



国立大学法人 高知大学学報

(題字：相良祐輔学長)

高知大学学位授与記録第四号

広報・調査課発行

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7号	大 崎 史 淳	Roles of Sp1 and protein kinase C in regulation of human serum paraoxnase 1(PON1) gene transcription in HepG2 cells (血清パラオキシナーゼ遺伝子の転写調節におけるSp1およびプロテインキナーゼCの役割)	1
甲医博第8号	工 藤 順 弘	HIF-1 α is involved in the attenuation of experimentally induced rat glomerulonephritis (HIF-1 α はモデルラット腎炎の発症抑制に関与する)	4
甲医博第9号	ZIYAD MUTLAQ ALDAHOODI	Dysfunction of dendritic cells associated with adult T cell leukemia/lymphoma and therapeutic strategy using a dendritic cell vaccine (成人T細胞白血病・リンパ腫発症に関与する樹状細胞機能異常と樹状細胞ワクチンを用いる治療戦略) [1] Dysfunction of dendritic and T cells as the cause of immune suppression in HTLV-I infected individuals (HTLV-I感染者にみられる免疫抑制の原因である樹状細胞とT細胞の機能障害) [2] Generation of functional monocyte-derived dendritic cells from HTLV-I infected rabbits : therapeutic approach using a dendritic cell vaccine (HTLV-I感染ウサギからの機能的単球由来樹状細胞の樹立: 樹状細胞ワクチンを用いた治療的アプローチ)	7
甲医博第10号	鈴 木 稜 子	MCI-186 inhibits tumor growth through suppression of EGFR phosphorylation and cell cycle arrest (EGFレセプターを介する腫瘍細胞増殖に対するラジカルスカベンジャーMCI-186の抗腫瘍増殖効果)	10
甲医博第11号	TOIVGOOGIIN AIRA	Validity of using tuberculin skin test erythema measurement for contact investigation during a tuberculosis outbreak in schoolchildren previously vaccinated with BCG (BCG既接種中学生での結核集団感染発生時接触者健診に際してツベルクリン反応検査発赤径を測定することの妥当性)	13

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 12 号	濱 田 篤 秀	The effect of <i>Eriobotrya japonica</i> seed extract on oxidative stress in adriamycin-induced nephropathy in rats (ADR 投与腎障害ラットの酸化ストレスに対する枇杷種子由来エキスの効果)	1 6
甲医博第 13 号	李 德 超	Reactive oxygen species(ROS)control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination (活性酸素によるリン酸化およびユビキチン化を介した Bcl-2 ファミリー蛋白の発現制御)	1 9
甲医博第 14 号	中 谷 肇	STI571(Glivec) inhibits the interaction between c-KIT and heat shock protein 90 of the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1 (STI571(グリベック)は胃腸管間質腫瘍株-GIST-T1のc-KITと熱ショックタンパク 90との会合を阻害する)	2 2

氏名(本籍)	大崎 史淳(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第7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17年3月23日
学位論文題目	Roles of Sp1 and protein kinase C in regulation of human serum paraoxnase 1(PON1) gene transcription in HepG2 cells (血清パラオキシナーゼ遺伝子の転写調節におけるSp1およびプロテインキナーゼCの役割)
発表誌名	Atherosclerosis 176(2) : 279-287 2004年10月

審査委員	主査	教授	本家	孝一
	副査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	麻生	悌二郎

論文の内容の要旨

【目的】血清パラオキシナーゼ(PON1)は、高比重リポ蛋白(HDL)上に存在し、低比重リポ蛋白(LDL)の酸化を抑制することから動脈硬化進展の抑制因子として注目されている。われわれはPON1遺伝子上流に転写因子Sp1結合配列が存在することを報告した。また、プロテインキナーゼC(PKC)はSp1を活性化することが知られている。本研究では、ヒト肝癌由来HepG2細胞を用いて、PON1遺伝子の転写調節におけるSp1およびPKCの役割について検討した。

【方法】PON1遺伝子上流域配列を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを作成し、HepG2細胞に発現させてレポーター遺伝子アッセイを行った。まず、PON1遺伝子の転写調節に関与する領域を同定するために、本遺伝子5'上流側から順次欠失させたDNA配列の転写活性を比較検討した(deletion analysis)。次に、同定した領域内のDNA配列とSp1の結合をゲルシフト・アッセイ(EMSA)で検討した。更に、Sp1およびPKCの関与をみるために、Sp1発現ベクターおよびPKC発現ベクター(野生型、変異型)の共発現あるいは各活性化・阻害剤による処置が転写活性に与える影響を検討した。

【結果】deletion analysisにおいて、-1232bpから-269bpまで、DNAの長さが短くなるに従いPON1遺伝子の転写活性は増加したが、Sp1結合配列(GCボックス)を欠く-97bpフラグメントでは活性は著減した。このことから、-269/-97のDNA配列がPON1の転写調節に重要であると考えられた。次に、EMSAにおいて、-125/-95のDNA断片にSp1が結合すること、-111/-106のGCボックスを変異(GG→TT)させるとSp1の結合が減

弱することを明らかにした。野生型Sp1の過剰発現は転写活性を5~10倍に増強させ、Sp1結合阻害作用を有するmithramycinはSp1による転写活性化を濃度依存性に阻害した。PKCを活性化するphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)はPON1遺伝子の転写活性を4~6倍に増強し、Sp1の過剰発現で相乗効果を認めた。これらの効果はいずれもmithramycinにより阻害された。PKCアイソフォームのうち、PKC α およびPKC ζ はHepG2細胞に内因性に発現しているが、これらのkinase活性を欠失させたdominant negative変異体を過剰発現させるとPON1転写活性は35~45%減少した。また、PKC阻害剤であるbisindolylmaleimide (BIM)により、PMAのPON1転写活性に及ぼす効果はほぼ消失した。さらに、PKC ζ を活性化するインスリンは転写活性を亢進させ、野生型PKC ζ の過剰発現により相乗効果が認められた。

【結論】HepG2細胞において、Sp1はPON1遺伝子の転写を正に制御し、その結合にはPON1遺伝子上流-111/-106のGCボックス配列が重要であることを明らかにした。また、PKC α やPKC ζ の活性化により転写活性は増強し、これらを阻害すると活性は減弱することから、これらのPKCもPON1の転写調節に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、PKCの活性化によるPON1転写に及ぼす効果は、Sp1の阻害により有意に抑制されたことより、PKCによるPON1転写調節には一部にSp1を介した機序が示唆された。PON1遺伝子の転写を含めたPON1合成調節機構を明らかにすることは、血管障害の新たな予防法の開発につながると期待されるが、上記の研究結果は今後のPON1の研究に対して重要な知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

【背景および目的】

血清パラオキシナーゼ (PON1) は、高比重リポ蛋白 (HDL) 上に存在し、低比重リポ蛋白 (LDL) の酸化を抑制することから動脈硬化進展の抑制因子として注目されている。大崎氏が所属する内分泌代謝・腎臓内科学教室では、これまで、血清中 PON1 活性が糖尿病患者で低下していることや、PON1 遺伝子上流に存在する Sp1 結合予想配列に変異があると PON1 の転写が低下し血清中の PON1 のレベルが減少することを明らかにしてきたが、Sp1 が PON1 の転写を促進する詳細なメカニズムは不明であった。本論文は、Sp1 が PON1 遺伝子の転写を促進する分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】

PON1 遺伝子上流域配列とルシフェラーゼ遺伝子を繋いだリポーター遺伝子を HepG2 細胞に導入し、さまざまな条件下でのルシフェラーゼ活性を測定することによりレポーター遺伝子の転写活性への影響を調べた。まず、転写調節領域を決定するため、PON1 遺伝子の 5' 上流側 -1232 bp から順次欠失させた DNA 断片の転写活性を比較検討した。次に、同定した領域内の DNA 断片と Sp1 の結合をゲルシフトアッセイで調べた。さらに、転写活性への Sp1 およびタンパクキナーゼ C (PKC) の関与を、Sp1 遺伝子および PKC 遺伝子の共発現、あるいは特異的賦活剤と阻害剤による影響によって解析した。

【結果】

deletion analysis により、Sp1 結合配列を含む -269 から -97 bp の DNA 配列に強い転写促進領域が存在した。ゲルシフトアッセイにより -125/-95 bp の DNA 断片に Sp1 が結合し、予想 Sp1 結合配列を 2 塩基変異させると Sp1 の結合が減弱した。Sp1 の過剰発現は転写活性を 5~10 倍に増加させ、Sp1 結合阻害作用を有する mithramycin は Sp1 による転写活性化を濃度依存性に阻害した。PKC を活性化する phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は PON1 遺伝子の転写活性を 4~6 倍に増強し、Sp1 の過剰発現で相乗効果を認めた。この PMA による転写促進活性は、PKC 阻害剤の bisindolylmaleimide (BIM) によってほぼ消失した。HepG2 細胞には、内在性の PKC として、PKC α と PKC ζ が発現していた。それぞれの PKC に対するドミナントネガティブ変異体を過剰発現させると PON1 転写活性は有意に減少した。また、野生型 PKC ζ の過剰発現により転写活性が増加し、PI3-kinase を介して PKC ζ を活性化すると考えられるインスリンにより相乗効果がみられた。

