

2012. 12

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五十九号

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
甲総医博第9号	緒 方 巧 二	Upregulation of HNF-1 $\beta$ during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration  (HNF-1 $\beta$ の発現増加は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)	1
甲医博第142号	鉄 永 倫 子	T-reflex Studies in Human Upper Limb Muscles during Voluntary Contraction: Normative Data and Diagnostic Value for Cervical Radiculopathy.  (随意収縮下に誘発される上肢筋伸張反射(T波)：健康人と頸部神経根症における検討)	6

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第21号	今 城 雅 之	<p>Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients</p> <p>(本邦の子宮頸部扁平上皮癌ならびに腺癌におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出)</p>	11
乙総医博第22号	KANGJAM REKHA DEVI	<p>Molecular epidemiological studies on paragonimiasis and pulmonary tuberculosis in northeastern India</p> <p>1) Presence of three distinct genotypes within the Paragonimus westermani complex in northeastern India.</p> <p>2) Morphological and molecular characterization of Paragonimus westermani in northeastern India.</p> <p>3) Pleuropulmonary paragonimiasis due to Paragonimus heterotremus : molecular diagnosis, prevalence of infection and clinicoradiological features in an endemic area of northeastern India.</p> <p>(インド北東部における肺吸虫症と肺結核の疫学的並びに分子系統遺伝学的研究)</p> <p>1) (インド北東部におけるウエステルマン肺吸虫複合種に関する遺伝系統学的研究)</p> <p>2) (インド北東部におけるウエステルマン肺吸虫の形態的並びに分子的特徴に関する研究)</p> <p>3) (インド北東部における肺吸虫症(病原体 Paragonimus heterotremus) の分子診断、感染率並びに臨床所見)</p>	16

氏名(本籍)	緒方 巧二 (埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第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24年9月28日
学位論文題目	Upregulation of HNF-1 $\beta$ during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration  (HNF-1 $\beta$ の発現増加は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)
発表誌名	American Journal of Physiology (in press)

審査委員	主査	教授	藤枝 幹也
	副査	教授	椛 秀人
	副査	教授	執印 太郎

## 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 緒方 巧二

## 論文題目

Upregulation of HNF-1 $\beta$  during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration  
(HNF-1 $\beta$ の発現亢進は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)

(論文要旨)

[背景] 虚血性急性腎障害は、成人人口における急性腎障害 (AKI) の最も一般的な病態である。AKI 後の腎機能は約 3 割の症例で回復するが、障害を受けた尿細管の再生につながるメカニズムは不明な点が多い。虚血性 AKI の新たな治療戦略を検討する前に、腎細胞の増殖や再生につながるメカニズムの解明が必要である。尿細管上皮細胞は、細胞の損傷の後に脱分化 (dedifferentiation) し、Wnt-4 や Notch-2 などの胎生期の遺伝子が再発現し再生と修復に重要な役割を果たしていることを我々の研究室は報告している。Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) は腎臓、肝臓、膵臓及び他の上皮組織に発現する転写因子である。HNF-1 $\beta$  の遺伝子変異は若年性糖尿病と腎や生殖器の先天性奇形を引き起こす。最近では、HNF-1 $\beta$  は、SOCS-3 の転写を抑制するとともに、多発性嚢胞腎の責任遺伝子 (PKD2) を誘導し尿細管細胞の極性の形成に重要な役割を果たすとの報告されている。しかし、腎の虚血/再灌流で HNF-1 $\beta$  によって制御されるシグナル伝達経路および転写プログラムは不明である。

今回、AKI 後の尿細管の損傷における HNF-1 $\beta$ 、SOCS-3、STAT3 の機能的な役割を検討するとともに、尿細管細胞における HNF-1 $\beta$ 、SOCS-3、STAT3、Pkd1 のシグナル伝達経路を検討した。

[方法] ラット左腎動脈を 1 時間虚血後に再灌流し、2-48 時間後に HNF-1 $\beta$ 、SOCS3、PKD2 の蛋白発現を Western Blot と免疫組織学的に検討した。また培養近位尿細管細胞に HNF-1 $\beta$  を強制発現し、SOCS-3 の転写活性と蛋白発現を測定し、細胞増殖を検討した。3D ゲルの培養系において構造的非活性化と野生型の HNF-1 $\beta$  を強制発現した尿細管細胞の形態を検討した。

[結果] 虚血再灌流後の腎において、HNF-1 $\beta$  の発現と PKD2 の発現がそれぞれ 2-12 時間、6-24 時間で亢進し、組織学的にも近位尿細管で HNF-1 $\beta$  の発現亢進を認めた。一方 SOCS3 の発現は 6-24 時間で低下した。HNF-1 $\beta$  の強制発現により SOCS3 のプロモーター活性と蛋白発現は低下し、STAT3 のリン酸化は亢進した。また HNF-1 $\beta$  の強制発現で、

3D ゲル内における尿細管構造の発育は亢進した。それに対して構造的非活性型の HNF-1  $\beta$  を強制発現した尿細管細胞では 3D ゲルでの尿細管構造は形成されなかった。

[考察] 我々のグループによる以前の研究では、虚血性 AKI における Wnt-4 の発達遺伝子の発現を明らかにし、この遺伝子が腎尿細管細胞の増殖を促進することを確認した。また、Delta-1/Notch-2/Hes-1 経路は AKI の回復期近位尿細管において発現が増加していることを報告した。これらの論文から、胎生期遺伝子が AKI からの回復時に再発現し脱分化をおこすことが、尿細管の再生において重要な要因であることが考えられた。この仮説を確認するために、我々は、AKI モデルと腎尿細管細胞における HNF-1  $\beta$  の発現パターンとその伝達経路を検討した。

