

2017. 1

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八十五号

総務課広報係発行

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157号 | 吉岡 玲子 | Functional Role of Estrogen for Regulation of Serum Uric Acid Levels in Pre-Menopause Patients with Breast Cancer (閉経前乳がん患者の血清尿酸値調節におけるエストロゲンの役割について) | 1 |
| 甲総医博第50号 | 朝比奈 大道 | DISTRIBUTION OF PROTOCADHERIN 9 PROTEIN IN THE DEVELOPING MOUSE NERVOUS SYSTEM (発達期のマウス神経系における細胞接着分子プロトカドヘリン9タンパクの分布) | 6 |
| 甲総医博第51号 | 難波 利治 | Activation of arginine vasopressin receptor 1a facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb of male mice (アルギニンバソプレッシン受容体1aの活性化は雄マウスの副嗅球における長期増強の誘導を促進する) | 11 |
| 甲総医博第52号 | 宮崎 涼平 | In Vitro Drug Sensitivity Tests to Predict Molecular Target Drug Responses in Surgically Resected Lung Cancer (肺癌における分子標的薬剤の臨床的効果を予測する培養法の確立) | 16 |

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 吉岡 玲子 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第157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28年11月29日 |
| 学位論文題目 | Functional Role of Estrogen for Regulation of Serum Uric Acid Levels in Pre-Menopause Patients with Breast Cancer (閉経前乳がん患者の血清尿酸値調節におけるエストロゲンの役割について) |
| 発表誌名 | International Medical Journal Vol. 22 No. 5, pp. 371-374 October 2015 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 山口 | 正洋 |
| | 副査 | 教授 | 藤本 | 新平 |
| | 副査 | 教授 | 前田 | 長正 |

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

吉岡 玲子

論文題目

Functional Role of Estrogen for Regulation of Serum Uric Acid Levels in Pre-Menopause Patients with Breast Cancer
(閉経前乳がん患者の血清尿酸値調節におけるエストロゲンの役割について)

(論文要旨)

背景・目的：血清尿酸値は性別や遺伝的要因、さらには環境因子やライフスタイル、メタボリックシンドロームなど様々な要因や疾患、状況によって調節されており、腎機能障害やメタボリックシンドロームの臨床的マーカーおよび心血管系疾患の重要な予測因子としての有用性が指摘されている。近年、肥満や過食、運動不足などの要因によるメタボリックシンドローム患者の増加に伴い高尿酸血症の患者数も増加している。

高尿酸血症および痛風は発症率に著しい性差がある疾患の一つであり男性に多いことは良く知られている。男性において血清尿酸値は思春期まで増加し、それ以降はほぼプラトーに達するのに対し、女性では血清尿酸値は閉経後に増加し成人男性とほとんど同じレベルに達する。また妊娠中の女性では血清エストラジオール値が上昇することにより血清尿酸値は明らかに減少することから、性ホルモン、特にエストロゲンが血清尿酸値の調節に重要な役割を果たしていると考えられてきた。しかし、閉経後や薬物などによるエストロゲン阻害の状況下での血清尿酸値の調節については明らかにされていない。そこで今回私は、エストロゲンレセプター阻害薬（タモキシフェン）にて治療を受けた閉経前、閉経後乳がん患者を対象に、治療前と治療後の血清尿酸値と血清クレアチニン値の変化に注目して、エストロゲンによる血清尿酸値調節機序および腎機能に対する影響について検討を行った。

方法：少なくとも5年間エストロゲンレセプター阻害薬であるタモキシフェンで治療を受けている乳がん患者234人について、閉経前および閉経後の血清尿酸値と血清クレアチニン値をタモキシフェン投与前後で比較検討した。なお、血清尿酸値、血清クレアチニン値に影響を与えらると思われる尿酸低下薬や抗癌剤による治療中の患者は本研究対象者から除外した。




結果：タモキシフェン治療開始前における閉経後患者の血清尿酸値の分布は、閉経前患者と比較して全体的に高い値にシフトしていた。また、治療前の閉経後患者の平均血清尿酸値 ($4.65 \pm 1.25 \text{mg/dl}$) は閉経前患者の平均血清尿酸値 ($4.29 \pm 0.98 \text{mg/dl}$, $p < 0.05$) に比べ明らかに高値であった。一方、血清尿酸値に影響を与えらる血清クレアチニン値や空腹時血糖値については両群間に有意な差は認めなかった。次に、本研究の全乳がん患者234人のタモキシフェン治療5年間の血清尿酸値の経時的変化について検討したところ、血清尿酸値は治療1年後に明らかに上昇したが、その後プラトーとなった。そこで、エストロゲン阻害による血清尿酸値に対する影響についてさらに詳細に調べるために、閉経前患者と閉経後患者に分け、血清尿酸値の経時

