



(題字：相良祐輔学長)

# 国立大学法人 高知大学学報

## 高知大学学位授与記録第二十六号

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 63 号	大西 知子	Evaluation of the depth score of type V pit patterns in crypt orifices of colorectal neoplastic lesions (V型ピットパターンの腺口形態から見た大腸癌深達度診断の検討)	1
甲医博第 64 号	浦松 睦実	Different effects of sulfur amino acids on prolidase and prolinase activity in normal and prolidase-deficient human erythrocytes (正常人及びプロリダーゼ欠損症患者におけるプロリダーゼ及びプロリナーゼ活性に対する含硫アミノ酸の異なる作用)	5
甲医博第 65 号	倉谷 義智	Morphogenesis of a colorectal neoplasm with a type IIIs pit pattern from the viewpoint of isolated crypts (腺管単離法を用いた IIIs 型ピットパターンを呈する大腸腫瘍の組織形態発生の検討)	10
甲医博第 66 号	中谷 貴美子	Perforating branches of the internal thoracic artery in women with breast cancer: An anatomical study for breast-conservation surgery (乳癌患者における内胸動脈穿通枝の解剖学的検討)	15
甲医博第 67 号	新井 淳一	Role of brain prostanoids in glucagon-like peptide-1-induced central activation of sympatho-adrenomedullary outflow in rats (ラット脳室内に投与した GLP-1 は、脳内プロスタノイドを介して中枢性に交感神経-副腎髄質系を賦活する)	19
甲医博第 68 号	中居 永一	Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma (神経膠芽腫由来の腫瘍幹細胞における MDR1 の発現増強と薬剤耐性について)	24
甲医博第 69 号	佐藤 哲也	Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in renal transplant recipients (小児腎移植患者の EB ウイルス量と killer T 細胞のモニタリング)	29

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
乙医博第41号	香川 亨	Angiotensin II receptor blocker inhibits tumor necrosis factor alpha-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells (アンジオテンシンII受容体拮抗薬はヒト腎近位尿細管上皮細胞において腫瘍壊死因子 $\alpha$ による細胞傷害を阻害する)	34
乙総医博第1号	近澤 成和	Expression of angiogenesis-related genes regulates different steps in the process of tumor growth and metastasis in human urothelial cell carcinoma of the urinary bladder (膀胱尿路上皮癌の腫瘍増生および転移の過程における血管新生関連遺伝子の経時的発現の変化)	39
乙総医博第2号	土岐 真治	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG and <i>Lactobacillus casei</i> suppress <i>escherichia coli</i> -induced chemokine expression in intestinal epithelial cells ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GGと <i>Lactobacillus casei</i> は、大腸菌によって誘導される腸管上皮細胞のケモカイン発現を抑制する)	44
乙総医博第3号	西川 宏志	T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of <i>Escherichia coli</i> urinary tract infections (大腸菌性尿路感染症に対する治療選択肢としてのT-evenバクテリオファージの検討)	49

氏名(本籍)	大西 知子(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第63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20年7月31日
学位論文題目	Evaluation of the depth score of type V pit patterns in crypt orifices of colorectal neoplastic lesions (V型ピットパターンの腺口形態から見た大腸癌深達度診断の検討)
発表誌名	Journal of Gastroenterology 2008; 43 (4) :291-297

審査委員	主査	教授	小林	道也
	副査	教授	降幡	睦夫
	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

大西知子

## Evaluation of the depth score of type V pit patterns in crypt orifices of colorectal neoplastic lesions

論文題目

(V型ピットパターンの腺口形態から見た大腸癌深達度診断の検討)

(論文要旨)

【目的】大腸病変における拡大内視鏡を用いた pit pattern 診断は、腫瘍と非腫瘍の鑑別、腺種と癌の鑑別、早期大腸癌の深達度診断に有用である。その中で、早期大腸癌の深達度診断は、内視鏡的治療の適応を評価する際に重要である。粘膜下層浸潤癌では、癌の粘膜下層への浸潤実測値が 1000 $\mu$ m より深い場合は、10%程度のリンパ節転移を認めると報告されているため内視鏡的治療後に追加手術が必要となる。この様に、癌の深達度を正確に推定することが、治療方針の決定に役立つという観点からも、pit pattern 診断は重要性を増している。