尿細管細胞再生のメカニズムとしては、HNF-1  $\beta$  は虚血/再灌流傷害後の近位尿細管細胞においてその発現が増加し、HNF-1  $\beta$  は SOCS-3 の発現および STAT3 の活性化を調節することにより、細胞増殖と尿細管形成を制御している。また HNF-1  $\beta$  / SOCS-3 の伝達経路は AKI 後の再生と腎尿細管細胞の増殖を調節している。今後虚血/再灌流傷害後の腎機能回復の分子機構のより正確な理解を得るためにさらなる検討が必要である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	緒方 巧二
審 査 委 員	主 査 氏 名	藤 枝 幹 也 
	副 査 氏 名	椛 秀 人 
	副 査 氏 名	執 印 太 郎 

題 目 Upregulation of HNF-1 $\beta$  during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration  
(HNF-1 $\beta$ の発現増加は急性腎障害での尿細管再生に重要な役割を果たす)

著 者 Koji Ogata, Yoshiko Shimamura, Kazu Hamada, Masayuki Hisa, Masayuki Bun, Nazuki Okada, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Masayuki Ishihara, Toru Kagawa, Taro Horino, Shimpei Fujimoto, Yoshio Terada

発表誌名、巻 (号)、ページ ( ~ ), 年 月  
American Journal of Physiology (in press)

### 要 旨

[背景] 虚血性急性腎障害は、成人人口における急性腎障害 (AKI) の最も一般的な病態である。AKI 後の腎機能は約 3 割の症例で回復するが、障害を受けた尿細管の再生につながるメカニズムは不明な点が多い。尿細管上皮細胞は、細胞の損傷の後に脱分化 (dedifferentiation) し、Wnt-4 や Notch-2 などの胎生期の遺伝子が再発現し再生と修復に重要な役割を果たしていることを著者らは報告している。Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) は腎臓、肝臓、膵臓及び他の上皮組織に発現する転写因子である。HNF-1 $\beta$  の遺伝子変異は若年性糖尿病 (MODY5) と腎や生殖器の先天性奇形を引き起こす。最近では、HNF-1 $\beta$  は、suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) の転写を抑制するとともに、多発性嚢胞腎の責任遺伝子 (*Pkd2*) を誘導し尿細管細胞の極性の形成に重要な役割を果たすとの報告されている。しかし、腎の虚血/再灌流で HNF-1 $\beta$  によって制御されるシグナル伝達経路および転写プログラムは不明である。

今回、AKI 後の尿細管の損傷における HNF-1 $\beta$ 、SOCS-3、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の機能的な役割を検討するとともに、尿細管細胞における HNF-1 $\beta$ 、SOCS-3、STAT3、*Pkd2* のシグナル伝達経路を検討した。

[方法] ラット左腎動脈を1時間虚血後に再灌流し、2-48時間後にHNF-1 $\beta$ 、SOCS-3、PKD2の蛋白発現をWestern Blotと免疫組織学的に検討した。また培養近位尿細管細胞にHNF-1 $\beta$ を強制発現し、SOCS-3の転写活性と蛋白発現を測定し、細胞増殖を検討した。3Dゲルの培養系において構造的な非活性化と野生型のHNF-1 $\beta$ を強制発現した尿細管細胞の形態を検討した。

[結果] 虚血再灌流後の腎において、Western blot解析でHNF-1 $\beta$ の発現とPKD2の発現がそれぞれ3-12時間、6-48時間で亢進し、組織学的にも近位尿細管でHNF-1 $\beta$ の発現亢進を認めた。一方SOCS-3の発現は3-48時間で低下した。ラット近位尿細管細胞(NRK-52細胞)でHNF-1 $\beta$ の強制発現によりSOCS3のプロモーター活性と蛋白発現は低下し、STAT3のリン酸化は亢進した。さらに、hepatocyt growth factor (HGF)の存在下でHNF-1 $\beta$ の発現が増加し、SOCS-3の発現は抑制された。またHNF-1 $\beta$ の強制発現で、3Dゲル内における尿細管構造の発育は亢進したが、構造的な非活性化型のHNF-1 $\beta$ を強制発現した尿細管細胞では3Dゲルでの尿細管構造は形成されなかった。

[考察] 著者らのグループは、以前、虚血性AKIにおけるWnt-4の発達遺伝子の発現を明らかにし、この遺伝子が腎尿細管細胞の増殖を促進することを確認している。また、Delta-1/Notch-2/Hes-1経路はAKIの回復期近位尿細管において発現が増加していることも報告している。これらの結果から、著者らは、AKIからの回復時に、胎生期遺伝子が再発現し脱分化をおこすことが、尿細管の再生において重要な要因であることを証明した。今回、この仮説を確認するために、AKIモデルと腎尿細管細胞におけるHNF-1 $\beta$ の発現パターンとその伝達経路を検討した。

その結果、HNF-1 $\beta$ は虚血/再灌流傷害後の近位尿細管細胞においてその発現が増加し、HNF-1 $\beta$ はSOCS-3の発現およびSTAT3の活性化を調節することにより、細胞増殖と尿細管形成を制御していることを示した。これらの事から、HNF-1 $\beta$ /SOCS-3の伝達経路は、AKI後の尿細管細胞の再生と増殖を調節していることを証明した。今後、虚血/再灌流傷害後の腎機能回復の分子機構のより正確な理解を得るために、さらなる検討が必要である。

