

2010. 10

特集号



国立大学法人 高知大学学報

(題字：相良祐輔学長)

高知大学学位授与記録第四十三号

総務課広報室発行

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15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *

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120号	細川 卓利	Neutrophil infiltration and oxidant-production in human atherosclerotic carotid plaques (ヒト頸動脈プラーク病変における好中球浸潤と活性酸素産生の検討)	1
甲医博第121号	石浦 嘉人	Anomalous expression of Thyl (CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thyl antibody treatment. (B細胞性リンパ腫細胞におけるThyl (CD90)分子の異所性発現と抗Thyl抗体処理による増殖抑制)	6
甲医博第122号	西岡 利恵	Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea (蝸牛血管条におけるアクアポリンとバゾプレシントプ2レセプターの発現)	12

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第12号	孫 長海	Metabonomics study of the protective effects of <i>Lonicera japonica</i> extract on acute liver injury in dimethylnitrosamine treated rats (<i>Lonicera japonica</i> (金銀花) 抽出エキスジメチルニトロソアミン惹起急性肝障害モデルラットの予防効果の Metabonomics 解析)	17

氏名(本籍)	細川 卓利(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第120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22年9月30日
学位論文題目	Neutrophil infiltration and oxidant-production in human atherosclerotic carotid plaques (ヒト頸動脈プラーク病変における好中球浸潤と活性酸素産生の検討)
発表誌名	Histology and Histopathology (in press)

審査委員	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	瀬尾	宏美
	副査	教授	土居	義典

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 細川 卓利

論文題目

Neutrophil infiltration and oxidant-production in human
atherosclerotic carotid plaques

(ヒト頸動脈プラーク病変における
好中球浸潤と活性酸素産生の検討)

(論文要旨)

【背景・目的】

動脈硬化進展機序において、血管平滑筋細胞、マクロファージやリンパ球等の白血球が、炎症性プラーク形成に関わる主要な構成細胞であり、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase などが産生する活性酸素種 (ROS) などの酸化ストレスが粥状硬化巣 (プラーク) の形成や進展に重要な役割を持つ事が明らかにされてきた。プラークに存在するマクロファージや血管平滑筋細胞では NADPH-oxidase サブユニットの発現が亢進していることが報告されている。一方、近年話題となっている急性冠症候群では好中球浸潤が存在することが報告され、好中球浸潤は不安定プラークの病理学的特徴とされてきつつあるが、その病態的意義は未だに明らかにされていない。好中球は豊富な NADPH-oxidase を細胞内に含有しており、ROS 産生に関与しうると考えられるため、活性化好中球の形態的特徴を好中球細胞質内の N-formyl peptide receptor-like 1 (fPRL1) 濃度を指標として捉え、ヒト頸動脈プラーク病変における好中球の浸潤と好中球から産生される ROS がプラークの不安定化に如何に関与するかを病理学的検討することである。

【対象と方法】

2005年1月から2007年8月に、当院及び関連病院で頸動脈狭窄の診断で動脈内膜切除術を実施された患者7人(男性6人、女性1人、平均年齢70±8才)から得られた頸動脈標本を用いて病理学検討を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋標本で、HE染色、細胞化学的にナフトールASDクロロアセテート(NASDCE)と活性酸素産生を評価し、免疫組織化学的に抗fPRL1抗体、抗CD66b抗体、抗CD68抗体、抗p22phox抗体を使用し検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、我々が開発した方法でROSの検出を行い、好中球細胞質のfPRL1濃度を定量し活性指標として用いた。

【結果】

- (1) 抗CD66b抗体で陽性と示される好中球は、プラーク肩領域や脂質コアに多数存在した。好中球数はプラークの進展に比例して増加した。
- (2) 好中球に陽性とされるNASDCE活性はプラーク内の毛細血管の内側とそのごく周囲の多形核細胞のみに検出されるが、広く毛細血管外ではNASDCE陰性であった。一方、fPRL1はNASDCE染色と異なり、好中球細胞質は毛細血管内で陽性、辺縁でも弱陽性であった。

(3)標本中好中球細胞質内 fPRL1 濃度を 4 標本で評価した。4 症例ともほぼ同様の結果であり、症例 1 では毛細血管内好中球細胞質 fPRL1 濃度は 152.4 ± 12.2 arbitrary units (AU)、毛細血管外 102.8 ± 5.0 AU と、毛細血管外の好中球細胞質 fPRL1 濃度は毛細血管内のその約 60%と有意 ($p < 0.001$) に低値であった。




(4)抗 p22phox 抗体陽性細胞と活性酸素産生細胞の分布は一部一致したが、抗 p22phox 抗体陽性細胞は細胞サイズや核型は不均一な集団であった。

(5)抗 CD66b 抗体陽性細胞または抗 CD68 抗体陽性細胞は活性酸素産生細胞や p22phox 陽性細胞と一部一致した。このことから、動脈硬化プラークでの活性酸素産生にはマクロファージと同様に好中球が関与することが示唆された。

