

2006.12

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第十五号

評価広報課 発行

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

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 32 号	岡林 喬久	Core set approach to reduce uncertainty of gene trees (種内遺伝子の進化系統樹を構築する新しい手法の開発(Core set approach))	1
甲医博第 33 号	西方 誠	Carbonic anhydrase-related protein VIII promotes colon cancer cell growth (炭酸脱水酵素関連蛋白VIIIは大腸癌細胞の増殖を促進する)	4
甲医博第 34 号	鎌倉 真紀	Regulation of IL-27p28 gene by lipopolysaccharide in dendritic DC2.4 cells (マウス骨髄由来樹状細胞(DC2.4)における lipopolysaccharide 刺激による IL-27p28 遺伝子発現調節機構の解明)	6
乙医博第 26 号	松崎 浩	Use of vascularized pedicle iliac bone graft combined with transtrochanteric rotational osteotomy in the treatment of avascular necrosis of the femoral head (広範囲大腿骨頭壊死に対する大腿骨頭回転骨切り併用血管柄付き腸骨移植術の開発)	9
乙医博第 27 号	谷田 豊宏	Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from Candida cells (抗菌ペプチドは、カンジダ菌からATPを排出することにより抗真菌剤の抗カンジダ活性を増強する)	12
乙医博第 28 号	松下 雅英	Methylation of the MLH1 gene in hematological malignancies (造血器悪性腫瘍におけるMLH1遺伝子の異常メチル化)	16
乙医博第 29 号	Calvopiña Hinojosa Segundo Manuel	<i>Leishmania</i> isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation (エクアドルにおけるリーシュマニア原虫のアイソザイム多型：地理的分布と臨床症状との関係解析)	20

氏名(本籍)	岡林 喬久 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第32号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年9月29日
学位論文題目	Core set approach to reduce uncertainty of gene trees (種内遺伝子の進化系統樹を構築する新しい手法の開発(Core set approach))
発表誌名	BioMed Central Evolutionary Biology 6(41) 2006年5月

審査委員	主査	教授	吾妻	健
	副査	教授	岩堀	淳一郎
	副査	教授	栗原	幸男

論文の内容の要旨

遺伝子配列を用いた種内の系統関係は、その種の形態的特徴、構造、進化の歴史などを評価するために重要な役割を果たす。なぜならば、種内の配列は種間の配列よりも近い関係にあるので、推定される系統樹のすべての分岐点の遺伝子配列を決定することが原理的に可能であり、その結果進化過程の詳細な情報が得られ、機能的制約や収斂進化などについての洞察を提供する。しかしながら、遺伝子間に強い進化的相関関係(correlated evolution)が存在するとき、系統樹の構築は著しく困難になり、従来のオーソドックスな方法である最大節約法(MP)では、同じ推定基準値(総枝長)に対して多数の解(トポロジー)が提案される。

最近、Kitazoe et al. は“多次元空間法”と呼ばれる系統樹構築の新しい理論を発展させた。そこでは、木構造を多次元ユークリッド空間で表現し、進化距離の加算性(additivity)を枝ベクトル間の直交関係に変換し、直交関係からのずれを測るための統一的な指標を提案した。

本論文では、上記理論を種内進化の系統樹構築に応用し、強い correlated evolution がある場合でも、単一解を推定する新しい方法(“Core-set approach”と呼ばれる)を提案する。Core-set approach をある HIV-1 患者の env 配列や、ハマダラ蚊のミトコンドリア(COI、COII)の198 DNA配列に応用することによって、従来の方法の問題点が本方法で如何に解決されるかを具体的例示した。最後に、computer を用いて進化過程を simulate し、得られた endpoints の遺伝子配列を用いて、本方法が正しい系統樹を作成することができることを確認した。

論文審査の結果の要旨

分子生物学の目的は特定の核酸(アミノ酸)配列から、現存する生物種の進化機構や分岐年代を推定することにある。分子に着目するのは、進化における分子レベルの解析は形態に比べて偏り(収斂進化)が少ないこと、又置換の大部分が生命種の機能に直接関係のない random な変化に基づいていると考えられている為であり、形態学や、古生物学よりも客観的な評価が可能なのである。しかし、分子レベルでは、本当に収斂進化は無視していいのかという疑問が残り、もし遺伝子間に強い収斂進化(convergent evolution)が存在すると、従来の分子進化推定法は random model を前提にしているため、間違った系統樹を推定してしまう。そこで、convergent evolution を検出する為に multidimensional vector-space (MVS) representation ("多次元空間法") を開発し生物種間(哺乳類)の解析に応用した(Kitazoe et al)。その結果、convergent evolution が生物種間に意外に多くある事が分かった。

本論文の目的とする遺伝子配列を用いた種内の系統関係は、その種の形態的特徴、構造、進化の歴史などを評価するために重要な役割を果たす。なぜならば、種内の配列は種間の配列よりも近い関係にあるので、推定される系統樹のすべての分岐点の遺伝子配列を決定することが原理的に可能であり、その結果進化過程の詳細な情報が得られ、機能的制約や convergent evolution などについての洞察を提供する。しかしながら、遺伝子間に強い convergent evolution が存在するとき、種内であっても系統樹の構築は著しく困難になり、従来のオーソドックスな方法である最大節約法(MP)では、同じ推定基準値(総枝長)に対して多数の解(トポロジー)が提案される。同様に近隣接合法では、推定系統樹の枝の長さが、実数(例えば、1塩基(アミノ酸)置換よりも短い枝)になるような解を提案する。

Kitazoe et al. の開発した MVS 法では、木構造を多次元ユークリッド空間で表現し、進化距離の加算性(additivity)を枝ベクトル間の直交関係に変換し、直交関係からのずれを測るための統一的な指標を提案した。種内の遺伝子配列は種間の遺伝子配列よりも近い関係にあるので、種内の進化距離は配列の違い数を用いた。

本論文では、上記理論を種内進化の系統樹構築に応用し、強い convergent evolution がある場合でも、単一解を推定する新しい方法("Core-set approach"と呼ばれる)を提案する。我々は、上記指標を用いて直交関係から大きくずれる配列を除いていき、MP 法が single solution を出力する最大数の配列グループ(core set)を選択し、core set の全ての node 配列を決定する。この core set tree は robust で、除かれた配列を挿入する際には保存することを仮定する。ここで、挿入される配列の tree 上の位置は枝の長さを最小にする所にする。Core-set approach をある HIV-1 患者の env 配列や、ハマダラ蚊のミトコンドリア(COI, COII)の 198 DNA 配列に応用することによって、従来の方法の問題点が本方法で如何に解決されるかを具体的例示した。最後に、

computer を用いて進化過程を simulate し、得られた endpoints の遺伝子配列を用いて、本方法が正しい系統樹を作成することができることを確認した。

