

2012. 4

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人
高知大学学報

高知大学学位授与記録第五十二号

法人企画課広報戦略室発行

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14条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

*
*
*
高知大学学報
*
*
*

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

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 136 号	増田 弘誠	Usefulness of Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of nonalcoholic fatty liver disease (非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患活動性を評価するためのテクネチウム-99m 標識 2-メトキシイソブチルイソニトリル肝シンチグラフィの有用性)	1
甲医博第 137 号	大崎 丈二	The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody (マウス前脳の生後発達期における Sez-6 蛋白質の局在は Sez-6 蛋白質の多機能を示唆する：新しい抗体を用いての解析)	7
甲医博第 138 号	姜 松林	A proteomics approach to the cell surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction (酵素触媒ラジカル発生反応を用いる細胞表面インタラクトームへのプロテオミクスによるアプローチ)	12
甲医博第 139 号	高田 智也	¹⁸ F-FDG PET/CT is a powerful tool for detecting subclinical arthritis in patients with psoriatic arthritis and/or psoriasis vulgaris (¹⁸ F-FDG PET/CT を用いた乾癬患者における無症候性関節炎の検出)	17
甲総医博第 1 号	庵地 孝嗣	SNRPE is involved in cell proliferation and the progression of high-grade prostate cancer through the regulation of AR expression (SNRPEはARの発現制御を通して前立腺癌の増殖や進展に関与する)	22

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総医博第2号	趙 立峰	Hormonal Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase Isoenzyme Gene Transcription (アセチル補酵素Aカルボキシル化酵素アイソフォーム遺伝子のホルモンによる調節)	27
甲総医博第3号	常風 興平	Metabolomics study on the biochemical profiles of odor elements in urine of human with bladder cancer (膀胱がん患者の尿臭気のメタボロミクス解析)	32
甲総医博第4号	遅 海東	Activity of prolidase isoenzymes in the rat brain: subcellular and regional distribution during development (ラット脳におけるプロリダーゼアイソエンザイムの活性:細胞質分画と成長に伴う脳の各部位での分布)	37
甲総医博第5号	森下 慶子	Superoxide dismutase activity of Helicobacter pylori per se from 158 clinical isolates and the characteristics. (ヘリコバクター・ピロリ臨床分離株158株のSOD活性に関する検討)	42
甲総医博第6号	矢田部 智昭	The evaluation of the ability of closed loop glycemic control device to maintain the blood glucose concentration in ICU patients. (Closed-loop方式血糖管理装置のICU患者における血糖値管理の能力評価)	48
甲総医博第7号	NGATU NLANDU	Anti-inflammatory Effects of Sacran, a Novel Polysaccharide from Aphanothece sacrum, on 2,4,6-Trinitrochlorobenzene-induced Allergic Dermatitis in vivo. 2,4,6-トリニトロクロロベンゼンで誘導されたアレルギー性皮膚炎マウスに対するAphanothece sacrumから抽出された新規の多糖類「サクラン」の抗炎症効果	53

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第16号	駄場中 研	PKIB expression strongly correlated with phosphorylated Akt expression in the breast cancers and also with triple negative breast cancer subtype (乳癌における cAMP 依存性蛋白酵素阻害βの発現は、リン酸化 Akt 発現およびトリプルネガティブタイプの乳癌と有意に相関する)	59
乙総医博第17号	古宮 淳一	Effects of Ethanol Exposure on Spatial Learning in Mice During Synaptogenesis (シナプス形成期のエタノール曝露がマウスの空間学習能に及ぼす影響)	64
乙総医博第18号	古野 貴志	Effects of various doses of aspirin on platelet ctivity and endothelial function (アスピリン用量変化が血小板活性および血管内皮機能におよぼす影響)	69
乙総医博第19号	濱川 公祐	Abdominal visceral fat thickness measured by ultrasonography predicts the presence and severity of coronary artery disease (超音波法で測定した腹部内臓脂肪厚は冠動脈疾患の有無や重症度を予測する)	74

氏名(本籍)	増田 弘誠(香川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第136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24年2月29日
学位論文題目	Usefulness of Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of nonalcoholic fatty liver disease (非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患活動性を評価するためのテクネチウム-99m標識2-メトキシイソブチルイソニトリル肝シンチグラフィの有用性)
発表誌名	Hepatology Research (in press)

審査委員 主査 教授 麻生 悌二郎

副査 教授 本家 孝一

副査 教授 花崎 和弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 増田 弘誠

論文題目

Usefulness of Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of nonalcoholic fatty liver disease (非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患活動性を評価するためのテクネチウム-99m 標識 2-メトキシイソブチルイソニトリル肝シンチグラフィの有用性)

(論文要旨)

(背景) 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、メタボリック症候群の肝における表現型と考えられ、単純脂肪肝から NASH までの広い範囲を網羅している。非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は NAFLD の進行した病態で、肝硬変や肝癌へ進展し得ると理解されている。したがって、NAFLD の中から NASH を鑑別することは重要であるが、肝生検以外の非観血的手法での両者の鑑別は容易でない。また、肝のミトコンドリア障害は NASH の発症要因として指摘され、単純脂肪肝は NASH に比べて、ミトコンドリア障害は軽微であると報告されているが、その障害を検出する方法は確立していない。さらに近年、NASH/NAFLD 患者の長期予後において、肝関連疾患よりも、心血管疾患が主要な死因としての頻度が高いことが注目されている。したがって、現在 NAFLD 患者において、心血管疾患と NASH の両者の存在を非侵襲的に診断する方法が必要とされている。

Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile (99mTc-MIBI) を用いた心筋シンチグラフィにおいて、負荷時での撮影は非侵襲的に心筋虚血を評価する方法として循環器領域で確立している。また、安静時での撮影においても、心筋や骨格筋でのミトコンドリア障害を検出する方法として、その有用性が報告されている。したがって、99mTc-MIBI 肝シンチグラフィが NASH 肝におけるミトコンドリア障害を検出し得るかを検討することは、臨床的意義があると考えられる。

(対象と方法) 当科にて肝生検を施行し、心・肺疾患のない NAFLD 患者 26 名を対象にした。NAFLD 患者の肝生検組織を NASH Clinical Research Network が提唱する NAFLD Activity Score (NAS) に基づいて、NASH、borderline-NASH、non-NASH (単純脂肪肝) に区別した。99mTc-MIBI シンチグラフィは、安静時に 600MBq の 99mTc-MIBI を肘静脈から急速静脈投与し、投与 10 分後の前面プラナー像を撮影した。肝臓集積を評価するために、前面プラナー像において肝臓の関心領域 (ROI) は肝生検施行した部位に一致させるために肝右葉上部に置き、対照としての心臓集積の ROI は、肝左葉の放射活性の影響を避けるために前側壁に置いた。我々は肝臓への 99mTc-MIBI 取り込みの指標として肝臓/心臓集積比 (L/H) を算出し、L/H と患者の臨床所見、生検肝組織所見との

関連を検討した。

(結果) 99mTc-MIBI 前面プラナー像において、NASH 群は non-NASH 群に比べて、視覚的に 99mTc-MIBI の著名な肝集積低下を認めた。肝集積の指標である L/H において、NASH 群と borderline NASH 群の L/H は non-NASH 群に比して、それぞれ有意に低値であった ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。さらに全 26 名 NAFLD 患者の検討では、NAS と L/H は有意な逆相関を示した ($r = -0.413$, $p < 0.05$)。線維化に関しては、線維化のない F0 ステージ群は F2 ステージ群に比べて有意に L/H が高値であった ($P < 0.05$)。しかし、F0 ステージ群は F2 ステージ群に比べて、NAS が有意に低値であった ($p < 0.01$)。




(考察)

今回の研究は NAFLD 患者において、99mTc-MIBI 肝集積と NAFLD の病理組織像を比較した世界で初めての報告である。99mTc-MIBI の肝での細胞内動態の詳細は明らかにされていないが、心筋においては、受動拡散によって細胞内に取り込まれた MIBI の約 90% がミトコンドリア分画に集積する。NASH 患者における 99mTc-MIBI 肝集積は単純脂肪肝に比して有意に低下していたことは、肝のミトコンドリア障害が 99mTc-MIBI 肝集積低下に寄与することを示唆した。また、NAFLD の疾患活動性と 99mTc-MIBI 肝集積が有意な逆相関を示したことから、疾患活動性の増加に伴って肝のミトコンドリア障害が進行する可能性が示唆された。

(結論)

99mTc-MIBI 肝シンチグラフィは、肝のミトコンドリア障害を検出するのに有用であるとともに、NAFLD 患者の中から NASH 患者を鑑別する非侵襲的検査として有用である可能性が示唆された。また、心筋虚血の診断方法として確立している 99mTc-MIBI 負荷心筋シンチグラフィと組み合わせることによって、NAFLD 患者において、心血管疾患と NASH の両方の存在を、一連の検査として、非侵襲的に診断し得る可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	増 田 弘 誠
審 査 委 員	主 査 氏 名	麻 生 悌 二 郎 
	副 査 氏 名	本 家 孝 一 
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘 

題 目 Usefulness of Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of nonalcoholic fatty liver disease
 (非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患活動性を評価するためのテクネチウム-99m 標識 2-メトキシイソブチルイソニトリル肝シンチグラフィの有用性)

著 者 Kosei Masuda, Masafumi Ono, Mitsutaka Fukumoto, Akira Hirose, Kensuke Munekage, Tsunehiro Ochi, Nobuto Okamoto, Naoki Akagi, Yasuhiro Ogawa, Toshiji Saibara

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Hepatology Research (In press)

要 旨

【背景・目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患は、肝細胞に中性脂肪が過剰に蓄積した状態の肝障害の総称であり、単純性脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) までの広い範囲を包含する。非アルコール性脂肪性肝疾患の中でも NASH は肝硬変や肝癌に進展し得る予後不良な病態であることから、その鑑別が重要であるが、現状では肝生検が唯一の方法であり、非侵襲的な診断法は確立されていない。また、最近肝細胞のミトコンドリア障害が NASH の発症要因としてクローズアップされ、健常者や単純性脂肪肝の肝細胞では異常がほとんどみられないことからその検出が鑑別診断に有用である可能性が指摘されているが未だ確立した方法は開発されていない。

心筋血流シンチグラフィは心血管疾患の診断のために汎用されている非侵襲的検

査法の1つである。 ^{99m}Tc -2-メキシイノブチルイソニトリル(^{99m}Tc -MIBI)は同検査用に関発された試薬であり、細胞内に受動拡散により取り込まれた後、約 90%がミトコンドリア分画に集積する。そのため、同試薬の組織への取り込みと保持はミトコンドリア機能を反映するとされ、現在では同試薬を用いたシンチグラフィが心筋や骨格筋におけるミトコンドリア障害の検出に利用されている。

そこで、申請者らは、 ^{99m}Tc -MIBI シンチグラフィの非アルコール性脂肪性肝疾患の鑑別診断、とりわけ単純性脂肪肝と NASH との鑑別における有用について検討を行った。

【対象と方法】

本学消化器内科学教室にて肝生検を実施し、心肺疾患のない非アルコール性脂肪性肝疾患患者 26 名を対象とした。同疾患の活動性スコアを基に分類(脂肪沈着を 0-3 点、実質の細胞浸潤を 0-3 点、肝細胞腫大を 0-2 点と点数化して、それらの合計が 2 点以下を単純性脂肪肝、3 ないし 4 点を borderline-NASH、5 点以上を NASH と診断する)した結果、内訳は単純性脂肪肝 4 名、borderline-NASH 11 名、NASH 11 名である。 ^{99m}Tc -MIBI シンチグラフィは、安静時に 600 MBq の ^{99m}Tc -MIBI を静注し投与 10 分後の前面プランナー像を撮影した。肝臓への ^{99m}Tc -MIBI の取り込みの指標としては、肝臓/心臓集積比(L/H 比)を算出して用いた。

【結果】

(1)NASH 群では単純性脂肪肝群に比べて視覚的にも ^{99m}Tc -MIBI の肝への集積の低下を認めた。各群の L/H 比の比較では、単純性脂肪肝群の平均値が 2.07 であるのに対して、NASH 群と borderline-NASH 群はそれぞれ 1.42、1.56 と有意な低値を示した。

(2)次に、L/H 比と非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患活動性との関連について検討した。その結果、今回の 26 症例の解析では、L/H 比が同疾患の活動性スコアの合計値と有意な逆相関を示すことが明らかとなった。

(3)最後に、L/H 比と肝の線維化の有無との関連について検討したが、線維化を伴わない F0 ステージ群の L/H 比の平均値は 2.0 であり、線維化の進んだ F2 ステージ群の 1.43 に比して有意に高値であった。しかし、F0 ステージ群の疾患活動性スコアが F2 ステージ群に比して有意に低値であることが判明し、疾患活動性の影響が考えられたため、両者の関連については明確な結論を下すことはできなかった。

【考察・まとめ】

^{99m}Tc -MIBI の肝臓における細胞内動態の詳細は明らかでないが、非アルコール性脂肪性肝疾患の活動性と同試薬の肝への集積が逆相関を示すという本研究の結果から、肝臓においてもミトコンドリアの機能障害が同試薬の集積低下に寄与すること、さらには、

疾患活動性の増加に伴いミトコンドリア障害が進行する可能性が示唆された。

本論文は、肝生検を施行された非アルコール性脂肪性肝疾患患者に非侵襲的検査である ^{99m}Tc -MIBI シンチグラフィを適用し、同法が非アルコール性脂肪性肝疾患の活動性の評価ならびに単純性脂肪肝とNASHとの鑑別に有用であり、肝生検に代用し得る検査法である可能性を世界で初めて示したものであり、医学的に高い価値を有すると認められた。今後、同法がNASHの治療効果の判定にも適用され、その有用性が拡大していくことが期待される。

以上により、本論文は高知大学博士(医学)の学位授与に値すると審査員全員一致で評価した。

氏名(本籍)	大崎 丈二 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第137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24年2月29日
学位論文題目	The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody (マウス前脳の生後発達期における Sez-6 蛋白質の局在は Sez-6 蛋白質の多機能を示唆する: 新しい抗体を用いての解析)
発表誌名	Brain Research 1386:58-69, 2011年4月

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	井上	新平

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 大崎 丈二

論文題目

The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody.

マウス前脳の生後発達期における Sez-6 蛋白質の局在は Sez-6 蛋白質の多機能を示唆する：新しい抗体を用いての解析

(論文要旨)

<緒言> Seizure related gene 6(Sez-6)は、ニューロンの膜貫通蛋白質をコードする遺伝子であり、痙攣薬(Pentylentetrazole)投与後に大脳皮質に mRNA が上昇する遺伝子として同定された。Sez-6 mRNA はマウスの胎児では脳の皮質下領域に強く発現し、成体では梨状皮質、嗅結節、海馬に強く、大脳皮質 II 層、V 層、VI 層、線条体に中程度に検出されている。また、Sez-6 遺伝子欠損マウスは行動テストにおいて記憶力、認知機能および協調運動の低下、不安レベルの減少を示すことが報告された。このような胎児と成体脳の Sez-6 mRNA 発現パターンの相違から前脳の発達とそれに伴う認知機能における Sez-6 蛋白質の関与が示唆された。今回の研究では、Sez-6 蛋白質に対する新たな抗体を作製し、前脳の生後発達段階における Sez-6 蛋白質の局在について免疫組織化学法を用いて解析した。

<方法> 抗体は細胞外ドメイン(分子量97.8kDa)の組み替えSez-6蛋白質をウサギに免疫して作製した。抗Sez-6 IgGはProtein A セファロースカラムとアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。免疫組織化学法には、生後0日、3日、7日、10日、20日、10ヶ月齢のC57BL/6マウス63匹を用いた。マウスをTribromoethanolで麻酔し、ホルマリン溶液による灌流固定を行った。脳を摘出し、厚さ22 μ mの切片を作製し免疫組織化学法を行った。内因性ペルオキシダーゼ阻害を3%過酸化水素水と40%メタノールで行い、抗Sez-6抗体(1:1000)を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させ、ヤギ抗ウサギIgGでビオチン標識を行いABC complexで反応させ、1% Diaminobenzidinと0.01%過酸化水素水で5分間発色させた。Sez-6免

疫陽性シグナルの強度はMacScope image analysis systemを用い、 $50 \times 50 \mu m^2$ の面積で左右対称域を測定し半定量解析を行った。Sez-6免疫陽性シグナルの強度の比較は成体の海馬CA1領域を100とし、75以下を弱、75-125を中、125以上を強とした。




<結果> Sez-6免疫陽性シグナルは生後0日から10ヶ月齢までのそれぞれの発達段階の前脳における大脳皮質、梨状皮質、嗅結節、尾状核・被殻(線条体)、扁桃体、海馬に検出された。半定量解析によりSez-6免疫陽性シグナルの強度の変化は以下の3パターンに分類された。

- i) 大脳皮質、梨状皮質、扁桃体、海馬において、Sez-6免疫陽性シグナルは生後0日に中程度で、その後徐々に減弱した。
- ii) 線条体において、Sez-6免疫陽性シグナルは生後0日には検出されなかったが、生後10日で検出され、シグナルの強度は10ヶ月齢に向かって徐々に増加した。
- iii) 嗅結節において、生後0日から生後10ヶ月齢まで中程度あるいは強いSez-6免疫陽性シグナルが検出された。