以上、本論文は、AKI後の尿細管細胞の再生と増殖メカニズムを、HNF-1 $\beta$ /SOCS-3シグナル伝達系で証明した重要かつ貴重な研究であると考えられる。さらに、掲載誌も世界的に権威のあるjournalであり、今回の研究は、大学院博士(医学)の学位を授与されるに値する内容と思われる。

氏名(本籍)	鉄永倫子 (鳥取県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第142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11月30日
学位論文題目	T-reflex Studies in Human Upper Limb Muscles during Voluntary Contraction: Normative Data and Diagnostic Value for Cervical Radiculopathy. (随意収縮下に誘発される上肢筋伸張反射(T波): 健常人と頸部神経根症における検討)
発表誌名	Archives of Physical Medicine and Rehabilitation(in press)

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	由利	和也
	副査	教授	清水	恵司

## 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 鉄永倫子

## 論文題目

T-reflex Studies in Human Upper Limb Muscles  
during Voluntary Contraction: Normative Data and  
Diagnostic Value for Cervical Radiculopathy.

(随意収縮下に誘発される上肢筋伸張反射(T波): 健常人と頸部神経根症における検討)

(論文要旨)

【目的】T波は、筋伸張反射を複合筋活動電位として記録するものでH反射と異なり広くさまざまな筋から記録できる利点がある。しかし、すべての筋から誘発される訳ではなく随意収縮下に叩打刺激を加えることにより脊髄前角細胞を興奮させ通常腱反射を誘発できない筋でもT波をとらえることができる。そこで、本研究の目的は上肢筋伸張反射を安定して記録するために随意収縮下にT波を誘発し健常者における正常データと片側性頸部神経根症の診断的意義を検討することである。

【方法】対象は、健常者80人、平均年齢43歳(21~79歳)と、神経学的所見、画像診断所見および神経根ブロックに基づいて責任神経根が明らかな片側性頸部単一神経根症12例(C5:2例、C6:3例、C7:5例、C8:2例)、平均年齢53歳(40~75歳)で、informed consentのもとに行った。reflex hammerは先端に電極を備え、それが叩打部位に貼り付けたアルミ箔に接触した瞬間にトリガーパルスが発生して筋電計オシロスコープの掃引が駆動されるようにした。また、ハンマーは叩打力を標準化するためにインパクトセンサーを内蔵し、ある一定範囲の叩打力(加速度)に対してのみトリガーパルスが発生するようにした。対象筋には、上腕二頭筋(C5)、腕橈骨筋(C6)、上腕三頭筋(C7)、第一背側骨間筋(C8)を選択し、belly-tendon法に従って、関電極を筋腹中央に、基準電極を腱または骨上に設置し、両側について座位にて検査した。T波が安定して誘発されるように被験筋の等尺性随意収縮下に行い、その程度は、最大筋力の10~20%となるようにリアルタイム積分筋電計を用いて定量化した。リアルタイム積分筋電計は、T波記録用電極を利用して等尺性随意収縮の筋放電を記録し、まず、最大収縮時の500msec当たりの筋放電の積分値を記録し弱収縮時筋放電の積分値がその何%に相当するかをリアルタイムにデジタル表示されるように作成した。T波は、上腕二頭筋、腕橈骨筋、上腕三頭筋では10回の反応を、第一背側骨間筋は、50~100回の反応を加算平均しそれぞれ2回ずつ記録して再現性を確認した。加算平均したT波の開始潜時と、基線と陰性波頂点間の振幅を計測した。

【結果】健常者のT波検出率は、上腕二頭筋、腕橈骨筋は100%、上腕三頭筋は97%、第一背側骨間筋は95%であった。右側と左側の開始潜時と振幅の平均値はいずれの筋においても左右で有意差を認めなかった。T波潜時はArm Spanおよび年齢との間に有意な正の相関が認められ、それら2つの因子を従属変数とする重回帰分析ではさらに高い相関があり、Arm Spanと年齢から各筋のT波の正常潜時予測式とその正常上限を算出した。また、T波潜時の左右差の平均±SDはそれぞれ $0.4 \pm 0.4$ ms、

0.3±0.3ms、0.4±0.4ms、0.5±0.6ms であり、その正常上限を平均+2SD と定義すると、上腕二頭筋では 1.2ms、腕橈骨筋では 0.9ms、上腕三頭筋では 1.2ms、第一背側骨間筋では 1.7ms 以下と算出された。一方、T 波振幅の左右比(小さい方を大きい方で除した値)の平均±SD はそれぞれ 82±14%、71±19%、74±19%、76±16% であり、その正常下限を平均-2SD と定義すると上腕二頭筋では 54%、腕橈骨筋では 33%、上腕三頭筋では 36%、第一背側骨間筋では 44% と推定された。健常者のデータから得られたクライテリアを基準として、片側性頸部単一神経根症 12 例の T 波を検討すると、T 波潜時の左右差および振幅の左右比に基づいて感度 92%、特異度 81%、正確度 83% で責任神経根の診断が可能であった。また、左右の比較で異常と判定された T 波潜時の絶対値は、予測式をもとに算出された正常上限よりも長い値を示した。

【考察】上肢腱反射は、安定して誘発されにくいことから腰部神経根症における膝蓋腱反射(PTR)やアキレス腱反射(ATR)ほど臨床上重視されない傾向がある。そこでわれわれは、対象筋に一定の随意収縮を加えて反射中枢である脊髄運動ニューロンの興奮性を高めることにより、上肢腱反射を T 波として安定して記録する方法を考案した。事実、対象筋に随意収縮を加えることにより健常者 80 名において 95% 以上で両側とも T 波を検出することが可能であった。健常者 80 名の結果から、T 波潜時の左右差の平均+2SD 以上、振幅の左右比の平均-2SD 以下を異常と定義し責任神経根がすでに分かっている片側性頸部単一神経根症 12 例を検討すると、T 波潜時の左右差および振幅の左右比から感度 92%、特異度 81%、正確度 83% で C5、C6、C7、C8 根の異常を診断できることが明らかとなった。とくに、侵襲的な神経根ブロックでのみ診断が可能であった 5 例においては、T 波検査により非侵襲的な方法で責任神経根診断が可能であったことは臨床的意義が高いと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	鉄永倫子
審査委員	主査氏名	梶 秀人 
	副査氏名	由利 和也 
	副査氏名	清水 恵司 