Core set approach を用いることで、種内における進化過程を明らかにし、系統樹上の全ての node 配列を推定することができた。この結果、1 サイト毎の核酸(アミノ酸)置換を見ることができるようになり、伝染病における薬剤抵抗の発達の評価、免疫から逃れるための、ポジティブセレクションの検出、そして、病気の将来的なトレンドの予測などに応用できるものと期待され、学位論文に値すると評価した。

氏名(本籍)	西方 誠 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第33号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年9月29日
学位論文題目	Carbonic anhydrase-related protein VIII promotes colon cancer cell growth (炭酸脱水酵素関連蛋白VIIIは大腸癌細胞の増殖を促進する)

審査委員	主査	教授	宇高 恵子
	副査	教授	花崎 和弘
	副査	教授	麻生 悌二郎

論文の内容の要旨

【目的】炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase; CA)はCO₂の水和反応を可逆的に触媒する亜鉛要求性の酵素で、酸塩基平衡や呼吸などの種々の生理プロセスに関与している。現在までCA遺伝子ファミリーとして16種類のCAが報告されているが、この中には亜鉛結合ヒスチジン残基を欠失するため酵素活性をもたない3種類のアイソフォームがあり、炭酸脱水酵素関連蛋白(CA-related protein; CA-RP VIII、X、XI)と呼ばれる。CA-RPの機能は不明であるが、我々はCA-RP VIIIに対するモノクローナル抗体を作製し大腸癌と肺癌の浸潤先端部でCA-RP VIIIが強く発現していること、成人正常肺組織に比べ胎児肺組織においてCA-RP VIIIが強発現していることを報告した。これらの結果はCA-RP VIIIが癌胎児性抗原であることを示唆する。本研究では、大腸癌細胞におけるCA-RP VIIIの役割を明らかにするため、CA-RP VIIIが低発現の大腸癌細胞株LoVoに遺伝子を導入しCA-RP VIII蛋白を強制発現させた細胞株と、CA-RP VIIIが高発現の大腸癌細胞株HCT116にsiRNAを用いてCA-RP VIII蛋白発現を抑制した細胞株を作製し、それぞれの細胞の増殖能および浸潤能を*in vitro*と*in vivo*にて検討した。

【方法】CA-RP VIII遺伝子を発現ベクターpCI-neoに挿入したのちLoVoに導入した細胞株LoVo-CA8と、ベクターのみを導入した細胞株LoVo-pCIneoを作製し、リアルタイムPCRと免疫染色によりCA-RP VIIIのmRNAと蛋白の発現量を検討した。これらの細胞の細胞増殖能と細胞浸潤能をそれぞれMITアッセイとマトリゲルチャンバーを用いて検討した。さらに、これらの細胞のコロニー形成能を細胞外基質であるIV型コラーゲン、ラミニン、ファイブロネクチンをコートしたプレートを用いて検討した。また、BALB/cヌードマウスの背部に細胞を移植し腫瘍増殖を検討した。次に、HCT116とLoVoにpSilencerベクターを用いてCA-RP VIII発現を抑制した細胞株を作製し、それらの細胞の増殖能およびコロニー形成能を検討した。

【結果】LoVo-CA8はLoVoおよびLoVo-pCIneoに比しCA-RP VIII mRNAおよびCA-RP VIII蛋白の強い発現を認めた。LoVo-CA8のCA-RP VIII mRNA発現量はLoVoの52.5倍であり、他の大腸癌細胞株と比べても高値であった。*In vitro*実験ではLoVo-CA8はLoVoおよびLoVo-pCIneoに比し有意に増殖能および浸潤能の増強を認めた。コロニー形成実験ではLoVo-CA8はLoVoに比べ有意にコロニー形成の増強を認めた。このコロニー形成の増強は3種類の細胞外基質をコートしたプレートでも同様に確認された。Xenograft実験ではLoVo-CA8はLoVoに比し腫瘍発育速度

の有意な増強を認めた。CA-RP VIII発現を抑制した HCT116 はコントロールの細胞に比べ増殖能およびコロニー形成能の有意な低下を認めた。CA-RP VIIIの低発現株である LoVo ではCA-RP VIII発現を抑制しても増殖能およびコロニー形成能に有意差は認められなかった。

【結論】以上の結果より、CA-RP VIIIには大腸癌細胞の増殖を促進する機能があることが示された。

論文審査の結果の要旨

西方氏は、炭酸脱水酵素関連蛋白(CA-RP)のアイソタイプのうち、VIII について、大腸癌細胞の増殖に対する影響を調べた。CA-RP は、CA と祖先を共にする分子であることが推定されるが、酵素活性に必要な3個の His のうち、1個が置換されており、酵素活性がない。しかし、大腸癌、肺癌の浸潤先端部、あるいは胎児肺組織で高発現が見られることから、癌胎児抗原である可能性が考えられる。そのため、本研究では、*in vitro* の実験系で、大腸癌細胞株の増殖に対するCA-RP VIII 発現の影響を調べた。

まず、CA-RP VIIIを低発現する LoVo 細胞株にCA-RP VIIIを強制発現させると(RNA 量にして53倍)、細胞増殖が促進されることがわかった。これは、細胞外基質依存性、非依存性いずれの増殖においても観察された。逆に、CA-RP VIIIを高発現する HCT116 細胞株を使って siRNA によりCA-RP VIIIの発現量を低下させると、増殖能の低下が起こった。さらに、Matrigelを用いて細胞浸潤試験を行ったところ、CA-RP VIII 高発現株は、有意に高い血清依存性の遊走能を示した。

このため、CA-RP VIIIの発現量が、*in vivo*における腫瘍の成長や浸潤、転移能にも影響するかどうか調べるため、ヌードマウスの皮下に腫瘍株を植えて成長をみた。すると、CA-RP VIII 高発現株では有意に腫瘍の成長が亢進していた。このことから、CA-RP VIIIは*in vivo*でも、その発現量に応じて腫瘍の成長を促す活性を持つ癌胎児抗原のひとつである可能性が示唆された。

今後、どのような分子機構で増殖が促進されるのか、興味深い研究へと発展しうる研究成果である。特に、炭酸脱水酵素に近縁の分子が、いかにして腫瘍に関連した機能をもつに至ったか、分子進化の観点からも注目に値する。

審査員や出席者からは、活発なディスカッションがあった。まず実験系や結果についての議論があった。続いて、CA-RP VIIIの残存酵素活性の可能性や、増殖を促す分子機構について、また、正常な中枢神経系におけるCA-RP VIIIの発現部位についても質問があった。さらに、臨床における意義や今後の発展性について、議論があった。これらに対して西方氏は、実験時の状況やいきさつを説明して適切に議論をした。また、関連論文を引いて、考えられる分子機構について、その可能性を紹介をした。