さらに、Sez-6免疫陽性シグナルは新生児の海馬および皮質の錐体ニューロンの細胞体および樹状突起に観察されたが、生後10日では細胞体のみを観察された。

<考察> 哺乳動物システムを用いたこれまでの抗体と違い、抗原として短期間で十分な量を産生、精製できるバクテリアシステムで作製した我々の抗Sez-6抗体はマウス脳において特異的にSez-6蛋白質を検出した。Sez-6蛋白質は、成体の大脳皮質、梨状皮質、嗅結節、線条体、扁桃体、海馬に観察された。これらのSez-6蛋白質の局在は、過去に報告されているSez-6 mRNAの局在と一致していたことから、Sez-6蛋白質の発現は転写レベルで調節されていると考えられる。また、Sez-6免疫陽性シグナルは線条体では、生後10日から検出された。線条体では生後9日に樹状突起の分枝が起こることがわかっており、Sez-6蛋白質がこの部位の樹状突起の分枝に関与している可能性がある。大脳皮質、海馬などでは生後からSez-6蛋白質は減少し、嗅結節では生後から成体までSez-6蛋白質が認められ、さらに大脳皮質、海馬では細胞内局在の変化が観察された。このようなSez-6蛋白質の時空間的变化は前脳の生後の発達におけるSez-6蛋白質の多様な機能を示唆するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	大 崎 丈 二
審 査 委 員	主 査 氏 名 梶 秀 人	
	副 査 氏 名 横 谷 邦 彦	
	副 査 氏 名 井 上 新 平	

題 目 The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody
 (マウス前脳の生後発達期における Sez-6 蛋白質の局在は Sez-6 蛋白質の多機能を示唆する：新しい抗体を用いての解析)

著 者 George Osaki, Shinichi Mitsui, Kazunari Yuri

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Brain Research, 1386:58-69, 2011年4月

要 旨

Seizure-related gene-6 (*Sez-6*)は、痙攣誘発薬 pentylenetetrazole の投与により大脳皮質にその発現量が増大する遺伝子として同定された。*Sez-6* タンパク質には2つの膜タンパク型 (type 1, 2) と1つの分泌タンパク型 (type 3) の3種類のアイソフォームが存在する。膜タンパク型は複数のドメインからなり、C末端側に細胞膜結合ドメインを有している。分泌型にはC末端側が欠落している。*Sez-6* mRNA は脳に特異的に発現し、マウスの胎仔では皮質下領域に強く発現しているのに対し、成体では梨状皮質、嗅結節、海馬に強く、大脳皮質、線条体に中程度に発現しているとの報告がある。また、*Sez-6* 遺伝子欠損マウスの解析から、*Sez-6* タンパク質は長期記憶や認知機能、協調運動などに関わるとの報告もある。こうした胎仔と成体脳における *Sez-6* mRNA 発現パターンの相違等から *Sez-6* タンパク質は前脳の発達とそれに伴う認知機能に関わることが示唆されるが、不明な点が多い。

そこで申請者らは、*Sez-6* タンパク質に対する新たな抗体を作製し、前脳の生後発達段階における *Sez-6* タンパク質の局在について免疫組織化学法を用いて解析した。

具体的には、バクテリアシステムを用いて作製した細胞外ドメイン (分子量 97.8 kDa) の組換え Sez-6 タンパク質をウサギに免疫し、抗体を得た。得られた抗体 Sez-6 IgG は Protein A セファロースカラムとアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。生後 0 日、3 日、7 日、14 日、21 日、10 ヶ月齢のマウスから脳切片を作製し免疫組織化学を行った。

得られた成績を纏めると次のようになる。

1) 発達段階の前脳における Sez-6 免疫陽性シグナルの強度の変化は以下の 3 つのパターンに分類された。

- i) 大脳皮質、梨状皮質、扁桃核、海馬において、シグナルは生後 0 日に中程度で、その後徐々に減弱した。
- ii) 線条体において、シグナルは生後 0 日には検出されなかったが、生後 10 日で検出され、10 ヶ月齢に向けて徐々に増加した。
- iii) 嗅結節において、生後 0 日から生後 10 ヶ月齢まで中程度あるいは強いシグナルが検出された。

2) Sez-6 免疫陽性シグナルは新生仔の海馬および大脳皮質の錐体ニューロンの細胞体および樹状突起に観察されたが、生後 10 日では細胞体のみを観察された。

また、以下の点などについて考察している。

1) 哺乳動物システムを用いて作製された既報の抗体が数個のタンパク質を検出したのに対して、今回作製された抗 Sez-6 抗体は 160 kDa と 190 kDa のタンパク質を検出したことから、今回作製した抗体の方が Sez-6 タンパク質に対する特異性が高いと考えられる。

2) Sez-6 タンパク質の局在は、既報の Sez-6 mRNA の局在と一致していることから、Sez-6 タンパク質の発現は転写レベルで調節されている。

3) 線条体での Sez-6 免疫陽性シグナルの発現時期が樹状突起の分枝が起こる時期と一致していることから、Sez-6 タンパク質は樹状突起の分枝に関与し得る。

4) Sez-6 タンパク質の時空間的变化は前脳の生後の発達における Sez-6 タンパク質の多様な機能を示唆している。

以上のように、本論文は前脳の生後発達段階における Sez-6 タンパク質の局在を明らかにし、神経科学の発展に寄与しうる基礎研究データを提示した。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に値する内容を含むものと判断した。

氏名(本籍)	姜 松林 (Songlin Jiang) (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第138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24年2月29日
学位論文題目	A proteomics approach to the cell surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction (酵素触媒ラジカル発生反応を用いる細胞表面インターラクトームへのプロテオミクスによるアプローチ)
発表誌名	Proteomics (in press)

審査委員	主査	教授	谷口	武利
	副査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	横谷	邦彦

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 姜 松林

論文題目 A proteomics approach to the cell surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction
(酵素触媒ラジカル発生反応を用いる細胞表面インターラク
トームへのプロテオミクスによるアプローチ)

(論文要旨)

シグナル伝達、細胞接着、タンパク輸送など細胞膜上での生物学イベントには、レセプター、接着分子、シグナル分子との間の相互作用が必要とされる。したがって、重大な生物学的効果を生み出すのに細胞膜上でどの分子とどの分子が相互作用するかを知ることは重要である。このような分子相互作用の全体セットを“分子インターラクトーム”と呼ぶ。分子インターラクトームの調査研究は、最近の分子細胞生物学で注目される研究領域のひとつである。

細胞表面分子相互作用分析に関しては、いくつかの手法が報告されている。共免疫沈降は、標的分子の静態複合体同定のための一般的な手法である。この方法は単純、簡単であるが、サンプル調製時にアーティファクトがしばしば起こる。複合体が生体内で実際に構成されていることを保証するためには、生きてる状態での化学的クロスリンクが必要とされる。蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いた形態学的可視化により、信頼性高く、異なる分子の共局在が直接観察されるが、それらの実験を実施する前に、会合するすべての候補分子を知らなければならない。

最近、著者が所属する研究室で、生きて細胞条件下で、細胞表面分子間相互作用を調べる方法を開発し、酵素触媒ラジカル発生 (EMARS) 反応と命名した。この方法は、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) によるラジカル試薬の活性化を特徴とする。EMARS 反応により生じたラジカルは、HRP から限られた距離内の (だいたい 200~300nm) 分子を攻撃し、共有結合する。したがって、細胞表面で HRP を結合させた標的分子の近傍に存在する分子のみが標識される。




開発当初、EMARS 反応産物は、抗体アレイシステムを用いて同定していた。抗体アレイシステムは非常に感度がよく、分子同定が簡単ではあるが、抗体アレイには限られた数の抗体しかコートされていない。EMARS 反応を、広く細胞表面分子間相互作用の研究に応用するために、標識された分子の同定は、質量分析を用いるプロテオミクスのように網羅的な方法が必要である。そこで、本研究では、EMARS 反応産物をプロテオミクスで同定する方法の開発を目的とした。

本研究の目的に合うように、新しい標識試薬のアリールアジド-フルオレセインを合成した。従来使用していたアリールアジド-ビオチンは、細胞膜を透過して内在性酵素により活性化され、細胞内タンパクを標識してしまうので、HRP による標識タンパク質と区別できない欠点があった。

アリールアジド-フルオレセインを用いることでこの問題は大幅に改良された。さらに、フルオレセインで標識されたタンパク質は、蛍光イメージ分析器を用いて電気泳動ゲル内で直接確認することができる利点もある。コレラ毒素 B サブユニットは、脂質ラフトに局在するガングリオシド GM1 と特異的に結合する。HeLa S3 細胞の細胞表面に局在する GM1 に HRP-結合コレラ毒素 B サブユニットを結合させた後、EMARS 反応を行い GM1 と会合している分子を標識した。標識タンパク質を抗フルオレセイン抗体を固相化した樹脂を用いた免疫親和性クロマトグラフィーにより、精製、濃縮した。精製されたタンパク質は、トリプシンで消化後、ナノ液体クロマトグラフィーで分離して、MALDI-TOF/TOF 質量分析に供した。この結果、膜タンパク質と分泌タンパク質を合わせて 30 種類のタンパク質を同定した。

今回示した、酵素触媒ラジカル発生反応を用いる細胞表面インターラクトームへのプロテオミクスによるアプローチは、細胞表面上での様々な生物学イベントでの機能的分子間相互作用研究に応用可能である。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	姜 松 林
審 査 委 員	主 査 氏 名	谷 口 武 利 
	副 査 氏 名	麻 生 悌 二 郎 印 
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦 

題 目 A proteomics approach to the cell surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction
 (酵素触媒ラジカル発生反応を用いる細胞表面インターラクトームへのプロテオミクスによるアプローチ)

著 者 Songlin Jiang, Norihiro Kotani, Tomoko Ohnishi, Arisa Miyagawa-Yamaguchi, Masayuki Tsuda, Ryusuke Yamashita, Yoshihito Ishiura, Koichi Honke
 (姜松林, 小谷典弘, 大西知子, 宮川 - 山口亜利沙, 津田雅之, 山下竜右, 石浦嘉人, 本家孝一)

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、 年 月
 Proteomics (in press)

要 旨

背景：多細胞生物では、細胞間の情報伝達に細胞膜上に存在するレセプター、接着分子、シグナル分子との間の相互作用が必要とされ、細胞膜上でどの分子とどの分子が相互作用するかを知ることは、情報伝達機序を解明する上で大変重要なデータとなります。細胞表面での分子相互作用を分析するには、従来標的分子に対する特異抗体を用いた共免疫沈降法が標的分子との複合体同定のための一般的な手法でした。しかし、この方法ではサンプル調製時にアーティファクトがしばしば起こる問題点がありました。そこで、著者が所属する研究室で開発された酵素触媒ラジカル発生 (EMARS) 反応法を用いて、標識アリルアザイドを改良し、細胞表面分子に特異的に標識出来るようにし、さらに標識された因子は網羅的に質量分析装置により同定できることを証明した。

研究方法：最近、著者が所属する研究室で、生きた細胞条件下で、細胞表面分子間相互作用を調べる方法を開発した。この酵素触媒ラジカル発生 (EMARS) 反応法は、西洋

わさびペルオキシダーゼ (HRP) による標識アリルアザイドを活性化し、EMARS 反応により生じたラジカルは、HRP から限られた距離内の (だいたい 200-300nm) 分子を攻撃し、共有結合する。したがって、細胞表面で HRP を結合させた標的分子の近傍に存在する分子のみが標識される。従来用いて来たビオチンアリルアザイドは、細胞内へ入り、内在性のペルオキシダーゼにより細胞内因子も標識するため、非特異的標識が問題となっていた。本研究では、この点を改良し、新しい標識試薬のアリルアザイドフルオレセイン (FA) を合成した。この新しく開発したフルオレセイン標識試薬は、細胞内に入るが内在性のペルオキシダーゼによる活性化を受けないため非特異的な標識が非常に低く、さらにフルオレセインで標識されたタンパク質は、蛍光イメージ分析器を用いて電気泳動ゲル内で直接確認することができる利点もある。そこで、今回情報伝達に関与する糖脂質であるガングリオシド GM1 における分子会合複合体の解析をあたらしく開発したフルオレセイン標識試薬を用いて行った。

研究結果：ガングリオシド GM1 と特異的に結合するコレラ毒素 B サブユニットに HRP を結合させ、生きた HeLa S3 細胞の細胞表面に局在する GM1 に HRP-結合コレラ毒素 B サブユニットを結合させた後、EMARS 反応を行い GM1 と会合している分子を標識した。標識タンパク質は抗フルオレセイン抗体を固相化した樹脂を用いた免疫親和性クロマトグラフィーにより、精製、濃縮された。精製されたタンパク質は、トリプシンで消化後、ナノ LC スポッターで分離して、MALDI-TOF/TOF 質量分析により解析した。この結果、膜タンパク質と分泌タンパク質を合わせて 30 種類のタンパク質を同定できた。この 30 種類のタンパク質の中から 3 種のタンパク質、CD44、L1CAM、transferrin R1 を選び、FA 標識されたタンパク質をそれぞれの抗体を使って Western Blot で確認し、三タンパク質すべて確認できた。さらに、細胞を CD44、L1CAM の抗体で蛍光染色し、コレラ毒素と結合する GM1 を別の色で蛍光染色して、両者を重ね合わせ形態学的に GM1 の会合体と一致することを確認している。

今回示した酵素触媒ラジカル発生反応を用いた細胞表面分子会合複合体へのプロテオミクスによるアプローチは、細胞表面上での様々な生物学イベントでの機能的分子間相互作用研究に応用可能であり、様々な受容体を介した情報伝達系の分子機構を解明する上で重要な成果であると判断された。

氏名(本籍)	高田 智也(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第139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24年3月30日
学位論文題目	¹⁸ F-FDG PET/CT is a powerful tool for detecting subclinical arthritis in patients with psoriatic arthritis and/or psoriasis vulgaris (¹⁸ F-FDG PET/CTを用いた乾癬患者における無症候性関節炎の検出)
発表誌名	Journal of Dermatological Science (in press)

審査委員	主査	教授	福島	敦樹
	副査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	谷	俊一

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 高田智也

論 文 題 目

18-FDG PET/CT is a powerful tool for detecting subclinical arthritis in patients with psoriatic arthritis and/or psoriasis vulgaris (18-FDG PET/CT を用いた乾癬患者における無症候性関節炎の検出)

(論文要旨)

はじめに：

乾癬性関節炎 (Psoriatic arthritis: 以下 PsA) は乾癬患者に合併するリウマチ因子陰性の関節炎である。PsA はそのほとんどが尋常性乾癬 (Psoriasis vulgaris: 以下 PsV) からの移行であり、発症頻度は報告により幅があるが乾癬患者全体の 15% 内外とされる。しかし、関節腫脹や圧痛などもない無症候性関節炎の早期発見が困難なため、低く見積もられている可能性もある。PsA は関節痛、また進行すれば関節の変形を伴い、PsV より著しく QOL が低下する。このため、より早期の診断のもとで治療介入が必要である。以前より PsA の無症候性関節炎の検出には、様々な画像検査 (MRI、骨シンチグラフィ、超音波) が試みられてきた。我々は新たに ^{18}F -FDG PET/CT を用いた症候性/無症候性 PsA の検出法を確立し、治療効果の評価についても検討を行った。

方法と結果：

TNF- α 阻害薬を導入予定の PsA (6 例) および PsV 患者 (5 例) に PET/CT 検査を施行した。PsA 患者ではすべての罹患関節が描出された。従来の骨シンチでは炎症部位の詳細な判別は不可能であったのに対し、PET/CT 法では PsA 患者においては脊椎関節症患者同様、FDG の集積が付着部に限局して描出されることが多く、関節リウマチに認められる滑膜炎と鑑別が可能であった。興味深いことに、骨シンチグラフィでは検出できない自覚症状を欠く関節炎も PET/CT では検出できた。さらに、PsV 患者で 5 例中 3 例において PET/CT 法は関節炎が検出できた。これは無症候 PsA、あるいは PsV に合併する一過性関節炎を検出出来たものと解釈した。TNF- α 阻害薬の導入 3 ヶ月後に再度 PET/CT 検査を行い、FDG の集積 (SUVmax) の変化を治療効果として検討した。あわせて皮疹、関節症状の治療効果判定はそれぞれ Psoriasis




Area and Severity Index (PASI) , Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) を用いた。その結果、治療後 PsA 患者の SUVmax は PASI score および DAS28 と相関して減少し、SUVmax は関節炎の病勢評価に有効であると考えた。また PsV 患者に認められた潜在性関節炎の SUVmax も PASI score と相関して減少した。

考察：

TNF- α 阻害薬などの生物学的製剤は PsA の関節症状に対して最も有効な薬剤である。しかし PsA の特徴的な後期病態である骨新生に TNF- α 阻害薬の効果は乏しいとされるため、このような不可逆的な変化を来す前に投与開始すべきである。また、骨びらんが形成される前に TNF- α 阻害薬を投与することで骨新生が予防できると報告されている。このため、最近では PsA においても関節リウマチ同様、迅速な診断のもと window of opportunity といわれる早期の治療介入が推奨されるようになった。我々は PET/CT による画像診断が、関節炎の部位特定に優れるのみならず、PsA および PsV 患者における無症候性関節炎をも検出出来るほど鋭敏であることを見出した。PsA 患者の TNF 阻害薬による治療 3 ヶ月後の SUVmax 値は PASI score および DAS28 と相関して減少しており、関節症状の病勢と治療効果の客観的評価に有用であると考えた。さらに特筆すべきは、TNF 阻害薬によって PsV 患者に認められた潜在性関節炎の SUVmax も PASI score と相関して減少した。これは、PET/CT 画像診断法は PsV 患者の無症候性関節炎の潜在的な病勢の評価にも有用であり、TNF 阻害薬が PsA の移行を未然に防いだ可能性を示唆している。

以上より、PET/CT 画像診断法は乾癬患者における症候性/無症候性関節炎の検出に有用で治療効果の客観的評価にも有用であるのみならず、PsV から PsA への移行を予見でき、これにより早期の治療介入の目安を提供すると考えた。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	高 田 智 也
審 査 委 員	主 査 氏 名	福 島 敦 樹 
	副 査 氏 名	宇 高 恵 子 
	副 査 氏 名	谷 俊 一 

題 目 ¹⁸-FDG PET/CT is a powerful tool for detecting subclinical arthritis in patients with psoriatic arthritis and/or psoriasis vulgaris
 (¹⁸-FDG PET/CT を用いた乾癬患者における無症候性関節炎の検出)

著 者 Tomoya Takata, Yoshinori Taniguchi, Takenao Ohnishi, Shino Kohsaki, Munenobu Nogami, Hideki Nakajima, Yoshitaka Kumon, Yoshio Terada, Yasuhiro Ogawa, Masahito Tarutani and Shigetoshi Sano

