

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 の 結 果 の 要 旨

平 成 21 年 度

平 成 22 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 22 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
1517	甲 第 853 号	西 田 晃 久	Allogeneic intra-BM-BMT plus adult thymus transplantation from same donor has benefits for long-term survival even after sublethal irradiation or low-dose BM cell injection.....	201
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079314		
1518	甲 第 854 号	楊 培 慧	Resting muscle sympathetic nerve activity, cardiac metaiodobenzylguanidine uptake, and exercise tolerance in patients with left ventricular dysfunction	202
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19159993		
1519	甲 第 855 号	梅 村 茂 雄	The effect of pharmaceutical adjunctive therapy with percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction	203
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16479244		
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836373		
1520	甲 第 856 号	中 村 正 孝	Phosphorylated Smad2/3 immunoreactivity in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis and its mouse model	204
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18210139		
1521	甲 第 857 号	鳥 居 芳 太 郎	Imidazoquinoline Acts as Immune Adjuvant for Functional Alteration of Thymic Stromal Lymphopoietin-Mediated Allergic T cell Response	205
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832690		
1522	甲 第 858 号	梅 田 眞 志	Activation of Rat Nucleus Pulposus Cells by Coculture with Whole Bone Marrow Cells Collected by the Perfusion Method.....	207
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752275		
1523	甲 第 859 号	溝 上 友 美	Preferential expansion of human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells on major histocompatibility complex-matched amnion-derived mesenchymal stem cells.....	208
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336739		
1524	甲 第 860 号	青 田 泰 子	Efficacy of an L- and N-type calcium channel blocker in hypertensive patients with neurovascular compression of the rostral ventrolateral medulla	209
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19521420		
1525	甲 第 861 号	松 山 加 耶 子	Relationship between pigment epithelium-derived factor (PEDF) and renal function in patients with diabetic retinopathy.....	210
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523656		
1526	甲 第 862 号	六 浦 裕 美	Depression and Anxiety Correlate Differently with Salivary Free Cortisol in the Morning in Patients with Functional Somatic Syndrome.....	212
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19662526		
1527	甲 第 863 号	大 西 静 生	Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis	213
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686706		

1528	甲 第 864 号	中 道 尚 人	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19139722	Synergistic effect of interleukin-6 and endoplasmic reticulum stress inducers on the high level of ABCG2 expression in plasma cells.....	214
1529	甲 第 865 号	吉 田 進	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782255	Prevention of contrast-induced nephropathy by chronic pravastatin treatment in patients with cardiovascular disease and renal insufficiency.....	215
1530	甲 第 866 号	蒋 时 文	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664292	Involvement of TORC2, a CREB co-activator, in the <i>in vivo</i> -specific transcriptional control of HTLV-1	216
1531	甲 第 867 号	辰 巳 貴美子	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467350	<i>Drosophila big brain</i> does not act as a water channel, but mediates cell adhesion	217
1532	甲 第 868 号	德 田 貴 則	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19506947	Mechanical Characteristics of Composite Knitted Stents.....	218
1533	甲 第 869 号	矢 吹 輝	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540526	CpG Oligonucleotides Activate the Immune Response in Burned Mice	219
1534	甲 第 870 号	小 薮 雅 紀	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087609	Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases.....	220
1535	甲 第 871 号	大 重 英 行	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425042	Flow cytometric analysis for the mechanism of the new antineoplastic agent temozolomide in glioma cells	221
1536	甲 第 872 号	矢 内 勢 司	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578737	Anti-tumor effects of fusion cells of type 1 dendritic cells and Meth A tumor cells using hemagglutinating virus of Japan-envelope	223
1537	甲 第 873 号	石 明	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599811	Intra-Bone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells Suspended in Collagen Gel Retains Injected Cells in Bone Marrow, Resulting in Rapid Hemopoietic Recovery in Mice	224
1538	甲 第 874 号	今 井 雄 一 郎	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686047	Caspase Inhibitor, ZVAD-fmk, Facilitates Engraftment of Donor Hematopoietic Stem Cells in Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation	225
1539	乙 第 667 号	松 矢 浩 暉	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288561	Regenerative effects of transplanting autologous mesenchymal stem cells on corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits	226
1540	乙 第 668 号	鉢 嶺 大 作	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497983	Involvement of Smad3 phosphoisoform-mediated signaling in the development of colonic cancer in IL-10-deficient mice	227
1541	乙 第 669 号	大 橋 敦	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19419504	Cerebral blood flow monitoring using a novel laser doppler flowmeter in asphyxiated infants	228
1542	乙 第 670 号	高 木 孝 士	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022623	Presence of donor-derived thymic epithelial cells in [B6 → MRL/lpr] mice after allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation (IBM-BMT).....	229
1543	乙 第 671 号	北 村 直 行	PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19674362	Effects of baby doctor-team interview on mood status of pregnant women with high risk delivery	230

1544	乙 第 672 号	榎 木 千 春	Enhanced Mesenchymal Cell Engraftment by IGF-1 Improves Left Ventricular Function in Rats Undergoing Myocardial Infarction	232
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19411121		
1545	乙 第 673 号	吉 村 健	Increased nitric oxide production by neutrophils in early stage of Kawasaki disease.....	233
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19020897		
1546	乙 第 674 号	三 宅 眞 理	Comparative Research between Australia and Japan A Comparison of the Quality of Healthcare in Nursing Facilities Using Actigraphy.....	234
	PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20446931		

【1517】

氏名(本籍) にし だ てる ひさ 西田 晃 久 (兵庫県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位番号 甲 第 853 号
 学位授与の日付 平成 21 年 5 月 26 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Allogeneic intra-BM-BMT plus adult thymus transplantation from same donor has benefits for long-term survival even after sublethal irradiation or low-dose BM cell injection

論文審査委員 主査(教授) 藺田精昭
 (教授) 木梨達雄 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【研究目的】

骨髄移植 (bone marrow transplantation: BMT) は白血病, 先天性免疫不全症, あるいは自己免疫疾患に有効性を示してきた。しかし BMT を安全に, かつ有効に行うには, できるだけ放射線量を減らし, 少ない細胞数で生着させる必要がある。今回, 我々は同種骨髄内骨髄移植 (intra-bone marrow-BMT: IBM-BMT) 法に胸腺移植を併用した BMT を行い, 低放射線照射または低骨髄細胞数での効果を調べた。

【研究方法】

実験 1: 低放射線照射 (Sublethal irradiation: SubLI)

5.5 Gy 放射線照射した 6-8 週齢 BALB/c マウス (H-2^d) に, 同週齢 C57BL/6 (B6) マウス (H-2^b) の骨髄細胞 1×10^7 個を IBM-BMT 法で移植し, 同時に B6 マウス胸腺を腎被膜下に移植 (adult thymus transplantation: ATT) する群, 又は脾細胞 1×10^7 個を注入 (donor lymphocyte infusion: DLI) する群も作製した。

実験 2: 低骨髄細胞数 (Low dose of bone marrow cell injection: LDBMCI)

7 Gy 放射線照射した BALB/c マウスに, B6 マウスの少量の骨髄細胞 3×10^6 個を同法で移植し, 同時に ATT 群, DLI 群も作製した。

【結果】

実験 1 では, 12 週で IBM-BMT+ATT 群, IBM-BMT 単独群ともに生存率は 90% 以上であったが, donor chimerism は IBM-BMT+ATT 群で 73%, IBM-BMT 単独群で 45% であった。実験 2 では, IBM-BMT+ATT 群は生存率 90% で, donor chimerism は 80% であった。IBM-BMT 単独群では生存率は 55% で, donor chimerism は 44% であった。IBM-BMT+DLI 群は両実験とも, donor

chimerism は 100% であったが, 5 週以内に全て GVHD で死亡した。

脾臓中の CD4⁺T 細胞数は, IBM-BMT+ATT 群が最も多く, 次に IBM-BMT 単独群で, IBM-BMT+DLI 群が最も少なかった。興味深いことに, CD4⁺T 細胞中における Foxp3⁺CD4⁺制御性 T 細胞数は, IBM-BMT+ATT 群と IBM-BMT 単独群ではほぼ同じであり, IBM-BMT+DLI 群は優位に低かった。また, 両実験とも, IBM-BMT+ATT 群, 及び IBM-BMT 単独群のマウスの脾リンパ球は十分な mitogen に対しての反応性を示したが, ホストの主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex: MHC) に対しては低反応であった。

【考察】

1. ドナーからの胸腺移植を併用した IBM-BMT 法は, 低放射線照射, 低骨髄細胞数においても, 従来の方法に比べ, 安全かつ有効な骨髄移植法の一つとなる可能性を示した。
2. その機構の一つに, 移植胸腺からの制御性 T 細胞が関与している可能性が考えられた。

なお, 本要旨に該当する内容は, Bone Marrow Transplant. 43: 829-837, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

同種造血幹細胞移植は, 造血器腫瘍や再生不良性貧血の根治療法として広く臨床応用されている。しかしながら, 移植細胞数の少ない場合や低放射線照射を前処置に用いた場合には生着不全が問題となる。本研究は, マウスの同種移植系において骨髄内骨髄移植に胸腺移植を併用することにより, 低放射線照射あるいは低骨髄細胞数の移植においても高い生存率とドナーキメリズムが得られることを明らかにしている。臨床応用に際して移植胸腺ドナーをどのように確保するかなどの課題はあるが, 将来的に新たな同種移植法の開発に繋がる基礎研究であり, 学位に値すると考えられた。

【1518】

氏 名 (本 籍) よう 楊 ます 培 え 慧 (兵庫県)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 854 号
 学位授与の日付 平成 21 年 5 月 26 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Resting muscle sympathetic nerve activity, cardiac
 metaiodobenzylguanidine uptake, and exercise
 tolerance in patients with left ventricular dysfunction
 論文審査委員 主査 (教授) 松田博子
 (教授) 中邨智之 (教授) 澤田 敏

論文内容の要旨

【研究目的】

心不全の特徴的な生理的所見の一つとして、交感神経活動の亢進と運動耐容能の低下が一般的に報告されている。しかし、この両所見が心ポンプ機能の良否でいかなる関係を有しているかは明らかではない。すなわち、運動時には、心臓では心拍出量の増加を認め、末梢では運動代謝産物により運動筋血管拡張が生じており、この両者のバランスにより運動時の血圧は維持されていると報告されている。心不全では安静時より交感神経活動の亢進が認められ、この交感神経の亢進は、心臓においては運動時の心拍出量を増加し運動筋への血流を維持する上で重要である。しかし、末梢においては運動筋血管拡張に拮抗して運動筋血管抵抗のさらなる上昇を生じるため運動筋血流の低下を生じていると考えられる。そのため心臓と末梢の交感神経活動は運動耐容能と関係していると推察される。本研究は、左室機能不全例において末梢交感神経活動と心臓交感神経活動の両者を同時に測定することにより、交感神経活動の亢進が運動耐容能に貢献しているか否かを検討した。

【対象・方法】

新たな虚血病巣を有さない左室機能不全例 30 例 (男性 25 名, 女性 5 名, 平均年齢は 57 ± 11 歳) を対象に、心電図, 呼吸分析, 動脈圧モニター下, ランプ負荷法にて座位エルゴメーターを用いた症候限界性心肺運動負荷試験を施行し, 運動耐容能の指標として peak VO_2 (最大酸素消費量) を求めた。同時に、心臓超音波法にて左室駆出率を、採血にて血中ノルエピネフリン濃度を測定した。2~3 日後に、 ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィーを用いて早期像 (early) と後期像 (delayed) を撮像し、心臓交感神経活性の指標として

early H/M (心臓/上縦隔比) と delayed H/M, washout ratio (WR: 洗い出し率) を計測した。さらに、筋交感神経活動 (MSNA) は微小神経電図法を用いて、1 分間の MSNA パースト出現数と 100 心拍の MSNA パースト出現数を計測した。

【結果】

対象を、peak VO_2 が 20 ml/min/kg 以上の運動耐容能良好群 (group I, $n=15$) と 20 ml/min/kg 未満の運動耐容能低下群 (group II, $n=15$) に分類し比較検討した。左室駆出率は両群間で有意差を認めなかった。しかし、group II において、血中ノルエピネフリンと MSNA は有意な高値 ($p<0.05$) を、WR は有意な亢進 ($p<0.05$) を、early H/M, delayed H/M は有意な低値 ($p<0.05$) を認め、運動耐容能の低下している例ほど交感神経活動の亢進が認められた。group II において、peak VO_2 は MSNA と WR と有意な負の相関関係 ($r=0.58, r=0.56$ いずれも $p<0.05$) を、early H/M, delayed H/M と有意な正の相関関係 ($r=0.71, r=0.75$ いずれも $p<0.01$) を認めた。さらに、group II では MSNA は early H/M と delayed H/M と有意な負の相関関係 ($r=0.78, r=0.66$ いずれも $p<0.05$) を、WR と有意な正の関係 ($r=0.79, p<0.001$) を認めた。しかし、group I では各々に有意な関係は認められなかった。以上より、運動耐容能良好群に比し運動耐容能低下群では、心臓と末梢の交感神経活動が綿密に連携することにより運動耐容能に関与していると考えられた。

【結語】

左室機能が保たれている例では交感神経活動が動員されることなく運動耐容能が維持されている。これに対して、運動耐容能の低下した左室機能不全例では、心臓と末梢の交感神経活動の連携が運動耐容能の規定因子として重要な役割を果たしていると考えられた。

なお、本要旨に該当する内容は J Nucl Cardiol. 16: 244-250, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

30 例の左室機能不全例で、運動耐容能、心臓交感神経活動、筋交感神経活動を測定した。運動耐容能低下群では、低下の程度に応じて、心臓と末梢の交感神経活動がともに増加していた。心臓交感神経活動が先行して亢進し、引き続いて全身の交感神経活動が亢進する結果、骨格筋の血管が収縮し低灌流になるため、あるいは骨格筋交感神経亢進により乳酸の産生が増加するため、運動耐容能が低下する可能性が考察された。心臓と末梢の両方の交感神経活動を測定して得られた成果は学位に値すると思われる。

【1519】

氏 名 (本 籍) うめ むら しげ お (大阪府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 855 号
 学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

The effect of pharmaceutical adjunctive therapy with
 percutaneous coronary intervention in patients with
 acute myocardial infarction

論文審査委員 主査 (教授) 中邨智之
 (教授) 松田博子 (教授) 湊 直樹

論文内容の要旨

【はじめに】

急性心筋梗塞症例に対する経皮的冠動脈インターベンション (percutaneous coronary intervention: PCI) によって責任血管の開存 (再疎通) を得ても, 心筋救済効果および慢性期の左室機能改善が乏しい症例がある。これら症例では, 心筋微小循環障害である no-reflow が大きく関与している。no-reflow の診断法としては血管造影, 心筋コントラストエコー, 核医学的心筋灌流評価 (SPECT) などの評価法によって検討がなされている。それに対し種々の薬剤追加治療が試みられているものの, 未だ一定の見解は得られていない。

【研究目的】

本研究は急性心筋梗塞に対する PCI への薬剤追加治療として, ベラパミル (第一編) およびニコランジル (第二編) の投与が心筋血流, バイアビリティ, そして心機能に与える影響を検討した。

【研究方法】

第一編では, 急性心筋梗塞で PCI を行った連続 101 例のなかで, PCI 後に血管造影遅延 (angiographic no-reflow) を認めた症例を対象とし, ベラパミル投与群と非投与群の 2 群に分けた。ベラパミルの投与方法としては angiographic no-reflow を認めた時点で冠動脈内投与を行った。両群とも PCI の施行前後と 1 ヶ月後に心筋血流製剤 (Tc-99m Tetrofosmin) を用いた SPECT を行った。SPECT 解析は心筋を 13 分節に分け, 無集積 (3) から正常 (0) の 4 段階にスコア化し, 総和を defect score として算出した。また, PCI 施行前と 1 ヶ月後に心エコー図検査を行い, 同じく 13 分節に分け壁運動異常を無運動 (3) から正常 (0) の 4 段階にスコア化し, 壁運動異常分画数 (asynergic score) を求めた。PCI 施行前・後そして 1 ヶ月後のそれぞれのスコア変

化を検討した。

第二編では, 急性心筋梗塞で PCI を行った連続 199 例を対象とし, ニコランジル投与群とコントロール群の 2 群に分けた。ニコランジルの投与方法としては急性心筋梗塞の診断後, 静脈内投与を行った。第一編と同様に両群とも PCI の施行前および終了時と 1 ヶ月後に SPECT を用いた defect score と心エコー図検査による asynergic score を求め, PCI 施行前・後そして 1 ヶ月後のそれぞれのスコア変化を検討した。

【結果】

第一編: angiographic no-reflow は 32 例で認めた。ベラパミル投与群 (Group 1; n=18) と非投与群 (Group 2; n=14) の 2 群間で, PCI 施行前の defect score に有意差を認めないものの, 1 ヶ月後では Group 1 で Group 2 に対し有意に小さく ($p=0.003$), asynergic score も同様に Group 1 が Group 2 に対し有意に減少を示した ($p=0.03$)。また, Group 1 の defect score と asynergic score は angiographic no-reflow が認められなかった群 (Group 3; n=69) と同様の改善を示した。さらに, 多変量解析を行った結果, ベラパミル投与は PCI 後の心筋救済効果を規定する独立規定因子であった ($p=0.002$, $OR=22.4$)。

第二編: ニコランジル投与群 (n=101) とコントロール群 (n=98) の 2 群間で, PCI 施行前の asynergic score に有意差は認めないものの, defect score はニコランジル群でコントロール群に対し有意に小さかった ($p<0.0001$)。さらに, 多変量解析を行った結果, ニコランジル投与は PCI 前の心筋リスクエリア内におけるバイアビリティを保持する独立規定因子であった ($p<0.0001$)。また defect score, asynergic score とともに 1 ヶ月後ではニコランジル群でコントロール群に対し有意に減少を示した ($p=0.0006$, $p=0.0015$)。

【考察】

第一編: 急性心筋梗塞における PCI 時に angiographic no-reflow を伴う症例へのベラパミル冠動脈内投与は, 心筋血流および機能的改善をもたらすと考えられた。

第二編: 急性心筋梗塞における PCI 前のニコランジル経静脈投与は, 心筋リスクエリア内におけるバイアビリティを保持すると考えられた。

【総括】

急性心筋梗塞における PCI はその予後を飛躍的に改善した。しかし, PCI を行ったものの心筋救済効果が乏しい症例も存在し, その予後は依然として不良である。本研究における薬剤追加治療は, 急性心筋梗塞のさらなる予後改善に寄与すると考えられ, 臨床上積極的に適用すべきである。

なお, 本要旨に該当する内容は, Nucl Med Commun.