以上の様な背景から、本研究では、腺管の構造異型を反映する癌の所見であるV型 pit pattern を構成する腺口開口部の所見を明確にし、深達度診断に有用で臨床に役立つ所見について検討した。

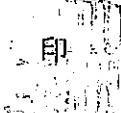


【方法】1996年12月から2005年4月までに内視鏡的ないし外科的切除により病理組織診断が得られた標本のうち、実体顕微鏡を用いてV型 pit pattern の再検討ができた高度異型腺腫22病変、早期大腸癌119病変を対象とした。

深達度分類は、浸潤実測値が1000 $\mu$ m より深い場合を粘膜下層深部浸潤癌とした。V型 pit pattern を形成する所見として、既存の pit の消失、腺管の辺縁不整、腺管の内腔狭小化、腺管の輪郭が不明瞭の4種類の腺管開口部所見を取り上げ深達度との関係を検討し、その有用性を評価した。また病変は内視鏡治療の適応である腺腫、粘膜内癌、粘膜下層浅部浸潤癌までを一つの群とし、外科切除の適応である粘膜下層深部浸潤癌を別の群にした2群で検討した。

【結果】既存の pit の消失、腺管の辺縁不整、腺管の内腔狭小化、腺管の輪郭不明瞭の4種類の腺管開口部所見のうち、辺縁不整、腺管の内腔狭小化、輪郭の不明瞭化は、粘膜下層深部浸潤癌を示唆する所見として有意差を持って認められた。ロジスティック回帰分析を行い、ROC曲線にて有用性の確認された所見をもとに算出して得られた早期大腸癌の深達度診断スコアを0.63に設定して検討したところ、腺腫、粘膜内癌、粘膜下層浅部浸潤癌80例すべてが内視鏡的治療可能群に入り(特異度1.0)、粘膜下層深部浸潤癌病変61例のうち53例(86.9%)が外科治療必要群に振分けられた(感度0.869)。

【結論】以上の結果より、V型 pit pattern の腺管開口部の所見をパターン認識することで、より正確な深達度診断が可能となり診断率の向上に繋がると考えられた。このV型 pit pattern における客観的所見の有用性と限界を認識した上で、早期大腸癌の深達度診断に応用して、正確な内視鏡的治療の適応病変を選別していくことが重要である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	大 西 知 子
審 査 委 員	主 査 氏 名    小 林 道 也 副 査 氏 名    降 幡 睦 夫 副 査 氏 名    花 崎 和 弘	  

題 目    Evaluation of the depth score of type V pit patterns in crypt orifices of colorectal neoplastic lesions  
 (V型ピットパターンの腺口形態から見た大腸癌深達度診断の検討)

著 者    Tomoko Onishi, Satoru Tamura, Yoshinori Kuratani, Saburo Onishi, Nobufumi Yasuda

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、    年 月  
 Journal of Gastroenterology 2008; 43 (4) : 291-297

### 要 旨

【背景および目的】大腸病変における拡大内視鏡を用いた pit pattern 診断は、腫瘍と非腫瘍の鑑別、腺種と癌の鑑別、さらに早期大腸癌の深達度診断に有用である。その中で、早期大腸癌の深達度診断は、内視鏡的治療の適応を評価する際に特に重要である。粘膜下層浸潤癌では、癌の粘膜下層への浸潤実測値が 1000  $\mu\text{m}$  より深い場合は、10%程度のリンパ節転移を認めると報告されており、内視鏡的治療後にリンパ節郭清を含めた追加手術が必要となる。この様に、癌の深達度を正確に推定することが、治療方針の決定に役立つという観点からも、pit pattern 診断は重要性を増している。

以上の様な背景から、本研究では、腺管の構造異型を反映する癌の所見であるV型 pit patternのうち、TisおよびT1の大腸癌を含むため、内視鏡的治療の適応決定が困難な場合があるV<sub>1</sub>型 pit patternを構成する腺口開口部の所見を明確にし、深達度診断に有用で臨床に役立つ所見について検討した。

【方法】1996年12月から2005年4月までに内視鏡的ないし外科的切除により病理組織診断が得られた標本のうち、実体顕微鏡を用いてV<sub>1</sub>型 pit patternの再検討ができた高度異型腺腫22病変、早期大腸癌119病変を対象とした。