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、 年 月
 Journal of Dermatological Science. (in Press)

要 旨

【緒言】 乾癬性関節炎 (Psoriatic arthritis: 以下 PsA) は乾癬患者に合併するリウマチ因子陰性の関節炎である。PsA はそのほとんどが尋常性乾癬 (Psoriasis vulgaris: 以下 PsV) からの移行であり、発症頻度は報告により幅があるが乾癬患者全体の 15%内外とされる。しかし、関節腫脹や圧痛などもない無症候性関節炎の早期発見が困難なため低く見積もられている可能性もある。PsA は関節痛、また進行すれば関節の変形を伴い、PsV より著しく QOL が低下する。このため、より早期の診断のもとで治療介入が必要である。以前より PsA の無症候性関節炎の検出には、様々な画像検査 (MRI, 骨シンチグラフィ, 超音波) が試みられてきた。我々は新た

に¹⁸F-FDG-PET/CTを用いた症候性/無症候性PsAの検出法を確立し、治療効果の評価についても検討を行った。

【方法と結果】TNF- α 阻害薬を導入予定のPsA（9例）およびPsV患者（8例）にPET/CT検査を施行した。PsA患者ではすべての罹患関節が描出された。従来の骨シンチでは炎症部位の詳細な判別は不可能であったのに対し、PET/CT法ではPsA患者においては脊椎関節症患者同様、FDGの集積が付着部に限局して描出されることが多く、関節リウマチに認められる滑膜炎と鑑別が可能であった。興味深いことに、骨シンチグラフィでは検出できない自覚症状を欠く関節炎もPET/CTでは検出できた。さらに、PsV患者で8例中4例においてPET/CT法は関節炎が検出できた。これは無症候PsA、あるいはPsVに合併する一過性関節炎を検出出来たものと解釈した。TNF- α 阻害薬の導入3ヶ月後に再度PET/CT検査を行い、FDGの集積(SUVmax)の変化を治療効果として検討した。あわせて皮疹、関節症状の治療効果判定はそれぞれPsoriasis Area and Severity Index (PASI), Disease Activity Score in 28 joints (DAS28)を用いた。その結果、治療後PsA患者のSUVmaxはPASI scoreおよびDAS28と相関して減少し、SUVmaxは関節炎の病勢評価に有効であると考えた。またPsV患者に認められた潜在性関節炎のSUVmaxもPASI scoreと相関して減少した。

【考察】TNF- α 阻害薬などの生物学的製剤はPsAの関節症状に対して最も有効な薬剤である。しかしPsAの特徴的な後期病態である骨新生にTNF- α 阻害薬の効果は乏しいとされるため、このような不可逆的な変化を来す前に投与開始すべきである。また、骨びらんが形成される前にTNF- α 阻害薬を投与することで骨新生が予防できると報告されている。このため、最近ではPsAにおいても関節リウマチ同様、迅速な診断のもとwindow of opportunityといわれる早期の治療介入が推奨されるようになった。我々はPET/CTによる画像診断が、関節炎の部位特定に優れるのみならず、PsAおよびPsV患者における無症候性関節炎をも検出出来るほど鋭敏であることを見出した。PsA患者のTNF阻害薬による治療3ヶ月後のSUVmax値はPASI scoreおよびDAS28と相関して減少しており、関節症状の病勢と治療効果の客観的評価に有用であると考えた。さらに、TNF阻害薬によってPsV患者に認められた潜在性関節炎のSUVmaxもPASI scoreと相関して減少した。PET/CT画像診断法はPsV患者の無症候性関節炎の潜在的な病勢の評価にも有用であり、TNF阻害薬がPsAの移行を未然に防いだ可能性を示唆している。

以上の結果より、PET/CT画像診断法は乾癬患者における症候性/無症候性関節炎の検出に有用で治療効果の客観的評価にも有用であるのみならず、PsVからPsAへの移行を予見でき、これにより早期の治療介入の目安を提供すると考えた。

氏名(本籍)	庵地 孝嗣 (鹿児島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第1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24年3月23日
学位論文題目	SNRPE is involved in cell proliferation and the progression of high-grade prostate cancer through the regulation of AR expression (SNRPEはARの発現制御を通して前立腺癌の増殖や進展に関与する)
発表誌名	Oncology letters 3号, 264~268, 2012年2月

審査委員	主査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	大畑	雅典
	副査	教授	宇高	恵子

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 庵地 孝嗣

論文題目

SNRPE is involved in cell proliferation and the progression of high-grade prostate cancer through the regulation of AR expression

(SNRPEはARの発現制御を通して前立腺癌の増殖や進展に関与する)




(論文要旨)

high-grade 前立腺癌 (high Gleason score 8-10) は、進行が早く、遠隔転移を来しやすい。また一般に前立腺癌はホルモン療法によく反応するが、high-grade 前立腺癌においてはホルモン療法に対する反応が悪く、短期間で castration resistant を獲得する傾向にある (最終的に患者は死に至る)。我々は進行前立腺癌の治療成績の向上を目的として、Laser Microbeam Microdissection ならびに cDNA マイクロアレイを用いて high-grade 前立腺癌の遺伝子発現解析を行い、新規治療法につながる分子標的の同定を試みた。今回我々は、high-grade 前立腺癌で発現上昇を認める遺伝子の中から SNRPE (Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E) 遺伝子を同定したので報告する。

我々はまず *SNRPE* 遺伝子が high-grade 前立腺癌で高発現していることを RT-PCR で確認した。次に siRNA を用いて *SNRPE* 遺伝子の発現を knockdown すると、著明な前立腺癌細胞の増殖抑制が観察され、逆に *SNRPE* 遺伝子を過剰発現すると前立腺癌細胞の増殖促進が観察された。さらに興味深いことに、我々は SNRPE が AR の発現を制御していることを明らかにした。*SNRPE* 遺伝子の発現を knockdown すると、*AR* (androgen receptor) ならびにその下流遺伝子である *PSA*、*NKX3.1* そして *TMPRSS2* の発現が抑制されることを RT-PCR で確認した。

以上の結果から、SNRPE が AR の発現制御を通して high-grade 前立腺癌の増殖や進展に深く関与していることが考えられ、前立腺癌の新規治療法につながる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	庵 地 孝 嗣
審 査 委 員	主 査 氏 名	麻 生 悌 二 郎 
	副 査 氏 名	大 畑 雅 典 
	副 査 氏 名	宇 高 恵 子 

題 目 SNRPE is involved in cell proliferation and the progression of high-grade prostate cancer through the regulation of AR expression
 (SNRPE は AR の発現制御を通して前立腺癌の増殖や進展に関与する)

著 者 Takashi Anchi, Kenji Tamura, Mutsuo Furihata, Hirofumi Satake, Hatsune Sakoda, Chiaki Kawada, Maiko Kamei, Tsutomu Shimamoto, Hideo Fukuhara, Satoshi Fukata, Shingo Ashida, Takashi Karashima, Ichiro Yamasaki, Masaharu Yasuda, Masayuki Kamada, Keiji Inoue and Taro Shuin

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、 年 月
 Oncology letters、3号、264~268(2012年2月)

要 旨

【背景・目的】

前立腺癌は頻度の高い悪性腫瘍であり、米国ならびにヨーロッパでは男性の癌死の原因の2番目に位置しており、他の先進諸国においても年々増加傾向を示している。前立腺癌においても限局した腫瘍に対しては切除術や放射線療法が有効であるが、30%余の症例では治療後に再発を認める。前立腺癌はその増殖をアンドロゲンに依存するためアンドロゲン除去療法が有効であるが、進行してくるとホルモン不応性を獲得し同治療に抵抗性を示すようになる。また、グリーンソン・スコアが8~10の悪性度の高い前立腺癌は、急速に増殖し遠隔転移を起し易い。しかし、ホルモン不応性ならびに高悪性度の前立腺癌に対しては有効な治療法がほとんどないのが現状である。したがって、前立腺癌進

展の分子メカニズムの解明とそれを基盤にした新規治療法の開発が急務である。

以前本学泌尿器科学教室ではマイクロアレイを用いてホルモン不応性ならびにホルモン感受性前立腺癌の遺伝子発現プロファイルを作成し、ホルモン不応性前立腺癌で特異的に発現増加を認める低分子リボ核タンパク質 E (SNRPE)、アンドロゲン受容体 (AR) 等、合計 36 個の遺伝子を同定し Cancer Research 誌に報告している。今回申請者らは、それらの内最も増加の程度が大きかった SNRPE を選び、同遺伝子産物が前立腺癌治療の新たな分子標的となる可能性について検討を行った。

【対象と方法】

アンドロゲン除去療法施行前のグリーンソン・スコア 8-10 の高悪性度の前立腺癌 13 症例を対象とした。前立腺癌細胞およびコントロールとしての正常前立腺上皮細胞部分は凍結切片から Laser Microbeam Microdissection (LMM)を用いて選択的に採取した。

【結果】

- (1) PSA 高値でグリーンソン・スコアが 8-10 の高悪性度の前立腺癌における SNRPE mRNA の発現を半定量的 RT-PCR 法により解析した結果、13 症例中 11 例において発現の増加を認めることが判明した。
- (2) 前立腺癌における SNRPE 高発現の生物学的意義を明らかにするため SNRPE のノックダウン実験を行った。SNRPE を高発現する前立腺癌細胞株である 22Rv1 細胞に SNRPE に特異的な short hairpin RNA を発現するプラスミドベクターを導入して SNRPE の発現を抑制した結果、コロニー形成と細胞増殖が顕著に阻害されることが明らかとなった。
- (3) SNRPE が癌遺伝子としてはたらく可能性を探るため、22Rv1 細胞に同遺伝子を発現するプラスミドベクターを導入して SNRPE の安定発現細胞株を作製した。次いで、細胞増殖能について検討した結果、コントロール細胞との間で増殖性に有意な差が認められ、SNRPE の過剰発現が前立腺癌細胞の増殖に促進的に作用することが判明した。
- (4) 細胞増殖能に関連した SNRPE の下流遺伝子を探索するため、SNRPE を siRNA によりノックダウンした 22Rv1 細胞ならびに SNRPE を過剰発現する 22Rv1 細胞を用いてマイクロアレイ解析を実施した。その結果、AR 遺伝子の発現がノックダウン細胞ではコントロールに比べて 80%以上低下し、一方、過剰発現細胞ではコントロールに比べて 20%以上増加していることが明らかになった。また、半定量的 RT-PCR 法により、ノックダウン細胞では AR 遺伝子と同遺伝子の下流に存在する PSA、NKX3.1、TMPRSS2 遺伝子等の発現が低下していることが確認された。

【まとめ】

本論文で申請者らは、mRNA 前駆体のスプライシングを制御するスプライソソームの構

成因子の1つ SNRPE が高悪性度の前立腺癌において過剰発現していること、さらには、同因子が AR の発現制御を介して、前立腺癌細胞の増殖およびホルモン不応性の獲得、悪性度の上昇等、病期の進展に主要な役割を演じている可能性を示した。そのメカニズムの詳細については未だ明らかでないが、SNRPE の過剰がスプライソソーム構成の不均衡により AR 遺伝子のスプライシング異常を誘発し、アンドロゲン結合領域を欠損した AR mRNA 等、構成的に活性化した型の splice variants の発現増大を引き起こしている可能性が考えられた。

以上のように本論文は、SNRPE が高悪性度前立腺癌に対する治療の新規標的となり得る可能性を世界で初めて提示したものであり、医学的に高い価値を有すると認められた。したがって、審査員一同は本論文が高知大学博士(医学)の学位を授与に値するものと判断した。

氏名(本籍)	趙立峰 (Li Feng Zhao) (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第2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24年3月23日
学位論文題目	Hormonal Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase Isoenzyme Gene Transcription (アセチル補酵素Aカルボキシル化酵素アイソフォーム遺伝子のホルモンによる調節)
発表誌名	Endocrine Journal, 57 (4), 317-324, 2010年2月

審査委員	主査	教授	高尾	俊弘
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	藤本	新平

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名

趙立峰

論文題目

Hormonal Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase Isoenzyme Gene Transcription

(アセチル補酵素 A カルボキシル化酵素アイソフォーム遺伝子のホルモンによる調節)

(論文要旨)

【目的】

インスリンとグルココルチコイドはいずれも脂肪代謝に対し同化作用を有する。糖質が十分に摂取されると、解糖系の中間代謝産物であるアセチル補酵素 A (アセチル CoA) を材料として脂肪合成が開始されるが、その際アセチル CoA をマロニル CoA に変換するアセチル補酵素 A カルボキシル化酵素 (Acetyl-CoA Carboxylase; ACC) が重要な役割を果たしている。ACC には2つのアイソフォーム (ACC1, ACC2) が存在し、その遺伝子発現はそれぞれ3種類および2種類の異なるプロモーターにより制御されている。今回の研究では、インスリンとグルココルチコイドが各々のプロモーターを介した ACC 遺伝子発現に及ぼす影響を及ぼすかを明らかにしようとした。

【方法】

最初に、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞株において、ACC1 の3種類のプロモーター (PI, PII, PIII)、および ACC2 の2種類のプロモーター (PI, PII) のいずれが機能しているかを、プロモーター特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により評価した。次に、ヒトゲノムより ACC1 遺伝子の3種類のプロモーター、および ACC2 遺伝子の2種類のプロモーターを PCR でクローニングし、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子上流に組み込んだキメラ遺伝子を有するプラズミドを作成した。この系を用いて、インスリン (10 nM) およびグルココルチコイド (デキサメタゾン 100 nM) が各々のプロモーター活性に及ぼす効果を、リポフェクションによる一過性遺伝子導入法を用いた系により評価した。またインスリン作用を仲介する転写因子 SREBP1c, LXR α /RXR α , LXR β /RXR α , ChREBP/Mlx の役割を、各々の発現ベクターを用いた共発現系により解析した。

【結果】

1. HepG2 細胞において、ACC1 PI-PIII, ACC2 PI, PII 全てのプロモーター由来の mRNA 発現が確認された。
2. インスリン (10 nM) は検討したすべてのプロモーターに対し転写誘導作用を示し、その効果は ACC1 PII で最も強力 (7倍以上) であった。グルココルチコイドも同様の効果を示し、ACC2




PI で最も顕著(約6倍)であった。両刺激の共存下では、ACC1 PI, ACC2 PI プロモーターにおいて 48 時間までの範囲で相加効果を認めたが、ACC1 PII および ACC2PII プロモーターではグルコシルチコイドがインスリン作用に対し抑制的に作用した。

3. インスリン関連転写因子のうち、SREBP1c はすべてのプロモーターに対し有意の転写促進作用を示した。一方 LXR α /RXR α は ACC1 PII 特異的に、また ChREBP/Mlx は軽微ながら ACC1 PI 特異的な転写誘導効果を呈した。LXR β /RXR α の効果は認められなかった。

【考察】

ACC は脂肪酸合成の最初の調節段階に位置している。今回の検討により、インスリンにより活性化される転写因子 SREBP1c の共発現が ACC1, ACC2 遺伝子のすべてのプロモーター活性を増強したことから、SREBP1c は脂肪酸合成のマスターレギュレーターとして、ACC の転写調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。一方インスリンで発現が誘導される転写因子 LXR α は、特定のプロモーター (ACC1 PII) を介して同様に脂肪酸合成に関与しているものと考えられた。グルコシルチコイドはインスリンと同様に、ACC1, ACC2 遺伝子すべてのプロモーター活性に促進的な作用を示し、本ホルモンが糖・脂質代謝に対し同化ホルモンとしての役割を有するとする従来の考え方に矛盾しない結果であった。なお少なくとも今回の実験系で検討した限りでは、ACC1, ACC2 遺伝子発現調節における ChREBP および LXR β の役割は少ないものと推察された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	趙 立 峰
審 査 委 員	主 査 氏 名 高 尾 俊 弘	
	副 査 氏 名 椛 秀 人	
	副 査 氏 名 藤 本 新 平	

題 目 Hormonal Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase Isoenzyme Gene Transcription
 (アセチル補酵素 A カルボキシル化酵素アイソフォーム遺伝子のホルモンによる調節)

著 者 LI FENG ZHAO, YASUMASA IWASAKI, WANG ZHE, MITSURU NISHIYAMA, TAKAFUMI TAGUCHI,
 MAKOTO TSUGITA, MACHIKO KAMBAYASHI, KOZO HASHIMOTO AND YOSHIO TERADA

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Endocrine Journal, 57 (4), 317-324

要 旨

【背景・目的】

摂食時にはグルコースが解糖により脂肪酸合成に利用され脂肪酸として蓄えられる。糖質が十分に摂取されると、細胞質においてアセチル補酵素 A (アセチル CoA) は活性化されたアセチル補酵素 A カルボキシル化酵素 (Acetyl-CoA Carboxylase; 以下 ACC) によりマロニル-CoA となり、パルミチン酸などの脂肪酸に合成される。その際 ACC が重要な役割を果たしているが、ACC には2つのアイソフォーム (ACC1, ACC2) が存在し、その遺伝子発現はそれぞれ3種類および2種類の異なるプロモーターにより制御されている。

一方、インスリンとグルココルチコイドはいずれも脂肪代謝に対し同化作用を有しており、申請者らは、インスリンとグルココルチコイドが各々のプロモーターを介した ACC 遺伝子発現に及ぼす影響を及ぼすかを明らかにしようとした。

【方法】

最初に、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞株において、ACC1 の3種類のプロモーター (PI, PII, PIII)、および ACC2 の2種類のプロモーター (PI, PII) のいずれが機能しているかを、プロモーター特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により評価した。次に、ヒトゲノムより ACC1 遺伝子の3種類のプロモーター、およ

び ACC2 遺伝子の2種類のプロモーターを PCR でクローニングし、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子の上流に組み込んだキメラ遺伝子を有するプラズミドを作成した。この系を用いて、インスリン (10 nM) およびグルココルチコイド (デキサメタゾン 100 nM) が各々のプロモーター活性に及ぼす効果を、リポフェクションによる一過性遺伝子導入法を用いた系により評価した。またインスリン作用を仲介する転写因子 SREBP1c, LXR α /RXR α , LXR β /RXR α , ChREBP/Mlx の役割を、各々の発現ベクターを用いた共発現系により解析した。