27: 247–254, 2006, 同誌 29: 956–962, 2008 に掲載されている。

審査の結果の要旨

急性心筋梗塞に対する経皮的冠動脈インターベンション（PCI）によって責任血管を再開通しても、約 3 割の症例では no-reflow とよばれる心筋微小循環障害のために心機能の改善が悪い。本臨床研究で梅村氏は PCI 直後にベラパミル冠動脈内投与（投与群 18 例、非投与群 14 例）または PCI 前にニコランジル静脈内投与（投与群 101 例、非投与群 98 例）を行い、これらの薬物療法が PCI 後の心筋血流・心機能改善をもたらすことを明らかにした。本研究は临床上すぐに活用できる成果をあげたものであり、学位に値する。

【1520】

氏 名（本 籍） なか むら まさ たか 中 村 正 孝（山梨県）
 学 位 の 種 類 博士（医学）
 学 位 番 号 甲 第 856 号
 学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Phosphorylated Smad2/3 immunoreactivity in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis and its mouse model

論文審査委員 主査（教授）山田久夫
 （教授）杉本哲夫 （教授）河本圭司

論文内容の要旨

【目的】

Transforming growth factor (TGF)- β はセリン・スレオニンキナーゼ型受容体に結合し、このシグナルによってリン酸化された Smad2/3 (pSmad2/3) が、核内に移行し転写調節因子として働くことが知られている。正常成人の中枢神経系では TGF- β 濃度は低い、虚血や外傷などの神経損傷において急速に発現量が増加するという事実、マウスの中大脳動脈閉塞による梗塞範囲が TGF- β の脳室内前投与により縮小することや、ラットの海馬神経細胞でアミロイド β の神経毒作用が TGF- β の前投与により有意に減少するという実験結果から、TGF- β には神経保護効果があると、一般に信じられている。

一方、Alzheimer 病 (AD) の患者でも血清・髄液の TGF- β 濃度が上昇しており、脳内で TGF- β 遺伝子の転

写も亢進している。AD の神経原線維変化 (NFT) が免疫組織化学的に抗 pSmad2/3 抗体に陽性で、NFT を有する神経細胞では pSmad2/3 の核の染色性が低下していたという報告もあり、これらの細胞では pSmad2/3 の核内移行が阻害された結果 TGF- β のもつ神経保護効果が発揮されず、神経変性をきたすことが示唆される。

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : 以下 ALS) 患者の血清・髄液でも TGF- β 濃度、mRNA 量が増加しているとの報告があることから、AD の場合と似たような機序で病態形成がおこなわれている可能性が考えられる。ALS のうち、家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) とその病態モデル動物である G93A 変異 SOD1 transgenic (G93A Tg) マウス、および別型と考えられる孤発性筋萎縮性側索硬化症 (SALS) を対象に、pSmad2/3 を指標にした免疫組織化学的解析をおこなうことを目的とする。

【方法】

対象として、SALS 患者 8 例、FALS 患者 3 例 (A4V SOD1 mutation) と正常対照者 8 例の剖検腰髄、および、雌の G93A Tg マウス 12 匹と週齢を合わせた雌の正常対照マウス 12 匹の腰髄をもちいた。ホルマリン固定パラフィン包埋組織から得られた切片に pSmad2/3 に対する抗体を適用し酵素抗体法で免疫組織化学を施行した。なお、SALS に蓄積するユビキチン封入体の主要構成成分として、核タンパク質の一種である TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) が同定されていることから、pSmad2/3 と ubiquitin、および pSmad2/3 と TDP-43 に対する蛍光二重免疫組織化学法でも検索した。

【結果】

SALS 患者腰髄前角では、運動ニューロン細胞体の細胞質内に出現する円形硝子封入体 (RHIs) とスケイン様封入体 (SLIs) は pSmad2/3 抗体に対し、中等度ないし強度の陽性を示していた。これらの封入体をもつニューロンの核は中等度の陽性であったが、封入体を持たないニューロンの核は強陽性であった。SALS 疾患特異的な Bunina 小体は陰性であり、この小体をもつニューロンの核は強陽性であった。さらに、RHIs における蛍光二重染色の所見では、pSmad2/3 と ubiquitin、TDP-43 との共存が観察された。一方、FALS 患者と G93A Tg マウスに見られるレビー小体様硝子封入体 (LBHI) は pSmad2/3 抗体に対し陰性を呈していたが、運動ニューロンの核は pSmad2/3 抗体に対し強度の染色性を示していた。

【考察】

SALS 患者、FALS 患者、Tg マウスすべてにおいて、

pSmad2/3 を含有する封入体を持たないニューロンの核では pSmad2/3 染色性が増強していたことから、SALS 患者、FALS 患者、Tg マウスでは TGF- β シグナル伝達が活性化された状態であると考えられた。しかし pSmad2/3 を含有する RHIs のある SALS 患者の前角ニューロンの核では pSmad2/3 染色性が増強していなかったことから、この封入体を有する細胞では、AD の場合と同様、pSmad2/3 の核への輸送障害が生じている可能性が示唆された。pSmad2/3 が SALS 患者の RHIs と SLIs に存在するメカニズムは現時点で不明であるが、pSmad2/3 が ubiquitin や TDP-43 と共存し、かつ封入体が一様の染色性を示したことから、一連のタンパク質が封入体形成に関与したものと推察される。さらに、FALS 患者や Tg マウスにみられる LBHIs は pSmad2/3 陰性であったことから、SALS 患者の場合と SOD1 変異である FALS 患者や Tg マウスの場合とでは封入体形成過程や神経変性機序が異なると考えられる。

先に報告のあった AD と同様に今回の研究から、本来核内に局在すべき pSmad2/3 が、SALS 患者の細胞質内封入体にも局在することが明らかとなった。このことは、TGF- β シグナル伝達系の異常が AD と SALS に共通する神経変性機序である可能性を示唆している。今後、Smad 系の細胞質-核間移動の異常を他の神経変性疾患で検討することにより、神経変性の機序を理解する手がかりが得られると考える。

なお、本要旨に該当する内容は *Acta Neuropathol.* 115: 327-334, 2008 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は、孤発性および家族性筋萎縮性側索硬化症患者の剖検標本とモデル動物を用いた免疫組織化学的研究で、TGF- β シグナル伝達系の主要因子である pSmad2/3 の細胞内局在と染色強度が疾患型や封入体の種類によって異なることを明らかにし、封入体形成や神経変性機序を考察したものである。未知の部分が多い神経難病の病態解明に有用な知見を提供しているとみなされ、博士（医学）の学位に値すると判断した。

【1521】

氏 名（本 籍） 鳥 居 芳太郎（滋賀県）
学 位 の 種 類 博士（医学）
学 位 番 号 甲 第 857 号
学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Imidazoquinoline Acts as Immune Adjuvant for
Functional Alteration of Thymic Stromal

Lymphopoietin-Mediated Allergic T cell Response

論文審査委員 主査（教授）木梨達雄
（教授）池原 進 （教授）藺田精昭

論文内容の要旨

【背景・目的】

近年、先進諸国ではアレルギー疾患の増加が顕著であり、その制御が重要な課題となっている。アレルギー性炎症は Th2 細胞から産生されるサイトカイン（IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α ）によって引き起こされる異常な免疫反応であり、近年、アレルギーカスケードの上流でアレルギー誘導因子として作動する胸腺間質リンパ球増殖因子：thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の存在が明らかにされた。TSLP はアトピー性皮膚炎患者の上皮細胞（ケラチノサイト）や気管支喘息患者の気道粘膜に過剰発現し、ミエロイド樹状細胞（dendritic cells: DC）を活性化する。活性化された DC は炎症性 Th2 サイトカイン産生 T 細胞を誘導する。その際、DC 上に発現する OX40 リガンド（OX40L）がこの炎症性 Th2 細胞を誘導する責任分子である。

従来、アレルギー疾患の治療法は、アレルギーカスケードのエフェクターである B 細胞や好酸球、肥満細胞、そしてこれらが産生する化学伝達物質をターゲットとして開発された。本研究の目的は、従来のターゲットと異なり、アレルギーカスケードの起点に位置する DC 機能の制御によりアレルギー疾患の治療法の開発を目指すことにある。我々が候補とした薬剤は抗ウィルス外用剤（Imiquimod : (Aldara®・ベセルナクリーム®））として臨床使用されている imidazoquinoline 合成化合物の誘導体 R848 である。R848 は Toll-like receptor (TLR8) のリガンドであり、DC を介して強力な Th1 誘導能を有するアジュバンドである。この免疫アジュバンドの刺激によって炎症性 Th2 細胞分化誘導能の制御が可能になれば、アレルギー疾患の有効な治療法の開発につながる。この作業仮説のもとに、R848 の TSLP 刺激-DC (TSLP-DC) に及ぼす影響

を検討した。

【方法】

健康人ドナーの末梢血からマグネチックビーズ法およびセルソーターを用いて CD11c⁺ DC, CD4⁺ naive T 細胞, CD4⁺ memory T 細胞である CCR2⁺ T 細胞を単離した。

1. TSLP または R848 の刺激による DC の OX40L を含めた表面マーカーの発現, サイトカイン産生能, および Th 細胞誘導能を検討した。
2. TSLP または R848 の刺激による DC を, 純化した allogeneic CD4⁺ naive T 細胞ならびに CD4⁺ memory T 細胞とそれぞれ共培養し, Th1 細胞および Th2 細胞の誘導能を細胞内サイトカイン染色により検定した。
3. T 細胞 suppression assay を用いて, TSLP/R848-DC によって誘導されたヘルパー T 細胞の増殖抑制能 (制御能) を検討した。

【結果】

1. R848 による, TSLP- 刺激 DC の持つ炎症性 Th2 誘導能の阻害の検証

TSLP-DC は CD4⁺ naive T 細胞を炎症性 Th2 サイトカイン産生の T 細胞へ誘導した。しかし, TSLP/R848-DC と CD4⁺ naive T 細胞の共培養ではその誘導が阻害され, 大量の IFN- γ と IL-10 を産生する T 細胞を誘導した。

2. R848 による, TSLP- 刺激 DC の持つ memory Th2 維持能の阻害の検証

TSLP-DC は Th2 細胞へと分化したエフェクター T 細胞の増殖を促進し, Th2 サイトカイン産生をより増強することでアレルギー性炎症の維持に寄与していることが明らかにされた。また TSLP/R848-DC は Th2 型 CD4⁺ memory T 細胞の増殖と炎症性 Th2 サイトカインの産生も抑制した。以上から, R848 は TSLP-DC の持つ炎症性 memory Th2 維持能を阻害することが示された。

3. R848 刺激 DC の誘導する T 細胞の制御機能の検討

TSLP/R848-DC から誘導された T 細胞は共培養された naive T 細胞や Th2 型 CD4⁺ memory T 細胞の増殖能を抑制した。そして IL-10 中和抗体を添加するとこの抑制は解除されたことから, T 細胞産生の IL-10 に依存する抑制メカニズムと推察された。すなわち, TSLP/R848-DC により誘導される Th1 細胞は機能的にも制御性 T 細胞であることが確認された。

4. R848 による炎症性 Th2 誘導阻害能のメカニズムを検討

TSLP-DC は炎症性 Th2 誘導因子である OX40L を発

現するが, TSLP/R848-DC ではそれが抑制された。また TSLP-DC は Th1 誘導サイトカイン IL-12 は産生しないが, TSLP/R848-DC では IL-12 産生が認められた。TSLP/R848-DC と CD4⁺ naive T 細胞の共培養の系に IL-12 の中和抗体を添加すると IFN- γ 産生が減弱し, さらにリコンビナント OX40L を添加すると炎症性 Th2 サイトカインの産生増加が認められた。すなわち, R848 は DC の IL-12 産生誘導と OX40L の発現抑制を同時に惹起することにより, TSLP-DC の持つ炎症性 Th2 誘導能を阻害することが証明された。

【考察】

Imidazoquinoline の誘導体である R848 は TLR8 のリガンドである。今回我々は, R848 が TSLP による炎症性 Th2 誘導性 DC を制御性 Th1 誘導性 DC に変換すること, そしてこの機能変換は DC の細胞表面に発現する OX40L の発現抑制と DC が産生する IL-12 に依存することを明らかにした。我々は, 先に TLRs 2 & 4 のリガンドとして知られる BCG によっても同様の現象を誘導出来ることを報告している (Int Immunol 2008)。R848 と BCG は, それぞれ異なる受容体に刺激を与えるが, 細胞内においては同じシグナル伝達経路を使っている可能性がある。この機構の解明は, 従来とは根本的に異なる抗アレルギー薬の開発に貢献する。

なお, 本要旨に該当する内容は *J Immunol.* 181: 5340–5349, 2008. に掲載されている。

審査の結果の要旨

アトピー性皮膚炎を誘発するサイトカイン TSLP は末梢血由来骨髄性樹状細胞 (DC) に作用して naive T 細胞を Th2 型 T 細胞に分化させる活性を誘導する。鳥居氏らは, 抗ウイルス外用剤である Imidazoquinoline の誘導体であり, TLR8 のリガンドである R848 が, TSLP 刺激 Th2 誘導性 DC を制御性 Th1 誘導性 DC に変換できることを明らかにし, その機序として STAT5 リン酸化抑制, OX40L の低下と IL-12 産生誘導が関与していることを示した。これは R848 がアトピー性皮膚炎の抗アレルギー薬として資する可能性を示唆しており, 学位に値する研究と認められる。

【1522】

氏名(本籍) うめ だ まさ ゆき 梅田真志(大阪府)
 学位の種類 博士(医学)
 学位番号 甲 第 858 号
 学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Activation of Rat Nucleus Pulposus Cells by
 Coculture with Whole Bone Marrow Cells Collected
 by the Perfusion Method

論文審査委員 主査(教授) 蘭田精昭
 (教授) 木梨達雄 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、変性椎間板に対する治療として、動物モデルで椎間板内への遺伝子導入やサイトカイン療法が報告されているが、長期的な安全性については不明な点が多い。自己細胞移植では、椎間板細胞や間葉系幹細胞が使われており、良好な結果を得ている。しかし、椎間板細胞や間葉系幹細胞は体外で培養するため、専用設備の整備が必要となり、実施施設に限られる。

従来方法である吸引法で採取した新鮮全骨髄細胞の使用は、末梢リンパ球や赤血球が混入するため、その使用は困難であった。今回我々は、末梢血の混入を防ぐことが可能な灌流式骨髄細胞採取法により採取した新鮮全骨髄細胞と椎間板髄核細胞を共培養し、椎間板髄核細胞への影響を検討した。

【研究方法】

① Fisher344/slc ラット雄(体重 220-250 g)を使用した。② 骨髄細胞は、灌流法と吸引法の 2 種類で採取した。灌流法は、大腿骨転子部より生理食塩水を 5 cc 注入し、大腿骨顆部より骨髄細胞を採取した。吸引法は、大腿骨顆部より骨髄細胞を吸引し採取した。③ 髄液中の末梢血の混入を検討するため、CD4 と CD8 陽性 T 細胞の割合を測定し、さらに、赤血球/白血球比を計測した。④ 椎間板髄核細胞は尾椎より摘出した。⑤ 3 グループを作成 (i) 椎間板髄核細胞の単独培養; NPCs alone 群, (ii) 椎間板髄核細胞と間葉系幹細胞との共培養; NPCs+MSCs 群, (iii) 椎間板髄核細胞と新鮮全骨髄細胞との共培養; 全骨髄細胞群とした。さらに、全骨髄細胞群を、2 グループに細分化 (i) 灌流法により採取した新鮮全骨髄細胞と椎間板髄核細胞との共培養; NPCs+BMCs by PF 群, (ii) 吸引法により採取した新鮮全骨髄細胞と椎間板髄核細胞との共培養;

NPCs+BMCs by AS 群とした。⑤ 細胞増殖能は、培養 2 週後の椎間板髄核細胞の増殖数と [³H]-thymidine の uptake, cell cycle の G₁ phase の測定で評価した。細胞外器質の合成能は、RT-PCR のアグリカンの発現と 3 次元培養下における、[³⁵S]-sulfate の uptake を評価した。増殖因子の評価として、TGF-β を培養 2 日後に測定した。

【結果】

新鮮全骨髄液中における CD4 と CD8 陽性 T 細胞の割合と赤血球/白血球比は吸引法に比べ、灌流法では有意に少なかった。② 培養後 14 日目の椎間板髄核細胞の増殖数、[³H]-thymidine の uptake, cell cycle のいずれにおいても、全骨髄細胞群は NPCs alone 群と NPCs+MSCs 群に比べて有意に活性化していた。③ RT-PCR のアグリカンの発現と [³⁵S]-sulfate の uptake はどちらも、全骨髄細胞群が、NPCs alone 群と NPCs+MSCs 群に比べて有意に活性化していた。④ 培養 2 日後の TGF-β 分泌量は、全骨髄細胞群が、NPCs alone 群と NPCs+MSCs 群に比べて有意に活性化していた。② から④ の測定について、NPCs+BMCs by PF 群と NPCs+BMCs by AS 群には有意差を認めなかった。

【考察】

新鮮全骨髄細胞は、培養された間葉系幹細胞に比べ、椎間板髄核細胞の細胞増殖能力と細胞外器質の合成能力を亢進させることが可能であった。また、椎間板細胞の増殖能力と細胞外器質の両方を活性化する因子の 1 つである TGF-β の産生量が全骨髄細胞群で、有意に亢進していた。今回使用した間葉系幹細胞は、培養後の接着細胞のみを回収するため、造血幹細胞やより未分化な幹細胞が除去される可能性がある。一方、新鮮全骨髄細胞ではそれらすべてが含まれており、全骨髄細胞群は NPCs+MSCs 群に比べ、良好な結果が得られたと考えられた。さらに、従来の吸引法により採取した新鮮全骨髄細胞は、末梢血の混入が多く、使用には制約があったが、灌流法は末梢血の混入を防ぐことが可能である。このため、灌流法は椎間板再生において有用な骨髄採取法となる可能性が示唆された。

なお、本要旨に該当する内容は、*J Orthop Res.* 27: 222-228, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は、ラット椎間板髄核細胞を新鮮全骨髄細胞(吸引法及び灌流法で採取)と共培養することにより、G1 期細胞比率の低下、II 型コラーゲンとプロテオグリカンの発現増加が見られることを明らかにしている。この椎間板髄核細胞の活性化機序として、細胞増

殖能力と細胞外基質の両方を活性化する TGF- β の関与を示唆している。また、灌流法で採取した骨髓細胞は、従来の吸引法に比べて末梢血の混入が少なく、臨床応用する際に有利であると考えられた。本研究は、変性椎間板の再生治療の可能性を示唆した点で価値ある研究と認められる。

【1523】

氏 名 (本 籍) みぞ かみ とも み 溝 上 友 美 (和歌山県)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 859 号
学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目

Preferential expansion of human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells on major histocompatibility complex-matched amnion-derived mesenchymal stem cells

論 文 審 査 委 員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 木梨達雄 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【目的】

骨髓移植の生着率向上のための基礎実験により、マウス造血幹細胞 (HSC) と骨髓ストローマ細胞/間葉系幹細胞 (MSC) との間に、主要組織適合遺伝子複合体拘束性 (MHC restriction) が見られることが明らかになっている (Blood, 1997 & Stem Cells, 1997 & Stem Cells, 2001)。本研究では、ヒトにおいても同様の MHC restriction が機能しているかを解析する目的で、ヒト羊膜由来の付着性 (ストローマ) 細胞の MSC としての特性の有無ならびに、臍帯血由来造血前駆細胞 (HPC) との間に MHC restriction が存在するか否かについて検討した。

【研究方法】

選択的帝王切開術施行の正期産妊婦より同意を得た後、臍帯血と羊膜を採取した。臍帯血より密度勾配遠心法にて得られた単核細胞 (使用時まで凍結保存) より成熟細胞を除去し、さらにソーティングにより HPC 濃縮画分 (Lin⁻CD34⁺ cells) を精製した。羊膜を酵素処理して得られた単細胞を rhb-FGF 含有培地で培養し、付着性細胞を得た。

① Lin⁻CD34⁺ cells の Clonal cell culture assay を行い、HPC の含有率を解析した。

② 羊膜由来付着性細胞の増殖能、表面分子の発現、多分化能を解析した。

③ 羊膜由来付着性細胞と臍帯血由来 Lin⁻CD34⁺ cells の共培養による HPC-proliferation assay, Long-term culture-initiating cell (LTC-IC) assay を行い、in vitro での羊膜由来付着性細胞の造血支持能を評価した。なお、Short tandem repeat (STR) マーカーを用いた DNA 解析・Mixed lymphocyte reaction (MLR) 解析により、本研究に用いた羊膜由来付着性細胞が胎児由来であることを確認した。

④ さらに、共培養系の培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA assay にて解析した。

【結果】

① 臍帯血由来 Lin⁻CD34⁺ cells には、その形態的な評価・増殖能・分化能より未分化な造血前駆細胞が多数含まれていることが判明した。

② 羊膜由来付着性細胞は、その形態的な評価・増殖能・表現型・多分化能 (骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞への分化) より MSC としての能力を有することが判明した。

③ この羊膜由来付着性細胞は、臍帯血由来 Lin⁻CD34⁺ cells を短期 (HPC-proliferation assay) だけでなく長期 (LTC-IC assay) にわたってもサポートし、そのサポート能力は、同一胎児由来の組合せの場合 (MHC 一致) の方が、別の胎児由来の組合せの場合 (MHC 不一致) よりも高いことが判明した。

