である。虚血性心疾患の生命予後, 機能的予後は心筋梗塞領域の広がりや密接に関係している。そこで, 急性心筋梗塞では梗塞領域を縮小させる治療戦略が望まれている。

【研究目的】

本研究と仮説の目的は発症前に行っていた継続的有酸素運動が心筋梗塞縮小効果をもたらすか否か及びその機序を検討することである。我々は継続的有酸素運動の心筋保護効果は, 心臓交感神経の賦活化に伴う酸化ストレスの発生と, それによる内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の活性化を介した誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)のアップレギュレーションによりもたらされると考えた。

【研究方法】

マウスに最大酸素摂取率60–70%のトレッドミル運動負荷を1日1時間, 7日間連続行なった。その24時間後に左冠動脈を30分間閉塞後, 2時間の再灌流を行なった。継続的有酸素運動の心筋保護効果における1)心臓交感神経の役割を検討するためにトレッドミル運動負荷の7日前に左冠動脈領域の左室前壁にフェノールを塗布し心臓交感神経の除神経を行なった。2)酸化ストレスの役割を検討するために抗酸化剤であるN-(2-mercapto-propionyl)-glycine (MPG)をトレッドミル施行30分前に投与した。3) eNOSの役割を検討するため

に eNOS ノックアウトマウスを用いた。4) iNOS の役割を検討するために iNOS ノックアウトマウスを用いるか、iNOS の選択的阻害剤である 1400W を冠動脈閉塞 30 分前に投与した。酸化ストレスの指標として還元型グルタチオン (GSH) /酸化型グルタチオン (GSSG) 比およびニトロチロシン化タンパク (NT) を測定した。eNOS の活性化と iNOS の発現はリン酸化 eNOS と iNOS をそれぞれウェスタンブロット法で定量することにより評価し、iNOS 活性は L-シトルリンアッセイ法を用いて測定した。

【結果】

トレッドミル運動負荷は、一過性に心筋 GSH/GSSG レベルの減少、NT の増加および eNOS の活性化をもたらした。これは、7 日後に iNOS をアップレギュレーションさせ、心筋梗塞巣を有意に縮小させた。フェノールを塗布し心筋ノルエピネフリンを枯渇させたマウスでは運動負荷による GSH/GSSG の減少、NT の増加、eNOS の活性化はみられず、iNOS のアップレギュレーションと心筋梗塞巣縮小効果も失われていた。運動負荷直前の MPG 投与によっても同様の結果が得られた。eNOS ノックアウトマウスでは、運動負荷による GSH/GSSG の減少は認められたが、iNOS のアップレギュレーションと梗塞巣の縮小効果は認められなかった。iNOS ノックアウトマウスでは運動負荷による GSH/GSSG の減少、NT の増加は認められたが、iNOS のアップレギュレーションと梗塞巣の縮小効果は認められなかった。1400W 投与群では、iNOS 活性の抑制に伴い梗塞巣の縮小効果は抑制された。

【考察】

継続的有酸素運動には心筋保護効果のあることが証明された。その機序として以下の生体反応の関与が考えられた。運動負荷は心臓交感神経を刺激する。それに伴う一過性の酸化ストレスは eNOS を活性化し、恐らくレドックス感受性転写因子の活性化を介して iNOS をアップレギュレーションさせる。iNOS によって産生された一酸化窒素は虚血再灌流障害に対するメディエーターとして働き、冠動脈の閉塞に伴う致死的心筋障害を軽減して心筋梗塞巣を縮小させる。以上のことから、発症前の継続的有酸素運動は心臓交感神経の刺激と酸化ストレスを介していわゆる遅発性プレ

コンディショニング効果を惹起し、心筋保護的に働くことが示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は新規な内容を含んでおり、医学に資するところ大と考え、学位に値すると判断された。

【1446】

氏名(本籍) ^{いま} ^だ ^{たか} ^{のぶ} 田 崇 裕 (山口県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 792 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Targeted Delivery of Bone Marrow
Mononuclear Cells by Ultrasound Destruction
of Microbubbles Induces Both Angiogenesis
and Arteriogenesis Response

論文審査委員 主査(教授)池原 進
(教授) 藺田精昭 (教授) 岩坂壽二

論文内容の要旨

【はじめに】

我々は世界で初めて、人の虚血下肢に対して骨髄単核球細胞 (BM-MNC) ・末梢血単核球細胞移植による血管新生療法の臨床応用に成功した。しかし、細胞を用いた血管新生療法における血管前駆細胞の遊走・接着のメカニズムは現在まで十分に解明されていない。また、臨床における骨髄単核球細胞移植による血管新生療法に関しても虚血下肢が主流でありその応用範囲は限られている。これには現在行われている細胞移植が筋肉内注射 (i.m.) によって行われるなど、侵襲や痛みを伴うことに問題があると考えている。

超音波 (US) によるコントラストマイクロバブル (Bubble) 破壊衝撃波は局所における微小血管を傷害し arteriogenesis を引き起こす。一方、骨髄単核球細胞の筋肉注射による細胞移植は angiogenesis を引き起こす。そこで US によるマイクロバブル破壊衝撃波と BM-MNC 移植を組み合わせることで arteriogenesis と angiogenesis による血

流改善効果の検討を行った。

【研究方法】

ラット右大腿動静脈を結紮剥離し虚血下肢モデルを作成した。虚血作成4日目に健常側大腿静脈から bubble を静注後、虚血下肢に US (1 MHz, 2 W/cm², Beam Nonuniformity Ratio) を照射した。刺激直後に蛍光染色した BM-MNC (2×10⁷ 個) を経静脈的 (i.v.) に移植した後、血流改善効果をレーザードップラー (下肢虚血作成当日と移植 0, 1, 2, 3, 4 週目)、血管／筋繊維比・下肢血管造影 (移植 4 週目) を用いて比較検討した。また Bubble+US 刺激による局所の変化を電子顕微鏡において確認した。

次にヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、Bubble+US 刺激後に発現する接着因子を蛍光染色で確認するとともに flow assay を行い、その発現効果を検討した。

【結果】

レーザードップラーでは Bubble+US+BM-MNC infusion により未治療群に比し 34%, Bubble+US 群からは 25%増の著明な血流改善効果がみられた (P<0.05)。筋繊維あたりの第 VIII 因子陽性の微小血管比 (capillary/muscle fiber ratio) では、Bubble+US 群が未治療群に比し (172%増) であったのに対し Bubble+US+BM-MNC-i.v. 群では (260%増, P<0.01) (angiogenesis) に改善していた。Smooth muscle α -actin- 陽性の血管／筋繊維比 (arteriole/muscle fiber ratio) の増加も同様にみられ血管造影においても側副血行の増加が確認された (arteriogenesis)。電子顕微鏡において Bubble+US 刺激により局所の血管内皮に血小板の接着・フィブリンネットの形成と同時に単核球細胞の接着も確認することができた。このことから血小板の活性化が移植 BM-MNC と血管内皮の接着に重要な役割をもつと考えた。培養細胞において、Bubble+US 刺激を行うことにより活性化された血小板由来 pro-inflammatory factor が接着因子 (P-selectin・ICAM-1) を局所に発現し、flow assay により BM-MNC が内皮細胞に有意に接着することが確認された。

【考察】

我々が初めて臨床応用した筋肉注射による自己骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生療法は、関西医科大学のみの症例でも 2000 年 7 月～2006 年

4 月までに 68 例行われている。結果 62%の症例に Ankle-brachial blood pressure index (ABI) において 0.1 以上の血流改善効果が得られた。しかしながら移植の際に局所に痛みを伴うなどの問題は今も残っており、非侵襲的な目的領域への細胞移植法の確立は血管新生療法において大きなメリットがあると考えている。近年、標的臓器への遺伝子・薬物の輸送方法の一手段として US 刺激によるマイクロバブル衝撃波が注目されている。US 刺激でマイクロバブルを破壊するとバブルが壊れた際に生じる Jet が局所の微小血管を障害し arteriogenesis を生じさせることは報告されていた。しかしながらこれまで、細胞の輸送方法としてマイクロバブル衝撃波が有用であるかどうか検討はされていない。本研究では、ラット虚血下肢モデルにおいて Bubble+US 刺激後に経静脈的に BM-MNC 移植しても BM-MNC-i.m. 群と同等の血流改善効果があることをレーザードップラー・muscle fiber-ratio・血管造影の結果から明らかにした。そのメカニズムとして Bubble+US 刺激直後の電子顕微鏡像で障害をうけた血管内皮にフィブリンネットの形成と血小板の接着像が見られたことから、マイクロバブルが血管内で壊れた際に生じる Jet が局所の血管内皮と血管内を流れる血小板を活性化させ局所に接着因子を発現させると考えた。このことは、HUVEC を用いた実験系において、血小板を含んだ培養液に Bubble+US 刺激を加えた時のみ有意に接着因子が発現し、かつ flow assay でも BM-MNC が接着することからも証明することができた。以上の結果から、従来行われている骨髄単核球細胞の筋肉注射による移植と比較しても、より低侵襲かつ効果的な血管新生療法が行える可能性が示唆された。また血管内皮と BM-MNC の接着には Bubble+US 刺激により活性化された血小板由来の pro-inflammatory factor が重要な役割を果たしていることも判明した。

審査の結果の要旨

虚血下肢に対して、筋肉内注射 (i.m.) による自己骨髄単核球細胞 (BM-MNC) 移植は 62%の症例で血流改善効果が得られているが、移植局所の痛みを伴うことが欠点である。そこで、マイクロバブル (MB) と超音波 (US) の組み合わせによる arteriogenesis を促進する血管新生療法の効果を

ラットを用いて解析した。その結果, i.m. による移植と比較して, MB+US の組合せにより, より効果的な血管新生療法が行えることが判明した。博士号に値すると認められた。

【1447】

氏 名 (本 籍) 堤 俊 之 (京都府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 793 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Vesicular acetylcholine transporter-immunoreactive axon terminals enriched in the pontine nuclei of the mouse

論文審査委員 主査 (教授) 中村加枝

(教授) 杉本哲夫 (教授) 山下敏夫

論文内容の要旨

【はじめに】

中枢内のコリン神経については, 認知症において大脳のレベルでのアセチルコリンの減少, コリン線維数の低下, コリン受容体の下方移動などが知られている。耳鼻科領域においても, 動揺病などコリン神経と平衡覚との関連性を示唆する病態が知られている。しかしながら脳幹・小脳のコリンシナプスについては, 詳細不明な点が多い。小胞膜アセチルコリントランスポーター (VACHT) はコリン性ニューロン軸索終末のシナプス小胞膜に局在するタンパクで, アセチルコリンをシナプス小胞に取り込む働きをする。VACHT 抗体による免疫組織化学法を用いれば, 従来のコリンアセチルトランスフェラーゼ抗体では検出が困難であったコリン性軸索終末を明確に描出できる。本研究ではマウス橋核の VACHT 陽性軸索終末をマッピングし, 3 次元構築した。さらにこれらの軸索終末について電顕的に解析するとともに起始ニューロンについても WGA-HRP 逆行性標識・VACHT 免疫染色組み合わせ法により検討した。

【研究方法】

雄性 ddY マウス (8~10 週齢) を使用した。全

身麻酔を施行後灌流固定し, 脳幹組織を摘出。ミクロトームにて 40 μ m 幅の凍結切片を作製した。VACHT 抗体による免疫化学染色を行い, HRP 標識 2 次抗体を結合し, DAB 染色にて観察した。橋核を含む小脳前核において VACHT 陽性瘤状線維の分布密度を比較した。3 次元構築には橋核と橋被蓋網様核の連続切片上に観察できた VACHT 陽性瘤状線維を描画した。電顕免疫組織化学には pre-embedding 法を用い, 橋核の VACHT 陽性軸索終末を観察した。WGA-HRP による逆行性標識にはトレーサーを脳定位的に橋核に注入した。3 日後, 灌流固定を行い WGA-HRP 陽性・VACHT 陽性ニューロンを検出した。

【結果】

小脳前核で VACHT 陽性瘤状線維の分布密度を比較した。瘤状線維は橋核に著明に出現したが, 橋被蓋網様核では中等度, その他の核 (小脳中位核, 外側楔状束核, 下オリーブ核, 外側網様核, 前庭神経外側核, 前庭神経内側核, 小細胞性赤核, 内側孤束核) では散見される程度であった。

橋核の VACHT 陽性瘤状線維は内側部, 腹側部, 外側部に高密度に分布しており, 大脳脚周囲部には低密度であった。橋被蓋網様核では内側部, 背内側部に比較的集中して認められた。

電顕観察上, VACHT 陽性軸索終末は橋核ニューロンの樹状突起に対して対称性シナプスを形成していた。多形性シナプス小胞に免疫反応産物が局在した。

WGA-HRP による逆行性標識では, 片側の橋核にトレーサーを注入したのち, 両側の背外側被蓋核と脚橋被蓋核に WGA-HRP 陽性・VACHT 陽性ニューロンを検出した。

【考察】

本研究により小脳前核の中で橋核はとりわけ多くのコリン性入力線維を受けることがわかった。橋核での VACHT 陽性瘤状線維の分布所見から, コリン性入力は橋核内では一様に分布しないことが示唆された。電子顕微鏡所見では, コリン性入力線維が橋核ニューロンに対して対称性シナプスを形成した。したがって, 脚橋被蓋核と背外側被蓋核からのコリン性入力線維は, 主要な抑制性入力として皮質-橋-小脳路に調節的役割を果たす可能性が示唆される。

橋核ではムスカリン性コリン受容体が多く存在

するとの報告があるが、その他の小脳前核においてはその存在はほとんど証明されていない。橋核に豊富に存在するムスカリン性コリン受容体のサブタイプは、主に m2, m3 受容体であり、橋核の他、脚橋被蓋核や背外側被蓋核にも存在するとされる。これらの受容体の知見は、橋核へのコリン性入力に皮質-橋-小脳路に対して抑制的に制御しているとする本研究の結果を支持していると考えられる。

【結語】

マウス小脳前核において VACHT 陽性瘤状線維を検出したところ、主に橋核に認められた。それらの線維は内側部、腹側部、外側部に高密度に分布した。VACHT 陽性軸索終末は橋核ニューロンの樹状突起に対して対称性シナプスを形成した。橋核の VACHT 陽性線維は両側性に背外側被蓋核、脚橋被蓋核から起始した。橋核へのコリン性入力は皮質-橋-小脳路に対して抑制的に制御していると結論した。

審査の結果の要旨

マウス橋核に高密度に分布する小胞性アセチルコリントランスポーター陽性線維は、脳幹コリン性神経核に起始し、両側性投射を特徴とすることが明らかになった。さらに一連の電顕所見の分析結果から、当該コリン性線維が、興奮性連絡路たる皮質-橋-小脳路に対して、抑制性投射を直接与えることが判明した。本研究により小脳入力系の回路概念に以上の新知見が追加された。博士号に値すると認められた。

【1448】

氏名(本籍) ^{ふく い じゅん いち} 福井 淳一 (兵庫県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第794号

学位授与の日付 平成19年9月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Prevention of Graft-Versus-Host Disease by

Intra-Bone Marrow Injection of Donor T cells

論文審査委員 主査(教授) 藺田精昭

(教授) 上山泰男 (教授) 池原 進

論文内容の要旨

【目的】

骨髄移植(BMT[bone marrow transplantation])は、種々の造血系疾患・先天性免疫不全症・遺伝性代謝疾患を治療する上で欠かせない治療法であり、臓器移植や固形癌治療にも応用可能である。しかし、その際に生じる致死的な合併症である移植片対宿主病(GvHD[graft-versus-host disease])は、未だ十分にコントロールされていない。我々はBMTに関する一連の研究過程で、骨髄内骨髄移植法(IBM[intra-bone marrow]-BMT)を開発し、この方法は従来の経静脈的骨髄移植法(IV[intravenous]-BMT)と比べ、ドナー細胞の生着が促進され、ドナー特異的トランスの誘導も容易であることを明らかにしてきた。

本研究では、IBM-BMTとT細胞骨髄内注入法(IBM-DLI[donor lymphocyte infusion])によるT細胞混入モデルを用いて、IBM-BMTのGvHD抑制効果について検討した。

【方法】

C57BL/6マウス(7~9週齢)をレシピエントとし、骨髄移植前日に8.5 Gyの骨髄破壊的放射線照射を行った。ドナーとしてBALB/cマウス(7~9週齢)の全骨髄細胞を 1×10^7 個に調整し、C57BL/6マウスの脛骨骨髄腔内に投与(IBM-BMT)した。同時にドナーの脾臓T細胞(1×10^7 個)をレシピエントの尾静脈(IV-DLI)、又は対側の脛骨骨髄腔内(IBM-DLI)に投与し、両群について生存率・臨床所見・病理組織学的所見・制御性T細胞(Treg)・脾IL-2/IL-4/IL-10産生細胞について解析

した。さらに、移植後 3 日目マウスの DLI 側脛骨から全骨髓細胞を採取し、2 週間培養した後に、培養容器底面への付着細胞として得られる骨髓間質細胞の免疫関連サイトカイン発現を real time RT-PCR 法にて解析した。

【結果】

IV-DLI 群は移植後 78 日目までに全例が GvHD により死亡したが、IBM-DLI 群では 100%の生存が得られ、移植後 14 日目・21 日目における肝臓・脾臓の病理組織学的検討においても、IBM-DLI 群で GvHD が抑制されていることが明らかになった。さらに IV-DLI 群と比べ IBM-DLI 群では、移植後 14 日目・21 日目における Treg の比率・脾 IL-4/IL-10 産生細胞の比率が有意に増加していたが、脾 IL-2 産生細胞の比率は有意に低下していた。また、レシピエントの骨髓間質細胞における HGF と TGF- β の mRNA は、IV-DLI 群と比べ IBM-DLI 群で有意に増加していた。

【考察】

従来の腸骨からの骨髓採取法（100 箇所以上で骨髓穿刺針を刺し、吸引法で採取）では、末梢血の混入が避けられず T 細胞が 20%以上混入するため GvHD が発症する。一方、GvHD 予防として T 細胞除去処理を行うと生着不全の発症率が上昇し、未だ有効な GvHD 予防法は確立されていないのが現状である。本研究において、IBM-DLI 群で GvHD が抑制されることから、骨髓移植ソースに高度の T 細胞混入が認められる場合においても、IBM-BMT は GvHD 抑制効果を有することが明らかとなった。

近年、骨髓間質細胞（その中でも間葉系幹細胞）がアロ T 細胞の免疫抑制を誘導することが報告されており、本研究でも骨髓腔内における骨髓間質細胞が、混入 T 細胞の免疫抑制を誘導することが明らかとなった。Treg の増加と Th2 への偏向による免疫抑制相乗効果が、IBM-BMT の GvHD 抑制に寄与したものと推測される。

審査の結果の要旨

マウスにおける骨髓内骨髓移植法（IBM-BMT）の移植片対宿主病（GvHD）抑制効果について、骨髓内ドナーリンパ球注入法（IBM-DLI）を用いた移植片 T 細胞混入モデルを用いて検討している。その結果、経骨髄的 T 細胞混入モデル（IBM-DLI

群）では、経静脈的 T 細胞混入モデル（IV-DLI 群）と比較して、GvHD の発症が抑制されることを明らかにした。この GvHD 抑制機序を明らかにするために、骨髓移植後マウスの制御性 T 細胞、Th1/Th2 バランス、骨髓ストローマ細胞の HGF/TGF- β の mRNA の発現などについて検討し、IBM-DLI 群の GvHD 抑制効果には制御性 T 細胞の増加、Th2 への偏向、混入 T 細胞と骨髓ストローマ細胞との相互作用が関与していることを示した。

本研究は、造血幹細胞移植における GvHD の発症を抑えるための有用な知見を明らかにしており、医学上価値ある研究と認められ、博士号に値するものと考えられる。

【1449】

氏 名（本 籍）^か金 ^こ子 ^し志 ^ほ帆（熊本県）

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 番 号 甲 第 795 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目

Characterization of the molecular mechanism of ornithine cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells: induction of cationic amino acid transporter-1 by spermine

論文審査委員 主査（教授）中邨智之
（教授）伊藤誠二 （教授）松村美代

論文内容の要旨

【研究目的】

脳回転状脈絡網膜変性症（Gyrate atrophy: GA）は、ornithine aminotransferase（OAT）遺伝子の変異が原因で生じる、常染色体劣性を呈する進行性の網脈絡膜変性疾患である。小児期に夜盲で発症し、患者の多くは 50 才代までに失明に至る。OAT 欠損のため高オルニチン血症および高オルニチン尿症を生じるが、網脈絡膜障害の原因については依然として不明である。これまで我々は、OAT の特異的阻害剤 5-fluoromethylornithine（5-FMO）とオルニチンを用いて本疾患の in vitro モデルを作製し、オルニチンによる網膜色素上皮（RPE）細

胞障害の誘導と、中性アミノ酸による障害の保護効果を見だし、RPE細胞障害にアミノ酸輸送が関与することを明らかにしてきた (Ueda et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39: 820–827, Nakauchi et al. *ibid.* 2003; 44: 5023–5028). 本論文では、RPE細胞におけるアミノ酸トランスポーター (AAT) の発現および機能解析を行い、オルニチンの主要な輸送担体の同定を行った。また、オルニチンによる細胞障害の分子機構を解明するため、オルニチンとオルニチンの代謝産物であるポリアミンによる、AATの発現及び細胞傷害について検討した。

【研究方法】

1) ヒト RPE 細胞株 hTERT-RPE における AAT mRNA の発現を、RT-PCR およびノーザンブロット法で確認した。

2) AAT の発現ベクターを用いた強制発現系と short interfering RNA (siRNA) を用いた発現抑制系を用いて、 $[^{14}\text{C}]\text{L-}$ オルニチンの細胞内への取り込みを測定することにより、オルニチンの輸送活性を測定した。

3) 5-FMO とオルニチンで24時間処理することにより認められる細胞傷害に対する CAT-1 の発現抑制の効果を、細胞生存性試験により検討した。

4) 5-FMO 存在下におけるオルニチンの影響を、 $[^{14}\text{C}]\text{L-}$ オルニチンの細胞内への取り込みと、AAT mRNA の発現誘導について調べた。

5) ポリアミンの合成酵素である ornithine decarboxylase (ODC) の影響は、ODC の阻害剤 difluoromethylornithine (DFMO) 及び ODC の siRNA を用いた発現抑制系を用いて検討した。

6) 細胞内ポリアミン濃度を HPLC 法で測定し、さらにポリアミン (プトレシン、スペルミジンおよびスペルミン) による AAT と ODC mRNA の発現量の変化を測定した。

7) CAT-1 の発現誘導は転写因子 c-myc が担っていることを、c-myc siRNA を用いた発現抑制により検討した。

8) ブタ初代培養 RPE 細胞において、5-FMO とオルニチン処理による CAT-1、ODC および c-myc mRNA の発現誘導と、DFMO による発現量の変化について検討した。

【結果】

I hTERT-RPE 細胞における AAT の発現とオルニチン細胞毒性

1) hTERT-RPE において 6 種の AAT (LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, CAT-1, b⁰+AT) と 2 種の補助因子 (4F2hc, rBAT) の発現が確認された。

2) hTERT-RPE 細胞において、CAT-1 および y+LAT2 の siRNA による発現抑制により、オルニチンの取り込みはそれぞれ 46.6% と 22.0% 減少したことにより、オルニチンは CAT-1 および y+LAT2 により輸送されることが明らかとなった。

3) CAT-1 の siRNA による発現抑制により、オルニチンによる細胞傷害が有意に抑制された。

II オルニチンの代謝産物ポリアミンによる AAT の発現誘導

1) hTERT-RPE 細胞では、5-FMO とオルニチン処理にてオルニチンの取り込みが増加した。5-FMO 単独、オルニチン単独では変化が見られなかった。また CAT-1 mRNA の発現上昇が認められ、この発現誘導は DFMO にて消失した。

2) ODC mRNA の発現もオルニチン処理にて増加し、この発現誘導もまた DFMO にて消失した。

3) ODC の siRNA による発現抑制により、オルニチンの細胞内への取り込みが減少し、オルニチンによる細胞障害も抑制された。

4) 5-FMO とオルニチン添加により、細胞内のスペルミンは増加していた。また、スペルミン添加により、CAT-1 および ODC mRNA の発現が上昇した。

5) 転写因子 c-myc mRNA の発現もまたオルニチン及びポリアミン添加により増加し、c-myc の発現抑制によって、CAT-1 及び ODC mRNA の発現誘導が消失した。

6) ブタ初代培養 RPE 細胞において、CAT-1、ODC および c-myc mRNA の発現が誘導され、この誘導は DFMO によって抑制された。

【考察】

hTERT-RPE 細胞では、オルニチンの主要なトランスポーターは CAT-1 であり、CAT-1 がオルニチンによる細胞傷害に関与していた。また、5-FMO とオルニチン処理後の RPE 細胞では、CAT-1 の発現誘導を介して、オルニチンの取り込みが増加すると考えられた。ODC の発現抑制により CAT-1 の発現誘導が消失したことから、CAT-1 の発現誘導

には、ポリアミン、特にスペルミンの増加が重要であり、転写因子 c-Myc を介した CAT-1 の発現量の増加が、細胞障害誘導に関与することが示唆された。CAT-1 の発現量を調節することで、オルニチンによる RPE 細胞障害を抑制できる可能性があり、CAT-1 の発現制御の機構をさらに明らかにすることで、現在治療法のない本疾患の治療法確立に貢献できると考えられる。

審査の結果の要旨

脳回転状脈絡網膜萎縮症はオルニチン代謝酵素異常による高オルニチン血症を呈する遺伝病で、末期には失明に至る。金子氏はオルニチンの代謝物ポリアミンが転写因子 c-Myc、塩基性アミノ酸トランスポーター CAT-1、ポリアミンの合成酵素オルニチン脱炭酸酵素を誘導して網膜色素上皮細胞の障害に関与することを証明した。本研究は、現在治療法がない脈絡網膜変性疾患の治療法確立に道を開くものであり、学位授与に値する。

【1450】

氏 名 (本 籍) 関 本 剛 (兵庫県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 796 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Reversible Smad-Dependent Signaling between
Tumor Suppression and Oncogenesis

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
(教授) 藤澤順一 (教授) 岡崎和一

論文内容の要旨

【背景と目的】

Smad を介した TGF- β 細胞内シグナル伝達は、癌化過程において中心的な役割を果たしているが、その分子機構は未だ不明な点が多い。TGF- β シグナル伝達因子 Smad2/3 は、リガンド刺激により I 型 TGF- β 受容体 (T β R1) によってリン酸化されたアイソフォーム (pSmad2/3C) と、JNK/p38MAPK でリン酸化されたアイソフォーム (pSmad2/3L) に

変換される。

我々は pSmad3C を介するシグナルは細胞の増殖抑制に働き、JNK 依存性の pSmad2/3L を介するシグナルは細胞の浸潤能を高めると報告してきており、TGF- β シグナル伝達の観点からみた癌化の分子機構は、pSmad3C から pSmad2/3L カスケードへのシフトではないかという概念を提唱してきた。

Smad2/3 のリン酸化部位がシフトするという事が消化器発癌に果たす役割と、新たな分子標的としての可能性を明らかにする為、我々は正常胃粘膜細胞に前癌遺伝子として広く知られている H-ras をレトロウイルスを用いて導入して癌細胞を作り出し、更にそこへ再度レトロウイルスを用いて Smad3 リンカー部がリン酸化しない mutant (Smad3 EPSM) を導入し、それらの細胞における TGF- β シグナル伝達や biological function 等を検討した。

【研究方法】

今回我々は Smad2/3 リンカー部のそれぞれ 4 カ所のリン酸化部位を特異的に認識する 7 種類の抗体を新たに作成し、以前より使用していた Smad2/3C 末端部のリン酸化を特異的に認識する 2 種類と合わせて、計 9 種類の抗体を用いて細胞内 TGF- β シグナル伝達を解析した。

まずラット正常胃粘膜細胞の cell line である RGM-1 細胞に Blasticidin 耐性 retrovirus を用いて活性型 H-RAS^{V12} を導入した細胞株を作製し、Smad2/3 リン酸化と標的遺伝子発現を western blot 法にて解析した。又、それらの細胞での Smad 核移行を immunofluorescence study にて解析し、DNA 合成能と細胞浸潤能を調べた。次に RAS 導入癌細胞に、Smad3L がリン酸化されない mutant (Smad3EPSM) を、Puromycin 耐性 retrovirus を用いて導入し、この細胞における内在性 Smad2/3 リン酸化を western blot 法にて解析し、DNA 合成能と細胞浸潤能を調べた。

【結果】

活性型 H-RAS^{V12} 導入癌細胞 (RGMRas) では、活性化 JNK により Smad2/3L の全 8ヶ所は恒常的にリン酸化されており、核移行した pSmad2/3L は PAI-1 や MMP1, 2, 9, 13 を誘導し、細胞浸潤能を高めていた。親株 RGM-1 細胞では、TGF- β で刺激すると Smad3C はリン酸化され、c-Myc によって細胞増殖が抑制されるのに対し、RGMRas 細胞で

は TGF- β で刺激しても Smad3C はリン酸化されず, c-Myc による細胞増殖は抑制されなかった.