【結果】

1. HepG2細胞において、ACC1 PI-PIII, ACC2 PI, PII 全てのプロモーター由来の mRNA 発現が確認された。
2. インスリン (10 nM) は検討したすべてのプロモーターに対し転写誘導作用を示し、その効果は ACC1 PII で最も強力であった。グルココルチコイドも同様の効果を示し、ACC2 PI で最も顕著であった。両刺激の共存下では、ACC1 PI, ACC2 PI プロモーターにおいて 48 時間までの範囲で相加効果を認めたと、ACC1 PII および ACC2PII プロモーターではグルココルチコイドがインスリン作用に対し抑制的に作用した。
3. インスリン関連転写因子のうち、SREBP1c はすべてのプロモーターに対し有意の転写促進作用を示した。一方 LXR α /RXR α は ACC1 PII 特異的に、また ChREBP/Mlx は軽微ながら ACC1 PI 特異的な転写誘導効果を呈した。LXR β /RXR α の効果は認められなかった。

以上よりインスリンにより活性化される転写因子 SREBP1c の共発現が ACC1, ACC2 遺伝子のすべてのプロモーター活性を増強したことから、SREBP1c は脂肪酸合成のマスターレギュレーターとして、ACC の転写調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。一方インスリンで発現が誘導される転写因子 LXR α は、特定のプロモーター (ACC1 PII) を介して同様に脂肪酸合成に関与しているものと考えられた。グルココルチコイドはインスリンと同様に、ACC1, ACC2 遺伝子すべてのプロモーター活性に促進的な作用を示し、本ホルモンが糖・脂質代謝に対し同化ホルモンとしての役割を有するとする従来の考え方に矛盾しない結果であった。

本論文では、インスリン/グルココルチコイド過剰が少なくとも一部は ACC1, ACC2 遺伝子を介して中性脂肪の蓄積を引き起した可能性を示したものといえ、本研究の発展によりACCの抑制が肥満、メタボリックシンドロームの改善に繋がる可能性がある。よって、本論文は、高知大学博士(医学)に値すると判断した。

氏名(本籍)	常風 興平(和歌山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第3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24年3月23日
学位論文題目	Metabolomics study on the biochemical profiles of odor elements in urine of human with bladder cancer (膀胱がん患者の尿臭気のメタボロミクス解析)
発表誌名	Biological and Pharmaceutical Bulletin Vol.35(4), 2012年4月1日掲載予定

審査委員	主査	教授	梶	秀人
	副査	教授	小林	道也
	副査	教授	寺田	典生

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 常風 興平

論文題目

Metabolomic study on the biochemical profiles following
odor elements in urine of human with bladder cancer
(膀胱がん患者の尿臭気の Metabolomics 解析)

(論文要旨)

【目的】わが国において、現在、膀胱がんは、毎年1万6千人の罹患を認める。膀胱がんの約70%は、がん浸潤が筋層にまでは至らない表在性がんである。その標準療法である経尿道的膀胱腫瘍切除術により、膀胱温存が可能で生命予後も良好であるが、術後、膀胱内再発が高率である。また、がん浸潤が筋層にまで至る浸潤性がんが発見された場合には、標準療法として膀胱全摘術およびそれに伴う尿路変更が余儀なくされるため、QOLの低下が重要な問題となる。そのため、他のがんと同様に膀胱がんにおいても早期発見が、重要である。このため、膀胱がんの診療においては、膀胱内再発を念頭に置いた定期的な検査が必要であり、患者に負担のない方法での検査・診断が求められているが、現状では侵襲性の高い膀胱内視鏡検査や画像診断が行われている。膀胱がんスクリーニングに関して、これまでに犬が尿臭気より膀胱がんが識別出来る可能性があることが報告されている。また、犬の鋭敏な嗅覚をがんのスクリーニングに利用し、乳がんや肺がんの患者の呼気の臭気より識別できたという報告もある。これらのことから、特に膀胱がんにおいては、がん細胞の発生及び増殖により、直接的に膀胱内の尿の臭気に変化することが予想される。しかしながら、犬ががんを特定した臭気物質については、同定されておらず、不明のままである。そのため、尿の臭気による膀胱がんの判別は科学的根拠が乏しいのが現状である。当教室では、これまでに、肝障害モデル動物から採取した尿中の代謝物を Metabolomics 解析し、生薬製剤服用後の代謝物の解析及び肝障害の診断・治療への応用について報告している。そこで、著者らは、膀胱がん患者の尿臭気を Metabolomics 解析することにより、膀胱がんの早期診断の確立に向けて有益な知見を得たので報告する。




【方法】対象者は膀胱内視鏡検査により膀胱がんと確定診断され、膀胱全摘術または経尿道的膀胱腫瘍切除術を受けた患者9名とした。手術前及び手術後に自己採尿により早朝尿を採取した。手術後の尿は肉眼的に血尿が認められなくなった後に採取を行った。別途、コントロール群として健常人7名から早朝尿を採取した。採取した尿から20mL

をガス捕集用サンプルバックに移し、15分間臭気を充満させた後、北川式ガス収集器を用いて、尿の脂肪酸分画の臭気を NeedlEx[®] (SHINWA CHEMICAL INDUSTRIES, LTE.)に濃縮採取し、測定用サンプルとした。各測定用サンプルについて GC/MS(QP5050A, Shimadzu)を用いてピーク分析を行った。得られたピークの Retention time と Fragment pattern を基に、含有する成分を NIST Mass Spectral Database (v 1.7)を用いて解析・同定した。測定用サンプル毎に、同定したピークの Mass total ion Current の Intensity を用いて Principal Component (PC)分析を行い、two-dimensional (PC1 vs. PC2) mapping を行い、患者群とコントロール群のスコアプロットにおける乖離性を検討した。また、実臨床において最も非侵襲的な膀胱がんスクリーニングとして用いられる尿細胞診と対比し、本解析法の有用性を評価した。なお、今回の研究は、高知大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

【結果・考察】GC/MS 解析の結果、①(S)-2-Hydroxypropanoic acid,②Dihydrogen dioxide,③Nonanoyl chloride,④Dodecanal,⑤(Z)-2-Nonenal,⑥4, 5-Dimethyl-3(2H)-isoxazolone,⑦(Z)-2-Decenal,⑧Trichloroacetic acid 3-tridecyl ester,⑨Pentanoic acid 4-methyl-1-buten-1-yl ester,⑩Diethyl phthalate,⑪Pentadecanoic acid,⑫1, 2-Benzenedicarboxylic acid butyldecyl ester の12個のPeak化合物を臭気由来成分として同定した。同定ピークを用いたPC分析の結果、患者群における9例中7例の手術前サンプルのスコアプロットは、PC1 0.14~0.54, PC2 -0.30~0.23 (average)の領域に分布し、一方、コントロール群のスコアプロットはPC1 -0.34~-0.21, PC2 -0.075~-0.008 (average)の領域に分布しており、患者群とコントロール群のスコアプロットと間に大きな乖離が認められた。また、今回、対象とした患者群における実臨床の尿細胞診結果では、9例中5例が膀胱がんとしてスクリーニングされており、尿臭気 Metabolomics 解析結果と考え併せると、Metabolomics 解析は、尿細胞診に比べ、膀胱がんスクリーニングにおいて優位性が示された。さらに、患者群の手術後のスコアプロットは、手術前のスコアプロットに比べ、コントロール群のスコアプロットに近似する傾向が認められた。このことより、尿臭気 Metabolomics 解析は、患者の予後観察等にも有用であると考えられる。さらに、検出した12の化合物の中で、② Dihydrogen dioxide, ③ Nonanoyl chloride, ④ Dodecanal, ⑤ (Z)-2-nonenal, ⑥ 5-dimethyl-3(2H)- isoxazolone の5つの化合物は、コントロール群から検出されず、膀胱がん患者からのみ検出されており、バイオマーカーとなる可能性があると考えた。今後、さらに検討を重ね、尿臭気中の膀胱がんバイオマーカーの精査を行いたいと考える。

【結語】Metabolomics 解析に必要な検体は尿だけである為、非侵襲で患者への負担は小さい。また費用のかかる画像検査などを用いることなく診断する方法の開発となり、多くの膀胱がん患者の利益になる可能性がある。今後、Metabolomics 解析の手法を用いた膀胱癌がん診断法を開発し、膀胱がんの早期発見および術後再発の予防モニタリングにつなげていきたい。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	常 風 興 平
審 査 委 員	主 査 氏 名 梶 秀 人	
	副 査 氏 名 小 林 道 也	
	副 査 氏 名 寺 田 典 生	

題 目 Metabolomics Study on the Biochemical Profiles of Odor Elements in Urine of Human with Bladder Cancer
(膀胱がん患者の尿臭気メタボロミクス解析)

著 者 Kohei Jobu, Changhai Sun, Saburo Yoshioka, Junko Yokota, Masahide Onogawa, Chiaki Kawada, Keiji Inoue, Taro Shuin, Toshiaki Sendo, Mitsuhiro Miyamura

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
Biological and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 35 No. 4
(2012年4月1日掲載予定)

要 旨

膀胱がんの検査では、尿検査/尿細胞診、膀胱内視鏡検査、画像検査などが行われる。尿細胞診は、膀胱がんのスクリーニング法として重要であるが、感度が約40%で低いという問題点を有している。膀胱内視鏡検査は、膀胱腫瘍の診断上最も有用な診断方法であるが、患者に対して侵襲的な検査であるという問題点を有している。画像診断は、その多くが腫瘍の存在診断よりむしろ腫瘍の深達度を検索するために行われる。膀胱がんの約70%を占める表在性がんにおいては、膀胱温存が可能であるが、再発率が高く、再発を繰り返すうちに、悪性度が悪性転化していく可能性が示されている。従って、他のがんと同様に膀胱がんにおいても早期発見が重要である。また、膀胱がんの診療においては、膀胱内再発を念頭に置いた定期的な検査が必要であり、患者に負担のない方法での検査・診断が求められている。こうした状況の中で申請者らは、イヌは尿の臭気から膀胱がん患者を特定できるとの興味深い報告に着目した。しかしながら、イヌががんを特定した臭気物質については同定されておらず、不明のままである。

そこで申請者らは、膀胱がん患者の尿臭気成分のメタボローム解析を行うことにより、この解析が膀胱がんの非侵襲的なスクリーニング法として有用であるか否かを検討した。具体的には、膀胱内視鏡検査により膀胱がんと確定診断され、膀胱全摘術または経尿道的膀胱腫瘍切除術を受けた患者9名の手術前と手術後の早朝尿と、コントロール群として健常人7名の早朝尿を採取、尿から発する脂肪酸分画の臭気を濃縮して測定用サンプルとした。各測定用サンプルについて GC/MS を用いてピーク分析を行い、検出されたピークの保持時間等を基に、NIST データベースを用いて各成分を同定した。サンプル毎に、同定したピークの強度を用いて多変量解析のひとつである主成分分析を行った。また、最も非侵襲的な膀胱がんスクリーニングとして用いられている尿細胞診と対比し、本解析法の有用性を評価した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 尿から発する脂肪酸分画の臭気として 12 個の化合物が同定された。
- 2) 同定ピークを用いた主成分分析の結果、膀胱がん患者 9 例中 7 例の手術前サンプルのスコアプロットは第 1 主成分が 0.14~0.54、第 2 主成分が -0.30~0.23 の領域に分布しているのに対し、コントロール群のスコアプロットは第 1 主成分が -0.34~-0.21、第 2 主成分が -0.075~-0.008 の領域に分布しており、患者群とコントロール群の間に大きな乖離が認められた。患者 9 例中 7 例をコントロール群とは明確に区別したメタボローム解析結果は、患者 9 例中 5 例が膀胱がんとスクリーニングした尿細胞診よりも膀胱がんの検出において優れていることが示唆される。
- 3) 膀胱がん術後のスコアプロットは、コントロール群のスコアプロットに近似する傾向が認められた。
- 4) 検出された 12 の化合物の中で、Ethyl benzene、Nonanoyl chloride、Dodecanal、(Z)-2-Nonenal、4,5-Dimethyl-3(2H)-isoxazolone の 5 つの化合物は、コントロール群からは検出されず、膀胱がん患者のみから検出された。この知見は、これらの化合物が膀胱がんバイオマーカーとなる可能性を示唆している。尿臭気中の膀胱がんバイオマーカーの探索と確立に向けて、今後のさらなる研究の進展が期待される。

以上のように、本論文は尿の臭気成分のメタボローム解析が膀胱がんの非侵襲的なスクリーニングとして有用であることを示すと共に、膀胱がんバイオマーカーの探索から確立へと発展可能な成果であり、高く評価される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）に値する内容を含むものと判断した。

氏名(本籍)	遅 海東 (Haidong Chi) (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第4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24年3月23日
学位論文題目	Activity of prolidase isoenzymes in the rat brain: subcellular and regional distribution during development (ラット脳におけるプロリダーゼアイソエンザイムの活性:細胞質分画と成長に伴う脳の各部位での分布)
発表誌名	Brain Research, 1303:8-14, 2009年12月
	審査委員 主査 教授 梶 秀人 副査 教授 佐野 栄紀 副査 教授 井上 新平

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 遅海東

論文題目

Activity of prolidase isoenzymes in the rat brain: subcellular and regional distribution during development.

(ラット脳におけるプロリダーゼアイソエンザイムの活性：細胞質分画と生長に伴う脳の各部位での分布)

(論文要旨)

[目的]

プロリダーゼはカルボキシル末端にプロリン又はヒドロキシプロリンを含むイミノジペプチドを分解するホモ2量体のイミノジペプチダーゼである。1968年にプロリダーゼが欠損した患者が初めて発見され、この患者は慢性難治性皮膚潰瘍、知能障害、感染症及び多量のイミノジペプチドを尿中に排泄する稀な常染色体劣性遺伝であることが明らかになった。

その後プロリダーゼには二つのアイソエンザイム (PD I と PD II) があることが報告された。我々も人赤血球からプロリダーゼの PD I と PD II を分離精製し、その性質を調べてきた。劉等はプロリダーゼのアイソエンザイムの性質をより詳しく理解するために、ラットの種々の臓器からプロリダーゼのアイソエンザイム PD I と PD II を分離精製し、基質特異性、各種臓器の分布、成長に伴う酵素活性の変化などについて研究し、ラットプロリダーゼ PD I は人赤血球の PD I とは基質特異性が異なること、PD I の活性はこれまでに報告されていたように小腸と腎臓に高く、一方 PD II の活性は臓器によってあまり差を認めなかった。小腸の PD I と PD II は生後早い時期にプロリンと他のアミノ酸の吸収に関与していることが考えられた。しかし、脳及び脳の各部位におけるプロリダーゼアイソエンザイムに関する研究は行っていなかった。

そこで申請者は本研究において脳における PD I と PD II の生理的意義を理解するために脳及び脳の各部位におけるプロリダーゼアイソエンザイムの分布、発現及び生長に伴う酵素活性の変化等について研究した。

[方法]

1. ラット脳の PD I と PD II の分離

ラット脳を 10 mMメルカプトエタノールを含む 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4, buffer A) の 10 倍量でホモジェネートし、そのホモジェネートを buffer A で平衡化した DEAE-セルロースカラムにロードし、30 ml の buffer A で洗った後、150 mM と 250 mM の Tris-HCl Buffer (pH 7.4) で段階的に溶出した。各フラクションの酵素活性を Gly-Pro と Met-Pro を用いて測定した。

2. ラット脳の各部位のプロリダーゼの調製と酵素活性の測定

ウィスターラット (250-280 g) をエーテルで麻酔し、脳を取り出し、6 部位 (小脳、海馬、尾状核、大脳皮質、視床下部と中脳) に分離し、それぞれを 0.32 mM sucrose を含む 50 mM

Tris-HCl Buffer の 10 倍量でホモジネートし、1,000×g で 15 分間遠心し、その上清を実験に用いた。

酵素活性は 10 μ l の酵素、80 μ l の 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) と 10 μ l の 20 mM $MnCl_2$ を含む反応液を 37°C で 10 分間プレインキュベートし、10 mM 基質 100 μ l を加えて、37 °C で 30 分間インキュベートし、10% TCA 200 μ l を加えて反応を止め、遊離したプロリンを Chinard の方法で測定した。

3. PD I と PD II の抗血清の調製

精製された PD I と PD II (0.9-1 mg in 0.75 ml) をフロイトアジュバンドの同量で乳状にし、その乳状液をラビットの背中の数箇所にて二週間内ごと 4 回皮下注射した。27 日後に血液を取り、抗血清を準備した。

4. Western blotting

PD I と PD II を含む蛋白質を 10%ゲルの SDS-PAGE で電気泳動し、泳動した蛋白質を疎水性の P V D F 膜上に移動し、PD I と PD II のウサギ抗血清及び二次抗体と反応し、PD I と PD II の蛋白質を Western Blotting Detection System で検出した。

[結果と考察]

本研究は脳におけるプロリダーゼアイソエンザイム (PD I と PD II) の生理的意義を理解するために行った。

ラット脳の細胞質分画を遠心により分離し、PD I と PD II の活性を調べた。PD I、PD II とも 100,000 ×g の上清に全活性の約 90% が検出された。この結果は Western blot 分析による PD I と PD II の蛋白質の分布と良く一致していた。ラット脳の PD I と PD II を分離し、両酵素の基質特異性を調べた。PD I は Ser-Pro と Ala-Pro に対して高い活性を示し、PD II は Met-Pro に対して高い活性を示した。これらは、これまでに報告された結果と同じであった。