**題 目** T-reflex Studies in Human Upper Limb Muscles during Voluntary Contraction: Normative Data and Diagnostic Value for Cervical Radiculopathy.  
 (随意収縮下に誘発される上肢筋伸張反射(T波)：健常人と頸部神経根症における検討)

**著 者** (Tomoko Tetsunaga, Toshikazu Tani, Masahiko Ikeuchi, Kenji Ishida, Kazunobu Kida, Nobuaki Tadokoro, Masahiro Ichimiya, Noriaki Nakajima, Hideshi Tsuboya, Shinichirou Taniguchi)

**発表誌名、巻(号)、ページ(～)、年 月**  
 Archives of Physical Medicine and Rehabilitation(in press)

### 要 旨

頸部神経根症は、骨棘などの頸椎症性変化による圧迫のため頸部神経根が障害される疾患である。本疾患の診断はおもに神経症状と画像診断によってなされる。しかし、画像による形態学的診断と神経症状が直接関連づけられない場合もある。そこで機能診断法である電気生理学的診断が必要かつ有用となる。腱を叩打して伸張反射を誘発し、複合筋活動電位として記録することができる。この腱の叩打により誘発された単シナプス反応を T 波という。T 波は末梢感覚神経の電気刺激で誘発される H 波とは異なり広くさまざまな筋から記録できる利点がある。頸部神経根と支配筋の対応から、上腕二頭筋、腕橈骨筋、上腕三頭筋、第一背側骨間筋の腱反射はそれぞれ C5、C6、C7、C8 神経根機能の指標となりうる。しかしながら、これまで C5～C8 の全レベルを対象に T 波の診断的意義をシステマチックに検討した報告はない。下肢筋に比較して上肢筋の T 波の報告が非常に少ないのは、上肢腱反射が安定して誘発されにくいことから腰部神経根症における膝蓋腱反射やアキレス腱反射ほど臨床上重視されない傾向があるためと申請者らは推察している。

そこで申請者らは上肢腱反射が安定して誘発されにくいという問題に対して、対象筋に一

定の随意収縮を加えて反射中枢の脊髄運動ニューロンの興奮性を高めることにより、上肢腱反射を T 波として安定して記録する方法を考案した。具体的には、T 波が安定して誘発されるように被験筋の等尺性随意収縮下で計測を行うという方法で、その際の筋力を最大収縮の何%に相当するかをリアルタイムにデジタル表示し、最大筋力の 10~20%に維持させた。さらに、加算平均することにより反射波のみを記録して、これを分析の対象とした。また、検者による T 波の検出の差異を是正するために腱を叩打するハンマーに加速度センサーを内蔵させ、反射誘発の叩打力は、叩打力判定装置を用いて一定範囲の叩打力の場合のみトリガーパルスが筋電計に入力されるように設定した。本法を用いて健常者 80 人における正常データと神経学的所見、画像診断所見および神経根ブロックに基づいて責任神経根が明らかな片側性頸部単一神経根症 12 例の診断的意義を検討した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 上腕二頭筋、腕橈骨筋は勿論のこと、上腕三頭筋や第一背側骨間筋においても 95%以上で両側とも T 波が検出された。
- 2) T 波の潜時および振幅の平均値はいずれの筋においても左右差を認めなかった。
- 3) T 波潜時は Arm Span および年齢との間に有意な正の相関が認められ、それら 2 つの因子を従属変数とする重回帰分析ではさらに高い相関があり、Arm Span と年齢から各筋の T 波の正常潜時予測式とその正常上限が得られた。
- 4) T 波潜時の左右差の正常上限 (平均+2SD) は、上腕二頭筋では 1.2 ms、腕橈骨筋では 0.9 ms、上腕三頭筋では 1.2 ms、第一背側骨間筋では 1.7 ms と算出された。
- 5) T 波振幅の左右比 (小さい方を大きい方で除した値) の正常下限 (平均- 2SD) は、上腕二頭筋では 54%、腕橈骨筋では 33%、上腕三頭筋では 36%、第一背側骨間筋では 44%と算出された。
- 6) 以上の正常値を基準に片側性頸部単一神経根症 12 例の T 波潜時の左右差および振幅の左右比の値を評価すると、感度 92%、特異度 81%、正確度 83%で責任神経根の診断が可能であった。
- 7) 左右の比較で異常と判定された T 波潜時の絶対値は、予測式をもとに算出された正常上限を超えていた。

以上の成績は、頸部神経根 C5~C8 の全レベルを対象に Arm Span と年齢に応じた T 波の正常値を明らかにすると共に、得られた判定基準に基づいて頸部神経根症の責任神経根の診断が高い精度で可能であることを証明したものであり、臨床神経生理学的に高く評価される。今後、身体検査で運動障害も感覚障害もみられない患者において本法で責任神経根の診断が可能であるか否か、さらなる研究が期待される。