RGM-Ras 細胞に Smad3L がリン酸化されない mutant (Smad3EPSM) を導入した細胞においては, 内在性 Smad2/3L リン酸化および細胞浸潤能は, 著しく阻害されたが, RGM-Ras 細胞で一旦認めなくなっていた TGF- β 依存性の Smad3C リン酸化および pSmad3C を介する細胞増殖抑制が, 親株 RGM-1 細胞と同等に再度認められるようになった.

【考察】

これまで Smad リンカー部のリン酸化は, Smad の核移行を阻害し, TGF- β シグナルを全体的に shut down させると考えられてきた.

しかし今回の我々の研究では, 正常上皮細胞へ H-RAS^{V12} 遺伝子を導入すると, JNK/Smad2/3L 経路の恒常的なリン酸化を介して恒常的な細胞増殖や浸潤能の促進を来し, これこそが癌化シグナルであると考えられた. 更に, JNK/pSmad3L 経路を阻害する事により Smad3C の TGF- β 刺激によるリン酸化が復活し, H-RAS^{V12} 遺伝子導入により導いた癌化シグナルは細胞増殖抑制シグナル, つまり癌抑制シグナルへと可逆的に回帰した.

以上の事より JNK/pSmad3L 経路の阻害はヒト癌に対する新たな分子標的治療となり得, その際, 我々の作成した抗リン酸化抗体を用いた Smad2/3L ならびに Smad3C のリン酸化解析は治療効果を評価するバイオマーカーとして有用となるであろうと考えた.

審査の結果の要旨

Smad2/3 リンカー部 (L) と C 末端部のリン酸化部位を特異的に認識する 9 種類の抗体と活性型 H-RAS^{V12} 遺伝子を導入した上皮細胞を用いて, 癌遺伝子導入上皮細胞では JNK/Smad2/3L を介する経路の恒常的なリン酸化が認められる一方, この経路の阻害により癌抑制シグナルともいえる Smad3C のリン酸化が復活する新知見を見いだした. TGF β の癌の分子機構を Smad2/3 のリン酸化部位から明らかにし, 消化器癌治療の新たな分子標的を示した本研究は, 医学博士の学位に値する.

【1451】

氏 名 (本 籍) ^{み き かつ あき} 三 木 克 朗 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 797 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Role of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors on N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration and cataractogenesis in rats

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
(教授) 螺良愛郎 (教授) 松村美代

論文内容の要旨

【目的】

メチルニトロソ尿素 (N-methyl-N-nitrosourea: MNU) は発癌性・催奇形性を有するアルキル化剤である. ラットへの投与時の年齢特異的に組織親和性は異なり, 網膜視細胞あるいは水晶体上皮細胞の DNA を傷害し, 各々のアポトーシスを誘発し, ヒト網膜色素変性症や白内障のモデルとなりうる病態を惹起する. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) は DNA 傷害に対してゲノムの安定性や DNA 修復因子として働くとともに, 過剰な活性化は基質である NAD⁺ の枯渇を来し細胞死を導く. 今回 PARP 阻害剤である 3-aminobenzamide (3AB) や nicotinamide (NAM) を用い, PARP の網膜視細胞および水晶体上皮細胞における DNA 傷害に対する役割を検討した. なお, 網膜視細胞傷害に対しては PARP の制御因子である nuclear factor (NF)- κ B の関与について検討した.

【方法】

1) MNU 誘発視細胞アポトーシスの PARP 阻害剤による制御実験

50 日齢の Sprague-Dawley ラットに対し 60 mg/kg・MNU を単回腹腔内投与し, 同時に 3-aminobenzamide (3AB) の 0, 1, 5, 30, 50 mg/kg 単回皮下投与を行った. また MNU 投与 12 時間前, 0, 4, 6, 12 時間後に 50 mg/kg・3AB の単回皮下投与を行った. MNU 投与 7 日後に, 眼球を摘出し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して形態比較を行うとともに, 網膜厚ならびに網膜障害率

を形態計測し、3AB の有効投与量と有効投与時期を検討した。併せて、TUNEL 染色と formamide-抗単鎖 DNA 抗体染色により視細胞のアポトーシスを MNU 単独群、MNU+50 mg/kg・3AB 同時投与群につき投与 3 日、7 日後の網膜標本を用いて確認するとともに電顕観察も行った。さらに、MNU 単独群と MNU+50 mg/kg・3AB 同時投与群に対して、投与 12、24、72 時間後の網膜から蛋白を抽出し、リン酸化 NF- κ B とリン酸化 I κ B 量をウェスタンブロット法により解析を行った。

2) MNU 誘発水晶体上皮アポトーシスの PARP 阻害剤による制御実験

15 日齢の Sprague-Dawley ラットに 70 mg/kg・MNU を単回腹腔内投与し、50 mg/kg・3AB を同時に単回、あるいは 1,000 mg/kg・NAM を同時に単回または 1 週間隔で計 3 回皮下投与した。MNU 投与 3 日後にアポトーシスと増殖細胞の出現を各々 TUNEL 染色と PCNA 染色でみるとともに、経時的に水晶体の白濁を肉眼的に観察し、28 日後に眼球を摘出して、白内障指数を指標として白内障の程度を組織学的に比較した。

【結果】

1) 50 日齢のラットに 60 mg/kg・MNU を投与すると、投与 3 日後では、変性した視細胞核に TUNEL ならびに formamide-抗単鎖 DNA 抗体で標識される細胞が検出され、変性細胞に隣接した Muller 細胞による貪食像を認め、投与 7 日後には視細胞層の消失をみた。一方、50 mg/kg・3AB の同時投与により網膜傷害の完全抑制を組織学的に認め、形態計測にても確認した。しかし、50 mg/kg・3AB を MNU と異時投与すると抑制効果をみなかった。また、NF- κ B のリン酸化は MNU 非投与対照網膜に比較して、MNU 単独投与群では有意に低下したが、MNU+50 mg/kg・3AB 同時投与群では低下をみなかった。なお、I κ B のリン酸化は、MNU 非投与対照網膜に比べて MNU 投与により低下傾向を認め、この低下は 3AB の併用により抑制をみたが、3 群間に有意差はみなかった。

2) 15 日齢のラットに、70 mg/kg・MNU を投与すると、投与 3 日後では水晶体上皮細胞に TUNEL 陽性細胞の出現をみたが、無処置対照水晶体に比べて PCNA 陽性細胞に変動はみなかった。MNU 投与 21 日後には水晶体の白濁を認め、28 日後には組織学的にも白内障が確認された。一方、3AB

や NAM の投与は白内障の進行を早め、その程度を増悪することが判明した。

【結論】

1) PARP 阻害剤は、MNU 誘発視細胞アポトーシスを抑制した。よって PARP 阻害剤である 3AB は網膜変性症に対して有効であり病態抑制機序には NF- κ B の持続的リン酸化が関わっていた。

2) 一方、PARP 阻害剤は MNU 誘発水晶体上皮アポトーシスを増悪した。

3) 同一の刺激に起因する細胞傷害に対しても、異なる細胞間では PARP 阻害剤の反応には差異をみる。

審査の結果の要旨

メチルニトロソ尿素 (MNU) 誘発ラット網膜変性症と白内障に対する poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤である 3-aminobenzamide (3AB) の効果につき検討を試みた実験的研究である。網膜変性症に対し、3AB を MNU と同時併用投与すると病変の完全抑制を認め、NF- κ B の持続的リン酸化の関与が示唆された。一方白内障に対し、3AB は病変の進行を早め、病態の増悪をみた。よって、異なる細胞では同一の刺激に対しても 3AB の作用は異なるという結果である。MNU による網膜視細胞や水晶体上皮傷害に対する 3AB の効果は今日まで検証されておらず、新規な検討と評価され、学位に値すると認められた。

【1452】

氏名(本籍) ^{やなぎ}柳 ^だ田 ^{ひで}英 ^{すけ}佐 (東京都)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第798号

学位授与の日付 平成19年9月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Administration of rhHGF-Activator Via Portal
Vein Stimulates the Regeneration of Cirrhotic
Liver After Partial Hepatectomy in Rats論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)伊藤誠二 (教授)上山泰男

論文内容の要旨

【目的】

ヒト肝癌の治療として肝切除術が挙げられる。肝癌の多くは肝硬変を基礎疾患とし、その切除後の肝再生能は正常肝と比べ著しく低下している。従って、術後の肝再生促進は大きな課題である。肝再生に重要な因子は、Hepatocyte growth factor (HGF) といわれている。HGF は不活性な一本鎖の前駆体 (pro HGF) として分泌され、HGF activator により二本鎖の成熟型 HGF (mature HGF) に変換され肝再生に働く。肝硬変切除後の残存肝には多量の pro HGF が存在するが、その活性化阻害により肝再生が低下していると報告されている。そこで我々は、ラット肝硬変部分切除モデルにおける recombinant human (rh) HGF-activator 投与による残存肝内 pro HGF の活性化及び肝再生促進効果について検討し、また HGF receptor (c-Met) を介した signal の解析を行った。

【方法】

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットに dimethylnitrosamine を腹腔内投与し肝硬変モデルを作成した後に 45% 肝切除術 (左外側葉切除) を行った。切除 24 時間後に経門脈的に rhHGF-activator を投与し、残存肝及び血液を採取した。採取した血液から、alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (T-Bil), albumin, hepaplastin test (HPT) について解析した。肝再生の評価として、摘出残存肝の重量から肝重量再生率を算出し、また DNA 合成能の指標として prolifer-

ating cell nuclear antigen (PCNA) 染色を行い、その標識率を算出した。homogenate した肝臓に対してカラム処理を行い HGF を調製した後、抗 α 鎖抗体を用いて Western blot 分析を行った。また、経門脈投与した HGF-activator の肝外逸脱の有無について、下大静脈からの採血から血漿を採取し抗 HGF-activator 抗体を用いて Western blot 分析を行った。さらに、c-Met を介した signal の活性化について、抗 c-Met 抗体及び抗 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3Kp85) 抗体による免疫沈降を行った後、抗 insulin receptor substrate (IRS)-1 抗体及び抗 PI3Kp85 抗体、抗 phosphotyrosine 抗体を用い Western blot 解析した。

【結果】

rhHGF-activator 投与により、ALP, T-Bil の上昇及び、albumin, HPT の低下は非投与群と比べ有意に抑えられた。ALT は有意差を認めなかったが、非投与群と比べ低い傾向を示した。肝切除後 2 日目に PCNA labeling index が、8 日目に肝重量再生率が非投与群に比べ有意な増加を示し、肝再生効果を認めた。残存肝内の pro HGF は rhHGF-activator により mature HGF に変換され、mature HGF レベルは投与後 10 分で最大を示し 30 分で減少した。また、血漿中に HGF-activator は認めなかった。rhHGF-activator により c-Met と IRS-1 の活性化を認め、c-Met 及び PI3K への IRS-1 の結合を認めた。

【考察】

硬変肝部分切除ラットを実験モデルとして rhHGF-activator を直接門脈内に投与することにより、残存肝の pro HGF をすみやかに mature HGF へ変換することができた。さらに mature HGF への変換に伴い、増殖 signal の活性化を介した残存肝の再生促進と肝機能の改善を認めた。また、投与した HGF-activator の肝外逸脱を認めず、他臓器への影響は無いものと考えた。今後、臨床応用にむけて、さらなる基礎的研究を考慮したい。

審査の結果の要旨

肝硬変合併肝癌の患者で肝切除後残存肝の再生能を促進させる手段の開発は重要な課題である。本研究は硬変肝部分切除ラットの門脈内に rhHGF-activator を直接投与することにより、残存肝の proHGF はすみやかに mature HGF へ変換され、増

殖 signal の活性化を介した硬変残存肝の再生促進が得られることを示している。本 activator の臨床応用への重要な基礎的データである。博士号に値する。

【1453】

氏 名 (本 籍) 向 出 裕 美 (石川県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 799 号

学位授与の日付 平成 19 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Immunotherapy for malignant tumors using combination of allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation, donor lymphocyte infusion and dendritic cells

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

進行した悪性腫瘍に対し、骨髓移植とドナー末梢血を用いた DLI が行われ一定の効果をあげているが、graft-versus-host disease (GVHD) のコントロール等問題点も多い。我々は骨髓移植を行う時に骨髓内骨髓移植 (Intra-bone marrow-bone marrow transplantation; IBM-BMT) を行った場合、通常の静脈内への骨髓移植と比較して、早期に造血が回復すること、GVHD の発症を抑制できることを示した。また、マウスやラットのモデルを用い、CD4 陽性細胞を除去した脾細胞を用いた DLI では、抗腫瘍効果は残しながら GVHD を抑制できることを証明した。今回、IBM-BMT+DLI に加え、ドナー骨髓細胞から誘導した樹状細胞 (DC) を用いた治療効果を検討した。

【研究方法】

- ① Meth A (fibrosarcoma) を皮下移植した BALB/c マウスを用いて、腫瘍径が約 10 mm に達した時点で 5 Gy の放射線を照射後、C57BL/6 (B6) マウスの骨髓細胞を IBM-BMT 法で移植し、同時に B6 マウスの CD4 陽性細胞を除去した脾

細胞を用いて DLI を行った (CD4⁻DLI)。さらに、B6 マウスの骨髓細胞を予めホルマリンで固定した Meth A と 4 種のサイトカインで共培養し、DC1 を誘導、これを付加投与する群も作成した。1. control, 2. IBM-BMT, 3. IBM-BMT+whole-DLI, 4. IBM-BMT+CD4⁻DLI, 5. IBM-BMT+DC, 6. IBM-BMT+whole-DLI+DC, 7. IBM-BMT+CD4⁻DLI+DC の 7 群にて治療効果を腫瘍サイズ、GVHD の程度、生存率について比較検討した。

- ② 皮下腫瘍モデルでは腫瘍が増大しても転移が生じにくく、長期にわたりマウスが生存可能であるため、レシピエントに Meth A を静脈注射し、より治療効果が生存率に反映し易い肺転移モデルを作成した。①の結果をふまえ、1. control, 2. IBM-BMT, 3. IBM-BMT+CD4⁻DLI+DC の 3 群にて治療効果を検討した。

【結果】

- ① ・皮下腫瘍モデルにおいて 6. IBM-BMT+whole-DLI+DC, 7. IBM-BMT+CD4⁻DLI+DC の 2 群では 3. IBM-BMT+DLI (whole), 4. IBM-BMT+DLI (CD4⁻) 群より強い腫瘍の発育抑制効果が認められた。
・体重減少、下痢、皮膚所見等でも DC 投与による GVHD の増悪は認めなかった。
・7. IBM-BMT+CD4⁻DLI+DC 群において、腫瘍発育抑制が強く、GVHD が軽度であるため、最も生存率の向上がみられた。
- ② ・肺転移モデルにおいても 3. IBM-BMT+CD4⁻DLI+DC 群で最も高い生存率が得られた。
・3. IBM-BMT+CD4⁻DLI+DC 群では肺の組織学的検討において、明らかな腫瘍発育抑制効果が認められた。

【考察】

以上より、骨髓移植と DLI にドナー由来の DC を加えることにより、GVHD を増悪させることなく、より高い抗腫瘍効果が得られることが証明された。

これまでも DC を使用した腫瘍免疫治療について多くの報告があるが、十分に有効な結果は得られていない。

DC はプロフェッショナル抗原提示細胞であるが、特に DC1 を使用することにより、Th0 から Th1 への誘導が効果的に行われた。またこの DC1

は予めホルマリン固定した腫瘍細胞と共培養することで抗原提示がよりスムーズに行われ、さらに骨髄移植、DLIと併用することにより、より強い抗腫瘍効果が得られたと考える。また、BMTをIBM-BMTとし、CD4陽性細胞を除去した脾細胞にてDLIを行うことで、よりGVHDの発症を抑制し、それが生存率の改善に関与したと考えられた。

審査の結果の要旨

悪性腫瘍の治療に骨髄移植とドナーの末梢血のリンパ球投与が用いられているが、graft-versus-host disease (GVHD) の発現を抑え、抗腫瘍効果を得るための治療法は尚開発途上である。本研究は実験的腫瘍モデルにおいて、骨髄移植、ドナーのCD4⁺のリンパ球の投与、ドナーの骨髄細胞より誘導したDCIを宿主の腫瘍細胞で感作して投与している。これによりGVHDを抑えかつ抗腫瘍効果と担腫瘍動物の生存率の延長が得られることを明らかにしている。骨髄移植による悪性腫瘍の治療の開発に重要な実験的データを得ている。博士号に値すると認められた。

【1454】

氏名(本籍) よこい がわ のり お 横井川 規 巨 (滋賀県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位番号 甲 第800号
 学位授与の日付 平成19年11月29日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 学位論文題目
 Enhanced Production of Interleukin 6 in
 Peripheral Blood Monocytes Stimulated with
 Mucins Secreted into the Bloodstream
 論文審査委員 主査(教授) 福原資郎
 (教授) 伊藤誠二 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

大腸癌細胞が産生する糖タンパク質であるムチンがヒト末梢血中の単球を刺激しシクロオキシゲナーゼ2(COX-2)、プロスタグランジン E2(PGE2)の産生を高め、癌増殖に関与することを報告した

(Proc Natl Acad Sci USA 100, 2736-2741, 2003)。また、癌細胞の増殖には血清中のインターロイキン6(IL-6)が関係しているという報告(Cancer Lett 151, 31-38, 2000)や血清中のIL-6の濃度が高くなると癌患者の予後が悪いといわれている(Cytokine Res 21, 45-52, 2001)今回、我々はムチンとIL-6との関係について分析し、癌細胞の関与以外にどのようなメカニズムによって血清中のIL-6が上昇するかを調べた。

【方法】

大腸癌患者10例(男性4例、女性6例、年齢59～88歳、stage III 4例、stage IV 6例)で早朝空腹時に末梢血20mlを採取した。Ficoll法に従い単核球(1×10^6 個)を分画した。この単核球を培養液RPMI中で37°C、1時間培養し単球を得た。高分子タンパクであるムチンは大腸癌細胞株(LS180)の培養上清より分離精製した。ISOGEN法に従い単球よりtotal RNAを得た。IL-6のPCR primer (sense, antisense)、controlとしてβ-actinのPCR primerを用いRT-PCR法により増幅し2%アガロースゲルによって分析した。

患者より採取した血清はSephacrose4Bでゲルろ過し、各fractionを280nmの吸光度で測定し、吸光度の上昇が認められたfractionを100μlずつnylon membrane上に添加し、ムチンのコアタンパク上にあるsialyl Tn antigenは、この抗原に特異的な抗体であるMLS132Abを用いて検出した。

患者血清中のムチンが単球のIL-6の産生を高めるfactorであるかを調べるために健常人より得た単球の培養液中に患者血清を加え培養し、その培養上清のIL-6活性をELISAで分析した。一方、患者血清にMLS132mAbを添加し、遠心後の上清を健常人より得た単球培養液に加え、単球のIL-6産生効果について分析した。

【結果】

患者血清中のIL-6濃度を調べると(38-80pg/ml)、健常人の場合(0-9pg/ml)と比べて高値を示した。患者末梢血中の単球のIL-6mRNAは6例において検出できた。4例においては検出できなかった。

患者血清中のムチンが単球のIL-6産生を高めるかどうかを検討するために健常人から採取した単球に患者血清を加え、その培養上清をELISAで分析したところ、6例の患者血清において単球の

IL-6 産生を亢進せしめることがわかった (mean 146 pg/ml). 健常人の血清を加えた control 群では産生がほとんどみられなかった (mean 32 pg/ml). この IL-6 産生は加えた患者血清の用量・時間依存性に増加した. また, 患者血清中には糖タンパクであるムチンが定性的に検出された.

次にムチンに対する抗体を使用してムチンを除いた患者血清で単球を刺激した実験では, ムチンが存在する場合と比べて IL-6 の産生は約 50 pg/ml にまで低下することがわかった. 一方, 健常人より採取した単球にヒト大腸癌細胞株の培養上清より採取したムチンを添加し培養した結果, その培養上清中には IL-6 の産生が見られ, ムチンの濃度依存性に産生が高まることもわかった.

【考察】

今回の実験で, 癌細胞が産生するムチンが末梢血中の単球を刺激し IL-6 の産生を高めることが考えられた. 血清中にムチンが存在しない場合には IL-6 の産生が低下することもわかり, ムチンが単球の IL-6 産生の 1 つの刺激因子であることが示唆された. 血清中の IL-6 濃度が高まると血管新生, 宿主の免疫反応の障害などさまざまな影響をもたらす. したがってムチンは癌細胞の増殖にとって好都合な環境を作り出していると考えられる. 今後, 癌患者における免疫抑制状態の改善や癌細胞の増殖抑制に抗ムチン反応の誘導といった応用が期待される.

審査の結果の要旨

大腸癌が産生する糖蛋白, ムチンが癌自体の発育, 増殖にどのように関与しているかを検討している. 進行期大腸癌患者の血中ではムチンが高値を示し, これと一致して IL-6 の血中濃度が上昇していることが明らかになった. また, in vitro 実験系において, 大腸癌細胞の産生するムチンが正常人の末梢血単球を刺激し, IL-6 を産生することが証明された. すなわち, ヒトの大腸癌は, 生体内で血管新生を促したり宿主の免疫反応を障害することにより, 自己の増殖に適した環境を作り出している可能性が示唆された. これらの所見は, 新しい癌治療法の開発に貴重な知見であり, 博士号に値する.

【1455】

氏名(本籍) ^{やま} ^だ ^{まさ} ^{のり} 山田正法 (大阪府)
学位の種類 博士(医学)
学位番号 甲 第 801 号
学位授与の日付 平成 19 年 11 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目

Characterization of alternatively spliced isoforms of the type I interleukin-1 receptor on iNOS induction in rat hepatocytes

論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)伊藤誠二 (教授)上山泰男

論文内容の要旨

【目的】

肝術後に生じる肝不全のメディエーターとして, サイトカイン, ケモカイン, 活性酸素, 一酸化窒素 (NO) などが良く知られている. NO は一酸化窒素合成酵素 (NOS) の働きにより L-arginine から産生される. NOS には常在型 (eNOS と nNOS) と誘導型 (iNOS) が存在する. 我々は肝細胞における炎症性サイトカイン, インターロイキン (IL)-1 β による iNOS の発現誘導に, 従来から良く知られている I κ B キナーゼを介した転写因子 NF- κ B の活性化に加えて, PI3K/Akt を介した I 型 IL-1 レセプター (IL-1RI) の up-regulation (増幅) が必須であることを報告した (J Hepatol 2004; 40: 616-623). 本研究では 3 種類の alternatively spliced IL-1RI isoforms (長鎖膜結合型 IL-1RI, long IL-1RI; 短鎖膜結合型 IL-1RI, short IL-1RI; および可溶性型 IL-1RI, soluble IL-1RI) を同定し, これらの肝細胞での局在と iNOS 誘導に対する役割を追求した.

【方法】

雄性ラット (Wistar 200 g) からコラゲナーゼ灌流法により初代培養肝細胞を調製した. IL-1 β (1 nM) の存在下, alternatively spliced IL-1RI mRNAs の発現の経時的変化を RT-PCR および real time PCR で検出した. HA-tagged IL-1RI の transfection 実験にて, 各 isoform の細胞内の局在 (細胞染色) を追求した. iNOS promoter-Luc construct と各 IL-1RI isoform の co-transfection 実験にて, 各 isoform の iNOS promoter 活性への影響を検討した. 一方,

IL-1 β 刺激後の“conditioned medium”を用いて、soluble IL-1RI の細胞からの遊離の有無を Western blotting で調べた。さらに、“conditioned medium”を IL-1 β 刺激した肝細胞に添加し iNOS 誘導および NO 産生への効果を検討した。

【結果】

IL-1 β の刺激下、iNOS 誘導に先行して 3 種類の IL-1RI mRNA が誘導された。膜結合ドメインを持つ 2 つの膜結合型 IL-1RI (long IL-1RI (590 aa), short IL-1RI (573 aa)) と他の 1 つは膜結合ドメインを欠損した可溶化型 IL-1RI (soluble IL-1RI (525 aa)) であった。2～3 時間後 long IL-1RI と short IL-1RI の各 mRNA は約 5～10 倍へ、一方 soluble IL-1RI も増加を示したが両膜結合型に比べるとわずかであった。これらの isoforms の発現実験より、前 2 者は肝細胞内 (膜) に局在したが後者の soluble form は細胞外に遊離した。2 つの膜結合型は iNOS promoter (mRNA 合成) 活性および mRNA 安定化活性を促進したが、可溶化型には効果が認められなかった。可溶化型 IL-1RI は IL-1 β 刺激後 medium 中に経時的に増加した。また、可溶化型 IL-1RI を含む medium を IL-1 β 刺激した細胞に投与することにより、iNOS タンパク質および NO 産生の誘導をいずれも阻害した。

【考察】

3 種類の isoforms のうち 2 種の膜結合型はその mRNA の発現に time lag があるものの、プロモーター活性化と mRNA 安定化の両面より、iNOS の発現誘導の促進に関与していることが示唆された。可溶化型は細胞外へ遊離することより、IL-1 β と細胞膜上の IL-1RI との結合を阻害して、iNOS シグナルを軽減している可能性が考えられる。NO の過剰産生は肝臓の障害と保護の両面に関与することが報告されている。本研究で明らかとなった 3 種類の IL-1RI の役割はより詳細な iNOS 誘導の制御メカニズムの解明に貢献すると考える。

審査の結果の要旨

病態肝の増悪因子としても作用する一酸化窒素 (NO) の産生に関する研究である。肝細胞においては炎症性サイトカイン IL-1 β により一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が発現誘導される。この発現に I 型 IL-1 レセプターの増幅が必須であるが、その詳細についてはこれまでに解明されていなかった。

本研究は IL-1 β 刺激下に iNOS 誘導に先行して 3 種類の IL-1RI mRNA が誘導されること、内 2 つは膜結合型で iNOS の mRNA 合成活性、mRNA 安定化活性を促進すること、一方可溶化型 IL-1RI は iNOS 蛋白および NO 産生誘導を阻害することを明らかにしている。

病態肝での iNOS の誘導、NO 合成に関しての新しい知見である。

博士号に値すると認められた。

【1456】

氏名 (本籍) 津田 雅庸 (愛知県)

学位の種類 博士 (医学)

学位番号 甲第 802 号

学位授与の日付 平成 19 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Activation of granulocytes by direct interaction with dendritic cells

論文審査委員 主査 (教授) 福原資郎

(教授) 池原 進 (教授) 中谷壽男

論文内容の要旨

【はじめに】

樹状細胞 (Dendritic cells : DCs) は獲得免疫応答における主要な抗原提示細胞であり、様々な局面で免疫応答を制御・調節する細胞としても知られている。また DCs 上の Toll-like receptor を含むパターン認識レセプターの発現やデフェンシンに対する感受性などの知見から DCs は自然免疫においても重要な細胞であることが明らかにされてきている。しかしながら、感染初期防御において最も重要な要員の 1 つである顆粒球系細胞との相互作用に関しては未だ明らかにされていない。この点を解明するため我々は DC サブセットとの共培養による顆粒球 (好中球) 機能の変化を解析した。

【研究方法】

健常人末梢血よりセルソーターを使用し、conventional DCs (cDCs)、及び plasmacytoid DCs (pDCs) を分離し、分離直後の未熟な DCs を LPS と GM-CSF 存在下 (cDCs の場合) あるいは LPS

と IL-3 存在下 (pDCs の場合) に 72 時間培養し、成熟 DCs とした。また健康人末梢血より比重遠心法により好中球を分離精製し、各 DCs サブセットと 24 時間共培養を行った。好中球と cDCs との共培養の場合は GM-CSF をまた pDCs との共培養の場合は IL-3 を培養に加えた。

共培養後の細胞の観察、表面抗原マーカーの解析、産生されるサイトカインの測定を行い DCs との相互作用における好中球の変化を観察した。

【結果】

好中球を DCs と共培養し 24 時間後には DCs を取り囲むように好中球が集まり、クラスターの形成が認められ、また同時に好中球活性化マーカーである CD63, CD64 の発現が増加した。CD63, CD64 の発現増加は cDCs との共培養においてより顕著であり、また共培養する DCs 数に比例してその増加を認めた。さらに、後述の CD209 のリガンドである CD50 (ICAM-3) も好中球活性化因子の一つとされているが、共培養群の好中球において有意に発現が増加していた。クラスター形成、好中球活性化マーカーの変化は T 細胞、B 細胞との共培養群では観察されなかった。

次に好中球の初期感染防御因子として、好中球エラスターゼに着目した。培養した細胞をサイトスピンし、エラスターゼの免疫染色を行ったところ、DCs と共培養した好中球細胞内のエラスターゼが単独培養した好中球内のエラスターゼに比べ減少し、逆に培養液中のエラスターゼは共培養した群で有意に上昇していた。このことは DCs との相互作用により細胞内のエラスターゼの分泌が促進されたことを示唆している。同様に感染防御因子の一つであるミエロペルオキシダーゼも好中球単独群に比べ、共培養群で有意に上昇していた。