脳の 6 部位 (小脳、海馬、尾状核、大脳皮質、視床下部と中脳) では小脳で高い活性を示し、一方 PD I は小脳と海馬で高い活性を示した。又、脳及び 6 部位におけるプロリダーゼのトータル活性も種々の基質を用いて測定した。活性の順序は Met-Pro > Ser-Pro > Ala-Pro であった。Met-Pro の PD II の活性は PD I の活性の 3 倍であった。これはこれまでに報告された小腸や腎臓での Ser-Pro に対して最も高い活性を示した点と異なっていた。これは脳では PD II がプロリンやメチオニン等のアミノ酸の供給に強く関与していると考えられた。脳の PD I と PD II の活性はラットの成長に伴って変化していることが明らかになった。Cbz-プロリンによるプロリダーゼの阻害実験では PD I に対しては強く阻害したが、PD II に対しては低濃度ではあまり阻害が認められなかった。

これらの結果は PD I と同じく PD II も種々のイミノジペプチドの分解を調節することによりプロリン及び他のアミノ酸の供給と維持に関与していると考えられた。今後はプロリダーゼアイソエンザイム (特に PD I) の欠損とイミノジペプチドの脳での蓄積との関係について研究していきたい。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	遲 海 東 (Chi Haidong)
審 査 委 員	主 査 氏 名 梶 秀 人	印
	副 査 氏 名 佐 野 榮 紀	印
	副 査 氏 名 井 上 新 平	印

題 目 Activity of prolidase isoenzymes in the rat brain: subcellular and regional distribution during development
(ラット脳におけるプロリダーゼアイソエンザイムの活性：細胞質分画と成長に伴う脳の各部位での分布)

著 者 Haidong Chi, Jincal Lu, Gang Liu, Jia Tong, Kazuko Nakayama, Koichi Yamashita, Noriko Kitaoka, Hiroyuki Kodama

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Brain Research, 1303:8-14, 2009年12月

要 旨

プロリダーゼはカルボキシル末端にプロリン又はヒドロキシプロリンを有するジペプチド(X-Pro)を加水分解し、プロリンと他のアミノ酸を遊離するマンガン要求性酵素である。プロリダーゼ欠損症はイミノジペプチドを遊離のアミノ酸に分解できないため多量のイミノジペプチドを尿中に排泄する遺伝性代謝異常症で、慢性難治性皮膚潰瘍、知的障害、易感染性などの症状を示すことが特徴である。

プロリダーゼのアイソエンザイム(PDIとPDI)、種々の臓器におけるアイソエンザイムの基質特異性や分布、成長に伴う酵素活性の変化などが報告されているが、脳においては系統的な検討がほとんどなされていない。

そこで申請者らは、脳の各部位におけるプロリダーゼ(PDIとPDI)の分布と成長に伴うプロリダーゼ活性の変化等について検討を行った。具体的には、ラット脳のPDIとPDIのDEAE-セルロースカラムによる分離、ラット脳の各部位のプロリダーゼの調製と酵素活性の測定、Western blotting等を行った。

得られた成績を纏めると次のようになる。

1) ラット脳のプロリダーゼ活性及び PD I と PD II の両タンパク質は脳ホモジェネートの可溶性画分 (100,000×g 上清) に認められた。このことは、PD I と PD II が細胞質タンパク質であることを示している。

2) 両酵素の基質特異性について、PD I は Ser-Pro と Ala-Pro に対して、PD II は Met-Pro に対して高い活性を示した。

3) PD I と PD II の両者とも、検討した脳の6部位 (小脳、海馬、尾状核、大脳皮質、視床下部及び中脳) の中では海馬と小脳において高い活性を示した。

4) 成長に伴う PD I と PD II の活性は出産の3日前に最も高い活性を示し、出産後2日まで減少し、その後21日まで徐々に増加した。

5) プロリダーゼの阻害剤である N-カルボベンゾキシ-L-プロリンは PD I に対して濃度依存的に活性を阻害したが、PD II に対しては低濃度では活性を阻害しなかった。

以上の成績は、プロリダーゼアイソエンザイムが種々のイミノジペプチドの分解を調節することにより脳中のプロリン、他のアミノ酸の供給と維持に関与していることを示唆している。

申請者らの論文は、プロリダーゼの機能解明のみならず、プロリダーゼ欠損症の病態解明にも寄与することが期待される。よって審査員一同は、本論文を高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと認定した。

氏名(本籍)	森下 慶子 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第5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24年3月23日
学位論文題目	Superoxide dismutase activity of Helicobacter pylori per se from 158 clinical isolates and the characteristics. (ヘリコバクター・ピロリ臨床分離株158株のSOD活性に関する検討)
発表誌名	Microbiology and Immunology (in press)

審査委員	主査	教授	大畑	雅典
	副査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	小林	道也

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 森下 慶子

論文題目

Superoxide dismutase activity of *Helicobacter pylori*
per se from 158 clinical isolates and the characteristics.
(ヘリコバクター・ピロリ臨床分離株 158 株の
SOD 活性に関する検討)

(論文要旨)

【背景・目的】ヘリコバクター・ピロリ菌（ピロリ菌）感染は胃炎を必発し、胃潰瘍、萎縮性胃炎および胃癌への病態進行に関与する病原細菌である。その感染部位では炎症性細胞浸潤を伴う宿主免疫応答が惹起され、ピロリ菌は活性酸素などの酸化ストレスに暴露されつつ慢性持続感染を成立させている。酸化ストレスはスーパーオキシドを代表とする活性酸素によってもたらされるが、多くの生物はスーパーオキシドを過酸化水素に変換する Superoxide dismutase (SOD) を有しており、活性酸素を除去することにより宿主の免疫システムから免れることが出来る。ピロリ菌は SOD の中でも FeSOD のみを有していることが知られているが、その SOD 活性と病態との関連については明らかにされていない。そこで今回我々は、種々の上部消化管疾患患者由来のピロリ菌 158 株を用いて SOD 活性を測定し、種々の検討を行なった。




【材料・方法】山口大学および高知大学医学部附属病院にて上部消化管疾患患者（胃癌 59 例、胃十二指腸潰瘍 83 例、胃炎 5 例、その他 9 例）から得られた臨床分離株 156 株および標準株（26695、J99）の 158 株を使用した。SOD 活性は SOD Assay kit (同仁化学会社) で測定し、SOD 活性値により高値群 (>0.22)、中間群 ($0.15 \leq \leq 0.22$)、低値群 (<0.15) の 3 群に分類した。高値群の 2 株、他の 2 群の各 3 株、計 8 株を無作為に選び、以下の解析に供した。各株の FeSOD のアミノ酸配列を解析することにより Dendrogram を作製するとともに、SOD 活性のプロファイリングをザイモグラムに求めた。さらに、FeSOD の蛋白質発現量をピロリ菌 SOD に対する特異抗体を作製したのち、Western blotting 法にて解析するとともに、SOD 高値群および低値群に属するピロリ菌の増殖能および SOD 活性に及ぼすパラコートによる酸化ストレスの影響を検討した。これらに加え、SOD 活性に及ぼすピロリ菌病原因子の影響を、*cdrA* 変異株 (HPKT510)、*ureA* 変異株

(HPK5UreA)、*ureB*変異株 (HPK5UreB)、*babA*変異株 (HPK5BA2)、*sabA*変異株 (HPK5SA2) および *cagA*変異株 (HPK5CA2) を用いて検討した。

【結果・考察】SOD活性の高値群は2株、中間群は16株、低値群は140株であったが、癌群のSOD活性 (0.11 ± 0.06 U/ μ g 蛋白) は非癌群のSOD活性 (0.09 ± 0.04 U/ μ g 蛋白) に比べて有意に高値であった ($p=0.033$)。Dendrogramにおいて、SOD活性高値株から中間および低値株への派生が認められた。SOD活性の異なる8株において54番目のアミノ酸にDiversityが認められたが、4箇所のMetal binding siteのアミノ酸配列は8株すべてにおいて同一であり、アミノ酸配列とSOD活性との相関は認められなかった。FeSOD蛋白質発現量とSOD活性とは相関していなかったものの、ザイモグラムにてSOD高値株では3本のバンドが同じ位置に認められ、中間および低値株では1本のバンドが異なる位置に認められた。酸化ストレスに対する反応は高値株と低値株では異なり、低値株はSOD活性が誘導されず著明に増殖が抑制されたのに対し、高値株ではSOD活性が誘導され増殖抑制は軽度であった。*cagA*変異株 (HPK5CA2) はコントロールと比べSOD活性が低下するとともにザイモグラムのパターンが変化したことより、病原因子CagAはピロリ菌のSOD活性を正に制御していると考えられた。

【結論】胃癌病変から分離されたピロリ菌は高いSOD活性を有していることが明らかとなり、この高いSOD活性がピロリ菌の慢性持続感染を可能とし、胃癌の発生を引き起こす可能性が示唆された。これとともに、ピロリ菌の病原因子の一つであるCagAはSOD活性を正に制御すること、さらには、FeSODに結合してその活性を制御する未知の蛋白質が存在することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	森 下 慶 子
審 査 委 員	主 査 氏 名	大 畑 雅 典 
	副 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	小 林 道 也 

題 目 Superoxide dismutase activity of *Helicobacter pylori per se* from 158 clinical isolates and the characteristics.
 (ヘリコバクター・ピロリ臨床分離株 158 株の SOD 活性に関する検討)

著 者 Keiko Morishita, Hiroaki Takeuchi, Norihito Morimoto, Tomoko Shimamura, Yoshu Kadota, Masayuki Tsuda, Taketoshi Taniguchi, Hiroyuki Ukeda, Tetsuya Yamamoto, Tetsuro Sugiura

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Microbiology and Immunology (in press)

要 旨

【背景・目的】

ヘリコバクター・ピロリ菌 (以下、ピロリ菌と略す) は胃粘膜に感染を起こし、胃炎・胃潰瘍さらには胃癌への病態進行に関与する病原細菌である。感染部位では炎症性細胞浸潤を伴う宿主の免疫反応が惹起され、ピロリ菌はそこで産生される活性酸素などの酸化ストレスに暴露されつつ、慢性持続感染を成立させている。酸化ストレスはスーパーオキシドを代表とする活性酸素によりもたらされるが、多くの生体はスーパーオキシドを過酸化水素に変換するスーパーオキシドディスムターゼ (以下、SOD と略す) を有しており、その活性酸素を除去することにより、宿主の免疫システムから免れることができる。ピロリ菌は SOD の中でも、鉄含有 SOD (FeSOD) のみを有していることが知られているが、その SOD 活性と病態との関連については明らかにされていない。そこで申請者らは、種々の上部消化管疾患患者由来ピロリ菌 158 株を用いて、胃癌病変から分離されたピロリ菌群と非癌部から分離されたピロリ菌群の間で SOD 活性に違いがあるかどうかの解析を行なった。

【方法】

高知大学および山口大学医学部附属病院にて、上部消化管疾患患者から得られた臨床分離株 156 株（内訳は、胃癌 59 例、胃十二指腸潰瘍 83 例、胃炎 5 例、その他 9 例）と標準株 2 株（26695、J99）の計 158 株を使用した。SOD 活性は SOD アッセイキットを用いて測定し、SOD 活性値の違いにより、高値群 ($> 0.22 \text{ U}/\mu\text{g}$ 蛋白) 2 株、中間群 ($0.15 \leq \leq 0.22$) 16 株、低値群 (< 0.15) 140 株の 3 群に分類した。この中で、高値群から 2 株、中間群と低値群からそれぞれ 3 株、計 8 株を無作為に選び、以下の解析に供した。

各株の FeSOD アミノ酸配列を解析し、系統樹 (デンドログラム) を作製するとともに、ザイモグラムにて SOD 活性のプロファイリングを行なった。さらに申請者らは独自にピロリ菌 SOD に対する抗体を作製し、FeSOD の蛋白発現量をウエスタンブロット法にて解析した。またパラコートにより酸化ストレスを与え、SOD 高値群と低値群のピロリ菌における増殖能および SOD 活性を調べた。これらに加え、申請者らは種々のピロリ菌遺伝子変異株 (*cdrA* 変異株: HPKT510、*ureA* 変異株: HPK5UreA、*ureB* 変異株: HPKUreB、*babA* 変異株: HPK5BA2、*sabA* 変異株: HPK5SA2、*cagA* 変異株: HPK5CA2) を作製し、SOD 活性に及ぼすピロリ菌病原因子の影響を解析した。

【結果と考察】

胃癌病変から分離されたピロリ菌群の SOD 活性 ($0.11 \pm 0.06 \text{ U}/\mu\text{g}$ 蛋白) は非癌部群のピロリ菌の SOD 活性 ($0.09 \pm 0.04 \text{ U}/\mu\text{g}$ 蛋白) に比べて有意に増加していた ($p = 0.033$)。

デンドログラムから、SOD 活性高値株から中間および低値株への派生が示唆された。

SOD 活性の異なる 8 株において、54 番目のアミノ酸に多様性が認められたが、鉄結合部位のアミノ酸配列は 8 株全てにおいて同一であり、アミノ酸配列と SOD 活性との間に相関は認められなかった。

FeSOD 蛋白発現量と SOD 活性に相関はなかったが、ザイモグラムを行なうと SOD 高値株では 3 本のバンドが同じ位置に認められたのに対し、中間および低値株では 1 本のバンドが異なる位置に認められた。このパターンはピロリ菌 SOD に対する抗体を使って行なったウエスタンブロット法にても確認された。

パラコートによる酸化ストレスに対する反応は高値株と低値株では異なり、低値株は SOD 活性が誘導されずに著明に菌の増殖が抑制されたのに対し、高値株では SOD 活性が誘導され、増殖抑制は軽度であった。

cagA 変異株 (HPK5CA2) はコントロールに比べ、SOD 活性の低下が認められ、ザイモグラムのパターンが変化したことにより、病原因子 CagA はピロリ菌の SOD 活性を正に制御していることが示唆された。

【結論】

胃癌病変から分離されたピロリ菌は高いSOD活性を有していることが明らかとなった。この高いSOD活性がピロリ菌の慢性持続感染を可能とし、胃癌の発生に関与する可能性が示唆された。またピロリ菌の病原因子の一つであるCagAはSOD活性を正に制御することも示された。さらには、申請者らはFeSODに結合して存在する未知の蛋白を突き止めており、SODの活性を制御する新たな機序の解明につながると期待される。

以上のように本論文は、ピロリ菌感染と胃癌の関係について新たな知見を提示したものであり、医学的に高い価値を有すると認められた。したがって、審査員一同は、本論文が高知大学博士（医学）の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(本籍)	矢田部 智昭(岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第6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24年3月23日
学位論文題目	The evaluation of the ability of closed loop glycemic control device to maintain the blood glucose concentration in ICU patients. (Closed-loop方式血糖管理装置のICU患者における血糖値管理の能力評価)
発表誌名	Critical Care Medicine 39(3):575-578, 2011年3月

審査委員	主査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	藤本	新平
	副査	教授	渡橋	和政

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 矢田部 智昭

論文題目 The evaluation of the ability of closed loop glyceimic control device
to maintain the blood glucose concentration in ICU patients.

(Closed-loop 方式血糖管理装置の ICU 患者における
血糖値管理の能力評価)

(論文要旨)

緒言: 集中治療室において目標血糖値を 80-110mg/dl とする厳格な血糖管理 (強化インスリン療法) を行うことが患者予後改善に重要であるという報告がなされて以来, 血糖管理に対する注目が高まった。しかし, 低血糖発作が高い頻度で発生し, 予後を悪くする可能性が問題となった。また近年は血糖変動を抑制することが, 血糖値を低く保つより重要である可能性が示唆されている。人工膵臓 STG-22 (日機装, 東京) は目標血糖値になるように自動的にグルコースとインスリンを投与し, 至適血糖値に維持することが可能な機器である。我々は集中治療室の患者において人工膵臓 STG-22 が低血糖発作を起こすことなく, 血糖変動を抑制することができるという仮説を立て, 人工膵臓 STG-22 を用いた場合の血糖変動について検討した。




方法: 2006 年 8 月から 2009 年 7 月までの間に集中治療室で人工膵臓 STG-22 を用いた症例を対象とした。人工膵臓 STG-22 による強化インスリン療法は集中治療室入室時から集中治療室退室時までとした。人工膵臓 STG-22 は目標血糖値を 90-110mg/dl に設定した。それぞれの患者で人工膵臓 STG-22 による IIT を行った間の平均血糖値 (Glu_{Ave}), 標準偏差 (Glu_{SD}), 平均血糖変動 ($MAG = \Delta Glu / \Delta Time$), 低血糖発生率, 血糖値を 70-110, 110-150, 150-180, 180 mg/dl 以上のそれぞれの範囲に管理し得た時間を評価項目とした。

結果: 対象症例は 208 症例であった。平均運転時間は 33.9 ± 42.2 時間 (平均値 \pm 標準偏差, 以下同様) であった。インスリンは 7.5 ± 5.7 単位/時間で投与され, 平均血糖値は 117.4 ± 22.8 mg/dl, Glu_{SD} は 19.9 ± 10.9 mg/dl, MAG は 11.8 ± 4.5 mg/dl/hr であった。血糖値が 71mg/dl 以下となる低血糖発作を起こした症例は 1 例もなかった。血糖値を 70-110 mg/dl で管理し得た時間は全運転時間の 49.5% であった。110-150 mg/dl, 150-180 mg/dl, 180 mg/dl 以上であった時間はそれぞれ 31.4%, 7.0%, 6.9% であった。

考察：今回の研究より人工膵臓 STG-22 で血糖管理を行うことで低血糖発作を確実に回避できることが明らかになった。また血糖値を 150mg/dl 以下で管理することが望ましいとされる中、人工膵臓 STG-22 は全運転時間の 80.9%でこの目標を達成した。また過去の生存群と非生存群を比較した報告で、生存群での血糖変動よりさらに少ない血糖変動で管理することができた。そして、今までの研究と異なり強化インスリン療法を行っているにも関わらず、集中治療室の医療従事者の血糖管理に対する負担を増大させていない。これらのことは人工膵臓 STG-22 を使用することによって現在、集中治療室における強化インスリン療法における低血糖発作の発生と労力の増加という 2つの重要な問題点を解決できることを示している。人工膵臓 STG-22 には脱血不良という問題が残されている。実際、本研究においても全運転時間の 5.2%において脱血不良で血糖管理が中断している。今後、この問題を解決するために中心静脈からの採血方法の開発が望まれる。今回は後方視研究であったため、人工膵臓 STG-22 により血糖変動を抑えた管理をすることが集中治療室の患者の予後を改善するか否かは評価できなかった。そのため予後への影響を明らかにするため、前向き比較試験による確認が必要である。

結語：人工膵臓 STG-22 は集中治療室の患者において低血糖発作を起こすことなく、血糖変動を抑制した血糖管理を行うことができた。このことは人工膵臓 STG-22 による血糖管理が集中治療室の患者の予後を改善する可能性があることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	矢 田 部 智 昭
審 査 委 員	主 査 氏 名	菅 沼 成 文 
	副 査 氏 名	藤 本 新 平 
	副 査 氏 名	渡 橋 和 政 

題 目 The evaluation of the ability of closed loop glycemic control device to
 Maintain the blood glucose concentration in ICU patients.
 (Closed-loop 方式血糖管理装置の ICU 患者における血糖値管理の能力評価)

著 者 Tomoaki Yatabe, Rie Yamazaki, Hiroyuki Kitagawa, Takehiro Okabayashi,
 Koichi Yamashita, Kazuhiro Hanazaki, Masataka Yokoyama.