深達度分類は、浸潤実測値が1000  $\mu\text{m}$  より深い場合を粘膜下層深部浸潤癌とした。V<sub>1</sub>型 pit patternを形成する所見として、既存のpitの消失、腺管の辺縁不整、腺管の内腔狭小化、腺管の輪郭不明瞭の4種類の腺管開口部所見を取り上げ深達度との関係を検討し、その有用性を評価した。また病変は内視鏡治療の適応である腺腫、粘膜内癌、粘膜下層浅部浸潤癌までを一つの群とし、外科切除の適応である粘膜下層深部浸潤癌を別の群にした

2群で検討した。

【結果】既存の pit の消失、腺管の辺縁不整、腺管の内腔狭小化、腺管の輪郭不明瞭の4種類の腺管開口部所見のうち、辺縁不整、腺管の内腔狭小化、輪郭の不明瞭化は、粘膜下層深部浸潤癌を示唆する所見として有意差を持って認められた。ロジスティック回帰分析を行い、ROC曲線にて有用性の確認された所見をもとに算出して得られた早期大腸癌の深達度診断スコアを0.63に設定して検討したところ、腺腫、粘膜内癌、粘膜下層浅部浸潤癌80例すべてが内視鏡的治療可能群に入り(特異度1.0)、粘膜下層深部浸潤癌病変61例のうち53例(86.9%)が外科治療必要群に振分けられた(感度0.869)。

申請者らは臨床上得られるパラメータに基づいて、粘膜下深部浸潤を診断するスコアリングシステムを開発した。V<sub>I</sub>型 pit pattern の腺管開口部の所見をパターン認識することで、より正確な深達度診断が可能となり、診断率の向上に寄与すると考えられ、近年増加傾向にある早期大腸癌に対する内視鏡的治療に際し、正確に適応病変を選別するための重要な知見を示した。以上の知見は学術的評価も高く、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると評価した。

氏名(本籍)	浦松 陸実 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第64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20年7月31日
学位論文題目	Different effects of sulfur amino acids on prolidase and prolinase activity in normal and prolidase-deficient human erythrocytes (正常人及びプロリダーゼ欠損症患者におけるプロリダーゼ及びプロリナーゼ活性に対する含硫アミノ酸の異なる作用)
発表誌名	Clinica Chimica Acta 375(2007): 129-135
	<b>審査委員</b> 主査 教授 佐野 栄紀 副査 教授 横谷 邦彦 副査 教授 大西 三朗

## 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 浦松 睦実

## 論文題目

Different effects of sulfur amino acids on prolidase and prolinase activity in normal and prolidase-deficient human erythrocytes.  
(正常人及びプロリダーゼ欠損症患者におけるプロリダーゼ及びプロリナーゼ活性に対する含硫アミノ酸の異なる作用)

(論文要旨)

### 【目的】

プロリダーゼ欠損症患者は X-Pro を加水分解するプロリダーゼが欠損しているために、尿中に多量のイミノジペプチドを排泄していることが報告された。その後 DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを用いて、正常人赤血球よりプロリダーゼのアイソザイム PD I と II が部分精製され、これらの酵素の  $MnCl_2$  に対する反応、基質特異性、熱に対する安定性や PD I と II の活性に対する種々のアミノ酸の効果を調べた。最近、Pro-X を加水分解するプロリナーゼの活性に対するアミノ酸の効果についても調べた。

しかし、これらの酵素活性に対する含硫アミノ酸の効果については調べられていなかった。

そこで申請者は本研究において、正常人及びプロリダーゼ欠損症患者の赤血球中の lysate のプロリダーゼ及びプロリナーゼ活性に対する種々の含硫アミノ酸の効果について詳細に研究した。

### 【方法】

1) 正常人及びプロリダーゼ欠損症患者の血液をヘパリンのある試験管に採血し、遠心して赤血球を分離し、分離した赤血球を 0.9% NaCl で洗い、10 分間 1000xg で遠心した。その赤血球に 3 倍量の純水を加えて溶血し、その溶血液を酵素溶液として用いた。蛋白質の濃度は Lowry の方法を用いて測定した。

2) プロリダーゼ及びプロリナーゼ活性の測定

プロリダーゼ及びプロリナーゼ活性は種々のイミノジペプチドを用いて測定した。反応液には  $10\mu l$  の酵素液、 $80\mu l$  の 50 mM Tris-HCl (pH7.8) と  $10\mu l$  の 20 mM  $MnCl_2$  又は 2 mM  $MnCl_2$ 、 $37^\circ C$  で 10 分間プレインキュベートし、10 mM 基質  $100\mu l$  を加え、 $37^\circ C$  で 30 分間又は 60 分間反応した。その反応液に 10% TCA  $200\mu l$  を加えて反応を止めた。