変化についてそれぞれ比較検討した。閉経前患者の血清尿酸値は、タモキシフェン治療一年後には増加し ($4.29 \pm 0.98 \text{mg/dl}$ から $4.65 \pm 1.05 \text{mg/dl}$, $p < 0.01$)、その値は閉経後患者の治療前値にまで達した。一方、閉経後患者においては、治療開始前の血清尿酸値は閉経前患者よりも明らかに高値であったが、治療後の経過においても有意な上昇は見られなかった。

血清尿酸値は腎機能に影響されると考えられているものの、その詳細なメカニズムは明らかではない。このため本研究の乳がん患者 234 人における治療前の血清クレアチニン値と血清尿酸値の相関を検討したところ明らかな正の相関関係を認めた ($r = 0.3396, p < 0.0001$)。このことから腎機能低下は血清尿酸値上昇に寄与する因子であることが改めて明らかとなった。そこで本研究における血清尿酸値に対する血清クレアチニン値の影響についても検討する目的で、閉経前患者、閉経後患者における治療前、治療後の変化について評価を行った。タモキシフェン治療開始 1 年後の血清尿酸値は、閉経前患者においては明らかな上昇を認めたが、閉経後患者では有意な上昇を認めなかった。一方、治療前血清クレアチニン値については前述のとおり閉経前、閉経後患者両群において有意差は認めず、タモキシフェン治療後においても両群ともに明らかな上昇は認めなかった。以上のことより、閉経前、閉経後にかかわらずタモキシフェン治療によるエストロゲン阻害により血清クレアチニン値の上昇は認めず、閉経前患者でのエストロゲン阻害による血清尿酸値上昇は腎機能低下を介した作用ではないことが明らかとなった。

結論：エストロゲンは腎機能に大きな影響を与えることなく血清尿酸値を低下させる作用を有しており、タモキシフェン治療による血清尿酸値の上昇は、エストロゲン阻害が腎機能低下を介さずに尿酸値を上昇させているものと考えられた。本研究は、エストロゲン阻害によるタモキシフェン誘発非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発症機序解明に向けての当科の長年の研究過程において、エストロゲン阻害と高尿酸血症発症に注目したことが契機となった研究成果である。今後は高尿酸血症を含めたメタボリックシンドロームと NASH との関係についてさらなる検討を続けていきたい。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|------|------|---|
| | 氏名 | 吉岡 玲子 |
| 審査委員 | 主査氏名 | 山口 正洋  |
| | 副査氏名 | 藤本 新平  |
| | 副査氏名 | 前田 長正  |

題目 Functional Role of Estrogen for Regulation of Serum Uric Acid Levels in Pre-Menopause Patients with Breast Cancer
(閉経前乳がん患者の血清尿酸値調節におけるエストロゲンの役割について)

著者 Reiko Yoshioka, Masafumi Ono, Keisuke Oe, Tsunehiro Ochi, Kensuke Munekage, Kosei Masuda, Hiroshi Mizuta, Nobuto Okamoto, Toshiji Saibara

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
International Medical Journal Vol. 22 No. 5, pp. 371-374, October 2015

要 旨

背景・目的:

血清尿酸値は遺伝的要因、環境因子、様々な病態によって調節されており、腎機能障害やメタボリックシンドロームの臨床的マーカーおよび血管系疾患の重要な予測因子としての有用性が指摘されている。近年、肥満や過食、運動不足などの要因によるメタボリックシンドローム患者の増加に伴い高尿酸血症の患者数も増加している。

高尿酸血症および痛風が男性に多いことはよく知られている。また、女性では血清尿酸値は閉経後に増加し、また妊娠中の血清エストラジオール値の上昇によって血清尿酸値は減少する。これらのことから、性ホルモン、特にエストロゲンが血清尿酸値の調節に重要な役割を果たしていると考えられてきた。しかし、閉経後の女性や、薬物などによるエストロゲン阻害下での血清尿酸値の調節については明らかにされていない。

そこで申請者は、エストロゲンレセプター阻害薬(タモキシフェン)にて治療を受けた閉経前、閉経後乳がん患者を対象に、治療前と治療後の血清尿酸値と血清クレアチニン値の変化に着目して、エストロゲンによる血清尿酸値調節機序および腎機能に対する影響について検討した。

方法:

少なくとも5年間タモキシフェンによる治療を受けている乳がん患者 234 人について、閉経前患者および閉経後患者の血清尿酸値と血清クレアチニン値をタモキシフェン投与前後で比較し

た。血清尿酸値、血清クレアチニン値に影響を与えると思われる尿酸低下薬や抗癌剤による治療中の患者は本研究対象者からは除外した。

結果：

タモキシフェン治療前の血清尿酸値の分布は、閉経後患者において閉経前患者より高い値にシフトしていた。その平均値も閉経後患者 ($4.65 \pm 1.25 \text{ mg/dl}$) は閉経前患者 ($4.29 \pm 0.98 \text{ mg/dl}$) に比べ高値であった ($p < 0.05$)。一方、血清尿酸値に影響を与えると考えられる血清クレアチニン値や空腹時血糖については両群間に有意な差は認めなかった。