氏名(本籍)	鎌倉 真紀 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第34号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年10月31日
学位論文題目	Regulation of IL-27p28 gene by lipopolysaccharide in dendritic DC2.4 cells (マウス骨髄由来樹状細胞(DC2.4)における lipopolysaccharide 刺激による IL-27p28 遺伝子発現調節機構の解明)
発表誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications 2006(in press)

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	吾妻	健

論文の内容の要旨

ヘルパーT細胞は、そのサイトカイン産生パターンからTh1とTh2の2つのサブセットに分類され、それぞれ細胞性免疫、液性免疫を制御していると言われている。自己免疫性疾患、アレルギー、様々な感染性疾患はこのバランスの破綻に起因することが明らかになっている。この破綻の原因の一つとして遺伝的要因が考えられているが、未だ詳しく解明されていない。これまでに遺伝的背景の異なるLewisおよび Brown-Norway (BN) ラットを用いて免疫応答に対する違いについて研究を行ってきたところ、樹状様細胞から分泌されるIL-27がTh1型Lewisラットで増加し、Th2型BNラットでは増加しないことを明らかにした。IL-27はナイーブCD4⁺T細胞からTh1細胞への分化のごく初期に関わっているIL-12ファミリーサイトカインで、EBI3(Epstein-Barr virus-induced gene 3)とp28から成る。現在、IL-27p28の遺伝子発現制御機構については未だ報告されていない。そこで、IL-27p28発現制御機構を解明するため、LPS刺激によるIL-27p28遺伝子調節機構をマウス骨髄由来樹状細胞のDC2.4細胞を用いて解析を行った。

DC2.4 細胞に LPS, *E. coli*, 結核死菌で刺激し、IL-27p28 の mRNA の発現量を調べたところ、LPS, *E. coli* でその発現量の増加が見られたが、結核死菌では発現量の増加は認められなかった。次に、アデノウイルスベクターにラット IL-27p28 プロモーターで制御されるレポーター遺伝子を構築しレポーターアッセイを行った。その結果、-648~-364 の領域で高い活性が見られ、LPS 刺激によりその活性はさらに増加した。そこで、-648~-364 領域を転写因子結合部位検索ソフト (TFSARCH) を用いて検索し、その転写因子結合部位配列をプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。その結果、deltaE や NF κ B では LPS 刺激による結合の変化は見られなかったが、GATA 配列をプローブにしたものでは LPS 刺激により結合に顕著な差が認められた。さらに、変異型 GATA および野生型 GATA で競合させたゲルシフトアッセイや変異型 GATA のレポーターアッセイの結果からも特異的な結合であることが確認された。しかし、既知の GATA binding protein ではなかったため、この GATA 配列に結合するタンパク質を探した。GATA binding 配列に結合するタンパク質を二次元電気泳動で分離し、トリプシン消化後、質量分析 (TOF-MS) で分析したところ、non-POU domain-containing octamer binding protein (NonO) と同定された。

以上の結果から、DC2.4 細胞における LPS 刺激による IL-27p28 の発現量の増加は IL-27p28 プロモーター領域 GATA binding 配列に結合している NonO が LPS 刺激により外れることが原因であると判断された。したがって、非感染時には IL-27p28 遺伝子は NonO により抑制された状態にあり、感染によるシグナルで NonO が外れ IL-27p28 が発現し Th1 型へ分化するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

鎌倉真紀さんの学位審査は、平成18年10月10日15:00より、1時間余りにわたり行った。まず、公開審査会において研究内容について発表をもらった。

学位申請者らのグループは、遺伝背景の異なる Lewis, BN のラットの2系統で、それぞれ Th1, Th2 優位な免疫応答が起こるしくみについて研究を進めてきた。これまでに、研究グループの齊藤らが、Lewis ラットでは、結核死菌に対して Th1 優位な免疫反応が起こるが、その原因のひとつとして、IL-27 の樹状細胞における発現が、BN に比べ有意に高いことを明らかにしていた。

そこで今回、申請者らは、この IL-27 の遺伝子発現制御について、樹状細胞株が入手でき、研究が容易なマウスの系で研究を行った。組み換えアデノウイルスベクターを使った Luciferase アッセイにより、IL-27p28 遺伝子の promoter 解析をしたところ、-648~-364 の領域に、転写活性部位が同定できた。この部位は LPS 依存性に転写活性の高まる部位でもあった。そこで、この部位

に結合する転写因子の解析を進めた。不死化樹状細胞株である DC2.4 細胞の核抽出液を使って EMSA (electrophoretic mobility shift assay) 解析をしたところ、GATA 配列に特異的に結合する蛋白質(群)の結合が確認された。さらに、この GATA 結合蛋白質は、LPS 投与後の DC2.4 細胞では結合が減少することがわかった。これまでに見つかっている GATA-3 蛋白質の関与は否定された。そこで、これら GATA 結合蛋白質(群)の同定を、2次元電気泳動法にて試みた。観察された10個余りの分子種の中で、LPS 依存性に結合量が低下する3つの蛋白質に注目し、質量分析によりアミノ酸配列を調べたところ、2つは NonO、残りのひとつは PTB (polypyrimidine tract-binding protein) であることがわかった。さらに、抗 NonO 抗体を用いて、NonO が EMSA で観察された GATA 結合分子群のひとつであることの検証を行った。

審査員からは、多数の質問や議論があった。関連分子群のノックアウトマウスの表現型についての質問、NonO の結合データの解釈を裏づけするための詰めの実験の必要性、NonO の LPS 刺激後の細胞内局在の変化について、Luciferase アッセイによる promoter 解析において、詰め残りの可能性について、NonO のリン酸化部位のアミノ酸配列情報、樹状細胞株の不死化操作、Lewis、BN ラットの F1 動物の表現型やこれらのラットの IL-27 遺伝子 promoter 領域の構造について、の質問などがあげられる。これらの質問や議論に対して、申請者は、現在、明らかになっている情報を紹介して討議し、考察を加えた。また、実験デザインで詰めきれなかった点について、適切な説明をした。残された問題への認識も明らかであった。IL-12 遺伝子ファミリーの理解や、それらを認識するレセプターの情報伝達のしくみについては、明快な図を用いて説明し、研究に直接関連する基礎知識については十分習得されていることがうかがわれた。

申請者は、現在は別の研究グループの1員として基礎研究に従事しており、科学に対する興味は明らかで、問題解決に向けたアプローチについても、方法や技術の習得、情報の収集など、持続的な努力が見られた。このため、審査員一同、申請者の研究は、高知大学大学院医学系研究科博士課程の学位授与にふさわしい内容を持ったものであると、判断いたしました。

氏名(本籍)	松崎 浩(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第26号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成18年9月5日
学位論文題目	Use of vascularized pedicle iliac bone graft combined with transtrochanteric rotational osteotomy in the treatment of avascular necrosis of the femoral head (広範囲大腿骨頭壊死に対する大腿骨頭回転骨切り併用血管柄付き腸骨移植術の開発)
発表誌名	Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 125(2)95-101 2005年3月