遊離したプロリンは Chinard の方法を用いて分光光度計で測定した。赤血球の lysate のプロリナーゼの反応速度論はラインウェーバーバークの式を用いて測定した。

### 【結果・考察】

我々はこれまでに正常人及びプロリダーゼ欠損症患者の Gly-pro に対する赤血球のプロリダーゼ活性が  $MnCl_2$  の存在下でグリシン、アラニン、セリンによって強く上昇すること、また、Pro-gly に対するプロリナーゼ活性は  $MnCl_2$  の存在下でグリシン、アラニンによって上昇したが、分枝鎖アミノ酸の L-バリンと L-ロイシンによって著しく抑制された。しかし、D-分枝鎖アミノ酸はその活性を上昇させたこと等を報告してきた。

本研究において正常人及びプロリダーゼ欠損症患者の赤血球の lysate を用いてプロリダーゼ及びプロリナーゼ活性に対する種々の含硫アミノ酸の効果を調べた。D-メチオニンは正常人及び患者の Pro-gly に対するプロリナーゼ活性を  $MnCl_2$  の存在下で強く上昇させた。一方 L-メチオニンと N-アセチル L-メチオニンは濃度依存的にこれらの活性を抑制した。これに対して正常人赤血球の Gly-pro に対するプロリダーゼ活性は L-と D-メチオニン共に低濃度で上昇し、強い抑制効果は認められなかった。

D,L-ホモシステインと D,L-ホモシステインチオラクトンは正常人及び患者の Pro-gly に対するプロリナーゼ活性を濃度依存性に強く抑制した。一方 D,L-エチオニンと D-と L-メチオニンは低濃度でプロリナーゼ活性を少し上昇させたが、高濃度になるに従ってその活性を抑制した。

50 mM での抑制の強さは D,L-ホモシステイン>D,L-ホモシステインチオラクトン> D,L-メチオニン>D,L-エチオニンの順であった。

Met-pro に対する正常人及び患者のプロリダーゼ活性は、D,L-エチオニンによって著しく上昇した。D,L-メチオニンと D,L-ホモシステインチオラクトンは低濃度でその活性を上昇させた。一方、D,L-ホモシステインはその活性を濃度依存的に抑制した。



次に種々のイミノジペプチドに対する正常人及び患者の赤血球のプロリナーゼ活性に対する L-メチオニンと D-メチオニン及び D,L-ホモシステインの効果を調べた。両者のプロリナーゼ活性は、10 mM L-メチオニンではあまり抑制効果を認めなかったが、50 mM L-メチオニンで強く抑制された。

10 mM D-メチオニンはその活性を上昇させた。しかし、50 mM D-メチオニンはあまり効果を認めなかったが、正常人の Pro-Asp と Pro-glu に対する活性は強く抑制された。10 mM D,L-ホモシステインは実験に用いたすべてのイミノジペプチドのプロリナーゼ活性を抑制した。50 mM D,L-ホモシステインでは更にその活性を強く抑制した。

正常人のプロリナーゼに対する含硫アミノ酸の作用機構を調べるために、これらのプロリナーゼの kinetics も調べた。

本研究によって、正常人及び患者のプロリナーゼとプロリダーゼ活性に対する種々の含硫アミノ酸の効果が異なっていることが明らかになったが、これらの詳細な作用機構は明らかでない。しかし、D-メチオニン、D-エチオニンのような含硫アミノ酸を加えることによって患者における種々のアミノ酸の再利用を改善し、慢性下腿潰瘍の治療に役立つことが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	浦 松 睦 実
審 査 委 員	主 査 氏 名	佐 野 栄 紀 
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	大 西 三 朗 印

題 目      Different effects of sulfur amino acids on prolidase and prolinase activity in normal and prolidase-deficient human erythrocytes  
 (正常人及びプロリダーゼ欠損症患者におけるプロリダーゼ及びプロリナーゼ活性に対する含硫アミノ酸の異なる作用)

著 者      Mutsumi Uramatsu, Gang Liu, Soichiro Uramatsu, Mei Zhang,  
 Weifang Wang, Kazuko Nakayama, Masanobu Manabe, Hiroyuki Kodama