次に、本研究の全乳がん患者 234 人のタモキシフェン治療 5 年間の血清尿酸値の経時的変化を検討したところ、治療 1 年後に明らかに上昇したがその後プラトーとなった。全乳がん患者を閉経前患者と閉経後患者に分け、血清尿酸値の経時的変化をそれぞれ比較検討したところ、閉経前患者の血清尿酸値はタモキシフェン治療 1 年後には増加し ($4.29 \pm 0.98 \text{ mg/dl}$ から $4.65 \pm 1.05 \text{ mg/dl}$, $p < 0.01$)、その値は閉経後患者の治療前値にまで達した。一方、閉経後患者においては、治療開始前の血清尿酸値は閉経後患者よりも明らかに高値であったが、治療後の経過で有意な上昇は見られなかった。

血清尿酸値は腎機能に影響されると考えられているがその詳細なメカニズムは明らかではない。本研究の全乳がん患者 234 人における治療前の血清クレアチニン値と血清尿酸値の相関を検討したところ明らかな正の相関関係を認め ($r = 0.3396$, $p < 0.0001$)、このことから腎機能低下は血清尿酸値上昇に寄与する因子であることが改めて明らかとなった。

そこで、本研究で観察された血清尿酸値の変化に対する腎機能の影響を検討した。前述した血清尿酸値の閉経前、閉経後患者における差異、タモキシフェン治療による上昇の一方で、血清クレアチニン値は、治療前には閉経前患者、閉経後患者の両群間に有意差は認めず、またタモキシフェン治療後にも両群とも有意な上昇は認めなかった。

以上のことから、閉経前患者で見られたタモキシフェンのエストロゲン阻害による血清尿酸値上昇は、腎機能低下を介したものではないことが明らかとなった。

結論：

エストロゲンは腎機能に大きな影響を与えることなく血清尿酸値を低下させる作用を有しており、タモキシフェン治療による血清尿酸値の上昇は、エストロゲン阻害が腎機能低下を介さずに尿酸値を上昇させているものと考えられた。

本論文は乳がん患者を対象として、閉経やタモキシフェンによるエストロゲン阻害が血清尿酸値を上昇させること、またこの作用が腎機能低下を介さない機構によることを示した。本論文の知見は、今後ホルモン治療の過程で遭遇する高尿酸血症の発症機序を理解し、臨床上の対応方法を検討するうえで大きく寄与するものと期待される。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) | 朝比奈 大道 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲総医博第50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28年11月29日 |
| 学位論文題目 | DISTRIBUTION OF PROTOCADHERIN 9 PROTEIN IN THE DEVELOPING MOUSE NERVOUS SYSTEM (発達期のマウス神経系における細胞接着分子プロトカドヘリン9タンパクの分布) |
| 発表誌名 | Neuroscience 225 : 88~104 2012年12月 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 山口 | 正洋 |
| | 副査 | 教授 | 齊藤 | 源頭 |
| | 副査 | 教授 | 森信 | 繁 |

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 朝比奈 大道

論文題目

DISTRIBUTION OF PROTOCADHERIN 9 PROTEIN
IN THE DEVELOPING MOUSE NERVOUS SYSTEM
(発達期のマウス神経系における
細胞接着分子プロトカドヘリン9タンパクの分布)

(論文要旨)

[緒言]

プロトカドヘリン9(Pcdh 9)は、プロトカドヘリンファミリーに属する細胞接着分子である。プロトカドヘリンは非常に多様であり、ほとんどのものが神経系で発現していることから、細胞接着、神経投射、シナプス形成といった複雑な細胞間相互作用に関わっていると考えられている。しかし、それらの多くは未だ機能が明らかにされていない。今回の研究では、未解明の部分が多い Pcdh 9 に着目し、マウス脳において Pcdh 9 の同定を行うとともに神経系におけるタンパクの分布を解析した。

[方法]

Pcdh 9 について、我々が作製した Pcdh 9 モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。さらに、Pcdh 9 タンパクの局在を調べるために、Pcdh 9 の cDNA で形質転換された COS-1 細胞と、胎生 13.5 日のマウス脳から採取し培養したニューロン、胎生 13.5 日から生後 1 日までのマウス脳、生後 7 日の嗅球、そして胎生 15.5 日から生後 7 日までの網膜を、Pcdh 9 モノクローナル抗体を用いて免疫染色した。その際、Pcdh 9 に対する 1 次抗体には 2D3 を、2 次抗体には anti-rat Cy3 183C を用いた。Pcdh 9 タンパクと分布の比較するために免疫染色した OL-Pcdh タンパクに対する 1 次抗体には 5G10 を、2 次抗体には anti-rat Cy3 183C を用いた。神経線維のマーカーとして免疫染色したニューロフィラメントに対する 1 次抗体には 2H3 を、2 次抗体には anti-mouse Alexa 488 を用いた。その他、細胞核のマーカーとして DAPI を用いて染色し、神経核のマーカーとしてニッスル染色を行った。

[結果]