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、 年 月
 Critical Care Medicine 39 (3): 575~578

要 旨

緒言: 集中治療室において目標血糖値を 80-110mg/dl とする厳格な血糖管理 (強化インスリン療法) を行うことが患者予後改善に重要であるという報告がなされて以来, 血糖管理に対する注目が高まった。しかし, 低血糖発作が高い頻度で発生し, 予後を悪くする可能性が指摘されている。また近年は血糖変動を抑制することが, 血糖値を低く保つより重要である可能性が示唆されている。人工膵臓 STG-22 (日機装, 東京) は目標血糖値になるように自動的にグルコースとインスリンを投与し, 至適血糖値に維持することが可能な機器である。申請者らは集中治療室の患者において人工膵臓 STG-22 が低血糖発作を起こすことなく, 血糖変動を抑制することができるという仮説を立て, 人工膵臓 STG-22 を用いた場合の血糖変動について検討した。

方法: 2006 年 8 月から 2009 年 7 月までの間に集中治療室で人工膵臓 STG-22 を用いた症例を対象とした。人工膵臓 STG-22 による強化インスリン療法は集中治療室入室時から集中治療室退室時までとした。人工膵臓 STG-22 は目標血糖値を 90-110mg/dl に設定した。それぞれの患者で人工膵臓 STG-22 による IIT を行った間の平均血糖値 (Glu_{Ave}), 標準偏差 (Glu_{SD}), 平均血糖変動 ($MAG = \Delta Glu / \Delta Time$), 低血糖発生率, 血糖値を 70-110, 110-150, 150-180, 180 mg/dl 以上のそれぞれの範囲に管理し得た時間を評価項目とした。

結果:対象症例は 208 症例であった。平均運転時間は 33.9 ± 42.2 時間(平均値 \pm 標準偏差, 以下同様)であった。インスリンは 7.5 ± 5.7 単位/時間で投与され, 平均血糖値は 117.4 ± 22.8 mg/dl, Gl_{SD} は 19.9 ± 10.9 mg/dl, MAG は 11.8 ± 4.5 mg/dl/hr であった。血糖値が 71mg/dl 以下となる低血糖発作を起こした症例は 1 例もなかった。血糖値を 70-110 mg/dl で管理し得た時間は全運転時間の 49.5% であった。110-150 mg/dl, 150-180 mg/dl, 180 mg/dl 以上であった時間はそれぞれ 31.4%, 7.0%, 6.9%であった。

考察:本研究により人工膵臓 STG-22 で血糖管理を行うことで低血糖発作を確実に回避できることが明らかになった。また血糖値を 150mg/dl 以下に管理することが望ましいとされる中, 人工膵臓 STG-22 は全運転時間の 80.9%でこの目標を達成した。また過去の生存群と非生存群を比較した報告で, 生存群での血糖変動よりさらに少ない血糖変動で管理することができた。そして, 今までの研究と異なり強化インスリン療法を行っているにも関わらず, 集中治療室の医療従事者の血糖管理に対する負担を増大させていない。これらのことは人工膵臓 STG-22 を使用することによって集中治療室での強化インスリン療法において問題となる低血糖発作の発生と労力の増加という 2 点を解決できることを示している。人工膵臓 STG-22 には脱血不良という問題が残されている。実際, 本研究においても全運転時間の 5.2%において脱血不良で血糖管理が中断している。今後, この問題を解決するために中心静脈からの採血方法の開発が望まれる。今回は後方視研究であったため, 人工膵臓 STG-22 により血糖変動を抑えた管理をすることが集中治療室の患者の予後を改善するか否かは評価できなかった。そのため予後への影響を明らかにするため, 前向き比較試験による確認が必要である。

結語:人工膵臓 STG-22 は集中治療室の患者において低血糖発作を起こすことなく, 血糖変動を抑制した血糖管理を行うことができた。このことは人工膵臓 STG-22 による血糖管理が集中治療室の患者の予後を改善する可能性があることを示唆する。

以上の内容を踏まえ、審査員全員が、本研究は、高知大学博士（医学）の学位授与に値するものであると判断した。

氏名(本籍)	NGATU NLANDU (コンゴ民主共和国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第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24年3月23日
学位論文題目	Anti-inflammatory Effects of Sacran, a Novel Polysaccharide from Aphanothece sacrum, on 2,4,6-Trinitrochlorobenzene-induced Allergic Dermatitis in vivo. 2,4,6-トリニトロクロロベンゼンで誘導されたアレルギー性皮膚炎マウスに対する Aphanothece sacrum から抽出された新規の多糖類「サクラン」の抗炎症効果
発表誌名	Annals of Allergy, Asthma & Immunology (in press)

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	本家	孝一
	副査	教授	福島	敦樹

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 Ngatu Nlandu Roger

論文題目

Anti-inflammatory effects of sacran, a novel polysaccharide from *Aphanothece sacrum*, on 2,4,6-trinitrochlorobenzene-induced allergic dermatitis in vivo
2,4,6-トリニトロクロロベンゼンで誘導されたアレルギー性皮膚炎マウスに対する *Aphanothece sacrum* から抽出された新規の多糖類「サクラン」の抗炎症効果

(論文要旨)

【目的】

サクランは、福岡県黄金川の清流のみに生育するスイゼンジノリから抽出精製された、分子長が10マイクロメートル以上もある、巨大な硫酸多糖類である。本サクランは、ヒアルロン酸Naの10倍にも及ぶ高い保水力・高粘性、チキソトロピー性・被膜形成力(バリア機能)・低濃度で液晶性を示すという性質があり、その物性のユニークさから医療分野での様々な応用が期待されている。著者らは、バリア機能による環境因子の曝露回避を行うことで、接触性アレルギー性皮膚炎の予防・防止に効果があると期待して、サクラン塗布による2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) 誘導したアレルギー性皮膚炎マウスへの予防効果を試験した。また、ヒト皮膚からの水分蒸散量も測定した。

【方法】

サクランは、酸・アルカリ抽出によって得た。はじめに、サクランの構造をFT-ICR-MSにて解析した。次に、1日目と8日目に、5%TNCB溶液をマウス腹部に1匹あたり150 μ L塗布し感作させた。8、14、16、18、20日目の計5回1%TNCB溶液をマウス耳に15 μ L(1耳あたり)塗布し、皮膚炎を誘導した。21日目に耳バイオプシーと血液採取し、Total IgE、TNF- α 、インターロイキン4、インターロイキン5、IFN- γ 、MCP-1、EOTAXIN、ひっかき回数、炎症の程度、および病理組織学的評価を行った。マウスは、4群に分け、2%サクラン塗布群、偽薬群、10mg/ml ヒドロコルチゾン塗布群には、TNCB感作・チャレンジを行い、陰性対照群には、TNCB塗布の治療薬の塗布も行わなかった。予防薬の塗布は、第一日目から20日目まで、1日1回の連日塗布を行った。TNCB塗布マウスでは、TNCB塗布の30分前に予防薬塗布を行った。また、ボランティア10人へ0.2%サクランと0.2%ヒアルロン酸を塗布し、皮膚からの水分蒸散量を調べた。

【結果・考察】

サクランの構造は、FT-ICR-MS 解析により今回、硫酸化されたムラミン酸構造が明らかになった。炎症の程度は、Scaling/dryness、Erosion/excoriation、Erythema/hemorrhage とともに、偽薬群と比べてサクラン塗布群・ヒドロコルチゾン塗布群では明らかに改善していた ($P < .01$)。

しかし、サクラン塗布とヒドロコルチゾン塗布群との比較では、有意な差はなかった。ひっかき回数もサクラン塗布群・ヒドロコルチゾン塗布群では、有意な減少を示した ($P < .01$)。加えて、サクラン塗布とヒドロコルチゾン塗布群との比較では、ヒドロコルチゾンよりも有意なひっかき回数の低下が見られた ($P < .05$)。血液中の全 IgE レベル、TNF- α 、インターロイキン4、インターロイキン5、IFN- γ を偽薬群と比較すると、サクラン群では有意な低下を示した ($P < .001$ 、 $P = .02$ 、 $P < .01$ 、 $P < .01$ 、 $P < .01$)。さらに、MCP-1、EOTAXIN も偽薬群との比較においてサクラン塗布群では、有意な低下を示した ($P < .01$ 、 $P < .001$)。また、病理組織標本観察では、偽薬群では好酸球浸潤が多く認められたのに対して、サクラン群では、非常に少ない傾向であった。ボランティア10人へ0.2%サクランと0.2%ヒアルロン酸を塗布し、皮膚からの水分蒸散量 (TEWL) を調べたところ、サクランのほうがヒアルロン酸よりも優位に水分蒸散を抑えていた ($P < .001$)。

TNCB 感作誘導マウスへのサクラン塗布により、皮膚炎症スコアおよび引っ掻き回数が劇的に減少した。耳組織への好酸球浸潤も明らかに減少させた。これは、サクランが、IL-4、Total IgE ヒスタミン産生に関わるタンパクを抑制し、TNF- α 、IFN- γ といった、炎症に関わるサイトカインが産生を抑え、また、好酸球遊走させる EOTAXIN、インターロイキン5の産生も抑えているためと考えられる。これらは、サクランが持っているバリアー効果により、刺激性物質 TNCB の皮膚への侵入を抑えている可能性が考えられた。また、ヒト皮膚からの水分蒸散試験では、ヒアルロンよりも高い保水効果を示し、サクランのヒアルロン酸よりも10倍高い保水性をもつ性質から、十分予想される効果であった。

以上のように接触性アレルギー性皮膚炎の予防や皮膚蒸散の抑制が、サクラン塗布により今回明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	NLANDU, NGATU
審査委員	主 査 氏 名	宇 高 恵 子 印
	副 査 氏 名	本 家 孝 一 印
	副 査 氏 名	福 島 敦 樹 印

題 目 Anti-inflammatory Effects of Sacran, a Novel Polysaccharide from *Aphanothece sacrum*, on 2,4,6- Trinitrochlorobenzene-induced Allergic Dermatitis in vivo.
 (2,4,6-トリニトロクロロベンゼンで誘導されたアレルギー性皮膚炎マウスに対する *Aphanothece sacrum* から抽出された新規の多糖類「サクラン」の抗炎症効果)

著 者 N. R. NGATU, M. OKAJIMA, M. YOKOGAWA, R. HIROTA, M. EITOKU, B. A. MUZEMBO, N. DUMAVIBHAT, M. TAKAISHI, S. SANO, T. KANEKO, T. TANAKA, H. NAKAMURA, and N. SUGANUMA,

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Annals of Allergy, Asthma & Immunology (in press) (2011).

要 旨

Nlandu Ngatu さんの公開学位審査は、平成23年2月27日18時より、約1時間にわたり行った。まず、研究内容について口頭発表を行った。

[目的]

福岡県の清流に生育するスイゼンジノリから抽出された巨大な硫酸多糖類である Sacran は、保湿性に富み、皮膚にバリアー機能を付加することが予想され、スキンケア商品として製品化されている。申請者らは、皮膚のバリアー機能不全があり、アトピー性皮膚炎モデルマウスとして使われている NC/Nga マウスに、さらに TNCB を塗布して hapten 特異

的接触皮膚炎を起こさせる実験系を用いて、抗原のチャレンジに先立ち Sacran を皮膚に塗布することにより、皮膚炎の抑制効果があるかどうかを調べた。

その結果をふまえて、次に、人の皮膚に Sacran を塗布し、水分の蒸散量の比較をした。さらに、アトピー性皮膚炎の小児2名の患部に Sacran を塗布し、皮膚炎の変化を観察した。

[方法と結果]

TNCB を acetone - olive oil の溶媒に溶かして NC/Nga マウスの腹部皮膚に塗布して感作免疫を行い、1週間後から耳介皮膚に抗原チャレンジを繰り返す実験系で、感作時より抗原塗布前に Sacran を塗って効果を調べたところ、有意に皮膚炎の発症や、皮膚炎スコアで評価した炎症の程度が低かった。Sacran 塗布マウスでは、血清中の IgE レベルや、Th1 タイプのサイトカインである TNF- α や、Th2 タイプのサイトカインである IL-4, IL-5、ケモカインである MCP-1, CCL, eotaxin の血中濃度が低下しており、皮膚炎の程度と相関がみられた。皮膚病変部においては Eosinophil やリンパ球の浸潤および角化上皮の増殖が顕著である hapten 特異的接触皮膚炎の像を呈していたが、Sacran 塗布群では、ほとんど正常な皮膚と変わらない組織像が観察された。

さらに、感作時から Sacran を塗布した場合の抑制効果に留まらず、一度抗原に感作されたマウスに対し、抗原チャレンジを Sacran 塗布後に行う実験系でも皮膚炎の抑制効果が見られ、皮膚炎をすでに発症している患者の治療目的にも使える可能性が示唆された。

そこで、次に人の皮膚に Sacran を塗り、ヒアルロン酸を対照にして、水分の蒸散量を比較したところ、Sacran ではヒアルロン酸に比べても有意に蒸散量が少なかった。さらに、試験的にアトピー性皮膚炎の2例の患部に Sacran を塗布したところ、1ヵ月後に塗布部の皮膚炎の程度が軽減することが2例ともに観察された。

[考察]

以上の観察をふまえ、Sacran を塗布することにより、外来の環境抗原に対する皮膚炎の予防あるいは治療の可能性が示唆された。ただし、現時点では、この皮膚炎抑制効果が、単に抗原の侵入を妨げるバリアー機能によるものか、さらに、Sacran に積極的な免疫反応への抑制機能があるものかは整理できておらず、今後、その点を明らかにする必要がある。

審査員からは、IgE やサイトカインが測定限界付近の値であることから誤差や測定値の差の生理的意義について質問があった。また、血清中の炎症因子のみならず、皮膚炎の患部における免疫応答の解析の重要性が問われた。加えて、効果の比較に使った副腎皮質ホルモン剤は作用機序がまったく異なる薬剤であることから、他の皮膚バリアー機能を有する物質との比較が望ましいとアドバイスがあった。さらに、Sacran は複雑な高分子多糖であり、同様の保湿機能を有する fucoidan や fucoidin 等の他の多糖との機能の比較が必要ではないかとコメントとアドバイスがあった。さらに、Sacran の作用機序について、1. 皮膚

のバリアー機能の補強、2. 積極的な免疫抑制機能、の2つが、はっきり分けて整理されておらず、現時点のデータを基にした作用機序としては、1. のみによると仮定しても矛盾のないデータであることから、議論の内容について、コメントとアドバイスがあった。

以上の審査内容をふまえ、審査員一同、申請者は高知大学博士（医学）の学位を授与するに値する研究を行い、有意義な成果を修めたと判断した。

氏名(国籍)	駄場中 研 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第16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24年2月5日
学位論文題目	PKIB expression strongly correlated with phosphorylated Akt expression in the breast cancers and also with triple negative breast cancer subtype (乳癌におけるcAMP依存性蛋白酵素阻害 β の発現は、リン酸化Akt発現およびトリプルネガティブタイプの乳癌と有意に相関する)
発表誌名	Medical Molecular Morphology, (in press)
	審査委員 主査 教授 李 康弘 副査 教授 小林 道也 副査 教授 小川 恭弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 馱場中 研

論文題目

PKIB expression strongly correlated with phosphorylated Akt expression in the breast cancers and also with triple negative breast cancer subtype

(乳癌における cAMP 依存性蛋白酵素阻害 β の発現は、リン酸化 Akt 発現およびトリプルネガティブタイプの乳癌と有意に相関する。)

(論文要旨)

【はじめに】

cAMP 依存性蛋白酵素阻害 β (PKIB) は、cAMP 依存性蛋白酵素 A (PKA) 経路をコントロールする規定因子の一つと考えられている。前立腺癌は精巣除去手術や抗アンドロゲン療法などのホルモン治療が有効であり、一般的に予後は良好であることが多いが、なかには治療抵抗性を示す悪性度の高い前立腺癌が存在する。高悪性度の前立腺癌では、PKIB が過剰発現しており、PKA 経路と Akt 経路が関連して作用し、悪性度の高い前立腺癌に変化することに PKIB が関与しているのではないかと考えられている。今回、我々は男性のホルモン依存性腫瘍である前立腺癌で認められた PKIB が、女性のホルモン依存性腫瘍である乳癌においても発現しているのではないかと推測し、乳癌における PKIB 発現とその臨床病理学的意義について検討した。

【研究方法】

2003 年～2007 年に当科で加療した 148 例の乳癌患者を対象とし、抗 PKIB 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体による免疫組織化学染色法を用いて、148 例の原発性乳癌における PKIB 発現、リン酸化 Akt 発現を検索した。同様にエストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター(PR)、human epidermal growth factor 2 (HER2)を染色し、PKIB 発現とリン酸化 Akt 発現、ER,PR,HER2 および乳癌組織型・腫瘍サイズ・リンパ節転移の有無・TNM 分類・術前化学療法の有無などの臨床病理学的因子との関係につき χ^2 検定をも用いて統計学的に検討した。