以上より、PON1 遺伝子上流域に Sp1 が結合し、転写を促進することが明らかとなった。また、PKC も Sp1 結合領域を介して PON1 遺伝子の転写を促進することがわかった。

本論文は、血清リポタンパク質の酸化抑制活性を有するとされるパラオキシナーゼ PON1 の転写制御の一端を明らかにし、血管障害の予防法開発のための足がかりを与えた。よって、本論文は本学の学位に値すると判断した。

氏名(本籍)	工藤 順弘 (大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第8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17年3月23日
学位論文題目	HIF-1 α is involved in the attenuation of experimentally induced rat glomerulonephritis (HIF-1 α はモデルラット腎炎の発症抑制に関与する)
発表誌名	Nephron Experimental Nephrology 2005年 (in press)

審査委員	主査	教授	大舘	祐治
	副査	教授	橋本	浩三
	副査	教授	土居	義典

論文の内容の要旨

(目的) 今までに多くの実験腎炎モデルが報告されているが、主として糸球体に病変を呈し、かつ短期間に完成するモデルの報告は少ない。また、腎炎の発症に関与する因子が多数報告されているが、糸球体の障害を抑制する因子についての報告は少ない。今回我々は、ハブ毒単回及び Angiotensin II 持続投与による新しいモデルラット腎炎を作製し、腎炎発症初期における腎組織変化を検討した。さらに細胞の生存に密接に関与する蛋白の一つである Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α に着目し、その発現と腎炎発症との関連を検討した。

(方法) 9週齢の雄 Wistar ラットを用い、前日に片腎摘処理を行った後、ハブ毒 (3.5mg/kg) 静注と Angiotensin II (100ng/min) 持続皮下投与を行った (H+A 群、n=22)。対照群として、無投与群 (N 群、n=6)、ハブ毒単回投与群 (HV 群、n=11)、Angiotensin II 単回投与群 (A 群、n=11) を作製した。各群ともそれぞれ 1, 2, 3, 4 日目に屠殺し、血液及び腎組織を採取した。採取した腎組織は、PAS 及び PAM 染色にて病理組織像を観察し、HIF-1 α の発現は Western blot 法及び免疫組織化学的手法を用い検討した。血圧の測定は、tail-cuff 法にて片腎摘前、薬物投与前、投与後 1 日、2 日の計 4 回行った。また、HIF-1 α の pre-induction 目的に片腎摘前日と当日の 2 回、塩化コバルトの皮下投与 (30mg/kg) を行い (CoCl₂ 群、n=11)、以後は H+A 群 (塩化コバルト非投与群: non-CoCl₂ 群、n=22) と同様に片腎摘処理とハブ毒、Angiotensin II 投与を行った。CoCl₂ 群の片腎摘の際には、薬剤投与前サンプル (CoCl₂ pre) として腎組織を採取保存した。薬剤投与後 2 日目に屠殺し、CoCl₂ 群と non-CoCl₂ 群の 2 群間で比較検討した。

(結果) 病理組織所見では、H+A 群にのみ糸球体の融解壊死 (mesangiolysis) 及び尿細管腔内に円柱 (cast) が認められ、対照群ではほとんど変化が認められなかった。mesangiolysis は、H+A 投与後 1 日目には認められず、2 日目以後全ての個体に認められ、経時的に増悪傾向を呈した。血清 UN 及び Cr の上昇は、糸球体の障害度と一致した。いずれの群でも尿細管細胞壊死は認められなかった。血圧は、H+A 群及び A 群において有意に上昇した。HIF-1 α の発現は、H+A 群及び A 群

に認められ、その発現部位は糸球体、尿細管、集合管それぞれの細胞核であった。特に H+A 群において、HIF-1 α の発現は障害された糸球体には認められず、残存する正常糸球体にのみ認められた。この HIF-1 α の発現が、組織障害の促進因子であるのか、あるいは障害抑制反応のための応答なのかを確認するため、CoCl₂ 群と non-CoCl₂ 群でその組織障害度を比較検討した。CoCl₂ 群では、腎炎発症は 11 匹中 7 匹において抑制され、その 7 匹の mesangiolysis 発生率は 12.2% であり、non-CoCl₂ 群の 44.9% に対し有意に低値であった。さらに HIF-1 α の発現は、CoCl₂ 群のうち 7 匹で薬物投与前、後共に強く認められたのに対し、4 匹ではほとんど認められず、mesangiolysis の発症抑制頻度と一致した。

(結論) 今回我々が報告したハブ毒及び Angiotensin II を用いた腎炎モデルは、再現性が高く、かつ短期間で完成した。また、前もって HIF-1 α を発現誘導させることにより、腎炎の発症を抑制することができた。

論文審査の結果の要旨

実験腎炎のモデルに関しては、短期間で糸球体に病変を惹起させるものの報告は数少なく、一方、発症要因に関しては多数の報告が認められるのに対して発症予防因子に関するものは数少ない。そこで今回申請者らは、腎障害を惹起することが報告されているハブ毒と Angiotensin II の双方を用いて短期間のうちに糸球体病変を生じるモデルの作成を試み、且つそれらの腎障害の発症予防に関して、転写因子である hypoxia inducible factor (HIF)-1 α が有効であるかどうかを検索した。

用いたのは 9 週齢の雄 Wistar ラットであり、4 群に分けて実験を行った。ハブ毒 (Habu snake venom, HV) (3.5mg/kg) 静注と Angiotensin II (A) 持続投与 (100ng/min) 群 (HV+A, n=22)、HV 単独投与群 (HV, n=11)、Angiotensin II 単独投与群 (A, n=11) および無投与群 (N, n=6) の 4 群である。いずれのラットも片側腎摘出後に上記処置を行い、1、2、3、4 日目に各々屠殺し、腎の病理組織所見観察 (PAS 反応と PAM 染色) と血清中の Urea N (UN) と Creatinine (Cr) も測定した。また、tail-cuff 法により血圧の測定も行った。

さらに HIF-1 α 誘導のために別の 11 匹には CoCl₂ の皮下投与 (30mg/kg) を腎摘出前後に実施した後に HV+A 群と同様の処置をし、CoCl₂ 非投与群 (n=22) と腎病理組織所見や血清中の UN、Cr の比較を行った。HIF-1 α の発現は Western blot 法とその抗体を用いた免疫組織化学染色により実施した。糸球体障害に関しては、観察された糸球体のうち病変をみとめたものを % であらわした。

HV+A 群のみで糸球体病変が認められ、focal segmental mesangiolysis (capillary aneurysmal ballooning) と表現される変化が認められ、切片上では、segmental のみでなく global にも認められた。2 日目の HV+A 群の腎糸球体で、44.9% の頻度にこれらの変化が認められた。1 日目では糸球体の変化は観察されず、2 日目以降は次第に増強し、4 日目では、すべての個体において観察された。UN や Cr の値は糸球体の変化の程度と相関していた。また、尿細管腔には、糸球体障害の 2 次的変化として蛋白円柱が認められた。HV、A、N 群など他の群では糸球体の変化は 4 日目においても認められず、蛋白円柱も観察されなかった。何れの群でも尿細管壊死はみなかった。又、HV+A 群と A 群では、有意に血圧が上昇していた。

CoCl₂ 投与群 11 匹では、2 日目に 7 匹において HIF-1 α の発現が、免疫染色では糸球体、尿細管、集合管上皮の核にみとめられ、Western blot 法でも発現が確認された。これらのラットでの糸球体病変の発現率は 12.2% であり、上述の HV+A 群での 44.9% に比し格段に糸球体病変の発現が抑制されていた。しかし、HIF-1 α の発現が認められなかった個体での病

変は CoCl₂ 非投与群と同様であった。A 群においても HIF-1 α の発現は認められたが、糸球体病変は認めなかった。血圧に関しては CoCl₂ 群および CoCl₂ 非投与群間において差異は見出されなかった。

これらの結果、HV+A 群 (HV+A 投与) により 2 日目においてすでに糸球体に病変が惹起されるという糸球体急性障害モデルが確立された。また、興味深いことにこれら病変の発症に関して転写因子である HIF-1 α の発現に予防効果のあることが明らかにされた。従来、HV 単独投与や AngiotensinII 投与による腎障害の発生は報告されていたが、HV+A の組み合わせにより前述の興味深い結果を得たものである。腎障害の詳細に関する更なる検索や HIF-1 α の具体的な発症予防効果についてのメカニズムの解明が今後必要である。

本研究において腎障害、特に糸球体で再現性の高い短期間に発生する mesangiolytic の確立とこれを予防する因子としての HIF-1 α の役割が明らかにされたことは、今後のヒト腎障害の治療・予防において臨床応用への道を拓く重要な知見であり、申請者の研究内容は高知大学博士 (医学) 授与に値するものと判断された。

氏名(本籍) ZIYAD MUTLAQ ALDAHOODI (パレスチナ)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 甲医博第9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17年3月23日