本論文は脊髄疾患の機能診断法の確立のみならず、治療の向上にも大きく寄与することが期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	今城雅之 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第21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12月18日
学位論文題目	Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients (本邦の子宮頸部扁平上皮癌ならびに腺癌におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出)
発表誌名	Virology Journal 9 (1) : 154、2012年8月

審査委員	主査	教授	藤枝	幹也
	副査	教授	小林	道也
	副査	教授	佐野	栄紀

## 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 今城 雅之

## 論文題目

Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients  
(本邦の子宮頸部扁平上皮癌ならびに腺癌におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出)

(論文要旨)

### 【研究の背景と目的】

メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)はヒトに癌を惹起する第7番目の腫瘍ウイルスとして、2008年に報告された新しいポリオーマウイルスである。MCPyVは当初、メルケル細胞癌と呼ばれる稀な皮膚癌から発見された。メルケル細胞癌は白色人種で特に多いことから、米国や欧州諸国では活発な研究が行われている。アジア地域における検出例の報告はまだ少ないが、本邦のメルケル細胞癌の55~80%からMCPyVが検出されることがこれまでに報告された。現在、MCPyVの研究では、その細胞指向性が解明されていない背景から、MCPyVと他の腫瘍疾患との関連性について注目が集まっている。本研究では、次に挙げた2つの理由、すなわち、一つは、子宮頸部はメルケル細胞癌と組織学的に近似した神経内分泌癌が発生し得る部位であること、もう一つは、MCPyVが性的接触から感染する可能性があることから、子宮頸癌におけるMCPyVの検出を行うことを目的とした。さらに、MCPyVとヒトパピローマウイルス(HPV)との相互関係についても調べた。

### 【材料と方法】

64例の子宮頸癌パラフィン包埋標本からDNAを抽出した。組織学的内訳として、扁平上皮癌(SCC)が48症例と腺癌(AC)が16症例であった。MCPyVゲノムの検出は、腫瘍蛋白 large T(LT)抗原とウイルス構造蛋白 viral protein 1(VP1)のコード領域を標的にしたプライマーを用いたPCR法で行った。PCR増幅産物はゲル精製により回収し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。PCR法で判定したMCPyV陽性検体を用いて、さらに、small T抗原のコード領域標的のTaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法によるMCPyVゲノムの定量、GP5+/GP6+プライマーを用いたシーケンス解析によるHPVのタイピング、抗LT抗体を用いた免疫組織染色法によるLT抗原の発現解析をそれぞれ行った。

## 【結果】

PCR法の結果、LT領域でのMCPyV陽性例は、SCCが48例中8例、ACが16例中1例、VP1領域でのMCPyV陽性例は、SCCが48例中2例、ACが16例中3例となり、累計でSCCが48例中9例(19%)、ACが16例中4例(25%)となった。また、リアルタイムPCR法の結果から、これらの1細胞あたりのMCPyVゲノムのコピー数は、メルケル細胞癌と比べて極めて低い値を示した。シーケンス解析の結果、LT領域の塩基配列はSCC8例とAC1例ともに全て同一であった。一方で、VP1領域の塩基配列では、SCC2例とAC3例で塩基置換が複数箇所から見つかり、そのうち、3875番目、3919番目および3994番目の塩基置換はさらにアミノ酸置換を伴っていた。免疫組織染色法の結果、SCC、AC例ともに、LT抗原の発現を示すシグナルが観察され、多くは癌細胞の核に局在していた。HPVのタイピングの結果、MCPyVが検出されたSCC9例のうち、6例から16型、1例から31型、2例から58型、またAC4例のうち、2例から16型、2例から18型のHPVがそれぞれ検出され全て高リスク型のHPVであった。

## 【考察】

本研究から、MCPyVが一部の子宮頸癌で存在することを初めて明らかにした。その陽性率とウイルスゲノム量については組織型の間で大きな差は認められなかった。MCPyVのVP1領域のアミノ酸配列の違いから3つの変異株が見つかり、子宮頸癌でのMCPyVの遺伝的多様性が示された。子宮頸癌の病因にはHPVが密接に関係することが知られているが、MCPyV陽性であるSCC9例とAC2例からも例外なく高リスク型HPVが検出された。その一方で、MCPyVの発癌機序の役割を担うLT抗原の発現とその核局在も同時に確認された。このことは、子宮頸癌におけるMCPyVの病因的意義を示唆する重要な知見であり、HPVの多段階発癌機序にMCPyVが関与する可能性がある。今後、MCPyVの腫瘍ウイルスとしての病原性が子宮頸癌のどの発癌過程でどのように発揮されるのかをより詳細に調べていく必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	今 城 雅 之
審査委員	主査氏名	藤枝 幹也 
	副査氏名	小林 道也 
	副査氏名	佐野 栄紀 

題 目      Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients  
 (本邦の子宮頸部扁平上皮癌ならびに腺癌におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出)

著 者      Masayuki Imajoh, Yumiko Hashida, Yuiko Nemoto, Hiroyoshi Oguri, Nagamasa Maeda, Mutsuo Furihata, Takao Fukaya, Masanori Daibata

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Virology Journal 9 (1) : 154、2012年8月

### 要 旨

[背景] メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)は、ヒトに癌を惹起する第7番目の腫瘍ウイルスとして2008年に報告された新しいポリオーマウイルスである。MCPyVはメルケル細胞癌と呼ばれる皮膚癌から発見された。わが国では、この細胞癌患者の55-80%にMCPyVが検出されているが、近年、他の腫瘍疾患との関連が注目されている。今回の研究では、1)子宮頸部はメルケル細胞と類似した神経内分泌癌が発生する可能性のある部位である、2)MCPyVが性交渉により感染する可能性のあること、の2点から子宮頸癌におけるMCPyVの検出を試みることに同時に、ヒトパピローマウイルス(HPV)との相互関係について検討した。