ウエスタンブロッティングを行った結果、Pcdh 9 の分子量は 180 kDa であることがわかった。また、COS-1 細胞の形質転換体の免疫染色で、Pcdh 9 タンパクが細胞接着面に局在していることが明らかになった。さらに、培養したニューロンでは Pcdh 9 タンパクは軸索や成長円錐に局在していた。




胎生 13.5 日の神経系では、顕著な Pcdh 9 免疫反応性が視床背側部と内耳神経で見られた。胎生 15.5 日から生後 1 日へと発生が進むにつれて、Pcdh 9 免疫反応性は特定の神経線維や神経核に見られるよ

うになった。特に、Pcdh 9 免疫反応性は、前庭系(内耳神経、前庭神経核群、前庭小脳など)と眼球運動系(内側縦束、動眼神経核、滑車神経核、カハールの間質核など)に沿って特徴的に見られた。さらに、胎生 7 日の嗅球の糸球体において、Pcdh 9 タンパクと OL-Pcdh タンパクが差次的に分布していることを発見した。胎生 15.5 日から生後 7 日までの網膜では内網状層および外網状層に分布していた。

[考察]

Pcdh 9 タンパクがニューロンの軸索や成長円錐に局在していることから、この分子が神経回路形成の際に軸索を標的まで誘導するガイダンス分子として働いている可能性があると考えられた。また、Pcdh 9 タンパクは神経系において、前庭系および眼球運動系に沿って分布していた。さらに、Pcdh 9 タンパクは嗅球の糸球体や、網膜の内網状層や外網状層に分布していたが、これらはいずれもシナプス形成など細胞間の相互作用が盛んに起こっている場所である。これらの結果から、Pcdh 9 が神経系の発達段階において、特定の神経回路の形成に関わっている可能性があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|------|------|---|
| | 氏 名 | 朝比奈 大道 |
| 審査委員 | 主査氏名 | 山口 正洋  |
| | 副査氏名 | 齊藤 源頭  |
| | 副査氏名 | 森信 繁  |

題 目 DISTRIBUTION OF PROTOCADHERIN 9 PROTEIN IN THE DEVELOPING MOUSE NERVOUS SYSTEM
 (発達期のマウス神経系における細胞接着分子プロトカドヘリン9タンパクの分布)

著 者 H. ASAHINA, A. MASUBA, S. HIRANO AND K. YURI

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Neuroscience 225 : 88~104, 2012年12月

要 旨

背景・目的:

プロトカドヘリン9(Pcdh9)はプロトカドヘリンファミリーに属する細胞接着分子である。プロトカドヘリンは非常に多様であり、ほとんどのものが神経系で発現していることから、神経投射、シナプス形成、神経回路形成といった複雑な神経細胞間相互作用に関わっていると考えられている。しかし、それらの多くは未だ機能が明らかにされていない。申請者は、未解明の部分が多い Pcdh9 に着目した。特にその mRNA 発現に関する報告はあるもののタンパクの発現分布に関する理解は乏しい。そこで申請者はマウス脳における Pcdh9 タンパクの発現分布を解析した。

方法:

Pcdh9 について、申請者らが作製した Pcdh9 モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。さらに、Pcdh9 タンパクの局在を調べるために、Pcdh9 の cDNA で形質転換された COS-1 細胞と、胎生 13.5 日のマウス脳から採取し培養したニューロン、胎生 13.5 日から生後 1 日までのマウス脳、生後 7 日の嗅球、そして胎生 15.5 日から生後 7 日までの網膜を、Pcdh9 モノクローナル抗体を用いて免疫染色した。Pcdh9 タンパクと分布の比較をするために OL-Pcdh9 タンパクを、また神経線維のマーカーとしてニューロフィラメントを、それぞれ特異的抗体を用いて免疫染色した。その他、細胞核のマーカーとして DAPI 染色を、神経核のマーカーとしてニッスル染色を行った。

結果：

ウェスタンブロッティングおよび免疫染色により、作製した Pcdh9 モノクローナル抗体の特異性を確認した。また COS-1 細胞の形質転換体の免疫染色で、Pcdh9 タンパクが細胞接着面に局在していることが明らかとなった。培養ニューロンでは Pcdh9 タンパクは軸索や成長円錐に局在していた。

胎生 13.5 日の神経系では、顕著な Pcdh9 免疫反応性が視床背側部と内耳神経で見られた。胎生 15.5 日から生後 1 日への発生が進むにつれて、Pcdh9 免疫反応性は特定の神経線維や神経核、特に前庭系（内耳神経、前庭神経核群、前庭小脳など）と眼球運動系（内側縦束、動眼神経核、滑車神経核、カハールの間質核など）に沿って特徴的に見られるようになった。さらに、胎生 7 日の嗅球の糸球において Pcdh9 タンパクと OL-Pcdh タンパクが差次的に分布していること、胎生 15.5 日から生後 7 日までの網膜において Pcdh9 タンパクが内網状層および外網状層に分布していることを見出した。