④ 培養上清中の種々のサイトカイン濃度を測定したところ、GM-CSF のみが、同一胎児由来の組合せの場合に、別の胎児由来の組合せの場合よりも有意に高値であった。他のサイトカイン (M-CSF, G-CSF, SCF, LIF, IL-6) については、有意差は認められなかった。

【考察】

本研究により、ヒト羊膜由来付着性細胞は MSC としての性状を有し、臍帯血由来 HPC の増殖・分化を支持・促進する能力があること、この両者の間に MHC restriction が存在することが明らかになった。LTC-IC assay 後回収された細胞の造血コロニー形成率が MHC 一致の組合せで高いことから、その機序としては、臍帯血由来 HPC と羊膜由来 MSC 間の相互作用に MHC が何らかの影響を及ぼしている可能性、GM-CSF などのサイトカインによる影響などが考えられる。現在、このメカニズムについて更なる検討を加えるとともに、SCID マウスへの移植実験による in vivo での評価をすすめている。

MHC 一致羊膜由来 MSC には、MHC 不一致のものとは比べてより高い臍帯血由来 HPC の増殖の支持・促

進能があることから、MHC 一致羊膜由来 MSC を臍帯血移植に導入できれば、臍帯血移植の問題点（移植細胞数不足や血球回復の遅延）を克服できる可能性が示された。すなわち、羊膜由来 MSC を臍帯血由来 HPC の feeder cells として使用し、増殖した HPC を臍帯血移植に使用するという可能性、あるいは羊膜由来 MSC を臍帯血由来 HPC と共に移植することにより造血系の早期からの十分な回復を促進し、臍帯血移植の問題点（血球回復遅延による感染症のリスク）を克服できる可能性などである。羊膜由来 MSC を用いた新しい臍帯血移植法を開発・確立するために、臨床応用に必要安全性の確認などを含め、今後さらに研究を進めてゆきたい。

なお、本要旨に該当する内容は Haematologica 94: 618-628, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は、ヒト羊膜由来の付着性細胞が間葉系幹細胞の性状を有し、ヒト臍帯血由来の造血前駆細胞（HPC）の増殖・分化を支持・促進する能力があることを示している。さらに、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）が HPC と一致する羊膜由来付着性細胞により強い増殖促進効果があることから、MHC 拘束性の存在を示唆している。臨床的にも、従来の臍帯血移植法の問題点（移植細胞数の不足や造血回復の遅延）を、羊膜由来付着性細胞との共培養あるいは共移植によって克服できる可能性を示唆しており、学位に値する価値ある研究と認められる。

【1524】

氏名（本籍） あお た やす こ 青田 泰子（兵庫県）
学位の種類 博士（医学）
学位番号 甲 第 860 号
学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Efficacy of an L- and N-type calcium channel blocker in hypertensive patients with neurovascular compression of the rostral ventrolateral medulla

論文審査委員 主査（教授）高橋伯夫
（教授）松田博子 （教授）中邨智之

論文内容の要旨

【研究背景】

延髄の腹側表面に存在する頭側延髄腹外側野（rostral ventrolateral medulla, RVLM）は交感神経活動の制御中枢であり、血管運動中枢ともよばれる領域である。1978 年の Jannetta らによる報告以来、RVLM への動脈による圧迫と本態性高血圧の関連についての報告が散見されるようになった。我々のグループも本態性高血圧患者の一部では RVLM への動脈による圧迫が交感神経活動の亢進を介して高血圧の成因に関与する可能性（Hypertension 1997, J Hypertens 1999）、および圧迫解除術により交感神経活動が抑制され高血圧が治癒する症例が存在すること（Stroke 1999）を報告した。さらに RVLM への動脈による圧迫、難治性高血圧を認める慢性腎不全患者において中枢性の交感神経活動抑制薬であるクロニジンが著効を示し、十分な降圧と腎機能の改善が得られた症例を報告した（Hypertens Res 2009）。従って RVLM への圧迫を認める本態性高血圧患者においては、交感神経活動を抑制する降圧薬が有用であると考えられるが詳細は不明である。

【研究目的】

そこで本研究では、L 型カルシウムチャンネルのみならず、N 型カルシウムチャンネルに対する拮抗作用により交感神経活動の抑制作用を有するシルニジピンの、RVLM への圧迫を認める本態性高血圧患者における有用性について検討した。

【研究方法】

対象は 2006 年 4 月から 2008 年 3 月までに関西医科大学附属枚方病院を受診し、診察室血圧が 140/90 mmHg 以上の未治療本態性高血圧患者である。過去 6 ヶ月以内に脳・心血管障害を発症した患者や慢

性腎不全患者、妊娠女性や悪性疾患患者を対象から除外した。全例に対し、延髄部の高分解能 MRI 3D thin-slice T2 強調像（使用装置：GE Signa Excite 1.5 テスラ、スライス厚：1.4 mm）を撮像した。患者情報を知らされていない 2 人の放射線科専門医師が、RVLM への圧迫の有無を評価し、RVLM への圧迫を認める（NVC+）群と認めない（NVC-）群に分類した。全例においてシルニジピン 10 mg/日を 16 週間単独投与し、治療による血圧、血漿ノルエピネフリン（NE）値、心エコー図より求めた左室心筋重量係数（LVMI）の変化を 2 群間で比較検討した。

【結果】

対象となった 46 例は NVC+ 群 24 例と NVC- 群 22 例に分類された。NVC+ 群 24 例のうち、13 例においては左側 RVLM への動脈による圧迫を認め、7 例においては右側、4 例においては両側への圧迫を認めた。年齢、性別、body mass index、血圧、脈拍数、BUN、CRE、CRP、HbA1c、脂質値は 2 群間で有意差はなかった。一方、NVC+ 群では NVC- 群に比し血漿 NE 値が有意に高値（ 392 ± 152 pg/mL vs. 512 ± 158 pg/mL, $p < 0.05$ ）であり、交感神経活動が亢進していることが再確認された。シルニジピン投与による収縮期血圧（NVC- group: 24.1 ± 16.7 vs. NVC+ group: 38.5 ± 14.7 mmHg, $p < 0.05$ ）、拡張期血圧（ 14.3 ± 11.8 vs. 26.0 ± 14.8 mmHg, $p < 0.05$ ）、NE 値（ 60 ± 199 vs. 186 ± 174 pg/mL, $p < 0.05$ ）、LVMI（ 1.3 ± 18.3 vs. 20.2 ± 23.5 g/cm², $p < 0.05$ ）の低下は NVC+ 群において NVC- 群に比し有意に大であった。

【考察】

RVLM への動脈による圧迫を認める本態性高血圧患者では交感神経活動が亢進していること、および RVLM への圧迫解除術により高血圧が治癒することより、RVLM への動脈による圧迫を認める高血圧は本態性高血圧ではなく二次性高血圧に分類される可能性が考えられる。今後この新しい二次性高血圧を確立するためには、その病態生理や治療法についての更なる検討が必要である。

治療法としては、圧迫解除術を選択肢の一つとして考慮することができる。しかし、圧迫解除術は侵襲性が高く圧迫を認める高血圧患者全例に適応を拡大することは困難であり、有効な降圧薬治療手段を模索すべきである。本研究では、N 型カルシウムチャネル拮抗作用に基づく交感神経活動の抑制作用を有するシルニジピンは、RVLM への圧迫を認める本態性高血圧患者において圧迫を認めない患者に比し、より強い交感神経活動抑制効果による降圧効果、および左室肥大の退縮効果を有することが示された。従って RVLM への

圧迫を認める本態性高血圧患者においては交感神経活動を抑制する薬剤が有用である可能性が示唆される。今後は L 型のみに対するカルシウム拮抗薬や他の交感神経抑制薬の効果についての検討が必要であると考えられる。

なお、本要旨に該当する内容は、Hypertens Res. 32: 700–705, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

延髄外腹側野が接する動脈で拍動性に刺激を受ける（圧迫）ことで機械的に交感神経活動を高める、その結果、高血圧をもたらす、本態性高血圧症の約半数で画像診断的にこれに該当する集団があると報告した。交感神経活動を抑制する N 型 Ca チャネルをも遮断する Ca 拮抗薬の効果を検証したところ、圧迫群では降圧度と交感神経活性抑制度が大きであったことから、この説を臨床的に支持したものである。

【1525】

氏 名（本 籍）	まつ やま か や こ 松 山 加 耶 子（大阪府）
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 番 号	甲 第 861 号
学位授与の日付	平成 21 年 9 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	

Relationship between pigment epithelium-derived factor (PEDF) and renal function in patients with diabetic retinopathy

論文審査委員 主査（教授）中邨智之
（教授）岩坂壽二 （教授）高橋伯夫

論文内容の要旨

【はじめに】

糖尿病の代表的な合併症として網膜症と腎症がある。日本の成人中途失明の原因では、糖尿病網膜症が現在第 2 位である。糖尿病網膜症では、高血糖の持続により網膜血管障害が起こり、それが高度になると、網膜出血や網膜毛細血管瘤が見られる単純糖尿病網膜症（mild to moderate nonproliferative diabetic retinopathy: M-NPDR）となり、やがて網膜毛細血管床の閉塞が見られる前増殖糖尿病網膜症（severe nonproliferative diabetic retinopathy: S-NPDR）と呼ばれる状態になる。さらに進行すると、網膜無灌流領域が広範囲に生じ、網膜は虚血状態となる。この虚血刺激により、血管新

生促進因子の発現が増加し、網膜新生血管が生じる。この状態を増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy: PDR) という。血管新生は、vascular endothelial growth factor (VEGF) などの血管新生促進因子と pigment epithelium-derived factor (PEDF) などの血管新生抑制因子とのアンバランスによって起こるとされている。

一方、糖尿病腎症は糖尿病患者の生命予後を左右する合併症の一つであり、進行性の疾患である。細小血管病変を基礎にした糖尿病性糸球体硬化症である。糖尿病腎症が見られる患者は糖尿病網膜症が悪化しやすいとの報告がある。また糖尿病腎症モデルラットの腎では PEDF の発現が低下し、血中の PEDF 濃度も低下していると報告されている。しかし、ヒトでの詳細は不明である。当教室では以前から糖尿病網膜症と血中 PEDF 濃度の関係について研究を行ってきた。そこで、今回、我々は腎機能と網膜症また血中の PEDF 濃度の関係について検討した。

【研究方法】

対象は学内倫理委員会の承認を得、採血に同意が得られた 2 型糖尿病患者 243 人 (男性 125 名、女性 118 名) で年齢は 18~87 歳、平均年齢 61.7 歳である。眼底検査、蛍光眼底造影検査を施行して、網膜症のない群 (no apparent diabetic retinopathy: NDR), M-NPDR, S-NPDR, PDR の 4 病期に分類した。さらに血液を採取し、血中 HbA1c、血中尿素窒素 (BUN)、血中クレアチニン (Cr) を測定。また血中 PEDF 濃度を測定するために血液を 3000 回転、20 分間遠心分離し、platelet poor plasma を抽出し、 -20°C で冷凍保存、その後尿素処理を行い、PEDF sandwich ELISA Kit (Chemicon International Tercula. CA, USA) にて測定した。

【結果】

血中 PEDF 濃度は、NDR 群で $5.29 \pm 1.04 \mu\text{g/ml}$ (平均 $\pm$ SD, $n=20$)、M-NPDR 群では $5.07 \pm 0.72 \mu\text{g/ml}$ ($n=37$)、S-NPDR 群は $6.61 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$ ($n=98$)、PDR 群は $7.69 \pm 0.65 \mu\text{g/ml}$ ($n=88$) であった。病期の進行した症例では血中 PEDF 濃度はより高値となった。特に PDR では M-NPDR に比べ血中 PEDF 濃度が有意に高値であった。 ($P<0.05$)

血中 BUN 濃度は、NDR 群で $15.6 \pm 1.0 \text{ mg/ml}$ ($n=17$) で M-NPDR 群では $18.5 \pm 1.1 \text{ mg/ml}$ ($n=24$)、S-NPDR 群は $19.9 \pm 0.9 \text{ mg/ml}$ ($n=59$)、PDR 群は $27.1 \pm 2.5 \text{ mg/ml}$ ($n=65$) であった。PDR では NDR, M-NPDR, S-NPDR と比べ血中 BUN は有意に高値であった。 ($P<0.05$)

血中 Cr 濃度は、NDR 群で $0.69 \pm 0.06 \text{ mg/ml}$ ($n=17$) で M-NPDR 群では $0.71 \pm 0.06 \text{ mg/ml}$ ($n=24$)、S-NPDR 群は $1.01 \pm 0.19 \text{ mg/ml}$ ($n=59$)、PDR 群は $1.94 \pm 0.3 \text{ mg/ml}$

($n=65$) であった。PDR では NDR, M-NPDR, S-NPDR と比べ血中 Cr は有意に高値であった。 ($P<0.05$)

また血中 PEDF 濃度が高値である症例は、血中 BUN、血中 Cr とともに血中濃度も高値であり、統計学的に正の相関がみられた。 ($P<0.0001$)

【考察】

糖尿病網膜症の病期の進行した症例では、進行のしていない症例と比べ血中 PEDF さらに血中 BUN、Cr 濃度が有意に高値であった。さらに血中 PEDF と BUN または血中 PEDF と Cr には正の相関がみられた。糖尿病網膜症と糖尿病腎症はともに慢性炎症が微小血管障害の原因であるため糖尿病網膜症と糖尿病腎症の間には密接な関係がある。PEDF には抗炎症作用があると報告があり、PEDF は微小血管障害を抑制すると考えられる。腎機能障害で血中 PEDF が上昇する原因は不明であるが、網膜症や腎症の原因である慢性炎症および、血管障害の進行に反応して、血中 PEDF が上昇している可能性が考えられた。糖尿病網膜症患者の血中 PEDF の上昇は微小血管障害の程度を表し、糖尿病網膜症や糖尿病腎症の進行の指標となると考えられた。

なお、本要旨に該当する内容は、*Mol Vis.* 14: 992-996, 2008 に掲載されている。

審査の結果の要旨

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) は糖尿病網膜症をはじめとする眼内血管新生の抑制因子として重要な役割を果たすとされている。しかしながら同じ糖尿病の合併症として重要な糖尿病腎症との関係は知られていない。本研究は、2 型糖尿病患者の多数例の血中に PEDF が増加しており、しかもその濃度は糖尿病網膜症の重症度とともに増加し、増殖糖尿病網膜症で最も高いことを証明した。さらに、BUN、クレアチニンを指標とした腎機能の検索において、血中 PEDF と BUN 値、血中 PEDF とクレアチニン値の間にはそれぞれ相関がみられ、しかも網膜症の重症度に相関して BUN、クレアチニンが増加することを証明した。腎機能の指標となる他の検査と比べての PEDF の特異度、網膜症や腎障害の際の PEDF の産生組織が明らかでないなど、解明されるべき課題はあるが、血中 PEDF は全身の微小血管障害の指標となりうる可能性を示した研究であり、学位に値すると考えられた。

【1526】

氏 名 (本 籍) むつ うら ひろ み (京都府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 862 号
 学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Depression and Anxiety Correlate Differently with
 Salivary Free Cortisol in the Morning in Patients
 with Functional Somatic Syndrome

論文審査委員 主査 (教授) 木下利彦
 (教授) 中邨智之 (教授) 中村加枝

論文内容の要旨

【はじめに】

Functional Somatic Syndrome (FSS) は、世界的に広くみられ、医学的に説明可能な程度を越えて苦痛や訴えが強く、治療抵抗性で医療コスト増大の原因ともなる疾患群をさす概念である。

関西医大心療内科では、先行研究として、FSS に対する急性ストレス負荷に対する自律神経系の反応 (psychophysiological stress profile, PSP) に関する研究を行ったところ、低反応であるという結果であり、機能不全の可能性が示唆された。そこで今回、FSS に関して生化学的指標を用いた研究を計画した。

一般にストレス状況下では、視床下部-脳下垂体-副腎系 (HPA axis) を介して、コルチゾールの分泌が増加する。FSS 患者は医学的に説明のつかない症状に苦しんだ結果疲弊状況にあり、自律神経反応のように HPA axis も機能不全である可能性が推定される。そこで、① FSS 患者の HPA axis 反応は健常人と、異なる結果を示す、② なかでも疲弊と関連の強いうつ状態が強いほど、コルチゾール分泌が低下するという仮説を立て、これについて検証した。

【研究方法】

2006 年 8 月から 2008 年 3 月までの期間、関西医大心療内科で治療を受けた患者のうち、神経生理学的な検査を受ける価値があると主治医が判断した 67 名の中で、Barsky ら (1999) の定義に基づき①医学的に説明のつかない身体症状が主症状で、精神障害によるものを除く、②主観的な症状スケールが 3/10 以上、6 か月以上継続している、③症状のために社会的日常的活動が制約を受けている、という 3 点を満たすもの 45 名を FSS と診断した。機能性胃腸障害 (6)、過敏性腸症候群 (3)、線維筋痛症 (6)、慢性疲労症候群 (2)、

慢性疼痛 (11)、頭痛 (6)、他の機能性胃腸障害 (3)、自律神経失調 (8) であった。検査前に薬物は変更しないようにし、激しい運動や、アルコール、カフェインの摂取も制限した。また、健康なコントロールを公募して 29 名のデータを得た。

PSP を施行した同日起床後の唾液を、Salivette を用いて採取し、SRL に依頼してフリー・コルチゾール値を測定した。HPA axis 機能の評価には、起床後複数回唾液採取が理想だが、患者の負担を考慮し、かつデータの信頼性が示されている起床後 30 分の 1 回採取とした。

質問紙はうつの尺度として Beck Depression Inventory II (BDI-II)、不安の尺度として State-Trait Anxiety Inventory (STAI)、最近の気分を Profile of Mood State (POMS) の各日本語版、Quality of life (QOL) を 8 item short-form health survey (SF8) を用いて測定した。統計ソフトは SPSS 11.5 を用い、T 検定、Mann-Whitney 検定、2 元配置の分散分析、多変量解析などを行った。

【結果】

FSS はコントロールに比べ、有意に抑うつ不安が強くなり、QOL が低かった。コルチゾール値の平均値では、FSS、コントロールの男女で差を認めなかったが、コルチゾールと心理テストの関係性において、FSS はコントロールと反対の傾向を示した。すなわち、FSS では BDI-II、POMS-depression, fatigue, confusion などが負相関、精神的 QOL 指標 MCS が正相関を示したのに対し、コントロールでは STAI-state, trait, POMS-depression, fatigue, confusion が正相関、MCS は負相関を示した。多変量解析では、コルチゾール値に影響を及ぼしている要素は FSS で POMS-D と身体的 QOL 指標 PCS、コントロールでは STAI-trait であった。

【考察】

FSS の HPA axis 機能は、抑うつの程度が軽いとは hyper-functional、抑うつ程度が重いと hypo-functional な反応を示した。すなわち通常ストレス下で亢進するコルチゾール分泌が、うつ状態が強いほど低下するという、機能不全状態にあった。FSS 患者は、HPA axis 機能だけでなく自律神経反応も低反応であることが我々の先行研究で指摘されており、疲弊した状態から各種機能不全を呈していることが推定される。またうつに関する研究史では、程度が強いほどコルチゾールが高値であるという報告が多く、今回の結果は FSS 患者特有の傾向だと考えられる。

なお、本要旨に該当する内容は、*Appl Psychophysiol Biofeedback*. 34: 291-298, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

過敏性腸症候群など機能性心身症の大部分が含まれる機能性身体症候群（FSS）における、視床下部下垂体副腎系機能と心理指標との関係を検討した論文である。患者 45 名と健常者 29 名の早朝唾液中コルチゾールと、抑うつ、不安、感情状態の 3 種類の心理テストとの相関を検討し、患者群では抑うつ指標とコルチゾール値が負の相関を示し、健康対照では正の相関を示すことが判明した。機能性身体症候群の病態解明についての貴重な所見であると考え、学位に値すると判断した。