審査委員	主査	教授	笹栗	志朗
	副査	教授	小川	恭弘
	副査	教授	山本	哲也

論文の内容の要旨

(目的) 大腿骨頭壊死症は青壮年期に好発し、その多くは股関節の荒廃にいたる難治性疾患である。本症に対する手術的治療は、発症年齢が若いため、人工骨頭、人工関節置換術では、耐用年数の点で長期成績に問題がある。従って、60歳以下の症例においては、可能な限り関節温存手術を行うべきであり、一般に大腿骨頭前方回転骨切り術(杉岡法)が選択されることが多い。しかし、壊死領域が骨頭荷重部の2/3以上を占める広範壊死例に対しては、杉岡法単独では良好な結果が期待できない。そこで我々は、このような広範壊死例に対し、大腿骨頭前方回転骨切り術と血管柄付き腸骨移植を組み合わせ骨頭温存をはかる術式を開発した。本論文では、我々の再建方法を紹介しその成績について述べる。

(方法) 手術は、まず、大腿骨の骨切りを行って、約90度大腿骨頭を前方に回転し、骨切り部をチタン製スクリューで固定する。次に、深腸骨回旋動脈を血管柄とする腸骨(長さ約5cm、深さ約2cmの全層腸骨)を採取して、大腿骨頸部から骨頭内にかけて作製した骨溝に挿入する。さらに2000年6月以降は、我々がNAKASHIMA MEDICAL社と共同で開発したHip Osteotomy Plate Systemによる内固定を追加した。

対象症例は1992年6月から2002年12月までの間に、壊死領域が骨頭荷重部の2/3以上を占める広範壊死例に対して本法を施行し、術後1年以上経過した症例である。男性8例9関節、女性6例8関節であり、手術時年齢は21-51(平均37.9)歳であった。大腿骨頭壊死の原因別ではアルコール性が7例9関節、外傷性が1例1関節、ステロイド性が3例4関節、狭義の特発性が3例3関節であった。術前の病期は、骨頭荷重部に

陥没のない Stage2 が 3 関節、陥没のある 3-A が 13 関節、3-B が 1 関節であり、病型は全例 Type C-2 の広範囲壊死であった。これら 17 関節について、日本整形外科学会変形性股関節症治療成績症判定基準の点数 (以下 JOA score) の推移と病期の進行の有無について検討した。

(結果) JOA score は、術前平均 67.8 点から、術後 18~133 ヶ月 (平均 50.7 ヶ月) の時点で、平均 78.1 点へと改善した。17 関節中 12 関節 (71%) では Stage の進行はなかった。明らかな進行がみられた 5 関節のうち、3 関節では移植骨の挿入が不十分であり、1 関節では術中に移植骨の血流が不十分であったことや、内反固定角が不足していた。

(考察) 杉岡の報告によると大腿骨頭前方回転骨切り術では、骨頭回転後に、骨頭健常部が臼蓋荷重部に占める割合が 20% 以下の広範囲壊死例においては、術後 3~16 年の経過で、成功率は 29% である。一方、我々の方法では、骨頭回転後に骨頭健常部が臼蓋荷重部に占める割合が平均 20% であったが、術後平均 51 ヶ月の経過で、71% の症例で Stage の進行が防止され、回転骨切り術単独と比較して良好な成績が得られた。壊死領域が広範囲であっても、骨頭の後下方には必ず健常部が残存しており、我々はその健常部を 90 度の骨頭前方回転によりできるだけ荷重部に近い位置に移動させたうえで、荷重部として残った壊死領域に対して、血管柄付き腸骨移植を追加した。これにより支持性が獲得され、局所血流の改善により壊死部が修復され骨頭陥没を防止できたと推測される。我々の方法の利点は、大腿骨頭回転骨切り術単独では適応とならない Stage3-B、type C-2 にも適応できること、血管吻合を必要としないため手技が比較的容易で確実性が高いことなどが挙げられる。欠点は、全荷重歩行までに 6 ヶ月要することであったが、Hip Osteotomy Plate System を使用することにより、免荷期間を 1/2 に短縮することが可能となった。

我々の開発した方法は、従来大腿骨頭骨切り術では良好な結果が期待できない広範囲大腿骨頭壊死症の治療における福音となり、推奨できるものと思われた。

論文審査の結果の要旨

大腿骨頭壊死症は大腿骨上端の大腿骨頭の骨組織が壊死し、関節が変形・破壊する病気であり、このうち原因がはっきりしないものを特発性大腿骨頭壊死症といい、その多くが股関節の荒廃をもたらすために厚生省の特定疾患に指定されている。本症は青壮年期に好発するために、耐用年数に制限がある人工骨頭、人工関節置換術では問題があり、60 才以下の症例では骨頭温存手術が選択される。

申請者は、骨頭荷重部の 2/3 以上を占める広範囲壊死例に対して従来関節温存手術として行われてきた大腿骨頭前方回転骨切り術は術後の良好な症状改善が得られないという欠点を有するため、広範囲壊死例の治療効果改善を目的とした手術法: 大腿骨頭回転骨切り併用血管柄付き腸骨移植術を開発した。

本法はまず大腿骨の骨切りを行い、90度大腿骨頭を前方に回転し骨切り部をチタン製スクリュウで固定し、次に深腸骨回旋動脈を血管柄とする腸骨を採取し、大腿骨頸部から骨頭内へ挿入し、さらに申請者らが開発したHip Osteotomy Plate Systemで内固定し、骨頭を補強するものである。

本論文は本法の手術手技とその長期予後を論じたものである。

本法を施行した壊死領域が骨頭荷重部の2/3以上を占める広範囲壊死症例は、1992年より2002年までで、男性8例9関節、女性6例8関節で、手術時年齢は平均38才であり、原因はアルコール性7例9関節、外傷性1例1関節、ステロイド性3例4関節、狭義の特発性が3例3関節であった。術前病期は骨頭荷重部に陥没のないstage 2が3関節、陥没のある3-Aが13関節、3-Bが1関節であり、病型は全例type C-2の広範囲壊死であった。これらの17関節について日本整形外科学会変形性股関節症治療成績判定基準(JOA)のスコアの推移と病期の進行の有無について検討している。

結果では、JOA scoreは術前67.8点から術後平均50ヶ月の時点で78.1点に改善し、17関節中12関節71%ではstageの進行は見られず、従来の大腿骨頭前方回転骨切り術での成功率29%を大いに上回った優れた成績を収めた。5関節ではstageの進行を認めたものの初期の技術的問題に起因するものと考察している。