【考察】

本検討の結果から、進展や破綻をきたした頸動脈プラーク内には好中球が相当数浸潤していること、プラーク内に浸潤している好中球は活性化されており、NADPH-oxidase などによる活性酸素産生に関与していることが明らかにされた。本検討では ROS 産生を検討したことが特徴であるが、ホルマリン固定パラフィン包埋病理標本を用いたこと、ROS 産生という好中球の機能を細胞ごとに評価したことなどの報告は今までにない。本検討により、プラーク内の ROS 産生はマクロファージのみならず、好中球にも依存していることが明らかとなった。プラーク内に好中球が浸潤し活性化に至る正確な機序は不明であるが、好中球は主に毛細血管を介してプラークに浸潤し、既に存在していたマクロファージに加えて ROS を産生するため、好中球浸潤がプラークの脆弱化に関与していることは疑いがない。また、プラーク内への好中球浸潤を抑制することが急性冠症候群、ひいては動脈硬化進展を防止する有効な治療戦略になりうる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	細 川 卓 利
審 査 委 員	主 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	瀬 尾 宏 美 
	副 査 氏 名	土 居 義 典 

題 目 Neutrophil infiltration and oxidant-production in human
atherosclerotic carotid plaques
 (ヒト頸動脈プラーク病変における好中球浸潤と活性酸素産生の検討)

著 者 Takatoshi Hosokawa, Yoshitaka Kumon, Toshihiro Kobayashi,
 Hideaki Enzan, Yutaka Nishioka, Kazunari Yuri, Hiroshi Wakiguchi,
 Tetsuro Sugiura

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

要 旨

【背景・目的】

動脈硬化進展機序において、血管平滑筋細胞、マクロファージやリンパ球等の白血球が、炎症性プラーク形成に関わる主要な構成細胞であり、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) -oxidase などが産生する活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) などの酸化ストレスが粥状硬化巣 (プラーク) の形成や進展に重要な役割を持つ事が明らかにされてきた。プラークに存在するマクロファージや血管平滑筋細胞では NADPH-oxidase サブユニットの発現が亢進し、一方、急性冠症候群では好中球浸潤の関与が報告され、好中球浸潤は不安定プラークの病理学的特徴とされつつあるが、その病態的意義の詳細は不明である。好中球は豊富な NADPH-oxidase を細胞内に含有しており、ROS 産生に関与しうると考えられる。よって申請者らは活性化好中球の形態的特徴として、好中球細胞質内の N-formyl peptide receptor-like 1 (fPRL1) 濃度を指標として捉え、ヒト頸動脈プラーク病変における好中球浸潤と好中球から産生される ROS がプラークの不安定化に関与するかを病理学的に検討した。

【対象と方法】

2005年1月から2007年8月に、当院及び関連病院で頸動脈狭窄の診断で動脈内膜切除術を実施された患者7人(男性6人、女性1人、平均年齢70±8才)から得られた頸動脈標本を用いて病理学検討を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋標本で、HE染色、細胞化学的にナフトール ASD クロロアセテート(NASDCE)と活性酸素産生を評価し、免疫組織化学的に抗 fPRL1 抗体、抗 CD66b 抗体、抗 CD68 抗体、抗 p22phox 抗体を使用し ABC 法にて検討した。さらにホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、ROS の検出を行い、好中球細胞質の fPRL1 濃度を定量し活性指標として用いた。

【結果】

抗 CD66b 抗体陽性好中球は、頸動脈のプラーク肩領域や脂質コアに多数存在し、好中球数はプラークの進展に比例して増加した。NASDCE 活性はプラーク内の毛細血管内を主体にその血管辺縁の一部の多形核細胞のみに検出され、その血管外周囲では NASDCE 陽性好中球は認めなかった。一方 fPRL1 は、毛細血管内に存在する抗 CD66b 抗体陽性好中球に陽性、血管辺縁でも同陽性細胞に弱陽性であった。好中球細胞質内 fPRL1 濃度を4症例で評価し、いずれもほぼ同様の結果であり、症例1では毛細血管内好中球細胞質 fPRL1 濃度は 152.4 ± 12.2 arbitrary units (AU)、毛細血管外 102.8 ± 5.0 AU と、毛細血管外の好中球細胞質 fPRL1 濃度は毛細血管内のその約 60%と有意($p < 0.001$)に低値であった。抗 p22phox 抗体陽性細胞と活性酸素産生細胞の分布は一部一致したが、抗 p22phox 抗体陽性細胞は細胞サイズや核型は不均一な集団であった。抗 CD66b 抗体陽性好中球や抗 CD68 抗体陽性マクロファージは活性酸素産生細胞や p22phox 陽性細胞と一部一致した。このことから、動脈硬化プラークでの活性酸素産生には、マクロファージと同様に一部の好中球が関与することが示唆された。