【1527】

氏 名（本 籍） おお にし しず お
大 西 静 生（大阪府）
学 位 の 種 類 博士（医学）
学 位 番 号 甲 第 863 号
学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Intra-bone marrow-bone marrow transplantation
slows disease progression and prolongs survival
in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal
model mouse for amyotrophic lateral sclerosis

論文審査委員 主査（教授）藺田精昭
（教授）杉本哲夫 （教授）福原資郎

論文内容の要旨

【はじめに】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、発症後数年以内に、主に呼吸不全によって死に至るきわめて予後不良な進行性の致死性神経変性疾患である。この疾患に対する細胞移植療法は近年注目されてきており、家族性の ALS モデルマウスを用いた実験などで症状進行抑制や神経機能改善などの効果が確認されているがその改善の機序については未だ解明されていない。

【研究目的】

本研究の目的は発症が確認された遺伝子変異 ALS モデルマウスに対し、骨髄内骨髄移植（IBM-BMT）法を用いて、正常マウスの骨髄細胞を移植し、疾患の進行に対する効果を検討し、また、効果がみられた場合にはその機序に関して検討を行うことである。

【研究方法】

現在 ALS のモデル動物として広く研究応用されている B6SJL-TgN（SOD1-G93A）マウス（mSOD1 Tg

マウス）の発症を確認した時点（生後約 12 週）で 5.5Gyx2 あるいは 6.0Gyx2 の放射線照射を行い、24 時間後に eGFP transgenic C57BL/6 マウス（eGFP Tg マウス）の骨髄細胞を用い骨髄内骨髄移植を行った。コントロールとしては mSOD1 Tg マウスから mSOD1 Tg マウスへ IBM-BMT を行った群や無処置の mSOD1 Tg マウスを用いた。IBM-BMT 後 14 日目に骨髄細胞の置き換えを確認するためフローサイトメーターを用い末梢血の解析を行った。経時的に体重変化、握力、四肢運動機能を観察し、疾患の進行を評価した。また食物の自己摂取が不可能となった時点で還流固定を行い、免疫染色による二重染色を行い蛍光顕微鏡にて観察を行った。染色には抗 Iba-1 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 O4 抗体、抗 NeuN 抗体、抗 CD45 抗体を用いた。

【結果】

eGFP Tg マウスの骨髄の投与を受けた群においては、mSOD1Tg マウスから IBM-BMT を行われた群や無処置のコントロール群と比較して有意差をもって生存期間の延長、神経機能の回復を認めた。移植された eGFP 陽性ドナー骨髄由来の細胞は骨髄内腔にはもちろん、全身諸臓器への分布が認められた。疾患の障害部位である脊髄においてもドナー骨髄由来の細胞が認められ、それらの細胞はミクログリアやマクロファージなど貪食細胞で発現がみられる Iba-1 が陽性であった。脊髄前角内でのそれらの細胞数はコントロールに比べ有意差をもって増加していた。しかし、その他の神経系のマーカーは陰性であり、神経細胞への分化転換は認められなかった。

【考察】

本研究においては骨髄内骨髄移植という新たに開発された移植の方法を用い、効率よく野生型の骨髄細胞を移植することにより発症後でも細胞移植療法を行えば、正常骨髄由来の細胞が障害された脊髄へ遊走することが示され、またマウスの生存期間が延長し、神経機能の改善が見られることが解明された。本研究の結果は細胞移植療法の改良、もしくは他の治療法との併用により筋萎縮性側索硬化症を治癒させうる可能性を示唆していると考えられる。

なお、本要旨に該当する内容は *Brain Res.* 1296: 216–224, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は、骨髄内骨髄移植（IBM-BMT）という新たに開発された移植方法を用いて、野生型の骨髄細胞を筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデルマウスに移植することにより、発症後でもマウスの生存期間が延長し、神経機能の改善が見られることを明らかにしてい

る。その機序として、ドナー由来のミクログリア細胞の脊髄前角における増加が関与する可能性を示唆した。以上より、本研究は、IBM-BMT を応用することにより将来的に ALS の病態を改善させうる可能性を示唆しており、医学上価値ある研究と認められる。

【1528】

氏 名 (本 籍) ^{なか みち なお と} 中 道 尚 人 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 864 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Synergistic effect of interleukin-6 and endoplasmic reticulum stress inducers on the high level of ABCG2 expression in plasma cells

論文審査委員 主査 (教授) 池原 進

(教授) 藺田精昭 (教授) 木梨達雄

論文内容の要旨

【背景・目的】

ATP binding cassette (ABC) transporter family は細胞膜に存在するトランスポーターであり、ATP に依存した内因的物質や外因性物質、そしてその代謝産物の輸送に関与する。Mitoxantrone 耐性乳癌細胞株から分離同定された ABCG2 は、多種類の抗がん剤の輸送排出などに働く。この蛋白は、未熟な造血幹細胞に発現しており、Hoechst33342 色素の排出能をもつ side population 分画を構成する。最近では胎盤の survival factor であることも報告されている。本研究は、末梢リンパ組織における ABCG2 発現細胞の同定を試み、その発現機構と役割を明らかにすることを目的としている。

【方法】

保存されている様々な疾病を持つリンパ節もしくは扁桃のパラフィン包埋切片を、免疫組織染色にて検討した。次に、形質細胞の細胞株を用い、インターロイキン 6 (IL-6) と小胞体ストレス誘導物質での刺激の有無による ABCG2 の mRNA 量を real-time reverse transcription-PCR にて評価し、ABCG2 のタンパク発現量と機能をフローサイトメトリーにて確認した。更に、ABCG2 の発現調節機構の検討には、プロモーター領域のメチル化の解析、クロマチン免疫沈降法、ルシフェラーゼアッセイを施行した。また、ABCG2 発現の形質細胞における役割を検討するために、形質細胞

株と si-RNA によるノックダウンによって小胞体ストレス下での細胞増殖を WST-1 細胞増殖アッセイにて評価した。最後に、リンパ節内での形質細胞における ABCG2 の発現とアポトーシスの関係について、リンパ節のパラフィン包埋切片での ABCG2 と活性化カスパーゼ 3 の二重免疫組織染色を用いて検討した。

【結果】

反応性リンパ組織やキャッスルマン病、ホジキンリンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫などにおいて、ABCG2 を高発現する形質細胞が増加していた。これらのリンパ組織は、サイトカイン産生が亢進され、形質細胞に小胞体ストレスがかかっている病態と考えられる。そこで形質細胞株に IL-6 と小胞体ストレス誘導物質を加えたところ、ABCG2 の mRNA 量およびタンパク量が増加し、薬剤排出の増加も確認された。小胞体ストレス誘導物質下での形質細胞株の増殖能の検討では、ABCG2 発現のノックダウンにより増殖能の低下がみられた。また、リンパ節において ABCG2 高発現の形質細胞は低発現の形質細胞と比較してアポトーシスに陥っている割合が有意に低かった。ABCG2 発現調節機構を検討したところ、プロモーター領域のメチル化が ABCG2 の発現を抑制していること、IL-6 と小胞体ストレス誘導物質により活性化 XBP-1 と HIF-1 α が増加して ABCG2 遺伝子のプロモーター活性を上昇させることがわかった。

【考察】

ABCG2 は炎症反応性リンパ組織やサイトカイン産生リンパ腫に出現する形質細胞の一部に高発現することが明らかにされた。形質細胞株の研究では、ABCG2 は IL-6 と小胞体ストレスによって誘導され、薬物排出に働くことが示された。また細胞死の回避に作用することも示唆された。これらの所見は、ABCG2 が記憶 B 細胞や形質細胞の長寿命分画との関連を示唆するものであり、形質細胞腫瘍の Cancer stem cell の解明や治療法の開発にも貢献することが期待される。

なお、本要旨に該当する内容は、*Lab Invest.* 89: 327-336, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

耐性乳癌細胞株から分離同定された ATP-binding cassette transporter subfamily G member 2 (ABCG2) は造血幹細胞などの幹細胞に発現し、side population の形成に必要である。申請者は反応性リンパ節における形質細胞の一部に ABCG2 が高発現していることを見だし、形質細胞株を使ってその役割を検討した。ABCG2 の発現は小胞体ストレスと IL-6 の刺激による

プロモーター活性の上昇に一致して増加し、同時に薬物排出の増加もみられた、一方、小胞体ストレス下に ABCG2 の発現を低下させると生存率が低下した。これらの所見は、ABCG2 により、形質細胞のアポトーシスが回避されることを示唆しており、形質細胞の機能を考える上で興味深い研究で、学位に充分値するものとして評価された。

【1529】

氏 名 (本 籍) よし だ すずむ 吉 田 進 (奈良県)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 865 号
 学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Prevention of contrast-induced nephropathy by chronic pravastatin treatment in patients with cardiovascular disease and renal insufficiency

論文審査委員 主査 (教授) 松田博子
 (教授) 中邨智之 (教授) 澤田 敏

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、画像診断や治療のための造影剤使用が増加しているが、造影剤の使用は腎機能の悪化を招く可能性がある。また、腎機能低下症例は造影剤腎症を生じる高リスク群であり、さらに慢性腎疾患による腎機能障害の増加により、造影剤使用後に起こる造影剤腎症に関心が寄せられている。冠動脈造影検査や経皮的冠動脈形成術後の造影剤使用により起こる造影剤腎症は、冠動脈疾患のある患者において有病率や死亡率を増加すると報告されている。

脂質異常症改善薬であるスタチンはコレステロール低下作用以外に抗酸化作用、抗血栓作用、抗炎症作用や血管内皮の安定化等多面的作用が報告されており、腎臓に対して保護的に働き、結果として造影剤腎症を予防する可能性がある。

【研究目的】

待機的冠動脈造影や経皮的冠動脈形成術が臨床上必要な心血管病を有し、腎機能障害 (糸球体濾過量 60 ml/min 未満、もしくは血清クレアチニン s-Cr 1.1 mg/dL 以上) を合併する症例に対して、脂質異常症改善薬として長期プラバスタチン前投与症例は造影剤腎症の発症の予防効果があるかを検討した。

【研究方法】

待機的冠動脈造影や経皮的冠動脈形成術を施行した腎機能障害を認め冠動脈疾患を有する 431 例を対象とした。全症例に対して造影剤暴露直前の s-Cr と造影剤暴露後の s-Cr を測定した。慢性維持透析患者や一時的透析、血行動態に影響を与える可能性のある低左心機能 (左室駆出率 < 35%)、急性冠症候群、心不全例を除外した。造影剤腎症は造影剤投与後 2 日以内で、他の原因がなく 25% 以上の s-Cr の増加、あるいは絶対値で 0.5 mg/dl 以上の増加を認めるものと定義した。プラバスタチン投与群は脂質異常症改善を目的として少なくとも造影剤暴露 28 日前に投与されているものとし、全ての対象に対して、造影剤暴露 12 時間前に造影剤腎症の予防のため 1 ml/kg/dl の補液を行い造影剤暴露 12 時間後まで投与した。この対象をプラバスタチン投与群とスタチン非投与群で臨床背景を比較し、また造影剤腎症群と非造影剤腎症群に分類し、この 2 群に対して造影剤腎症の発生率を評価した。さらに造影剤腎症発生予防の関連独立因子について多変量解析にて検討した。

【結果】

全対象中 36 例 (8.4%) に造影剤腎症を認めた。プラバスタチン投与群とスタチン非投与群では血漿コレステロール値に有意差は認めなかった (183.1 ± 37.5 vs. 181.9 ± 40.1 mg/dl, $p=0.762$)。造影剤腎症群は、造影剤暴露前の高度腎機能障害例 ($p=0.003$)、高容量造影剤使用例 ($p=0.034$) において高率であり非造影剤腎症群はプラバスタチン投与例 ($p=0.01$) において高率であった。さらに多変量回帰分析でもプラバスタチン投与の有無 ($x_2=6.549$, $p=0.011$, odds ratio=0.34)、造影剤量 ($x_2=4.484$, $p=0.034$, odds ratio=1.01)、造影剤暴露前の腎機能障害の程度 ($x_2=6.294$, $p=0.009$, odds ratio=2.78) は造影剤腎症の独立因子であった。糖尿病、高齢者は造影剤腎症の予測因子ではなかった。

【考察】

脂質異常症改善薬であるプラバスタチン前投与は造影剤腎症を減少させる。特に造影剤使用前に腎機能障害のある例では必要最少量の造影剤量とプラバスタチン投与は予防として考慮されうる。

造影剤腎症の発症機序としてフリーラジカルの刺激による腎髄質血流低下や、尿細管上皮細胞障害、活性酸素の腎細胞への直接的な障害が原因となる。スタチンの抗酸化作用、抗炎症作用は活性酸素を抑制し造影剤腎症を予防する可能性が考えられる。特にスタチンの中で水溶性であるプラバスタチンは肝臓に対する悪影響はあるが、心筋、脈管と腎臓に及ぼす悪影響は弱く膵臓 β 細胞からのインシュリン分泌は妨げられ

ない等報告されておりより効果的な可能性がある。

なお、本要旨に該当する内容は、*J Cardiol.* 54: 192–198, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

軽度腎機能障害を有する冠動脈造影および経皮的冠動脈形成術待機患者 431 例中、高コレステロール血症の 194 例の患者にプラバスタチンを 28 日以上投与し、投与群と非投与群で、造影剤腎症の発生率を比較した。プラバスタチン投与群では 8 例 (4.1%) だったのに対し、非投与群では 28 例 (11.8%) で、非投与群で発生率が有意に高かった。多変量回帰分析では、造影剤投与前の血清クレアチニン値、造影剤使用量、プラバスタチンの投与の有無が、造影剤腎症の独立因子であることが示された。プラバスタチン長期投与が造影剤腎症を予防することを示した本研究は学位に値すると考える。

【1530】

氏 名 (本 籍) 蔣 時 文 (中国)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 866 号
学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Involvement of TORC2, a CREB co-activator, in the *in vivo*-specific transcriptional control of HTLV-1

論文審査委員 主査 (教授) 木梨達雄
(教授) 藺田精昭 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【目的】

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) の原因ウイルスであり、日本国内においては約 110 万人が感染している。HTLV-1 がコードする転写活性化因子 Tax は、ATL や HAM の発症に重要な役割を果たすことが示されているが、感染個体内においてはその発現は抑制されている。ところが、感染末梢血を体外 (*ex vivo*) で培養すると短時間で発現が再開することから、個体内においては一過的な発現抑制機構が存在することが想定され、これが未発症感染キャリア個体における数十年にも及ぶ長い潜伏期を規定する一因と考えられている。そこで、感染細胞の制御を介

した ATL 発症予防法の開発を目標に、個体内特異的なウイルス発現抑制機構の解明を試みた。

【研究方法】

- (1) HTLV-1 転写調節領域 (LTR) 下において EGFP と Tax の融合タンパク (Gax) を発現する組換えレトロベクターを導入したマウス EL4 T リンパ腫細胞 (EL4-Gax) 1×10^6 個を 6 週令マウス腹腔内に移入し、3 週間後、腹腔内より採取直後 (*in vivo*) および *ex vivo* 培養 48 時間後における Gax の発現を、EGFP の蛍光および total RNA の定量的 RT-PCR で測定した。
- (2) ゲノム DNA を亜硫酸処理後、ウイルス組込み部位特異的なプライマーを用いた genomic PCR により得られた PCR 断片の塩基配列を解析することで、プロモーター DNA の CpG メチル化を定量化した。
- (3) クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を用いて、転写調節領域への CREB, CBP/p300, TORC1~3, TFIIB, RNA polymerase 等転写因子の結合、およびヒストンのアセチル化あるいはメチル化を解析した。
- (4) TORC1~3 の shRNA を発現するレトロウイルスベクターを EL4-Gax 細胞に感染させ、それぞれの遺伝子発現を抑制することで、HTLV-1 転写制御における各 TORC 蛋白の関与を解析した。
- (5) Western blotting 法および免疫染色法を用いて、*in vivo* および *ex vivo* における TORC2 の発現および細胞内局在の変化を解析した。AMPK の活性については、活性化型 (リン酸化型) AMPK (pAMPK) の発現を Western blotting 法にて定量化した。

【結果】

- (1) EL4-Gax 細胞を同系マウス腹腔内に接種したところ、ヒト感染個体の場合と同様に、個体内においては Gax の発現が抑制され、*ex vivo* 培養で発現が再開した。
- (2) Tax 発現 EL4 細胞ゲノム中の 5'-LTR 領域における CpG メチル化は、発現抑制前後で大きな変化が観察されなかった。
- (3) HTLV-1 の転写調節において主要な役割を果たすことが知られる CREB, CBP/p300 の転写エンハンサーへの結合およびその結果予想されるヒストン H3 のアセチル化は、いずれも発現抑制前後において変化が見られなかったにもかかわらず、基本転写因子 TFIIB および RNA polymerase のプロモーターへの結合は、転写量と比例して増減していた。
- (4) CREB と基本転写因子の結合を媒介することが知られている、CREB の co-activator TORC (transducer of regulated CREB activity) 1~3 に注目し解析した

ところ、個体内では TORC1 および TORC2 の発現が減少していた。

(5) ChIP assay および shRNA によるノックダウン実験から、3 種類の TORC family 蛋白 (TORC1~3) のなかで TORC2 が EL4-Gax 細胞での HTLV-1 転写調節に最も重要な役割を果たすことが示された。

(6) Gax 発現抑制前後における TORC2 の細胞内局在を解析したところ、in vitro および ex vivo 培養時には核・細胞質両方に発現が確認されたのに対し、in vivo においては核での発現が消失した。一方、TORC2 のリン酸化を介して核-細胞質移行を調節することが知られる AMP 依存的リン酸化酵素 AMPK の活性を解析したところ、in vivo において活性化されていた。

【考察】

TORC2 は、種々のストレスシグナルや活性化シグナルに応答し、グルコース代謝や神経細胞の記憶調節等、CREB を介した転写調節における中心的な役割を果たすことが、近年、明らかとなっており、感染個体内における HTLV-1 の発現制御も、これらの調節と同期していることが強く示唆された。

今後、TORC2 を介して HTLV-1 の発現を調節する個々の細胞外刺激の実態を明らかにすることにより、感染キャリア個体内における感染細胞制御による ATL 発症予防法開発への応用が期待される。

なお、本要旨に該当する内容は、Retrovirology, 6: 73, 1-16, 2009. に掲載されている。

審査の結果の要旨

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) の原因ウイルスであるが、ウイルスの転写を抑制する機構が in vivo で存在することが知られていた。本研究はウイルスがコードする転写調節因子 Tax と GFP の融合遺伝子を HTLV-1 プロモーター LTR 下に発現するレポーター遺伝子を作成し、それを発現する細胞を用いて、in vivo では LTR 転写活性が抑制されることを再現した。LTR プロモーター活性にはメチル化制御ではなく、転写エンハンサーである CREB と co-activator である TORC2 が重要であること、さらに in vivo での制御には TORC2 の発現低下が関与することを見出し、TORC2 発現調節がウイルスの発現に重要な役割をもつことが示唆された。これらの結果は、長い潜伏期間をもつ ATL 発症の解明につながる重要な知見と考えられ、学位に値する成果と考えられる。

【1531】

氏名(本籍) 辰 巳 貴美子 (大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 867 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Drosophila big brain does not act as a water channel, but mediates cell adhesion

論文審査委員 主査(教授) 木梨達雄

(教授) 杉本哲夫 (教授) 松田博子

論文内容の要旨

【はじめに】

ショウジョウバエの神経形成領域発達過程において、Notch, Delta などの neurogenic 遺伝子は相互作用をしながら機能している。

neurogenic 遺伝子の一つである *big brain* (以下 *bib*) 遺伝子は、哺乳類の脳の主要な水チャネルである aquaporin4 (以下 AQP4) とアミノ酸配列に高い相同性があることが確認されている。しかし *bib* の遺伝子産物である Bib 機能は現在のところ不明である。