発表誌名、巻 (号)、ページ (    ~    ),      年 月  
 Clinica Chimica Acta 375(2007): 129-135

### 要 旨

プロリダーゼ欠損症はイミノジペプチド(X-Pro)を加水分解するジペプチダーゼ (プロリダーゼ) を欠損した常染色体劣性の遺伝性疾患であり、尿中へ多量のイミノジペプチドを排泄する。この患者では生体内のプロリンのリサイクルが障害されているため、プロリン含有量の高いコラーゲン等の生成が障害され、難治性の下腿潰瘍、精神発達遅延をきたす。DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィを用いて赤血球から2種類のプロリダーゼ I、II が分離精製され種々のイミノジペプチドに対する酵素活性が解析されてきた結果、プロリダーゼ欠損症患者では主にプロリダーゼ I 活性が完全欠失しているが、プロリダーゼ II 活性はほぼ正常に認められることが明らかになった。またプロリダーゼは種々のアミノ酸添加によりその酵素活性が修飾されることが明らかにされている。その後、Pro-X を加水分解するジペプチダーゼ (プロリナーゼ) についても解析された結果、プロリダーゼ欠損患者では正常と比較して MgCl<sub>2</sub> 添加による影響や基質特

異性の違いがあるもののプロリナーゼ活性は正常またはやや亢進していることが報告されている。今回申請者は、含硫アミノ酸添加によるプロリダーゼおよびプロリナーゼ活性への影響をプロリダーゼ欠損症患者および正常人の赤血球溶血液を用いて比較検討した。(1) D-メチオニン<sup>+</sup>は正常人及び患者の Pro-gly に対するプロリナーゼ活性を  $MgCl_2$  の存在下で強く上昇させた。一方 L-メチオニンと N-アセチル L-メチオニンは濃度依存的にこれらの活性を抑制した。これに対して正常人赤血球の Gly-pro に対するプロリダーゼ活性は L-と D-メチオニン共に抑制効果は認めなかった。(2) D,L-ホモシステインと D,L-ホモシステインチオラクトンは正常および患者の Pro-gly に対するプロリナーゼ活性を濃度依存的に強く抑制した。一方 D,L-エチオニンは低濃度でプロリナーゼ活性を軽度上昇させるも高濃度で抑制した。(3) 正常人プロリダーゼ活性および患者プロリダーゼ II 活性は、D,L-エチオニンによって著明に上昇し低濃度 D,L-ホモシステインチオラクトンにて軽度上昇した。一方、D,L-ホモシステインは濃度依存的に抑制した。(4) 50mM の D, L-メチオニンは Pro-Asp, Pro-glu を基質とした正常人プロリナーゼ活性を強く抑制したが、患者プロリナーゼ活性では影響が少ないことが明らかになった。(5) D,L-ホモシステイン、L-システインの正常人プロリナーゼ活性に対する阻害の Kinetics を検討した結果、拮抗および非拮抗阻害の混合型であることが明らかとなった。

本論文は、プロリダーゼ欠損患者におけるプロリナーゼ活性に対する含硫アミノ酸の作用を正常人との比較において明らかにした。またこの含硫アミノ酸の正常人プロリダーゼに対する影響、正常人プロリナーゼに対する阻害様式も酵素的に検討しこれを明らかにした。プロリダーゼ欠損患者においてプロリナーゼが代償的にプロリンを提供する可能性を鑑みた場合、その活性を高めることが出来る含硫アミノ酸の意義を明らかにできたことは、本疾患に認められる慢性的皮膚潰瘍の治療への有用性が示唆される。そこで、審査員一同は、本論文が高知大学博士（医学）の学位の授与に値すると判断する。

氏名(本籍)	倉谷 義智 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第65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20年7月31日
学位論文題目	Morphogenesis of a colorectal neoplasm with a type IIIs pit pattern from the viewpoint of isolated crypts (腺管単離法を用いた IIIs 型ピットパターンを呈する大腸腫瘍の組織形態発生の検討)
発表誌名	Journal of Gastroenterology vol.43, no.8 2008年8月
	<b>審査委員</b> 主査 教授 小林 道也 副査 教授 降幡 睦夫 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

倉谷義智

論文題目

MORPHOGENESIS OF A COLORECTAL NEOPLASM WITH  
A TYPE III<sub>s</sub> PIT PATTERN FROM THE VIEWPOINT OF ISOLATED CRYPTS.  
(腺管単離法を用いた III<sub>s</sub> 型ピットパターンを呈する大腸腫瘍の組織形態発生の検討)