【考察】

本検討の結果から、進展や破綻をきたした頸動脈プラーク内には好中球が有意に浸潤していること、プラーク内に浸潤している好中球は活性化されており、NADPH-oxidase などによる活性酸素産生に関与していることが示された。今回は ROS 産生の検討にホルマリン固定パラフィン包埋病理標本を用いることで、ROS 産生という好中球機能を細胞ごとに評価することができた。本検討により、プラーク内の ROS 産生にはマクロファージのみならず、好中球にも依存していることが示唆された。プラーク内に好中球が浸潤し活性化に至る機序は不明であるが、好中球は主に毛細血管を介して頸動脈プラークに浸潤し、既に存在していたマクロファージと共に ROS を産生することで、プラークの脆弱化に関与していると考えられる。また、プラーク内への好中球浸潤を抑制することが急性冠症候群、ひいては動脈硬化進展を防止する有効な治療戦略になりうる可能性が示された。

氏名(本籍)	石浦 嘉人(石川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第121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22年9月30日
学位論文題目	Anomalous expression of Thy1(CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thy1 antibody treatment (B細胞性リンパ腫細胞における Thy1(CD90)分子の異所性発現と抗 Thy1 抗体処理による増殖抑制)
発表誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications, 396(2), 329-334, 2010年5月28日

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	横山	彰仁

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 石浦 嘉人

論文題目 Anomalous expression of Thy1(CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thy1 antibody treatment

(B細胞性リンパ腫細胞におけるThy1(CD90)分子の異所性発現と抗Thy1抗体処理による増殖抑制)

(論文要旨)

近年、腫瘍関連抗原は診断に用いられるだけでなく抗体治療の標的となっている。B細胞性悪性リンパ腫にはCD20が発現しており、抗ヒトCD20ヒト・マウスキメラ型モノクローナル抗体であるrituximabが効果的な治療薬として知られている。しかしながら、再発例において薬剤耐性が認められ、新規の治療抗体を見いだすことは重要である。本研究は、細胞表面に発現する複合糖質関連抗原を対象として新規治療抗体の標的抗原を見出すことを目的とした。

複合糖質は各種糖鎖関連遺伝子産物により生合成されるが、それらの発現は細胞の腫瘍化や感染などにより変化する。B細胞性悪性リンパ腫の発症にはEBウイルス(EBV)が関与している場合がある。そこで、EBV陽性のパーキットリンパ腫患者から樹立された培養細胞株であるAkata細胞と、Akata細胞からEBVが脱離したAkata(-)細胞における糖鎖関連遺伝子の発現を、DNAマイクロアレイを用いて比較した。その結果、Akataでは、GPI(glycosylphosphatidylinositol)アンカー分子であるThy1(CD90)遺伝子の発現が、Akata(-)より42.4倍高いことが判明した。他のB細胞性悪性リンパ腫細胞株であるBJAB、Mutu I、Mutu IIIも含め、フローサイトメトリーおよびウエスタン・ブロッティングを行ったところ、これら5種の細胞株全てにThy1の発現が確認された。BJABはEBV陰性、Mutu IとMutu IIIはEBV陽性であること、および各細胞株におけるThy1の発現量の比較からは、これらの細胞株におけるThy1の発現とEBV感染についての明確な関連性は見いだせなかった。




新規治療抗体の標的分子としてのThy1の可能性を検討するため、抗Thy1モノクローナル抗体をAkata、Akata(-)、BJAB、Mutu I細胞に添加し、その効果を調べた。その結果、細胞増殖が抑制され、その効果が強い群(BJAB、Mutu I)と、弱い群(Akata、Akata(-))がみられた。各細胞株における増殖抑制効果は、Thy1発現量とは相関していなかった。抗Thy1抗体による増殖抑制はrituximabと同等以上の効果がみられ、併用により効果は増強した。

増殖抑制をもたらす要因を探求する目的で、annexin Vとpropidium iodide (PI)を用いたフローサイトメトリー解析によりアポトーシスとネクローシスの関与を調べたが、限定的であり他の要因の存在が示唆された。細胞膜上の脂質ラフトは、シグナル伝達の発信場として細胞増殖との関与が考えられている。Akata、BJAB、Mutu Iの各細胞で、Thy1は脂質ラフトに存在することが示されたため、抗Thy1抗体がThy1に結合することで、Thy1と同じラフトに存在する他の機能分子が影響を受け、細胞増殖抑制が誘導されるのではないかと推測した。そこで、Akata、BJAB、Mutu Iの各細胞に、西洋わさびペルオキシダーゼを結合させた抗Thy1抗体を反応させ、Enzyme-mediated Activation of Radical Sources

(EMARAS) 法と受容体チロシンキナーゼ (RTK) 抗体アレイを用いて、Thy1 と相互作用する RTK を調べた。その結果、安定的に多くの RTK が Thy1 ラフトに留まることが、細胞増殖の維持に寄与している可能性が示唆された。