DCs/好中球クラスター形成における接着因子の同定のため、共培養時に CD11a, CD11b (Mac-1), CD11c, CD18, CD62L (L-selectin), CD209 (DC-SIGN) に対する抗体をそれぞれ加えた。その結果、抗 CD209 抗体を添加した細胞ではクラスター形成が阻害され、CD209 が接着因子の一つであることが判明した。

【考察】

DCs との共培養によりクラスター形成と共に CD63, CD64, CD50 の発現増加が認められ、また感染防御因子として重要なエラスターゼ、ミエロ

ペルオキシダーゼの上昇も観察された。このことは好中球・DCs 間相互作用により好中球が活性化され、自然免疫における DCs の関与の 1 つの側面が明らかになった。

DCs/好中球クラスター形成における接着分子の一つは CD209 であることも明らかにされ、そのリガンドである CD50 は Lewis x を介して CD209 と結合するとされているが、可溶性 CD209 は好中球に発現する CD50 とのみ結合することが最近報告され (Bogoevska V *et al.* Glycobiology 2007; 17: 324-333.), これは我々の結果を支持するものと考えられる。

審査の結果の要旨

生体防御における獲得免疫機構は自然免疫によって発動され、樹状細胞はその中心的役割を果たしている。本研究は、自然免疫の最前線に位置する好中球が、樹状細胞との接触によって活性化することを明らかにし、その接触は好中球に発現する ICAM-3 と樹状細胞が発現する DC-SIGN による可能性を示した。これらの成績は、感染初期防御を担う好中球と樹状細胞との新たな関係を示唆するものとして重要である。学位に値すると認められた。

【1457】

氏 名 (本 籍) ^{い そ の}五十野 ^{つよし}剛 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 803 号

学位授与の日付 平成 19 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Nicorandil suppressed myocardial injury
after percutaneous coronary intervention

論文審査委員 主査 (教授) 中邨智之
(教授) 岩坂壽二 (教授) 今村洋二

論文内容の要旨

【研究背景】

待機的な経皮的冠動脈形成術 (PCI) 後の心筋逸脱酵素の上昇は、慢性期予後に関係するという

多数の報告がある。

PCI 後の心筋障害は、血管の機械的損傷によって生じる plaque の内容物や血栓による末梢塞栓、内膜解離、側枝閉塞、冠攣縮、balloon 拡張時の虚血など多くの要因によって生じると考えられる。

一方、 K_{ATP} channel 開口作用とニトロ基を併せ持つニコランジルは、急性心筋梗塞に対する PCI 時の no reflow/slow flow 現象を抑制し心筋障害を軽減する。この心筋保護効果は薬理学的な ischemic preconditioning 作用や微少循環の改善によるものと報告されている。

【研究目的】

本研究では、ニコランジルの心筋保護効果が待機的 PCI においても期待できるか否かについて検討した。

【研究方法】

1. 対象

待機的 PCI を行った 49 症例を対象とし、Nicorandil 群 (N=23) と Control 群 (N=26) に無作為に割り付けた。全例に PCI 開始直前に硝酸イソソルビドを冠動脈内に 1.25 ~ 2.5 mg 投与。Nicorandil 群においては、PCI 開始前からニコランジル 4 mg 単回静注した後、6 mg/時の速度で 24 時間点滴静注し、さらに 15 mg/日を確認造影施行時までの 3 ~ 6 ヶ月間経口投与とした。

2. 心筋逸脱酵素測定

心筋障害の指標として creatinine kinase (CK), creatinine kinase MB isoform (CK-MB), troponin I (TnI) および myoglobin を PCI 前、PCI 直後、4 時間後、24 時間後および 48 時間後にそれぞれ測定した。

3. 心電図測定

ischemic preconditioning 作用の指標をして、PCI 施行中のバルーン拡張時の ST 上昇の総和 (Σ ST) をそれぞれ測定した。

4. 微少循環障害の評価

微少循環障害の指標として PCI 後に TIMI myocardial perfusion grade (TMPG) および TIME frame count (TIMI) をそれぞれ計測した。

5. 左室機能の評価

左室機能および左室壁運動については PCI 前と慢性期 (PCI 施行 3 ~ 6 ヶ月後) に左室造影検査を行いそれぞれ評価した。

6. データ解析

各数値は平均値 $\pm$ 標準偏差で表示し、両群間比較において非連続変数に関しては χ^2 検定を、連続変数に関しては分散分析 Fisher 法を用い、 $p < 0.05$ を有意な差とした。

【結果】

1. 患者背景や冠危険因子および心筋障害の諸指標は、PCI 前には両群間で有意差は認めなかった。
2. 心筋逸脱酵素測定にて PCI 24 時間後では CPK (Nicorandil 群 78.1 ± 34.9 versus Control 群 117.4 ± 137.9 , $p = 0.0141$), CK-MB (Nicorandil 群 1.57 ± 1.9 versus Control 群 2.67 ± 4.5 , $p = 0.0485$), TnI (Nicorandil 群 0.37 ± 0.055 versus Control 群 0.86 ± 1.65 , $p = 0.0101$) と心筋逸脱酵素の上昇が Nicorandil 群で有意に抑制されていた。
3. Σ ST は Nicorandil 群で 1 回目、2 回目、3 回目のバルーン拡張時にいずれも上昇が有意に抑制されていた。
4. TMPG および TIMI は共に両群間で有意差は認めなかった。
5. 慢性期の左室造影にて Nicorandil 群で左室壁運動の改善が有意に認められた。

【本研究の限界】

これまでの研究では待機的 PCI 後の心筋逸脱酵素の上昇と長期予後との関連が報告されている。しかし本研究は単施設での検討であり、症例数も少なく、長期予後との関連は制限された成績となった。しかしながら本研究ではニコランジルによる PCI 後の心筋逸脱酵素の上昇の抑制を認めており長期予後の改善について十分期待できる。現在、多施設研究の組織作りの準備をしており、症例数を増やし、さらなる検討も予定している。

【考察】

頻回で短時間の心筋虚血後に ischemic preconditioning 作用が発現するが、これらは Adenosine A1 受容体の活性化により特徴付けられる。その活性化に伴い K_{ATP} channel が開口し、 K_{ATP} channel が活性化する。それに伴い、膜の脱分極が抑制され、活動電位持続時間が短縮し、虚血部位のカルシウム過負荷が軽減される。心筋内のカルシウム過負荷は細胞障害を引き起こすため、これらの作用が ischemic preconditioning 効果として心筋保護に働く。

本研究では K_{ATP} channel 開口作用とニトロ基を併せ持つニコランジルにて検討を行った。全例に PCI 開始直前に硝酸イソソルビドを冠動脈内に投与していることより、本研究で示されたニコランジルによる心筋保護効果については K_{ATP} channel 開口作用が大きな役割を占めていたと考えられる。

【結語】

本研究にて待機的 PCI 後の心筋逸脱酵素の上昇の抑制を認め、慢性期における左室壁運動の改善を認めたことより、ニコランジルによる待機的 PCI 後の心筋障害に対する心筋保護効果が示唆された。

審査の結果の要旨

待機的な経皮的冠動脈形成術 (PCI) 時における心筋障害は、慢性期予後に影響する。五十野氏は、待機的 PCI 術を行った 49 症例について、 K_{ATP} channel 開口作用とニトロ基による血管拡張作用を併せ持つニコランジルが、術後の心筋逸脱酵素の上昇、心電図上 ST 上昇を抑制し、左室機能の改善をもたらすことを明らかにした。本研究は、待機的 PCI 術後の予後を改善するエビデンスを示したものであり、学位授与に値する。

【1458】

氏 名 (本 籍) 伊 藤 健 一 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 804 号

学位授与の日付 平成 19 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Relationship between ultrasonography of knee cartilage and physical characterization

論文審査委員 主査 (教授) 飯田寛和

(教授) 西山利正 (教授) 岩坂壽二

論文内容の要旨

変形性膝関節症 (knee OA) 患者の人口は世界的に増大しており、この予防が各国の医療費抑制につながるものと考えられる。そこで我々は、knee

OA 変化の前駆現象とされる軟骨異常を超音波検査 (US) を用いて評価し、その所見 (正常・異常) と身体特性との関係について、主題目に基づき横断研究ならびに縦断研究の 2 つの研究により検討を行った。

I. Relationship between ultrasonography of knee cartilage and BMI, leg alignment and muscle strength in middle-aged and elderly women (中年および高齢女性の膝関節軟骨超音波像所見と BMI・下肢アライメント・下肢筋力の関係)

本研究の目的は、変形性膝関節症 (knee OA) に到るまでの前段階で認められる膝軟骨異常を US で評価し、その所見 (正常・異常) と Body mass index (BMI)、下肢アライメント、下肢筋力の関係を明らかにすることである。

対象は健康な女性 33 名の計 66 膝で、内科的診察と膝関節のレントゲン撮影の後、膝関節 US、身体計測、筋力測定を行い、得られた結果を年齢の影響を補正するために中年群 (40-59 歳) と高齢群 (60 歳以上) に分け分析を行った。

中年群では US 所見に異常を認めるものは、速い運動における筋力 (瞬発力) が低く、高齢群では US 所見に異常を認めるものは BMI が高値であることが明らかとなった。

本結果は、関節軟骨保護のためには中年期では瞬発力を養うトレーニング、そして高齢期では BMI のコントロールが knee OA への形成過程の循環を断ち切る一手段になる可能性を示唆するものとする。

II. Ultrasonographic changes of the knee joint cartilage associated with physical characterization in middle-aged women: 6-month observational survey (中年女性における膝関節軟骨超音波画像の変化と身体特性の関係: 6ヶ月間の観察調査)

本研究の目的は、中年女性の膝関節に対する US において 6ヶ月間関節軟骨所見が正常を維持できたケースと、正常から異常へ変化したケースの BMI および下肢筋力の変化を比較し、US 異常所見への体重過多や下肢筋力低下の影響を明らかにすることである。

関西医科大学健康科学センターを利用する中年女性 (40-59 歳) に対し、初回と 6ヶ月後の 2 回、

US と BMI の算出, 下肢筋力検査を行った. 初回 US で異常の認められたものや整形外科の疾患を有する者は対象から除外し, US 所見が6ヶ月間, 正常を維持できたグループ (N 群) と正常から異常に変化したグループ (A 群) 間で BMI や下肢筋力の差を比較検討した. 最終的な分析対象数は10名20膝となり, その平均年齢は 52.9 ± 5.0 歳 (40–59 歳) であった.

N 群の BMI と下肢筋力においては初回と6ヶ月後で有意な変化は認められなかったが, A 群では初回と6ヶ月後で有意な筋力の低下が認められた. A 群での BMI については有意な変化は認められなかった.

本結果より, 中年女性における膝関節軟骨の US 異常所見は下肢筋力の低下と関連することが明らかとなった.

以上, 横断研究と縦断研究の2つの研究結果より, 中年女性における膝関節軟骨の US 異常所見は下肢筋力の低下が原因の一要因であることが明らかとなった.

本研究は knee OA の予防に関する基礎データについて検討したもので, 今後の knee OA 予防に貢献することが期待される研究である.

審査の結果の要旨

本研究は変形性膝関節症の前駆現象である関節軟骨の異常を超音波検査で捉え, その異常をもたらす因子の一つが下肢筋力であることを統計学的に明確にした. このことは, 今後の変形性膝関節症予防の対策の一要因として寄与するところが大い. よって本研究は学位を授与するに値するものと認める.

【1459】

氏名(本籍) ^{おお まえ まり こ} 大前 麻理子 (京都府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第805号

学位授与の日付 平成19年11月29日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Long-term maintenance of donor-derived hemopoiesis by intra-bone marrow-bone marrow transplantation

論文審査委員 主査(教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 山下敏夫

論文内容の要旨

【はじめに】

骨髄内骨髄移植法 (IBM-BMT) は従来の経静脈的骨髄移植法 (IV-BMT) に比べて, ドナー細胞の生着促進, ドナー特異的トレランスの誘導, 造血前駆細胞の早期出現などの点において優れた移植法である. 今回我々は, さらに造血前駆細胞のもつ長期骨髄再構築能を測定するために, Serial BMT 法を用いて IBM-BMT 群, IV-BMT 群の2群を作成し, 移植後のドナー由来の各細胞動態について解析を行った.

【研究方法】

5.5 Gy×2 回照射後のレシピエントマウス (C3H/HeN:H-2^k) に MHC の異なるドナーマウス (BALB/c:H-2^d) の骨髄細胞を, 骨髄内骨髄移植法 (IBM-BMT: 脛骨内に直接移植), もしくは経静脈的骨髄移植法 (IV-BMT) を用いて移植を行った. さらにそれぞれ約2ヵ月の間隔をあけて, レシピエントの骨髄細胞を第2世代・第3世代のレシピエントに骨髄移植を行った (Serial BMT 法). その後, レシピエント中のドナー由来各細胞の出現・維持をフローサイトメトリー (FACS) や免疫染色を用いて解析を行った.

また, 骨髄内骨髄移植後のドナー由来骨髄細胞の早期動態を確認するため, 移植後1, 2, 7, 10, 14日にレシピエントの脛骨を用いてドナー細胞注入側と非注入側間の比較も含めて解析し, 検討を加えた.

【結果】

Serial BMT 法による長期骨髄再構築能を解析した結果、IV-BMT 施行群に比較して、IBM-BMT 施行群において、ドナー由来成熟血液系細胞の出現を多く認め、第 1・第 2 世代よりも第 3 世代のレシピエントで、その差がより顕著にみられた。また、第 3 世代レシピエントの IV-BMT 施行群においてはドナー由来細胞の維持ができず、レシピエント由来細胞のみが認められる個体が約 25% を占めたが、第 3 世代レシピエントの IBM-BMT 施行群ではこのような現象はみられず、ドナー由来細胞が維持されていた。また、IV-BMT 施行群に比して IBM-BMT 施行群はドナー由来造血前駆細胞の頻度も高く、この傾向は第 3 世代レシピエントにおいて最も顕著であった。第 3 世代のレシピエントの骨髄組織を用いた免疫組織学的検討においても IV-BMT 施行群に比較して IBM-BMT 施行群でドナー由来造血前駆細胞数が有意に多く検出され、実際骨髄中でこのような細胞が維持されていることが確認された。

さらに、生存率についての検討も加えたところ、IBM-BMT 施行群の長期の生存率が IV-BMT 施行群に比較して有意に高く、造血機能の長期的維持が示唆された。

移植直後の細胞動態を検討するため、移植後 1, 2, 7, 10, 14 日にレシピエントの脛骨骨髄細胞中のドナー由来造血前駆細胞数解析したところ、ドナー細胞注入側の脛骨では非注入側の脛骨、および対照群である IV-BMT 施行群の左右脛骨に比べドナー由来造血前駆細胞数が有意に多く検出された。

【考察】

Serial BMT 法による長期骨髄再構築能を解析した結果、ドナー由来成熟血液系細胞、造血前駆細胞において、第 1・第 2 世代のレシピエントよりも第 3 世代のレシピエントで、IV-BMT 施行群と IBM-BMT 施行群の差がより顕著にみられた。また、長期生存率においても IBM-BMT 施行群は IV-BMT 施行群より高いことが判明した。

移植直後の細胞動態の結果から、骨髄内に移植された造血幹細胞は、早期においては移植骨髄腔内に留まって造血を開始し、その後全身の骨髄に移行して造血を維持するものと推測される。またフローサイトメトリーおよび免疫組織学的検討の

結果は IBM-BMT 法が IV-BMT 法に比較して、移植後長期的な造血前駆細胞の能力の維持、血液・免疫系細胞の再構築という点から優れた移植法であることを示しており、我々が以前に示した同系間の骨髄移植のみならず、MHC の異なる異系骨髄移植においても IBM-BMT 法の利点が証明されたものと考えられる。

審査の結果の要旨

近年、本学で開発された骨髄内骨髄移植 (IBM-BMT) の臨床応用が注目されている。IBM-BMT は、HLA のバリアーを超える革新的な骨髄移植法の確立に繋がる画期的な方法である。本研究は、MHC の異なるマウス異系骨髄移植モデルにおいて、IBM-BMT を用いて serial BMT を行い、ドナー由来の成熟血液細胞及び造血前駆細胞が第 3 世代のレシピエントマウスで効率よく維持されていることを明らかにしている。この結果は、IBM-BMT が従来の静脈内投与による骨髄移植法に比べて優れていることを示している。以上より、本研究は、IBM-BMT を用いる新たな骨髄移植法の開発に重要な知見をもたらした価値ある研究であり、学位に値すると認められた。

【1460】

氏 名 (本 籍) 安 藤 性 實 (韓国)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 806 号

学位授与の日付 平成 19 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Protease-activated receptor4-mediated Ca^{2+} signaling in mouse lung alveolar epithelial cells

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二

(教授) 中邨智之 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

プロテアーゼ活性化受容体 (Protease activated receptor; PAR) はトロンピンやトリプシンなどのセリンプロテアーゼで活性化される 7 回膜貫通型新規 G 蛋白共役型受容体であり、現在までに 4 つ

の分子種 (PAR1~4) が同定されている。これらのプロテアーゼは、外傷や炎症の際に放出され、細胞外アミノ基からなる特定の受容体領域を切断することにより受容体共役型シグナルを伝達する。肺組織に発現する PAR1 と PAR4 はトロンビンで活性化されるが、PAR4 の作用および情報伝達機構については不明な点が多い。本論文は肺胞上皮細胞における PAR4 の発現状態と情報伝達機構について検討している。

最初にマウスの肺を構成する細胞の初代培養において、PAR4 は肺の線維芽細胞には発現しないが肺胞上皮細胞の細胞膜に強く発現していることを免疫化学的に証明し、次いで RT-PCR 法により確認した。

情報伝達機構の解析では、PAR4 刺激による Ca^{2+} 反応は、2 相性であり、一過性ピークからなる第 1 相とこれに続く緩徐に下降する第 2 相で構成されることを明らかにした。この反応は PAR1 刺激と比較して、反応持続時間が長いことも特徴であった。この特異な 2 相性 Ca^{2+} 反応はイノシトールリン脂質代謝回転の促進を介して惹起され、第 1 相 (一過性ピーク) は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員により、続く第 2 相 (緩徐下降相) は Ca^{2+} 貯蔵共役型 Ca^{2+} 流入により、それぞれ生じることが示唆された。PAR4 刺激による Ca^{2+} 反応の持続時間は PAR1 刺激時より長いことから、長期細胞応答に関与する可能性が考えられる。

審査の結果の要旨

本研究は肺胞上皮における PAR4 の発現とその刺激によって惹起される特異な Ca^{2+} 反応の様態を示し、その機構を明らかにしている。さらに本研究の成果は PAR4 刺激による肺胞上皮細胞から筋線維芽細胞への転換を誘導する仕事へと展開しており、肺線維症の分子病態の解明とその治療法の開発に役立つものと評価された。学位に値すると認められた。

【1461】

氏名 (本籍) ^{いけ}池 ^{うら}浦 ^{つかさ}司 (大阪府)
学位の種類 博士 (医学)
学位番号 甲 第 807 号
学位授与の日付 平成 20 年 1 月 22 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目

Effects of sensory denervation by neonatal capsaicin administration on experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
(教授) 山田久夫 (教授) 岡崎和一

論文内容の要旨

【はじめに】

慢性膵炎とは、持続的な炎症とそれに引き続く非可逆的な膵実質の線維化を特徴する病態であり、おもな臨床症状として反復する腹痛、耐糖能異常、消化吸収不良があげられる。これまでわれわれは、慢性膵炎モデルラットにおいて膵内の知覚神経軸索分枝が増生し、この形態学的変化と疼痛症状には密接な関連があると報告してきた。一方、一次知覚神経に含まれる substance P (SP) は局所に向炎症作用をもたらすことが知られており、これまでの動物実験により知覚神経終末から放出される SP が急性膵炎を増悪させることが報告されている。そこでわれわれは、慢性膵炎時にみられる膵内の知覚神経軸索分枝の増生が疼痛の原因となるだけでなく、膵の炎症およびその線維化にも関与しているのではないかと考え、dibutyltin dichloride (DBTC) による膵炎ラットモデルにおけるカプサイシン除神経の効果を組織学的、生化学的に検討した。

【研究方法】

生後 2 日目の Lewis ラットに対し高濃度のカプサイシン (50 mg/kg) を皮下投与し除神経をおこなった。対照群には同量の生理的食塩水を皮下投与した。これらのラットが 170–190 g となったところで DBTC を単回静脈内投与することで膵障害を惹起させた。投与後 3 日、7 日、28 日にそれぞれ 5 匹を屠殺し、両群における膵の炎症程度を評価した。急性期 (DBTC 投与後 3 日、7 日) にお

いては、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色による組織学的検討（炎症細胞浸潤、間質浮腫、腺房細胞壊死の 3 項目について 5 段階にスコア化）、および、顆粒球浸潤の指標である脾 myeloperoxidase (MPO) 活性の測定による生化学的検討をおこなった。さらに、慢性期 (DBTC 投与後 28 日) においては、H-E 染色による組織学的検討（小葉構造の崩壊について 5 段階、腺房細胞萎縮、線維化、脾管過形成について 4 段階にスコア化）に加え、Sirius Red 染色を施した脾組織像を画像処理することで脾線維化を定量化し評価した。

【結果】

DBTC 投与 3 日目の血清アミラーゼ値は、除神経群、非除神経群の両群において上昇していたが両群に有意差はなかった。急性期 (DBTC 投与後 3 日、7 日) の組織学的検討では、DBTC 投与 3 日目の非除神経群において、各腺房細胞の離開と炎症細胞の浸潤を認め、7 日目にはこれらの炎症所見はさらに著明となり、腺房細胞壊死もみられた。これに対し、3、7 日目の除神経群においては非除神経群に比し炎症所見は軽微で、脾組織スコアと脾 MPO 活性も有意に低値を示した。慢性期 (DBTC 投与後 28 日) での非除神経群では、脾腺房細胞は高度に破壊され、小葉間および小葉内に線維組織の増生がみられたが、除神経群ではこれらの慢性脾炎像は軽減しており、脾組織スコアと脾線維化率は有意に低かった。

【考察】

一次知覚神経に含まれる SP といった神経ペプチドは、一次知覚神経終末が末梢組織の損傷や炎症により刺激された際に軸索反射によって組織中へ放出され、直接的あるいは間接的に局所の向炎症作用をもたらすことが知られている。これまで知覚神経終末から放出される SP が急性脾炎を増悪させることは報告されているが、慢性脾炎の病態進行にどのように影響を及ぼすかについてはまったく報告されていない。今回われわれは、カプサイシンにより一次知覚神経を除神経することにより DBTC による脾の急性および慢性炎症を抑制できることを示した。慢性脾炎時に増生する脾内の知覚神経線維は疼痛の増悪の原因となるばかりでなく、持続する脾の炎症とその線維化にも関連することが示唆された。

審査の結果の要旨

カプサイシンによる一次知覚神経を除神経後、dibutyltin dichloride (DBTC) により誘発した急性および慢性脾炎ラットを用いて炎症を抑制できることを示した。本研究は慢性脾炎時に増生する脾内の知覚神経線維が疼痛の増悪だけでなく、脾の炎症の持続と線維化にも関連することを明らかにすることより、慢性脾炎患者の疼痛と進展の機序の解明に寄与し、学位に値すると考えられた。

【1462】

氏 名 (本 籍) ^{ひじ} 肱 ^{かわ} 川 ^{たけし} 健 (愛媛県)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 808 号
学位授与の日付 平成 20 年 1 月 22 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目

Insulin-like growth factor-I prevents liver injury through the inhibition of TNF- α and iNOS induction in D-galactosamine and lipopolysaccharide-treated rats

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
(教授) 岡崎和一 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

肝障害時に産生される一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は、肝機能の損傷と保護の両面にわたって重要な役割を果たしている。一般に、肝障害時に産生される過剰の NO は障害促進因子の一つと考えられている。しかしながら NO の産生を誘導する一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) の制御に関しては不明な点が多い。本研究では、肝障害モデルとしてリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS)・ガラクトサミン (D-galactosamine, GalN) による急性肝不全に陥ったラットを用いて、IGF-I の生体保護効果および iNOS 誘導の制御機序につき解明に努めた。

【目的】

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) は、成長ホルモンの作用を媒介するソマトメジン C として最初

に報告され、後にインスリン様の効果を持つ IGF-I と同一物質であることが明らかにされた。IGF-I は、抗アポトーシス作用、神経保護作用、神経新生促進作用など多様な作用を持つことが報告されており、心臓、骨格筋、骨、腎臓、角膜など多彩な臓器への効果が示されている。IGF-I は、既に臨床で用いられている薬剤で、安全性は高く、動物モデルでの実験において肝機能保護への効果が示されれば臨床応用に結びつく可能性が高い。肝不全モデルに対する IGF-I 投与の実験報告は少ない。我々は、急性肝不全ラットを用いて IGF-I の効果を検討した。

【研究方法】

肝不全モデルラット・SD 系雄性（8 週齢、250～300 g）は、GalN（400 mg/kg）、LPS（16 μ g/kg）を陰茎静脈から注射して作成した。IGF-I 群は、GalN/LPS 投与の 1 時間前に IGF-I を 3.2 mg/kg（コントロール群は生理食塩水）を皮下注射した。血中・肝組織中のサイトカイン、生化学データや NO/iNOS の誘導を比較した。

【結果】

IGF-I 投与により生存率の有意な改善、肝におけるアポトーシスと好中球浸潤の減少を認めた。また、肝障害のマーカーとされる血中 ALT/AST/総ビリルビン値の上昇の抑制、肝機能障害に影響を及ぼすとされる炎症性のサイトカイン、ケモカインの TNF- α /IL-1 β /CINC-1 の増加を抑制した。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 は IGF-I 投与により逆に増加を認めた。NO に関しても IGF-I 投与により血中 NO の増加を阻害した。iNOS 遺伝子の発現誘導に対しては、iNOS 蛋白・iNOS mRNA の発現抑制を認めたが、iNOS promoter の転写活性に必要な NF- κ B には影響は及ぼさなかった。最近の研究において、iNOS mRNA の分解の安定化に関与することが明らかになった iNOS のアンチセンス転写物（antisense-transcript, AS-T）を測定したところ、IGF-I による抑制を認めた。従って、IGF-I は iNOS mRNA の合成抑制よりも、むしろ mRNA の分解を促進させることにより、iNOS 蛋白ひいては NO の産生を阻害している可能性がある。

【考察】

IGF-I は、炎症性因子である TNF- α 、IL-1 β 、CINC-1 や NO の発現抑制と抗炎症性サイトカインである

IL-10 を増加させることにより生体保護効果を發揮すると思われた。さらなる機序の解明が必要であるが、今後の臨床における肝不全治療に対する IGF-I の応用が期待される。

審査の結果の要旨

本研究は実験的肝不全モデルにおいて insulin-like growth factor（IGF-I）が生存率の改善、肝細胞のアポトーシスの抑制等に加え、炎症性サイトカインの産生も抑制すること、IGF-I は iNOS mRNA の合成抑制よりむしろ mRNA の分解を促進することにより病態肝での NO の産生を阻害していることを明らかにした。本研究は肝不全での IGF-I の炎症性サイトカイン、NO 代謝を介した保護作用に関する初めての報告であり、臨床応用も期待されることから学位に値する業績と考える。

【1463】

氏名（本籍）^た田^{なか}中^{ひろ}宏^{のり}典（大阪府）

学位の種類 博士（医学）

学位番号 甲 第 809 号

学位授与の日付 平成 20 年 1 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, FR183998, has protective effect in lethal acute liver failure and prevents iNOS induction in rats

論文審査委員 主査（教授）岡崎和一
（教授）伊藤誠二（教授）上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

急性肝不全は致死率が高く、肝移植以外有効な治療法は見つかっていない。Na⁺/H⁺ exchanger（NHE）は様々な臓器、組織の細胞の膜に広く存在し、細胞内の pH や Na⁺ 濃度を調節している。新規の NHE 阻害剤である FR183998（FR）は心臓、脳、脾臓の虚血再灌流障害を軽減したとの報告があるが、急性肝不全に対する保護効果に関しては不明である。急性肝不全などの肝障害の病態に、炎症性サイトカインや誘導型一酸化窒素合成

酵素 (iNOS) の発現誘導が深く関与している。iNOS は tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1 β などの炎症性サイトカインによって誘導される。D-galactosamine (GalN) と lipopolysaccharide (LPS) で処理したラットやマウスが急性肝不全モデルとして良く知られている。我々は、i) ラット急性肝不全モデルを用いて、FR の保護効果および炎症性サイトカインの iNOS 誘導に対する影響について検討した。ii) ラット初代培養肝細胞を用いて、IL-1 β による iNOS 誘導に対する FR の阻害メカニズムを検討した。iii) *In vivo* および *in vitro* の実験より急性肝不全に対する NHE 阻害剤の治療効果について考察した。