[方法] 64例の子宮頸癌パラフィン包埋標本からDNAを抽出した。組織型は、扁平上皮癌(SCC)48例と腺癌(AC)16例であった。MCPyVゲノムの検出は、腫瘍蛋白Large T(LT)抗原とウイルス構造蛋白Viral protein 1 (VP1)のコード領域を標的としたプライマーを用いたPCR法で行い、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。PCRで陽性の検体において、1)small T抗原のコード領域標的のTaqManプロロー

ブを用いた Real-time PCR 法で MCPyV ゲノム量を測定し、2)GP5+/GP6+プライマーを用いたシーケンス解析により HPV のタイピングを行った。さらに 3)抗 LT 抗体による免疫組織染色による LT 抗原の発現解析を行った。

[結果] MCPyV 陽性頻度は、LT 領域は SCC が 8/48 例、AC が 1/16 例であり、VP1 領域では SCC が 2/48 例、AC が 3/16 例であり、合計で SCC が 9/48 例(19%)、AC が 4/16 例(25%)であった。Real-time PCR 法による検討では、1 細胞あたりの MCPyV ゲノム数はメルケル細胞癌に比して著しく低値であった。

LT 領域の塩基配列は、SCC8 例と AC1 例は全て同一であったが、VP1 領域では、SCC2 例と AC3 例では複数の塩基置換がみられ、3875、3919 および 3994 番目の塩基置換はアミノ酸置換を伴っていた。

免疫組織染色では、LT 抗原の発現が観察され、多くは癌細胞核に局在していた。

HPV タイピングでは、SCC9 例のうち 6 例から 16 型、1 例から 31 型、2 例から 58 型が検出され、AC4 例のうち 2 例が 16 型、残り 2 例に 18 型が検出され、いずれも高リスクに子宮頸癌を発症する型であった。

[考察] 一部の子宮頸癌に MCPyV が存在することを始めて報告した。子宮頸癌の組織型によるウイルス陽性率とゲノム数に差は認められなかった。MCPyV の VP1 領域のアミノ酸配列から 3 つの変異株が認められた。MCPyV 陽性の組織からは高リスク型の HPV が検出された。同時に MCPyV の発癌機序を担う LT 抗原の発現とその局在は癌細胞核に認められた。

以上から、MCPyV は子宮頸癌の発症に関与しており、HPV の発癌機序に MCPyV が関与している効能性が示唆された。今後は、MCPyV の腫瘍ウイルスとしての病原性が、子宮頸癌発症のどの段階で発揮されているか調べていく必要がある。

以上、本論文は、子宮頸癌における MCPyV の病因的意義を示唆する初めての研究であり、かつ子宮頸癌の発癌機序を解明していく上で非常に貴重な研究であると考えられる。加えて、掲載誌も世界的に権威のある Journal であり、今回の研究は、高知大学博士(医学)の学位を授与されるに値する内容と思われる。

氏名(本籍) KANGJAM REKHA DEVI (インド)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 乙総医博第22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12月18日

学位論文題目

Molecular epidemiological studies on paragonimiasis and pulmonary tuberculosis in northeastern India

- 1) Presence of three distinct genotypes within the *Paragonimus westermani* complex in northeastern India.
- 2) Morphological and molecular characterization of *Paragonimus westermani* in northeastern India.
- 3) Pleuropulmonary paragonimiasis due to *Paragonimus heterotremus* : molecular diagnosis, prevalence of infection and clinicoradiological features in an endemic area of northeastern India.

(インド北東部における肺吸虫症と肺結核の疫学的並びに分子系統遺伝学的研究)

- 1) (インド北東部におけるウエステルマン肺吸虫複合種に関する遺伝系統学的研究)
- 2) (インド北東部におけるウエステルマン肺吸虫の形態的並びに分子的特徴に関する研究)
- 3) (インド北東部における肺吸虫症(病原体 *Paragonimus heterotremus*)の分子診断、感染率並びに臨床所見)

発表誌名

- 1) Parasitology, Accepted
- 2) Acta Tropica, (116), (31~38), 2010年5月
- 3) Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, (101), (786~792), 2007年4月

審査委員 主査 教授 菅沼 成文  
副査 教授 杉浦 哲朗  
副査 教授 岩崎 泰正

## 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 カンジャム・レッカ・デビ

## 論文題目

Molecular epidemiological studies on paragonimiasis  
and pulmonary tuberculosis in northeastern India  
(インド北東部における肺吸虫症と肺結核の疫学的  
並びに分子系統遺伝学的研究)

(論文要旨)

肺吸虫症は、Neglected Tropical Diseases の中の一つであるが (PLOS Neglected Tropical Diseases; [www.plosntd.org](http://www.plosntd.org))、グローバルには、なおも 3 百万もの人々が感染していると推定されている (Keiser & Utzinger, 2005)。一般に肺吸虫症と肺結核との誤診は、よく知られるが、実際、インドでは、この誤診により、患者の不必要な治療投薬による強い副作用、入院生活の精神的負担、医療経済的負担等など、現在でも無視できない大きな問題となっている (Narain *et al.*, 2009)。一方、肺吸虫症の病原体である *Paragonimus westermani* ウエステルマン肺吸虫は、インドベンガルで初めて記載された。その後、世界的な疫学調査の結果、ウエステルマン肺吸虫による肺吸虫症例がよく知られるようになった。日本や中国でも、過去において多くの症例報告があり、現在でも散発的ではあるがウエステルマン肺吸虫による症例が報告されている。