学位論文題目 Dysfunction of dendritic cells associated with adult T cell leukemia/lymphoma and therapeutic strategy using a dendritic cell vaccine
(成人T細胞白血病・リンパ腫発症に関与する樹状細胞機能異常と樹状細胞ワクチンを用いる治療戦略)

[1]Dysfunction of dendritic and T cells as the cause of immune suppression in HTLV-I infected individuals
(HTLV-I感染者にみられる免疫抑制の原因である樹状細胞とT細胞の機能障害)

[2]Generation of functional monocyte-derived dendritic cells from HTLV-I infected rabbits : therapeutic approach using a dendritic cell vaccine
(HTLV-I感染ウサギからの機能的単球由来樹状細胞の樹立: 樹状細胞ワクチンを用いた治療的アプローチ)

発表誌名 [1]Journal of Clinical and Experimental Hematopathology
vol.43(2) : 43-48 2003年10月

[2]Journal of Clinical and Experimental Hematopathology
vol.44(1) : 17-24 2004年4月

審査委員 主査 教授 宇高 恵子
副査 教授 今井 章介
副査 教授 脇口 宏

論文の内容の要旨

ヒトリンパ向性ウイルスI型 (HTLV-I) は、成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) の原因ウイルスであり、長い潜伏期間の後に数%のキャリアが発症する。無症候性キャリア (AC) の段階では、感染細胞数はその抗体や細胞障害性T細胞 (CTL) により制御されているが、その一部では細胞性免疫の障害に続いて感染細胞のクローン性増殖が始まり、ATLLへと進展する。現在、治療として多剤併用化学療法が用いられているが、腫瘍細胞の残存を許してしまい、その予後は非常に悪い。最近、同種造血幹細胞移植が ATLL 症例の生存期間の延長を可能にしており、移植片対腫瘍細胞効果が重要な役割を演じていると考えられている。

樹状細胞 (DC) は、強力な抗原提示細胞であり、腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対する食作用を有し、これにより T 細胞を刺激して CTL 活性をもたらす。末梢血単球 (Mo) を GM-CSF と IL-4 を加えて培養し、さらに TNF- α を加えて成熟化すると、in vitro でも抗原提示能を有する DC を誘導することができる。また TNF- α などのサイトカインのほかにも CD40-CD40 リガンド (CD40L) を介した活性化 T 細胞との相互反応が DC の成熟化を誘導する。

著者は、HTLV-I 感染者の Mo 由来 DC の機能を調べることにより、免疫抑制状態の原因を、また、HTLV-I 感染動物モデルを用いて Mo 由来 DC を使った治療的ワクチン開発の可能性を検討した。

まず、HTLV-I 感染者の Mo 由来 DC を得るために、AC としては HTLV-I 抗体陽性献血者 (高知県赤十字血液センター) のバフィーコートより単核細胞を分離し、すぐに凍結保存あるいは DC 誘導を行った。ATLL 患者 (高知大学医学部附属病院) と健常人の末梢血からも同様に DC を誘導した。DC の食作用を FITC-dextran を用いて調べたが異常はみられなかった。フローサイトメトリーでは、AC の段階で病原菌の菌体成分の提示などに必要な CD1a および MHC クラス II 分子である HLA-DR の低発現を認め、抗原提示能の異常が示唆された。つぎに、 γ 線照射した DC と、PHA と IL-2 で刺激・選択した T 細胞とを共培養して DC の T 細胞増殖誘導能の有無を調べた。健常人では、FBS 存在下で誘導した DC が自己 T 細胞を刺激することを見出した (Autologous MLR) が、AC の半数と ATLL 患者の全例において増殖反応はみられなかった。これらは、HTLV-I 感染者では DC の抗原提示能障害とともに DC - T 細胞間の相互反応障害が存在することを示した。そこで、T 細胞の可溶性 CD40L 発現を ELISA で測定したが、HTLV-I 感染者では検出できなかった。これらの結果より、HTLV-I 感染者における免疫異常は、HTLV-I 感染 T 細胞の異常だけでなく、DC の機能異常ならびに DC-T 細胞間相互反応障害などにも基づいていることが明らかとなった。

次に、動物モデルとして HTLV-I 感染ウサギを作製し、DC を用いた治療的ワクチン開発のための初期実験をおこなった。ウサギ Mo の DC への誘導は、保証する抗体が無いので、形態変化と MLR でのリンパ球刺激能により確認した。これは、ウサギ Mo の DC 誘導化の世界最初例である。アポトーシスを誘導した HTLV-I 感染ウサギ細胞株 Ra-1 (高知大学医学部血液・呼吸器病態内科学教室で樹立) を、健常ウサギ Mo 由来 DC に認識させた後、ウサギの皮下あるいは静脈内に 1 週間隔で 2 度投与した。2 週間後にリンパ球を集めて調べてみると、Ra-1 に対する細胞障害性を獲得していた。この DC の遊走をみるために、あらかじめ PKH-26 でラベルし、投与 2 日後に解剖したところ、皮下投与した DC は所属リンパ節で CD4 陽性細胞と接触して相互反応している像を得た。一方、静脈内投与した場合は脾臓内に蓄積していた。これらのことから、腫瘍細胞を認識した正常 DC を皮下投与することにより、抗腫瘍免疫の増強を期待できることが示唆された。

以上より、著者は、DC の機能異常が ATLL 発症に深く関っており、これが発症高危険群の同定につながることを、さらに正常樹状細胞を用いた治療的ワクチンが発症予防あるいは造血幹細胞移植の補助療法として役立つことを示すことができた。

論文審査の結果の要旨

Ziyad Aldahoodi さんの学位審査は、平成 17 年 1 月 5 日 16:00 より、約 1 時間 40 分にわたって行なわれた。まず、研究内容の発表を行った。

「論文1の内容について」

HTLV-I 感染症および無症候性キャリアーの人では、末梢血の免疫応答が変化していることが報告されているため、まず、主要な抗原提示細胞である樹状細胞(DC)の機能について調べた。まず、末梢血単球(Mo)から GM-CSF と IL4 の存在下に *in vitro* の培養系で誘導した樹状細胞について、貪食能と、活性化や機能の指標となる細胞膜蛋白質の発現を調べた。その結果、FITC-Dextran の摂取能には差がなかったが、無症候性キャリアーにおいて、一部の症例では、健康人や ATLL 患者と比較して、CD1a、HLA-DR などの発現量の低下が観察された。

DCの抗原提示能を調べるために、autologous MLRを用いてT細胞誘導能を調べた。健康人2例では、DCを加えることにより、T細胞の増殖がある程度みられたのに対し、一部の無症候性キャリアーや2例の ATLL 患者においては、DCを抗原提示細胞として加えた場合とそうでない場合での反応性T細胞の増殖能に差がないことが観察された。しかし、上記で調べたDC上の細胞表面蛋白質の発現量との相関は明らかになっていない。

以上のように、無症候性キャリアーや ATLL 患者では、一部に DC の機能異常が示唆されたため、その原因として他に報告のある T 細胞の機能異常を疑った。そこで、今度は末梢血 T 細胞における CD40L の発現誘導を、それを間接的に反映する血清中の可溶性 CD40L の量を測定することにより調べた。すると、無症候性キャリアーや ATLL 患者では、ほとんどの症例で可溶性 CD40L の発現がなく、T細胞の機能異常と autologous MLRにおけるDCの抗原提示能の低下には関連があることが示唆された。

末梢血サンプル数の制限のため、十分に統計的有意性が示されていないことや、DC上に発現される細胞膜蛋白質との関連について機能相関が明らかになっていない点が残念であるが、一般に研究が進んでいないこの分野において、臨床検体に頼らざるを得ない実情の中では、症例の観察も意味があると思われる。特に、無症候性キャリアーにおいても、DC、T細胞の両方に機能異常が疑われる、ということを実証した点は、既報に知見を加えるものである。

「論文2」

HTLV-I 感染の *in vivo* の動物モデルとなりうるウサギにおいては、樹状細胞(DC)の *in vitro* 培養による誘導の方法や機能解析の方法が確立されていない。そのため、ヒトリコンビナントの GM-CSF と IL4 を加えて末梢血モノサイトから DC を誘導する方法の開発を試みた。その結果、形態や貪食能、リンパ組織への遊走能において、マウスやヒトで観察されている DC に相当する細胞の誘導が可能となった。これら DC の抗原提示能を調べるため、HTLV-I 陽性ウサギ細胞株 Ra-1 を用いて免疫したウサギにおける、アロ特異的リンパ球応答と細胞傷害活性を調べたところ、免疫の前後で反応性の増強がみられた。

ウサギというこの疾患のモデル動物としては十分に開発が進んでいない動物を対象としているため、手探り段階の研究であり、分子の確認など詰めが十分にできていない点はある程度やむを得ないかもしれない。ただ、細胞傷害活性の誘導は Ra-1 細胞を貪食させた自己 DC によるクロスプライミングにより行いながら、Ra-1 を直接の標的細胞として使った細胞傷害性試験においては、アロ反応への配慮や、期待されるエフェクター細胞の種類についての理解は十分でない印象を受けた。