【方法】

In vivo 実験では、雄性 Sprague-Dawley ラット (250 $\pm$ 30 g) の陰茎静脈より GalN (400 mg/kg) /LPS (16 μ g/kg) を投与した。FR (0.1–1 mg/kg) は、GalN/LPS 投与 30 分前に経静脈的に投与した。一方、雄性 Wistar ラット (200 $\pm$ 10 g) から肝細胞を調製し、FR (5–30 μ M) 存在下に IL-1 β (1 nM) で刺激し *in vitro* 実験を行った。以下の項目を検討した：GalN/LPS 投与後 12–48 時間後の生存率、血清中の AST, ALT, LDH, 総ビリルビン、血清中、肝組織中のサイトカイン (TNF- α , IL-6, interferon- γ , cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1)。GalN/LPS 処理 6 時間後の肝組織のアポトーシス、好中球浸潤、血清中の一酸化窒素 (NO), iNOS 蛋白および mRNA, iNOS 遺伝子の antisense-transcript (AS), nuclear factor (NF)- κ B, iNOS プロモーター活性および 3'-untranslated region (3'-UTR) を介した iNOS mRNA 安定化活性、NF- κ B subunit p65 の核移行、Akt リン酸化、IL-1 receptor (IL-1R) I 蛋白および mRNA。

【結果】

GalN/LPS 群は 24 時間以内にほとんど死亡したが、FR (1 mg/kg) 投与により約 70% の生存を認めた。FR は GalN/LPS 群の血清中 AST, ALT, LDH, 総ビリルビンの上昇を軽減した。FR は GalN/LPS 群の肝組織の出血や壊死巣、アポトーシス、好中球浸潤いずれをも軽減した。FR は血清中、肝組織中で GalN/LPS 群の TNF- α , IL-6, interferon- γ , CINC-1 の誘導を抑制した。FR は GalN/LPS 群での NO 産生、iNOS 誘導、AS 発現、NF- κ B 活性化を軽減した。同様に *in vitro* 実験でも IL-1 β 刺激によ

り iNOS 誘導および AS 発現、NF- κ B 活性化を認めたが、FR (30 μ M) により軽減した。さらに FR は iNOS プロモーター (mRNA 合成) 活性および mRNA 安定化活性、p65 核移行、IL-1RI 蛋白および mRNA の促進、Akt リン酸化を阻害した。

【考察】

In vivo 実験で FR は TNF- α や CINC-1 の増加を阻害し、肝のアポトーシスや好中球浸潤を抑制した結果、その生存率を上昇させたと考えられる。GalN/LPS による iNOS 誘導には TNF- α が深く関与し、iNOS により産生された NO はアポトーシスを引き起こす。iNOS 誘導の制御は NF- κ B 活性化を介した mRNA 合成促進と iNOS mRNA の 3'-UTR および AS を介した iNOS mRNA 安定化が関与している。FR は GalN/LPS ラットの肝 iNOS 誘導を NF- κ B 活性化および iNOS mRNA 安定化の両面で阻害し、NO の関与するアポトーシスを含む様々な肝障害を抑制し、保護効果を示したものと考えられる。FR の iNOS 誘導に対する阻害メカニズムは *in vitro* のラット初代培養肝細胞の実験にて、より詳細に確かめられた。*In vitro* 実験で FR は NF- κ B subunit の p65 の核移行を阻害すると共に IL-1RI の up-regulation を阻害した。PI3kinase/Akt を介した IL-1RI の up-regulation は iNOS プロモーターの活性化のみならず iNOS mRNA の安定化にも関与している可能性が高い。NHE 阻害剤は、急性肝不全等のサイトカインや NO の関与する様々な肝障害に対し、治療効果を示すと考えられる。FR は IL-1 β 刺激による細胞内 pH 上昇を阻害することから iNOS 誘導に NHE 活性化が関与している可能性がある。NHE 活性化と iNOS 誘導の分子レベルでの関連性についてはさらなる研究が必要である。

審査の結果の要旨

急性肝不全の病態増悪因子として炎症性サイトカインや iNOS の発現が関与しているが、臓器の虚血再灌流障害に保護作用をする Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) 阻害剤と NO 代謝との関連性は分かっていない。本研究は NHE 阻害剤が急性肝不全モデル動物の生存率を上げること、肝実質障害を軽減し、アポトーシスを抑制し、炎症性サイトカインの産生を抑制することを明らかにしている。NO 産生及び iNOS 発現の抑制も引き起こしているが、

この機構として NHE 阻害剤が NF- κ B の活性の阻害と iNOS mRNA の安定化の阻害の両面で関与しているとする知見を得ている。NHE 阻害剤の NO 代謝を介した肝障害保護作用を明確にした研究成果である。博士号に値する。

【1464】

氏名(本籍) 島野直人(大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第810号

学位授与の日付 平成20年1月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Effects of Prepubertal Indole-3-carbinol
Treatment on Development of *N*-methyl-
N-nitrosourea-induced Mammary Carcinomas
in Female Sprague-Dawley Rats

論文審査委員 主査(教授) 上山泰男
(教授) 伊藤誠二 (教授) 螺良愛郎

論文内容の要旨**【目的】**

Indole-3-carbinol (I-3-C) はブロッコリーや芽キャベツといったアブラナ科の植物に天然に含まれる化学物質で、実験的に成獣に投与する乳癌を抑制する。思春期前の乳腺は、環境発癌因子に対して高感受性で、かつ化学予防物質に対しても短期投与で高感受性をみる。しかし、思春期前に発癌刺激にさらされた雌ラットに I-3-C を短期間投与し、乳癌誘発に対する影響について検討した報告はない。そこで、思春期前 I-3-C 投与の *N*-methyl-*N*-nitrosourea 誘発乳癌におよぼす影響について検討した。

【方法】

雌 Sprague-Dawley ラットに対して I-3-C を以下の如く胃内投与した。1 群: I-3-C 無処置群, 2 群: 250 mg/kg を 15・16 日齢に投与, 3 群: 50 mg/kg を 15・16 日齢に投与, 4 群: 50 mg/kg を 15・16・29・30 日齢に投与, 5 群: 50 mg/kg を 29・30 日齢に投与。なお、全群 22 日齢に 50 mg/kg *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を単回腹腔内投与した。以上

の各群に対して体重増加、膣開口日齢、発情周期を群間比較し、最大乳腺腫瘍径が ≥ 1 cm になった時点で適宜屠殺し、34 週齢時に実験を終了し、乳腺腫瘍の発生につき ≥ 1 cm 乳癌発生率、全乳癌多発率、ならびに潜伏期を指標として I-3-C の影響につき比較検討した。

【結果】

250 mg/kg I-3-C 投与ラット(2 群)は急性毒性のため投与直後に 40% (12/30) が死亡したが、50 mg/kg 投与群(3-5 群)には顕著な毒性はみなかった。なお各群の生存ラットは実験終了時に体重差はみなかった。I-3-C を 15・16 日齢に 250 mg/kg (2 群) または 50 mg/kg 投与したラット(3 群)では各の膣開口日齢の早発や発情周期の延長を認めたが、実験終了時の子宮・卵巣重量は群間差をみなかった。乳癌の発生は、I-3-C を 15・16・29・30 日齢に 50 mg/kg 投与した群(4 群)では、 ≥ 1 cm 乳癌発生率、全乳癌多発率や潜伏期を指標とすると I-3-C 無処置群(1 群)に比して有意ではないものの乳癌抑制傾向をみた。なお、他の I-3-C 投与群(2, 3, 5 群)の乳癌発生は無処置群と差をみなかった。

【考察】

I-3-C は成熟ラットに対して 250 mg/kg 量は急性毒性効果をみないが、思春期前ラットに対しては 40% に急性毒性を示し、投与直後に死亡個体をみた。一方、思春期前ラットは 50 mg/kg 量に対しては毒性はみなかった。生存個体は膣開口日齢や発情周期よりみると、実験期間中内分泌かく乱作用がみられたが、実験終了時の子宮・卵巣重量には差を認めず、体重増加にも差はみなかった。成熟ラットに I-3-C を発癌起始過程に投与すると乳癌抑制をみるが、促進過程での投与では効果の不一致をみる。今回、思春期前ラットに対して発癌起始過程の前後に投与すると乳癌抑制傾向をみたが、統計的に有意には至らなかった。

【結論】

1. 思春期前に発癌刺激にさらされた雌 Sprague-Dawley ラットに、I-3-C の短期投与を試みた。
2. 250 mg/kg I-3-C は急性毒性を発揮したが 50 mg/kg 量では致死個体はみなかった。
3. 50 mg/kg あるいは 250 mg/kg I-3-C は経過中内分泌かく乱作用を呈したが、実験終了時の子宮・卵巣重量に差はみなかった。
4. 50 mg/kg I-3-C を発癌起始過程の前後に投与す

ると乳癌抑制傾向をみたが、有意には至らなかった。

5. 思春期前の短期 I-3-C 投与では有意な乳癌抑制は得られなかった。

審査の結果の要旨

Indole-3-carbinol (I3C) の成獣ラットへの投与は乳癌の化学予防に対して有効であるが、効果を見るには終生にわたる投与が必要である。一方、乳腺が未だ発育途上にある思春期前期は各種化学予防物質に対して短期の投与で終生永続する効果を見る。そこで、I3C を思春期前期に発癌剤暴露の前後に作用させたところ、乳癌抑制傾向はみたが、一過性の内分泌かく乱作用をみるとともに成獣では耐性をみる投与量で致死個体を認めた。よって、I3C の化学予防は成獣に対する長期投与が必要である。以上、I3C の摂取に関して注意を喚起せしめる研究と考える。学位に値すると認められた。

【1465】

氏 名 (本 籍) ^{みや そう たけ し} 宮 宗 武 史 (兵庫県)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 811 号
 学位授与の日付 平成 20 年 1 月 22 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 学位論文題目
 EDARVONE PREVENTS FAS-INDUCED
 FULMINANT HEPATIC FAILURE IN MICE
 BY REGULATING MITOCHONDRIAL
 BCL-XL AND BAX
 論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
 (教授) 岡崎和一 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【研究目的】

劇症型肝不全 fulminant hepatic failure (以下 FHF) は肝移植以外の治療法では救命率の低い重篤な病態であり、有効な薬物療法の確立が望まれている。FHF の最多の原因はウィルス性肝炎であり、その肝障害発生のメカニズムは免疫担当細胞

による Fas 経路 (Fas-Fas リガンドシステム) を介した感染肝細胞のアポトーシスの誘導とされている。そしてアポトーシスシグナルの伝達には細胞内の Redox 環境の変化が関与していると考えられている。フリーラジカル消去剤の edaravone (MCI-186) は 2001 年より臨床応用されている脳梗塞治療薬であるが、今回われわれは Fas 誘導性の FHF 実験モデルを用いて、edaravone の肝アポトーシス抑制効果とその抑制機構について検討した。

【研究方法】

7 週齢の雌性 BALB/c マウスに edaravone を投与した群と生理食塩水を投与した対照群とに分けた。edaravone 投与の 30 分後に、実験的に急性肝不全を引き起こす purified hamster agonist anti-Fas mAb clone Jo2 (以下 Jo2 抗体) 0.25 µg/g を静注し、両群間の生存率を比較した。また Jo2 抗体投与後経時的に採取した血液と肝組織から血清 AST、血清 MDA, caspase-3, cytochrome C の測定と HE 染色、TUNEL 染色を施行し両群間の肝障害、肝アポトーシスの程度を比較した。さらに、肝ミトコンドリア膜タンパクの構成要素で、膜の透過性に関与している Bcl-xL, Bax についても両群間で比較した。

【結果】

対照群の 12 時間後の生存率は 0% であったのに対して、edaravone 投与群では 100% と生存率の顕著な改善を認めた。血清トランスアミナーゼ値と摘出肝の肉眼所見、HE 染色の所見から edaravone 投与群では対照群と比較して肝障害の程度が軽く、TUNEL 染色、caspase-3 値から肝アポトーシス抑制作用が認められた。

またアポトーシスシグナルの一つでミトコンドリアから放出される cytochrome C が edaravone 群で有意に抑制されており、cytochrome C の放出を調整するミトコンドリア膜タンパクの比、Bcl-xL/Bax 比も edaravone 群で有意に高値であった。さらに生体内の酸化の指標である血清 MDA 値は edaravone 群で有意に低値であり、Jo2 抗体投与で酸化状態となった生体内が、edaravone により抗酸化されたことを確認した。

【考察】

Jo2 抗体を用いたマウス劇症肝不全モデルにおいて edaravone は顕著な肝保護効果を示した。今

回われわれは edaravone の有する抗アポトーシス作用の一つにミトコンドリア膜タンパクの保護効果に着目した。ミトコンドリアからの cytochrome C 放出の調節機構として Bcl-2 family タンパクの関与が知られるが、最近その subfamily である Bcl-xL/Bax 比が大きく影響することが明らかになってきた。当研究では edaravone 投与により Bcl-xL/Bax 比が高く維持された結果、Fas 誘導性のアポトーシスを抑制したと考えられた。また最近の報告では Fas 経路によるアポトーシスの誘導過程で活性酸素 (reactive oxygen species) を多く発生していることや活性酸素がミトコンドリア膜タンパクの構造を変化させるということが分かってきており、edaravone が Fas 経路により細胞内に発生した活性酸素を消去することで活性酸素の標的となりやすいミトコンドリア膜タンパクの変化を防ぎ cytochrome C の放出を阻害した可能性があるかと推測された。

審査の結果の要旨

劇症型肝不全の増悪因子の1つである活性酸素による肝細胞のアポトーシスの誘導の機構に関する研究である。Fas-Fas リガンド系を介した急性肝不全の増悪、個体の死亡をフリーラジカル消去剤edaravoneの投与により抑制可能なことを実験的に示した。本研究では Fas を介するアポトーシスに焦点を当て、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出抑制、Bcl-xL/Bax 比の維持がedaravone による抑制作用に重要であることも明らかにした。edaravone が劇症肝炎の治療への応用の可能性を示された本研究は学位に値すると考えられる。

【1466】

氏名(本籍) ^{たか}高 ^ぎ木 ^{くに}邦 ^お夫 (京都府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第812号

学位授与の日付 平成20年1月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Interleukin-1 is not essential for expression of inducible NOS in hepatocytes induced by lipopolysaccharide *in vivo*

論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)伊藤誠二 (教授)高橋伯夫

論文内容の要旨

【はじめに】

IL-1 や TNF α などのサイトカインは敗血症の病因として非常に重要である。 *in vitro* においては初代培養肝細胞に IL-1 β で刺激すると誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の mRNA が誘導され、発現した iNOS により NO が産生されるが、TNF α では誘導されない。しかし *in vivo* では肝臓での iNOS の誘導には TNF α が重要であり IL-1 が関係するかどうかは明らかでない。そこで我々は野生型マウス、IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$ マウス、TNF $\alpha^{-/-}$ マウスの腹腔内にリポポリサッカライド (LPS) を投与することにより敗血症を発症させたマウスを作製し、血清 NO 測定、肝臓での iNOS の mRNA の発現やタンパクを調べ、IL-1 β と TNF α の *in vivo* における iNOS 発現への関与を検討した。さらに *in vivo* において LPS 投与後の肝細胞における iNOS の発現と LPS の受容体 Toll-like receptor 4 (TLR4) との関係についても検討した。

【研究方法】

1. 生後 8-10 週の C57BL/6 (野生型) マウス、IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$ マウス、TNF $\alpha^{-/-}$ マウスを実験に使用した。
2. 血清 NO は、それぞれのマウスに LPS を腹腔内投与後、下大静脈より血液を採取し、血清部分を使って化学発光法で測定した。
3. さらに LPS 投与後の肝臓における iNOS 蛋白の発現を調べるため LPS 投与前と LPS 投与後の肝臓を用いてウェスタンブロットを行った。

4. また, iNOS と TNF α , IL-1 α , IL-1 β , TLR4 の mRNA の発現を調べるため LPS 投与前と投与後の肝臓を使って RT-PCR を行った.
5. LPS 投与後の肝臓組織内での iNOS 蛋白と TLR4 蛋白の発現と分布を調べるため抗 iNOS 抗体, 抗 TLR4 抗体, Kupffer 細胞のマーカーとして F4/80 抗体, 肝細胞のマーカーとして抗アルブミン抗体を用いて免疫組織化学を行った.

【結果】

1. 血清中の NO 濃度は野生型マウスでは LPS 投与後 2 時間より上昇し始め, 12 時間まで上昇し続けた. 野生型マウスと比較して, IL-1 α / β ^{-/-} マウス, TNF α ^{-/-} マウスはいずれも投与後 8, 12 時間で NO 濃度は有意に低かった. ウェスタンブロットで肝臓の iNOS 蛋白の発現は野生型マウスでは LPS 投与後 4 時間で検出され, 6 時間後にピークに達し 12 時間まで持続したが, TNF α ^{-/-} マウス, IL-1 α / β ^{-/-} マウスでは有意に減少していた.
2. 野生型マウスの肝臓では LPS 投与後 2 時間で iNOS, TNF α , IL-1 β の mRNA を発現し始めた. そしていずれも 6, 8 時間頃にピークとなった. 8, 12 時間後で IL-1 α / β ^{-/-} マウスと TNF α ^{-/-} マウスは野生型マウスよりも有意に発現が少なかった.
3. 免疫組織化学では, LPS 投与後 2 時間の野生型マウスで iNOS 蛋白の発現は Kupffer 細胞で染色され肝細胞では染色されなかったが, 8 時間後では Kupffer 細胞と肝細胞で強く染色されるようになった. IL-1 α / β ^{-/-} マウスでは野生型マウスと同様に 8 時間後に肝細胞で iNOS 蛋白が染色されたが TNF α ^{-/-} マウスの 8 時間後では肝細胞で染色されなかった.
4. iNOS 蛋白の発現と同様に, TLR4 の免疫染色でも野生型マウスでは LPS 投与後 2 時間まで Kupffer 細胞で発現しており, 4 時間後に肝細胞内で検出され始めた. 投与後 8 時間の IL-1 α / β ^{-/-} マウスでは TLR4 は野生型マウスと同様に Kupffer 細胞と肝細胞内で観察されたが, TNF α ^{-/-} マウスでは Kupffer 細胞のみであった.

【考察】

in vitro の初代培養肝細胞で iNOS を誘導させるのは IL-1 β であり, LPS や TNF α では誘導できない. 一方, ノックアウトマウスを用いた本研究から

in vivo での肝細胞における iNOS 発現には TNF α が必須であり, IL-1 β は必須でないことがわかったが, *in vitro* と *in vivo* の iNOS 誘導機序の違いは以下のように考察できる.

IL-1 受容体と TLR4 受容体は相同性が高い細胞内ドメインを有し, IL-1 β と LPS は共通の MyD88 依存経路を通して TRAF6/NF- κ B 介して iNOS 蛋白を誘導する. *in vitro* では IL-1 β が肝細胞に発現する IL-1 受容体を介して iNOS を誘導するが, *in vivo* では TNF α ^{-/-} マウスの実験結果から, LPS 刺激で iNOS を誘導する濃度に IL-1 β が達しないため, 肝細胞の iNOS が誘導されないと考えられる. *in vivo* においては, LPS がまず Kupffer 細胞上の TLR4 に作用して iNOS だけでなく TNF α を誘導し, 遊離された TNF α が肝細胞上の 1 型 TNF 受容体を介して TLR4 を発現させる. LPS は発現した TLR4 を介して肝細胞で iNOS を誘導させることが示された. 本研究結果は, 敗血症において LPS が iNOS 誘導に直接関与する新しい機構を示唆するものである.

審査の結果の要旨

リボポリカッカライド (LPS) はインターロイキン (IL)-1 や腫瘍壊死因子 (TNF) α などの炎症性サイトカインを介して血管や肝臓等で誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を誘導し, 低血圧性ショックを引き起こすと考えられている. 本研究は LPS が Kupffer 細胞に作用して iNOS と TNF α を誘導し, 遊離された TNF α により誘導された LPS 受容体 TLR4 を介して肝細胞の iNOS を誘導させることを IL-1 と TNF α ノックアウトマウスを用いて明らかにした. LPS が肝臓の iNOS 誘導に直接関与する新しい機構を *in vivo* で示した本研究は学位に値すると思う.

【1467】

氏名(本籍) ^は ^ば ^ら ^{こう} ^{ぞう} 羽原弘造 (広島県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第813号

学位授与の日付 平成20年1月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Pitavastatin up-regulates the induction of
iNOS through enhanced stabilization of
its mRNA in proinflammatory cytokine-
stimulated hepatocytes

論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)伊藤誠二 (教授)上山泰男

論文内容の要旨

【目的】

一酸化窒素(NO)は生体における循環器系、免疫系、脳神経系の重要な生理機能に關与している。さらに、様々な臓器・組織の障害時に、NOはその障害因子としてあるいは保護因子として諸刃の剣であることも良く知られている。肝臓において、NOはL-アルギニンを基質として、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)あるいは誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)により合成される。eNOSは血管類洞内に恒常的に発現しており、肝内循環系などに重要な役割を持つ。

一方、iNOSは炎症、虚血・再灌流や肝硬変時にクッパー細胞(常在型マクロファージ)や肝細胞などで発現誘導される。スタチン(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor)は本来の血中コレステロール低下作用に加えて、様々な臓器・組織において抗炎症性効果あるいは保護効果を発揮することが報告されている。最近、スタチンのこの保護効果の一部分はNO産生の制御を介していることが明らかになってきた。一方、スタチンが肝硬変患者のNO産生を促進することにより、肝内循環の抵抗を減少させ門脈圧の軽減に効果があったとの報告もある。本研究において、我々は“スタチンが障害肝においてiNOS遺伝子の発現、誘導を促進した結果、NO産生の増強を介して肝臓の保護に貢献している”という仮説を立てた。肝細胞におけるiNOS

誘導に対するスタチンの効果を検討するとともに、そのメカニズムを追求した。

【方法】

初代培養肝細胞は雄性ラット(Wistar, 200±10g)よりコラゲナーゼ灌流法を用いて調製した。炎症性サイトカイン interleukin-1β (IL-1β, 1 nM)により誘導されるiNOS/NO産生およびその関連シグナルに対するスタチン(ピタバスタチン, 興和)の影響を検討した。NO値(NO₂⁻)はGriess法で測定し、iNOS, I型IL-1 receptor (IL-1RI), inhibitory protein κB (IκB)はWestern blot, iNOSおよびIL-1RI mRNAはNorthern blot, NF-κB活性化はelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)で検討した。また、iNOS promoter-luciferase constructsをtransfectionし、promotor活性およびmRNA安定化活性に対する効果をみた。iNOS gene antisense-transcript (アンチセンス転写物)はRT-PCRで検討した。

【結果】

IL-1βは肝細胞のiNOS誘導とNO産生を刺激するが、ピタバスタチン(1-50 μM)はその効果を著しく促進した。特に、ピタバスタチンを前処理(IL-1βの少なくとも2h前に添加)することにより、NO産生は4倍前後に上昇した。しかしながらピタバスタチンはIκBキナーゼ経路のIκBの分解およびNF-κBの活性化には全く影響を与えなかった。一方、ピタバスタチンはiNOS誘導に必要なもう1つの経路、IL-1RIの増幅をさらに促進し、IL-1RI mRNAおよびそのタンパク質の発現を増加させた。コレステロール合成経路における代謝中間体のメバロン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸はこれらIL-1RI増幅やiNOS誘導に対するピタバスタチンの効果をブロックした。トランスフェクション実験にて、ピタバスタチンによるiNOS mRNAの増加は転写後の3'-untranslated region (3'-UTR)を介したiNOS mRNAの安定化に由来することを示した。このピタバスタチンのiNOS mRNA安定化効果はアクチノマイシンDを用いたmRNAレベルの解析からも示唆された。最近、iNOS遺伝子のアンチセンス転写物が3'-UTRを介したmRNAの安定化に關与することが明らかになった。ピタバスタチンはこのアンチセンス転写物の発現を増強した。

【考察】

肝細胞において、ピタバスタチンは炎症時の iNOS 誘導を up-regulation することにより、NO 産生を増加させた。ピタバスタチンは iNOS のアンチセンス転写物の発現を促進し、3'-UTR の関与する mRNA 安定化を増加させることにより、iNOS mRNA およびタンパク質レベルを増強した。ピタバスタチンは NF- κ B を介した iNOS promoter 活性には影響を与えないことから、iNOS mRNA の合成よりもむしろ IL-1RI の up-regulation を介した mRNA 安定化に寄与していると考えられる。本研究は病態肝などにおけるスタチンによる NO を介した新しい治療の可能性を示唆する。

審査の結果の要旨

血中コレステロール低下作用のあるスタチンの病態肝における作用を NO 代謝より検討した研究である。ピタバスタチンが初代培養肝細胞で炎症性サイトカイン interleukin-1 β による iNOS/NO 産生を亢進させること、iNOS の誘導促進に加え、IL-1RI の増幅促進をすること、IL-1RI mRNA 蛋白を増加させること、iNOS 遺伝子のアンチセンス転写物を介して iNOS mRNA を安定化すること等の機構を明らかにしている。炎症等の病態肝においてスタチンが新しい作用を有することを示した研究である。博士号に値すると認められた。

【1468】

氏名(本籍) 串^{くし}田^だ温^{あつ}子^こ (兵庫県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 814 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Enhancement of Antitumor Immunity
after Propofol Treatment in Mice

論文審査委員 主査(教授) 螺良愛郎
(教授) 池原 進 (教授) 新宮 興

論文内容の要旨

【研究目的】

プロポフォールは短時間作用性の静脈麻酔薬であり、集中治療室での鎮静に広く使用されている。一方ミダゾラムも広く用いられている鎮静薬であるが健忘作用を有することにより好んで用いる麻酔科医も多い。

近年、麻酔学と手術手技の向上により腫瘍切除の手術件数が増加し、それにともない術後の鎮静が必要な件数も増加してきた。麻酔は免疫に影響すると広く知られているので麻酔薬の選択が患者の予後を左右する可能性がある。腫瘍に対する免疫には自然免疫と獲得免疫があるが、前者は個々の腫瘍に非特異的であり、ナチュラルキラー細胞を介した腫瘍破壊がその例である。後者は腫瘍特異的であり、液性免疫と細胞性免疫に分かれるが抗腫瘍免疫では細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に代表される細胞性免疫が最も重要であるといわれている。CTL 活性にはヘルパー T 細胞 1 型 (Th1) が重要な役割を担っている。Th1 の産生にはインターロイキン-12 やインターフェロン- γ などのサイトカインが不可欠である。プロポフォールまたはミダゾラムがサイトカインの産生に影響をもたらすことは以前より報告されているので、これらの鎮静薬が免疫に何らかの影響を及ぼすと考えられる。抗腫瘍免疫も例外ではないがこれらの麻酔薬が及ぼす影響はほとんど知られていない。

本研究では、マウスにプロポフォールまたはミダゾラムを投与し ex vivo において CTL 活性を測定して抗腫瘍免疫に対する影響を検討した。また

マウスにおいて腫瘍増殖をモニターしプロポフォールの *in vivo* における影響も合わせて調べた。

【研究方法】

C57/BL6 マウスにプロポフォール、またはミダゾラム（対象群は生食またはプロポフォールの溶媒であるイントラリピッド）を3日間腹腔内投与した後、腫瘍細胞（EL4 細胞）を皮下投与した。プロポフォール、ミダゾラムを引き続き3週間投与した。その後、脾細胞を採取し *in vitro* において CTL を増幅した後、CTL 活性を測定した。また、プロポフォール、ミダゾラムのマウスの栄養状態に及ぼす影響をみるために連日腹腔内へ投与し、体重増加、血漿蛋白濃度、脾細胞数を測定した。さらにマウスにおける腫瘍増殖に与える影響をみるためにプロポフォールを3日間腹腔内投与した後、腫瘍細胞を皮下投与しさらに引き続き4週間投与し腫瘍の容積の変化を測定した。

【結果】

プロポフォール投与により、マウスの EL4 に対する CTL 活性は生食投与群、イントラリピッド投与群に比して有意に増強されたが、ミダゾラムにはこのような変化は認められなかった。プロポフォール、ミダゾラムは今回の投与量、投与期間では、体重、血漿蛋白濃度、脾細胞数に有意な影響は与えなかった。プロポフォール投与により、マウスでの EL4 腫瘍の容積の増大は生食投与群に比して有意に抑制された。

【考察】

今回の研究でプロポフォールがマウスにおける EL4 腫瘍の増殖を抑制し、腫瘍に対する CTL 活性を増強させることが明らかになった。プロポフォールが *in vitro* や *in vivo* での研究でインターフェロン-ガンマの産生を増加させるとの報告があるが、これが CTL 活性増加に関連している可能性がある。また栄養状態が免疫に影響を与えることはよく知られているが、今回我々が用いたプロポフォールやミダゾラムの投与量ではマウスの栄養状態に変化は認められなかった。従って今回認められた抗腫瘍免疫増強作用は、栄養状態を介したものではないと考えられた。大豆油が抗腫瘍免疫を増強するという報告があるが今回の研究でプロポフォールの溶媒であるイントラリピッド（大豆油を主成分）投与群による CTL への影響は認められなかった。今後の検討が必要であろう。

【結語】

プロポフォールはミダゾラムに比べ有意に EL4 腫瘍に対する CTL 活性を増加させた。またプロポフォールはマウスを用いた *in vivo* の実験においても有意に腫瘍の増殖を抑えた。従ってプロポフォールは抗腫瘍免疫に有益な効果をもたらす可能性があると考えられる。