【結果】

原発性乳癌 148 例中、PKIB 発現は 46 例 (43.2%)、リン酸化 Akt 発現は 27 例 (18.2%) であった。PKIB・リン酸化 Akt 両方とも発現しているものは 20 例 (13.5%) であり、リン酸化 Akt の発現数は少ないが、統計学的有意差($p = 0.006$)を持って相関関係が認められたが、ER、PR、HER2、および個々の臨床病理学的因子と PKIB 発現間に相関関係は認められなかった。一方、乳癌はホルモンレセプター、HER2 の発現の有無により、luminal A タイプ(ER+ and/or PR+, HER2-)、luminal B タイプ(ER + and/or PR+, HER2 +)、HER2 タイプ(ER-, PR-, and HER2+)、および triple negative breast cancer タイプ(ER-, PR-, and HER2 -)の四つに分類される。この分類による triple negative breast cancer タイプと PKIB 発現間には統計学的に有意差を認めた($p = 0.0004$)。

【結論】

一般的に PKA 経路が活性化された乳癌では、ホルモン治療剤であるタモキシフェンや分子標的治療剤であるトラスツズマブには治療抵抗性であること、リン酸化 Akt 発現が認められる乳癌では、腫瘍増殖能が増加することやホルモン治療に抵抗性を示しことが知られており予後不良である。一方、triple negative breast cancer タイプの乳癌では、Akt 経路は活性化されており予後不良と考えられている。今回、我々が発見した乳癌における PKIB 発現、PKIB 発現とリン酸化 Akt 発現の相関関係および PKIB 発現と triple negative breast cancer タイプの乳癌との相関関係は、高悪性度の前立腺癌同様に、PKIB 発現が乳癌における予後不良因子の一つである可能性を示唆するものであり、今後の更なる研究によっては、PKIB が乳癌治療の標的因子の一つと成り得るものと考ええる。

論文目録

学位論文

1 題 目

PKIB expression strongly correlated with phosphorylated Akt expression in the breast cancers and also with triple negative breast cancer subtype
(乳癌におけるcAMP依存性蛋白酵素阻害βの発現は、リン酸化Akt発現およびトリプルネガティブタイプの乳癌と有意に相関する)

2 著 者(共著者を含む)

Ken Dabanaka, Suyoun Chung, Hidewaki Nakagawa, Yusuke Nakamura,
Takehiro Okabayashi, Takeki Sugimoto, Kazuhiro Hanazaki, Mutsuo Furihata

3 発表誌名、巻(号)、ページ(~)

Medical Molecular Morphology

4 発表年月(日)

2012年 (in press)


参考論文

上記のとおり相違ありません。

平成23年11月21日

氏名 取崎 研 印

論文審査の結果の要旨

	氏 名	駄 場 中 研
審 査 委 員	主 査 氏 名 李 康 弘	
	副 査 氏 名 小 林 道 也	印
	副 査 氏 名 小 川 恭 弘	印

題 目 PKIB expression strongly correlated with phosphorylated Akt expression in the breast cancers and also with triple negative breast cancer subtype

(乳癌における cAMP 依存性蛋白酵素阻害 β の発現は、リン酸化 Akt 発現およびトリプルネガティブタイプの乳癌と有意に相関する)

著 者 Ken Dabanaka, Suyoun Chung, Hidewaki Nakagawa, Yusuke Nakamura, Takehiro Okabayashi, Takeki Sugimoto, Kazuhiro Hanazaki, Mutsuo Furihata

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Medical Molecular Morphology (2012 年 in press)

要 旨

【背景と目的】

cAMP 依存性蛋白酵素 A (PKA) を作用因子とするシグナル伝達経路は、ホルモン刺激などによって活性化され、細胞の増殖、分化、そして腫瘍化にも影響を与える。例えば、前立腺癌の多くはアンドロゲンに依存して増殖するが、アンドロゲン非依存性を獲得した高悪性度の前立腺癌では、持続的 PKA 経路の活性化が見られる。一方、PKA の阻害因子ファミリーに属する蛋白が複数知られている。cAMP 依存性蛋白酵素阻害因子 α (PKIA)、同 β (PKIB) などである。PKIA による PKA 経路阻害については研究が進んでいる。しかし、PKIB の機能については未だ不明の点が多い。また、PKIA と PKIB のアミノ酸相同性は約 40% と低く、両者の機能は必ずしも一致していない可能性がある。

近年、抗アンドロゲン療法耐性の前立腺癌が、しばしば PKIB の過剰発現を示すことが、本学の研究者を含めた共同研究によって明らかにされた。その際、PKIB は PKA の機能をむしろ強化し、PKA 経路を介したリン酸化を通じて、AKT がん遺伝子産物の活性化を促進するとの実験結果も示された。申請者は、これらの研究成果から着想を得て、

エストロゲン依存性を呈することの多い乳癌においても、PKIB の発現が悪性度増加に寄与しているのではないかとの仮説を立てた。本研究では、同仮説を検証するため、乳癌組織における PKIB 発現と病理学的予後判定因子との相関が検討された。

【方法と結果】

2003 年から 2007 年の間に本学第一外科で摘出手術を受けた 148 例の乳癌患者を対象とし、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫組織化学法により、原発腫瘍における PKIB、リン酸化 AKT の蛋白発現を調べた。同様に、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、ヒト表皮成長因子受容体 2 (HER2) の発現も調べた。染色強度を半定量化し、10%以上の腫瘍細胞が染色される場合を陽性、10%に満たない場合を陰性と判定した。この判定基準にしたがい、PKIB の発現が、リン酸化 AKT、ER、PR ないし HER2 の発現と有意に相関するか否かについて、 χ^2 検定で統計学的に解析した。また、病理学的予後判定因子として癌組織型、腫瘍サイズ、リンパ節転移、TNM 分類、さらに予後修飾因子として術前化学療法を取り上げ、これらの因子が PKIB 発現と相関を示すか否かも調べた。

原発性乳癌 148 例中、PKIB 陽性例は 43.2% (64 例)、リン酸化 AKT 陽性例は 18.2% (27 例) であった。PKIB 陽性例と陰性例のリン酸化 AKT 陽性率はそれぞれ 32% (20 例 / 64 例)、8% (7 例 / 84 例) であり、PKIB 陽性例は陰性例に比べてリン酸化 AKT 陽性率が有意に高かった ($p=0.006$)。一方、PKIB の発現は、ER、PR、HER2 の発現および上述の予後関連因子と有意な相関を示さなかった。そこで、ER、PR、HER2 の発現の有無の組み合わせによって乳癌を亜分類し、さらなる検討を行った。すると、これら 3 種類の蛋白全ての発現を欠く所謂 triple negative 症例では、PKIB 陽性率が 84% (21 例 / 25 例) と高く、その他の症例の陽性率である 35% (43 例 / 123 例) に比して有意差を認めた ($p=0.0004$)。

【考察】

PKA 経路が活性化された乳癌は、ホルモン治療剤であるタモキシフェンや分子標的治療剤であるトラスツズマブに治療抵抗性であることが知られている。また、リン酸化 AKT 陽性乳癌は、増殖能が高く、ホルモン治療にも抵抗性を示し、予後不良である。さらには、triple negative タイプの乳癌では、AKT 経路の活性化がしばしば観察されるとの報告がある。申請者は、乳癌における PKIB の発現を初めて確認し、その発現とリン酸化 AKT 発現ないし triple negative 形質が有意に相関することを見い出した。よって、PKIB は乳癌細胞の悪性形質を増強し、その作用は前立腺癌の場合と同様に PKA および AKT 経路の活性化を介していることが示唆された。PKIB 発現の検索は、乳癌の病理学的予後判定に有用と考えられ、臨床応用が期待される。今後の更なる研究によっては、PKIB を分子標的とする乳癌治療へと発展する可能性もある。

【審査結果】

申請者の研究成果は、乳癌の新しい予後判定マーカーとして PKIB の有用性を示し、今後の乳癌治療戦略にも示唆を与えるものである。審査員一同は高知大学医学博士の称号に値する研究内容と判定した。

氏名(国籍)	古宮 淳一 (千葉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第17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24年2月21日
学位論文題目	Effects of Ethanol Exposure on Spatial Learning in Mice During Synaptogenesis (シナプス形成期のエタノール曝露がマウスの空間学習能に及ぼす影響)
発表誌名	日本アルコール・薬物医学会雑誌 46(2), 250~259, 2011年4月

審査委員	主査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	深谷	孝夫
	副査	教授	井上	新平

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 古宮 淳一

論文題目

Effects of Ethanol Exposure on Spatial Learning
in Mice During Synaptogenesis

(シナプス形成期のエタノール曝露がマウスの
空間学習能に及ぼす影響)

(論文要旨)

【背景】

妊娠期間中のアルコール多量摂取が次世代へ与える影響として、児の中枢神経障害、発育遅滞および特徴的な顔貌を呈する胎児性アルコール症候群が知られている。特に、脳の発達段階がシナプス形成期である妊娠第三半期の胎児におけるアルコール曝露は出生後に学習、記憶および行動関連領域の脳障害として認められると報告されている。

脳の発達段階がシナプス形成期に相当する時期のげっ歯類を用いた研究報告では、急性エタノール (EtOH) 投与により、脳神経細胞のアポトーシスを生じることが明らかとなっている。また、シナプス形成期の急性EtOH曝露を経て成長したげっ歯類では、空間学習能に障害が認められると報告されている。しかしながら、そのようなげっ歯類の空間学習能障害が、成長後どのように変化するかについてはよく分かっていない。

本研究の目的は、シナプス形成期においてEtOHに曝露されたマウスの空間学習能障害が成長後の反復学習で改善するか否かを明らかにすることである。

【材料および方法】

生後1週齢のddYマウスの背部皮下に、2.5 g/kg に相当する量の20%EtOHを2時間間隔で2回投与し、シナプス形成期EtOH曝露マウスを作製した。このシナプス形成期EtOH曝露マウスが7週齢および12週齢に成長した時点でモーリスの水迷路試験を4日間連続で行い、空間学習能およびその成長に伴う変化を評価した。シナプス形成期EtOH曝露マウスにおいて、初回EtOH投与から8時間後または24時間後に脳を4%パラホルムアルデヒドで還流固定してパラフィン包埋標本作製し、TUNEL法によるアポトーシス細胞の検出および免疫組織化学的方法による活性化型カスパーゼ-3の検出を行った。また、1週齢の幼若マウスにおけるEtOHの薬物動態を検討するために、EtOH投与後に血液および大脳を採取し、気化平衡ガスクロマトグラフィーによりそれらのEtOH濃度を測定した。

【結 果】

シナプス形成期EtOH曝露マウスでは、7週齢の水迷路試験2、3および4日目において、対照マウスと比較してプラットホーム到達時間の遅延が認められた。この水迷路試験2、3および4日目におけるプラットホーム到達時間の遅延は、シナプス形成期EtOH曝露マウスが12週齢に成長した時点においても残存していた。

シナプス形成期の急性EtOH曝露により、TUNEL法陽性細胞および活性型カスパーゼ-3陽性細胞が脳の広範囲にわたり観察され、それら陽性細胞の分布はほぼ一致していた。EtOH投与8時間後の大脳皮質、海馬および視床におけるアポトーシス細胞の発生率はそれぞれ $1.6 \pm 0.9\%$ 、 $0.5 \pm 0.3\%$ および $1.8 \pm 1.2\%$ であったが、EtOH投与24時間後の発生率はそれぞれ $6.1 \pm 1.8\%$ 、 $1.6 \pm 0.9\%$ および $11.0 \pm 4.4\%$ と高値を示した。




シナプス形成期EtOH曝露マウスの血液および大脳には、EtOH投与8時間後でそれぞれ 3.1 ± 0.99 mg/gおよび 3.6 ± 0.90 mg/gのEtOHが認められ、EtOH投与24時間後にもそれぞれ 0.93 ± 0.79 mg/gおよび 0.96 ± 0.78 mg/gのEtOHが残存していた。

【考 察】

本研究結果から、シナプス形成期の急性EtOH曝露によるマウス空間学習能の障害は、成熟後の反復学習では改善されず残存することが明らかとなった。シナプス形成期にEtOH曝露されたマウスにおける成長後の空間学習能の障害には、記憶や学習の中核である海馬および海馬周辺の大脳皮質並びに視床における脳神経細胞のアポトーシスが関与している可能性があると考えられる。また、生後1週齢の幼若マウスではEtOH代謝能が未熟であり、そのためEtOHを急性投与した場合でも脳が高濃度のEtOHに長時間曝露され、脳神経細胞のアポトーシス性変化が強く生じることが明らかとなった。本研究で行なった、シナプス形成期のEtOH曝露による脳神経細胞のアポトーシスを病理組織学的および中毒学的に検討すると共に、成熟マウスの空間学習能障害を同時に検討した報告はほとんどない。

今回の実験で認められたマウス空間学習能障害およびその不可逆性は、シナプス形成期の脳において非常に重要な神経回路の形成に異常を来した結果と考える。このような障害機序が、人においても妊娠第3三半期のアルコール曝露で生じる可能性があり、その結果、児の学習・記憶障害およびその予後と深く関連しているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	古 宮 淳 一
審 査 委 員	主 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	深 谷 孝 夫 
	副 査 氏 名	井 上 新 平 

題 目 Effects of Ethanol Exposure on Spatial Learning in Mice During Synaptogenesis
 (シナプス形成期のエタノール曝露がマウスの空間学習能に及ぼす影響)

著 者 Junichi FURUMIYA and Yoshiaki HASHIMOTO

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 日本アルコール・薬物医学会雑誌, 46(2), 250~259, 2011年4月

要 旨

妊娠期間中のアルコール多量摂取により引き起こされる胎児性アルコール症候群では、児の中
 枢神経障害、発育遅滞および特徴的な顔貌が知られている。特に、脳の発達段階がシナプス形成
 期である妊娠第3三半期の胎児におけるアルコール曝露は、出生後に学習、記憶および行動関連
 領域の脳障害を引き起こすことが報告されている。また、脳の発達段階がシナプス形成期に相当
 する時期の齧歯類を用いた研究報告では、急性エタノール(EtOH)投与が脳神経細胞のアポト
 ーシスを引き起こし、さらに、空間学習能が障害されることが報告されている。しかしながら、
 そのような障害が、成長後どのように変化するかについては未だ明らかではない。そこで、申請
 者は、シナプス形成期に EtOH 曝露されたマウスの空間学習能障害が、成長後の反復学習で改善
 するか否かを検討した。

〈方法と結果〉

まず、生後1週齢の ddY マウスの背部皮下に、2.5 g/kg に相当する量の 20% EtOH を 2 時間
 間隔で 2 回投与して、シナプス形成期 EtOH 曝露マウスを作成した。その後、以下の 3 種類の実
 験を行った。

(1) EtOH の薬物動態の検討

初回 EtOH 投与後、1、2、5、8、24 時間後の血液および大脳を採取し、気化平衡ガスクロマトグラフィーにより、それぞれの EtOH 濃度を測定した。

EtOH 投与 8 時間後では 3.1 ± 0.99 mg/g (血液) および 3.6 ± 0.90 mg/g (大脳) の EtOH が認められ、投与 24 時間後では 0.93 ± 0.79 mg/g (血液) および 0.96 ± 0.78 mg/g (大脳) の EtOH が残存していた。

(2) DNA fragmentation と活性型カスパーゼ-3 の検出

初回 EtOH 投与から 8 時間後および 24 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで脳を還流固定してパラフィン包埋標本を作製し、TUNEL 法による DNA fragmentation の検出および免疫組織化学的方法による活性型カスパーゼ-3 の検出を行った。

EtOH 投与 8 時間後において、DNA fragmentation 陽性細胞および活性型カスパーゼ-3 陽性細胞が脳の広範囲にわたり観察され、それら陽性細胞の分布はほぼ一致していた。アポトーシス細胞の発生率は、 $1.6 \pm 0.9\%$ (大脳皮質)、 $0.5 \pm 0.3\%$ (海馬) および $1.8 \pm 1.2\%$ (視床) であり、投与 24 時間後においては、 $6.1 \pm 1.8\%$ (大脳皮質)、 $1.6 \pm 0.9\%$ (海馬) および $11.0 \pm 4.4\%$ (視床) とさらに増加した。

(3) 水迷路試験による空間学習能の解析

7 週齢および 12 週齢のマウスを用いて、モーリスの水迷路試験を 4 日間連続で行なった。水迷路試験には黒インクを満たした直径 80 cm、水深 25 cm の円形水槽を用い、4 方向から放たれたマウスが避難所 (プラットホーム) (10×10 cm²、水深 1 cm) に到達するまでの時間 (秒) の平均値を求めた。7 週齢マウスにおいて、実験 2、3 および 4 日目において、生理食塩水を投与した対照マウスと比較して、プラットホーム到達時間の遅延が認められた。さらに、12 週齢マウスにおいても、この遅延は残存していた。

以上の成績から、

(1) 生後 1 週齢の幼若マウスでは EtOH 代謝能が未熟であり、EtOH の急性投与により脳が高濃度の EtOH に長時間曝露されること、(2) EtOH 曝露マウスにおいて、記憶や学習の中核である海馬、海馬周辺の大脳皮質さらに視床の脳神経細胞にアポトーシスを生じること、(3) EtOH 曝露された幼弱マウスにおける空間学習能の障害は、成熟後も残存すること、が明らかになった。

本論文は、人における妊娠第 3 三半期のアルコール曝露による胎児性アルコール症候群の病態解明に寄与するものであり、審査員一同は、本論文が高知大学博士 (医学) に値するものと判断した。

氏名(国籍)	古野 貴志 (高知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙総医博第18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24年2月21日
学位論文題目	Effects of various doses of aspirin on platelet activity and endothelial function (アスピリン用量変化が血小板活性および血管内皮機能におよぼす影響)
発表誌名	Heart and Vessels, 26(3):267~73, 2011年5月