以上のように、Thy1 が B 細胞性悪性リンパ腫細胞株に異所性発現しており、抗 Thy1 抗体により細胞増殖が抑制されることを見出した。B 細胞性悪性リンパ腫における Thy1 の発現に関しては、今後の臨床的調査が望まれる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	石 浦 嘉 人
審 査 委 員	主 査 氏 名	宇 高 恵 子 
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	横 山 彰 仁 

題 目 Anomalous expression of Thy1 (CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thy1 antibody treatment
 (B細胞性リンパ腫細胞における Thy1 (CD90) 分子の異所性発現と抗 Thy1 抗体処理による増殖抑制)

著 者 Yoshihito Ishiura, Norihiro Kotani, Ryusuke Yamashita, Harumi Yamamoto, Yasunori Kozutsumi, Koichi Honke

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、 年 月
 Biochemical and Biophysical Research Communications, 396(2), 329-334,
 2010年5月28日

要 旨

石浦嘉人さんの学位審査は、平成22年9月14日13時より、約1時間にわたり、公開で行いました。口頭発表による学位論文の内容を下記に要約いたします。

【背景と目的】

申請者らはそれまでに、EBウイルス(EBV)陽性のBリンパ腫細胞株であるAkata細胞と、Akata由来の細胞株であるがEBVが脱離したAkata(-)とでは、接触増殖抑制能や3次元方向への集積など、腫瘍細胞としての性質が異なることを観察していた。そこで、それら形質の違いが、どのような分子レベルでの違いを反映したものを明らかにするため、まず手初めに、悪性化に伴い、しばしば変化がみられる、糖鎖関連遺伝子群について網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、発現差がもっとも大きな遺伝子として上がってきた Thy-1 について、さらに蛋白質レベルでの発現解析と機能解析を行った。

【方法と結果】

まず、Akata細胞とAkata(-)細胞との間で、DNAマイクロアレイを用いた糖鎖関連遺伝子

群について、網羅的な遺伝子発現パターンの比較解析を行った。DNA マイクロアレイ解析は、共著者である小堤らの協力を得て行った。その結果、Akata 細胞では、Akata(-)細胞に比べて発現が高まっている遺伝子群、および、逆に発現が低下している遺伝子群が見つかった。これらの中で、群を抜いて 42.4 倍も Akata 細胞で発現量が高い遺伝子として、GPI アンカーを持つ蛋白質である Thy-1 が見つかった。Thy-1 は、ヒトでは造血前駆細胞や神経細胞にいくらか発現されるが、末梢血、特に B 細胞には通常発現されないため、B 細胞腫瘍株である Akata における発現は異所的である。抗 Thy-1 抗体を使って、Flow cytometry にて細胞表面の Thy-1 蛋白質の発現を調べたところ、蛋白質レベルでも、Thy-1 の発現が見られ、Akata では高発現がみられる一方、Akata(-)でも、発現量は低いものの、わずかに Thy-1 の発現がみられることが確認された。この Thy-1 の異所性発現が、EBV 関連腫瘍細胞株に共通にみられるかどうかを調べるため、他の B 細胞悪性リンパ腫の細胞株である BJAB、Mutul、Mutulll における Thy-1 の発現を調べたところ、これらの細胞においても、発現量の差はあるものの、Thy-1 たんぱく質が発現していることが観察された。発現量と EBV の感染の有無には関連がなかった。

そこで次に、異所性に B 細胞腫瘍細胞株に発現された Thy-1 に機能的意義があるかどうかを調べるため、まず、抗 Thy-1 抗体を加えて、細胞増殖に対する影響を調べた。その結果、細胞株によって程度の差はあるものの、抗 Thy-1 抗体を作用させると、細胞の増殖抑制が起こることが観察された。増殖抑制が見られるのであれば、B 細胞腫瘍に対する抗体製剤(抗 CD20 モノクローナル抗体)である rituximab による増殖抑制効果に相乗効果を期待できるかもしれない。そこで、抗 Thy-1 抗体単独および、rituximab との併用による効果を比較したところ、いくらか相加的な増殖抑制効果が観察された。さらに、増殖抑制に加えて、抗 Thy-1 抗体および rituximab により、細胞死が誘導されることがわかった。

このように、Thy-1 蛋白質が、増殖抑制や細胞死誘導に関わっていることが明らかになったため、生きた Akata 細胞の細胞膜上で、Thy-1 蛋白質が他のどのような膜蛋白質と物理的に近く存在し、相互作用する可能性が高いか調べるため、最近、共著者である小谷らが開発した EMARS 法を用いて、Thy-1 の周辺蛋白質を biotin 化した。それら biotin 化膜蛋白質の中に、細胞増殖を促す受容体蛋白質が含まれないか調べるため、レセプターチロシンキナーゼ(RTK)群に属する分子を、網羅的な抗体アレイを使って捕捉して調べた。すると、Akata 細胞では、十種類の RTK が biotin 化されており、さらに、ショ糖密度勾配遠心法により、細胞膜による分子の局在を調べたところ、Akata 細胞の細胞膜上では、これらの RTK は、GPI アンカー蛋白質である Thy-1 が局在する細胞膜上の脂質マイクロドメイン(rafts)に、共に局在することがわかった。一方、同様の処理を行った BJAB、Mutul 細胞では、Akata と同様の RTK 群の biotin 化が観察され、それらの RTK が Thy-1 の近傍に存在することが示唆されたが、Akata とは、それら分子の局在が異なっており、biotin 化された RTK 群は、いずれも rafts には存在しないことが明らかとなった。