本研究では、骨頭内に血管柄付き腸骨移植を行うことで、大腿骨頭の血行改善をはかり、さらに力学的な補強を行うことで、従来の大腿骨頭前方回転骨切り術の手術成績を飛躍的に向上させ得る事を示した。問題点としては人工骨頭置換術と比較して手術時間や、術後リハビリに時間を要することがあり、また、microsurgeryと股関節のそれぞれの専門チームの協力がなければ高い完成度の手術が遂行されないが、申請者らはいずれの問題点も克服し、良好な成績を本論文に示した。このことは難病指定されている大腿骨頭壊死症に対して新たな外科治療法を開発したものとして、高知大学博士(医学)に相応しい価値あるものと認められた。

氏名(本籍)	谷田 豊宏 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第27号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成18年9月26日
学位論文題目	Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from <i>Candida</i> cells (抗菌ペプチドは、カンジダ菌からATPを排出することにより抗真菌剤の抗カンジダ活性を増強する)
発表誌名	Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57, 94-103 2005年11月

審査委員	主査	教授	今井	章介
	副査	教授	田口	博國
	副査	教授	脇口	宏

論文の内容の要旨

[はじめに]

近年、真菌感染症は増加の一途を辿るとともに、薬剤耐性菌の出現や免疫抑制患者の増加によりその制御は困難となってきた。これまで著者らは、真菌感染症に対する新しい治療戦略を開発すべく、抗菌蛋白であるラクトフェリンに着目し、牛ラクトフェリン由来の抗菌ペプチド (Peptide2 ; Pep2) を作成し (Ueta E *et al.* J Pept Res 2001; 57: 240-9)、種々の検討を行ってきた。その中で、Pep2 は抗真菌剤であるアムホテリシン B との併用によって有意にカンジダ感染マウスの生存期間を延長すること (Tanida T *et al.* Infect Immun 2001; 69: 3883-90)、さらには、Pep2 は好中球機能を亢進させることを報告してきた (Okamoto T *et al.* Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 1111-9)。そこで本研究では、Pep2 をはじめとした抗菌ペプチドと抗真菌剤の併用によるカンジダ菌制御の機序について検討した。

[材料および方法]

カンジダ菌 (TIMM0134 株) を、抗菌ペプチド (Pep2, α -デフェンシン 1 ; HNP1, ヒスタチン 5 ; Hst5)、抗真菌剤 (アムホテリシン B ; AMB、イトラコナゾール ; ITC) あるいは抗菌ペプチドと抗真菌剤で処理し、カンジダ菌増殖に及ぼす影響をコロニーアッセイ法にて検討するとともに、カンジダ菌の細胞膜成分であるエルゴステロール、細胞壁成分であるグルカン、キチンおよびマンナンの合成に及ぼす影響をラジオイムノアッセイ法にて検討した。さらに、処理したカン

ジダ菌の細胞膜透過性とカンジダ菌からの ATP 排出に及ぼす影響をそれぞれ蛍光吸光度法およびルシフェラーゼアッセイ法にて検討した。これらとともに、カンジダ菌における薬剤耐性遺伝子 CDR1 および CDR2 の mRNA 発現ならびに抗真菌剤のカンジダ菌内濃度をそれぞれ RT-PCR 法およびラジオイムノアッセイ法にて検討した。

[結果]

- 1) Pep2 あるいは Hst5 と抗真菌剤 (AMB あるいは ITC) とを併用することによりカンジダ菌のコロニー形成は相乗的に抑制された。これに対し、HNP1 のカンジダ菌のコロニー形成に対する抑制作用は Pep2 および Hst5 に比べやや弱く、AMB との併用では相乗的であり、ITC との併用では相加的であった。
- 2) AMB および ITC は、エルゴステロール、キチン、マンナンおよびグルカンの合成を抑制するとともに、細胞膜の透過性を亢進させた。これに対し、Pep2、HNP1 および Hst5 はそれらに対する作用を有しておらず、さらには、AMB および ITC のそれらに対する作用にも影響を及ぼさなかった。
- 3) カンジダ菌を Pep2、HNP1 および Hst5 で処理すると、ATP の細胞外への排出が促進され、この排出は陰イオンチャンネル阻害剤である NPPB あるいは DIDS により抑制された。一方、AMB および ITC はカンジダ菌における細胞内 ATP レベルには影響を与えず、さらには、抗菌ペプチドによる ATP 排出にも影響を及ぼさなかった。
- 4) カンジダ菌を AMB あるいは ITC で処理すると CDR1 および CDR2 の mRNA 発現が亢進したが、Pep2、HNP1 および Hst5 はこれらの発現レベルには影響を与えなかった。抗真菌剤と抗菌ペプチドの両方でカンジダ菌を処理すると、抗真菌剤による CDR1 および CDR2 の mRNA 発現亢進が抑制された。
- 5) カンジダ菌を抗真菌剤および抗菌ペプチドの両方で処理すると、抗真菌剤のみで処理したものとは比べ、抗真菌剤の細胞内への取り込みが促進されるとともに、細胞外への排出が抑制され、抗真菌剤の細胞内レベルが高く維持された。Pep2 による抗真菌剤の細胞内レベルの亢進は、DIDS により抑制された。

[考察]

Pep2 をはじめとする抗菌ペプチドは、陰イオンチャンネルを介してカンジダ菌の細胞内 ATP を排出させるとともに、カンジダ菌の薬剤耐性に関わる ABC トランスポーターである CDR1 および CDR2 の抗真菌剤による発現誘導を抑制することが明らかとなった。その結果、抗真菌剤と抗菌ペプチドを併用すると抗真菌剤の細胞内濃度が高く維持され、抗真菌剤の抗カンジダ活性が増強されることが示された。これらのことより、Pep2 と抗真菌剤の併用は、薬剤感受性のみならず薬剤耐性のカンジダ菌の制御に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、免疫抑制患者の増加や薬剤耐性菌の出現により、臨床現場で真菌感染症制御に苦慮する局面が増えている。この現状への対応策として、申請者らのグループはこれまでに、真菌感染症に対する新治療戦略の開発を目指し、抗菌タンパクであるウシ・ラクトフェリン由来の抗菌ペプチド (Peptide2; Pep2) を作製し (Ueta E *et al.* J Pept Res 2001; 57: 240-9)、その効果発現に関する種々の検討を行ってきた。その過程で、Pep2 は抗真菌剤であるアムホテリシン B (AMB) との併用により、カンジダ感染マウスの生存期間を有意に延長すること (Tanida T *et al.* Infect Immun 2001; 69: 3883-90)、Pep2 が好中球機能を亢進させることを報告してきた (Okamoto T *et al.* Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 1111-9)。