本学位申請者は、2008 年 7 月から 2010 年 6 月までインド北東部のアランナッチャル・プラデッシュ州及びアッサム州で肺吸虫症と肺結核の調査を行った。調査対象者は、63 の村の 5 歳以上計 4,371 人 (アッサム州 1,410 人、アランナッチャル・プラデッシュ州 2,961 人) であった。まずランダムに選択した住民を家族単位で訪問し、咳漱、血痰の有無とその程度などについて問診した。そして、1 週間以上咳漱を有し、喀痰を提供した住民について、ELISA 検査と AFB 検査を行った。その結果、肺吸虫症調査では、アランナッチャル・プラデッシュ州とアッサム州においてそれぞれ 7.6%、1.2% ELISA 検査陽性であった。さらに active 肺吸虫症の病原体の同定を試みるため、喀痰虫卵サンプルからリボソーム RNA 遺伝子の ITS2 を PCR 増幅し、塩基配列を調べたところ、すべての症例で *P. heterotremus* 広口肺吸虫であること証明した。また、肺結核 AFB 調査では、アランナッチャル・プラデッシュ州とアッサム州において 2.64%、11.6% がそれぞれ陽性であり、アッサム州に多いことが分かった。また、血痰は、肺吸虫症患者の 40.2%、結核患者の 16.7% に見いだされた。

本学位申請者は、次にアランナッチャル州、アッサム州、メガリア州の 3 州の肺吸虫症流行地に生息している第二中間宿主カニの感染調査を行い、これら 3 州には、上記の広口

肺吸虫 *P. heterotremus* とともに、大量のウエステルマン肺吸虫の感染を認めた。さらに、ウエステルマン肺吸虫には同所的に存在する、形態的に異なった、2つのタイプが存在することも明らかにした。これらのタイプをミトコンドリア DNA の *cox1*、リボソーム RNA 遺伝子の ITS2 と 28S の3領域の塩基配列を調べ、遺伝子解析ソフト MEGA 5 にて解析したところ、1つのタイプは、独立種であると思われる、極めて古い時代に分岐した系統であること、もう1つのタイプは、ウエステルマン肺吸虫グループの近縁種である *P. siamensis* であることを明らかにした。

これまでの結果から明らかなように、ウエステルマン肺吸虫による感染者は未だ見つかっていない。これは、インドのウエステルマン肺吸虫にヒトへの感染能が低いためか、あるいは、単に症例数が少ないためか、不明である。上述したように、ウエステルマン肺吸虫による肺吸虫症と疑われた患者の喀痰虫卵の DNA 分析を行ったところ、全ての症例でヒロクチ肺吸虫 *P. heterotremus* によるものであることを見出した (Rekha *et al.*, 2007)。これらの調査以降、インド産のウエステルマン肺吸虫はヒト感染性が皆無か、極めて弱いものと考えられるようになった (Narain *et al.*, Taylor & Francis, 815-825, 2009)。一方、スリランカ、タイ、マレーシアなどの東南アジアにおいては、病原体であるウエステルマン肺吸虫の存在は確認されているが、驚くべきことに、その症例は全く報告されていない。ウエステルマン肺吸虫による肺吸虫症の症例の大部分は、日本、中国、韓国など東アジアからの報告である。

最近、このインド北東部で3つ目の新しいタイプが発見された。このタイプは、内膜が薄く球状で、前二者とも異なり、既に述べた3つの領域 (*cox1* 領域、ITS2、28S) を遺伝子解析ソフト MEGA 5 にて解析したところ、東アジアの系統に極めて近縁であること、すなわち、ヒトに感染するタイプと極めて類似することが明らかとなった。このことから、この地区の症例は、今後、詳細な疫学的調査を要することが強く暗示された。

このように本申請者は、インド北東部のこれら3つの州 (アッサム、アランナッチャル・プラデッシュ、メガラヤ) の肺吸虫症及び肺結核に焦点をあて、肺吸虫症と肺結核の疫学的研究を行い、さらに病原体肺吸虫の形態学的、生態学的、分子系統学的解析を行い、インド北東部における肺吸虫症と肺結核の実態並びに肺吸虫症病原体の種鑑別を浮き彫りにした。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名		カンジャム・レッカ・デビ
審査委員	主 査 氏 名	菅 沼 成 文	
	副 査 氏 名	岩 崎 泰 正	
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗	

- 題 目 Molecular epidemiological studies on paragonimiasis and pulmonary tuberculosis in northeastern India  
 (インド北東部における肺吸虫症と肺結核の疫学的並びに分子系統遺伝学的研究)
- 1) Presence of three distinct genotypes within the *Paragonimus westermani* complex in northeastern India.  
 (インド北東部におけるウエステルマン肺吸虫複合種に関する遺伝系統学的研究)
  - 2) Morphological and molecular characterization of *Paragonimus westermani* in northeastern India.  
 (インド北東部におけるウエステルマン肺吸虫の形態的並びに分子的特徴に関する研究)
  - 3) Pleuropulmonary paragonimiasis due to *Paragonimus heterotremus* : molecular diagnosis, prevalence of infection and clinicoradiological features in an endemic area of northeastern India.  
 (インド北東部における肺吸虫症 (病原体 *Paragonimus heterotremus*) の分子診断、感染率並びに臨床所見)

著 者 (共著者を含む)

- 1) K. REKHA DEVI, KANWAR NARAIN, JAGADISH MAHANTA, TULIKA NIRMOLIA, DAVID BLAIR, SIDHARTHAP. SAIKIA and TAKESHI AGATSUMA
- 2) K. Rekha Devi, Kanwar Narain, Takeshi Agatsuma, David Blair, Mitsuru Nagataki, S. Wickramasinghe, L. Yatawara, Jagadish Mahanta.
- 3) K. Rekha Devi, Kanwar Narain, S. Bhattacharya, K. Negmu, Takeshi Agatsuma, David Blair, S. Wickramashinghe, J. Mahanta.