【研究目的】

Bib の機能(水透過性, イオン透過性, 細胞接着機能)を明らかにする。

【方法】

① *bib* および AQP4 遺伝子の発現細胞株の作成および免疫染色とビオチンアッセイ

bib 遺伝子あるいは AQP4 遺伝子の cDNA を L cell (内因性細胞接着機能を有さないマウス皮下結合組織由来細胞) に遺伝子導入し、それぞれの安定発現細胞株を確立した(以下、それぞれ Bib-L cell, AQP4-L cell と略)。

次に各々の L cell の固定標本を作成し、1 次抗体として抗 Bib または抗 AQP4 抗体を、2 次抗体として Alexa Fluor 555 を用いて反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Bib-L cell をまずビオチンで、次にアビジンで反応後、その結合蛋白を抗 Bib 抗体で解析した。

②細胞接着機能評価

Bib-L cell あるいは AQP4-L cell を、 1×10^6 個/ml に調整後、37°C で 60 分間インキュベーションしながら回転させ、グルタルアルデヒドで反応中止後、蛍光顕微鏡で細胞数を計測した。次に transfection していない L cell を DiI で標識、Bib- あるいは AQP4-L cell を DiO

で標識し、DiI と DiO でラベルされた細胞を、1:1 で混ぜ合わせ、蛍光顕微鏡で細胞数を計測した。

③細胞の電気生理学的評価

Bib-L cell のイオン透過性を whole cell パッチクランプ法により調べた。具体的には、+50 と -150 mV 間の固定膜電位における電流を記録し電圧電流曲線作成した。

④細胞の水透過性の評価

AQP4 と Bib を transient に発現した COS7 cell を 30 分間カルセインに反応させ、等張液を低張液に交換して、細胞容積変化に伴うカルセインの蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡で持続的に測定し、細胞容積変化から水透過性を求めた。

【結果】

① Bib の細胞表面への発現の確認

免疫染色およびビオチンアッセイで、Bib は L cell の細胞膜上に発現していることが確認された。

② Bib の細胞接着機能

Bib-L cell は、AQP4-L cell 同様、凝集した集団を形成し細胞接着機能を持つことが認められた。また Bib を介する細胞接着は、ホモ親和性のみならずヘテロ親和性も認められた。

③ Bib の細胞膜イオン透過性に及ぼす機能

Bib-L cell の電圧電流関係は、control (vector のみ発現させた L cell) と差がなかった。すなわち、Bib 特有のイオン透過性は認められなかった。

④ Bib の細胞膜水透過性に及ぼす機能

AQP4 を発現させた細胞では、カルセインの蛍光強度は素早く減衰した。一方、Bib を発現させた細胞では、control と蛍光強度の変化に優位差は認めず、Bib の水透過性は認められなかった。

【考察】

bib は AQP4 とアミノ酸配列に高い相同性があるが、AQP4 の特徴である水透過性は Bib には認められなかった。また、Bib のイオン透過性も確認できなかった。これらの結果は「oocytes に発現させた *bib* はチロシンキナーゼシグナルによって調節される cation channel としての役割を有する」とした既報 (Yanochko, et al. J Neurosci, 22: 2530–2540, 2002) とは異なる。この差異は、*bib* の基本的なチロシンリン酸化レベル、あるいは、L cell のチロシンキナーゼ活性に起因するものかもしれない。この点を明確にするにはさらなる研究が必要である。

一方、今回確認できた Bib のヘテロ親和性接着機能から、Bib は他の膜蛋白あるいは膜脂質を介して相互作用していると考えられた。

今回我々は、*bib* が細胞間接着機能を有することを

初めて示したが、この *bib* の細胞接着能がショウジョウバエの神経形成領域の発達過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

なお、本要旨に該当する内容は FEBS Lett. 583: 2077–2082, 2009. に掲載されている。

審査の結果の要旨

ショウジョウバエの big brain は哺乳類の水チャネルであるアクアポリン 4 のホモログであり、神経形成領域の発達過程で必須の働きをしている。辰巳氏は big brain が予想に反して水チャネルとしての機能を持たず、接着分子として機能しうることを示した。big brain を発現した L 細胞は膜電位や浸透圧の変化刺激に応答しなかったが、ヘテロ親和性の細胞間凝集を引き起した。これらの結果は神経領域形成過程における big brain の機能に細胞接着が関与することを示唆し、哺乳類ホモログの機能解明につながると考えられ、学位に値する研究成果と判断される。

【1532】

氏 名 (本 籍)	とく だ たか のり 徳 田 貴 則 (大阪府)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 番 号	甲 第 868 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	

Mechanical Characteristics of Composite Knitted Stents

論文審査委員 主査 (教授) 湊 直樹
(教授) 岩坂壽二 (教授) 木原 裕

論文内容の要旨

【はじめに】

金属ステントの力学特性はステントのメッシュデザインその他、金属の物性などによって規定される。高い拡張力を有するステントは一般に曲げ変形に対する復元性も高い。高拡張力のステントを屈曲した管腔臓器に留置すると、曲げ変形時に発生する復元力が組織に対して過度の面圧を与える原因となり、潰瘍形成や組織穿孔を起こすことがある。また高度の曲げ変形時には隣接するストラット同士が接触し、内方に突出するように変形するためキック発生の原因となる。金属ステント金属ステントのこれらの欠点を解決するため我々は、曲げ剛性の異なる 2 種類の材料を組み合わせ

た複合材料編成ステントを作成した。

【研究目的】

金属線と繊維線を用いて複合材料編成ステントを作成し、その機械的特性を同一構造の金属ステントと比較すること

【研究方法】

直径 0.12 mm のニッケルチタン合金線 (Ni-Ti) とポリパラフェニレンベンゾビスオキサゾール (PBO) の multifilament fiber (ZYRON AS[®]; TOYOBO, Osaka, Japan) を、Strecker Stent と同一の編み方で円筒編物とした複合材料編成ステントを 2 種類作成した (N-Z stent)。N-Z stent の Ni-Ti のループ長 (L) は L=1.84 mm (N-Z stent (L=1.84)) と L=2.08 mm (N-Z stent (L=2.08)) の 2 種類とした。比較対照として Ni-Ti のみを用いた同一 textile pattern の金属ステント N-N stent (L=1.92) を作成した。各々のステントに対し直径方向の面荷重 (横圧縮荷重)、および片端固定したステントに対して自由端への直径方向の集中荷重 (曲げ荷重) を加え、ステントの屈曲と荷重値の関係を評価した。また 180 度屈曲時のキンク発生状況を肉眼的に評価した。

【結果】

ステント径が 53% 減少した時点での横圧縮荷重値は、N-Z stent (L=1.84) で 6.44N、N-Z stent (L=2.08) で 6.14N、N-N stent (L=1.92) で 4.96N であり、複合材料編成ステントは金属ステントと同様以上の荷重値を示した。また曲げ角度 90 度における曲げ荷重値は N-Z stent (L=1.84) で 0.005N、N-Z stent (L=2.08) で 0.003N、N-N stent (L=1.92) で 0.034N であり、複合材料編成ステントの曲げ荷重値は有意に低かった。さらに複合ステントはループピッチに関係なく曲げ角度 180 度においても明らかなキンクを発生しなかったが、N-N stent は明らかなキンクを発生し内腔が閉塞した。

【考察】

複合編製ステント同士の比較では、ピッチが短いほうがより荷重値は高値を示した。一方、L=2.08 mm の複合ステントは L=1.92 mm の単一金属ステントよりも高い横圧縮荷重値を示した。金属線のピッチが広いにもかかわらず高い荷重値を示したのは、繊維線の長軸方向の伸縮性が少なく、金属線の変形を妨げたためと考える。また、曲げ荷重値に関して複合材料編成ステントは編み密度の類似した単一金属編製ステントと比較して低い値を示し、肉眼的に明らかなキンクも発生しなかった。複合材料編成ステントでは金属ループと隣接するのは繊維ループであり、これらが曲げ変形時に干渉し合っても後者が容易に変形して反発力が発生しない。また繊維線材は曲げ荷重が殆どゼロであり、曲げ変形時の曲げ荷重の主な原因は金属線材の屈

曲に関連した弾性復元力だけである。従ってステント全体の曲げ荷重値は低く抑えられたと考えている。

金属材料と繊維材料の複合材料編成ステントは、金属単一ステントと比較して同等以上の拡張性能を保持する一方で、よりすぐれた管腔形状への追従性や耐キンク性を示す。

なお、本要旨に該当する内容は、*Cardiovasc Intervent Radiol.* 32: 1028–1032, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

現在市販の、金属のみで作製されたステントは、留置時の屈曲病変への追従性や耐キンク性能がまだ不十分であり、長期的な組織障害や、ステント損傷を起こしうる。本研究は、金属ステントと同等の内腔保持力を持ち、追従性や耐キンク性に優れたステントの開発研究であり、ナイチノール金属と PBO (ポリパラフェニレンベンゾビスオキサゾール) 繊維を 1 対 1 に編み合わせた複合材料ステントを作成した。この新しい複合材料ステントと従来の金属単一ステントに関して、直径方向圧迫時の拡張力、90 度屈曲時の復元力、180 度屈曲時の耐キンク性能の比較をした結果、複合材料編成ステントは金属単一ステントと同等以上の拡張力を持ち、屈曲部への追従性や耐キンク性能は金属単一ステントより優れていた。今後の新しいステント開発の基礎となる知見を提供しており、学位に値すると判断した。

【1533】

氏 名 (本 籍)	や 矢 吹 輝 (広島県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 番 号	甲 第 869 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	

CpG Oligonucleotides Activate the Immune Response in Burned Mice

論文審査委員 主査 (教授) 岡本祐之
(教授) 藺田精昭 (教授) 木梨達雄

論文内容の要旨

【はじめに】

熱傷後に認められる免疫抑制状態は敗血症を引き起こし多臓器不全発生の引き金となるものの、その発生機序には不明な点が多く、有効な治療方法もないのが

現状である。本実験ではマウス熱傷モデルを作製し、熱傷受傷後の免疫能を抗原提示蛋白である MHC class II 発現や炎症性サイトカイン産生にて観察するとともに、免疫刺激物質として知られる CpG オリゴヌクレオチドによる免疫賦活効果を検討した。

【研究方法】

熱傷マウスモデルは BALB/c マウス（雄 8-10 週）に熱湯スチームを 4 秒間暴露することによって熱傷面積 20% の全層熱傷を作製した。CpG オリゴヌクレオチドは免疫賦活作用の報告されている CpG1826、ならびに対照として配列は酷似しているもの免疫賦活作用を有しない CpG1982 を使用した。熱傷後の免疫状態を評価するために受傷後 0, 4, 7, 14, 21 日後にマウスから摘出した脾マクロファージ上の MHC class II 発現の変化をフローサイトメトリーにて測定した。さらに CpG オリゴヌクレオチドの効果を Ex vivo で検討するため熱傷 14 日目のマウスより採取した脾マクロファージと各種濃度の CpG オリゴヌクレオチドを共培養し MHC class II 発現の変化を経時的に観察した。また熱傷後における炎症性サイトカイン（IL-12, TNF α , IL-6, IL1 β ）産生ならびに CpG オリゴヌクレオチドによる効果を検討するため、脾マクロファージに CpG1826 ならびに CpG1982 を添加し共培養した後に上清中のサイトカイン濃度を測定した。さらに In vivo における CpG オリゴヌクレオチドの効果を検討するため、受傷 4 日目に腹腔内投与し、その 10 日後に脾マクロファージ上の MHC class II 発現を観察した。

【結果】

脾マクロファージ上 MHC class II 発現は熱傷受傷後 4 日目より低下したことより、受傷後早期より免疫抑制状態に陥ることが観察された。CpG1826 との共培養は MHC class II 発現の改善を示し、熱傷による免疫抑制に対し有効であった。熱傷後に低下を認めたサイトカイン産生量は CpG1826 刺激によって速やかに増加した。In vivo における CpG 投与実験においては受傷後 14 日目における MHC class II 発現の低下が抑制された。

【考察】

マクロファージの抗原提示能は T 細胞増殖や B 細胞の抗体産生などにも影響するため MHC class II 分子の発現は適切な免疫応答に必須である。本実験より熱傷受傷後に脾マクロファージにおける MHC class II 発現とサイトカイン産生低下をきたすことが観察され、このような免疫抑制が感染を助長し敗血症時の多臓器不全の発生に関与していると考えられた。CpG オリゴヌクレオチド投与による炎症性サイトカイン産生の亢進が、自然免疫活性化効果や Th1 リンパ球への分化

促進効果を発揮すると推測された。また in vivo, in vitro いずれにおいても投与が、脾マクロファージの MHC class II 発現増加効果を示したことより、CpG オリゴヌクレオチドによるマクロファージ活性化作用が確認できた。

【まとめ】

マウスを用いた熱傷モデルでは、脾マクロファージにおける MHC class II 発現と炎症性サイトカインの産生抑制を示したものの、CpG オリゴヌクレオチド投与によりそれらが改善した。免疫刺激物質である CpG オリゴヌクレオチドが感染合併症のリスクを有する熱傷患者の治療に有用である可能性が示唆された。

なお、本要旨に該当する内容は、*J Surg Res.* 161: 111-118, 2010 に掲載されている。

審査の結果の要旨

熱傷後に生じる免疫抑制は易感染状態を誘導し患者の予後を左右する大きな要因となる。本研究はマウスの熱傷モデルにおける脾臓マクロファージの MHC class II の発現と IL-12, TNF- α などのサイトカイン産生に焦点を当てて、熱傷受傷後に免疫能が抑制されることを確認した。さらに CpG オリゴヌクレオチドがマクロファージ活性化作用をもたらす、重症熱傷の治療に有用である可能性を示唆し、学位に値する研究と考えられた。

【1534】

氏 名（本 籍）	こ やぶ まさ のり 小 薮 雅 紀（岡山県）
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 番 号	甲 第 870 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	

Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases

論文審査委員 主査（教授）権 雅憲
（教授）池原 進 （教授）木梨達雄

論文内容の要旨

【研究目的】

自己免疫性膵炎（autoimmune pancreatitis: AIP）は、脾腫大と主膵管の狭細像を呈し、血清 IgG, IgG4 の上昇や自己抗体の出現など、その発症に自己免疫機序の

関与が疑われる脾疾患である。本症には脾以外の臓器病変（硬化性胆管炎，硬化性唾液腺炎，後腹膜線維症など）を合併することがあり，全身性疾患である可能性も指摘され，IgG4 関連硬化性疾患などの概念も提唱されている。脾外病変のなかでも硬化性胆管炎は高率に合併し，原発性硬化性胆管炎（primary sclerosing cholangitis: PSC）と類似の画像所見を呈する。そのためこの IgG4 関連硬化性胆管炎（IgG4-related sclerosing cholangitis: IgG4-SC）と PSC の区別が臨床的に問題となるが，その病態については未だ不明な点が多い。近年，様々な自己免疫性疾患の発症に制御性 T 細胞（regulatory T cells: Tregs）が，関与していることが数多く報告されている。そこで今回我々は，IgG4-SC と自己免疫性肝疾患について免疫組織学的検討を行った。

【研究方法】

今回我々は IgG4-SC 患者の 16 症例を肝内胆管に病変があるタイプ（Intra）と病変部が肝外胆管のみのタイプ（Extra）に分け，Intra の 8 例を PSC 患者 26 例，自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis: AIH）患者 9 例，原発性胆汁性肝硬変症（primary biliary cirrhosis: PBC）患者 9 例の肝組織で免疫組織学的な検討を行った。抗 IgG1 抗体，抗 IgG4 抗体，抗 Foxp3 抗体（Tregs の特異的転写因子）にてそれぞれ免疫染色を行い，各々の陽性細胞数と単核球数との比率（IgG1/Mono, IgG4/Mono, Foxp3/Mono）を計測した。

【結果】

IgG4 陽性細胞数と単核球数との比率（IgG4/Mono）は IgG4-SC が他の自己免疫性肝疾患（PSC, AIH, PBC）と比較して有意に高く，IgG1/Mono は逆に IgG4-SC では低値であった。IgG4/Mono と IgG1/Mono の比率（IgG4/G1）は IgG4-SC が PSC, AIH, PBC と比較して有意に高く，IgG4-SC のみが 1 以上の値であった。Foxp3/Mono では PBC が IgG4-SC, PSC と比較して有意に高く，IgG4-SC と PSC では IgG4-SC の方が PSC より有意に高値であった。また，IgG4-SC 患者でのみ，IgG4/Mono と Foxp3/Mono の正の相関（ $R=0.75$ ）が認められた。

【考察】

IgG4-SC と PSC は臨床像が大きく異なる。IgG4-SC は PSC と異なりステロイドに良好な反応を示し，予後が良好であるため両者を正確に鑑別する必要がある。今回の検討において，IgG4/Mono と IgG1/Mono の比率（IgG4/G1）は IgG4-SC が PSC, AIH, PBC と比較して有意に高く，IgG4-SC のみ値が 1 以上であった。このことは IgG4-SC では IgG4 陽性細胞数が IgG1 陽性細胞数より多いことを示しており，IgG4-SC と PSC との鑑別において IgG4 陽性細胞数と IgG1 陽性細胞数を

計測することは有用であると考えられた。

Robinson らは，高濃度の抗原が曝露されると Th2 反応が抑制され Th1 優位の反応に切り替わり，その結果 IL-10 産生制御性 T 細胞が増加し，産生された IL-10 が B 細胞の IgG4 クラススイッチを促すと報告している。今回 IgG4-SC において IgG4 と Foxp3 の陽性細胞数に正の相関が認められたことは，Tregs の増加が IgG4 陽性細胞の浸潤に関与している可能性があり，また PSC, AIH, PBC では相関が認められなかったことより，これらの疾患においては Tregs の機能が IgG4-SC のものとは異なる可能性が示唆された。

なお，本要旨に該当する内容は，*J Gastroenterol.* 45: 732–741, 2010 に掲載されている。

審査の結果の要旨

新規疾患概念の IgG4 関連硬化性胆管炎（IgG4-SC）は原発性硬化性胆管炎（PSC）との鑑別が問題となり，病態にも不明な点が多い。申請者は各種自己免疫性肝疾患を対象に IgG1, IgG4, FoxP3 に対する免疫組織学的検討を行い，IgG4 陽性細胞/IgG1 陽性細胞比の上昇が IgG4-SC の補助診断となりうること，また制御性 T 細胞による IgG4 産生制御機構の存在を示唆し，学位に値すると考えられた。

【1535】

氏 名（本 籍）	おお しげ ひで ゆき 大 重 英 行（大阪府）
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 番 号	甲 第 871 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	

Flow cytometric analysis for the mechanism of the new antineoplastic agent temozolomide in glioma cells

論文審査委員 主査（教授）螺良愛郎
（教授）中邨智之 （教授）日下博文

論文内容の要旨

【研究目的】

悪性神経膠腫の本邦での治療薬として，2006 年 7 月本邦で 20 年ぶりに神経膠腫の新規治療薬である temozolomide が承認された。temozolomide は，内服可能な第 2 世代のアルキル化剤で世界的にも悪性神経膠腫の標準治療薬となりつつあり，注目されている。その作用機序に関しては，まだ十分に解明されてい

い。今回我々は、神経膠腫の cell line である U87MG, U373MG, 9-LMG を用いて FCM (flow cytometry) にて、その殺細胞効果、作用機序について検討した。

【材料と方法】

実験方法

ヒト glioma 株化細胞である U373MG 株化細胞, U87MG 株化細胞とラット glioma 株化細胞である 9-LMG 株化細胞のそれぞれにつき control 群, effective dose 50 (ED50) に近い中等度 TMZ 投与群 (100~250 $\mu\text{g/ml}$), 高度 TMZ 投与群 (300~500 $\mu\text{g/ml}$) 投与群を作成した。投与当日を 1 日目とし 2, 3, 4, 5 日目に cell count を行なった。U87MG では 8 日目, 9 日目の細胞数もカウントしそれぞれの FCM によるヒストグラム解析を 7-AAD と BrdU の 2 重染色を行ない解析した。通常のヒストグラムは 1 種類の色素のみで DNA を染めることで描かれるが, 2 種類の色素で染める事により 3D 表示が可能である。これにより, 2 次元分析では一見わからない S 期の増加を視覚的に認識することが可能となる。