本研究では、Pep2 をはじめとする抗菌ペプチドと抗真菌剤の併用によるカンジダ菌制御の分子機序について検討した。

材料および方法として、カンジダ菌は TIMM0134 株を、抗菌ペプチドは Pep2、 α -デフェンシン 1 (HNPI)、ヒスタチン 5 (Hst5) を、抗真菌剤は AMB、イトラコナゾール (ITC) を用いた。抗菌ペプチド、抗真菌剤 (トラフ値に近い濃度) のおのおのを単独あるいは併用で菌処理に供した。各種処理のカンジダ菌増殖に及ぼす影響はコロニーアッセイ法にて、カンジダ菌の細胞膜成分であるエルゴステロール、細胞壁成分であるグルカン、キチンおよびマンナンの合成に及ぼす影響はラジオイムノアッセイ法にて検討した。処理したカンジダ菌の細胞膜透過性、菌体内からの ATP 排出に及ぼす影響はそれぞれ蛍光吸光度法およびルシフェラーゼアッセイ法にて検討した。菌における薬剤耐性遺伝子 *Candida drug resistance genes* (*CDR1* および *CDR2*) の mRNA 発現の変化は RT-PCR 法にて、菌内抗真菌剤濃度はラジオイムノアッセイ法にて検討した。

結果の要点は以下のようにまとめられる。

- 1) Pep2 あるいは Hst5 と抗真菌剤 (AMB あるいは ITC) との併用によりカンジダ菌のコロニー形成は相乗的に抑制された。他方、HNPI の抑制作用は Pep2、Hst5 に比べてやや弱く、AMB との併用では相乗的であり、ITC との併用では相加的であった。
- 2) 抗真菌剤 AMB、ITC はエルゴステロール、キチン、マンナン、グルカンの合成を抑制するとともに、細胞膜の透過性を亢進させたが、Pep2、HNPI および Hst5 はこのような作用を有しておらず、また、AMB、ITC のこれらの作用に対しても影響を及ぼさなかった。
- 3) 菌を Pep2、HNPI ないしは Hst5 単独で処理すると、ATP の菌細胞外への排出が促

進され、この現象は陰イオンチャンネル阻害剤である 4,4'-diiodothiocyantestilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS)あるいは 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) により抑制された。一方、抗真菌剤単独処理では菌細胞内 ATP レベルは変化せず、抗菌ペプチドによる ATP 排出にも影響を及ぼさなかった。

- 4) 菌を抗真菌剤で単独処理後、薬剤耐性遺伝子 *CDR1*、*CDR2* の転写レベルでの発現亢進が観察されたが、三種の抗菌ペプチド単独処理後では両遺伝子の発現は変化しなかった。ただし、菌を抗真菌剤と抗菌ペプチドで共処理すると、抗真菌剤単独処理による *CDR1*、*CDR2* の発現上昇は抑制された。
- 5) カンジダ菌を抗真菌剤および抗菌ペプチドの両者で処理すると、抗真菌剤のみで処理した場合に比べ、抗真菌剤の細胞内への取り込み促進と、細胞外への排出抑制が認められ、抗真菌剤の細胞内レベルが高く維持された。また Pep2 による抗真菌剤の細胞内レベルの上昇は、DIDS により抑制された。

申請者は、抗菌ペプチドの単独作用、および抗真菌剤との共同作用について多角的に解析し、Pep2 をはじめとする抗菌ペプチドは陰イオンチャンネルを介してカンジダ菌の細胞内 ATP を排出させるとともに、カンジダ菌の薬剤耐性に関わる ATP-binding-cassette (ABC)トランスポーター遺伝子である *CDR1* および *CDR2* の抗真菌剤による発現亢進に抑制的に作用するといった新知見を見出した。この成績から、抗真菌剤と抗菌ペプチドの併用によって抗真菌剤の細胞内濃度が高く維持され、抗真菌剤の抗カンジダ活性が増強されると結論している。

本研究は、申請者らが新たに高活性抗菌ペプチドとして同定した Pep2 などと抗真菌剤の併用が、薬剤感受性のみならず薬剤耐性のカンジダ菌による感染症の制御に有望である可能性を示したものとして非常に意義がある。抗菌ペプチドの薬剤耐性遺伝子に対する作用メカニズムの詳細、ヒトへの臨床応用を目指した具体的取り組み等、今後に残された課題はあるものの、今回の研究成果はその基盤として高く評価されるべきである。

以上から、審査員一同は当論文を高知大学大学院博士（医学）に十分値するものと判断した。

氏名(本籍)	松下 雅英 (高知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙医博第28号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成18年11月22日
学位論文題目	Methylation of the MLH1 gene in hematological malignancies (造血器悪性腫瘍におけるMLH1遺伝子の異常メチル化)
発表誌名	ONCOLOGY REPORTS 14(1), 191~194 2005年7月

審査委員	主査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	脇口	宏
	副査	教授	執印	太郎

論文の内容の要旨

背景

ミスマッチ修復機構は、細胞増殖の過程で細胞がゲノムを正確にコピーしていく上で欠くことができない機能であり、本機序の破綻は発癌の原因となる。ミスマッチ修復遺伝子の1つである MLH1 遺伝子は、遺伝子欠失、点突然変異、およびプロモーター領域内の CpG アイランドのメチル化により不活化される。近年、多くの固形癌において MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化がマイクロサテライト不安定性 (MSI) と関連していることが明らかになった。本研究では、造血器悪性腫瘍において MLH1 遺伝子および MSH2 遺伝子プロモーターのメチル化が認められるか、またこれらの遺伝子のメチル化が MSI と関連しているかについて検討した。

方法

サンプル: 成人T細胞白血病 (ATL) 患者 31名、MSI を有する急性リンパ性白血病 (ALL) 患者 9名、健常人 12名、および MSI を有する造血器悪性腫瘍細胞株 12株。

メチル化の検討: MLH1 遺伝子および MSH2 遺伝子プロモーターのメチル化を、メチル化特異的 PCR 法で検討した。ゲノム DNA を 37°C 10 分間 NaOH で処理し、hydroquinone と sodium bisulfite を加えた後、50°C で 16 時間反応させた。bisulfite 処理により、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンはシトシンのままで留まる。この違いを認識するプライマーを用いて PCR 増幅した後、PCR 産物を ethidium bromide を含んだ 3% アガロースゲルで分離した。

RT-PCR 法 : RNA 1 μ g を DNase I で処理後、oligo-dT プライマーを用いて 60 分間 42°C で cDNA に逆転写した。その cDNA を PCR で増幅し、産物をアガロースゲルで分析した。
5-Azacytidine 処理 : MLH1 遺伝子の発現低下が、プロモーターのメチル化によるものであることを確認するため、脱メチル化剤である 5-Azacytidine によりプロモーターを脱メチル化すれば MLH1 遺伝子の発現が回復するかどうかを検討した。KCL22 細胞株を 5-Azacytidine を含む培養液で 9 日間培養し、その前後で DNA および RNA を抽出した。