発表誌名、巻 (号)、ページ ( ~ )、

- 1) Parasitology, Accepted
- 2) Acta Tropica, (116)、(31~38)
- 3) Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, (101)、(786~792)

発表年月(日)

- 1) 2012 年 8 月
- 2) 2010 年 5 月
- 3) 2007 年 4 月

## 要 旨

肺吸虫症は、Neglected Tropical Diseases の中の一つであるが (PLOS Neglected Tropical Diseases; [www.plosntd.org](http://www.plosntd.org))、グローバルには、なおも3百万もの人々が感染していると推定されている (Keiser & Utzinger, 2005)。一般に肺吸虫症と肺結核との誤診は、よく知られるが、実際、インドでは、この誤診により、患者の不必要な治療投薬による強い副作用、入院生活の精神的負担、医療経済的負担等など、現在でも無視できない大きな問題となっている (Narain *et al.*, 2009)。一方、肺吸虫症の病原体である *Paragonimus westermani* ウエステルマン肺吸虫は、インドベンガルで初めて記載された。その後、世界的な疫学調査の結果、ウエステルマン肺吸虫による肺吸虫症例がよく知られるようになった。日本や中国でも、過去において多くの症例報告があり、現在でも散発的ではあるがウエステルマン肺吸虫による症例が報告されている。

本学位申請者は、2008年7月から2010年6月までインド北東部のアランナッチャル・プラデッシュ州及びアッサム州で肺吸虫症と肺結核の調査を行った。調査対象者は、63の村の5歳以上計4,371人 (アッサム州1,410人、アランナッチャル・プラデッシュ州2,961人) であった。まずランダムに選択した住民を家族単位で訪問し、咳漱、血痰の有無とその程度などについて問診した。そして、1週間以上咳漱を有し、喀痰を提供した住民について、ELISA検査とAFB検査を行った。その結果、肺吸虫症調査では、アランナッチャル・プラデッシュ州とアッサム州においてそれぞれ7.6%、1.2%ELISA検査陽性であった。さらに active 肺吸虫症の病原体の同定を試みるため、喀痰虫卵サンプルからリボソームRNA遺伝子のITS2をPCR増幅し、塩基配列を調べたところ、すべての症例で *P. heterotremus* 広口肺吸虫であること証明した。また、肺結核AFB調査では、アランナッチャル・プラデッシュ州とアッサム州において2.64%、11.6%がそれぞれ陽性であり、アッサム州に多いことが分かった。また、血痰は、肺吸虫症患者の40.2%、結核患者の16.7%に見いだされた。

本学位申請者は、次にアランナッチャル州、アッサム州、メガリア州の3州の肺吸虫症流行地に生息している第二中間宿主カニの感染調査を行い、これら3州には、上記の広口肺吸虫 *P. heterotremus* とともに、大量のウエステルマン肺吸虫の感染を認めた。さらに、ウエステルマン肺吸虫には同所的に存在する、形態的に異なった、2つのタイプが存在することも明らかにした。これらのタイプをミトコンドリアDNAのcox1、リボソームRNA遺伝子のITS2と28Sの3領域の塩基配列を調べ、遺伝子解析ソフトMEGA5にて解析したところ、1つのタイプは、独立種であると思われる、極めて古い時代に分岐した系統であること、もう1つのタイプは、ウエステルマン肺吸虫グループの近縁種である *P. siamensis* であることを明らかにした。

これまでの結果から明らかのように、ウエステルマン肺吸虫による感染者は未だ見つかっていない。これは、インドのウエステルマン肺吸虫にヒトへの感染能が低いためか、あるいは、単に症例数が少ないためか、不明である。上述したように、ウエステルマン肺吸虫による肺吸虫症と疑われた患者の喀痰虫卵のDNA分析を行ったところ、全ての症例でヒロクチ肺吸虫 *P. heterotremus* によるものであることを見出した (Rekha *et al.*, 2007)。これらの調査以降、インド産のウエステルマン肺吸虫はヒト感染性が皆無か、極めて弱いものと考えられるようになった (Narain *et al.*, Taylor & Francis, 815-825, 2009)。一方、スリランカ、タイ、マレーシアなどの東南アジアにおいては、病原体であるウエステルマン肺吸虫の存在は確認されているが、驚くべきことに、その症例は全く報告されていない。ウエステルマン肺吸虫による肺吸虫症の症例の大部分は、日本、中国、韓国など東アジアからの報告である。

最近、このインド北東部で3つ目の新しいタイプが発見された。このタイプは、内膜が薄く球状で、前二者とも異なり、既に述べた3つの領域 (cox1領域、ITS2、28S) を遺伝子解析ソフトMEGA5にて解析したところ、東アジアの系統に極めて近縁であること、すなわち、ヒトに感染するタイプと極めて類似することが明らかとなった。このことから、この地区の症例は、今後、詳細な疫学的調査を要することが強く暗示された。

このように本申請者は、インド北東部のこれら3つの州 (アッサム、アランナッチャル・プラデッシュ、メガラヤ) の肺吸虫症及び肺結核に焦点をあて、肺吸虫症と肺結核の疫学的研究を行い、さらに病原体肺吸虫の形態学的、生態学的、分子系統学的解析を行い、インド北東部における肺吸虫症と肺結核の実態並びに肺吸虫症病原体の種鑑別を浮き彫りにした。