審査の結果の要旨

本研究はマウス腫瘍細胞の系を用いて、麻酔鎮静薬であるプロポフォールとミダゾラムの抗腫瘍免疫に及ぼす影響を検討したものである。マウスにプロポフォールあるいはミダゾラムを投与したのち、脾臓を採取して *in vitro* で CTL を誘導したところ、プロポフォール投与により有意に CTL 活性の増強が認められた。また、マウス体内における腫瘍の増殖は、プロポフォール存在下で有意に抑制されることが示された。

臨床における近年の癌手術の件数の増加にはめざましいものがある。手術手技が患者の予後を左右することは当然であるが、同時に投与される麻酔鎮静薬も抗腫瘍免疫に影響するというを示した点で新しい知見を含んでおり、学位に値するものと考えられた。

【1469】

氏 名 (本 籍) 龍^{りゅう} 堯^{たか} 志^し (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 815 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Transplantation of newborn thymus plus
hematopoietic stem cells can rescue
supralethally irradiated mice論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 河本圭司

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、骨髓移植法 (bone marrow transplantation, BMT) は血液学的疾患 (白血病, リンパ腫, 再生不良性貧血など), 先天性免疫不全症, 自己免疫疾患, および悪性腫瘍などの難病に対する強力な治療法となりつつある。しかし, 強い副作用のため放射線量には限界があり, また放射線事故などで通常の致死量以上の放射線照射を受けた場合, 宿主には強い臓器障害が起こり従来の BMT では救命し得ない。我々は超致死量放射線照射 (supralethal irradiation, SLI) したマウスを作製し, 種々の時期: 成体, 新生児期, 及び胎児の造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 移植を行い, さらに同時期の胸腺移植を併用した群も作製し, その効果を調べた。

【研究方法】

実験 1: 通常 7.0 Gy が致死量である 6-8 週齢の雌 BALB/c マウス (H-2^d) に対し, 9.5 Gy 放射線照射し SLI マウスとした。次の日に 6-8 週齢の雌 B6 マウス (H-2^b) の骨髓細胞 (BMC), または同新生児期 (生後 48 時間内), あるいは同胎生 16 日の肝細胞 (HSCs として使用: newborn liver, NL; fetal liver; FL) を 1×10^7 経静脈的に投与した。同時に, 同時期の胸腺 (adult thymus, AT; newborn thymus, NT; fetal thymus, FT) を腎皮膜下に移植する群も作製した。また, 放射線腸管障害の軽減に関与する IL-7 と keratinocyte growth factor (KGF) の発現も各時期の胸腺において調べた。実験 2:

SLI マウスに NL を移植するとともに, IL-7^{-/-} NT を移植する群, IL-7 を単独投与する群, あるいは両者を併用する群も作成した。以降, 生存率, 体重, 腸管組織像, 及びリンパ球サブセットを調べた。

【結果】

実験 1: 7.0 Gy 照射マウスは通常の骨髓移植だけで 100 日以上生存を得ることができたが, SLI マウスは造血幹細胞だけではそのほとんどが 14 日以内に死亡した。しかし, NL+NT 移植群は 70 %が 100 日以上生存を示した。NL 単独移植群では, 著明な体重減少とともに強い腸管壊死が見られたが, NL+NT 移植群では軽減されていた。さらに, NL+NT 移植群では有意な CD4T 細胞の増加を認めた。各時期の胸腺のうち, IL-7 と KGF は NT において最も高い産生能を示した。実験 2: SLI マウスに NL 単独移植した群の生存率, 体重減少, 及び CD4T 細胞の増加は, IL-7^{-/-} NT の併用移植あるいは IL-7 投与によって改善したが, その効果は十分でなく, 両者の併用によりさらに強い効果が得られた。

【考察】

SLI マウスに対し, NT 移植を併用した造血幹細胞移植を行うと, 腸管障害の改善とともに長期生存が可能となった。その機構の一部に, NT の高 IL-7 産生能と, それに伴う早期の CD4T 細胞の誘導が関与している可能性がある。本方法は, 難治性疾患への骨髓移植の適応拡大や, 放射線事故への治療につながる可能性がある。

審査の結果の要旨

本研究では, 通常の骨髓移植では救命することが困難な超致死量放射線照射 (SLI) したマウスを作製し, 胸腺移植の併用効果について検討している。SLI マウスに新生仔肝細胞 (NL) と新生仔胸腺 (NT) を同時移植することで, 腸管壊死の改善が認められ, レシピエントマウスの長期生存が得られた。この機序の一部に NT の高 IL-7 産生能と CD4⁺T 細胞の誘導が関与している可能性を示している。本研究は, 難治性疾患や放射線事故など従来の骨髓移植では救命できない患者への骨髓移植の適応拡大に寄与するものといえる。以上より, 医学上価値ある研究であり, 学位に値すると認められた。

【1470】

氏名(本籍) 寺川直良(大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第816号

学位授与の日付 平成20年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Clinical Monitoring of Innate Cellular Immunity
of Monocytes/Macrophages by Tumor Necrosis
Factor Alpha Productivity in Whole Blood
Stimulated by Lipopolysaccharide in Patients
with Pancreatic Cancer

論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)上山泰男 (教授)高橋伯夫

論文内容の要旨

【背景】

脾臓癌患者で長期生存を得るには切除が唯一の治療法である。しかし発見時に切除術適応でないことが多く、手術症例でも再発し化学療法を必要とすることが多い。極めて予後不良である原因には免疫機能の低下も関与があり、治療時の免疫抑制状態の解明は予後改善のために極めて重要であると考えられる。今回我々は免疫担当細胞のひとつである単球・マクロファージのサイトカイン産生能に注目し、脾臓症例の全血を用いて周術期・化学療法施行時における lipopolysaccharide (LPS) 刺激下 tumor necrosis factor (TNF)- α 産生能の変化を検討した。TNF- α 産生能は SEK-5001 システムを用いて測定した。SEK-5001 システムでは全血を用いて、低用量 LPS (100 EU/ml) を汚染が少ない閉鎖系システムでの刺激が可能である。しかも4時間だけの刺激で測定可能である。

【対象・方法】

脾臓 $n=39$ 、切除施行 16 例 (PC-Op 群)、化学療法施行 23 例 (PC-Chemo 群)、肝細胞癌 $n=27$ 、(切除症例 <HCC 群>)、良性疾患 ($n=15$ <コントロール群>) の合計 81 例を対象とした。切除手術施行例、化学療法施行例に分けて全血の TNF- α 産生能を検討した。

1. PC-Op 群、HCC 群、コントロール群の各群の術前の TNF- α 産生量、単球数を比較した。CD4/8

比や免疫機能として臨床応用されているナチュラルキラー (NK) 活性値、リンパ球幼若化反応も比較した。周術期を比較するため、術後の測定値の術前値に対する比を s-index と定義し TNF- α s-index と単球 s-index の周術期の変化を比較検討した。

2. 切除不能脾臓の化学療法施行前、施行中 2 回/週の採血を行った。化学療法後の測定値と化学療法前との比を c-index と定義した。TNF- α 産生量、単球数、リンパ球幼若化反応も測定し c-index の経時変化をみた。化学療法施行前には CD4/8 比、NK 細胞活性も測定した。化学療法施行時の白血球減少と TNF- α 産生能の関連を検討した。化学療法開始後、早期 (7 日目まで) に TNF- α c-index が増加傾向を示したかで、増加群・減少群の 2 群に分けそれぞれの治療前の背景、生存曲線を比較検討した。

【結果】

1. 切除症例

PC-Op 群、HCC 群、コントロール群の術前 TNF- α 産生量は各々 7.3 ± 0.5 , 9.7 ± 1.0 , 10.1 ± 1.3 ng/ml で PC-Op 群が有意に低値を示していたが ($p < 0.05$)、単球数に有意差は認めなかった。CD4/8 比や NK 活性値、リンパ球幼若化反応に有意な差は検出されなかった。PC-Op 群の TNF- α s-index では術後 1 日目に有意に低値を示し術後 7 日目までに回復した。一方、HCC 群では術後 TNF- α s-index 高値を示す傾向があった。2 群間の比較において、PC-Op 群では HCC 群と比較して有意差をもって低かった ($p < 0.05$)。両群とも単球 s-index に有意な変化は認めなかった。

2. 化学療法症例

23 例中 8 例に化学療法施行後に白血球数の減少 ($< 2000/\mu\text{l}$) を認めた。そのうち 7 例は TNF- α c-index が 0.3 以下に低下し、白血球減少と相関していた ($p < 0.01$)。7 例とも TNF- α c-index 低下時期は白血球減少時と同日または早期であった (平均: 化学療法施行前 4.75 日)。一方で単球数やリンパ球幼若化反応の c-index に有意な変化はなかった。化学療法開始後 7 日目までに TNF- α c-index が増加傾向を示した症例 ($n=10$) は、増加傾向のなかった症例 ($n=13$) より有意差をもって生存率が高かった ($p < 0.03$)。両群間の治療前の単球数、CD4/8 比、NK 活性に有意差はなかった。また年齢、性別、遠隔転移の有無、放射線照射併用、抗

癌剤の種類などの患者背景にも両群間に有意差はなかった。

【考察】

脾癌症例の TNF- α 産生能は低下していた。脾癌症例の周術期には、単球・マクロファージの TNF- α 産生能からみた免疫機能が低下していた。TNF- α 産生能は他の免疫機能検査と比較して鋭敏に反応した。

化学療法施行時に TNF- α 産生能は白血球数よりも早期に、また鋭敏に化学療法施行時の免疫能低下を現すことが示唆され、抗癌剤の副作用を早期に発見できる可能性がある。また TNF- α 産生能から見た免疫機能が化学療法後早期に回復した症例は、良好な生存率を有し、抗癌剤の効果判定の 1 つの指標になりうると考えられた。

【結語】

低用量 LPS 刺激による単球・マクロファージからの TNF- α 産生能の測定は脾癌治療中患者の免疫機能の評価法としての有用性が示唆された。

審査の結果の要旨

脾癌患者治療時の免疫抑制を解析するため、全血を用いて、単球機能を lipopolysaccharide 刺激下の tumor necrosis factor- α (TNF- α) 産生能により検討した臨床研究である。単球機能は担癌自体で低下しており、開腹手術によりさらに低下すること、これは化学療法時には免疫抑制の増悪を鋭敏に反映し得ること等を明らかにしている。脾癌患者での治療による免疫抑制の変化の解析に加えて、TNF- α 産生能の測定の免疫機能の評価法としての有用性を明らかにしている。博士号に値する。

【1471】

氏名(本籍) ^{いし}石 ^{ざき}崎 ^{もり}守 ^{ひこ}彦 (兵庫県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 817 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Protective effect of FR183998, a Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, and its inhibition of iNOS induction in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats

論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)伊藤誠二 (教授)上山泰男

論文内容の要旨

【研究目的】

肝臓外科領域において、肝阻血法等により安全な手術が行われるようになったが、肝虚血再灌流障害は術後合併症発症の重要なリスクファクターとして挙げられており、特に肝移植においては、グラフト肝不全の重要な要因の一つとして考えられている。肝虚血再灌流障害の病態生理やメカニズムに関して多くの研究が行われているが、臨床的にはその軽減策や保護法は未だ十分とは言えない。近年、Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE) 阻害により、心筋細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を抑制しラットの心虚血再灌流障害を改善すること、ブタの虚血再灌流脾においても NHE により障害が改善することが報告されている。また、ラットの虚血再灌流肝においても、NHE 阻害により肝における ATP 低下の抑制を介して障害が改善することが報告されている。NHE 阻害により、ラット心虚血再灌流障害モデルにおける病的好中球活性の抑制、炎症性サイトカイン産生の抑制、ラビット心不全モデルにおける iNOS 誘導の抑制などの報告もある。そこで今回、ラット肝虚血再灌流障害における NHE 阻害剤 (FR183998) の生体保護効果を、虚血再灌流肝における病的好中球活性、炎症性サイトカインの産生、および iNOS 誘導等に着眼し、検討を行った。

【研究方法】

7 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットに

FR183998 (1 mg/kg) を静脈内投与した群 (投与群) と、生理食塩水を投与した群 (対照群) とに分けた。投与 10 分後に 70% 領域の肝虚血を 120 分間行い、再還流後、経時的に血液と肝組織を採取した。血液から、血清中の AST, ALT, LDH, T-Bil, および NO 値、血漿中の PT 値 (%), APTT, Heparin test (HPT) 値の測定を行った。血液および肝組織から、サイトカイン値の測定を行った。肝組織から、iNOS 蛋白量, iNOS mRNA 量, iNOS gene antisense-transcript 量, NF- κ B 量の測定を行い、病理組織検査として、HE 染色, TUNEL 染色, ナフトール ASD 染色を行った。

【結果】

対照群では再灌流後 9 時間をピークに血清 GOT, GPT, LDH 値、血漿 APTT 値が上昇したが、投与群では全て有意に低下し、血漿 PT 値 (%), HPT 値の低下も有意に抑制された。病理組織検査では、対照群に比べ投与群で肝壊死、アポトーシス、病的好中球浸潤の割合が、再灌流 6~9 時間後において有意に低下した。血清および肝における炎症性サイトカイン値 (TNF- α , IL-6, IFN- γ , CINC-1) は対照群で上昇したが投与群で有意に低下し、抗炎症性サイトカイン値 (IL-10) は対照群で低下したが投与群で有意に上昇した。血清 NO 値は両群とも上昇したが、再灌流 24 時間後において投与群で有意に低下した。肝組織中の NF- κ B 量は再灌流 1~6 時間後において対照群で上昇したが投与群で有意にこの上昇が抑制され、iNOS 蛋白量も対照群で上昇したが再灌流 6~12 時間後において投与群で有意に抑制された。さらに肝組織中の iNOS mRNA 量は対照群で上昇したが、再灌流 9~12 時間後において投与群で有意に抑制された。iNOS mRNA を安定化する iNOS gene antisense-transcript 量も対照群で上昇したが、再灌流 9~12 時間後において投与群で有意に抑制された。

【考察】

今回の研究で、NHE 阻害剤である FR183998 は、ラット肝虚血再灌流障害モデルにおいて肝障害を抑制した。そのメカニズムとして、FR183998 投与により虚血再灌流肝での NF- κ B 活性、iNOS mRNA の発現、iNOS gene antisense-transcript の発現を抑制した事で、血清および肝での炎症性サイトカインの産生や肝での iNOS 蛋白の産生を抑

制した事が一因と考えられた。

審査の結果の要旨

肝虚血再灌流障害の病態生理やメカニズムについて多くの研究がなされているが、この障害を軽減する方法は確立されていない。本研究は Na⁺/H⁺ 交換輸送体阻害剤に肝虚血再灌流障害時の肝障害軽減効果及び生体保護効果があること、本阻害剤が病的に上昇している肝組織内及び生体内での炎症性サイトカインの産生をおさえ、肝の NF- κ B 活性化や iNOS mRNA の発現を抑制すること等により、これらの保護効果をもたらしていることを明らかにしている。博士号に値すると認められた。

【1472】

氏 名 (本 籍) 齊 藤 幸 子 (京都府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 818 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

The corpus callosum in obsessive-compulsive disorder: a diffusion tensor imaging study

論文審査委員 主査 (教授) 中村加枝

(教授) 木下利彦 (教授) 澤田 敏

論文内容の要旨

【はじめに】

強迫性障害は、煩わしい考えや行為が反復的に出現する慢性的な不安障害である。このため、強迫性障害患者は、自らの症状について過剰で不合理であるという洞察を有しているが、その多くが社会適応に問題点を有している。また、強迫性障害の 6ヶ月有病率は 1~2 パーセント、生涯有病率は 2~3 パーセントと高率で、決してまれな疾患ではなく、重症になると、入浴や排泄にすら長時間を要し、患者は日々苦痛に苛まれる。治療としては認知行動療法と薬物療法の併用療法が推奨されており、海外においては難治例に対して、帯状回切除術が施行されることもある。

今日までの研究で、強迫性障害で障害される脳の部位は、単一ではなく、前頭葉眼窩皮質や皮質下構造、およびこれらの領域を結ぶ神経回路網であるとされてきた。しかし脳機能画像研究の多くは、独立した部位の異常を検出するにとどまり、回路網を構築している白質線維連絡の異常を検出する報告は散見されるのみであった。

このため我々は、本研究で、眼窩前頭葉皮質下回路の白質線維連絡の異常を検証する目的で、MRI における拡散テンソル解析法を用いて、強迫性障害における脳画像研究を実施した。

【研究方法】

対象患者は、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition (DSM-IV) の診断基準に基づき、選出した強迫性障害患者 16 名で、対象患者の年齢は 16 歳以上 47 歳以下であった (28.7 ± 9.8 歳)。本研究の内容を十分に理解し、同意の得られた患者 (男性 7 名と女性 9 名) と、16 名の健常被験者 (男性 7 名と女性 9 名) (29.9 ± 9.0 歳) のテンソル MRI 画像を撮像した。

患者の強迫症状の重症度は、Yale-Brown 強迫観念・強迫行為評価尺度 (Y-BOCS) (26.0 ± 5.3 点) を用いて評価した。強迫症状に付随して生じてくることが予測される抑うつ症状の重症度は、Hamilton Depression Scale (HAM-D) (5.3 ± 2.7 点) を用いて評価した。

MRI 装置は、1.5 Tesla の GE Signa Horizon LX を用い、前交連および後交連を結んだ線 (AC-PC line) に平行な水平断面について spin-echo type single-shot echoplanar sequence (TR 2000 ms, FOV 24×24 cm, マトリックス 128×128 , 加算回数 4 回, 4 mm slice thickness) の条件下で、 1000 s/mm^2 の拡散検出傾斜磁場を印加して拡散強調画像を得た。用手 ROI 法にて、テンソル解析を行い、Fractional Anisotropy (FA) と Mean Diffusivity (MD) 値とを算出した。

ROI は、脳梁の 5 つの部位 (rostrum, genu, rostral body, isthmus, splenium) に設定し、ROI の大きさは $2 \times 2 \text{ mm}$ とした。

【結果】

16 名の強迫性障害患者と 16 名の健常者について、脳梁の 5 つの部位における、FA 値と、MD 値を得た。患者と健常者間の FA 値に有意差が認められた脳梁部位は、眼窩前頭葉から投射を受ける

rostrum (患者の FA 値, 健常者の FA 値, P 値: 0.55 ± 0.07 , 0.69 ± 0.06 , $P < 0.001$) のみであった。他の 4 部位の FA 値は以下のとおりで、患者と健常者間の FA 値に有意差を認めなかった。(部位: 患者の FA 値, 健常者の FA 値, P 値, genu: 0.80 ± 0.07 , 0.81 ± 0.09 , $P = 0.70$, rostral body: 0.68 ± 0.08 , 0.70 ± 0.06 , $P = 0.46$, isthmus: 0.69 ± 0.08 , 0.73 ± 0.07 , $P = 0.06$, splenium: 0.87 ± 0.10 , 0.86 ± 0.08 , $P = 0.74$)。MD 値については、全ての脳梁部位で、患者と健常者間に有意差を認めなかった。また、患者の rostrum における FA 値と、強迫症状の重症度の指標である Y-BOCS 値が逆相関を示した ($r = -0.72$, $p = 0.002$)。

【結語】

拡散テンソル画像解析法は、水分子のブラウン運動の情報をもとに、テンソル楕円体の概念を応用したもので、生体内における水分子の拡散の偏り、すなわち「拡散異方性」の視覚化や定量化を可能とし、白質線維における器質的異常の検出に鋭敏である。制限の無い空間において水分子は三次元的に拡散するが、脳白質神経線維内ではミエリン鞘の細胞膜が水分子の拡散を制限するため、物質は神経線維に直行する方向に比べて、平行な方向により大きく拡散する。このように方向によって拡散が異なることを拡散異方性と称され、拡散異方性は、ミエリンの損傷や軸索の変性などにより影響を受けるとされている。

我々は、強迫性障害患者における白質線維連絡に着目し、拡散テンソル画像解析を用いて、今日までに提唱された強迫性障害の神経回路網の異常を検出するべく研究を進め、神経回路網の障害の程度が、臨床症状の重症度と関連するという結果を得た。将来この研究も含めた神経科学的脳画像研究が、強迫性障害の病態解明の一端を担うにとどまらず、強迫症状に苦しむ多くの患者の診断や治療指針に貢献していくものと考えられる。

審査の結果の要旨

MRI 拡散テンソル解析法を用いて、強迫性障害における眼窩前頭葉皮質下回路の白質線維連絡の異常を検証した。健常者と比較し患者では、眼窩前頭葉から投射を受ける脳梁の rostrum に限局して有意な FA 値の低下が認められ、その変化は臨床症状の重症度と相関していた。本研究は強迫性

障害における神経回路網の異常を示唆するとともに、拡散テンソル画像解析の強迫症状の病態解明・診断や治療指針における有用性を示している。学位に値すると認められた。

【1473】

氏 名 (本 籍) 岡 崎 智 (愛媛県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 819 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Successful Acceptance of Adult Liver Allografts
by Intra-Bone Marrow-Bone Marrow
Transplantation

論文審査委員 主査 (教授) 岡崎和一
(教授) 池原 進 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

以前われわれは、胎仔あるいは新生仔の肝移植の際に同系の骨髄細胞を静脈内に移植すると、免疫抑制剤を使用しなくても移植片が生着することを報告した。しかし、臨床では骨髄と肝臓を同じ成人のドナーから採取し移植する人が多いと考えられる。

最近、我々は骨髄移植を行う時に骨髄内骨髄移植 (Intra-bone marrow-bone marrow transplantation; IBM-BMT) を行った場合、通常の静脈内 (IV-BMT) への骨髄移植と比較して早期に造血能が回復すること、また放射線照射を分割で行うことにより腸管に対する傷害が軽減できることも見出し報告した。

今回、放射線分割照射した 8 から 10 週令のマウスに同週令のアロの肝臓組織を移植し、おなじドナーの骨髄細胞を IV-BMT あるいは IBM-BMT で移入し、肝生着に及ぼす効果を比較検討した。

【研究方法】

①骨髄細胞移植

8週から10週令のBALB/cマウスから骨髄細胞を採取し、 1×10^7 個の細胞を放射線 1 回照射、ある

いは4時間間隔で2回分割照射したC57BL/6マウスにIV-BMT法あるいはIBM-BMT法で移入した。なお分割照射では 5×10^6 個のドナー細胞移入群も作成した。

②腎皮膜下への肝移植

8週から10週令のBALB/cマウスから肝臓を取り出し米粒大に細切した後、コラゲナーゼで処理し、BMTを施行したレシピエントマウスの左の腎皮膜下に移植した。

③解析方法

各群において生存率の評価を行い、また、移植後8週目に末梢血を採取し、抗H-2抗体を用いてキメリズムの評価を行った。さらに各組織を採取し抗H-2抗体、及びCD4/CD8、Gr-1/Mac-1、B220、TER-119抗体で重染色し、ドナータイプへの置き換わりについて検討した。移植片の評価はH-E染色、マッソン染色、渡銀染色、抗アルブミン抗体による免疫染色、PAS染色を行った。また電子顕微鏡による微細構造の観察も行った。

免疫能の評価としてはMixed lymphocyte reaction (MLR) や、脾細胞中のサイトカインをIBM-BMT群とIV-BMT群で比較検討した。

【結果】

① 9.5 Gy 及び 8.5 Gy 1 回照射群ではともに IBM-BMT 法の方が IV-BMT 法より生存率も高く、ドナー骨髄細胞、肝細胞の生着もよい結果であった。一方 7.5 Gy 照射群では殆どのマウスが生じたが、IV-BMT 法でも IBM-BMT 法でも生着は認められなかった。1 回照射群と同じ細胞数 (1×10^7 個) の骨髄を移植した分割照射群では 2 ヶ月後すべてのマウスが生じ、4.5 Gy $\times$ 2 照射群では IBM-BMT 法の方が IV-BMT 法よりドナー骨髄細胞の生着がよい結果が得られた。また、移植する骨髄細胞数を半分にしても IBM-BMT 法の方が IV-BMT 群より生存率が高かった。5 Gy $\times$ 2 照射群では IBM-BMT 群において約 65% のマウスでドナータイプへの置換を認め、肝細胞の生着も認められた。

② 移植後 2 週、4 週では移植手術による出血やリンパ球浸潤の像が移植肝にみられたため、肝細胞の生着の評価は 8 週目で行った。4.5 Gy $\times$ 2 照射群のドナー骨髄細胞生着群では肝の生着像を認め、骨髄細胞非生着群ではマッソン染色、渡銀染色にて拒絶され線維化した肝組織像

を認めた。抗アルブミン抗体免疫染色や PAS 染色を行ったところ、生着した肝臓では陽性所見を示した。電子顕微鏡の観察では、移植肝においても、正常肝と同様の構造を認め、微小胆管やグリコーゲンも確認できた。

- ③ 骨髓、末血、脾臓および、胸腺細胞を採取し、ドナータイプへの置き換わりをFACSにて解析した。肝の生着がみられないマウスでは、ドナータイプへの置き換わりが認められず、ドナー細胞であるBALB/cに対して強いリンパ球の増殖反応がみられた。一方、肝の生着がみられたマウスでは MLR でも tolerance が誘導されていた。移植 3 週目の脾臓の CD4 陽性細胞に占める IL-4、IL-10 産生細胞の割合は、IBM-BMT法の方がIV-BMT法よりも優位であった。また IL-2 は IV-BMT 法の方で優位であった。

【考察】

以上より、肝臓移植に、骨髓内骨髓移植と放射線分割照射を組み合わせることにより、従来の方法より低線量の放射線照射の前処置で、成獣（8-10 週令）マウスの肝細胞の生着が促進されることが明らかになった。放射線照射の前処置が軽減されることにより、腸管に対する放射線障害や、感染のリスク等が軽減され、生存率の改善につながったと考えられる。

また、骨髓移植を IBM-BMT 法で行うことで、IV-BMT 法と比較し Th-2 優位の状態を誘導できると考えられ、これがドナー細胞の生着促進に寄与していると推察できる。

審査の結果の要旨

アロの肝臓移植片の生着を促進のための基礎的研究である。本研究はドナーの骨髓細胞を静脈内に投与するのではなく、骨髓内に移植することにより生着率が上がることで、肝組織の移植前にレシピエントのマウスに低線量の放射線を分画照射することにより移植骨髓の細胞数を減量しても肝の生着が促進されること、肝移植片には構造的にも機能的にも正常肝と差異が認められないこと、tolerance が誘導されていること、等の結果を得ている。

この方法により放射線障害や感染リスク等の軽減による肝移植後の生存率の改善が得られることも明らかにしている。

この研究成果は博士号に値すると認められた。

【1474】

氏 名（本 籍）池 田 耕 造（大阪府）

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 番 号 甲 第 820 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Clinicopathologic study of small hepatocellular carcinoma with microscopic satellite nodules to determine the extent of tumor ablation by local therapy

論文審査委員 主査（教授）螺良愛郎

（教授）岡崎和一 （教授）上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

小肝細胞癌（HCC）に対する局所治療を施行後、画像診断上十分な壊死を獲得したと判断し治療を終了しても、治療部位に接した、あるいは治療部近傍に再発を認める症例が経験される。HCC の場合、主腫瘍周辺あるいは主腫瘍に接して画像診断では確認できない衛星結節（msn）が存在することが知られており、このような画像上確認できない衛星結節は局所治療の治療対象とはならないため、結果的に局所再発の大きな要因となる可能性がある。従って、局所再発の頻度を下げる一手段として、画像では確認できない腫瘍周囲の衛星結節を含めて壊死に至らしめる必要がある。つまり msn の存在を想定して腫瘍および腫瘍の最外縁からさらに非腫瘍部を含めた治療マージンを獲得しなければならない。今回我々は、肝癌切除標本を用い、腫瘍サイズ、腫瘍分化度、腫瘍 vascularity を基に局所治療においてどの程度の治療マージンを獲得すべきか検討した。また、経皮的マイクロ波治療（PMCT）が施行された症例に於いて、治療マージン（5 mm）の有無別に局所再発の頻度を検討した。

【研究方法】

対象は、腫瘍径 3 cm 以下で 1 cm 以上の surgical

margin を持って切除された小肝細胞癌 117 例. 全ての症例で術前の画像診断上 msn は認められなかった. 主腫瘍の組織学的分化度, 線維性被膜の有無, 被膜内浸潤の有無, msn の有無を評価するとともに, msn を認めた場合, マイクロメータを用い腫瘍最外縁と msn 最外縁までの最長距離 (msn の最大径を含む) と msn の最大径を測定した. PMCT 症例は 1997 年から 2002 年までに PMCT が施行された腫瘍径 3 cm 以下, 単発 (画像診断上) の 116 例を対象とした. これら症例の腫瘍はすべて腫瘍濃染を認め, PMCT 前にリピオドールを用いた TACE が施行されており, リピオドールが均一に腫瘍部に集積した症例を対象とした. マージンの測定は Dynamic CT でリピオドール集積の最外側縁より, 不染低濃度域の最外側縁までの距離を数カ所測定し, 最も短い距離を治療マージンとした. Dynamic CT にて不染域となった部位, 不染域に接した部位あるいは不染域近傍 (不染域から 1 cm 以内の距離) に再発を認める場合を局所再発とし, 治療マージン 5 mm 以下群, および治療マージン 5 mm 以上群の 2 群にて治療後 3 年間の局所再発の頻度を retrospective に検討した.