氏名(本籍)	鈴木 稜子(宮城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第10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17年3月23日
学位論文題目	MCI-186 inhibits tumor growth through suppression of EGFR phosphorylation and cell cycle arrest (EGFレセプターを介する腫瘍細胞増殖に対するラジカルスカベンジャー MCI-186の抗腫瘍増殖効果)
発表誌名	Anticancer Research(in press)

審査委員	主査	教授	大拙 祐治
	副査	教授	荒木 京二郎
	副査	教授	西岡 豊

論文の内容の要旨

【はじめに】

細胞内のラジカルが癌細胞の増殖シグナルに関わっていることが近年明らかとなってきた。炎症時や虚血再灌流障害等の病的状態での過剰なラジカル産生は強い細胞毒性をもたらすが、一方で生理的範囲でのラジカルは細胞増殖の細胞内シグナルセカンドメッセンジャーとして働く。特に上皮増殖因子(EGF)や血小板由来増殖因子(PDGF)刺激による癌細胞の増殖では、ラジカルがその細胞内増殖シグナルに関与しており、この細胞内ラジカルをターゲットとした癌細胞増殖抑制法が開発できれば、新たな分子標的治療戦略の一つとして癌治療に応用できる可能性が考えられる。

MCI-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one/ラジカット/エダラボン)は、急性期脳虚血性疾患における脳保護剤として唯一臨床的に使用されているラジカルスカベンジャーである。本研究は、このMCI-186を用いた腫瘍細胞増殖抑制効果について検討することを目的とし、さらにその作用メカニズムについての解析を行った。

【実験方法】

ヒト由来各種腫瘍細胞株(肝癌細胞 HepG2、悪性中皮腫細胞 MSTO-211H、胃癌細胞 TMK-1、乳癌細胞 MCF-7)を用い、MCI-186 添加(0 μ M - 300 μ M)にて48時間培養し細胞数を計測した。またMCI-186 前処理後、EGF(5ng/ml)を添加し48時間培養、同様に細胞増殖抑制の評価を行った。アポトーシスの検討としては、MCI-186 添加後 DAPI 染色により核の濃縮を観察し評価した。

また腫瘍細胞周期に与える影響につき検討するため、HepG2 細胞を aphidicolin 処理による G0/G1 期同調また nocodazole による G2/M 同調後、MCI-186 と 24 時間培養し propidium iodide 染色後、FACS で解析した。MCI-186 による EGF レセプター(EGFR)リン酸化抑制および EGFR の発現についてはウエスタンブロッティング法にて検討した。

【実験結果】

1) MCI-186 は、実験に用いた全ての腫瘍細胞株の増殖を濃度依存性に抑制した。しかしながら MCI-186 による細胞死の誘導は認められず、また DAPI 染色においても核の濃縮像はなかったことからアポトーシス誘導活性はないと考えられた。

2) 細胞周期に対する影響は、G0/G1 同調後においては MCI-186 による G1 期停止の維持が認められたが、G2/M 同調後は MCI-186 処理群と未処理群とで差が認められなかった。

3) 上皮増殖因子 (EGF) 刺激による EGFR のリン酸化は MCI-186 処理により濃度依存性に抑制された。しかし EGFR 自体の発現抑制は認めなかった。血清刺激による EGFR リン酸化も同様に抑制された。EGF 添加によって誘導される腫瘍細胞の増殖は、MCI-186 によって抑制された。

【考察および結論】

これらの実験結果より、MCI-186 の腫瘍細胞の増殖抑制効果が示されたが、これは細胞死を誘導する cytotoxic な作用ではなく、cytostatic な作用であった。細胞周期解析より、この増殖抑制は G1 期停止が関与することが示された。また EGF 刺激による EGFR のリン酸化が MCI-186 処理により濃度依存性に抑制されたことから、この MCI-186 による抑制効果のメカニズムの一つとして、EGFR リン酸化抑制が考えられた。

ラジカルスカベンジャー MCI-186 は正常細胞に対しては細胞保護的に作用するため、細胞増殖シグナルが過剰に増幅している癌細胞には抑制的に、逆に正常細胞に対しては副作用を軽減し細胞保護に働くという二重の効果が期待できると考えられる。今後は臨床応用をめざした解析につなげたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

細胞増殖に関して、Reactive oxygen species (ROS) は細胞死のみでなく腫瘍化にも関係する DNA 損傷や遺伝子不安定性とも関連を有していることが知られてきた。ROS 過剰状態では、cytotoxic に働くが、適量の ROS の存在は細胞内情報伝達に関与し、細胞増殖にとっても重要である。特に EGF や PDGF などによる細胞増殖刺激においては、細胞内 ROS の関与が重要視され、腫瘍細胞の増殖抑制を介した分子標的治療のモデルとなり得ると考えられる。そこで申請者は、ラジカルスカベンジャーとして知られ、臨床的にも急性脳虚血性疾患における脳保護剤として使用されている MCI-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) に注目し、腫瘍細胞増殖抑制における効果を多角的に検討した。

用いた腫瘍細胞株は HepG2 (肝癌)、MSTO-211H (悪性胸膜中皮腫)、TMK-1 (胃癌)、そして MCF-7 (乳癌) の 4 株である。MCI-186 (以下 MCI と略す) は、10、30、100、300 μ M の各濃度を用い、各々の株細胞の 48 時間後の細胞数や生細胞数をカウントした。この結果、

4株いずれにおいても MCI の濃度依存性に細胞数の有意な増殖抑制効果が得られた (HepG2 で $300\mu\text{M}$ では 45.7%)。また、生細胞数は、いずれの濃度においても差はなく 96-98%であった。つぎに、この増殖抑制が apoptosis と関連するかどうかを HepG2 株について、H₂O₂ を加えて apoptosis を惹起させたものを対照として、MCI を加えた後に DAPI 染色で核濃縮を検索したが、全く陽性所見は得られなかった。従って増殖抑制には apoptosis の関与はないことが明らかとなった。

ついで細胞周期との関連を検討した。まず aphidicolin により HepG2 を G₀/G₁ 期同調培養後 (24 時間で 80%以上) に aphidicolin を加えないで MCI 存在下に培養し FACS 解析した所、G₀/G₁ 期に同調 (81%以上) したままであり、MCI は腫瘍細胞の S 期への移行を阻止することにより増殖抑制効果を示していることが判明した。Nocodazole により HepG2 を G₂/M 期に同調培養後 (24 時間で 91%以上) に MCI 存在下に培養するとやはり G₀/G₁ 期で細胞は同調状態となり、やはり G₁ arrest が観察され前述の結果が確認された。腫瘍細胞の増殖抑制は G₁ arrest によるものと考えられたが、細胞周期蛋白との関係における詳細な機序は不明である。最後に EGF と EGFR について検討した。EGF については、MCI で前処理後に MCI 存在下で EGF を加えても増殖効果は得られなかった。また、EGF 刺戟により EGFR 発現と EGFR のリン酸化について検討した。ウエスタンブロット法により MCI 存在下で EGFR の発現増強は認められなかったが、EGFR のリン酸化に関しては、MCI を加えた場合においてのみ、30、100 μM の濃度依存性に発現低下が認められ、MCI によるリン酸化抑制効果が明らかであった。これら EGFR 発現、EGFR のリン酸化抑制については、HepG2 の他に悪性中皮腫、乳癌細胞株でも同様の結果が得られた。血清刺戟による EGFR、EGFR リン酸化においても MCI により同様の結果が得られた。また、MCI と同様にラジカルスカベンジャーとして知られている ebselen と mannitol については、HepG2 において apoptosis 誘導や腫瘍細胞増殖抑制効果は全く得られなかった。従って MCI は apoptosis を介さず、S 期への進行阻害 (G₁ arrest) により、さらに EGFR のリン酸化阻害により、肝癌・悪性中皮腫・胃癌・乳癌の各細胞株の増殖抑制効果を示していることが明らかとなった。また、同じラジカルスカベンジャーでも ebselen や mannitol とは腫瘍細胞に対する作用機序が異なっていることが明らかであった。

臨床応用に関しては、MCI-186 は $6\mu\text{M}$ が現在の使用濃度であり、今回用いた 30—300 μM との間に差があり、*in vitro* と *in vivo* の壁としてこの点の解消が重要と考えられた。また、細胞内や組織内でのラジカルの測定が重要であるが、現在は技術的に困難であると説明があった。

これらの結果、MCI-186 (edaravone) は代表的な悪性腫瘍について著明な増殖抑制効果を示したことから、抗癌剤としての臨床応用への可能性が格段に広がったことになり、且つ作用機序に関しても重要な点を明らかにした成果は大いに評価でき、申請者は高知大学博士 (医学) 授与に値すると判定した。

氏名(本籍)	TOIVGOOGIINAIRA (モンゴル)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第11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17年3月23日
学位論文題目	Validity of using tuberculin skin test erythema measurement for contact investigation during a tuberculosis outbreak in schoolchildren previously vaccinated with BCG (BCG既接種中学生での結核集団感染発生時接触者健診に際してツベルクリン反応検査発赤径を測定することの妥当性)
発表誌名	Journal of Epidemiology 15(2) 2005年3月