(論文要旨)

目的: 大腸内視鏡のピットパターン分類は 1996 年に工藤らが報告した、大腸粘膜の腺管開口部所見である。この分類は、病変の病理組織診断とよく相関しており、本邦では広く用いられている。中でも III<sub>s</sub> 型ピットパターンは陥凹型腫瘍、非顆粒型側方発育型腫瘍の陥凹部で観察される所見である。今回は、この III<sub>s</sub> 型ピットパターンを構成する腺管を単離し、走査電子顕微鏡で観察することにより、このピットパターンを呈する大腸腫瘍の三次元組織形態発生を検討した。

対象と方法: 対象は 1996 年 12 月から 2004 年 12 月までに内視鏡検査を行い、内視鏡的もしくは外科的に切除し病理組織学的評価をした病変である。すべての症例でインフォームドコンセントを得た。

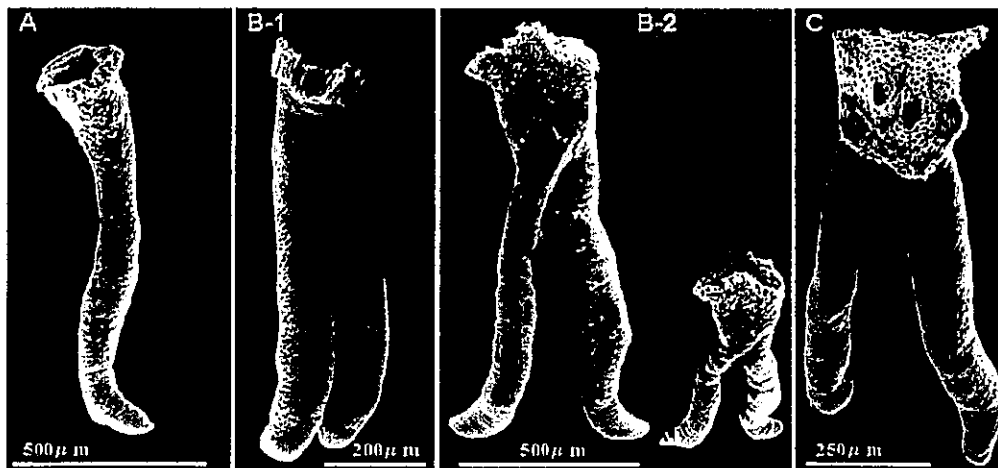
陥凹を有する表面型大腸腫瘍(n=12)から 109 の腺管を単離した。病変の内訳と大きさは、腺腫 9 例:8.11±5.23 mm、粘膜下層浸潤癌 3 例:12mm, 15mm, 18mm であった。

内視鏡検査はインジゴカルミンを散布し拡大観察を行った。また、切除後の病変はカラッチヘマトキシリン染色を行い、実体顕微鏡観察下に割を入れた。これら拡大内視鏡と実体顕微鏡の所見をもとに、ピットパターン分類を行い、III<sub>s</sub> 型ピットパターンを示す病変を抽出した。抽出された病変はいずれも陥凹を有する病変であった。病理組織はヘマトキシリンエオジン染色後に、WHO 分類に従って診断した。

腺管は、Arakiら(Gastroenterology 1995; 109: 1468-1474)の塩酸消化法を用いて単離を行った後、走査電子顕微鏡で観察した。

結果: 単離腺管は分岐のない試験管状の単一腺管(A 群)と、2 つに分岐した腺管とが抽出された。分岐が先端から下部もしくは中部までの腺管(B 群)では、その開口部は正円形を示し、分岐が上部まで及んだ腺管(C 群)の開口部は卵円形を示した(図 1)。

図 1



腺管の開口部径(表 1)は、A 群では  $95.1 \pm 28.1 \mu\text{m}$  (n=52)、B 群では  $114.7 \pm 40.8 \mu\text{m}$  (n=44)、C 群では長径  $208.1 \pm 71.4 \mu\text{m}$  (n=13)であった。各群間に有意差を認めた。C 群の開口部径は A 群および B 群の約 2 倍であった。

表 1

Diameter of the crypt orifice ( $\mu\text{m}$ )		
A (n=52)	$95.1 \pm 28.1$	} P=0.0295
B (n=44)	$114.7 \pm 40.8$	
C (n=13)	$208.1 \pm 71.4$	} P<0.0001