【結果】

径 2 cm 以下の腫瘍に於いて腫瘍分化度別に msn の頻度及び距離は, 高分化型 (n=16) ; 1 (6.2%), 1.4 mm ; 中分化型 (n=46) ; 5 (19.2%), 5.8±1.2 mm ; 低分化型 (n=4) ; 1 (25.0%), 4.8 mm ; であった. 腫瘍径 2 cm 以上 3 cm 未満の腫瘍に於いては高分化型 (n=11) ; 3 (27.2%), 3.5±2.2 mm ; 中分化型 (n=36) ; 6 (16.7%), 5.4±1.4 mm ; 低分化型 (n=4) ; 1 (25.0%), 4.9 mm であった. vascularity を認めた 112 結節の内, 17 結節に msn を認めた. vascularity を確認できない 5 結節では msn を認めなかった. PMCT 症例の内治療マージンが 5 mm 以下の場合, 腫瘍径 2 cm 以下では 25 例の内 2 例が, 腫瘍径 2 cm 以上 3 cm 未満の場合には 25 例の内 3 例が局所再発を来した. 5 mm 以上の治療マージンが確保された場合, 腫瘍径 3 cm 未満の症例で局所再発を認めなかった.

【考察】

本研究では, 小肝細胞癌に対する局所治療において, vascularity 陰性腫瘍では治療マージン確保 (マージンの幅は問わない) を目指し, vascularity 陽性腫瘍では治療マージン 1 cm (5 mm 以上) を

確保することにより, 局所再発の頻度を下げる可能性が示唆された.

審査の結果の要旨

小肝細胞癌に対する局所治療の治療成績の向上のためには, 肝細胞癌の主腫瘍周辺あるいは主腫瘍に接して画像診断では確認できない微小衛星結節 (msn) の治療が大変重要であるが, 確実な凝固範囲の設定方法は確立されていない. 本研究は, 117 例の切除単発肝細胞癌の病理標本を用いて主腫瘍と msn の距離を計測し, 5 mm 以上の治療マージンを確保することにより, 局所再発を予防できる可能性を示唆したことより, 学位に値すると考えられた.

【1475】

氏名 (本籍) ^{あん}安 ^{どう}藤 ^{ゆう}祐 ^ご吾 (大阪府)

学位の種類 博士 (医学)

学位番号 甲 第 821 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 31 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery from 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)-Induced Colitis in Rats

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭

(教授) 池原 進 (教授) 岡崎和一

論文内容の要旨

【はじめに】

炎症性腸疾患難治例では高度の腸管粘膜欠損がみられ, 粘膜再生障害が病態の遷延化に関与している可能性がある. 近年, 脂肪組織中にさまざまな組織へと分化する可能性を持った脂肪組織由来幹細胞 (以下 ADSCs) が, 幹細胞のソースとして注目されている. ADSCs は細胞表面マーカーおよび細胞増殖能, 多分化能など, 骨髄間葉系幹細胞と非常に類似した性質を持っており, 現在, 骨再生や血管再生などの臨床研究も進められている. 本研究においては皮下脂肪組織由来幹細胞を

用いて、腸管粘膜再生に利用可能か腸炎モデル動物を使って検討した。

【研究方法】

ラット皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼにて ADSCs を分離し、5%FBS 添加 IMDM にて 1ヶ月培養の後、骨、神経、脂肪、上皮へとそれぞれ分化誘導培地を用いて分化誘導を行い、多分化能を調べた。また、培養液中の HGF, VEGF, TGF- β , adiponectin や、炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-8) を ELISA 法にて測定し、粘膜再生および炎症性細胞への関与を検討した。さらに、クローン病の動物モデルとして確立された TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid) 大腸炎モデルを作成し、ADSCs を大腸粘膜下に局所注入し、腸粘膜への再生分化の可能性を検討した。

【結果】

今回行った実験により、ADSCs は多系統の成熟細胞へと分化する可能性が示された。また、ADSCs から大量の HGF, VEGF および adiponectin の産生が認められ、その作用により創傷治癒を促進させる可能性が考えられた。さらに、*in vivo* の実験において、ADSCs は傷害をうけた腸粘膜の再生を促進する働きが観察され、腸管局所に注入された ADSCs は腸管全層に分布し、一部は線維芽細胞や平滑筋細胞、脂肪細胞へと分化したことが確認された。ただし、腸管上皮や血管内皮細胞、神経細胞への分化は確認されなかった。

【考察】

今回、我々がラットの皮下脂肪組織から分離培養した ADSCs は、FACS analysis により CD90⁺CD45⁻の細胞群で、これらの細胞群は骨髄由来間葉系幹細胞の細胞表面マーカーと類似しており、また、多系統の細胞へと分化する多分化能を有し、骨髄由来間葉系幹細胞と非常に類似した細胞群であることを明らかにした。また、ADSCs は大量の HGF や VEGF などの growth factor や adiponectin を分泌しており、これらの growth factor の働きである抗アポトーシス作用、上皮細胞増殖促進作用、血管新生促進作用により傷害粘膜の再生を促進したと考えられる。さらに、HGF や adiponectin の抗炎症作用により、組織中の IL-8 の分泌が抑制され、それにより、好中球の腸管局所への浸潤が抑制された結果として組織中 MPO 活性が抑制された可能性も考えられる。さらに、*in vivo* の実験で

は ADSCs による腸管粘膜再生促進作用が確認され、腸管局所に注入された ADSCs の一部は腸管支持組織へと分化したことが確認された。ただし、*in vitro* では神経や腸上皮への分化は確認されず、腸管局所への注入前に何らかの分化誘導を行う必要性が考えられた。

今回、我々が行った実験で注目すべき点は、ヒトにおける脂肪組織採取は形成外科領域では比較的安全で確立された手技であり、骨髄幹細胞と比べて一度に大量の ADSCs を採取できることである。骨髄間葉系幹細胞は一度の骨髄採取で獲得できる細胞数が限られており、実際に臨床応用するにあたっては、数週間培養する必要がある。しかし、ADSCs は一度に大量の細胞数を準備できることから、cell-based medicine として最適な細胞源と考えられる。今後の臨床応用に向けて、現在 ADSCs の腫瘍化の有無を確認している。

審査の結果の要旨

難治性疾患であるクローン病における腸管粘膜上皮の有効な再生治療法はなく、外科的切除を余儀なくされることが多い。本研究では、皮下脂肪組織由来幹細胞 (以下 ADSCs) の腸管粘膜再生での応用を目的に、*in vitro* と腸炎モデル動物を用いた *in vivo* 実験により検討した。*In vitro* 実験で ADSCs は細胞増殖能、多分化能などを持っていること、*in vivo* 実験では ADSCs の腸管支持組織への分化と腸管粘膜再生促進作用が確認された。以上より、クローン病の粘膜再生における ADSCs の可能性が示唆され、学位に値すると考えられた。

【1476】

氏名(本籍) ^{さか}坂 ^{ぐち}口 ^{ゆう}雄 ^{たく}沢 (大阪府)
 学位の種類 博士(医学)
 学位番号 甲第822号
 学位授与の日付 平成20年3月25日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 学位論文題目

The Wistar Bonn Kobori rat, a unique animal
 model for autoimmune pancreatitis with
 extrapancreatic exocrinopathy

論文審査委員 主査(教授) 堀良愛郎
 (教授) 池原 進 (教授) 岡崎和一

論文内容の要旨

【はじめに】

自己免疫性膵炎の病因・病態生理の解明には自己免疫性膵炎の主要自己抗体の検出や膵病変の進展様式の把握と、自己免疫性膵炎に類似した膵病変を発症する動物モデルを用いた研究が必須である。膵炎を自然発症する動物や推定される標的抗原で免疫した動物をモデルとした報告が散見されるが、われわれは WBN/Kob ラットを用い、自己免疫性膵炎自然発症動物モデルとして整合性を含め多角的に解析を加え、制御性 T 細胞も含めた自己免疫性膵炎の病因ならびに病態生理の解析、さらには骨髓移植による自然発症膵炎モデルの発症予防を試みた。

【研究方法】

動物は雌雄の WBN/Kob (RT1a:u), Wistar, Fischer 344 (F344:RT1a:1) ラットを用いた。骨髓移植に際し、移植前日に 5.0 Gy×2=10 Gy (4 時間間隔) の分割放射線照射をし、Fludarabine (50 mg/kg) を経静脈投与した。移植骨髓細胞はドナー F344 の脛骨・大腿骨より採取 (3×10⁷/30 μl) し、ホスト (雌雄 6 週齢 WBN/Kob ラット) の骨髓内に直接注入 (骨髓内骨髓移植) した。骨髓移植後、4・8・12・16 週に、血液及び膵臓・脾臓・涙腺・耳下腺を採取し、ホルマリン固定から HE 染色 (肝臓・腎臓・甲状腺)、Masson Trichrome/Sirius red 染色を行った。また固定切片から脱パラフィン、抗原賦活処理後、免疫抗体染色 (CD4, CD8, CD25, MHC classI/II, B220, CD11b, DAPI, PAN-B, IgG2b,

IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, foxp3) を施行した。移植 1, 2, 4, 9, 16 ヶ月後に生化学測定を行った。随時血糖値、血清アミラーゼ、血清総蛋白、ELISA 法にて IL-4, IL-10, IL-12 を測定し、血清電気泳動により γ-グロブリンのパターンを検討した。

【結果】

雄性 WBN/Kob ラットは自然発症慢性膵炎、膵性糖尿病モデル動物であるといわれているが、雌性 WBN/kob ラットでは慢性涙腺炎 (一部においては耳下腺炎) を発症し形態的にはシェーグレン症候群に類似した特長を有していた。また、20 ヶ月齢の WBN/Kob ラットにおいては、胆管・甲状腺・腎臓にもリンパ球浸潤を伴った慢性炎症像を認め、硬化性胆管炎・慢性甲状腺炎・間質性腎炎を合併した病態を呈し、近年提唱されている膵外病変を含む自己免疫性膵炎と酷似していた。慢性膵炎・涙腺炎発症部では CD8 陽性 T 細胞の浸潤と B 細胞からの特異抗体産生 (IgG2b) が認められた。末梢血中の制御性 T 細胞及び脾臓内 foxp3 の発現の減少も認め、自己免疫機序の破綻に伴う多臓器障害性の自己免疫性疾患モデルと考えられた。そこで自己免疫疾患の予防を目的としてアロの骨髓内骨髓移植を行ったが、移植群では膵炎・涙腺炎等認めず、形態的・機能的にも正常の像を呈し、末梢血中の制御性 T 細胞、脾臓内 foxp3 の発現も正常群のレベルを示した。

【考察】

WBN/Kob ラットの膵炎・涙腺炎発症経過や特異抗体の存在、血清 γ globulin の増加、全身性硬化性病変の合併など、近年、臨床において提唱されている自己免疫性膵炎と類似した点が多いが、骨髓内骨髓移植によって、免疫学的寛容破綻を再構築することによりこのラットに特異的な自己免疫性障害の発症を予防できることが明らかとなった。以上から WBN/Kob ラットは自己免疫機序の破綻に伴う多臓器障害性の自己免疫疾患モデルと考えられた。この研究は近年、臨床において報告されている自己免疫性膵炎及び合併疾患の治療や成因解明等に寄与し得るものと考ええる。

審査の結果の要旨

近年、新しい疾患概念として認められつつある自己免疫性膵炎の病因・病態生理の解明には動物モデルを用いた研究が必須である。本研究では

WBN/Kob ラットの膵炎・涙腺炎の発症経過, 特異抗体, 血清 γ globulin の増加, 全身性硬化性病変の合併などが, 自己免疫性膵炎患者に極めて類似していること, 更に骨髓内骨髓移植による免疫学的寛容破綻の再構築により, 発症を予防できることが明らかにされた. 以上より, 本研究は自己免疫性膵炎及び合併疾患の治療や成因解明等に寄与し, 学位に値すると考えられる.

【1477】

氏 名 (本 籍) ^{よし} ^だ ^{ひで} ^{ゆき} 吉 田 秀 行 (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 823 号
学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目

Edaravone prevents iNOS expression by inhibiting its promoter transactivation and mRNA stability in cytokine-stimulated hepatocytes

論文審査委員 主査 (教授) 岡崎和一
(教授) 伊藤誠二 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨**【目的】**

大量肝切除後重篤な感染症は, 肝障害を増悪し, 場合によっては多臓器不全を引き起こし死に至らしめる. フリーラジカル scavenger のエダラボン (3-methy-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) は, 様々な臓器の虚血再灌流障害において強い保護効果を示す. ラット肝切除後エンドトキシン血症モデルにおいて, エダラボンが種々の炎症性サイトカインとともに誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現誘導を抑えることにより, 肝臓障害を軽減することが報告されている. 炎症性サイトカインやエンドトキシンによって誘導される iNOS は多量の一酸化窒素 (NO) を産生する. この NO の産生誘導は肝移植や肝切除時の虚血再灌流障害因子の一つとしてもよく知られている.

肝細胞の iNOS 誘導は I κ B キナーゼおよび phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt の 2 つの

シグナルを介して, 阻害タンパク質 I κ B の分解と転写因子 NF- κ B の活性化 (核移行) により誘導される. *In vivo* の研究より, エダラボンは NF- κ B の活性化を阻害するところまでは明らかになってきた. しかし, 肝細胞においてエダラボンが iNOS/NO の誘導・産生にどのように関与しているかその詳細なメカニズムは不明である. 本研究では培養肝細胞の系を用いて, エダラボンの iNOS 遺伝子発現に対する抑制メカニズムを追求した.

【方法】

雄性 Wistar ラット (200~220 g) からコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し, 初代単層培養系 (10⁶ cells/35 mm dish) を調製した. 炎症性サイトカイン interleukin-1 β (IL-1 β , 1 nM) 刺激による iNOS/NO 産生誘導およびその関連シグナルに対するエダラボン (三菱ウェルファーマ) の影響を検討した. NO 値 (NO₂⁻) は Griess 法で測定し, iNOS, 阻害タンパク質 I κ B, I 型 IL-1 receptor (IL-1RI) は Western blot, iNOS, I κ B および IL-1RI の mRNA は Northern blot, NF- κ B 活性化は electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で検討した. また, iNOS promoter-luciferase constructs を transfection し, promoter 活性および mRNA 安定化活性に対する効果をみた. iNOS gene antisense-transcript (アンチセンス転写物) は RT-PCR で検討した.

【結果】

エダラボンは IL-1 β 刺激下の培養肝細胞での NO 産生を時間および濃度依存性に抑制した (最大阻害は約 80%; 0.6 mM). iNOS 誘導もタンパク質と mRNA の両レベルで阻害した. I κ B キナーゼを介した I κ B の分解に対して, エダラボンは I κ B α の分解後の回復を促進した. これは I κ B α の mRNA レベルの増加に由来した. エダラボンは NF- κ B の活性化に対しても阻害を示し, 核画分の Western blot 分析からも NF- κ B サブユニット p65 の核移行阻害が確かめられた. 一方, PI3K/Akt シグナルでもエダラボンは Akt の活性化 (リン酸化) を阻害し, IL-1RI の mRNA およびタンパク質の増加を抑制した. Transfection 実験より, エダラボンは iNOS promoter 活性を阻害するとともに, 転写後の 3'-untranslated region (3'-UTR) を介した iNOS mRNA の安定化も阻害することが明らかとなった. さらにエダラボンは 3'-UTR を介した mRNA 安定化に

関与する iNOS 遺伝子のアンチセンス転写物の発現を抑制した。

【考察】

肝細胞において、エダラボンは I κ B キナーゼの I κ B/NF- κ B 活性化と PI3K/Akt の IL-1RI 増幅を阻害することにより、iNOS promoter 活性とその mRNA の安定化を阻害し、iNOS 遺伝子の発現誘導を抑制したと考えられる。*In vivo* および *in vitro* の研究より、エダラボンは iNOS mRNA の合成と安定化の両段階で iNOS 誘導を阻害することが明らかになった。以上より、エダラボンはサイトカインの発現・誘導のみならず iNOS 誘導を抑制することにより肝障害の保護に関与していると考えられ、肝虚血再灌流障害や感染症による肝障害の増悪に対する治療薬として今後期待される。

審査の結果の要旨

フリーラジカル scavenger, エダラボンは肝切除後エンドトキシン血症ラットで NO、炎症性サイトカインの産生抑制、肝組織で iNOS の発現誘導を抑え、肝機能及び、生体保護効果を有するが、このメカニズムを培養肝細胞レベルでさらに細詳細に検討している。エダラボンは IL- β 刺激下の培養肝細胞で NF- κ B の活性化、PI3K/Akt シグナルでの Akt 活性化、iNOS promoter 活性、3'-UTR を介した iNOSmRNA の安定化等を阻害することを明らかにしている。フリーラジカル、NO が関与する肝障害の増悪に対する本薬剤の治療薬としての可能性を示唆するデータを得ている。博士号に値すると認められた。

【1478】

氏名(本籍) ^{さい}斎 ^{とう}藤 ^{たか}隆 ^{みち}道 (京都府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第824号

学位授与の日付 平成20年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Protective Effect of Fibronectin for
Endotoxin-Induced Liver Injury after Partial
Hepatectomy in Rats

論文審査委員 主査(教授)伊藤誠二
(教授)岡崎和一 (教授)上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

肝細胞癌、肝門部胆管癌、胆嚢癌などでは、時に大量肝切除術が必要となる。大量肝切除では肝実質細胞および網内系細胞の減少に伴い種々の合併症を引き起こす可能性が高い。中でもエンドトキシン血症は高率に発症し、術後合併症や死亡率の重要な因子となる。肝切除後エンドトキシン血症のメカニズムとして tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β) 等の Kupffer 細胞由来の炎症性サイトカインの関与が指摘されている。Fibronectin (Fns) は細胞外マトリクスに存在する糖タンパクであり、細胞癒着、止血、創傷治癒などの過程に関与している。また Fns は人間や哺乳類における免疫反応にも関与することが報告されている。さらに血漿 Fns 欠損マウスにおいては神経のアポトーシスが増加し、一過性脳虚後の梗塞範囲が広がる傾向にある。Fns には血漿 Fns と細胞 Fns が存在し、肝細胞では血漿 Fns が産生されている。今回肝切除後エンドトキシン血症モデルにおける血漿 Fns の肝保護効果を検討した。

【研究方法】

SD 系雄性ラット(体重 250 ~ 300 g)を用い 70% 肝切除を施行、48 時間後に lipopolysaccharide (LPS, 1.5 mg/kg) を陰茎静脈より投与した。LPS 投与 30 分前に凍結血漿より精製したヒト血漿 Fns を静脈内投与した。Fns は異なるマウスにそれぞれ 50, 100, 200 mg/kg を静脈内に投与した。Control 群にはウシ血清アルブミン (200 mg/kg) を静脈内

投与した。LPS 投与後、以下の項目を測定した。

(1) Fns 投与後 4 日までの生存率、(2) Fns 投与 6 時間後の血液生化学データ (AST, ALT, LDH, T. Bil) の測定、(3) Fns 投与後 1, 2, 4 時間後の残存肝組織中炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , cytokine-induced neutrophil chemoattractant; CINC) 濃度の測定、(4) Fns 投与後 9 時間後の残存肝組織の病理組織学的検討

【結果】

肝切除後エンドトキシン血症モデルにおける Fns 投与群の生存率は control 群に較べ有意に良好であり、LPS 投与後 4 日後の生存率は Fns 投与群 (100 mg/kg) では 70% が生存したが、control 群では 48 時間以内にすべて死亡した。Fns 投与量の違い (100 or 200 mg/kg) では死亡率に大きな差は認めなかった。LPS 投与 6 時間後の血清 AST, ALT, LDH, T. Bil 値は Fns 群において低値を示した。血清 AST, ALT, LDH, T. Bil 値は有意に投与量依存性に低下した。TNF- α , IL-1 β , CINC 等の炎症性サイトカイン濃度は Fns 群では血清および肝組織中で有意に低値を示した。病理組織学所見においては LPS 投与後見られた肝組織の出血、炎症性壊死、アポトーシスなどの炎症性変化が Fns 投与にて抑制された。

【考察】

肝切除後の短期間内死亡率は比較的高く、早期死亡の原因にはエンドトキシン血症や重篤な感染症の関与が重要な因子となる場合が多い。大量肝切除後に重篤な感染症を合併しやすい原因として、肝内局在の Macrophage である Kupffer 細胞が肝切除後に易刺激状態となる事が指摘されている。すなわち、肝切除後の残肝組織において、Kupffer 細胞上の LPS の受容体である toll-like receptor IV の発現が増加するとされている。エンドトキシンにより活性化された Kupffer 細胞は、TNF- α , IL-6, IL-1 β などの炎症性サイトカインや活性酸素、一酸化窒素等を産生し肝臓をはじめとする多臓器の重篤な機能障害を引き起こす。この肝切除後エンドトキシン血症モデルにおいて Fns は残存肝での炎症性サイトカイン産生抑制、肝細胞壊死およびアポトーシスを阻害しており、Fns は敗血症、エンドトキシン血症での肝保護作用、生体保護効果をもたらすと考えられた。

審査の結果の要旨

Fibronectin (Fns) は細胞外マトリクスや血漿に存在する糖タンパクで細胞癒着、止血、創傷治癒、免疫反応等に関与する。本研究では肝切除後エンドトキシン血症モデルにおいて、Fns が血中、肝組織中での TNF- α , IL-1 β , CINC 等の炎症性サイトカインの上昇や残存肝組織での出血、炎症性壊死、肝実質細胞のアポトーシス等の炎症性変化を抑制するなどの作用により、肝保護、生体保護をもたらしていることを明らかにした。肝細胞で産生される血漿 Fns の新しい作用、生体への効果を見出した本研究は博士号に値すると考える。

【1479】

氏 名 (本 籍) ^み三 ^{やけ}宅 ^{たかし}岳 (香川県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 825 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目

Prevention of graft-versus-host disease by
intrabone marrow injection of donor T cells:

Involvement of bone marrow stromal cells

論 文 審 査 委 員 主査 (教授) 藺田精昭

(教授) 池原 進 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

骨髄移植 (BMT : bone marrow transplantation) は、種々の造血系疾患・先天性免疫不全症・遺伝性代謝疾患を治療する上で欠かせない治療法であるが、その際に合併症として生じる移植片対宿主病 (GvHD : graft-versus-host disease) は、生命予後に対し危険因子である。我々は骨髄内骨髄移植法 (IBM-BMT : intra-bone marrow-bone marrow transplantation) を開発し、従来の経静脈的骨髄移植法 (IV-BMT : intravenous-bone marrow transplantation) と比べ、ドナー細胞の生着が促進され、ドナー特異的トレランスの誘導も容易であることを明らかにしてきた。また、IBM-BMT と同時に T 細胞骨髄内注入法 (IBM-DLI : donor lymphocyte

infusion)による T 細胞混入モデルを用いて経静脈的に T 細胞投与を行った群と比較することにより IBM-BMT の GvHD 抑制効果についても報告した。

本研究では T 細胞骨髓内注入法を用いて、IBM-BMT における GvHD 抑制メカニズムについて検討を行った。

【研究方法】

C57BL/6 マウス (7~9 週齢) をレシピエントとし、骨髓移植前日に 8.5 Gy の骨髓破壊的放射線照射を行った。ドナーとして BALB/c マウス (7~9 週齢) の全骨髓細胞 (1×10^7 個) を C57BL/6 マウスの左側脛骨骨髓腔内に投与 (IBM-BMT) した。これらのマウスに、ドナーの脾臓 T 細胞 (1×10^7 個) を①レシピエントの尾静脈に投与した群 (IV-DLI)、②右側の脛骨骨髓腔内に投与した群 (IBM-DLI)、③ BMT のみで DLI を施行しない群 (No-DLI)、の 3 群に分け比較検討を行った。

移植後 3 日目にマウスの右側脛骨 (IBM-DLI 群においては DLI 側) から全骨髓細胞を採取し、非造血系骨髓間質細胞 (CD45/CD106⁺) を sorting し Mixed Leukocyte Reaction (MLR) に添加することにより T 細胞増殖反応抑制能を検討した。

一方、採取された全骨髓細胞を 2 週間及び 3 ヶ月間培養した後に、培養容器底面への付着細胞として得られる骨髓間質細胞の MLR における T 細胞増殖抑制効果及び responder T cell の細胞内サイトカインについて検討した。骨髓間質細胞の免疫関連サイトカイン発現については Real-time RT-PCR 法にて解析し、培養上清の免疫関連サイトカインについては ELISA 法にて測定した。

【結果】

各々の群から採取した非造血系骨髓間質細胞 (CD45/CD106⁺) には T 細胞増殖抑制能を認めなかった。一方、培養容器底面への付着細胞として得られる骨髓間質細胞においては IBM-DLI 群においては IV-DLI 群と比較して有意に T 細胞増殖抑制効果が認められた。また responder T cell の細胞内サイトカインの解析の結果 IBM-DLI 群においては IFN- γ 産生が減少し IL-4 産生が増加していた。

骨髓間質細胞における HGF と TGF- β の mRNA 及び骨髓間質細胞の培養上清中の TGF- β も IV-DLI 群と比べ IBM-DLI 群において有意に増加していた。

【考察】

GvHD は移植片にドナー T 細胞が混入することにより発症する。以前に、IBM-BMT と同時に IBM-DLI による T 細胞混入モデルを用いて、ドナー骨髓細胞中に多数の T 細胞が混入している場合においても、IBM-BMT は GvHD 抑制効果があることを明らかにした (Stem Cells 22: 125, 2004)。本研究において、骨髓腔内に T 細胞を投与した群 (IBM-DLI 群) の骨髓間質細胞は in vitro で T 細胞増殖反応を抑制し、Th2 細胞への偏向を促進することが明らかになった。また IBM-DLI 群より採取した骨髓間質細胞において免疫抑制性サイトカインである TGF- β 及び HGF の産生が増加していた。従って、骨髓腔内に投与された異系 T 細胞と骨髓間質細胞間との相互作用により、骨髓間質細胞から TGF- β 及び HGF の産生が増強されるとともに Th2 応答への偏向をも誘導し、両者が相まって GvHD の抑制に寄与していることが推測された。

審査の結果の要旨

従来の研究で、骨髓内骨髓移植と同時に T 細胞骨髓内注入を行うと、経静脈的に T 細胞を投与した場合に較べより GvHD 抑制効果が強いことが判明している。本研究ではこの効果の発現に、骨髓間質細胞の関与が必須であるとする新しい知見を示している。すなわち、骨髓腔内に投与された異系 T 細胞と骨髓間質細胞との相互作用により、骨髓間質細胞より TGF β , HGF の産生が誘導される。その結果、免疫抑制性サイトカインの産生及び Th2 応答への偏向を誘導し、GvHD 抑制効果が強められ得ることを明らかにしている。以上より、本論文は博士号に値すると認められた。

【1480】

氏 名 (本 籍) ^ひ樋 ^{ぐち}口 ^{あき}暁 ^こ子 (大阪府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 826 号
 学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 学位論文題目

Hypericin inhibits pathological retinal
 neovascularization in a mouse model
 of oxygen-induced retinopathy

論文審査委員 主査 (教授) 螺良愛郎
 (教授) 杉本哲夫 (教授) 松村美代

論文内容の要旨

【研究目的】

未熟児網膜症, 糖尿病網膜症は, 失明を引き起こす重要な原因疾患であり, 虚血によって誘導される病的血管新生がその病態発症基盤として重要であると考えられている. 多くの血管成長因子やサイトカインが網膜の血管新生を制御することが知られているが, それらの中でも血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は, 生理的な血管形成に関与するのみならず, 病的血管新生を刺激する重要な因子である.

VEGF は血管内皮細胞において, その受容体に結合し, 細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) や蛋白キナーゼ C (PKC) を活性化することにより, 血管新生を促進することが明らかとなっている. 虚血状態での網膜新生血管の解析に有用である酸素誘発性網膜症の動物モデルにおいて, ERK や PKC シグナルを遮断すると血管新生が抑制されることより, VEGF のシグナル伝達経路を抑制することは網膜の病的新生血管の治療につながると考えた.

セントジョーンズワート (SJW) は抗鬱作用, 抗ウイルス作用, 抗腫瘍作用を持つハーブである. SJW の主要成分の一つであるハイペリシンは培養内皮細胞において, ERK や PKC の活性化を阻害すると報告されている. 従って, SJW は, 網膜の血管新生に影響する可能性が推察された. そこで我々は酸素誘発性網膜症のマウスモデルを用いて, 網膜血管新生に対する SJW とハイペリシンの

の作用について検討した.