結論：

Pcdh9 タンパクがニューロンの軸索や成長円錐に局在していることから、この分子が神経回路形成の際に軸索を標的まで誘導するガイダンス分子として働いている可能性があると考えられた。また、Pcdh9 タンパクが前庭系や眼球運動系など特定の神経系に分布し、嗅球の糸球や網膜の内・外網状層といったシナプス形成・神経細胞相互作用が盛んに起こっている場所に分布していたことから、Pcdh9 が神経系の発達段階において、特定の神経回路の形成に関わっている可能性が示唆された。

本論文は、申請者らが自ら作製したモノクローナル抗体を活用し、Pcdh9 タンパクの細胞内局在および発生・発達期神経系における分布を詳細に検討することにより、Pcdh9 タンパクがシナプス形成部位に多く局在し、特定の神経回路に発現していることを明らかにした。この観察結果は Pcdh9 が特定の神経回路形成に寄与していることを示唆しており、神経回路形成の詳細な分子機構を解明するうえで大きく貢献するものである。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) | 難波 利治 (東京都) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲総医博第51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28年12月20日 |
| 学位論文題目 | Activation of arginine vasopressin receptor 1a facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb of male mice (アルギニンバゾプレッシン受容体1aの活性化は雄マウスの副嗅球における長期増強の誘導を促進する) |
| 発表誌名 | Neuroscience Letters, 634, 107-113 2016年11月10日 |

| | | | |
|-------------|----|----|-------|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 森信 繁 |
| | 副査 | 教授 | 齊藤 源頭 |
| | 副査 | 教授 | 由利 和也 |

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 難波 利治

論文題目

Activation of arginine vasopressin receptor 1a facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb of male mice

(アルギニンバゾプレッシン受容体 1a の活性化は雄マウスの副嗅球における長期増強の誘導を促進する)

(論文要旨)

哺乳動物の多くはフェロモンを用いたケミカルコミュニケーションを行うことで社会性を維持しており、フェロモン情報の記憶は社会性を発揮する上で重要である。所属教室では、2つの主要な嗅覚伝導路（嗅覚系と鋤鼻系）のうち、主としてフェロモンを受容・処理する鋤鼻系の最初の中継部位である副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達が長期にわたり増強する可塑的変化（長期増強：LTP）がフェロモン記憶の神経基盤であることを明らかにした。我々はこの可塑的変化に影響を及ぼす新たな候補物質としてアルギニンバゾプレッシン(AVP)に注目した。

先行研究において、オキシトシン(OT)が LTP 誘導を促進することが明らかにされており、構造が酷似した AVP にも同様の効果を持つことが期待される。更に、中枢の AVP は同種間の円滑な社会性に必要不可欠な社会的認識の促進や多様な社会行動（養育行動・攻撃性・親和性・社会的記憶など）の調節に関与していることが知られている。加えて、一夫一婦制の草原ハタネズミと乱交型のヤマハタネズミを比べたところ、草原ハタネズミの方が副嗅球内の AVPR1a が高密度に発現していると共に、オスでは AVP がメスでは OT が社会的認識に優位な役割を担っていることが知られている。これらの知見から、オスマウスの社会的認識を支える副嗅球の神経可塑性に AVP が重要な役割を果たすのではないかと考え、電気生理学的手法を用いて検討することにした。




僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達の強度を測定するために、外側嗅索の電気刺激によって顆粒細胞に誘発される単シナプス応答を細胞外からフィールド電位として記録し、その電位の立ち上がりの勾配をシナプス伝達強度の指標とした。高頻度 200 パルス刺激(100Hz, 1 秒間, 3 分間隔, 2 回)単独では LTP は誘導されないが、AVP かん流条件下で高頻度 200 パルス刺激を与えると、用量依存的に LTP が誘導された。AVP の LTP 誘導促進作用は AVPR1a アンタゴニストであるマニング化合物($d(\text{CH}_2)_5[\text{Tyr}(\text{Me})^2]\text{AVP}$)によって阻害され、AVPR1b アンタゴニストである SSR149415 では阻害されなかった。また、AVP に代え AVPR1a アゴニストである $[\text{Phe}^2, \text{Ile}^3, \text{Orn}^8]\text{-vasopressin}$ は AVP の LTP 誘導促進作用を再現した。

副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞は相反性シナプスを形成しており、僧帽細胞から顆粒細胞への伝達は興奮性のグルタミン酸作動性伝達であるのに対して、顆粒細胞から僧帽細胞へは抑制性

の GABA 作動性伝達である。この相反性シナプス伝達に対する AVP の影響を調べるために、単一僧帽細胞から全細胞記録を行った。膜電位固定下で僧帽細胞に脱分極刺激を与えると、相反性シナプス伝達を介して同一の僧帽細胞に抑制性シナプス後電流が誘発される。AVP はこの抑制性シナプス後電流を減少させた。AVP による相反性シナプス伝達の抑制がどのようなメカニズムを介して LTP の誘導促進へと導くのか、今後解決すべき課題の 1 つである。