審査委員	主査	教授	田口	博國
	副査	教授	今井	章介
	副査	教授	倉本	秋

論文の内容の要旨

ツベルクリン皮膚テスト(以下、TST)は、接触者健診において結核感染の有無を確認するため広く行われている。TSTは、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)のツベルクリンに対する遅延型反応に基づいており、皮膚テストで発赤と硬結が観察されるが、判定における国際的な標準は硬結が用いられている。我が国では、発赤の測定値が臨床及び疫学の双方において重要な役割を果たしているが、発赤の測定値を基盤にした結核の発症予防や対策プログラムの妥当性に関する疫学的研究は少ない。

本研究は、TSTによる発赤と硬結の相関関係を明らかにすること、及びBCG接種歴のある集団が結核患者に接触した場合の結核感染診断におけるTSTの発赤測定の妥当性を検討することを目的とした。

検討資料は、中学校における肺結核の集団感染事例で得られたものであり、初発患者への接触者に対して56か月間の追跡調査が行われた。初発患者は15歳の中学生で、追跡期間中に生徒24人を含む34人の患者が診断された。

接触者に対する健診は、初発患者診断の2か月後に行われ、以後3年間定期的な健診が実施された。TSTは0.05 μ gのツベルクリン精製蛋白抽出物を含む0.1mlの生理的食塩水を前腕に皮内注射し、48時間後に発赤及び硬結の長径及び短径を測定した。

今回の分析対象は中学生566人であり、初発患者との接触度により接触が多い同じクラスの生徒から、異なる学年の生徒まで4つの暴露群(I:同クラス、II:合同授業・課外活動が同じ、III:他の同学年、IV:他学年)に分類された。化学予防の対象者は、暴露群別に接触者健診の発赤測定値と入学時の定期健診における発赤径との変化を組合せた基準を用いて144人が選定され、137人が完了した。

統計的分析では、皮膚反応の長径を用い、発赤と硬結の相関関係については測定における variability を避けるため同一医師が測定した 543 人の結果を検討した。また、566 人全員を対象として、暴露群別の結核の発症率、ならびに発症者と化学予防対象者を感染者とみなした場合の感染率を比較した。さらに、発赤測定の診断上の有効性を評価するために、選定基準の false-positive と false-negative について検討した。

発赤と硬結の関係については、発赤、硬結の長径の分布はともに BCG 接種者の集団が結核患者に暴露された場合の特徴的な 2 峰性の分布を示し、指数変換を行った発赤値は硬結と直線的な関係（相関係数は 0.88）にあり、硬結径の増加に伴って発赤径の増加を認めた。

肺結核患者の発症率は、暴露群別に接触度が強いほど高率であった。（Ⅰ:30.0%、Ⅱ:8.3%、Ⅲ:4.8%、Ⅳ:1.1%）暴露群別の発赤の平均値も接触度が強いほど大きくなっており（Ⅰ:52.9mm、Ⅱ:49.5mm、Ⅲ:39.8mm、Ⅳ:28.1mm）、硬結と同様の傾向を認めた。（Ⅰ:23.3mm、Ⅱ:20.1mm、Ⅲ:17.4mm、Ⅳ:15.8mm）また、発症者と化学予防対象者を感染者とみなした場合の感染率も、暴露群別に接触が強い群ほど高かった。（Ⅰ:90.1%、Ⅱ:65.3%、Ⅲ:48.1%、Ⅳ:10.8%）以上から、発赤径による結核感染診断が硬結と同等の意義を有することが確認された。

本研究では、化学予防対象者の選定基準の一つとして発赤測定値を用いた。初発患者との接触度が高い群（Ⅰ-Ⅲグループ）では接触者健診での発赤測定値 $\geq 30\text{mm}$ を cut-off point とした。一方、接触が少ない群（Ⅳグループ）では感染者が少ないと思われることから 50mm とし、他の群と同様の陽性反応的中度となるよう設定した。また、BCG 接種者の TST 発赤径が結核菌暴露後暴露前に比べて 20mm 以上増加した場合、結核感染の可能性が高いとされている。そこで、もう一つの選定基準として接触者健診と入学時の定期健診の発赤径との変化を用い、Ⅱ及びⅢグループでは $\geq 20\text{mm}$ の増加、Ⅳグループでは他の群と同様の陽性反応的中度となるよう $\geq 30\text{mm}$ の増加を cut-off point とし、false-positive の減少を図った。その結果Ⅱ、Ⅲグループで 5 名、Ⅳグループで 6 名、計 11 名が、発赤径は cut-off point を超えていたが発赤径変化が cut-off point に達せず、化学予防対象者から除かれた。これら 11 名からは、追跡期間中に結核発症者はなかった。これらの結果から、暴露前後の発赤径変化を利用することで、化学予防対象者の特異度を向上させることが示唆された。

一方、TST の結果が化学予防対象者の基準を下回っていた 411 名の中から、追跡期間中に結核を発症し、false-negative と考えられるものが 8 名（1.9%）いた。BCG 接種歴を有する塗沫陽性患者の発赤径が 30mm を最頻値とする 1 峰性の分布を示すことから、今回設定した発赤径の cut-off point では、Ⅰ-Ⅲ群の約半数、Ⅳ群の半分以下しか真の感染者を発見できない。最近 QuantiFERON-TB 法が、結核感染に対して高度の特異性と感性をもつことが示されたが、それが普及するまでは、TST は唯一の潜在的な結核感染の検査である。BCG 接種集団で結核感染が発生した場合は、TST の化学予防対象基準値以下からも患者発生の可能性があり、少なくとも、活動性結核の累積罹患率が 80% に達する 2 年間の胸部 X 線と菌検査が必要である。

本研究の限界の一つとして、硬結と発赤の測定に際しての測定者の variability が課題になる。しかし、本研究では一人の検査者が硬結と発赤を全て測定しているため、複数の測定者間による variability の影響がなく、個人の variability はこれに比し小さいと推測され、検討結果に致命的な影響は与えないと考えた。また、本研究では、化学予防対象者を感染者とみなして分析しているが、今回用いた TST の化学予防基準値以上の者が全て真の感染者ではない。しかし、今回の接触者健診では、TST は初発患者の診断 2 ヶ月後に 1 回のみ実施し、発赤径と入学時の定期的検査による発赤径との変化を組合せた基準を用いて化学予防対象者を選定しており、ブースター効果による false-positive の紛れ込みの影響を最小限に抑えている。

今回の知見は、発赤の測定が TST 結果の解釈に有用であることを示した。硬結測定における困難さや測定者間の variability を考えると、発赤が観察されやすい日本人のような集団では、TST での発赤の測定は結核予防と対策プログラムに有用といえる。

論文審査の結果の要旨

ツベルクリン皮膚テスト(以下、TST)は、結核感染の有無を確認するため広く行われている。TST陽性者の判定の国際的な標準は硬結径が用いられている。我が国では、伝統的に発赤の測定値が用いられているが、発赤の測定値を基盤にした結核の発症予防や対策プログラムの妥当性に関する疫学的研究は非常に少ない。

申請者は今回高知県の中学校における肺結核の集団感染事例において、感染者の発見、化学的予防対象者の選定にTSTを用い、発赤と硬結の相関関係及びBCG接種歴のある集団が結核患者に接触した場合の結核感染診断におけるTSTの発赤測定値の妥当性を検討することを目的とし、初発患者への接触者566人を対象に56か月間の追跡調査を行った。初発患者は15歳の中学生で、追跡期間中に生徒24人を含む34人の患者が診断された。

接触者に対する健診は、初発患者診断の2か月後に行われ、以後3年間定期的な健診が実施された。分析対象の中学生566人を、初発患者との接触度により接触が多い同じクラスの生徒から、異なる学年の生徒まで4つの暴露群(I:同クラス、II:合同授業・課外活動が同じ、III:その他の同学年、IV:他学年)に分類した。化学予防の対象者は、暴露群別に接触者健診の発赤測定値と入学時の定期健診における発赤径との変化を組合せた基準を用いて144人が選定され、137人が完了した。発赤と硬結の測定はvariabilityを避けるため同一医師が行なった。また、566人全員を対象として、暴露群別の結核の発症率、ならびに発症者と化学予防対象者を感染者とみなした場合の感染率を比較した。

発赤と硬結の関係については、発赤、硬結の最大径の分布はともにBCG接種者の集団が結核患者に暴露された場合の特徴的な2峰性の分布を示し、指数変換を行った発赤値は硬結と直線的な関係(相関係数0.88)にあり、硬結径の増加に伴って発赤径の増加を認めた。

肺結核患者の発症率は、暴露群別に接触度が強いほど高率であった。暴露群別の発赤の平均値も接触度が強いほど大きくなっており、硬結と同様の傾向を認めた。また、発症者と化学予防者を感染者とみなした場合の感染率も、暴露群別に接触が強い群ほど高かった。以上から、発赤径による結核感染診断が硬結と同等の意義を有することが確認された。