【考察】

上記の結果から、申請者らは、腫瘍化に伴って複数の B 細胞腫瘍株で観察された異所性に発現された Thy-1 分子は、抗体により架橋されると、その B 細胞株に細胞死を誘導するこ

とから、将来、抗腫瘍薬の標的分子として使える可能性があること、また、その細胞死誘導活性が、Thy-1 およびその近傍に存在する RTK 群の細胞膜上での rafts 局在のあるなしと関連があることが示唆された。

【質疑応答】

以上の内容の発表について、審査員および聴衆からいくらか質疑が上がった。抜粋すると、EMARS 法の原理や限界を問うもの、細胞死の評価方法に関するもの、EBV による形質転換との関連について、実験方法についてのテクニカルな質問やアドバイス、rituximab の主たる作用機序との関連、材料として用いた Akata 細胞、Akata(-)細胞に特化した問題点の有無、抗体による架橋実験に対する指摘などがあげられる。これらの質問やコメントに対し、申請者は適切な説明をし、根拠をあげて意見を述べることができた。また、関連文献やこれまでの研究で明らかになった情報を紹介して、互いに理解を深めることができた。

以上の審査内容をふまえて、審査員一同、申請論文は、高知大学博士(医学)の学位を授与するに値する内容の研究であると判断いたしました。

氏名(本籍)	西岡 利恵 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第122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22年9月30日
学位論文題目	Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea (蝸牛血管条におけるアクアポリンとバソプレシンタイプ2レセプターの発現)
発表誌名	Hearing Research, 260(1-2), 11-19, 2010年2月

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	寺田	典生
	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 西岡 利恵

論文題目 Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor
in the stria vascularis of the cochlea

(蝸牛血管条におけるアクアポリンとバゾプレシンタイプ
2レセプターの発現)

(論文要旨)

近年、内耳液の恒常性維持に、バゾプレシン (VP) と水輸送膜蛋白であるアクアポリン (AQP) が関与する可能性が示唆されている。AQPは全身にひろく分布しており、腎臓では短時間に大量の水を輸送するしくみの一つとして、VP-AQP2システムの存在が明らかになっている。VP投与下、VPがバゾプレシンタイプ2レセプター (V2R) へ結合することにより、腎集合管主細胞頂側膜上にAQP2が発現し、AQP2を經由して細胞内へ流入した水が、側底膜に存在するAQP3と4を通じて流出していく。同様のシステムが内耳蝸牛に存在すると考えられる。AQPの発現の報告は多くみられるが、動物種・検討方法は異なっており、結果も一致していない。

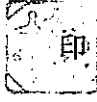


今回私たちは、ラット蝸牛血管条におけるAQP1/2/3/4/5/7/8/9およびV2Rの局在を、RT-PCRと免疫組織および免疫電顕にて検討した。私たちはすでにAQP6について、血管条に存在はするが細胞膜上には発現していないことを報告したため、今回の検討からは除外した。また、AQP1については過去に報告したが、他論文と異なる結果であったため、再度検討した。

実験動物として、頻用されるウイスターラットを用いた。RT-PCRは、蝸牛組織採取後、まずキアゲン社のRNA easy MINI Kitを用いてRNAを抽出し、Superscript IIを用いて逆転写を行い、Hot star Taqを用いてPCRを行った。cDNAを電気泳動後エチジウムブロマイドを用いて染色し、バンドを確認 (論文に掲載されたPrimerを使用)。また組織検討のため採取した側頭骨に4%パラホルムアルデヒド固定・EDTA脱灰を行い、OCTコンパウンド包埋後10マイクロメートルの厚さの凍結切片を作製し、2次抗体にアレクサ546を用い染色後蛍光顕微鏡で観察した。また、同様に作製した組織をLR white resinで包埋後超薄切片とし、2次抗体に金コロイドを用い、電子顕微鏡で観察した。なお、抗体は市販のものを用いた。RT-PCRの結果、検討したV2RとAQP全てのmRNAが蝸牛に発現していた。またその蛋白の局在を免疫組織や免疫電顕にて検討した結果、血管条基底細胞基底側膜にAQP2が、頂側膜にV2RとAQP3が、中間細胞頂側膜にAQP1が、辺縁細胞頂側膜にAQP7と9が局在していることを確認できた。