以上の結果は、AVP がオスマウス副嗅球の AVP 受容体 1a の活性化を介して僧帽細胞-顆粒細胞間シナプスにおける LTP 誘導を促進することを示している。本研究結果は AVP の新規な作用を示すと共に、鋤鼻系を介する多様な社会行動の更なる研究の一助となると考えられる。

論文審査の結果の要旨

| | | 氏名 | 難波 利治 |
|------|------|-------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 森信 繁 |  |
| | 副査氏名 | 齊藤 源頭 |  |
| | 副査氏名 | 由利 和也 |  |

題 目 Activation of arginine vasopressin receptor 1a facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb of male mice
 (アルギニンバゾプレッシン受容体1aの活性化は雄マウスの副嗅球における長期増強の誘導を促進する)

著 者 Toshiharu Namba, Mutsuo Taniguchi, Yoshihiro Murata, Jia Tong, Yujie Wang, Fumino Okutani, Masahiro Yamaguchi, Hideto Kaba

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月

Neuroscience Letters (in press)

要 旨

哺乳動物の多くはフェロモンを用いたケミカルコミュニケーションを行うことで社会性を維持しており、フェロモン情報の記憶は社会性を発揮する上で重要である。所属教室では、2つの主要な嗅覚伝導路(嗅覚系と鋤鼻系)のうち、主としてフェロモンを受容・処理する鋤鼻系の最初の中継部位である副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達が長期にわたり増強する可塑的变化(長期増強:LTP)がフェロモン記憶の神経基盤であることを明らかにした。申請者らは、この可塑的变化に影響を及ぼす新たな候補物質としてアルギニンバゾプレッシン(AVP)に注目した。

先行研究において、オキシトシン(OT)がLTP誘導を促進することが明らかにされており、構造が酷似したAVPにも同様の効果を持つことが期待される。更に、中枢のAVPは同種間の円滑な社会性に必要不可欠な社会的認識の促進や多様な社会行動(養育行動・攻撃性・親和性・社会的記憶など)の調節に関与していることが知られている。加えて、一夫一婦制の草原ハタネズミと乱交型のヤマハタネズミを比べたところ、草原ハタネズミの方が副嗅球内のAVPR1aが高密度に発現していると共に、オスではAVPがメスではOTが社会的認識に優位な役割を担っていることが知られている。これらの知見から、オスマウスの社会的認識

を支える副嗅球の神経可塑性に AVP が重要な役割を果たすのではないかと考え、電気生理学的手法を用いて検討することにした。

僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達の強度を測定するために、外側嗅索の電気刺激によって顆粒細胞に誘発される単シナプス応答を細胞外からフィールド電位として記録し、その電位の立ち上がりの勾配をシナプス伝達強度の指標とした。高頻度 200 パルス刺激(100Hz, 1 秒間, 3 分間隔, 2 回)単独では LTP は誘導されないが、AVP かん流条件下で高頻度 200 パルス刺激を与えると、用量依存的に LTP が誘導された。AVP の LTP 誘導促進作用は AVPR1a アンタゴニストであるマニング化合物 ($d(\text{CH}_2)_5[\text{Tyr}(\text{Me})^2]\text{AVP}$)によって阻害され、AVPR1b アンタゴニストである SSR149415 では阻害されなかった。また、AVP に代え AVPR1a アゴニストである $[\text{Phe}^2, \text{Ile}^3, \text{Orn}^8]$ -vasopressin は AVP の LTP 誘導促進作用を再現した。

副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞は相反性シナプスを形成しており、僧帽細胞から顆粒細胞への伝達は興奮性のグルタミン酸作動性伝達であるのに対して、顆粒細胞から僧帽細胞へは抑制性の GABA 作動性伝達である。この相反性シナプス伝達に対する AVP の影響を調べるために、単一僧帽細胞から全細胞記録を行った。膜電位固定下で僧帽細胞に脱分極刺激を与えると、相反性シナプス伝達を介して同一の僧帽細胞に抑制性シナプス後電流が誘発される。AVP はこの抑制性シナプス後電流を減少させた。AVP による相反性シナプス伝達の抑制がどのようなメカニズムを介して LTP の誘導促進へと導くのか、今後解決すべき課題の 1 つである。

以上の結果は、AVP がオスマウス副嗅球の AVP 受容体 1a の活性化を介して僧帽細胞-顆粒細胞間シナプスにおける LTP 誘導を促進することを示している。本研究結果は AVP の新規な作用を示すと共に、鋤鼻系を介する多様な社会行動の更なる研究の一助となると考えられる。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 宮崎 涼平 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲総医博第52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28年12月20日 |
| 学位論文題目 | In Vitro Drug Sensitivity Tests to Predict Molecular Target Drug Responses in Surgically Resected Lung Cancer (肺癌における分子標的薬剤の臨床的効果を予測する培養法の確立) |
| 発表誌名 | PLoS One. 11(4):e0152665. 2016年4月12日 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 降幡 | 睦夫 |
| | 副査 | 教授 | 横山 | 彰仁 |
| | 副査 | 教授 | 前田 | 長正 |