結 果

MLH1 遺伝子のメチル化は ATL 患者 2 名(6%)、MSI を有する細胞株 (KCL22) 1 株 (8%) で認められた。MLH1 遺伝子のメチル化を有する ATL 患者 2 名はともに急性型であった。MSI を有する ALL 患者では MLH1 遺伝子のメチル化は認められなかった。健常人末梢血では、MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化は認められなかった。以上の全てのサンプルにおいて、MSH2 遺伝子のメチル化は全く認められなかった。

MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化とその発現の関連を RT-PCR 法で検討した。MLH1 遺伝子は、プロモーターがメチル化していない全ての健常人末梢血サンプルにおいて発現されていたが、プロモーターがメチル化していた KCL22 細胞株では発現されていなかった。

5-Azacytidine 処理後、KCL22 細胞株の MLH1 遺伝子プロモーターは脱メチル化状態となり、同時に MLH1 遺伝子の発現が回復した。

結 語

以上の結果より、MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化が ATL などの造血器悪性腫瘍の発生に関与していること、および MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化によりその発現が低下していることが明らかになった。しかしながら、固形癌と異なり、造血器悪性腫瘍では MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化は MSI とは関連していないと考えられた。

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】

ミスマッチ修復は、DNA 複製の際に新生鎖に生じたエラーを取り除いて修復する機構であり、ヒトにおいては大腸菌 MutS のホモログである MSH2、MSH3、MSH6、および MutL のホモログである MLH1、MLH3、PMS2 の計 6 つの因子によって制御されている。これらミスマッチ修復因子の異常は、突然変異頻度の上昇、ひいては 1 から数塩基を 1 単位とした繰り返し配列であるマイクロサテライトの不安定性誘導の引き金となり、遺伝性非腺腫性大腸癌をはじめとする悪性腫瘍発生の原因となることが知られている。最近、マイクロサテライト不安定性を有する大腸癌、胃癌、子宮内膜癌等において MLH1 遺伝子プロモーター領域の

メチル化が同定され、固形癌においては同遺伝子のメチル化がマイクロサテライト不安定性誘導の原因となっていることが示唆された。しかし、血液疾患を対象とした報告は認められないため、申請者らは、白血病、悪性リンパ腫、等の造血器悪性腫瘍を対象に、MLH1、MSH2 遺伝子プロモーター領域のメチル化の有無、ならびに同領域のメチル化とマイクロサテライト不安定性との関連について検討を加えた。

【対象と方法】

成人 T 細胞白血病 (ATL) 31 例、マイクロサテライト不安定性を有する急性リンパ性白血病 (ALL) 9 例、健常人 12 例、およびマイクロサテライト不安定性を有する造血器悪性腫瘍細胞株 12 株を対象とした。DNA メチル化の解析には、DNA を sodium bisulfite で処理し (これによりシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンは変換されない。)、その後 PCR を実施する bisulfite PCR 法を用いた。mRNA の発現は RT-PCR により解析した。また、DNA の脱メチル化は、細胞を脱メチル化剤である 5-Azacytidine を含む培地中で 9 日間培養することにより行った。

【結果】

(1) MLH1 遺伝子のメチル化は ATL 31 例中 2 例 (何れも急性型)、マイクロサテライト不安定性を有する細胞株 12 例中 1 株 (KCL22; CML の blastic crisis) で認められた。しかし、マイクロサテライト不安定性を有する ALL 9 例、および健常人 12 名の末梢血細胞においては MLH1 遺伝子のメチル化は認められなかった。

(2) 解析した 56 個のサンプル全例で MSH2 遺伝子のメチル化は認められなかった。

(3) MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化と MLH1 mRNA の発現との関連の解析では、メチル化陰性の健常人末梢血サンプルでは全例で mRNA の発現が認められたが、メチル化陽性の KCL22 細胞株では発現が認められなかった。

(4) 5-Azacytidine 処理により、KCL22 細胞株の MLH1 遺伝子プロモーターは脱メチル化され、同時に MLH1 mRNA の発現が回復した。

【まとめ】

以上より、造血器悪性腫瘍における MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化は固形癌に比べると低頻度であることが判明した。しかし、ATL 等、一部の血液腫瘍においては同領域のメチル化によるミスマッチ修復系の異常が発症に関与している可能性が示唆された。また、MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化とマイクロサテライト不安定性との関連については、マイクロサテライト不安定性を有する腫瘍における同領域のメチル化の陽性率が、固形癌では 50-92% と報告されているのに対して、今回の解析では 5% 程度であったことから、造血器悪性腫瘍においては MLH1 以外の因子がマイクロサテライト不安定性の誘導により大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

本論文は、ミスマッチ修復因子の1つである MLH1 の遺伝子プロモーターのメチル化の造血期悪性腫瘍発症における意義の一端を明らかにしたものであり、本学の医学博士授与に値すると判断した。

氏名(本籍)	Calvopiña Hinojosa Segundo Manuel (エクアドル)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第29号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成18年11月22日
学位論文題目	<i>Leishmania</i> isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation (エクアドルにおけるリーシュマニア原虫のアイソザイム多型: 地理的分布と臨床症状との関係解析)
発表誌名	BMC Infectious Diseases, 2006, 6:139 2006年9月13日

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

論文の内容の要旨

リーシュマニア症は、世界保健機関 (WHO) が西暦 2000 年に Improved Control of TDR Diseases に選定した 8 大ターゲット疾患のひとつである。本症は熱帯や亜熱帯地域で広く流行しているため、世界の公衆衛生学上も大きな問題となっている。その感染者は 1200 万~1500 万人で、4 大陸 88 カ国で 3 億 5000 万以上の人々が感染の危険にさらされている。本症は新大陸ではアメリカ合衆国南部のテキサス州から南米のアルゼンチン北部に至る広い地域や国で流行している。また、旧大陸ではインド、アフガニスタン、パキスタンのほか、地中海沿岸諸国やアフリカ大陸の広い地域に分布している。媒介者はサシチョウバエと呼ばれる微小な吸血性の昆虫であり、保虫動物としては犬や鼠類など 100 種前後の哺乳動物が関与する。このため、本症は典型的な人獣共通感染症のひとつとされている。病原虫は *Leishmania* 属に属し、ヒトその他の哺乳類では細網内皮系細胞とくにマクロファージ内に寄生して分裂増殖する。ヒトに病原性を持つ *Leishmania* 属の原虫は 20 数種にのぼる。このため、本症患者では宿主と原虫種の組み合わせにより多様な臨床症状を呈するが、大別すると致死的な経過をたどる内臓型のカラアザールのほか、皮膚型、粘膜皮膚型、汎発性皮膚型などがみられる。したがって、各流行地における患者由来原虫を分離・同定して正確な診断を下すことは治療計画の上で重要であると同時に、原虫種の地理的分布と多様な臨床症状との関係、ひいては予後を判断する上でも重要である。エクアドルではこれまでに 6 種類の *Leishmania* 原虫の分布が明らかにされているが、多様な臨床症状との関係については不明な点が多い。