培養方法

dMEM に gentamycin (5%) を加えた液体をシャーレボトル内に満たし培地とした。開始細胞数は 5×10^5 から cell line は U373MG (human), U87MG (human), 9-LMG (rat) の 3 系統を用いた。Temozolomide は蒸留水にて溶解して速やかに投与した。培養は CO_2 incubator を用いて 37°C , CO_2 5.0% を保持し行なった。

細胞周期の測定

測定器機として BD 社の FACS calibur を用いた。統計学的解析には統計解析ソフトである Stat Mate III を用い, χ^2 乗検定を行った。そして, P 値 < 0.05 (*), P 値 < 0.001 (**) で有意差ありとした。細胞周期に関しては FCM により得られたヒストグラムを G_0G_1 期, S 期, G_2M 期に分割し, それぞれの細胞周期にある細胞比を検討した。7AAD と BrdU から得られた dot gram から gating を行ない, G_0G_1 , S, G_2M 期の細胞比を算出した。

【結果】

- (1) TMZ による増殖抑制: U373MG では 250~500 $\mu\text{g/ml}$ で, U87MG や 9-LMG では 100~400 $\mu\text{g/ml}$ で 50% 程度の殺細胞効果を認めた。U373MG では, 5 日目で TMZ 200 $\mu\text{g/ml}$ と 500 $\mu\text{g/ml}$ 投与群で有意な細胞数減少を認めた。9-LMG では 3 日目以降で TMZ 100 $\mu\text{g/ml}$ 投与群と 400 $\mu\text{g/ml}$ 投与群で有意な細胞数減少を認めた。
- (2) TMZ の細胞周期への影響を FCM により解析: U373MG では 2~4 日目に G_0G_1 期から S 期への集積傾向があり, TMZ 200 $\mu\text{g/ml}$ 投与群では 4 日目で

TMZ 500 $\mu\text{g/ml}$ 投与群では 1~4 日目で有意な集積を認めた。その後 4~5 日目は G_2M 期に細胞の集積傾向を認め, 特に TMZ 200 $\mu\text{g/ml}$ 投与群では 5 日目, TMZ 500 $\mu\text{g/ml}$ 投与群では 4, 5 日目に有意な集積を認めた。9-LMG でも 2~3 日目に S 期への集積を認め, その後は G_2M 期に集積を認めた。U87MG でも同様に 2 日~3 日目に S 期への集積傾向を認め, その後 G_2M 期に集積を認めた後, 8 日目, 9 日目に subG_1 期に集積を認めた。

- (3) U87MG で観察された 8 日目, 9 日目の subG_1 期の細胞を形態的に観察すると核の泡沫状変化を認め, TUNEL 染色では陽性でアポトーシスが示唆された。

【考察】

Temozolomide は摂取後, 速やかに加水分解・脱炭酸を受け, DNA メチル化作用をもつ 5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MITC) に変換される。これにより主にグアニン O6 位にメチル化を起こし細胞毒性を発揮する反応を引き起こす。

様々な機序により形成された DNA 障害に反応して, 細胞は細胞周期を停止する機構を各細胞周期に持っており, これをチェックポイントという。各細胞周期に対応して, G_1 期, S 期, M 期, G_2 期チェックポイントと呼ばれ, 様々な抗癌剤により, 作用機序は異なる。

細胞種により異なるという意見もあるが, 我々の行った実験ではいずれの細胞株でも同様の傾向がみられ, 特に BrdU を用いて S 期のブロックを鋭敏に観察することができた。そして, U87MG 株化細胞に限っての観察であるが, 8 日目にアポトーシスを示す SubG_1 期への集積がみられた。

以上より temozolomide の flow cytometry 法による作用機序解析の結果としては S 期, G_2M 期の両方に経時的に細胞周期ブロックを認めた。また 8 日目には SubG_1 期への集積傾向もみられアポトーシスの関連性も示唆された。

Temozolomide の主要な作用は今迄, 血液系の細胞でなされてきたが, その作用機序は主にアポトーシスであると報告されてきた。しかし, グリオーマ細胞においては主に細胞周期停止によるものであることが明らかになってきており, 我々の実験もそれを支持するものであった。

特に temozolomide に関して, 今迄に 7AAD, BrdU を用いて 2 重染色を行ない 3D 表示することでより明瞭に描出した論文は他になく, 特に S 期のブロックを鋭敏に観察する意味でも意義があったと考えられた。

【結語】

temozolomide をグリオーマ株化細胞である U87MG, U373MG, 9-LMG を作用させ, その作用機序を flow

cytometry にて評価した。早期の S 期のブロックと、その後の G₂M 期のブロックを認め、それを 7AAD と BrdU を用いて 2 重染色を行なうことでより明瞭に解析できた。2 重染色法は視認性に優れ、flow cytometry 法は抗癌剤の作用機序を解析するのに有用であった。これらの解析により、より効率的な集学的治療が期待される。

なお、本要旨に該当する内容は、*Brain Tumor Pathol.* 27: 7-15, 2010 に掲載されている。

審査の結果の要旨

悪性神経膠腫の治療薬として、最近新薬として開発された temozolomide は、世界的に使用されつつあるが、その抗癌作用機序解析を試みた。TMZ について、3 種類の神経膠腫の cell line を用いて flow cytometry (FCM) にて、7-AAD と BrDU の二重染色法により、細胞周期を解析し、その作用機序が早期の S 期と G₂M 期のブロックによる抗腫瘍効果であることを明らかにした。この解析は、今後のより効果的な集学的治療の応用への一助となることが期待でき、学位に値すると考えられた。

【1536】

氏 名 (本 籍) 矢 内 勢 司 (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 872 号
学位授与の日付 平成 22 年 3 月 31 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Anti-tumor effects of fusion cells of type 1 dendritic cells and Meth A tumor cells using hemagglutinating virus of Japan-envelope

論文審査委員 主査 (教授) 福原資郎
(教授) 螺良愛郎 (教授) 藺田精昭

論文内容の要旨

【背景及び研究目的】

樹状細胞 (DC) は、強力な T 細胞活性化能を有する抗原提示細胞 (APC) であり、現在、悪性腫瘍の治療として、DC を用いた免疫療法が注目を集めている。今回、我々は、骨髄由来の DC type1 (DC1) と放射線照射を行った Meth A (マウス線維肉腫細胞株) を融合させ、皮下投与し、抗腫瘍効果を検討した。

【研究方法】

まず、DC1 を誘導するために、BALB/c の骨髄細胞 (BMC) を GM-CSF と共に培養し、DC type0 (DC0) を誘導した後、さらに、DC0 を IL-12, IFN- γ と共に培養した。このようにして誘導された BMC 由来の DC0, DC1 を、不活化センダイウィルス (HVJ-E) を用いて、20Gy の放射線照射を行った Meth A とで、融合細胞を作製した。この後、Meth A を皮下接種した BALB/c マウスに、BALB/c の骨髄由来の DC1 を投与した (DC1 単独) 群と、BALB/c の骨髄由来 DC1 と放射線照射された Meth A (r-Meth A) の融合細胞を投与 (皮下注射) した (融合細胞) 群を作成し、腫瘍発育、生存率、生存期間について検討した。また、Meth A を静脈内投与し、肺転移モデルを作成し、同様の治療を行い、生存率、生存期間、肺転移巣効果を検討した。

【結果】

Meth A 皮下接種実験では、DC0, r-Meth A, DC0 と Meth A の融合細胞、DC0 と r-Meth A の融合細胞を投与 (皮下注射) したが、DC0, r-Meth A は、わずかに腫瘍の発育抑制効果がみられ、DC0 と r-Meth A の融合細胞は、さらに、腫瘍の発育抑制効果がみられたが、いずれも未治療群との有意差は認めなかった。DC0 と Meth A の融合細胞に至っては、全く腫瘍の発育抑制効果がみられず、投与部位に、腫瘍の形成が見られた。従って、次に、DC1 を使用した Meth A 皮下接種実験を行った。未治療群、DC1 単独群に比べ、DC1 と r-Meth A の融合細胞群が有意に腫瘍の発育抑制効果がみられた。しかしながら、生存期間については、未治療群に比べ、延長効果を認めたにもかかわらず、DC1 単独群と比べると、DC1 と r-Meth A の融合細胞群は、有意な延長効果は認めなかった。

肺転移モデルにおいては、DC1 と r-Meth A の融合細胞群は、未治療群、DC1 単独群に比べ、有意に生存期間の延長効果が見られた。肺転移巣に関しても、DC1 と r-Meth A の融合細胞投与では転移抑制効果がみられた。今回使用した DC1, DC1 と r-Meth A の融合細胞の作用機序を RT-PCR を用いて検討したが、DC1 は、IFN- γ , IL-12 など Th1 サイトカインだけでなく、IL-4, IL-10 など Th2 サイトカインも発現しており、DC1 と r-Meth A の融合細胞においても、同様だが減弱した結果を示した。IL-4 の発現に関しては、1h 培養後で増強しており、担癌宿主への投与後の増強が示唆された。又、Meth A 細胞における TGF- β の mRNA の発現はみられず、TGF- β の Meth A の増殖における関与は、否定的であった。

【考察】

DC1 と放射線照射処理を行った悪性腫瘍細胞との

融合細胞投与は、腫瘍の発育を抑制し、生存期間を延長させようと考えられた。また、我々の実験では、誘導された DC1 は、Th1 サイトカインだけでなく、Th2 サイトカインも発現し、さらに、DC1 と放射線照射処理を行った悪性腫瘍細胞との融合細胞は、担癌宿主投与後に Th2 サイトカインを増強することが示唆された。以上より、Th2 サイトカインの抑制と Th1 サイトカインの増強がさらなる抗腫瘍効果の発現に必要であると考えられる。

なお、本要旨に該当する内容は、Int J Oncol, 35: 249–255, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は骨髓由来樹状細胞 (DC) とマウス線維肉腫細胞株を不活化センダイウイルスを用いて融合細胞を作成し、その抗腫瘍効果を検討したものである。マウスに皮下接種された腫瘍細胞の増殖は、融合細胞治療群において未治療群と DC 単独群に比し優位に抑制され、宿主の生存期間は DC 単独治療群とほぼ同じ延長効果を示した。肺転移モデルでは未治療群と DC 単独群に比し優位に生存期間の延長を示した。本研究は、腫瘍細胞と DC との融合細胞におけるワクチン効果の有用性を示したものであり学位に値する。

【1537】

氏 名 (本 籍) せき 石 明 (中国)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 873 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 31 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Intra-Bone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells Suspended in Collagen Gel Retains Injected Cells in Bone Marrow, Resulting in Rapid Hemopoietic Recovery in Mice

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 木梨達雄 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【はじめに】

骨髓移植は血液疾患、免疫不全疾患、自己免疫疾患の治療として広く行われている。我々は最近、効率のよい骨髓移植法である骨髓内骨髓移植法 (IBM-BMT 法) を開発した。従来の骨髓移植が、ドナー骨髓細胞

をレシピエントの静脈内に投与し、投与された細胞は流血に乗り骨髓に達するのを期待しているのに対して、骨髓内骨髓移植では、ドナーの骨髓細胞を直接にレシピエントの骨髓内に注入するために、ドナーの骨髓細胞を効率よくレシピエントの骨髓内に投与可能である。ところが、骨髓は血管が豊富であるため、骨髓内に投与されたドナー骨髓細胞の一部は末梢血中に流出する。

本研究で用いたコラーゲン・ゲルは、*in vitro* での 3 次元培養のために開発されたゲルであり、4°C では液体であるが温度を上げるとゲル化する。今回の研究では、IBM-BMT を行う時に、このコラーゲン・ゲルを用いてドナー骨髓細胞をレシピエントの骨髓内により多く保持することを試み、またその造血に対する効果を検討した。

【研究方法】

1. コラーゲン・ゲルを用いた骨髓移植法

ドナー骨髓細胞を PBS あるいはコラーゲン・ゲルに 4°C で浮遊させ 37°C に暖めた後、レシピエントマウスの脛骨骨髓内に 10 μ l 投与した。

2. ドナー骨髓細胞のレシピエント骨髓内への保持効果の検討

前日に 10 Gy の放射線を照射したレシピエントである C57BL/6 マウス (B6 マウス) に PBS あるいはコラーゲン・ゲルに浮遊させた eGFP-Tg マウスの骨髓細胞 (10⁷ cells/10 μ l) を投与し、1 時間後に屠殺、レシピエント骨髓内のドナー骨髓細胞の割合を検討した。

3. day 12 colony-forming units in spleen (CFU-S) assay

前日に 9 Gy の放射線照射を行った B6 マウスに 10⁵ 個の eGFP-Tg マウスの骨髓細胞を投与し 12 日後に屠殺し、脾臓に形成された造血コロニーをカウントした。

4. 骨髓移植後長期間の観察

前日に 7 Gy の放射線照射を行った B6 マウスに eGFP-Tg マウスの骨髓細胞 (10⁶ cells/10 μ l) を投与し、1 ヶ月後、100 日後の末梢血におけるドナー造血系細胞の割合を検討した。

【結果】

1. コラーゲン・ゲルを用いた IBM-BMT は従来の IBM-BMT と比較して、より多くのドナー骨髓細胞をレシピエント骨髓内に保持することが可能であった。

IBM-BMT 後 1 時間でレシピエントマウスを屠殺し、ドナー骨髓細胞を注入した脛骨のドナー骨髓細胞の割合を検討したところ、コラーゲン・ゲルを用いた IBM-BMT では PBS を用いた IBM-BMT と比較して、より多くのドナー骨髓細胞が認められた。

2. コラーゲン・ゲルを用いた IBM-BMT では PBS を

用いた場合と比較して、より高い造血活性が認められた。

day 12 CFU-S は、造血系の非常に未熟な前駆細胞の造血活性を反映するとされているので、day 12 CFU-S アッセイを行い、コラーゲン・ゲルあるいは PBS を用いた IBM-BMT の造血活性を検討した。コラーゲン・ゲルを用いた IBM-BMT の方が PBS を用いた IBM-BMT よりも多くのコロニー形成が認められた。

3. コラーゲン・ゲルを用いた IBM-BMT ではドナーの造血活性の増強は長期間保持される。

骨髓移植 1 日前にレシピエントに対し 7Gy の放射線照射を行い、移植 1 ヶ月後あるいは 100 日後の末梢血におけるドナー由来造血系細胞の割合の検討を行った。コラーゲン・ゲルを用いて IBM-BMT を行った群では PBS を用いた群と比較して、1 ヶ月後、100 日後共に、多数のドナー由来白血球が認められた。また、CD3⁺ 細胞、B220⁺ 細胞、Gr-1⁺ 細胞のいずれの分画においても多数のドナー由来細胞が認められた。

【考察】

IBM-BMT は従来の骨髓移植と比較して非常に有効な骨髓移植法であるが、骨髓内に投与された骨髓細胞の一部は末梢血中に漏出する。コラーゲン・ゲルはこの漏出を抑制するために有効であり、ドナー骨髓細胞の、より効率的な移植が可能であった。その結果として、より高いドナーの造血活性が認められた。

我々が用いたコラーゲン・ゲルは、ブタのアキレス腱から作られたものであり、ヒトにこの方法が直接応用可能かどうかは不明であるが、ドナー骨髓細胞をレシピエントの骨髓内により多く留めることは、骨髓移植に有効であると考えられるため、さらに、より有効で安全な方法を開発することが必要と考えられた。

なお、本要旨に該当する内容は、Stem Cells. 26: 2211–2216, 2008. に掲載されている。

審査の結果の要旨

骨髓内骨髓移植法は、従来の骨髓移植法（骨髓細胞を静脈内に投与する）に比べて格段に効率的な移植方法である。しかし、骨髓は血管が豊富なことから、骨髓内に投与された骨髓細胞の一部は末梢血中に流出する。本研究は、コラーゲン・ゲルがこの流出を有意に抑制し、レシピエント造血組織において、従来の骨髓移植法よりも高いドナー由来造血活性をもたらすことを明らかにしている。以上より、医学的に価値ある研究と認められる。

【1538】

氏名(本籍) ^{いま い ゆういちろう} 今井 雄一郎 (滋賀県)
学位の種類 博士(医学)
学位番号 甲 第 874 号
学位授与の日付 平成 22 年 3 月 31 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Caspase Inhibitor, ZVAD-fmk, Facilitates Engraftment of Donor Hematopoietic Stem Cells in Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation

論文審査委員 主査(教授) 藺田精昭
(教授) 木梨達雄 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【研究目的】

効率良く骨髓移植を行うためにはドナーの造血幹細胞活性をいかに維持するかが重要である。関西医科大学 病理学 第一講座では、骨髓内骨髓移植 (Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation; IBM-BMT) を開発し、それがドナー造血幹細胞の速やかな回復、骨髓移植の前処置である放射線照射量の減量や移植片対宿主病の発症率減少／軽症化につながることを報告してきた。

apoptosis は細胞自らが DNase を活性化し、DNA を断片化することによって誘導される細胞死であるが、donor 骨髓細胞における apoptosis は骨髓移植の成功率を低下させる可能性があると考えられる。apoptosis における DNase 活性化の前段階として caspase が活性化される。したがって caspase 阻害剤による donor 骨髓細胞の apoptosis 抑制は、IBM-BMT におけるドナー造血系細胞の生着率を改善する可能性がある。

そこで本研究では広域 caspase 阻害剤・ZVAD-fmk を併用した IBM-BMT と併用しない IBM-BMT における donor 骨髓細胞の生着率を比較検討した。

【方法】

1. in vivo における検討

IBM-BMT の donor を C57BL/6 マウスとし recipient を BALB/c マウスとする同種移植の系を用いた。実験群は以下の 5 群とした。①群：放射線照射のみ、②群：通常の IBM-BMT のみ、③群：IBM-BMT に加え、ZVAD-fmk を day-1 に donor へ投与、④群：IBM-BMT に加え、day 0 に ZVAD-fmk を recipient へ 1 回投与、⑤群：IBM-BMT に加え、day 0 と day 3 の 2 回、ZVAD-fmk を recipient に投与。

いずれの群においても recipient に対しては day-1 に

7Gy の放射線照射を行い、①群以外の群では day 0 に 1×10^5 個のドナー骨髄細胞を用いて IBM-BMT を行った。そして day 12 に recipient を屠殺し、colony-forming units in spleen (CFU-S) 数、および骨髄細胞中の donor 細胞の割合を検討した。

さらに、移植 1 ヶ月後の末梢血での donor 造血細胞の割合に関しても検討を加えるため以下の実験を行った。②群、⑤群において recipient に対しては day-1 に 6Gy の放射線照射を行い、day 0 に 1×10^7 個のドナー骨髄細胞を用いて IBM-BMT を行った。

2. in vitro における検討

培養した全骨髄細胞および c-kit⁺/Sca-1⁺/lineage⁻ cells (KSL cells) を用いて ZVAD-fmk の apoptosis に及ぼす影響を検討した。

【結果】

1. 未熟な造血前駆細胞の造血活性の指標である CFU-S の検討では、②群のコロニー形成が平均 1.7 個であったのに対し、③～⑤群では 4 個以上と ZVAD-fmk 使用群においてコロニー形成の増加が認められた。なお①群ではコロニー形成は認められなかった。
2. recipient 骨髄における donor 由来造血系細胞の割合は、①群：0%、②群：25%であったのに対し、③群：41%、④群：33%、⑤群：50%と ZVAD-fmk 使用群において donor 由来細胞の増加が認められた。
3. 移植 1 ヶ月後の末梢血では、ZVAD-fmk を用いた群において、用いなかった群に比して、donor 造血細胞は高い割合を示した。
4. 培養細胞においては、ZVAD-fmk は全骨髄細胞の apoptosis を僅かに抑制し、KSL cells に対しては有意に apoptosis を抑制した。