【研究方法】

C57BL/6 の新生児マウスを用い, 生後 7 日から 12 日目まで 75% 濃度の酸素下, 生後 12 日から 17 日目まで大気濃度下にて飼育することにより網膜内の新生血管を誘導し, 酸素誘発性網膜症を作製した. 生後 12 日から 17 日目の 5 日間に SJW, ハイペリシンを 1 日 1 回経口投与した. SJW は人での内服量を体重当りに換算しマウスに投与, ハイペリシンは SJW 中に含まれる相当量を用いた. 網膜血管新生と血管閉塞の解析は生後 17 日目に眼球を採取し, 網膜を griffonia simplicifolia lectin (GSL) B4 抗体で染色後, 蛍光顕微鏡を用いて行った. 網膜における ERK のリン酸化はウエスタンブロット法にて検討した.

生理的な網膜血管形成の程度は, 生後 3 日から 7 日目まで SJW, ハイペリシンを経口投与し, 生後 7 日目に網膜をビオチン化 GSL 抗体で染色後, 視神経から血管形成の先端部の長さを測定することにより評価した.

【結果】

ハイペリシンと SJW の経口投与により血管閉塞の程度は影響を受けず, 網膜の病的新生血管が有意に抑制された. ハイペリシン, SJW 共に生理的な血管形成には影響を与えなかった. ウエスタンブロット法による解析では, ハイペリシン, SJW 共に虚血網膜における ERK のリン酸化を抑制した.

【考察】

ハイペリシンと SJW は正常な血管形成に影響することなく, 網膜の病的新生血管を抑制した. ハイペリシンと SJW は虚血状態における ERK のリン酸化を抑制したため, ERK の活性化を抑制することにより, 網膜の病的血管新生を抑制すると考えられた. 本研究の発展により SJW は糖尿病網膜症などの虚血性網膜症の治療に有効性があると期待される.

審査の結果の要旨

網膜の病的血管新生により失明をきたす種々の疾患が知られている. セントジョーンズワートならびにその主要成分であるハイペリシンは培養細胞において血管形成に関わるシグナルを抑制することが知られていることから, マウスの酸素誘発

網膜症に対して病的血管新生抑制能を検討したところ、双方の化学物質とも正常な血管形成には影響を認めず、ERK 活性の抑制を介して、病的血管新生のみを抑制することを証明した。in vivo の実験系での初めての効果実証であり、臨床の場における新たな治療法開発に示唆を与える成果と考え、学位に値すると判断した。

【1481】

氏名(本籍) ^{すぎ}杉 ^{もと}本 ^{たつ}達 ^や哉 (大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第827号

学位授与の日付 平成20年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目

Diffusion-weighted imaging for predicting
new compression fractures following
percutaneous vertebroplasty

論文審査委員 主査(教授) 飯田寛和
(教授) 木下利彦 (教授) 澤田 敏

論文内容の要旨

【はじめに】

Percutaneous vertebroplasty (PVP) は脊椎圧迫骨折を生じた椎体に対して自己硬化性のセメントを注入し、骨折椎体の構造的安定化を図る手技である。その劇的な除痛効果のため、近年急速に普及してきたが、PVP 施行後に隣接椎体に新たな圧迫骨折が生じることを少なからず経験する。この危険度が PVP 前に予測可能であれば、隣接椎体に対する予防的 PVP が正当化される可能性がある。

近年、MRI による拡散強調像 (DWI) を椎体に応用し、apparent diffusion coefficient (みかけの拡散係数; ADC) を計測することでその状態を客観的に評価可能となってきた。

本研究の目的は PVP 前の拡散強調画像より得られた隣接椎体の ADC 値が PVP 後の新たな圧迫骨折の予測因子となりうるかどうかを検討することである。

【研究方法】

対象患者は、2003 年 4 月～7 月に PVP が施行

された 25 症例で、対象椎体は治療椎体の上下の隣接 49 椎体とした。MRI は PVP 施行前 3 日以内と、施行後 1 週間以内に、DWI の矢状断を撮像し、正中矢状断を用いて対象椎体の ADC を測定した。

検討項目は、① 1ヶ月以内に圧迫骨折を生じた椎体と圧迫骨折を生じなかった椎体との ADC 値の比較、② 各症例の有する隣接椎体の ADC 値の平均を算出し、その患者固有の ADC 値と定義し、1ヶ月以内に圧迫骨折を生じた症例と圧迫骨折を生じなかった症例で ADC 値の比較、③ PVP 前後での隣接椎体の ADC 値の比較とした。

【結果】

PVP 後 1ヶ月以内に 25 例中 7 例、7 椎体に新たな圧迫骨折が生じ (28.0%)、6 例が隣接椎体の骨折 (24%)、1 例は非隣接椎体の骨折 (4%) であった。

術後 1ヶ月以内に新たな圧迫骨折を起こした 6 隣接椎体の術前 ADC 値は $0.55 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、骨折を認めなかった 43 隣接椎体の ADC 値は $0.20 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり、2 群間で統計学的な有意差が認められた ($p < 0.001$)。術後 1ヶ月以内に隣接椎体に新たな圧迫骨折を起こした 6 症例の術前 ADC 値は $0.55 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、骨折を認めなかった 18 症例の ADC 値は $0.17 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり、2 群間で有意差が認められた ($p < 0.001$)。

PVP 前の隣接椎体の平均 ADC 値は $0.24 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、PVP 後の隣接椎体の平均 ADC 値は $0.24 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり、2 群間には有意差は認められなかった。

【考察】

正常の椎体においては、間質腔に自由に運動できる水分子 (以下自由水) はほとんど存在しないため、MR 信号を発生させるような拡散可能なプロトンは非常に少なく、ADC の値は低値となる。反面、椎体内の ADC の高値は、拡散可能なプロトンが増加ことを意味し、間質腔内自由水の存在や腫瘍細胞などが骨髄に存在することが示唆される。

椎体の ADC 値を検討した我々の研究では、1ヶ月以内に圧迫骨折に発展した椎体は、椎体圧迫骨折に発展しなかった椎体に比較して ADC 値は高値であり、将来的に圧迫骨折に発展するリスクを有する椎体では、椎体内の自由水の量が正常椎体に比して増加している可能性があるものと考えられた。また、術前と術後 ADC 値の検討では、統計

学的有意差は認められず、PVP 自体の隣接椎体への影響はないものと考えられた。

われわれの研究結果は、セメント注入椎体に隣接する椎体の圧迫骨折を予測できる可能性があり、予防的 PVP の意義を明確にするうえで、ひとつの成果と考えられる。

【結論】

PVP 前の拡散強調画像より得られた隣接椎体の ADC 値は PVP 後の新たな圧迫骨折の予測因子となりうると考えられる。

審査の結果の要旨

老人に頻発する骨粗鬆症性椎体圧迫骨折に対して、近年低侵襲即効的疼痛制御法として経皮的椎体形成術 (Percutaneous Vertebroplasty [PVP]) が注目され普及してきた。PVP 施行後隣接椎体に新たに圧迫骨折が生じ得る。本研究は MRI 拡散強調画像により得られた、ADC (Apparent diffusion coefficient: 見かけの拡散係数が、近い将来生じる圧迫骨折の予測因子となりうるかを、実際に PVP を施行した患者の術前術後の ADC を測定し、圧迫骨折を生じた椎体の事前の ADC 値が有意に高値であることを明らかにされた。他の検査法では感知し得ない微細な椎体の内部変化を捉えたものと考えられ、将来の圧迫骨折の予測因子になりうることを新たに示したことは、学位に相当すると考えられる。

【1482】

氏名(本籍) ^{おか}岡 ^だ田 ^{たか}隆 ^{ゆき}之 (大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 828 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Role of F-actin organization in p38 MAP kinase-mediated apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes subjected to simulated ischemia and reoxygenation

論文審査委員 主査(教授)伊藤誠二
(教授)中邨智之 (教授)岩坂壽二

論文内容の要旨

【はじめに】

現在までに Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ (MAPK) カスケードは種々の細胞外刺激に対する細胞応答や生存、恒常性の維持あるいは細胞死に関与することが知られてきた。このカスケード内の p38MAPK は JNK と共にストレス応答性キナーゼとして知られており、心筋細胞の保護と障害の双方に関わっていることが示唆されてきたが、その詳細な役割は不明であった。このことは p38MAPK がアポトーシスとネクローシスに対して異なる役割を有している可能性を示唆している。そこで我々は p38MAPK を介した心筋細胞の F アクチン再構築がアポトーシス細胞死を促進する一方で、浸透圧性細胞障害からのネクローシス細胞死を抑制するという仮説を立て、それを検証した。

【方法】

まず、新生仔ラットから心室を採取してコラゲナーゼ処置した後に心筋細胞を単離、培養した。48 時間インキュベートした心筋細胞は培養ディッシュ上で固有レートでのコロニー収縮が確認された。この新生仔ラット培養心筋細胞を用いて、2 時間の虚血に相当する低酸素状態に置いた後、再灌流(再酸素化)状態におき、虚血再灌流モデルを作成した。再灌流時には等浸透圧培養または低浸透圧(140 mosM)培養条件下で細胞膜への力学的ストレスの影響を検討した。

p38MAPK 阻害剤として特異的かつ細胞浸透性の SB203580, アクチン重合阻害剤として細胞透過性真菌毒のサイトカラシン D を用いて, 虚血再灌流時における各々の薬剤の影響を解析した。

免疫プロット解析にて p38MAPK 活性化から MAP kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 (MAPKAPK2) 活性化を介して熱ショックタンパク (HSP) 27 のリン酸化が細胞保護作用を発揮する経路を評価した。また, サイトクローム C のミトコンドリアからの放出はアポトーシス誘導因子と考えられ, ミトコンドリアと細胞質分画内のサイトクローム C を定量した。

F アクチンは共焦点レーザー顕微鏡にて免疫細胞化学染色法で評価した。加えてアポトーシスの評価にはカスパーゼ 3 活性および DNA 断片化, ネクローシスの指標として細胞内から放出された LDH を定量した。またアポトーシス誘導にはカスパーゼ 3 を介した細胞内 ATP 依存性カスケードが存在しており, ATP 定量を施行した。

【結果】

再灌流時には MAPKAPK2 のリン酸化によって評価した p38MAPK の活性化がみられた。これは HSP27 の細胞質から細胞骨格分画への移行と F アクチンの再構成を伴っていた。

虚血再灌流時にミトコンドリアからのサイトクローム C の放出は増加し, カスパーゼ 3 の活性化と DNA 断片化は増加し, 低浸透圧下再灌流時には LDH 放出は著明に増加した。

p38 MAPK 阻害剤の SB-203580 は p38MAPK の活性化, HSP27 の移行や F アクチン再構築を抑え, サイトクローム C 放出, カスパーゼ 3 活性化および DNA 断片化を抑制した。一方 SB-203580 は低浸透圧下再灌流での LDH 放出を増強した。

F アクチン阻害剤の cytochalasin D は F アクチン再構築を抑制しサイトクローム C 放出, カスパーゼ 3 活性化と DNA 断片化を抑制したが, 低浸透圧下再灌流時の LDH 放出を増加させた。心筋細胞を再灌流後最初の 15 分間等浸透圧下に置くと SB-203580 および cytochalasin D は心筋細胞内の ATP を増加させ, 低浸透圧状態での LDH 放出を抑制した。

これらの結果から新生仔ラット心筋細胞の再灌流時における F アクチン再構築は p38MAPK 活性化を介して生じ, アポトーシスとネクローシスに

対する保護作用において異なる役割を果たすことが推察された。しかし, 再灌流時の機械的ストレスを一時的に回避することで細胞膜の破綻は回避され, その間に p38MAPK 阻害によって生じた心筋細胞膜の脆弱性が回復することが示唆された。

【結語】

新生仔ラット心筋細胞の虚血再灌流モデルにおいて, p38MAPK-HSP27 経路を介する F アクチン再構築はアポトーシスとネクローシスに対して異なる役割を果たすと考えられた。F アクチン細胞骨格は p38 MAPK が虚血再灌流時に活性化される際にアポトーシスシグナル伝達に関与する一方, F アクチン細胞骨格は心筋細胞膜を強化することによって機械的ストレスによって惹起されるネクローシスから心筋細胞を保護していることが示唆された。

また, 再灌流時一過性に機械的ストレスを回避することによって p38MAPK 阻害によるアポトーシスシグナルの抑制がミトコンドリア機能改善と ATP 産生増加を可能にし, 再灌流障害予防効果をもたらすことが示唆された。

審査の結果の要旨

心臓手術において虚血再灌流は避けて通れない手法である。本研究は新生仔ラット心筋細胞の虚血再灌流モデルを用いてストレス応答性キナーゼの p38MAPK を介する F- アクチンの再構築が心筋細胞のアポトーシスとネクローシスに対して異なる作用を示すことを明らかにした。再灌流時に一過性に機械的ストレスを回避することにより, p38MAPK カスケードの遮断が再灌流障害の予防効果をもたらすことを明らかにされた点は, 臨床応用への可能性を示すものであり, 本研究は学位に値すると考えられる。

【1483】

氏 名 (本 籍) 金 炳克 (徳原克治)^{とくはらかつじ} (韓国)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 829 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 31 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目

Rebamipide, anti-gastric ulcer drug,
up-regulates the induction of iNOS in
proinflammatory cytokine-stimulated
hepatocytes

論文審査委員 主査 (教授) 岡崎和一
(教授) 伊藤誠二 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【目的】

Rebamipide (Rm) は胃炎や胃潰瘍等の胃粘膜病変に対する治療薬として広く用いられている。Rm は *Helicobacter pylori* に感染した胃粘膜上皮細胞において、転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化および interleukin (IL)-8 mRNA の発現を抑制する。また、hydroxyl radical を直接除去し多形核白血球からの superoxide 産生を抑制することにより、胃粘膜を防御することが知られている。経口で摂取された Rm は一部が未変化体として血中に吸収され、摂取量の約 10% が尿中に排泄されるため、胃粘膜以外の臓器に対しても何らかの効果をしめす可能性が考えられる。これまでに Rm は障害された大腸粘膜、角膜、肺、腎、肝において組織の回復に有効であったことが報告されている。感染等による肝障害時の障害因子の 1 つとして一酸化窒素 (NO) の産生誘導があるが、一方で NO は、敗血症や肝炎罹患時において肝細胞の apoptosis を抑制し、また肝硬変、門脈圧亢進症患者において肝微小血流を改善させることにより門脈圧を低下させ、肝保護作用を示すとの報告もある。今回、炎症時の肝細胞に対する Rm の作用をみる目的で、炎症性刺激により誘導される一酸化窒素合成酵素 (iNOS) および NO 産生のシグナル伝達経路に対する Rm の効果を検討した。

【方法】

雄性ラット (Wistar 200 $\pm$ 10 g) からコラゲナー

ゼ灌流法により初代培養肝細胞を調製した。炎症性サイトカイン IL-1 β (1 nM) により誘導される NO 産生およびそのシグナルに対する Rm (0.1–0.5 mM) の影響について検討した。NO 値はその代謝物 (nitrite, NO $_2^-$) として Griess 法で測定した。iNOS 蛋白質, I 型 IL-1 receptor (IL-1RI) 蛋白質, inhibitory protein κ B (I κ B) 蛋白質は Western blot, iNOS mRNA, p65 mRNA, IL-1RI mRNA は Northern blot, NF- κ B は electrophoretic mobility shift assay で検討した。核内 p65 蛋白質, リン酸化 Akt 蛋白質は immunoprecipitation/Western blot で検討した。また, iNOS promoter-luciferase construct を transfection し, promotor 活性および mRNA 安定化活性に対する効果をみた。iNOS gene antisense-transcript は RT-PCR, real-time PCR で検討した。

【結果】

Rm の前処理 (2 時間以上) により, IL-1 β の NO 産生は時間および濃度依存性に増加し, 0.5 mM で約 3 倍の効果を示した。この促進効果は iNOS の蛋白質および mRNA レベルの増加に由来した。Rm は転写因子 NF- κ B の抑制蛋白質である I κ B α の分解後の回復を遅延させ, その結果 NF- κ B の活性化 (核移行と DNA 結合) を促進した。また, NF- κ B のサブユニットである p65 蛋白質の核移行およびその mRNA レベルも増加させ, Rm による I κ B/NF- κ B 経路の活性化を強く示唆した。一方, transfection 実験より, Rm は NF- κ B を介した iNOS promoter 活性化および 3'-UTR を介した iNOS mRNA 安定化の両面において促進効果を示した。Real-time PCR の実験から, iNOS mRNA の安定化に関与している iNOS gene antisense-transcript の発現も増加させることが明らかとなった。iNOS 誘導に必須のもう 1 つの経路である phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) /Akt を介した IL-1RI の増幅に対して, Rm は Akt のリン酸化, IL-1RI mRNA および蛋白質の発現誘導をいずれも促進させた。

【考察】

以上より, Rm は I κ B/NF- κ B と PI3K/Akt の両方のシグナルを活性化することにより, iNOS 遺伝子の発現誘導を強く促進することが明らかとなった。我々の PI3K 阻害剤 (LY294002) を用いた研究より, 後者の PI3K/Akt シグナルは iNOS mRNA の合成促進のみならず, iNOS gene antisense-

transcriptの発現を介したmRNA安定化にも関与することが示唆されている。Rmは障害肝において肝細胞のapoptosis抑制や微小血流の改善などを介して、肝保護に関与している可能性が考えられる。

審査の結果の要旨

Rebamipide (Rm)は障害された大腸、胃粘膜、障害された肝、腎に対して保護作用を有するが、障害肝への一酸化窒素(NO)の代謝を介した関与は分かっていない。本研究はRmは培養肝細胞で炎症性サイトカイン存在下にNO産生の亢進、iNOS蛋白質及びmRNAレベルの増加、NF- κ Bの活性化の促進をひきおこすこと、さらにiNOS mRNAの安定化に関与するiNOS gene antisense-transcriptの発現を増加させること等を明らかにしている。本研究は胃粘膜保護剤であるRmが障害肝でもNO産生による血流改善を介した保護作用を発現し得ることを示している。博士号に値すると認められた。

【1484】

氏名(本籍) まつ した みつ のぶ 松下 光 伸 (奈良県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 乙 第656号

学位授与の日付 平成19年5月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目

Appendix is a priming site in the development of ulcerative colitis

論文審査委員 主査(教授) 上山泰男
(教授) 池原 進 (教授) 岡崎和一

論文内容の要旨

【研究目的】

従来より虫垂は退化した臓器と考えられているが、虫垂切除歴のあるヒトでは潰瘍性大腸炎(UC)の発症率が有意に低く、虫垂切除によりUC発症だけでなく、病変の進展や重症化あるいは再発の抑制される可能性が考えられている。更にUCのモデル動物(TCR α ノックアウトマウス)では、虫垂切除により腸炎発症の抑制や腸炎の改善

が認められ、またUC患者においても虫垂切除によりUCの緩解する例も報告されている。しかしながら、このようにUCの発症や病態生理において虫垂は、何らかの関連性が考えられるものの、ヒトにおける虫垂の免疫学的意義については不明である。今回、UC患者の虫垂粘膜リンパ球サブセットを検討する事により、UCの病態生理における虫垂の意義を理解する事を目的とした。

【研究方法】

対象患者はUC 86例と、コントロール群 27例である。UC患者は、活動期全大腸炎型(A-Pan) 15例、活動期左側大腸炎型(A-Lt) 25例、更に虫垂開口部に炎症を認めるもの(A-Lt/Ap) 10例、緩解期全大腸炎型(I-Pan) 14例、緩解期左側大腸炎型(I-Lt) 22例に分類した。虫垂開口部、横行結腸、直腸の各粘膜4個の生検材料から分離された主に粘膜固有層のリンパ球を使用した。まず、抗-CD4-PE/抗-CD8-FITC抗体で染色した。また、抗-CD4-PE抗体と活性化初期抗原に対する抗-CD69-FITC抗体や活性化晚期抗原に対する抗-HLA-DR-FITC抗体でも染色した。フローサイトメトリーにて解析し、CD4/CD8比や活性化CD4+T細胞と病型との関連性についてコントロール群と比較検討した。

【結果】

活動期UC、特に左側大腸炎型における虫垂のCD4/CD8比はコントロール群に比し有意に高値であった。またA-Lt/Ap群では正常粘膜像を呈する横行結腸でもCD4/CD8比が有意に高値であった。直腸では他の結腸部位と異なり緩解期においてもCD4/CD8比の有意な高値を認めた。活性化初期抗原であるCD69陽性のCD4+T細胞の割合は、コントロール群に比しUCの病型に関係なく、虫垂では有意な増加を認めたが、横行結腸では有意な増加を認めなかった。またその割合は、直腸ではA-Pan群でのみ有意な増加を認めた。一方、活性化晚期抗原であるHLA-DR陽性のCD4+T細胞の割合は、コントロール群に比し直腸ではA-Pan群でのみ有意な増加を認めたが、横行結腸や虫垂ではUCの病型に関係なく有意な増加を認めなかった。

【考察】

CD4/CD8比は免疫学的活動性の最も有用なマーカーの一つであり、今回の研究では虫垂の

CD4/CD8比は、コントロール群に比較しA-Lt群とA-Lt/Ap 群において有意に増加していた。興味深いことに虫垂の CD4/CD8 比が増加するにしたがって、直腸の CD4/CD8 比にも増加傾向が見られ、虫垂と直腸における何らかの関連性が示唆された。また、直腸粘膜では他の結腸部位と異なり緩解期においても CD4/CD8 比の有意な高値を認め、有意な免疫不均衡が緩解期の直腸粘膜でも持続していた。UC 発症には腸内細菌などの腸内抗原に対する免疫寛容の破綻などの可能性が考えられているが、大腸における腸管内抗原の認識部位は明らかになっていない。そのため、我々は活性化初期抗原である CD69 と活性化晚期抗原である HLA-DR を用いて検討した。虫垂では UC の病型に関係なく CD4+CD69+T 細胞の割合はコントロール群に比し有意な増加を認めたが、CD4+HLA-DR+T 細胞の割合は有意な増加を認めなかった。以上より、UC の発症において虫垂は、腸管内抗原の最初の認識部位として重要な役割を演じている可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

虫垂切除歴のあるヒトでは潰瘍性大腸炎（UC）の発症率が有意に低く、また虫垂切除により UC 発症だけでなく、病変の進展や重症化あるいは再発の抑制される可能性が指摘されているが、虫垂の免疫学的意義については不明である。本研究では、CD4 T 細胞の活性化における、早期活性化抗原である CD69 と、晚期活性化抗原である HLA-DR に注目して、UC の病型に関係なく虫垂における CD4+CD69+T 細胞の割合はコントロール群に比し有意な増加を認めたが、CD4+HLA-DR+T 細胞の割合は健常人と差異を認めなかったことより、UC の発症において虫垂は、腸管内抗原の最初の認識部位として重要な役割を演じている可能性を示唆した。本研究は今後、潰瘍性大腸炎の病態解明だけでなく、新しい治療法の開発にも期待でき、学位に十分値するものと評価できる。

【1485】

氏 名（本 籍）^{やま がた ひで お}山 縣 英 生（大阪府）

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 番 号 乙 第 657 号

学位授与の日付 平成 19 年 5 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目

Acceleration of Smad2 and Smad3

Phosphorylation via c-Jun NH₂-Terminal Kinase during Human Colorectal Carcinogenesis

論文審査委員 主査（教授）螺良愛郎

（教授）上山泰男 （教授）岡崎和一

論文内容の要旨

【研究目的】

正常上皮細胞の腫瘍への変化には腫瘍抑制の活性化減少と癌化の活性化増加という TGF-β の機能の変化が関係している。しかしながら、ヒト大腸癌化過程におけるこの機能の特徴的なメカニズムの変化は明らかにされていないままである。TGF-β のシグナルには Smad2/3 のリンカー部のリン酸化（以下 pSmad2/3L）と C 末部のリン酸化（以下 pSmad2/3C）が関係する。それぞれのリン酸化部位に対し特異的な抗体を作製し、ヒト大腸癌化過程に Smad2/3 を介したシグナルがどのように変化するか、ヒト散発性大腸癌において JNK を介したシグナルが伝わることにより Smad2/3 のリンカー部のリン酸化はどのような役割をするのかを明らかにするために実験を行った。

【研究方法】

組織標本は関西医科大学臨床検査医学講座において診断された散発性大腸癌 31 例、大腸腺腫 11 例を用いて行われた。それぞれの組織から抽出した RNA を用いプロトコールに従い RT-PCR を行った。PCR は TGF-β II 型レセプターが 2 つ、Smad2、Smad4 の計 4 つに対しそれぞれの組み合わせのプライマーを用いて変異の検索を行った。Smad2 及び Smad3 の C 末部、リンカー部に対する領域特異的なリン酸化抗体を作製し、この 4 つの抗体及び Ki-67 抗体を用い Smad2/3 のリン酸化状態及び Smad2/3、Ki-67 の細胞内局在について検討を行った。in vitro kinase assay においても 4 つの抗体を

用いて腫瘍のキナーゼ活性を評価した。

【結果】

pSmad2/3CだけでなくpSmad2/3Lは正常の大腸上皮細胞において認められ、特にpSmad2/3Cは核内において優位に存在した。しかしながら、pSmad2/3Lは31例の散発性大腸癌において認められ、特に転移や浸潤を伴う後期ステージの癌は、pSmad2/3Lの程度が非常に高く認められた。11例の大腸腺腫におけるリン酸化の程度は正常の上皮細胞と癌との中間程度であった。pSmad2Lは細胞質に留まっているのに対し、pSmad3LはKi-67の免疫染色に反応した癌細胞に専ら存在した。対照的に、pSmad3Cは腫瘍のステージが上がるごとに減少する傾向があった。癌における活性化されたJNKは直接Smad2/3のリンカー部をリン酸化する。一方、Smad4遺伝子におけるMH2部位の配列は1つの癌においてcodon361にG/Aの変化が認められた。しかしその遺伝子変異はリン酸化には関係しなかった。TGF- β II型レセプターやSmad2の遺伝子変異は癌において観察されなかった。

【考察】

pSmad2/3Cに関係したシグナルは正常の大腸上皮細胞において増殖抑制及びアポトーシスに関与していると考えられる。正常の大腸粘膜から遠隔転移を伴った浸潤癌への過程としてJNK依存性pSmad2/3Lは優位な増加が認められ、特に浸潤や転移を伴った後期ステージの癌ではpSmad3Lが高いという特徴があった。ヒト大腸癌化過程において、TGF- β の腫瘍抑制活性を支持するpSmad3Cは減少していることが認められたが、JNKはpSmad2/3Lを引き起こす傾向があった。TGF- β シグナルは正常上皮細胞の生理に関係するため、ヒトの癌の病原につながるTGF- β シグナルの分子機構を解明することは新しい治療への発展にとって重要である。TGF- β シグナルの観点から、癌において治療戦略の鍵となるのは失われた腫瘍抑制機能の復元であり、その点においてJNKに関連したSmad2/3のリンカー部の経路を特異的に阻害する物質は有益であると証明されるであろう。ある標本においてpSmad2/3Lの分布に関する研究を行うことは、ヒト散発性大腸癌に対する分子標的療法の潜在的反応を予測するのに必要とされるであろう。

審査の結果の要旨

TGF- β シグナルは正常上皮細胞の生理や癌細胞の増殖に関係している。本研究は、ヒト大腸癌化過程において、smad3のリンカー部リン酸化がTGF- β の腫瘍化因子となること、一方でc末端部のリン酸化が抑制化因子であることを初めて示した。さらに、ヒトの癌の病原につながるTGF- β シグナルの分子機構を解明することは新しい治療への発展にとって重要であり、本研究は学位に充分値すると考えられた。

【1486】

氏名(本籍) ^{いな}稲 ^み見 ^{のり}則 ^{ひと}仁 (兵庫県)
学位の種類 博士(医学)
学位番号 乙 第658号
学位授与の日付 平成19年9月25日
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
学位論文題目

Early prediction of restenosis after
percutaneous coronary intervention in
patients with stable angina pectoris

論文審査委員 主査(教授) 今村洋二
(教授) 松田博子 (教授) 岩坂壽二

論文内容の要旨

【目的】

現在狭心症におけるヒト冠動脈狭窄・閉塞病変に対する経皮的インターベンション(バルーン拡張術、ステント留置術)が世界に広く普及している。しかし、拡張した血管が再び狭くなる冠動脈形成術(PCI)後の再狭窄が、バルーン拡張術においては40%前後、ベアメタルステント留置術においては20%前後と高率に発生することから、この治療法の長期的有効性を著しく損なう大きな問題となっている。PCI後の再狭窄は依然重要な問題点であり、そのメカニズムは依然はっきりとは解明されていない。PCI後には血小板の活性化が起こっていることは今まで報告されてきた。またこの活性化によりPCI後の虚血イベントを起こすことも報告されてきた。付け加えて言うならPCI後の血小板、白血球、内皮機能の活性化はPCI後

の再狭窄に対して非常に重要と考えられる。特に白血球の活性化は内皮の動脈硬化の進展に深く関与していると考えられている。つまり再狭窄の病態生理を理解することは非常に重要である。そこで本研究では PCI 後再狭窄に関して、ケモカイン、血小板活性化因子を検討することにより、再狭窄に対しての病態生理に有用であるかを検討してみた。第一編では PCI 後の早期における RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted), soluble (s)L-selectin, sP-selectin, MCP-1 (monocytic chemotactic peptide-1) の病態生理を、第二編では L-selectin と感冒の PCI 後再狭窄に及ぼす作用機序について明らかにした。