化学予防対象者の選定基準の一つとして発赤測定値を用い、初発患者との接触度が高い群(I-IIIグループ)では接触者健診での発赤測定値 $\geq 30\text{mm}$ をcut off pointとした。一方、接触が少ない群(IVグループ)では 50mm とし、他の群と同様の陽性反応的中度となるよう設定した。また、BCG接種者のTST発赤径が結核菌暴露後は暴露前に比べて 20mm 以上増加した場合、結核感染の可能性が高いとされているのもう一つの選定基準として接触者健診と入学時の定期健診の発赤径との変化を用い、II及びIIIグループでは $\geq 20\text{mm}$ の増加、IVグループでは他の群と同様の陽性反応的中度となるよう $\geq 30\text{mm}$ の増加をcut off pointとして、false positiveの減少を図った。その結果II、IIIグループで5名、IVグループで6名、計11名が、発赤径はcut off pointを超えていたが発赤径変化がcut off pointに達せず、化学予防対象者から除かれた。これら11名からは、追跡期間中に結核発症者はなかった。これらの結果から、暴露前後の発赤径変化を利用することで、化学予防対象者の特異度を向上させることが示唆された。一方、TSTの結果が化学予防対象者の基準を下回っていた411名の中から、追跡期間中に結核を発症すなわちfalse negativeと考えられるものが8名(1.9%)いた。BCG接種歴を有する塗沫陽性患者の発赤径が 30mm を最頻値とする1峰性の分布を示すことから、今回設定した発赤径のcut off pointでは、I-III群の約半数、IV群の半分以下しか真の感染者を発見できなかった。BCG接種集団で結核感染が発生した場合は、TSTの化学予防対象基準値以下からも患者発生の可能性があり、少なくとも、活動性結核の累積罹患率が80%に達する2年間は胸部X線と菌検査が必要であることが示唆された。

本論文は、発赤が観察されやすい日本人のような集団では、TSTでの発赤の測定は硬結測定に比べ、簡易であり測定者間の変動も少なく結核の感染者の発見に有用で、結核感染者の多いモンゴルのような発展途上国での結核の集団感染の予防と対策プログラムに適用できることを示した点が優れており、審査員全員が高知大学博士(医学)論文に相応しいものであることを認めた。

氏名(本籍)	濱田 篤秀 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第12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17年3月23日
学位論文題目	The effect of <i>Eriobotrya japonica</i> seed extract on oxidative stress in adriamycin-induced nephropathy in rats (ADR投与腎障害ラットの酸化ストレスに対する枇杷種子由来エキスの効果)
発表誌名	Biological & Pharmaceutical Bulletin 27(12) : 1961-1964 2004年12月

審査委員	主査	教授	執印	太郎
	副査	教授	本家	孝一
	副査	教授	大西	三朗

論文の内容の要旨

[緒言] 近年、活性酸素やフリーラジカルによる生体の酸化障害は、多種多様の疾患に関与していることが報告されている。活性酸素は生体内で持続的に産生され、細胞内の刺激情報伝達物質等として重要な役割を果たしている。しかしながら、様々な原因により過剰に発現すると、炎症、壊死、アポトーシス、発癌等の生体にとって有害な作用を示す。

癌化学療法で汎用されている5-fluorouracilやadriamycin (ADR)は、それ自身がラジカル産生物質となり、superoxide anionやhydroxyl radicalを発生させ、生体に酸化ストレスを与える。特に、ADR投与時の副作用として腎障害が知られており、その発症に酸化ストレスが関与するという報告がなされている。そのため、酸化ストレスが原因となる腎障害に対しては、抗酸化作用を有する物質の投与が有用であると考えられる。

現在までに我々は、70% Ethanolを用いて抽出した枇杷種子由来エキス(*Eriobotrya japonica* seed extract: ESE)がin vitroにおいてsuperoxide anionやhydroxyl radical消去作用を有していることを発見した。さらに肝障害モデルにおいても、肝機能の著明な改善作用を確認している。

そこで、酸化ストレスが原因となり発症する腎障害に対して、ESEが如何なる作用を有するかを明らかにする目的で、ADR腎障害ラットにESEを投与し、その改善効果を検討した。

[方法] 実験動物はwistar系雄性ラット(7週齢)を1週間の予備飼育後、実験に供した。ESEは、枇杷の種子1kgを粉碎し、70% Ethanol 2Lに1週間浸漬した後、上清を分取した。その上清をエバポレーターにて濃縮し、蒸留水20Lに溶解したものをを用いた。ラットを生理食塩液+水道

水、生理食塩液+ESE、ADR+水道水及びADR+ESE群の4群に分類した。生理食塩液及びADR (7mg/kg)は腹腔内に単回投与した。ESEは1日15mLを14日間摂取させた。生理食塩液及びADR投与後14日にラットを屠殺し、血漿中のクレアチニン、尿素窒素及びアルブミン値を測定した。また、腎組織中のsuperoxide dismutase (SOD)、glutathion peroxidase (GPX)、catalase (CAT)活性及び還元型グルタチオン量を測定した。抗酸化作用は、血漿中及び腎組織中の過酸化脂質量を指標とした。

[結果・考察] 腎機能の指標である血漿クレアチニン値はADR+ESE群が、ADR+水道水群と比較して低値を示した。血漿中尿素窒素値はADR+ESE群が、ADR+水道水群と比較して有意に低値を示した。血漿アルブミン値は、ADR+ESE群とADR+水道水群の間に差は認められなかった。このことより、ADRにより惹起された腎機能障害は、ESE投与により抑制されることが明らかとなった。腎組織中の抗酸化酵素であるSOD、GPX及びCATについては、CAT活性においてのみ、ADR+水道水群が他の群と比較して有意に高値を示した。また、腎組織中の還元型グルタチオンはADR+ESE群が、ADR+水道水群と比較して有意に高値を示した。血漿中及び腎組織中の過酸化脂質量は、ADR+ESE群がADR+水道水群と比較して有意に低値を示した。このことより、ESEは、ADR投与により惹起される生体の酸化状態を改善することが明らかとなった。

これらのことより、ESEはADRにより誘発された腎障害に対して有用であり、その作用機序は、ESEの抗酸化作用によるものと考えられる。また、抗酸化酵素活性の変動がなかったことより、ESEの抗酸化作用は活性酸素に対して直接的に作用するものと推察した。

以上のことより、ESEは、酸化障害が原因となる抗癌剤の副作用を軽減できる可能性があり、臨床への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

近年、活性酸素による生体の酸化障害は多種の疾患に関与していることが報告されている。活性酸素は生体内で持続的に産生され、細胞内の刺激情報伝達物質等として重要な役割を果たしている。しかしながら様々な原因で過剰に発現すると、炎症、壊死、アポトーシス、発癌等の生体にとって有害な作用を示す。癌化学療法で汎用されている adriamycin (ADR) はラジカル産生物質となり、superoxide anion や hydroxyl radical を発生させ、生体に酸化ストレスを与える。特に、ADR 投与時の副作用として腎障害が知られており、その発症に酸化ストレスが関与するという報告がなされている。そのため、酸化ストレスが原因となる腎障害に対しては、抗酸化作用を有する物質の投与が有用であると考えられる。申請者は70%Ethanolを用いて抽出した枇杷種子由来エキス (Eriobotryo japonica seed extract、以下ESEと略) が in vitro において superoxide anion や hydroxyl radical 消去作用があることを発見した。さらに肝障害モデルにて、肝機能の著明な改善作用を確認している。そこで、酸化ストレスが原因となり発症する腎障害に対して、ESE が如何なる作用を示すかを明らかにする目的で、ADR 腎障害ラットに ESE を投与し、その効果を検討した。

本研究では申請者はESEを用い、wistar系雄性ラット(7週齢)に生理食塩液+水道水、生理食塩液+ESE、ADR+水道水及びADR+ESE群の4群に分類し投与した。生理食塩液及びADR (7mg/kg)は腹腔内に単回で、ESEは1日15mlを14日間摂取させた。生理

食塩液及びADR投与後14日にラットを屠殺し、血漿中のクレアチニン、尿素窒素及びアルブミン値を測定した。また、腎組織中の superoxide dismutase (SOD)、glutathion peroxidase (GPX)、catalase (CAT) 活性及び還元型グルタチオン量を測定した。抗酸化作用は、血漿中及び腎組織中の過酸化脂質量を指標とした。

結果として腎機能の指標である血漿クレアチニン値は ADR+ESE 群が、ADR+水道水群と比較して低値を示した。血漿中尿素窒素値は ADR+ESE 群が、ADR+水道水群と比較して有意に低値を示した。血漿アルブミン値は、ADR+ESE 群と ADR+水道水群の間に差は認められなかった。このことより、ADR により惹起された腎機能障害は、ESE 投与により抑制されることを示した。腎組織中の抗酸化酵素である SOD、GPX 及び CAT については、CAT 活性においてのみ、ADR+水道水群が他の群と比較して有意に高値を示した。また、腎組織中の還元型グルタチオンは ADR+ESE 群が、ADR+水道水群と比較して有意に高値を示した。血漿中及び腎組織中の過酸化脂質量は ADR+ESE 群が ADR+水道水群と比較して有意に低値を示した。これにより、ESE は ADR 投与で惹起される生体の酸化状態を改善する事が明らかとなった。