【考察】

caspase 阻害剤・ZVAD-fmk は未熟な造血前駆細胞の apoptosis を抑制し recipient における donor 造血細胞の造血促進を誘導し、IBM-BMT における生着促進効果をもたらした。この効果は長期に認められた。また、悪性腫瘍等の重大な副作用は、移植後 6 ヶ月まで認められなかった。したがって donor 造血系細胞のアポトーシス抑制による生着率改善法は、ヒトの骨髄移植にも適応できる可能性が示唆された。

なお、本要旨に該当する内容は *Stem Cells Dev.* 19: 461-468, 2010 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は、caspase 阻害剤 ZVAD-fmk による骨髄移植効率とマウス造血前駆細胞 (HPC) の apoptosis 抑制効果について、in vitro 及び in vivo で検討している。そ

の結果、ZVAD-fmk の in vivo 投与により day12 CFU-S の増加、レシピエント骨髄中のドナー由来細胞の増加、移植 1 ヶ月後の末梢血キメリズムの改善を認めている。ZVAD-fmk の in vitro 処理により、マウス骨髄由来 KSL 細胞分画の apoptosis の割合が減少したことから、間接的ではあるが ZVAD-fmk によるマウス HPC の apoptosis の抑制が示唆された。本研究は、骨髄内骨髄移植における caspase 阻害剤の有用性を示唆した点で価値ある研究と認められる。

【1539】

氏名(本籍) 松 矢 浩 暉 (大阪府)
学位の種類 博士(医学)
学位番号 乙 第 667 号
学位授与の日付 平成 21 年 5 月 26 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目

Regenerative effects of transplanting autologous mesenchymal stem cells on corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits

論文審査委員 主査(教授) 福原資郎
(教授) 池原 進 (教授) 藺田精昭

論文内容の要旨

【はじめに】

骨髄移植や臓器移植、自己免疫疾患、脊髄損傷などに対しステロイド剤は非常に有益な治療薬である。しかしながらステロイド投与には重篤な副作用があり、特に大腿骨頭壊死症は重大な合併症の一つである。大腿骨頭壊死の発生には血栓や脂肪塞栓、血管炎、髄内血腫など多くの発生要因があり、現在のところ骨頭壊死の発生を予防する方法はなく、また、発生後は外科的加療になることが多い。

骨髄細胞は造血系幹細胞だけでなく骨芽細胞や内皮細胞にも分化する間葉系幹細胞も含まれており、この間葉系幹細胞は骨形成や血管新生に重要な役割を果たしている。今回われわれはメチルプレドニゾロン(以下、MPSL)を投与することにより骨壊死を発生させたステロイド誘発性骨壊死家兎の長管骨に培養した間葉系細胞移植を行い再生のメカニズムを解析した。

【研究方法】

生後 28～32 週齢の雌日本白色家兎(3～4 kg)を用い、20 mg/kg の MPSL を左大殿筋に筋肉注射した。MPSL 投与後 2 日目に左大腿骨より自家骨髄細胞を採

取し、それらを 5 日間培養し間葉系細胞を採取した。実験系は以下の 3 グループを作成した：(1) MPSSL 単独投与群 (MPSSL alone 群)，(2) MPSSL 投与後 7 日目に、間葉系細胞 ($1 \times 10^7/2 \text{ ml}$) を右大腿骨骨髓腔内に移植した群 (MPSSL+MCs 群)，(3) MPSSL 投与後 7 日目に、生理食塩水 (2 ml) を右大腿骨骨髓腔内に移植した群 (MPSSL+saline 群)。

評価項目は以下の 4 項目を行った。(1) 骨壊死の評価として HE 染色を行い、骨壊死発生率を比較した。(2) 虚血性変化の評価として VEGF 染色を行った。(3) アポトーシスの評価として TUNEL 染色を行った。(4) 骨髄細胞活性を評価するために flow cytometry を用いて cell cycle の G0/1 期の割合を評価した。

統計学的有意差については、 χ^2 検定と Student's t 検定を用いて行い、危険率 5% 未満をもって有意差とした。

【結果】

- (1) 骨壊死の発生率は MPSSL alone 群が近位、遠位ともに 53.3% であり全体では 80% に骨壊死を認めた。また MPSSL+saline 群では近位、遠位ともに 47.4% であり全体では 68.4% に骨壊死を認めた。一方 MPSSL+MCs 群では骨壊死は認められず、骨死発生率は有意に低下していた。
- (2) VEGF 染色による虚血性変化の評価では MPSSL alone 群、MPSSL+saline 群では陽性部位を多く認めたが、MPSSL+MCs 群ではほとんど認められなかった。
- (3) TUNEL 染色によるアポトーシスの評価も MPSSL alone 群、MPSSL+saline 群では陽性部位を多く認めたが、MPSSL+MCs 群ではほとんど認められなかった。
- (4) cell cycle の評価では、G0/1 期の割合は MPSSL alone 群で 70%、MPSSL+saline 群で 68% であり、正常骨髄細胞の 63.5% より有意に高値であった。一方、MPSSL+MCs 群では 63% であり、MPSSL alone 群や MPSSL+saline 群に比べ有意に低下しており、正常骨髄細胞 G0/1 期とほぼ同程度であった。

【考察】

今回我々の実験では MPSSL alone 群の骨壊死発生率は 80% に対して、MPSSL+saline 群は 68.4% と低値であった。これは注入する際に作成した骨孔から骨髄内圧が減少し骨壊死の発生率が低下したものと考えられた。しかし saline を注入しても骨壊死発生率は高値であったが、MPSSL+MCs 群では骨壊死発生率は 0% であった。特殊染色において骨髄内の虚血性部位やアポトーシス部位は MPSSL alone 群と MPSSL+saline 群に多く認められたが、MPSSL+MCs 群ではほとんど認められなかった。

一般に細胞増殖能が低下もしくは停止状態のときに

cell cycle の G0/1 期の割合は上昇する。今回、MPSSL alone 群と MPSSL+saline 群の G0/1 期は正常骨髄細胞に比べ有意に高値であり、一方 MPSSL+MCs 群では正常と同程度であった。以上よりステロイド投与により骨髄細胞の増殖能が低下し、間葉系細胞を移植することに骨髄細胞の増殖能が回復したと考えられた。

以上の所見よりステロイド誘発性骨壊死に対し培養間葉系細胞を直接骨髄内に移植する効果として、①骨髄内圧上昇の阻害、②虚血性変化とアポトーシスの抑制効果、③間葉系細胞による骨髄細胞の活性化が考えられた。予防および治療がなされたものと考えられた。

なお、本要旨に該当する内容は、*Mod Rheumatol.* 18: 132-139, 2008 に掲載されている。

審査の結果の要旨

ステロイド療法に好発する大腿骨頭壊死の原因は不明であり、壊死から生じる骨折は患者の ADL を損なう。本研究は、ステロイド誘発性骨壊死家兎において、自家骨髄細胞の骨髄内移植と同様に、自家骨髄由来の間葉系培養細胞の骨髄内移植が骨壊死を予防することを明らかにした。同時に、ステロイド誘発骨壊死発生のメカニズムを検討している。この研究成果は、直ちに臨床応用可能であり、予防法の確立に資するもので学位に値する。

【1540】

氏 名 (本 籍)	はち みね だい さく 鉢 嶺 大 作 (大阪府)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 番 号	乙 第 668 号
学位授与の日付	平成 21 年 9 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	

Involvement of Smad3 phosphoisoform-mediated signaling in the development of colonic cancer in IL-10-deficient mice

論文審査委員 主査 (教授) 螺良愛郎
(教授) 伊藤誠二 (教授) 権 雅憲

論文内容の要旨

TGF- β は細胞の分化、分裂、motility、死を調節する多機能な蛋白である。特に腸管においては、TGF- β は大腸上皮粘膜の細胞増殖を tumor suppressor として抑制の働きをするだけではなく、免疫細胞の負の調節においても大きな役割を担う。大腸の上皮粘膜での

TGF- β の減少や TGF- β 1 に反応しなくなることが大腸の炎症進行、進展に関連している。しかしながら IL-10-deficient mice において TGF- β の過剰な活動は腫瘍の抑制よりも進行に関連する可能性がある。腫瘍の進展における TGF- β の役割は両方でありそれは腫瘍の時期 (stage) による。TGF- β の機能の違いは細胞内の異なるシグナル伝達によると考えられている。TGF- β の主のシグナル伝達には Smad 蛋白が関わる。Smad3 を異なる二つの phosphoisoform (C-terminally phosphorylated Smad: pSmad3C & linker-phosphorylated Smad: pSmad3L) に変化させることにより、TGF- β は TGF- β type receptor I だけではなく、c-Jun N-terminal kinase (JNK) も活性化する。TGF- β type receptor I/pSmad3C pathway は上皮細胞の増殖を抑制し、一方 JNK/pSmad3L pathway は hepatic stellate cell のような mesenchymal cell を促進させることで ECM の付着を促進させる。(しかしながら) 長期に慢性腸炎を患うことによる大腸癌の発生に Smad3 のシグナル伝達がどのように関連しているかは不明である。

今回の研究では、これらの phosphoisoform の活性化を評価し、慢性腸炎から大腸癌の進行に Smad3 phosphoisoform が関連するかどうか検討した。

【方法】

IL-10 knock out マウス (n=18) を 4 週から 32 週にわたり経時的に屠殺した。それらの全大腸をホルマリン固定しパラフィン切片にした。病理学的検討を行うため薄切 (5 μ m) し hematoxylin and eosin (H&E) 染色および免疫染色をおこなった。免疫染色に際しては、Smad3 に対する抗体として、Smad3 のリン酸化された linker 部位に特異的である抗体 (anti-pSmad3L) と Smad3 の C 末端に特異的である抗体 (anti-pSmad3C) を用いた。免疫染色の評価には染色されている範囲の割合によりスコア化した。

【結果】

IL-10 knock out マウス (n=18) において、7 週目より腸炎を発症し 8 週で dysplasia を認めた。12 週にて半数が大腸癌を有し 16 週以降は全例が癌を有した。Smad3 のリン酸化を検討するため大腸正常上皮粘膜、腸炎粘膜、dysplasia、癌での pSmad3L, pSmad3C, p53 の免疫染色を行った。pSmad3C の発現 (つまり Smad3C のリン酸化) には大腸正常上皮粘膜、腸炎粘膜、dysplasia、癌を通して有意な差は認められなかった。一方 pSmad3L の発現 (つまり Smad3L のリン酸化) は dysplasia では 12 例中 5 例に大腸癌では全例で認められた。大腸正常上皮粘膜、腸炎粘膜では Smad3L のリン酸化は認められず癌化するにつれ Smad3L のリン酸化が上昇していることが分かった。p53 の発現に関

しては大腸癌のみで認めた。大腸癌 10 例中 5 例で p53 の発現を認めたが発現細胞は非常に少なく染色も弱かった。

【結語】

大腸炎自然発症モデルである IL-10 knock out マウスにおいて Smad3L のリン酸化は慢性大腸炎に関連する大腸癌の癌化において重要な役割を担っている可能性があると考えられた。今後はさらにヒューマンでの潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌においても検討が必要である。

なお、本要旨に該当する内容は、*Int J Oncol.* 32: 1221–1226, 2008 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は、潰瘍性大腸炎モデル動物である IL-10 遺伝子欠損マウスを用い、慢性腸炎における発癌過程において、TGF- β シグナル伝達経路での smad3 リンカー部リン酸化の関与を明らかにした。また、p53 染色との比較において、今後、ヒト潰瘍性大腸炎における大腸癌の早期診断のバイオマーカーとなる可能性を示し、学位に値する研究と考えられた。

【1541】

氏 名 (本 籍)	おお 橋 敦 (大阪府)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 番 号	乙 第 669 号
学位授与の日付	平成 21 年 9 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	

Cerebral blood flow monitoring using a novel laser doppler flowmeter in asphyxiated infants

論文審査委員 主査 (教授) 河本圭司
(教授) 日下博文 (教授) 中村加枝

論文内容の要旨

【はじめに】

新生児仮死児における低酸素性虚血性脳症 (hypoxic ischemic encephalopathy: HIE) は、新生児医療が発達した今日でも重篤な後遺症を残すことが少なくない。HIE は生後早期の循環動態の不安定性に起因する脳血流障害がその主因と考えられており、その時期の脳血流量 (cerebral blood flow: CBF) の正確なモニタリングは、HIE の児の神経学的予後の予測において有用である。しかし、従来の超音波や近赤外分光を用いた方法

では短時間しか測定が行えないため、CBF を出生直後から長時間連続的に測定した報告はない。

そこで新たに開発された長時間、連続的に CBF 測定が可能であるレーザードップラー血流計 (laser Doppler flowmeter: LDF) を用いて重症新生児仮死児の CBF の連続測定を行った。

【対象と方法】

新生児仮死 (Apgar スコア 1 分値: 7 点未満, または血清乳酸脱水素酵素: 580U/L 以上と定義) で入院した 11 例を対象に, LDF を用いて出生直後から 96 時間, CBF を連続測定 (毎心拍毎に計測) した。

方法としては, LDF プローブを前額に留置し, 得られたデータを専用ソフトを用いてコンピュータに記録した。そして連続的な CBF の変動を定量的に評価するために, モニタリング開始から 96 時間の変動係数 (標準偏差値を平均値で除した値) を Stability Index (SI) として算出した。そしてモニタリング開始から 48 時間の SI の平均を SI_{48} , モニタリング開始 48 時間から 96 時間の SI の平均を SI_{96} として神経学的予後良好群 (A 群: $n=6$) と不良群 (B 群: $n=5$) の間で比較した。また CBF, 平均動脈血圧や心拍数についても二群間で検討した。

神経学的予後は頭部 CT や MRI または脳波検査と小児神経科医による評価で判定した (平均観察期間: 11 か月)。

【結果】

- (1) SI_{48} は神経学的予後不良群 (B 群) で有意に高値であった (A 群 0.228 ± 0.043 , B 群 0.285 ± 0.033 , $p < 0.05$) が, SI_{96} は有意差を認めなかった (A 群 0.257 ± 0.052 , B 群 0.249 ± 0.058 , $p = 0.81$)。
- (2) SI_{48} について 0.24 を cut off 値とすると, 0.24 以上の場合の神経学的予後不良を予測する鋭敏度は 100%, 特異度は 66.7% であった。
- (3) 平均動脈血圧や心拍数は神経学的予後良好群 (A 群) と不良群 (B 群) の二群間で有意差を認めなかった。

【考察】

新生児仮死では, CBF が血圧変動の影響を受けて増加することが報告されている。したがって CBF の連続モニタリングは新生児仮死児の神経学的予後の予測に有用であると考えられているが, 従来の方法では連続測定が困難であった。新たに開発された LDF は皮膚の脆弱な新生児においても非侵襲的に長時間の連続モニタリングが可能であり, 今回の検討が実施できた。その結果, 仮死新生児における出生直後からの CBF モニタリングは, 従来の循環動態の指標とされている平均動脈血圧や心拍数に比較して神経学的予後

の予測により有用であった。

また, SI_{48} 以外の循環動態因子は, 神経学的予後良好群と不良群の間で有意差を認めなかったことから, 脳血流の変動は循環因子だけでは規定されていない可能性が示唆された。すなわち見かけ上, 循環動態が安定していても, $SI_{48} > 0.24$ を呈するような CBF の変動が大きい症例では, 神経学的予後が不良となる可能性が高いため, HIE の予後を改善するためには, 二酸化炭素分圧の調節など, 脳血流を安定させる治療を考慮する必要があると思われた。

なお, 本要旨に該当する内容は, *Pediatr Int.* 51: 715–719, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

新生児乳幼児における低酸素性虚血性脳症 (HIE) は重篤な後遺症を残すことがある。この原因は生後早期の脳循環血流障害が要因であることから, 新しく開発された継続的に脳血流測定が可能であるレーザードップラー血流計を用いて脳血流を測定した。モニタリング開始 48 時間後の変動が予後判定に重要であった。今後, 本法は HIE の予後改善に有用であり, 学位に値すると考えられた。

【1542】

氏 名 (本 籍)	たか き たか し (東京都)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 番 号	乙 第 670 号
学位授与の日付	平成 21 年 9 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	

Presence of donor-derived thymic epithelial cells in [B6 → MRL/lpr] mice after allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation (IBM-BMT)

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 福原資郎 (教授) 木梨達雄

論文内容の要旨

【はじめに】

我々はこれまで通常の骨髓移植法 (静脈内注入法) では効果の無かった, MRL/lpr マウスの自己免疫疾患に対して, 骨髓内骨髓移植 (intra-bone marrow-bone marrow transplantation: IBM-BMT) 法を用いて MRL/lpr マウスの造藤細胞と間葉系細胞の両者を正常マウスのものと置換することにより, 治療が出来ることを明ら

かにした (Kushida et al., Blood, 2001). 本研究では, 骨髄細胞由来胸腺上皮細胞 (thymic epithelial cells: TEC) の関与について検討を行った.

【研究方法】

自己免疫疾患を発症した 3~4 ヶ月齢の雌 MRL/lpr マウスを宿主とし, 致死量の放射線照射 (4 時間間隔, 4.5 Gy×2 回) を行い, 次の日にドナーの 6~8 週齢の green fluorescence protein (GFP) 遺伝子導入雌 C57BL/6 (B6-GFP) マウスの骨髄細胞 (3×10^7 個) を IBM-BMT 法を用いて移植した. 8 週後に脾臓細胞, 及び胸腺細胞のキメリズム, サブセット及び機能の解析を行なうとともに, 胸腺組織を髄質の TEC のマーカーである MTS-10, 皮質の TEC のマーカーである cytokeratin18, さらに TEC の分化の転写因子である forkhead box N1 (FOXN1), TEC の組織特異抗原の発現を調整する転写因子 autoimmune regulator (AIRE) で免疫染色をし, ドナー由来のこれらの細胞の存在を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した.

【結果】

- 1) IBM-BMT 法による MRL/lpr マウスの脾臓 T 細胞, B 細胞, 及び胸腺細胞は全てドナーの B6-GFP マウス由来の細胞に置換され, そのサブセットもドナーとほぼ同じであった. MRL/lpr マウス特有の aberrant T 細胞も消失していた. 自己抗体も B6-GFP マウスと同じレベルまで低下し, またリンパ球はホストに対して免疫寛容を示した.
- 2) 胸腺組織では, GFP 陽性かつ MTS-10 陽性のドナー由来の髄質 TEC が見られ, また GFP 陽性で且つ cytokeratin 18 陽性のドナー由来の皮質 TEC も観察された. さらに, GFP 陽性で且つ FOXN-1, あるいは AIRE が陽性を示す TEC も観察された. 興味深いことに, FOXN-1 陽性 TEC は MRL/lpr マウスと B6-GFP マウスはほぼ同数で, 移植前後でも変化はなかったが, AIRE 陽性 TEC は MRL/lpr マウスで上昇しており, 移植後は B6-GFP と同じレベルまで低下していた.

【考察】

骨髄細胞には, 間葉系幹細胞が含まれていると考えられているが, 胸腺髄質と皮質の両方の TEC に分化する前駆細胞も含んでいることが示唆された. IBM-BMT 方法は, これらの細胞を生着させることが出来るものと考えられた. 骨髄細胞由来の TEC は, 免疫学的寛容や自己免疫疾患の制御にも関与している可能性がある.

なお, 本要旨に該当する内容は, *J Autoimmun.* 31: 408-415, 2008 に掲載されている.

審査の結果の要旨

本研究は, 正常成体 GFP トランスジェニックマウス骨髄細胞を MRL/lpr マウスに骨髄内骨髄移植 (IBM-BMT) することにより, MRL/lpr マウスにおける自己免疫病態が改善することを示している. その機序として, 正常成体マウス骨髄細胞に由来する GFP 陽性胸腺上皮細胞 (TEC) の関与を示唆した. 以上の結果は, 1) 正常成体マウス骨髄細胞中に TEC に分化する前駆細胞が存在すること, 2) TEC が自己免疫性疾患の制御や免疫学的寛容に関与することを示しており, 学位に値する研究と認められる.