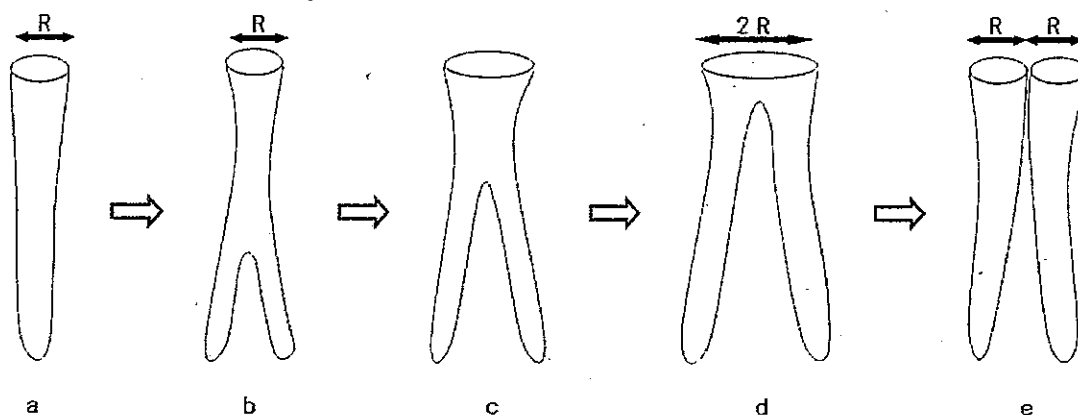
A: Non-bifurcated type crypt

B: Bifurcation reached up to the middle part of crypt

C: Bifurcation reached to the upper part of crypt

考察: IIIs 型ピットパターンを示す陥凹型腫瘍は、腫瘍径が 10mm 前後と小さなうちに粘膜下層に浸潤する傾向を有する、という特徴を持ち、臨床的にも注目されている。腺管単離法を用いて同大腸病変に関して組織形態発生を 3 次元的に検討したのは今回が最初である。腺管の形態と開口部径を検討した結果、腺管は下部から分岐し、分岐が上部に進展し、二つの腺管に分離することにより増殖する(図 2)と推測された。

図 2



a: non-bifurcated crypt

b: crypt which bifurcation confined in bottom



c: crypt which bifurcated to middle

d: crypt which bifurcated to cervical part

e: completely bifurcated crypt (two non-bifurcated crypts)

また、これまでの検討において、隆起型腫瘍の腺管は主に増殖帯のある腺体部から芽出する形で分岐していた。形態別に大腸腫瘍の腺管三次元構造を解析することで、各形態の深部浸潤様式や組織発生的一端が解明できると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	倉 谷 義 智
審 査 委 員	主 査 氏 名	小 林 道 也 
	副 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘 印

題 目 Morphogenesis of a colorectal neoplasm with a type IIIs pit pattern from the viewpoint of isolated crypts  
(腺管単離法を用いた IIIs 型ピットパターンを呈する大腸腫瘍の組織形態発生の検討)

著 者 Yoshinori Kuratani, Satoru Tamura, Yasuo Furuya, Saburo Onishi  
 1) Department of Gastroenterology and Hepatology, Kochi Medical School, Nankoku, Japan  
 2) Division of Gastroenterology, Tamura Clinic, Kochi, Kochi, Japan  
 3) Division of Surgery, Takeshita Hospital, Kochi, Kochi, Japan

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Journal of Gastroenterology vol. 43, no. 8 2008年8月掲載予定

### 要 旨

#### 【背景および目的】

大腸内視鏡のピットパターン分類は 1996 年に工藤らが報告した大腸粘膜の腺管開口部所見である。この分類は、病変の病理組織診断とよく相関しており、本邦では広く用いられている。中でも IIIs 型ピットパターンは陥凹型腫瘍、非顆粒型側方発育型腫瘍の陥凹部で観察される所見である。この IIIs 型ピットパターンを構成する腺管を単離し、走査電子顕微鏡で観察することにより、このピットパターンを呈する大腸腫瘍の三次元組織形態発生を検討した。

#### 【対象と方法】

対象は 1996 年 12 月から 2004 年 12 月までに内視鏡検査を行い、内視鏡的もしくは外科的に切除し病理組織学的評価をした病変である。すべての症例でインフォームドコンセントを得た。