内耳液の恒常性維持は、聴覚や平衡覚を維持する上で必要不可欠である。蝸牛血管条は内リンパ産生場所と考えられている。また能動的なイオンと水輸送の主ルートと考えられている。今回の検討により、特に外リンパシステムと内リンパシステムの境界である基底細胞にAQP2・3とV2Rが存在していたことは特筆すべき結果であった。この分布はVP-AQP2が仲介する水輸送が、腎臓と

同様に基底細胞で活発に働いていることを支持している。また、AQPの駆動力は浸透圧勾配であり、内リンパの浸透圧が高いことから、外リンパ側から内リンパ側への水が流れるのではないかと推測した。VP投与下、水が外リンパ側からAQP2を介して基底細胞内へ流れ、AQP3を介して血管条内細胞間隙へ入る。または基底細胞内の水がギャップジャンクション（分子量1000以下の小分子を非選択的に透過）を経由して中間細胞へ入り、AQP1を経由して血管条内細胞間隙へ入る。辺縁細胞基底側膜にはAQPの発現はなく、細胞間隙から辺縁細胞へ水が流れるルートとしてNKCCが候補に挙げられる。NKCCを経由して辺縁細胞内へはいった水がAQP7又は9を経由して内リンパ側へ流れていくのではないかと推測した。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	西 岡 利 恵
審 査 委 員	主 査 氏 名	椛 秀 人 
	副 査 氏 名	寺 田 典 生 
	副 査 氏 名	執 印 太 郎 

題 目 Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea
(蝸牛血管条におけるアクアポリンとバゾプレシンタイプ2レセプターの発現)

著 者 Nishioka R, Takeda T, Kakigi A, Okada T, Takebayashi S, Nishimura M, Taguchi D, Hyodo M

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Hearing Research, 260(1-2), 11-19, 2010年2月

要 旨

内耳は、骨性の複雑な形の腔である骨迷路とその中にある膜性の膜迷路からなり、音とバランスの情報を脳へ送る。骨迷路と膜迷路の間は、一般の体液によく似たイオン組成を持つ外リンパ液で満たされ、膜迷路の内部は、高 K^+ 、低 Na^+ 、低 Ca^{2+} 濃度を基本とする内リンパ液で満たされている。内耳が正常な機能を営むには、これらの液成分の水・電解質代謝を通しての恒常性維持が必要不可欠である。メニエル病の本態である内リンパ水腫は、これらの恒常性維持機構の破綻、特に水代謝の破綻によって惹起されることが推測されている。蝸牛中心階の外側面を構成する血管条は内リンパ液の産生に重要な組織であり、辺縁細胞によって形成される層と、中間細胞・基底細胞・血管内皮・らせん靭帯内線維細胞がギャップ結合により機能的合胞体を形成している層からなる。近年、内耳液の恒常性維持にバゾプレッシン (VP) と水チャネルタンパクであるアクアポリン (AQP) が関与することが示唆されている。特に、内耳液の恒常性が VP-AQP2 システムによって制御されているとの知見が集積されている。腎臓では、VP が腎集合管主細胞側底膜の VP タイプ 2 受容体 (V2R) に結合することによ

り、主細胞管腔膜 AQP2 の発現量増加と活性化が促進され、この AQP2 を通って細胞内に流入した水が、側底膜に存在する AQP3 と AQP4 を通って流出していくシステムの存在が明らかになっている。同様のシステムが内耳蝸牛にも存在すると考えられるが、内耳蝸牛における AQP サブタイプと V2R の発現部位については不明な点が多い。

そこで申請者らは、内リンパ産生の場合と考えられている蝸牛血管条における AQP サブタイプ及び V2R の局在を RT-PCR、免疫組織化学及び免疫電顕にて検討した。具体的には、まずラット蝸牛組織から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。増幅産物を電気泳動後、エチジウムブロマイドにより染色し、バンドの確認を行った。次に、蝸牛血管条領域の凍結切片を作製し、2 次抗体にアレクサ 546 を用い染色後蛍光顕微鏡で観察した。また、同様に作製した組織を包埋後超薄切片とし、2 次抗体に金コロイドを用い、電子顕微鏡で観察した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) RT-PCR による遺伝子解析により、検討した AQP1・2・3・4・5・7・8・9 と V2R の全ての mRNA が蝸牛に発現していることが明らかとなった。
- 2) 免疫組織化学と免疫電顕による解析により、血管条基底細胞の基底側膜に AQP2 が、内リンパ腔側膜に V2R と AQP3 が、中間細胞の内リンパ腔側膜に AQP1 が、辺縁細胞の内リンパ腔側膜に AQP7 と AQP9 が局在していることが明らかとなった。

外リンパシステムと内リンパシステムの境界にある基底細胞に V2R と AQP2・3 が発現していたことは、水を輸送する VP-AQP2 システムが、腎臓と同様に基底細胞で活発に働いていることを示唆している。申請者らは、VP 投与下で水が外リンパ側から内リンパ側へと流れていくメカニズムについて考察を加えている。