これらのことより、ESE が ADR により誘発された腎障害に有効であり、その作用機序は ESE の抗酸化作用によるものと強く示唆された。また、抗酸化酵素活性の変動がないことより、ESE の抗酸化作用は活性酸素に対して直接的に作用するものと考えられた。本研究で ESE は、酸化障害が原因となる抗癌剤の副作用を軽減できる可能性を強く示しており、臨床への応用が期待される。

上記の内容に関して口頭発表が行われ、質疑応答がなされた結果、審査員一同は本論文が本学学位論文として十分な内容を有するものと判定した。

氏名(本籍)	李 德 超 (中 国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第13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17年3月23日
学位論文題目	Reactive oxygen species(ROS)control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination (活性酸素によるリン酸化およびユビキチン化を介した Bcl-2 ファミリー蛋白の発現制御)
発表誌名	Cancer Science Vol 95, No. 8 (644-650) 2004年8月

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	大拙	祐治
	副査	教授	大西	三朗

論文の内容の要旨

【目的】抗癌剤や放射線によるアポトーシスは、主として Bcl-2 ファミリー蛋白や活性酸素(ROS)の関与するミトコンドリアを介する経路によって誘導されることが知られている。Bcl-2 ファミリー蛋白は、Proapoptotic ならびに Antiapoptotic なファミリーからなっており、これらの発現や機能は転写レベル、リン酸化、オリゴマー形成、さらには、ユビキチン化などによって調節されている。しかしながら、抗癌剤や放射線が細胞の Bcl-2 ファミリー蛋白の発現、機能にどのような影響を及ぼすか、さらには、Bcl-2 ファミリー蛋白と ROS との関係については十分に明らかにされていない。これまで我々は、高い Manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD)活性を有する口腔扁平上皮癌(OSC)細胞は抗癌剤や放射線に抵抗性であるが、Mn-SOD アンチセンスを導入することにより抗癌剤や放射線によるアポトーシスが誘導され易くなることを明らかにし、放射線や抗癌剤による OSC 細胞のアポトーシス誘導には ROS が関与することを報告してきた。そこで本研究では、抗癌剤や放射線による OSC 細胞のアポトーシス誘導の中で、Bcl-2 ファミリー蛋白の転写、リン酸化、オリゴマー形成、さらには、ユビキチン化における ROS の役割について検討を行った。

【方法】株化 OSC 細胞に Mn-SOD アンチセンスを導入した OSC-4AS 細胞およびコントロールベクターを導入した OSC-4VC 細胞を、抗癌剤(5-フロオロウラシル、ペプロマイシン、シスプラチン)あるいは γ 線処理し、細胞内 ROS レベルおよびアポトーシス誘導をフローサイトメトリー法あるいは共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。各蛋白の発現レベルおよびリン酸化レベルは免疫沈降法ならびにウエスタンブロット法にて、NF- κ B の DNA 結合活性については EMSA 法にて、Bax および Bcl-2 の転写活性についてはルシフェラーゼアッセイにて検索した。

【結果】OSC-4AS 細胞を抗癌剤あるいは γ 線処理すると、OSC-4VC 細胞に比べて細胞内 ROS レベルの上昇、Proapoptotic Bcl-2 ファミリーである Bax および Bad の発現亢進、さらには、Antiapoptotic Bcl-2 ファミリーである Bcl-2 および Bcl-X_L の発現低下がより強く生じ、アポトーシスがより強く誘導された。抗癌剤あるいは γ 線処理することにより OSC-4VC 細胞では NF- κ B 活性、さらには、Bcl-2 のプロモーター活性は上昇したが、OSC-4AS 細胞では NF- κ B 活性が軽度上昇しただけで、Bcl-2 のプロモーター活性の上昇は認められなかった。OSC-4AS における抗癌剤あるいは γ 線処理後の Bcl-2 ファミリー蛋白のユビキチン化レベルは、OSC-4VC に比べ、Bax および Bad では低く、逆に Bcl-2 では亢進していた。さらに、OSC-4AS では OSC-4VC に比べ抗癌剤あるいは γ 線処理による Bcl-2 (Thr56) および Bad (Ser155) のリン酸化が抑制され、Bax/Bcl-2 および Bax/Bcl-X_L のヘテロダイマー形成が減弱し、これらの変化は、抗酸化剤である N-アセチルシステインおよび Pyrrolidine dithiocarbamate により打ち消された。

【考察および結論】抗癌剤あるいは γ 線処理で OSC 細胞を処理すると Proapoptotic Bcl-2 ファミリーである Bax および Bad の発現亢進、Antiapoptotic Bcl-2 ファミリーである Bcl-2 および Bcl-X_L の発現低下が生じ、アポトーシスが誘導される。しかしながら、Bcl-2 ファミリー蛋白の発現レベルは、それらの遺伝子の転写活性や転写因子の活性によって制御されるのみではなく、リン酸化ならびにユビキチン化によって調節されていることが明らかとなった。すなわち、抗癌剤あるいは γ 線は Bcl-2 および Bad のリン酸化を抑制するが、Bcl-2 はリン酸化が抑制されることによりユビキチン化による分解が亢進し、発現が低下するのに対し、Bad はリン酸化が抑制されることにより Bcl-X_L との結合能が増強する。さらに、Bax および Bad は、ユビキチン化による分解が抑制され、発現が増強する。その結果、Bax のホモダイマーは増加し、一方、Bax/Bcl-2 および Bax/Bcl-X_L のヘテロダイマーは減少し、アポトーシス誘導に進むと考えられる。さらには、これらの変化は Mn-SOD のアンチセンス導入により増強し、逆に、抗酸化剤の前処理により抑制されたことより、Bcl-2 ファミリー蛋白のリン酸化シグナルには ROS が関与していることが示唆された。以上より、癌細胞内の ROS 生成誘導、ROS 消去の抑制が抗癌剤や放射線の治療効果を高める 1 手段であり、Mn-SOD アンチセンスの導入による ROS 消去の抑制—アポトーシス誘導の増強は、癌治療の 1 つの戦略になりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

李 徳超さんの学位審査は、平成17年1月13日16:00より約1時間半にわたり行われた。まず、学位論文の研究内容について、発表と質疑応答を行った。

李さんは、口腔扁平上皮癌細胞株 OSC を用いて、Mn-SOD の抗アポトーシス活性が、どのような分子を介したのかをについて研究を行った。OSC 細胞株は、数種の抗がん剤や放射線に対する抵抗性を示し、これまでに本学の歯科口腔外科学教室のグループにより、Mn-SOD 遺伝子の発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドによって特異的に抑制すると、アポトーシスに感受性になることが明らかにされている。今回の研究では、Mn-SOD 抑制が、どのような下流の分子種に影響を与えてアポトーシス活性誘導に至るか、を解析した。

アポトーシスの制御において、中心的な役割を果たす分子としては、アポトーシス誘導に働く Bad, Bid, Bik などを含む BH3 モチーフを有する Bcl-2 ファミリー分子群と、これらに拮抗してアポトーシスを抑制する活性をもつ、BH4 モチーフを有する Bcl-X_L, Bcl-2 などを含む Bcl-2 ファミリー分

子群とがあげられる。そこで、Mn-SOD 遺伝子の発現抑制下で、抗癌剤や放射線照射を行った OSC 細胞株において、これらの遺伝子群の発現の変化を調べた。

まず、抗癌剤である 5-FU、peplomycin、シスプラチン添加や放射線照射を行い、産生された reactive oxygen species (ROS)の量と Annexin V 陽性のアポトーシス細胞の割合に相関があることを確認した。アンチセンスオリゴヌクレオチドによって Mn-SOD を発現抑制した OSC 細胞では、ROS と Annexin V 陽性細胞の割合が有意に増加した。この実験条件下で Bcl-2 ファミリー遺伝子産物の発現を Western blot にて調べたところ、アポトーシスを誘導する Bax や Bak の蛋白質量が Mn-SOD 抑制細胞で亢進していた。一方、アポトーシス抑制効果のある Bcl-2 や Bcl-X_L の量は、低下していた。このことから、Bcl-2 ファミリー遺伝子産物群の発現量がアポトーシス誘導へと傾いていることが明らかとなった。

アポトーシス抑制活性のある Bcl-2 や Bcl-X_L の発現は、NF- κ B がこれらの遺伝子のプロモーターに結合することにより誘導されることが知られているので、DNA に結合した NF- κ B 量を gel shift アッセイで調べたところ、抗癌剤や放射線照射により結合量の増加が確認された。しかし、Mn-SOD を発現抑制した OSC 細胞では、結合量の変化がごくわずかにとどまった。これら抗癌剤や放射線照射を受けた細胞では、Luciferase レポーターアッセイを使って調べると、Bax のプロモーター活性が上がっており、それは、Mn-SOD の発現抑制によっては影響されなかった。一方、Bcl-2 プロモーター活性は、増加していたが、Mn-SOD の発現抑制をした細胞では、Bcl-2 プロモーター活性の上昇が見られなかった。