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 宮崎 涼平

論文題目

In vitro drug sensitivity tests to predict molecular target drug responses in surgically resected lung cancer
(肺癌における分子標的薬剤の臨床的効果を予測する培養法の確立)

(論文要旨)

背景：肺癌の治療はEGFR（上皮成長因子受容体）チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）やALK（未分化リンパ腫リン酸化酵素）阻害薬（ALK-inhibitor）などの分子標的薬の出現によって大きく変貌した。その分子標的薬の治療効果予測にはEGFR遺伝子変異やEML4-ALK融合遺伝子の発現を調べるのが一般的であるが、現時点では一つ一つ検査する必要があり包括的に検査する方法は一般的ではない。またEGFR遺伝子変異が陽性の症例でもEGFR-TKIの奏効率は約7割とされており、逆に遺伝子変異が陰性であった場合でも一部の症例では効果を示すことが報告されている。一方で細胞障害性抗癌剤に対してはin vitroでの細胞培養を基礎としたthe succinate dehydrogenase inhibition (SDI、2次元培養法) testやcollagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST、3次元培養法)などが、その抗腫瘍効果を予測する方法として報告されている。今回我々はin vitroの抗癌剤感受性試験を用いて分子標的薬の効果を網羅的に予測する方法を検討した。

方法：癌細胞の培養過程において種々の濃度の分子標的薬剤とともに培養し、細胞の増殖率をみることでその腫瘍抑制効果を確認した。

まず肺癌の培養細胞（HCC827（EGFR遺伝子変異（Exon19: E746-A750 del）陽性細胞）、H3122（EML4-ALK陽性細胞）、A549, H460（EGFR遺伝子変異、ALK融合遺伝子ともに陰性） and H1975（EGFR遺伝子変異（L858R）陽性+EGFR-TKI耐性遺伝子（T790M）陽性細胞）に対してMTS-assayとCD-DST法を用いてエルロチニブ（EGFR-TKI）とクリゾチニブ（ALK阻害剤）投与下での細胞増殖率を検討した。次に肺癌切除例35例に対してSDI法とCD-DST法を用いてエルロチニブ投与下での細胞増殖率とEGFR遺伝子変異との相関を検討した。またROC曲線を用いて感度と特




異度を検討し、最適なカットオフ値を決定した。

結果：培養細胞ではエルロチニブ投与下での細胞増殖率はMTS-assayでHCC827が $31.9 \pm 1.6\%$ 、H460が $98.9 \pm 9.3\%$ 、A549が $99.4 \pm 10.7\%$ 、H1975が $85.7 \pm 10.7\%$ 、CD-DST法ではHCC827が $0.63 \pm 0.19\%$ 、H460が $87.1 \pm 0.56\%$ 、A549が $72.2 \pm 5.20\%$ 、H1975が $55.8 \pm 8.1\%$ であった。

クリゾチニブ投与下での細胞増殖率はMTS-assayでH3122が $35.8 \pm 3.24\%$ 、H460が $103.2 \pm 5.67\%$ 、A549が $96.9 \pm 8.05\%$ 、CD-DST法ではH3122が $20.1 \pm 2.13\%$ 、H460が $93.7 \pm 3.13\%$ 、A549が $75.5 \pm 7.43\%$ であった。HCC827とH3122はそれぞれエルロチニブとクリゾチニブによる有意な細胞増殖抑制効果を認めたが、A549, H460, H1975ではどちらの薬剤でも細胞増殖抑制効果は認めなかった。臨床症例の切除肺癌細胞においては、エルロチニブ投与下でのEGFR遺伝子陽性症例と陰性症例の細胞増殖率はSDI法で $60.0 \pm 9.8\%$ と $86.8 \pm 13.9\%$ ($p = 0.0003$)と有意差をもってEGFR遺伝子変異陽性群で細胞増殖が抑制された。ROC曲線を用いるとSDI法のカットオフ値は72.7%で感度は93.3%、特異度は100%であった。またCD-DST法でも同様にEGFR遺伝子陽性症例と陰性症例の細胞増殖率は $33.5 \pm 21.2\%$ と $79.0 \pm 18.6\%$ ($p = 0.026$)と有意差をもってEGFR遺伝子変異陽性群で細胞増殖が抑制された。ROC曲線ではCD-DST法のカットオフ値は55.9%で感度は88.9%、特異度は100%であった。

結論：SDI法やCD-DST法によるin vitroの抗癌剤感受性試験ではEGFR遺伝子変異と細胞増殖抑制効果に相関がみられた。このことからSDI法やCD-DST法は分子標的薬の臨床効果を予測する有用な検査である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|------|------|---|
| | 氏名 | 宮崎 涼平 |
| 審査委員 | 主査氏名 | 降幡 睦夫  |
| | 副査氏名 | 横山 彰仁  |
| | 副査氏名 | 前田 長正  |

題目 In Vitro Drug Sensitivity Tests to Predict Molecular Target Drug Responses in Surgically Resected Lung Cancer

(肺癌における分子標的薬剤の臨床的効果を予測する培養法の確立)

著者

Ryohei Miyazaki, Takashi Anayama, Kentaro Hirohashi, Hironobu Okada, Motohiko Kume, Kazumasa Orihashi

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月

PLoS One. 11(4):e0152665.