申請者らの論文は、血管条における AQP2・3・7 と V2R の細胞内局在を明らかにした最初の報告であり、学術的に高く評価される。本論文はまた、内耳液の恒常性維持機構の解明のみならず、メニエル病の病態解明や治療法の開発、予防法の確立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(国籍)	孙 长海 (中国) [孫 長海]
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第12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22年7月6日
学位論文題目	Metabonomics study of the protective effects of <i>Lonicera japonica</i> extract on acute liver injury in dimethylnitrosamine treated rats (<i>Lonicera japonica</i> (金銀花)抽出エキスジメチルニトロソアミン惹起急性肝障害モデルラットの予防効果のMetabonomics解析)
発表誌名	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 53(2010): 98-102, 2010年3月
	審査委員 主査 教授 西原 利治 副査 教授 横山 正尚 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 孫 長海

論文題目

Metabonomics study of the protective effects of *Lonicera japonica* extract on acute liver injury in dimethylnitrosamine treated rats (*Lonicera japonica*(金銀花)抽出エキスにおけるジメチルニトロソアミン惹起急性肝障害モデルラットに対する予防効果の Metabonomics 解析)

(論文要旨)

【緒言】毒性学や病気診断など多くの分野において、薬物や生体分子の代謝による最終産物、或いはその中間体の解析を行う Metabonomics 解析が注目されている。Metabonomics 解析は、「動的な代謝反応の量的な解析」と定義される多変量統計法である。

Metabonomics 解析の分析手法は、主に質量分析法が用いられる。ガスクロマトグラフィー (GC) と質量分析 (MS) と組み合わせた GC/MS が広く普及し、さらに、質量分析における代謝物の分析・同定に用いるライブラリーが急速に整備され、分析感度及び特異性の向上は著しい。質量分析法による定量・定性的分析結果により、代謝産物はバイアスなしに網羅的にカタログ化され、代謝産物同士の関係が特徴付けられること等から、医療の場においても、診断や薬物代謝への応用が期待される。特に、尿などの試料中に含まれる代謝物を網羅的に測定することで、生体や組織、細胞における代謝物プロファイルの変動を検出することができ、代謝等に影響を及ぼす様々な生物学的事象の解明が期待される。

近年、生薬やハーブなどの天然物の医療への応用に関する研究は著しく進展している。生薬などの有用性・安全性の科学的検証における評価は、主に血液成分や組織学的評価などが指標とされている。一方、生薬は多成分系であることが多く、疾患に対する臨床効果を推測する手法として、Metabonomics 解析の応用が期待される。

申請者等は、既に、日本・中国において主に清熱解毒を目的とし、肝機能障害、化膿性皮膚疾患、扁桃炎及び消化管感染症などに広く応用されている金銀花 (*Flos Lonicerae*) に注目し、肝障害モデル動物に金銀花抽出エキスを投与、エキスの肝機能障害に対する有用性の科学的検証を行って

る。本論文では、肝障害モデル動物に金銀花を投与し、採取した尿中の代謝物群について Metabonomics 解析を行い、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検討を行った。

【方法】金銀花はスイカズラ (*Lonicera japonica* Thunberg) の花蕾を用い、常法に準拠し 75%エタノールを用いて抽出した。急性肝障害モデルは、Wistar 系雄性ラットを用い、ジメチルニトロソアミン (DMN) を 40mg/kg 腹腔内投与することにより作成した。金銀花抽出エキスは、DMN 投与 7 日前より投与後 7 日まで強制投与した。なお、対照として水道水投与群を用いた。GC/MS 測定試料は、DMN 投与前 1、3、5、7 日及び DMN 投与後 1、3、5 日後に 24 時間蓄尿したものを採取した。各尿サンプルについて、GC/MS (QP5050A、島津製作所製) を用い、TIC クロマトグラム 40-500 m/z レンジにてデータ収集した。GC/MS データは、MATLAB (バージョン 7.0.1、MathWorks) にてデータ処理を行い、アルゴリズム主成分分析 (PCA) を用いて解析した。解析は、二次元のマッピング法 (1 番目の主成分 (PC1) 対 2 番目の主成分 (PC2)) の二次元スコアプロットを用い、多変量空間における経時的なサンプル分布を、平均化して、群間比較した。さらに、DMN 投与、金銀花抽出エキス投与の影響を検討するために、正常ラットの尿においても、同様に、Metabonomics 解析を行った。また、投与終了後、肝臓を摘出し、Azan 染色による病理組織学的検討を行った。

【結果・考察】金銀花抽出エキス、水道水投与群及び正常ラットにおける尿 GC/MS クロマトグラムの中に、信号対雑音比が 10 以上の代謝物のピークは、19 種確認できた。これらのピークデータを用いて、試料毎の生化学的パターンを、19 次元のベクトルに構築した。各ベクトルは、各ラットの尿量変化による尿濃度の相違により、MATLAB の Z スコア機能で正常化した。