審査委員	主査	教授	渡橋	和政
	副査	教授	大畑	雅典
	副査	教授	高田	淳

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 古野 貴志

論文題目

Effects of various doses of aspirin on platelet activity and endothelial function
(アスピリン用量変化が血小板活性および血管内皮機能におよぼす影響)

(論文要旨)

心脳血管疾患における抗血小板療法薬として確立されているアスピリンは、低用量で血小板中のトロンボキサン A₂ 合成を抑制し抗血小板作用を発揮するが、高用量では血管内皮細胞中の、血小板凝集抑制および血管拡張作用のあるプロスタグランジン I₂ 合成も抑制するため、血栓塞栓症の発生率を増加させると考えられている。臨床的には低用量アスピリンが推奨されているが、血小板活性および血管内皮機能の両方からみたアスピリンの至適用量は不明である。その理由の1つは、血小板活性化は血小板凝集能検査を用いて評価することができるが、内皮細胞中のプロスタグランジン I₂ 抑制を臨床的に評価する方法が確立されていないことである。

最近、血管内皮機能は反応性充血前後の血流依存性血管拡張反応 (flow-mediated dilation : FMD) を用いて評価されるようになり、心血管疾患や代謝疾患での内皮機能障害が報告されている。この FMD は、主に内皮細胞で合成される血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) を介する反応であるが、プロスタサイクリンやトロンボキサン A₂ が介する系も血管反応に関与する。高用量のアスピリンはこの血管拡張を引き起こす系を阻害する可能性がある。そこで本研究では、血小板活性および血管内皮機能の両面からアスピリンの至適用量を検討した。

11名の健常男性ボランティア (32 ± 6 歳) を対象に、アスピリン用量別に血小板活性および血管内皮機能の評価した。アスピリンは朝一回内服し、服用量は3日毎に0, 81, 162, 330, 660 (mg/日) と増量した。服用前および各内服量の最終日に測定を行った。血小板活性は、フローサイトメトリを用いた細胞表面抗原の発現率および血小板凝集能で評価した。血管内皮機能は、高解像度超音波検査で上腕動脈の血管径を測定し、反応性充血後の FMD を用いて評価した。この際、FMD は (反応性充血後の血管径 - 前の血管径) / 前の血管径 × 100 (%) で求められる。




血小板凝集機能検査では、ADP と collagen による最大血小板凝集率は、アスピリン 81mg から 660 mg/日のすべてで有意に抑制された (ADP; 78 ± 3% to 67 ± 2%, 66 ± 2%, 65 ± 2%, 66 ± 2%, all ps < 0.01), (collagen ; 85 ± 2% to 34 ± 6%, 38 ± 6%, 34 ± 5%, 35 ± 6%, all ps < 0.01)。またフローサイトメトリ検査では、血小板 P-selectin 発現率, 血小板 ADP 刺激 P-selectin 発現率および ADP 刺激血小板 - 好中球複合体 (PNC: platelet-neutrophil complex) 頻度の抑制傾向を認めた。よって、81mg / 日以上のアスピリンすべてで血小板活性は抑制された。

血管内皮機能検査では、FMD(%) はアスピリン服用前値に比し、81mg / 日で増加傾向を示し (1.68 ± 0.29

to 2.78 ± 0.47 , $p = 0.08$), 162mg / 日で有意に増加した (3.67 ± 0.41 , $p < 0.05$)。330mg / 日では前値に比し増加傾向を示したものの ($p = 0.07$)、162mg / 日に比し減少傾向を示した (3.30 ± 0.50 , n.s.)。さらに 660mg / 日 (1.07 ± 0.34) では、162mg / 日、330mg / 日に比し有意に減少し ($p < 0.01$, $p < 0.01$, respectively)、前値および 81mg / 日に比し減少傾向を示した。よって、FMD(%) はアスピリン 162 mg / 日で最も高値であった。

以上の結果より、アスピリンは 81mg / 日以上の内服で血小板活性を抑制するのに対し、血管内皮機能においては 162mg / 日が至適容量であった。660 mg / 日の容量では血管内皮機能をむしろ悪化させた。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	古 野 貴 志
審 査 委 員	主 査 氏 名 渡 橋 和 政	
	副 査 氏 名 大 畑 雅 典	
	副 査 氏 名 高 田 淳	

題 目 Effects of various doses of aspirin on platelet activity and endothelial function
 (アスピリン用量変化が血小板活性および血管内皮機能におよぼす影響)

著 者 Takashi Furuno · Fumiyasu Yamasaki · Takeshi Yokoyama · Kyoko Sato · Takayuki Sato · Yoshinori Doi · Tetsuro Sugiura

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、 年 月
 Heart and Vessels, 26(3):267~73. (2011 May. Epub 2010 Nov 10.)

要 旨

緒言: アスピリンは心血管・脳血管疾患における抗血小板療法薬として確立されている。低用量では血小板中のトロンボキサン A2 合成を抑制し抗血小板作用を発揮するが、高用量では血管内皮細胞中のプロスタグランジン I2 合成も抑制する。プロスタグランジン I2 は血小板凝集抑制および血管拡張作用を有するため、高用量のアスピリンにより合成が抑制されると血栓塞栓症の発生率を増加させることが懸念される。臨床的には低用量アスピリンが推奨されているが、血小板活性と血管内皮機能の両者からみたアスピリンの至適用量は不明である。血小板活性化は血小板凝集能検査を用いて評価することができるのに対し、内皮細胞中のプロスタグランジン I2 抑制を臨床的に評価する方法が確立されていないことが一つの理由となっている。

最近、血管内皮機能を評価する方法として反応性充血前後の血流依存性血管拡張反応 (flow-mediated dilation : FMD) が用いられるようになり、心血管疾患や代謝疾患での内皮機

能障害の報告がみられる。FMDは主に内皮細胞で合成される血管拡張物質である一酸化窒素(NO)を介する反応だが、プロスタサイクリンやトロンボキサンA2が介する系も血管反応に関与しており、高用量のアスピリンがこの血管拡張の系を阻害する可能性がある。そこで本研究では、血小板活性および血管内皮機能の両面からアスピリンの至適用量を検討した。

方法：11名の健常男性ボランティア(32 ± 6歳)を対象に、アスピリン用量別に血小板活性および血管内皮機能を評価した。アスピリンは朝一回内服とし、3日毎に一日量0mgから、81, 162, 330, 660mg/日と増量した。測定は、服用前および各内服量の最終日に行った。血小板活性はフローサイトメトリを用いた細胞表面抗原の発現率および血小板凝集能で評価し、血管内皮機能は高解像度超音波検査で上腕動脈の血管径を測定し、反応性充血後のFMDを用いて評価した。FMDは、(反応性充血後の血管径 - 前の血管径) / 前の血管径 × 100 (%)で求めた。

結果：血小板凝集機能検査では、ADPとcollagenによる最大血小板凝集率がアスピリン81mgから660mg/日のすべての用量で有意に抑制された(ADP; 78 ± 3% to 67 ± 2%, 66 ± 2%, 65 ± 2%, 66 ± 2%, all ps < 0.01), (collagen; 85 ± 2% to 34 ± 6%, 38 ± 6%, 34 ± 5%, 35 ± 6%, all ps < 0.01)。またフローサイトメトリ検査で血小板P-selectin発現率、血小板ADP刺激P-selectin発現率およびADP刺激血小板-好中球複合体(PNC: platelet-neutrophil complex)頻度の抑制傾向を認めた。よって81mg/日以上のアスピリンすべてで血小板活性は抑制された。

血管内皮機能検査では、FMD(%)はアスピリン服用前値に比し81mg/日で増加傾向を示し(1.68 ± 0.29 to 2.78 ± 0.47, p = 0.08), 162mg/日で有意に増加した(3.67 ± 0.41, p < 0.05)。330mg/日では162mg/日に比し減少傾向を示した(3.30 ± 0.50, n.s.)。さらに660mg/日(1.07 ± 0.34)では、162mg/日、330mg/日に比し有意に減少した(p < 0.01, p < 0.01, respectively)。よってFMD(%)はアスピリン162mg/日で最も高値であった。

考察・結語：以上の結果より、アスピリンは81mg/日以上の内服で血小板活性を抑制するのに対し、血管内皮機能においては162mg/日が至適用量であった。660mg/日の用量では血管内皮機能をむしろ悪化させた。本研究では、サンプルサイズが小さく対象が健常男性であるという限界があり、動脈硬化性病変を有する患者では健常人より血小板機能がより活性化されている可能性があるため、今後対象を増やすとともに動脈硬化性疾患患者における検討が必要である。

以上の内容を踏まえ、審査員全員が、本研究は、高知大学博士(医学)の学位授与に値するものであると判断した。

氏名(国籍)	濱川 公祐 (高知県)															
学位の種類	博士(医学)															
学位記番号	乙総医博第19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24年2月21日															
学位論文題目	Abdominal visceral fat thickness measured by ultrasonography predicts the presence and severity of coronary artery disease (超音波法で測定した腹部内臓脂肪厚は冠動脈疾患の有無や重症度を予測する)															
発表誌名	Ultrasound in Medicine and Biology, 36 (11): 1769-1775, 2010年11月															
	<table border="0"> <tr> <td>審査委員</td> <td>主査</td> <td>教授</td> <td>杉浦</td> <td>哲朗</td> </tr> <tr> <td></td> <td>副査</td> <td>教授</td> <td>渡橋</td> <td>和政</td> </tr> <tr> <td></td> <td>副査</td> <td>教授</td> <td>瀬尾</td> <td>宏美</td> </tr> </table>	審査委員	主査	教授	杉浦	哲朗		副査	教授	渡橋	和政		副査	教授	瀬尾	宏美
審査委員	主査	教授	杉浦	哲朗												
	副査	教授	渡橋	和政												
	副査	教授	瀬尾	宏美												

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 濱川 公祐

論文題目

Abdominal visceral fat thickness measured by ultrasonography predicts the presence and severity of coronary artery disease

(超音波法で測定した腹部内臓脂肪厚は冠動脈疾患の有無や重症度を予測する)

(論文要旨)

【背景】メタボリック・シンドロームは冠動脈疾患や他の動脈硬化性の心血管疾患の危険因子である。メタボリック・シンドロームにおいては内臓脂肪蓄積が重要であり、その正確な評価が必要である。腹囲は簡単に測定できるためメタボリック・シンドロームの診断基準に使用されているが、皮下脂肪も含んでおり内臓脂肪のみを正確に反映していない。CT は内臓脂肪と皮下脂肪を分けて計測できるため内臓脂肪の評価に用いられているが被爆やコスト等の問題がある。超音波による腹部内臓脂肪の評価は様々な報告があるが、冠動脈疾患との関連性を十分に検討した報告はない。そこで本研究では超音波法で測定した腹部内臓脂肪厚により冠動脈疾患の有無や重症度が予測できるかを検討した。

【方法】2006年10月から2008年7月に冠動脈造影検査を施行した連続185人(男性123人、女性62人、平均年齢70.9歳)を対象とした。不安定狭心症や急性心筋梗塞により緊急で冠動脈造影検査を行った患者と腹部に手術の既往のある患者は除外した。冠動脈造影検査を施行する前に、超音波による既報の測定法(Suzukiら、1993年)にて腹膜前最大内臓脂肪厚(Vmax)と最小皮下脂肪厚(Smin)を測定した。冠動脈病変あり群となし群とで脂肪厚や他の動脈硬化の指標を比較検討した。冠動脈病変の重症度としての病変枝数とVmaxとの相関も検討した。




【結果】冠動脈病変あり群が144人、なし群が41人であった。冠動脈病変あり群ではなし群と比較し有意に腹囲($88.0 \pm 9.5\text{cm}$ vs. $84.0 \pm 9.5\text{cm}$; $p < 0.05$)とVmax($8.8 \pm 3.6\text{mm}$ vs. $6.4 \pm 2.8\text{mm}$; $p < 0.001$)は大きかったがSminには差はなかった。冠動脈病変ありの予測因子としてのROC曲線ではVmax $\geq 6.9\text{mm}$ が感度74%、特異度68%で最適のカットオフ値であり、腹囲 $\geq 84.5\text{cm}$ が感度63%、特異度54%で最適のカットオフ値であった。多変量解析ではVmax $\geq 6.9\text{mm}$ は冠動脈病変の独立した危険因子であったが(オッズ比3.710; $p = 0.008$)、腹囲 $\geq 84.5\text{cm}$ は独立した危険因子ではなかった。冠動脈病変枝数別にVmaxをみると、病変枝数の増加とともにVmaxも増加した。

【考察】Vmaxは冠動脈病変の有無や重症度と相関を認めた。過去にも超音波法で計測した内臓脂肪厚と冠動脈病変の有無や重症度との相関を検討した報告はある。しかしそれらは(1)研究対象の設定に非肥満患者や糖尿病患者などという偏りがある、(2)重症度の指標に

臨床ではあまり使用しない Gensini スコアを用いている、(3)内臓脂肪厚のカットオフ値が示されていない、(4)内臓脂肪厚が通常の動脈硬化の指標より有用であるかが明らかでない、(5)超音波での測定法が統一されていないという点で問題がある。本研究では冠動脈造影を施行した連続 185 人を対象とし、重症度の評価には一般的に臨床で使用される病変枝数を使用した。ROC 曲線を用いて冠動脈病変の有無を予測するための内臓脂肪厚のカットオフ値を示し、多変量解析にて内臓脂肪厚が冠動脈病変の独立した危険因子であるのに対して、腹囲は独立した危険因子ではなく、超音波での評価が腹囲の計測より優れていることを示した。内臓脂肪厚の測定法としては複数の方法があるが、最も計測が簡単と思われる Suzuki らが報告した測定法を用いることで、Vmax の検者内変動係数は 4.3%、検者間変動係数は 6.7%と優れた検査の再現性と信頼性が得られた。

結論：本研究により超音波法で測定した腹部内臓脂肪厚により冠動脈病変の有無や重症度の予測が可能であった。臨床の場において超音波を用いてわずかな追加の検査を行うことによって、放射線の被曝などもなく、従来の動脈硬化の危険因子以上の有益な情報が得られることが示された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	濱 川 公 祐
審 査 委 員	主 査 氏 名	杉 浦 哲 朗  印
	副 査 氏 名	渡 橋 和 政  印
	副 査 氏 名	瀬 尾 宏 美  印

題 目 Abdominal visceral fat thickness measured by ultrasonography predicts the presence and severity of coronary artery disease
 (超音波法で測定した腹部内臓脂肪厚は冠動脈疾患の有無や重症度を予測する)

著 者 Kosuke Hamagawa, Yoshihisa Matsumura, Toru Kubo, Kayo Hayato, Makoto Okawa, Katsutoshi Tanioka, Naohito Yamasaki, Hiroaki kitaoka, Toshikazu Yabe, Masanori Nishinaga, Yoshinori L. Doi

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Ultrasound in Medicine and Biology 36 (11): 1769~1775 (2010年11月)

要 旨

[背景と目的]

メタボリック・シンドロームは動脈硬化性心血管疾患の危険因子である。メタボリック・シンドロームを有する症例においては内臓脂肪蓄積が重要因子であるため、その診断基準には簡単に測定できる腹囲が使用されている。しかし、腹囲には皮下脂肪も含んでおり内臓脂肪を正確に反映していない。CTは内臓脂肪と皮下脂肪を分けて計測できるため内臓脂肪の評価に用いられているが、被爆やコスト面より日常スクリーニング検査としては問題がある。一方、超音波検査は簡便な非観血的検査法で短時間に腹部内臓脂肪の評価を行なえるため、腹部内臓脂肪評価法としてよく使用されているが、冠動脈疾患との関連性を詳細に検討した報告はない。そこで申請者らは、超音波法で測定した腹部内臓脂肪厚が冠動脈疾患の有無や重症度との関連性を有するか

を検討した。

[方法]

2006年10月から2008年7月に冠動脈造影検査を施行した連続185例(男性123例、女性62例、平均年齢70.9歳)を対象とした。冠動脈造影検査を施行する前に、腹部超音波にて腹膜前最大内臓脂肪厚(Vmax)と最小皮下脂肪厚(Smin)を測定した。そして、冠動脈病変あり群となし群間で、腹部内臓脂肪厚及び他の動脈硬化の危険因子を比較検討した。さらに、冠動脈病変の重症度として病変枝数を用いVmaxとの関連も検討した。

[結果]

得られた結果は以下のように要約される。

- 1.冠動脈病変あり群(144例)は、なし群(41例)に比し腹囲(88.0 ± 9.5 cm vs. 84.0 ± 9.5 cm; $p < 0.05$)とVmax(8.8 ± 3.6 mm vs. 6.4 ± 2.8 mm; $p < 0.001$)は有意に大きかったが、Sminには有意差はなかった。
- 2.冠動脈病変の予測因子としてのROC曲線では、Vmaxが6.9mmで感度74%、特異度68%と最適のカットオフ値を示し、腹囲が84.5cmで感度63%、特異度54%と最適のカットオフ値を示した。
- 3.冠動脈病変を目的変数とした多変量解析では、Vmaxは独立した危険因子であったが(オッズ比3.710; $p = 0.008$)、腹囲は独立した危険因子ではなかった。
- 4.冠動脈病変枝数の増加とともにVmaxは増加した。

申請者らは、冠動脈造影を施行した連続185例において、腹部超音波法で計測した腹部内臓脂肪厚が冠動脈病変に対する独立した予測因子であることを始めて示した。

内臓脂肪厚の測定法としてはSuzukiらが報じた測定法を用いると、Vmaxの検者内変動係数4.3%、検者間変動係数6.7%と優れた検査の信頼性が得られた。またROC曲線を用いて冠動脈病変の有無を予測するための腹部内臓脂肪厚のカットオフ値を示し、超音波での評価が腹囲の計測より優れていることを示した。本研究により、臨床の場において簡便で非侵襲的に行える腹部超音波を施行することにより得られた腹部内臓脂肪厚が冠動脈硬化病変の存在および進展の予測に有用な指標であることが示された。したがって、本論文は高知大学博士(医学)に値すると評価された。