【1543】

氏 名 (本 籍) きた むら なお ゆき 北 村 直 行 (大阪府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 乙 第 671 号
 学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
 学位論文題目

Effects of baby doctor-team interview on mood status
 of pregnant women with high risk delivery

論文審査委員 主査 (教授) 神崎秀陽
 (教授) 木下利彦 (教授) 福永幹彦

論文内容の要旨

【目的】

妊婦は一般に自身のみならず, 胎児の健康への不安を有するが, 未熟児や早産児を出産する可能性のある妊婦 (以下, ハイリスク妊婦) はその傾向がより強い. ハイリスク妊婦は母体・胎児集中治療室 (Maternal Fetal Intensive Care Unit: 以下, MFICU) に入院することが多いが, その場合, さらに孤立感といった情緒障害が加わることも多い.

本研究は, MFICU に入院したハイリスク妊婦への産前訪問によるカウンセリング (以下, 産前訪問) の効果を明らかにすることを目的に, 以下の二点を検討した.

- ① MFICU に入院したハイリスク妊婦の情緒障害の頻度および種類
- ② ハイリスク妊婦に対して新生児医療に携わる医師と臨床心理士で構成された心理カウンセリングチーム (以下, カウンセリングチーム) が産前訪問を行うことによって及ぼす妊婦の情緒障害への効果

【対象と方法】

2006 年 12 月から 2007 年 9 月に関西医大枚方病院 MFICU に入院したハイリスク妊婦のうち、本研究への参加に同意し、胎児死亡や死産となることなく分娩を当院で行い、分娩後も経過を追跡しえた 52 名を対象とした。

対象の年齢は 33.0 ± 4.8 歳（以下、平均値 $\pm$ 標準偏差；範囲 19～42 歳），入院時の妊娠週数は 29.0 ± 3.8 週（範囲 21.3～37.6 週），出産時週数は 34.0 ± 3.8 週（範囲 25.3～41.1 週）であった。

産前訪問は、カウンセリングチームが、入院後 1 週以内に初回を行い、以後、週 1 度のペースで行った。内容は「自己紹介を兼ねた産前訪問の意義の説明」、「未熟児に起こりやすい疾患とその予後の解説」、そして「不安や不満、要望に関する聞き取り」の 3 つのセッションから構成した。

対象には産前訪問前後に、情緒評価票（Profile of Mood States：以下、POMS）を記入してもらった。POMS は対象の気分、感情の状態を客観的に測定するもので、①緊張と不安（Tension-Anxiety：以下、T-A 領域）、②抑うつと落胆（Depression-Dejection：以下、D 領域）、③怒りと敵意（Anger-Hostility：以下、A-H 領域）、④活気・活力（Vigor：以下、V 領域）、⑤疲労（Fatigue：以下、F 領域）、⑥混乱（Confusion：以下、C 領域）の 6 領域を同時に評価できる。所要時間は 15 分程度で、被検者への物理的負担は少ない。具体的には、被検者は 65 の質問項目に 0 点から 4 点のポイントで回答する。検者は各領域別に合計したポイントを換算表で T スコアと呼ばれる指数に変換する。T スコアは中央値が 50 となるように作成されたもので、T-A 領域、D 領域、A-H 領域、F 領域、C 領域においては 60 を超える場合、また V 領域においては 40 未満の場合にそれぞれの領域での情緒障害があると判定する。

なお本研究は関西医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】

1. 情緒障害の頻度と種類

POMS によって、産前訪問前の情緒障害の頻度と種類を検討した結果、T-A 領域で 28.8%、D 領域で 23.1%、A-H 領域で 3.8%、V 領域で 48.1%、F 領域で 7.7%、C 領域で 11.5% の対象にそれぞれの情緒障害が認められた。

2. 産前訪問の情緒障害に及ぼす効果

ハイリスク妊婦の情緒障害に対する産前訪問の効果を明らかにするために、T スコアを産前訪問前後で比較した。その結果、T-A 領域、D 領域、A-H 領域、C 領域において産前訪問後に有意な改善が認められた（Paired Student's T-test で $P < 0.05$ ）。

3. 各種因子と情緒障害の関係

個別の各種因子と情緒障害の関係を明らかにするために、以下のような様々な条件間で T スコアを比較した：①死産・流産の既往のある場合とない場合、②生産児の分娩歴のある場合とない場合、③妊娠週数が 30 週未満と 30 週以降の場合、④多胎妊娠の場合と単胎妊娠の場合。

その結果、多胎妊娠の場合においてのみ、単胎妊娠の場合に比して有意に C 領域（「混乱」）の T スコアが高かった。

【考察と結論】

ハイリスク妊婦は約半数が「活気・活力の低下」を、また約 1/4 が「緊張・不安」や「抑うつ・落胆」といった情緒障害を有していることが明らかとなった。新生児科医と臨床心理士による産前訪問は、これらの情緒障害を改善する可能性があることが示唆された。

なお、本要旨に該当する内容は、*Pediatr Int.* 51: 498–501, 2009 に掲載されている。

審査の結果の要旨

妊婦は一般に自身のみならず、胎児の健康への不安を有するが、未熟児や早産児を出産する可能性のある妊婦（ハイリスク妊婦）はその傾向が強い。

本研究は「ハイリスク妊婦の約半数が【活気・活力の低下】を、約 1/4 が【緊張・不安】や【抑うつ・落胆】という情緒障害を有していること」、さらに「彼らに対する専門家チーム（新生児科医と臨床心理士）による産前カウンセリングは情緒障害を改善する可能性があること」を初めて明らかにしたもので、学位を授与するに値するものである。

【1544】

氏 名 (本 籍) えの き ち はる 榎 木 千 春 (鹿児島県)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 乙 第 672 号
 学位授与の日付 平成 21 年 9 月 29 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
 学位論文題目

Enhanced Mesenchymal Cell Engraftment by IGF-1
 Improves Left Ventricular Function in Rats
 Undergoing Myocardial Infarction

論文審査委員 主査 (教授) 池原 進
 (教授) 岩坂壽二 (教授) 松田博子

論文内容の要旨

【はじめに】

重症虚血性心疾患の患者に対してはこれまで心臓移植以外に根本的な治療法はなかった。しかし再生医療に関する基礎的研究の進歩は、心臓に血管や筋肉を再生させることを可能にしつつある。骨髄幹細胞移植は心臓再生医療において臨床的に応用されているが、その有効性に関しては報告者間に大きな差異がある。心筋への骨髄幹細胞移植における問題点の一つは、移植された細胞の低生着率である。心筋に移植された骨髄幹細胞は低酸素、低栄養環境下で死滅することがこれらの細胞の低生着率の原因であるといわれている。そこで、心筋に移植した骨髄幹細胞の生着率を改善するためには生存を促す細胞内シグナル伝達系を活性化することが重要であると考えられる。Insulin-like growth factor (IGF-1)-phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) は細胞の接着促進と細胞死の抑制に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで我々は培養骨髄間葉系細胞 (MCs) 移植に際し IGF-1 を同時投与することによって移植した細胞の生着率を改善し、心機能や生存率を向上させるうえで有効であるか否かを検討した。

【方法】

Green fluorescence protein (以下 GFP) 発現 S-D ラットの大腿骨、脛骨から得た骨髄細胞を培養して MCs を得た。まず *in vitro* において IGF-1 の細胞増殖、接着促進、細胞死抑制効果を検討した。次に *in vivo* の実験として S-D ラットの心臓を左前下行枝で結紮し、1 ヶ月後に MCs 5×10^6 個を心筋梗塞辺縁部に局所注入した。実験群として、PBS のみ、MCs、IGF-1 (10 μ g/ml) + MCs、IGF-1 のみ、IGF-1+LY294002 (PI3K 阻害薬) (LY: 5 μ M) + MCs の 5 群を作成した。MCs 生着率は移

植時に Rhodamine particle を混注し、細胞の生存率の経時変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。細胞移植後 3 日目の左室心筋組織内の SDF-1 α を ELISA 法にて定量した。血管新生の程度は移植後 3 日目、30 日目において、von Willebrand factor 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。ホスト心筋細胞のアポトーシスは TUNEL 法にて検討した。心筋繊維化は Massontrichrom 染色で行った。心機能評価は心筋梗塞後 3 日と移植後 30 日に心臓超音波法にて行った。各群において 12 ヶ月間の生存率を検討した。

【結果】

in vitro で 10 μ g/ml の IGF-1 は MCs の細胞増殖と接着を有意に促進し、低酸素環境下での細胞死を有意に抑制した。LY はこれら IGF-1 の効果を阻害した。*In vivo* の研究において移植された MCs の生着数 (Rhodamine particle に対する生着率 %) は 6 時間後と 3 日後で MCs 群と IGF-1+MCs 群間に有意差を認めた。IGF-1+LY+MCs 群では IGF-1+MCs 群と比較して MCs の生着数は有意に減少した。また、30 日後にはいずれの群においても GFP 陽性細胞は存在しなかった。左室心筋内 SDF-1 α は IGF-1+MCs 群において PBS 群に比較して有意に高値であった。20 μ m 以下の血管数は IGF-1+MCs 群において PBS 群に比較して有意に増加していた。移植後 30 日の心筋繊維化は、IGF-1+MCs 群において PBS 群に比較して有意に抑制されていた。またホスト心筋の心筋梗塞辺縁部での TUNEL 陽性細胞は IGF-1+MCs 群において PBS 群に比較して有意に減少していた。移植後 1 ヶ月の心機能評価では IGF-1+MCs 群は PBS 群に比較して左室拡張末期径が有意に小さく、%FS が有意に高値であった。12 ヶ月の生存率は IGF-1+MCs 群が PBS 群に比較して有意に高値であった。IGF-1+MCs 群におけるこれらの効果は移植時に LY を混注することによって阻害された。

【結論】

IGF-1 は PI3K/Akt シグナル伝達系を介して心筋梗塞周辺部に局所注入した MCs の生着率を改善させた。この IGF-1 による生着率改善は心筋梗塞周辺部の血管新生を促進し、ホストの心筋細胞死を抑制した。これに伴い心機能は改善し、生存率は向上した。以上の結果から、骨髄由来 MCs 移植に際し IGF-1 を同時投与することは、移植した細胞の生着率を改善し、心機能や生存率を向上させるうえで有効であることが示唆された。

なお、本要旨に該当する内容は、*Int J Cardiol.* 138: 9-18, 2010 に掲載されている。

審査の結果の要旨

Insulin-like growth factor (IGF-1) は、細胞の接着促進と細胞死の抑制に重要な役割を果たしているといわれているが、本研究は、ラットの培養骨髄間葉系細胞と IGF-1 を同時に心筋梗塞周辺部に局所注入することによって、ホストの血管新生を促進し、ホストの心筋の細胞死を抑制し、その結果、心機能や生存率を向上させることを明らかにした研究で、学位に充分値するものとして評価された。

【1545】

氏 名 (本 籍) よし むら けん 健 (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 673 号
学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目

Increased nitric oxide production by neutrophils in early stage of Kawasaki disease

論文審査委員 主査 (教授) 中邨智之
(教授) 岩坂壽二 (教授) 伊藤誠二

論文内容の要旨

【はじめに】

川崎病 (以下、本症) は、乳幼児に好発する急性熱性疾患で、中小動脈の全身性血管炎である。本症では免疫グロブリン大量療法 (IVIG) が著効するが、3-5% に冠動脈病変 (CAL) を残すため、それらの難治例に対する治療法の確立が急務である。

病因はいまだに解明されていないが、活性化された単球やマクロファージから産生される TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 などのサイトカインやケモカインが病態に関与していると考えられている。

最近、好中球が本症の急性期の病態に深く関わっている、との報告が散見される。とくに好中球で産生される一酸化窒素 (NO) が本症血管炎の主因であるとする報告が多い。しかし多くは NO 合成酵素の mRNA 発現量や血中・尿中の NO 代謝産物 (NOx) を測定したもので、NO 産生量を直接測定した報告はない。

そこで、本研究では、本症病初期の病態進展における好中球および NO の関与を明らかにする目的で、好中球の NO 産生量および活性酸素種 (ROS) 産生量を測定した。

【対象】

'05 年から '08 年に関西医大枚方病院およびその関連施設に入院した小児のうち、以下の疾患に該当する患者を対象とした。

- ・A 群：急性期 (発症 7 日以内) の本症患者 (14 例)
- ・B 群：各種細菌感染症 (肺炎、扁桃炎、中耳炎、尿路感染症、胃腸炎、菌血症) 患者 (14 例)
- ・C 群 (正常コントロール)：小手術 (臍径ヘルニアなど) で入院した患者 (12 例)

【方法】

1) 検体採取

上記の対象患者から以下の時期に全血 1,000 μ l を採取した。

- ・A 群：IVIG 前 (平均 4.5 病日) および IVIG 後 (平均 7.5 病日)
- ・B 群：抗生物質投与前 (平均 4.1 病日)
- ・C 群：術前一般検査の採血時

2) NO 測定

細胞内 NO を標識する蛍光色素 diaminofluorescein-FM diacetate を、好中球を含む細胞浮遊液に添加、インキュベーションや溶血処理の後、フローサイトメーターで好中球の平均蛍光強度 (MFI) を測定し NO 産生量とした。

3) ROS 測定

細胞内の ROS (主に hydroxyl radical や peroxynitrite) を標識する蛍光色素 hydroxyphenyl fluorescence と好中球刺激物質である phorbol myristate acetate を、好中球を含む細胞浮遊液に添加、インキュベーションや溶血処理の後、フローサイトメーターで MFI を測定し ROS 産生量とした。

4) 検討項目

以下の項目について統計学的に比較検討した。

- ① A 群, B 群, C 群における NO 産生量
- ② A 群, B 群, C 群における ROS 産生量
- ③ A 群における NO 産生量と発症後日数との相関
- ④ A 群における IVIG 前・後での NO および ROS 産生量の変化

【結果】

- ① NO 産生量：A 群 (69.8 ± 54.9 ：平均値 $\pm$ 標準偏差, 単位：MFI, 以下同様) において、B 群 (33.3 ± 13.8) や C 群 (25.7 ± 14.8) より有意に高値 ($p < 0.05$) であった。また CAL 合併例が高値を示した。
- ② ROS 産生量：A 群 (41.2 ± 17.2) と B 群 (51.7 ± 6.7) において C 群 (25.1 ± 16.0) より有意に高値 ($p < 0.05$) であったが A 群と B 群の間には有意差を認めなかった。
- ③ NO 産生量と発症後日数との間には有意な負の相関

が見られた ($r=0.55$, $p<0.05$).

- ④ IVIG 投与後, NO 産生量は有意に低下した ($p<0.05$) が, IVIG 不応例では変化がみられなかった. 一方, ROS 産生量については有意な変化はみられなかった.

【考察】

最近の報告では, 本症の病初期には, 好中球が血管壁に多数, 浸潤しており, また NO 合成酵素の mRNA も好中球において早期から発現するとされ, 好中球の血管炎への関与が少なくないと考えられている.

本研究では, 病初期の本症患者好中球の NO 産生量を測定し, NO 産生量が亢進していることを確認するとともに, その産生亢進状態は IVIG によって正常化することを初めて明らかにした. このことは病初期の本症において, 好中球が病態に少なからず関与していることを示唆しており, 本症の治療戦略に新たな可能性を呈示するものと思われた.

なお, 本要旨に該当する内容は, *Eur J Pediatr*. 168: 1037-1041, 2009 に掲載されている.

審査の結果の要旨

川崎病は, 乳幼児に好発する原因不明の全身性血管炎であるが, その血管傷害への好中球の関与が示唆されている. 吉村氏は一酸化窒素 (NO) 産生に着目し「川崎病急性期の末梢血好中球の NO 産生能は, 細菌感染症のそれよりも亢進していること」, 「特に重症例でその傾向が強いこと」を明らかにし, 病勢の予知因子となりうる可能性を報告した. 本研究は, 川崎病 14 例を他の細菌感染症例と比較してその特徴を明らかにした臨床研究であり, 学位に値する.

【1546】

氏 名 (本 籍) み や け ま り (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 674 号
学位授与の日付 平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目

Comparative Research between Australia and Japan
A Comparison of the Quality of Healthcare in Nursing
Facilities Using Actigraphy

論文審査委員 主査 (教授) 木村 稔
(教授) 岩坂壽二 (教授) 中村加枝

論文内容の要旨

【はじめに】

日本の高齢化は世界に例をみない速度で進行しており, 質が高くコストの軽減をはかる高齢者介護が必要とされている. 一方, オーストラリアでは早くから高齢者対策に取り組んでおり, 北欧諸国の “高” 負担, “高” 福祉に比べ “中” 負担で “中” 福祉を提供している. 本研究では介護の社会的環境やサービスの異なりが高齢者の生活リズムにどのような影響があるかを, オーストラリアの介護に注目し, 日本との比較から高齢者介護について検討を行った.

【研究方法】

対象者は日本の高齢者介護施設に入居する施設高齢者 10 名と自立している日本の独居高齢者 11 名, および, オーストラリアの高齢者介護施設に入居する施設高齢者 9 名の 3 つの異なる環境の高齢者のグループを対象にした.

両国の最も異なる介護サービスは, オーストラリアでは介護予防や認知リハビリテーションを重視し, 高齢者介護施設では入居者のニーズに合わせた活動 (Diversional Therapy) を提供して本人の自立を促す介護が行われていることである.

3 つのグループの高齢者の生活リズムを客観的に評価する為に, 腕時計型の小型高感度加速度センサー付き行動計 (MicroMin-Monitoringger™ 以下, アクチグラフ: AMI 社 製 Ambulatory Monitoring Inc., Ardsley, NY, USA) を対象者の利き手でない側の手首に 3 日間着用した. アクチグラフから得られたデータはソフトウェア AW2 (Action-W, Version2, AMI 社製) を用いて分析した.

【結果】

3 グループの中で最も活動量が多かった時間帯は,

オーストラリアの施設高齢者の 13-14 時の時間帯 224.6 ± 75.5 (counts/min) で、日本の施設高齢者の 136.8 ± 63.8 (counts/min) と比較して有意に多いことが認められた ($p < 0.05$)。一日における睡眠時間の占める割合は有意な差は認められなかったが、Wake after Onset Sleep (睡眠時の覚醒時間) において、日本の施設高齢者が 3 グループの中で最も長かった。Longest wake Episodes (睡眠時における最も長い覚醒時間) においても、オーストラリアの施設高齢者 ($p < 0.05$) および日本の独居高齢者 ($p < 0.01$) と比較して日本の施設高齢者は有意に長かった。また、日本の独居高齢者の Sleep efficiency (睡眠効率) は、日本の施設高齢者 ($p < 0.01$) およびオーストラリアの施設高齢者 ($p < 0.05$) と比較して有意に高値を示した。これらの結果からオーストラリアの施設高齢者は日本の施設高齢者に比較して日中の活動量が多く睡眠効率が高いことが示された。

【考察】

アクチグラフから得られたデータから各グループの生活のリズムについて比較検討した結果、両国の生活様式の異なりが活動のリズムから明らかになった。日中の活動において、オーストラリアの施設高齢者は Diversional Therapy が行われる 13-14 時の時間帯が 3

グループの中で最も活動の多い時間帯であった。睡眠効率も日本の施設高齢者より高値を示したことから、オーストラリアで実践されている高齢者のコンプライアンスに合わせた支援である Diversional Therapy や自立支援を促す介護サービスが身体活動を高め、生活のリズムを適切に保つことが明らかになった。

高齢期の身体的、心理的な自立支援の提供は高齢者の生活リズムを整えることで介護予防に有用であり、如いては介護の負担軽減に貢献できることが示唆された。

なお、本要旨に該当する内容は、*Geriatr Gerontol Int.* 10: 167-176, 2010 に掲載されている。

審査の結果の要旨

本研究は、客観的指標として行動計を用いてオーストラリアと日本の高齢者介護の社会的環境やサービスの異なりが高齢者の生活リズムに影響をもたらすことを明らかにした。高齢者のコンプライアンスにあわせた身体的、心理的な自立支援の提供が生活リズムを整え、介護の負担軽減に貢献できることを結論づけた意義のある研究である。よって、本研究は学位を授与するに値するものと認める。