DMN 惹起急性肝障害モデルラットに対する金銀花抽出エキス及び水道水投与群における GC/MS を用いた尿サンプル Metabonomics 解析の経時的な比較、さらには正常ラットの尿サンプル Metabonomics 解析との比較において、尿中成分の変化は、群間で大きく異なった。DMN 惹起急性肝障害ラットと正常ラットのプロット分布は、大きく異なり、DMN 投与による尿中生化学的变化が示された。さらに、金銀花投与群におけるプロット分布は、投与前に比べ、経時的に正常ラットに近似する傾向を示した。また、正常ラットとの比較により、DMN 投与、金銀花抽出エキス投与により誘発される 9 種の尿中代謝成分をバイオマーカーとして発見した。さらに、病理組織学的検討による金銀花抽出エキスの DMN 惹起急性肝障害モデルラットに対する評価は、Metabonomics 解析と同様の傾向を示し、Metabonomics 解析の非侵襲的方法による臨床評価の有用性が示された。

【結語】 GC/MS 及び PCA を用いた Metabonomics 解析により、DMN 惹起急性肝障害及び金銀花抽出エキス投与による尿中の生化学的変化は、明瞭及び一貫性を持って識別された。さらに、同時に、病態変化及び天然物投与による尿中バイオマーカーを発見することができた。本研究により明確化された様に、今後、Metabonomic 解析は、診断及び薬効評価等、臨床評価の指標として期待される。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	孫 長 海
審 査 委 員	主 査 氏 名	西 原 利 治 印
	副 査 氏 名	横 山 正 尚 印
	副 査 氏 名	執 印 太 郎 印

題 目 Metabonomics study of the protective effects of *Lonicera japonica* extract on acute liver injury in dimethylnitrosamine treated rats
 (*Lonicera japonica* (金銀花) 抽出エキスジメチルニトロソアミン惹起急性肝障害モデルラットの予防効果の Metabonomics 解析)

著 者 Changhai Sun, Yang Teng, Guangzhi Li, Saburo Yoshioka,
 Junko Yokota, Mitsuhiro Miyamura, Hongzhuang Fang, Yu Zhang

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、年 月
 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 53(2010): 98-102

要 旨

近年、本邦でもサプリメントの使用が広く行われるようになり、肥満の軽減を目的としたサプリメントは人気のある商品の一つになっている。しかし、効果を高めるために甲状腺末など薬物の混入が後を絶たず、健康被害をもたらすためしばしば社会問題となっている。ニトロソ化合物が添加されたサプリメントはことに毒性が強く、服用後に急性肝不全をきたした症例に対し救命のための肝移植が行われたことは記憶に新しい。しかし、毒物の作用を緩和するといった観点からの研究は西洋医学では活発ではなく、なす術のないのが実情である。他方、生薬やハーブなどの天然物の医療への応用については、以前に増して熱い期待が高まっており、本研究のように毒物の緩和作用を持つ天然資源を用いた健康増進も極めて重要な研究課題の一つである。

申請者らは、本邦や中国で清熱解毒を目的として広く用いられているスイカズラ (*Lonicera Japonica*) の花蕾から作られる生薬に肝機能障害などの改善効果があることに着目し、dimethylnitrosamine によって誘発される重症肝障害の予防・治療効果について検討を行った。本論文には、スイカズラの花蕾 2 g から 75%アルコールにより抽出したエキス

を雄性 Wistar ラットに連日経口投与しておく、dimethylnitrosamine によって惹起される重症肝障害は組織学的にも軽減されることや、花蕾エキス投与を継続することにより肝障害からの回復が促進されることが記載されている。

dimethylnitrosamine によって誘発される重症肝障害は、肝細胞保護作用を持つ薬剤の開発を行う際に広く用いられるモデルであり、従来は組織学的検索に加えて、AST や ALT、プロトロンビン時間などといった血液検査により、治療に用いられる薬剤の有用性検定が行われてきた。しかし、スイカズラの花蕾エキスは多成分系であるため、従前の臨床検査のみで花蕾エキスの臨床効果を十分に把握することができないのではないかと考えた申請者らは、ガスクロマトグラフィーと質量分析とを組み合わせた GC/MS による質量分析法を用いて蓄尿検体の解析を行うことにより、花蕾エキスによる治療効果を容易に検出する方法を創出した。今回の GC/MS による metabonomics 解析では、花蕾エキスを服用した際に生じる生体内の変化の検出にも成功しており、GC/MS の解析力の高さを利用した新たな臨床検査法の開発に向けた先駆的研究と位置づけることもできる。

以上より、申請者らの論文は、スイカズラの花蕾エキスが dimethylnitrosamine によって誘発される重症肝障害の予防・治療に有効である可能性を示したのみならず、GC/MS による新しい臨床検査法の開発に向けた先駆的研究となることが期待された。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。