背景：リーシュマニア症における多様な臨床症状の決定因子は不明であるが、病原虫種や *Leishmania* 原虫株の違いは重要な因子のひとつである。そこで、本研究では臨床症状と原虫種やアイソザイム多型との関係を解析するため、エクアドル各地のリーシュマニア症患者から分離した *Leishmania* 原虫 56 株を分析した。

材料及び方法：使用した原虫株は地理的に異なる4つの地域、1) 太平洋側高地、2) 太平洋側低地、3) アマゾン川低地、4) アンデス高地で生活する患者由来のものである。これらの *Leishmania* 原虫株を多座位酵素電気泳動 (MLEE) によって解析した。MLEE の実施に際しては、各酵素について ALAT, ASAT, G6PDH, 6GPDH, GPI, MDH, ME, MPI, NH, PGM, PK の11酵素系によるアイソザイム分析を行った。

結果：総計 21 ザイモデームからなる次の6種 *Leishmania* 属原虫が同定された。1) *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (21株、7 zymodemes)、2) *L.* (*V.*) *guyanensis* (7株、4 zymodemes)、3) *L.* (*V.*) *braziliensis* (5株、3 zymodemes)、4) *L.* (*Leishmania*) *mexicana* (11株、4 zymodemes)、5) *L.* (*L.*) *amazonensis* (10株、2 zymodemes)、6) *L.* (*L.*) *major* (2株、1 zymodeme)。これらのうち、*L.* (*V.*) *panamensis* は太平洋側の流行地でもっとも頻繁にみられる原虫種であり、皮膚リーシュマニア症の幾つかの病型に本種が広く関与していることが判明した。また、特異な病型の再発性皮膚リーシュマニア症 (*leishmaniasis recidiva cutis*: LRC) は本種 (*L.* (*V.*) *panamensis*) の3つのザイモデームと関係していることが明らかとなった。一方、鼻中隔欠損など極めて重篤な病型を呈する粘膜皮膚リーシュマニア症はアマゾン地域に限って分布・流行しており、本病型には *L.* (*V.*) *braziliensis* の3つのザイモデームが関与していることが判明した。また、丘疹性皮膚リーシュマニア症のウタ症 (*Uta*) はアンデス高地に限ってみられ、本症の病原虫である *L.* (*L.*) *mexicana* の1つのザイモデームが深く関与していることが判明した。

結論：本研究は、*Leishmania* 属原虫の種内には高頻度の表現型変異が存在すること、また *Uta* 症や LRC でみられたように、アメリカ皮膚・粘膜皮膚リーシュマニア症の多様な臨床症状 (病型) には種特異的リーシュマニア原虫のザイモデームが関与していることを指摘した。さらに、本研究はエクアドル全土におけるリーシュマニア原虫種及び皮膚・粘膜皮膚リーシュマニア症の多様な病型の地理的分布を明らかにし、病型との関係で各種 *Leishmania* 属原虫の分布地図を作成したことは、エクアドルにおける地域あるいは国レベルでの本症の防圧対策プログラムの企画や、集団治療あるいは将来のワクチン接種キャンペーン実施時の重要な資料となるものである。

論文審査の結果の要旨

【背景および目的】

リーシュマニア症は吸血性昆虫である微小なサシチョウバエによって媒介され、保虫動物としてイヌや鼠類などが関与する典型的な人獣共通原虫性疾患である。本症は熱帯や亜熱帯地域で広く流行し、世界保健機関 (WHO) が定めた8大ターゲット疾患の1つであり、世界の公衆衛生学上大きな問題となっている。ヒトに病原性を持つ *Leishmania* 属の原虫は20数種にのぼり、本症患者では宿主と原虫種の組み合わせにより致死的な経過をたどる内臓型のほか、皮膚型、粘膜皮膚型、汎発性皮膚型など宿主と原虫種の組み合わせにより、

多様な臨床症状を呈する。したがって、各流行地における患者由来原虫を分離・同定して正確な診断を下すことは治療計画や予後予測の上でも重要である。

エクアドルではこれまでに6種類の *Leishmania* 原虫の分布が明らかにされているが、多様な臨床症状との関係については不明な点が多い。そこで、申請者らはエクアドル各地のリーシュマニア症患者から分離した *Leishmania* 原虫 56 株を多座位酵素電気泳動 (MLEE) によって分析し、臨床症状と原虫種のアイソザイム多型との関係を解析した。

【方法】

Leishmania 原虫 56 株は地理的に異なる4つの地域、すなわち、1) 太平洋側高地、2) 太平洋側低地、3) アマゾン川低地、4) アンデス高地に生活する患者由来のものである。これらの *Leishmania* 原虫株に対する MLEE 実施に際しては、11 酵素系 (ALAT、ASAT、G6PDH、6GPDH、GPI、MDH、ME、MPI、NH、PGM、PK) によるアイソザイム分析を行った。電気泳動に際しては、WHO 指定リファレンス株の9株も含め解析し、遺伝子距離 (Jaccard distance) の計算に基づきエクアドル *Leishmania* 原虫株の分子系統樹 (molecular phenogram) を作成した。

【結果】

得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 総計 21 ザイモデームからなる6種の *Leishmania* 原虫が同定された。
- 2) 6種のうち *L.(V.) panamensis* は太平洋側の流行地で最も頻繁にみられる原虫種で、皮膚リーシュマニア症のいくつかの病型に本種が広く関与していた。
- 3) 特異な病型の再発性皮膚リーシュマニア症は *L.(V.) panamensis* の3つのザイモデームと関係していた。
- 4) 鼻中隔欠損など極めて重篤な病型を呈する粘膜皮膚リーシュマニア症はアマゾン地域に限って分布・流行しており、本病型には *L.(V.) braziliensis* の3つのザイモデームが関与していた。
- 5) 丘疹性皮膚リーシュマニア症のウタ症はアンデス高地に限ってみられ、*L.(L.) mexicana* の1つのザイモデームが深く関与していた。

申請者らは、エクアドルのリーシュマニア症流行地における *Leishmania* 原虫の種 (species) および株 (strain) をアイソザイムレベルで決定し、*Leishmania* 属原虫には高頻度の種内多型 (変異) が存在し、多様な臨床症状には *Leishmania* 原虫のザイモデームが関与していることを指摘した。以上、本研究はエクアドル全土におけるリーシュマニア原虫種の地理的分布および皮膚・粘膜皮膚リーシュマニア症の多様な病型との関連を明らかにし、病型との関係で各種 *Leishmania* 属原虫の分布地図を作成したことは、エクアドルにお

るリーシュマニア症の伝播疫学および予防対策にも貢献するところ大であり、学術的評価も高い。したがって、本論文は高知大学医学部博士（医学）に値すると評価された。