次に Bcl-2 ファミリーの分解に対する影響を調べるため、Bax、Bad、Bcl-2 のユビキチン化を調べたところ、Mn-SOD の発現抑制により、Bax と Bad のユビキチン化は低下しており、この低下は、抗酸化剤投与により回復した。一方、Bcl-2 のユビキチン化は、亢進していた。さらに、これら Bcl-2 ファミリー遺伝子のリン酸化を調べたところ、抗癌剤や放射線処理後の Bad (Ser155) および Bcl-2 (Thr56) のリン酸化の増加が、Mn-SOD の発現抑制細胞では減弱していた。また、PKA のリン酸化も減弱していた。その結果、アポトーシスを誘導しない複合体である Bax/Bcl-2 や Bax/Bcl-X_L のヘテロダイマーおよび Bcl-X_L/ Bcl-X_L のホモダイマーの量が減少し、これらの複合体の解離に伴い、アポトーシスを誘導する Bax のホモダイマーの増加が起こることが推測された。

以上の結果を総合すると、抗癌剤や放射線照射による酸化ストレスは、Bcl-2 ファミリー分子の発現誘導、ユビキチン化、リン酸化を通じて、アポトーシスを誘導することがわかった。さらに、Mn-SOD は、この一連の反応に拮抗し、アポトーシスを抑制する働きをもつ主要な酵素のひとつであることが明らかとなった。

審査員からは、研究に使った OSC-4 細胞株がたまたま p53 など、アポトーシスに関連する重要な遺伝子の欠損株であり、観察された変化がこの細胞に限った現象である可能性はないか、という質問があった。これに対し、p53 遺伝子は調べたが silent mutation で機能には影響がないので、おそらく今回の結果は他の細胞にも一般化できる可能性が高い、また、oncogenic なウイルス感染は確認されていない、という説明があった。その他の質問には、Bcl-2 ファミリーの分子群の他のメンバーは調べていないか、ROS が Bad や Bcl-2 のリン酸化を起こす分子機構はどこまでわかっているか、実験の再現性や実験条件の工夫はどうであったか、Caspase 3 の活性はどうなっていたか、などがあった。これらに対し、李さんはおおむね適切な応答をし、将来の課題として残される問題について認識が明らかであった。また、研究発表は、明快簡潔にする工夫がされていた。

氏名(本籍)	中谷 肇(兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第14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17年3月31日
学位論文題目	STI571(Glivec) inhibits the interaction between c-KIT and heat shock protein 90 of the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1 (STI571(グリベック)は胃腸管間質腫瘍株-GIST-T1のc-KITと熱ショックタンパク90との会合を阻害する)
発表誌名	Cancer Science Vol.96(2);116-119 2005年2月

審査委員	主査	教授	大西	三朗
	副査	教授	西岡	豊
	副査	教授	麻生	悌二郎

論文の内容の要旨

【背景】胃腸管間質腫瘍(GIST)は消化管に発生する腫瘍で表面マーカーのCD34,並びに癌遺伝子産物のc-KITを発現していることから消化管の蠕動運動のペースメーカーであるCajalの介在細胞を起源とした腫瘍と考えられている。また近年,GISTのc-KITの遺伝子異常によるc-KITのチロシンリン酸化の亢進がその腫瘍化に重要であることが示唆されている。GISTの治療は原則として外科的切除であるが、切除不能例では近年開発された分子標的薬剤であるSTI571(商品名;グリベック)が有効である。STI571はc-KITのチロシンリン酸化を阻害し抗腫瘍効果を発揮している。また細胞内においてシャペロンはタンパクの安定や識別を行っており、とくにHeat shock protein90(Hsp90)はいくつかの癌遺伝子産物の機能調節を行っていることが報告されている。本研究ではc-KITの遺伝子異常によりチロシンリン酸化が亢進しているc-KITを有するGIST細胞株(GIST-T1)を用いて細胞表面上のc-KITの挙動に着目し、特に活性型c-KIT、不活性型c-KITにおけるHsp90との関連を検討した。

【方法】c-KITのチロシンリン酸化の検討は未処理分、STI571処理分(0.1,1 μ g/ml)、Hsp90阻害剤geldanamycin処理分(0.01,0.1,1 μ g/ml)のタンパクを抽出しwestern blotを行った。また薬剤は培養上清に加え5時間incubateした。c-KITとHsp90の会合に関しては免疫沈降法にて検討した。未処理分、STI571(1 μ g/ml),geldanamycin(0.1 μ g/ml)で12時間のincubationを行った後、c-KIT抗体で沈降後、western blotでHsp90を確認した。細胞表面上のc-KITの挙動は未処分,STI571(1 μ g/ml),geldanamycin(0.1 μ g/ml)で12時間処理後、細胞を集め免疫電子顕微鏡で観察するため試料を作製した。免疫染色はc-KIT,Hsp90抗体をそれぞれ用いた。cell viabilityの検討では、MTT assayを用いて検討した。

【結果】 c-KIT のリン酸化は STI571, geldanamycin により阻害された。

c-KIT と Hsp90 の会合は STI571, geldanamycin により阻害された。

細胞表面上の c-KIT は cluster を形成しているが、STI571, geldanamycin により cluster 形成が阻害された。また c-KIT と Hsp90 の会合も観察された。cell viability は STI571, geldanamycin により濃度依存性に低下した。

【考察、結語】 western blot の結果より STI571 により GIST-T1 における c-KIT のリン酸化が阻害され、さらに geldanamycin でもリン酸化は阻害された。さらに免疫沈降の結果から c-KIT のリン酸化は Hsp90 との会合が必要かつ十分であることが示唆された。細胞表面上の c-KIT は Hsp90 と共に cluster 形成しており STI571, geldanamycin により cluster 形成は阻害された。また近年 Hsp90 阻害剤は臨床治験がなされておりいくつかの腫瘍に対し良好な治療成績を得ている。geldanamycin は GIST-T1 の cell viability の低下を STI571 と同様に来すため Hsp90 阻害剤は GIST 治療に使用できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

胃腸管間質腫瘍(GIST)は癌遺伝子産物 c-KIT の遺伝子異常による c-KIT のチロシンリン酸化の亢進が腫瘍化に重要であることが明らかにされている。GIST の外科的切除不能例では、分子標的薬剤である STI571 (商品名; グリベック) が c-KIT のチロシンリン酸化を阻害し、その抗腫瘍効果は顕著である。また、分子シャペロンである Heat shock protein 90 (Hsp90)は数種の癌遺伝子産物の機能調節を行っている。

本研究は c-KIT の遺伝子異常により細胞内ドメインのチロシンリン酸化が構成的に亢進している GIST 細胞株(GIST-T1)を用いて、培養液に STI571 あるいは Hsp90 の阻害剤; geldanamycin を添加し、傍細胞膜での c-KIT cluster 形成に c-KIT の活性化、および活性型 c-KIT と Hsp90 の会合が関与することを明らかにし、かつ Hsp90 阻害剤の新たな分子標的薬剤としての可能性を示した論文である。

【方法】c-KIT のチロシンリン酸化は、STI571(0.1,1_g/ml)、あるいは geldanamycin (0.01,0.1,1_g/ml)を添加し、5 時間培養後、western blot で検討した。c-KIT と Hsp90 の会合は薬剤添加後、12 時間培養し、cell lysate を c-KIT 抗体で免疫沈降後、沈降物中の Hsp90 を western blot で検出した。傍細胞膜での c-KIT の挙動は、STI571(1_g/ml)あるいは geldanamycin(0.1_g/ml)を添加し、12 時間培養後、c-KIT 抗体、Hsp90 抗体を用いた immuno gold 免疫電顕で観察した。両薬剤の cell viability への効果は 16 時間培養後、MTT assay で検討した。

【結果】 c-KIT のリン酸化は STI571, geldanamycin により阻害された。免疫沈降法で c-KIT と Hsp90 の会合は STI571, geldanamycin により阻害された。免疫電顕で、傍細胞膜での c-KIT の cluster 形成は STI571, geldanamycin により阻害され、cluster 形成部位では c-KIT と Hsp90 の共存も観察された。cell viability は STI571, geldanamycin により濃度依存性に低下した。

【考察】 GIST-T1 における c-KIT のリン酸化は geldanamycin により、STI571 と同様に阻害された。さらに、免疫沈降法と免疫電顕で c-KIT のリン酸化が c-KIT と Hsp90 の会合、および cluster 形成に必要なことが示された。

近年、Hsp90 阻害剤は臨床治験がなされており、幾つかの腫瘍に対し良好な治療成績が得られている。geldanamycin は GIST-T1 の cell viability の低下を STI571 と同様に来し、Hsp90 阻害剤が GIST 治療に有効である可能性が示唆された。

質疑では、GIST-T1 株は doubling time は 40-50 時間であり、両薬剤の添加後、速やかに G1 arrest になり、両薬剤の viability への影響は細胞内シグナル伝達の MAPK への影響が異なり、更に検討中であることが追加された。c-KIT 遺伝子異常のない細胞での両薬剤の c-KIT のリン酸化阻害効果、および c-KIT の活性化と cluster 形成の関連については、c-KIT のリン酸化サイトの欠失変異株で調べてはとのアドバイスがあった。

本論文は GIST の分子標的型治療法に Hsp90 阻害剤が有効である事を、作用機序の一部の解明とともに示し、本学の医学博士に値すると考える。