【方法・対象】

待機的 PCI 症例に対して、STENT 挿入し PCI 前後と経時的に一週間以内の末梢採血を施行し、採血後一時間以内に 1,000×g で 20 分間遠心分離しその後 -30°C にて保存し後日 ELISA kit にて測定した。第一編では同意の得られた 52 人の労作時狭心症患者の PCI 前と一日、三日、七日目に末梢採血施行し再狭窄群と非再狭窄群での sL-selectin, sP-selectin, MCP-1, RANTES 比較検討を行った。第二編では 88 人の労作時狭心症患者において、PCI 前と一日、七日目に末梢採血施行し、PCI 後六ヶ月以内に感冒を起こした群と非感冒群について検討した。

【結果】

第一編では再狭窄群において sL-selectin は PCI 三日後より有意差を認めた。MCP-1 では再狭窄群、非再狭窄群において有意差を認めなかった。sP-selectin においては、PCI 三日後に有意差を認めた。しかしながら RANTES においては、PCI 一日後から非再狭窄群においては速やかに減少し、再狭窄群において、減少は認められず、二群間に有意差を認めた。第二編では検討した患者 88 名中 12 名が PCI 後六ヶ月以内に感冒を起こした。この感冒群と非感冒群では再狭窄に有意差は認められなかった。しかしながら、白血球由来の sL-selectin において再狭窄群、非再狭窄群では PCI 一日後より有意差を認めた。

【考察】

労作時狭心症患者の待機的 PCI 時に PCI 後早期の sL-selectin の再狭窄群における上昇と RANTES の非再狭窄群における減少は、再狭窄の予測因子

になると考えられる。また今回感冒と再狭窄についてははっきりとした因果関係は認められなかったが、PCI 後早期に sL-selectin が変動していることより PCI 後の早期に白血球の活性化と再狭窄には因果関係が認められるが、PCI 後 restudy までの六ヶ月間に感冒を起こしても再狭窄には関与しないことが証明された。

審査の結果の要旨

冠動脈狭窄病変に対し、最も多く行われているステント治療後の再狭窄発生に関する規定因子をケモカイン、血小板活性化因子より検討した。sL-selectin の上昇と RANTES の減少は再狭窄の予測因子となることが判明した。世界的な新知見ではないが、循環器専門医がその壁を越え、血小板機能を研究して得た結論であり、患者側に立ったより良い治療を行って行く上に於いて、絶対に必要な臨床的知見を追及したものである。

【1487】

氏 名 (本 籍) ^{よし} ^だ ^{つね} ^{たか} 吉 田 常 孝 (兵庫県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 乙 第 659 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目

Effectiveness of treatment with donepezil hydrochloride and changes in regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease

論文審査委員 主査 (教授) 日下博文

(教授) 木下利彦 (教授) 澤田 敏

論文内容の要旨

【研究目的】

塩酸ドネペジルは、アルツハイマー病 (以後 AD) 治療薬であり、コリンエステラーゼ阻害作用により脳内のアセチルコリン作用を高め、認知機能を維持する効果がある。この研究の目的は、塩酸ドネペジルの認知機能に対する効果と脳血流の関係性を明らかにし、治療効果の判定及び治療効果予測に関する脳血流画像の有用性を評価すること

である。

【研究方法】

対象者は NINCDS-ADRDA によって AD と臨床的に診断された 29 人の外来患者である。(男性 12 人, 女性 17 人, 50 歳から 82 歳, 平均 69.2 歳) ドネペジル投与前, 投与 1 ヶ月後, 投与 3 ヶ月後, 投与 6 ヶ月後, 投与 1 年後に, それぞれ ADAS-cog と脳血流 SPECT 像で評価した。観察期間中に ADAS が 3 点以上の改善を認めたグループをレスポonderとし, 改善を認めなかったグループをノンレスポonderとした。

【結果】

対象者 29 人中 22 人がレスポonder (男性 7 人, 女性 15 人, 50 歳から 82 歳, 平均 69.0 歳), 7 人がノンレスポonder (男性 5 人, 女性 2 人, 61 歳から 80 歳, 平均 70.0 歳) であった。レスポonderでは, すべての領域で投薬後 1 年間を通して血流増加を認めた。特に, 前頭葉 (前方), 頭頂葉において, 投薬後 1 ヶ月で有意な ($p < 0.05$) 血流増加を示した。ノンレスポonderでは, すべての領域において投薬後 1 ヶ月で有意な ($p < 0.05$) 血流低下を認めた。特に, 海馬領域では, 投薬後 3 ヶ月まで有意な ($p < 0.05$) 血流低下を認めた。また, ドネペジル投薬後の局所脳血流をレスポonderとノンレスポonderで比較すると, 投薬後 1 ヶ月では基底核に, 3 ヶ月では基底核と視床に有意な ($p < 0.05$) 血流の差を認めた。

【考察】

レスポonderとノンレスポonderの違いは, ドネペジルに対する基底核, 視床の反応性と, 投薬後 1 ヶ月目の前頭葉, 頭頂葉の血流増加が関与していることが示唆された。また, このことから投薬後 1 ヶ月目の脳血流量の変化は, レスポonderとノンレスポonderを区別し, 治療薬の有効性を予測しうることが示唆された。コリン作動性ニューロンは, 前脳基底部に存在するマイネルト基底核を起始核とし, 海馬, 扁桃核および新皮質全体に投射しており, 前頭葉にも多くの軸索を投射している。AD では, 初期からこのマイネルト基底核において病変が進行し, それに応じて認知機能障害が惹起される。また, コリン作動性ニューロンは, マイネルト基底核の他に, 大脳基底核と外側被蓋野にも存在し, 記憶以外の脳機能に関与していると考えられている。外側被蓋野を

起始核とするコリン神経細胞は頭側には大脳基底核や視床に軸索を投射している。我々の研究結果で, ドネペジルのレスポonderにおいて血流が保たれた領域は, コリン作動性ニューロンの主な投射路であった。つまり, レスポonderでは, コリン作動性ニューロンが温存されていたため, 治療開始早期の血流増加を認めたのではないかと考察する。

【まとめ】

29 人すべての患者に対してドネペジルは効果的であったが, 著効を示したレスポonderは 22 人であった。著効したレスポonderは, 投薬後 1 ヶ月で脳血流の増加がみられ, 特に, 前頭葉, 頭頂葉において有意に血流が増加した。レスポonderでは, 認知機能検査も, 主に前頭葉機能を反映する項目に改善が見られた。レスポonderはノンレスポonderに比して, 投薬初期に基底核, 視床の有意な血流増加を認めることから, 基底核や視床のドネペジルに対する良好な反応性が, 結果的に前頭葉機能へ影響し, レスポonderとノンレスポonderを分けているのではないかと考えられた。

審査の結果の要旨

軽症から中等症の Alzheimer 病 (以下 AD) 患者 29 例において, 塩酸ドネペジル投与に伴う認知機能と脳血流をそれぞれ ADAS-cog, IMP-SPECT を用いて経時的に投与後 1 年まで検討している。良好な薬剤効果を示した群では, 前頭葉, 頭頂葉で血流の改善がみられ, 特に投与初期に大脳基底核, 視床では血流増加が見られ, 反応不良群との間に有意な相違がみられた。薬剤の有効性の判定に意義のある知見を見いだしており, 学位に値するものと判断する。

【1488】

氏 名 (本 籍) ^{いま いずみ まさ ひと} 今 泉 正 仁 (大阪府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 乙 第 660 号
 学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
 学位論文題目

Optic nerve compression by normal carotid
 artery in patients with normal tension glaucoma

論文審査委員 主査 (教授) 日下博文
 (教授) 中村加枝 (教授) 松村美代

論文内容の要旨

【研究目的】

正常眼圧緑内障 (以下 NTG) は高眼圧を呈しないが、緑内障性視神経萎縮をおこす疾患である。その原因として循環障害や視神経篩状板部の脆弱性など推察されているが、いまだ明らかになっていない。そこで、内頸動脈 (以下 ICA) による視神経の圧迫が正常眼圧緑内障 (以下 NTG) の発症の危険因子であるかどうか検討する。

【研究方法】

対象は関西医科大学病院眼科、済生会泉尾病院眼科で、NTG と診断された 54 名 103 眼の NTG 群と、年齢を適合させた眼疾患のない対照群 52 人 (男性 22 人、女性 30 人の) 104 眼。全例に磁気共鳴映像 (以下 MRI) 頭部矢状断撮影を行い、ICA による視神経圧迫の有無、程度を検索した。圧迫の程度は画像上 3 段階に分類 (Grade-0: 全く接触しないか、わずかな接触を認めるが視神経の圧迫、変形のないもの、Grade-1: 接触をみとめ、わずかな変形があるもの、Grade-2: 視神経の中度から高度の接触と強い変形を認めるもの) し、Grade-1 以上を圧迫ありと判定した。さらに、視力、視神経乳頭陥凹の程度、および糖尿病と高血圧の有無について調査した。NTG 群と対照群のデータは、カイ二乗 (χ^2) 検定を用いて統計学的に比較検討した。

【結果】

1. ICA による視神経圧迫

1) NTG 群と対照群

NTG 患者群 54 名 103 眼中、51 眼 (49.5%) に

ICA による視神経圧迫を認めた。そのうち Grade-1 の圧迫は 33 眼 (64.7%) で、Grade-2 の圧迫は 16 眼 (35.3%) であった。

一方対照群 52 名 104 眼中、36 眼 (34.6%) に ICA による視神経圧迫を認めた。そのうち Grade-1 の圧迫は 22 眼 (61.1%) で、Grade-2 の圧迫は 14 眼 (38.9%) だった。圧迫の有無は NTG 群に有意に高かった ($p=0.035$) が、Grade-2 の圧迫には有意差がなかった ($p=0.2$)。

2) 両眼性と片眼性

NTG 群 54 名中 22 人 (40.7%) が両眼に圧迫を、9 人 (16.7%) が片眼のみに圧迫を認めた。

一方対照群 52 名中 11 人 (21.1%) が両眼に圧迫を、14 人 (26.9%) が片眼のみに圧迫を認めた。両眼圧迫の患者数は NTG 群に有意に高かった ($p=0.029$)

3) 視神経乳頭陥凹

NTG 群 103 眼中 95 眼に視神経乳頭／陥凹比 (C/D 比) 0.7 以上あり、そのうち 50 眼 (52.6%) に ICA による視神経圧迫を認めた。C/D 比 0.7 未満は 8 眼あり、1 眼 (12.5%) のみに ICA による視神経圧迫を認めた。C/D 比 0.7 以上の群に有意に圧迫を認めた ($p=0.017$)

2. 糖尿病

NTG 群、コントロール群とも糖尿病と圧迫の有無には有意差なかった。

3. 高血圧

NTG 群、コントロール群とも高血圧と圧迫の有無には有意差なかった。

【考察】

ICA による圧迫性視神経症は、通常は動脈瘤や頭蓋内腫瘍によって発生する。しかし、正常 ICA や動脈硬化性変化によっても発生することがある。今回の研究で NTG 患者群と正常対照群で ICA と視神経線維の圧迫程度を頭部 MRI 検査で比較したところ、NTG 患者に有意に高い割合で、ICA による視神経圧迫、および両眼性圧迫を認めた。NTG 発症の原因はいまだ明らかではなく、複数の要因が関与していると考えられるが、この結果は ICA による視神経圧迫が NTG における視神経損傷のひとつの危険因子であり、NTG 発症の原因の 1 つである可能性を示す。

審査の結果の要旨

正常眼圧緑内障（以下 NTG）は、眼圧が正常でありながら緑内障と同様の視神経障害による視野欠損をおこし、眼圧以外にも原因が想定されながらもまだ明らかになっていない。本研究で、NTG 患者では対照群より内頸動脈による視神経圧迫の頻度が高く、しかも両側圧迫の確率が高いことがわかった。内頸動脈による視神経圧迫が NTG 発症原因のひとつとして可能性を示した初めての論文であり学位に値する。

【1489】

氏 名（本 籍）^{あら い しょう じ}新 井 昇 治（兵庫県）
学 位 の 種 類 博士（医学）
学 位 番 号 乙 第 661 号
学位授与の日付 平成 19 年 9 月 25 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目
Induction of inducible nitric oxide synthase
and apoptosis by LPS and TNF- α in nasal
microvascular endothelial cells
論文審査委員 主査（教授）中邨智之
（教授）伊藤誠二（教授）山下敏夫

論文内容の要旨

【緒言】

一酸化窒素（NO）は、生体内で NO 合成酵素（NOS）により産生され多様な作用を有している。中でも誘導型 NOS（iNOS）は菌体内毒素であるリポポリサッカライド（LPS）や TNF- α などの炎症性サイトカイン等の刺激により多量の NO 産生を惹起する結果、アポトーシス等の細胞障害を引き起こし種々の病態の原因となることが明らかとなってきた。一方、近年アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎などの鼻疾患においても病態の原因として iNOS および NO の関与が示唆されているが未だ解明されていない。そこで本研究では鼻疾患の病態における NO および iNOS の関与を調べるために、培養ヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞を用いて LPS、TNF- α 刺激により誘導される iNOS 発現、さらにアポトーシスとの関係について免疫組織学的

手法を用いて検討を行った。

【研究方法】

下鼻甲介粘膜切除術時に採取した下鼻甲介粘膜を用いてヒト鼻粘膜血管内皮細胞の分離培養を行った。培養した鼻粘膜微小血管内皮細胞に薬剤刺激として 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の LPS と 10 ng/ml の TNF- α を用いた。刺激として、LPS および TNF- α 単独刺激と、両薬剤の混合刺激を行った。一次抗体にウサギ抗 iNOS 抗体を、二次抗体に FITC 標識抗ウサギ抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。また蛍光色素：Hoechst33342 を用いて核染色によるアポトーシスの同定を行った。アポトーシス、iNOS 発現には共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光強度を測定し判定した。

【結果】

培養鼻粘膜微小血管内皮細胞において無刺激の状態でも弱い iNOS 発現が認められた。また LPS、TNF- α 単独、及び混合のいずれの刺激においても刺激前に比較して iNOS 発現の増強が認められた。さらに混合刺激時では単独刺激時に比べより強い iNOS 発現が認められた。選択的 iNOS 阻害剤である 1400W によって LPS と TNF- α の混合刺激による iNOS 発現が抑制された。LPS、TNF- α の混合刺激により培養鼻粘膜微小血管内皮細胞においてアポトーシスの発現を認めた。1400W は、LPS、TNF- α の混合刺激による培養鼻粘膜微小血管内皮細胞におけるアポトーシスの発現を抑制した。LPS、TNF- α の混合刺激による iNOS 発現は、アポトーシスの発現より早く観察された。

【考察】

近年菌体内毒素である LPS や TNF- α などの炎症性サイトカインが、さまざまな細胞や組織において iNOS を発現させ、その後引き起こされる大量の NO 産生が細胞障害や組織障害を起こすことが報告されている。さらに iNOS による細胞障害や組織障害にアポトーシスの関与が示唆されている。気道粘膜においても LPS や TNF- α が iNOS を強力に発現し、その後高濃度の NO を持続産生する結果アポトーシスを引き起こし細胞障害や組織障害を起こすことが報告されている。そのことから気管支喘息などの病態に深く関与すると言われている。さらに気道粘膜における微小血管においても LPS や TNF- α が同様の機序で細胞障害を引き起こすことが報告され、結果局所の血管内容物

漏出がおこり気道粘膜の浮腫の原因になると考えられる。鼻粘膜においては上皮細胞における LPS や TNF- α が iNOS による同様の機序で細胞障害を引き起こす報告はあるが、微小血管内皮細胞についての報告はなかった。本研究で、LPS と TNF- α が培養鼻粘膜微小血管内皮細胞において iNOS 発現を誘導することが証明された。そのことから結果として引き続き NO 産生が起こることが推測された。また他の細胞や組織と同様に iNOS による NO の持続的産生が、鼻粘膜微小血管内皮細胞においてアポトーシスを誘導し、結果細胞障害を引き起こすと考えられた。この結果、鼻粘膜において微小血管の漏出 (microvascular leakage) が発生し血管透過性亢進を惹起することで鼻粘膜浮腫形成を介し鼻疾患の病態に関与していると考えられた。

【結語】

これまで鼻疾患の病態における NO の役割は十分に解明されていなかったが、本研究により培養鼻粘膜微小血管内皮細胞において LPS, TNF- α 刺激で誘導される iNOS を介した細胞障害が微小血管の漏出を引き起こし、結果アレルギー性鼻炎のような遅発性の鼻閉などの鼻疾患の病態に関係している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎では鼻粘膜微小血管の傷害が鼻粘膜浮腫の原因となる。新井氏はヒト鼻粘膜微小血管細胞において LPS と TNF α が相加的に iNOS の発現を誘導し、その結果起こる高濃度 NO の産生によって内皮細胞のアポトーシスを引き起こすことを明らかにした。本研究は、非常に患者数の多い鼻疾患の新たな発症メカニズムを示唆するものであり、学位授与に値する。

【1490】

氏 名 (本 籍) ^さ ^{とう} ^{まさ} ^{ひと} 佐藤 正人 (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 662 号
学位授与の日付 平成 19 年 11 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目

Thoracoscopic surgery under artificial
pneumothorax in children: its experimental
investigation and clinical application to
diaphragmatic procedures

論文審査委員 主査 (教授) 金子一成
(教授) 今村洋二 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【研究背景】

小児胸腔鏡下手術は術野が非常に小さく、成人例以上に鉗子操作の制限を受けるため、手術手技が煩雑である。成人例では大気圧下に胸腔鏡手術を行うことが大部分であるが、小児例では大気圧下に安全な術野を展開するためには比較的大きな開胸創が複数必要である。

この問題を解決すべく気腹装置を用いて炭酸ガスを胸腔内に注入し、患側肺を虚脱せしめる方法 (人工気胸) が臨床応用されている。しかしながら、小児外科領域においては、動物実験を含め、その安全性の検討が十分になされていない。

本研究では、人工気胸が循環動態に及ぼす影響を動物実験で検討し、至適胸腔内圧を求めること、そしてその結果をふまえ、完全人工気胸下手術を臨床応用し、小児横隔膜弛緩症に対する新たな術式を開発することを研究目的としている。

【研究方法】

1. 基礎研究 (動物実験)

- 1) 雄仔ブタ (30-32 kg) 5 頭を用い気管挿管下、全身麻酔を行った。
- 2) 胸腔に 5 mm 径トロカールを挿入し、胸腔鏡を挿入した。
- 3) 心拍数 (HR), 呼気終末炭酸ガス濃度 (ETCO₂), 経皮的酸素飽和度 (SaO₂), 動脈圧 (大腿動脈), 心電図をモニターした。
- 4) 胸腔内に炭酸ガスを注入し陽圧化 (人工気

胸)した。

- 5) 人工気胸の圧を 0 mmHg (大気圧), 5 mmHg, 10 mmHg, 15 mmHg に保ち循環動態の変動を測定した。
2. 臨床応用 (完全人工気胸を用いた胸腔鏡下横隔膜縫縮術の開発)
 - 1) 小児胸腔鏡下横隔膜縫縮術を完全人工気胸下に行った。
 - 2) 人工気胸下胸腔鏡手術中の患児の循環動態の変動を測定した。
 - 3) 人工気胸の安全性を臨床例で検討した。

【結果】

1. 動物実験結果

全身麻酔下に一定の陽圧換気条件下で胸腔内圧が 0 mmHg (大気圧) から 10 mmHg に上昇すると HR は 99.6 ± 17.5 回/分から 118.9 ± 11.9 回/分と増加 ($p < 0.05$) し, ETCO_2 も 44.2 ± 7.0 mmHg から 53.4 ± 12.2 mmHg と上昇 ($p < 0.05$) した。また収縮期血圧は胸腔内圧が 0 mmHg から 15 mmHg に上昇すると 86.8 ± 11.7 mmHg から 40.5 ± 7.8 mmHg に低下 ($p < 0.05$) した。拡張期血圧も同様に 48.1 ± 8.8 mmHg から 29.0 ± 1.4 mmHg へと低下 ($p < 0.05$) した。 SaO_2 は胸腔内圧の変化には影響されなかった。心電図上, 10 mmHg 以上の胸腔内陽圧条件になると T 波の陰転化が認められた。実験中, 胸腔鏡で観察された肺の虚脱状況は肉眼所見上, 5 mmHg と 10, 15 mmHg では大きな違いは認められなかった。

2. 臨床 (手術) 結果

4 mmHg 圧の人工気胸下に 6 例の胸腔鏡下横隔膜縫縮術を施行した。全例で全手術経過を通じ十分な患側肺の虚脱が得られた。挙上していた横隔膜は人工気胸により腹側に押しやられたので、広い術野が展開され、安全に胸腔鏡下に横隔膜の縫縮手術が完遂できた。全症例で手術中の心拍数 (HR), 呼気終末炭酸ガス濃度 (ETCO_2), 経皮的酸素飽和度 (SaO_2) は安定していた。症例 1 から 5 では片肺換気を併用したが、症例 6 では両肺換気のまま安全に手術が施行できた。症例 1 では術後肺炎のため 21 日間の入院を要したが残り 5 症例では術後 4-6 日、平均 5 日で退院した。術後観察期間 5 年から 10 年の現在、症状の再発は認めていない。

【考察】

動物実験の結果, 10 mmHg の人工気胸で HR や ETCO_2 に有意な変化が認められたこと、また心電図上 ST の逆転が認められたことから、胸腔内圧の上昇に伴い静脈還流が減少し、心拍数が増加したと考えられた。また血圧の低下や高炭酸ガス血症の直接作用も影響し心筋虚血を誘発した可能性が示唆された。従って、循環動態に影響を及ぼさない 5 mmHg の胸腔内圧が至適人工気胸圧であると結論された。

申請者が考案した人工気胸下横隔膜縫縮術は肋間筋の損傷も少なく、minimally invasive surgery の条件を満たす安全な術式であると考えられた。とくに、横隔膜弛緩症においては人工気胸により弛緩した横隔膜が腹側に圧排され、従来の開胸手術とくらべて手技が非常に容易になった。

以上、基礎的ならびに臨床的研究で小児人工気胸下手術の安全性が確認されたことから、小児胸腔鏡手術領域において他疾患へのさらなる応用が期待できると考えられた。

審査の結果の要旨

小児でのより安全な胸腔鏡下手術のための基礎研究として、ブタを用いた動物実験で胸腔内への炭酸ガス注入 (人工気胸) による循環動態への影響を検討し、人工気胸時の至適胸腔内圧が 5 mmHg 以下であることを確認し、この結果をふまえ、小児横隔膜弛緩症症例 6 例に対し、完全人工気胸下に手術を施行した。人工気胸により、患側肺は片肺換気なしでも十分に虚脱し得たこと、また、弛緩し挙上した横隔膜は尾側に押しやられ、十分な手術野が得られ、安全に横隔膜の縫縮術を施行し得たことを実証している。本研究により、小児横隔膜弛緩症に対する完全人工気胸下の胸腔鏡下横隔膜縫縮術の術式が確立したのみならず、小児での胸腔鏡下手術を安全に行うための基礎的、臨床的データを得ている。博士号に値すると認められた。

【1491】

氏 名 (本 籍) ^{みち}道 ^{うら}浦 ^{たく}拓 (大阪府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 乙 第 663 号
 学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
 学位論文題目

Assessment of the Preserved Function of the
 Remnant Stomach in Pylorus-preserving Gas-
 trectomy by Gastric Emptying Scintigraphy

論文審査委員 主査 (教授) 岡崎和一
 (教授) 上山泰男 (教授) 澤田 敏

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、診断技術の向上により早期胃がんの頻度は増加し、その 5 年生存率は 90% 以上と良好なことから、胃切除後の quality of life の向上が外科医にとって新たな課題となっている。そのために、多くの施設では、様々な胃切除後障害を防止するために種々の機能温存手術が行われている。

幽門保存胃切除術 (PPG) は、従来の幽門側の胃を切除した後に残胃と十二指腸を吻合する Billroth I 法ではなく、幽門を温存し再建する術式で機能温存手術のひとつである。PPG は、従来の幽門側胃切除術と比較し、幽門機能が温存されることから食事摂取量の増加、ダンピング症候群発症の頻度の減少、逆流性胃炎の発症が少ない事などが報告されている。しかし一方では、幽門が温存されることにより胃排出遅延を誘発し、腹部膨満感や食事摂取量の減少をきたすとの報告もあり、未だその評価は定まっていない。

また、現在まで客観的に残胃の機能評価を行う方法は確立されていないことや、胃の機能温存を考慮した胃切除術時に胃の切除範囲や迷走神経幽門・腹腔・幽門洞枝などの神経温存が残胃運動にどのような影響を与えるかに関しても明確にされていないのが現状である。よって、客観的に残胃の機能評価を行う方法が確立でき、さらにそれによる評価結果が術後の quality of life を反映するようであれば、様々な胃の機能温存手術において適切な術式の確立に寄与するものと思われる。

本研究の目的は、機能温存術式の 1 つである PPG 施行術後患者に対し胃排出シンチグラフィーを施行し、客観的にどの程度残胃の機能が温存されているかを評価し、胃排出シンチグラフィーの臨床的有用性を検討することである。

【方法】

対象は、1993 年 1 月から 2003 年 8 月までに関西医科大学外科で PPG が施行され、術後 1 年目に胃排出シンチグラフィーを受けた 45 例を対象とした。45 人の患者の内訳は、男性 23 人、女性 22 人で平均年齢は 56 歳であった。すべての患者に、説明と同意を得た後に本試験を行った。

RI 胃排出シンチグラフィーの施行方法は、試験食 (粥 200 g + 鶏卵一個に ^{99m}Tc -DTPA を添加) を摂取し、試験食摂取後 0, 5, 10, 20, 40, 50, 60 分後にガンマカメラにて撮影を行い、そのデータを専用コンピューターにて解析し、残胃内の RI 停滞率を求め、胃排出曲線を描出した。さらに、胃排出曲線を停滞率により 3 つの排出パターン (1) Rapid type (R-type) : 試験食摂取直後に停滞率が 40% 以下 (2) Intermediate type (I-type) : 摂取直後に 40% 以上停滞し、60 分後に 70% 以上排出しているもの (3) Delayed type (D-type) : 60 分後の停滞率が 30% 以上のもの、に分類し PPG 術後の胃排出能を評価した。

また、以上の 3 つの排出パターンと術後愁訴、食事摂取量、体重変化、内視鏡所見との関係を術後 3, 6, 12, 24 ヶ月、内視鏡所見のみ 12 ヶ月時点で比較検討した。

【結果】

PPG の胃排出曲線を排出パターンに分類すると、R-type は存在せず、I-type が 45 例中 33 例 (73.3%)、D-type が 45 例中 12 例 (26.7%) であった。排出パターンと術後愁訴、食事摂取量、体重変化、内視鏡所見との関係では、I-type の症例では 3, 6, 12 ヶ月の時点で、D-type の症例と比較し、有意に愁訴を訴える患者の頻度が低かった ($p < 0.05$)。1 回食事摂取量も I-type の症例では 6 ヶ月から改善し、12, 24 ヶ月の時点では D-type よりも健常時の 80% 以上摂取可能であった症例の割合が低かった ($p < 0.05$)。体重変化の検討でも、24 ヶ月後で I-type の症例では、D-type に比較し体重の回復が有意に良好な結果であった ($p < 0.05$)。内視鏡所見においては、排出パターンと (食道炎、

残胃炎, 食物残渣, 胆汁逆流の所見) に差がなかった。

【考察】

RI 胃排出シンチグラフィーは, 残胃機能評価だけでなく術後の QOL を反映し, 胃術後の機能評価に有用であることが示唆された。

今後, この様な客観的評価方法を用い, 残胃の運動に影響を与えられる胃切除範囲, 神経温存の有無を詳細に検討することによって, 機能温存術式の合理的な術式の確立が可能となり, 胃癌術後患者の QOL 向上にとって有効なものとなると思われる。

審査の結果の要旨

胃切除後の長期的な QOL の向上のために種々の機能温存手術術式が選択されているが, 客観的な残胃機能評価法は確立されていない。本臨床研究は RI 胃排出シンチグラフィー法を開発し, 残胃内 RI 停滞率や胃排出曲線を求め, これらの結果と長期的な臨床データ, あるいは残胃内視鏡所見とを対比検討している。本シンチグラフィー法の経時的データが単に残胃の機能, 評価にとどまらず, 術後の QOL をも反映し得ることを明らかにしている。術後長期経過後の残胃の客観的な機能評価法を得ることよりさらなる機能温存を重視した合理的な術式の確立が可能となる。博士号に値すると認められた。

平成 20 年 1 月 31 日発行 第 59 巻 第 2, 3, 4 合併号の博士学位論文(内容の要旨および審査の結果の要旨 平成 18 年度)の P 5 に掲載しました【1409】京井志織氏の論文審査委員に下記のとおりの誤りがありました。お詫びして訂正させていただきます。

【1409】京井志織氏の論文審査委員

正: 主査(教授) 松田博子 (教授) 今村洋二 (教授) 岩坂壽二

誤: 主査(教授) 岩坂壽二 (教授) 今村洋二 (教授) 松田博子