2016年4月12日

要旨

【背景・目的】肺癌の治療は EGFR (上皮成長因子受容体) チロシンキナーゼ阻害薬 (エルロチニブ: EGFR-TKI) や ALK (未分化 リンパ腫リン酸化酵素) 阻害薬 (クリゾチニブ: ALK-inhibitor) などの分子標的薬の出現によって変貌し、その分子標的薬適応には EGFR 変異や EML4-ALK 発現の有無を調べるが、現時点では一つ一つ検査する必要があり包括的検討方法は確立されていない。また EGFR 変異陽性症例でも EGFR-TKI の奏成功率は約 7 割とされており、逆に一部の遺伝子変異陰性例では治療効果を示すことが報告されている。一方で細胞障害性抗癌剤に対しては in vitro での細胞培養を基礎とした the succinate dehydrogenase inhibition (SDI、2 次元培養法) test や collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST、3 次元培養法) などが、その抗腫瘍効果予測判定方法として応用されている。今回我々は in vitro の抗癌剤感受性試験を用いて分子標的薬の効果を網羅的に予測する方法を検討した。

【方法】癌細胞の培養過程において種々の濃度の分子標的薬剤とともに培養し、細胞の増殖率をみることでその腫瘍抑制効果を確認した。まず肺癌の培養細胞として、HCC827 : *EGFR* 変異型 (Exon19: E746-A750 del) 細胞、H3122 : *EML4-ALK* 融合型細胞、A549, H460 : *EGFR* 野生型かつ *ALK* 野生型細胞、そして H1975 : *EGFR* 変異型 (L858R) かつ *EGFR*-TKI 耐性型 (*EGFR* 変異型 (T790M)) 細胞に対して、MTS-assay と CD-DST 法を用いてエルロチニブとクリゾチニブ投与下での細胞増殖率を検討した。次に肺癌切除例 35 例に対して SDI 法と CD-DST 法を用いてエルロチニブ投与下での細胞増殖率と *EGFR* 変異との相関を検討した。また ROC 曲線を用いて感度と特異度を検討し、最適なカットオフ値を決定した。

【結果】培養細胞ではエルロチニブ投与下での細胞増殖率は MTS-assay で HCC827 が $31.9 \pm 1.6\%$ 、H460 が $98.9 \pm 9.3\%$ 、A549 が $99.4 \pm 10.7\%$ 、H1975 が $85.7 \pm 10.7\%$ 、CD-DST 法では HCC827 が $0.63 \pm 0.19\%$ 、H460 が $87.1 \pm 0.56\%$ 、A549 が $72.2 \pm 5.20\%$ 、H1975 が $55.8 \pm 8.1\%$ であった。クリゾチニブ投与下での細胞増殖率は MTS-assay で H3122 が $35.8 \pm 3.24\%$ 、H460 が $103.2 \pm 5.67\%$ 、A549 が $96.9 \pm 8.05\%$ 、CD-DST 法では H3122 が $20.1 \pm 2.13\%$ 、H460 が $93.7 \pm 3.13\%$ 、A549 が $75.5 \pm 7.43\%$ であった。HCC827 と H3122 はそれぞれエルロチニブとクリゾチニブによる有意な細胞増殖抑制効果を認めたが、A549, H460, H1975 ではどちらの薬剤でも細胞増殖抑制効果は認めなかった。臨床症例の切除肺癌細胞においては、エルロチニブ投与下での *EGFR* 変異型症例と野生型症例の細胞増殖率は SDI 法で $60.0 \pm 9.8\%$ と $86.8 \pm 13.9\%$ ($p = 0.0003$) と有意差をもって *EGFR* 変異型症例群で細胞増殖が抑制された。ROC 曲線を用いると SDI 法のカットオフ値は 72.7% で感度は 100%、特異度は 93.3% であった。また CD-DST 法でも同様に *EGFR* 変異型症例と野生型症例の細胞増殖率は $33.5 \pm 21.2\%$ と $79.0 \pm 18.6\%$ ($p = 0.026$) と有意差をもって *EGFR* 変異型症例群で細胞増殖が抑制された。ROC 曲線では CD-DST 法のカットオフ値は 55.9% で感度は 100%、特異度は 88.9% であった。

【結論】SDI 法や CD-DST 法による *in vitro* の抗癌剤感受性試験では *EGFR* 変異と細胞増殖抑制効果に相関がみられた。このことから SDI 法や CD-DST 法は分子標的薬の臨床効果を予測する有用な検査である可能性が示唆された。