陥凹を有する表面型大腸腫瘍 (n=12) から 109 個の腺管を単離した。病変の内訳と大きさは、腺腫 9 例 : 8.11±5.23 mm、粘膜下層浸潤癌 3 例 : 12mm, 15mm, 18mm であった。

内視鏡検査はインジゴカルミンを散布し拡大観察を行った。また、切除後の病変はカラッチヘマトキシリン染色を行い、実体顕微鏡観察下に割を入れた。これら拡大内視鏡と実体顕



微鏡の所見をもとに、ピットパターン分類を行い、IIIs型ピットパターンを示す病変を抽出した。抽出された病変はいずれも陥凹を有する病変であった。病理組織はヘマトキシリンエオジン染色後に、WHO分類に従って診断した。

腺管は、Arakiら(Gastroenterology 1995; 109: 1468-1474)の塩酸消化法を用いて単離を行った後、走査電子顕微鏡で観察した。

#### 【結果】

単離腺管は分岐のない試験管状の単一腺管(A群)と、2つに分岐した腺管とが抽出された。このうち分岐が先端から下部もしくは中部までの腺管(B群)では、その開口部は正円形を示し、分岐が上部まで及んだ腺管(C群)の開口部は卵円形を示した。

腺管の開口部径は、A群では $95.1 \pm 28.1 \mu\text{m}$  (n=52)、B群では $114.7 \pm 40.8 \mu\text{m}$  (n=44)、C群では長径 $208.1 \pm 71.4 \mu\text{m}$  (n=13)であった。各群間に有意差を認めた。C群の開口部径はA群およびB群の約2倍であった。

IIIs型ピットパターンを示す陥凹型腫瘍が、腫瘍径が10mm前後と小さなうちに粘膜下層に浸潤する傾向を有する、という特徴を持ち、臨床的にも注目されている。本論文は腺管単離法を用いて同大腸病変に関して組織形態発生を初めて3次元的に検討した。申請者らはIIIs型ピットパターンを示す陥凹型腫瘍における腺管の形態と開口部径を検討した結果、腺管は下部から分岐し、分岐が上部に進展し、二つの腺管に分離することにより増殖すると推測した。一方、これまでの検討から隆起型腫瘍の腺管は主に増殖帯のある腺体部から芽出する形で分岐しており、形態別到大腸腫瘍の腺管三次元構造を解析することで各形態の深部浸潤様式や組織発生的一端を解明する重要な知見であり学術的評価も高く、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると判断する。

氏名(本籍)	中谷 貴美子 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第66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20年7月31日
学位論文題目	Perforating branches of the internal thoracic artery in women with breast cancer: An anatomical study for breast-conservation surgery (乳癌患者における内胸動脈穿通枝の解剖学的検討)
発表誌名	Oncology Reports 19(5): 1299-1303 2008年5月
	<b>審査委員</b> 主査 教授 由利 和也 副査 教授 花崎 和弘 副査 教授 深谷 孝夫

**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 中谷 貴美子

## 論文題目

Perforating branches of the internal thoracic artery in women with breast cancer: An anatomical study for breast-conservation surgery

(乳癌患者における内胸動脈穿通枝の解剖学的検討)




(論文要旨)

乳癌温存術における乳房再建は、乳癌患者にとって重要な項目である。乳房温存術の合併症には様々な要因があるが、局所の血流も重要な要因の一つである。乳腺へ分布する主な血管には、内胸動脈穿通枝、外側胸動脈、肩甲下動脈があるが、内側から流入する動脈は内胸動脈穿通枝のみである。外側からの血管を考慮した再建術にはいくつか報告があるが、内胸動脈穿通枝に着目した方法は知られていない。さらに、内胸動脈穿通枝の走行や、皮膚からの深さなどについての検討も、我々の知る限り報告されていない。一方、これまで血管の評価には、digital subtraction angiography (DSA) が用いられてきたが、multidetector CT (MDCT) と、ワークステーションの発達により、末梢動脈についても MDCT angiography での評価が可能となってきた。本研究では、MDCT angiography を用いて、内胸動脈穿通枝の分布や走行について検討したので報告する。

対象は乳癌を疑われ、MDCT angiography を施行した女性38例。画像評価はワークステーション上で、水平断 MDCT 画像と、volume rendering により作成した三次元画像を用いて行った。合計47本の穿通枝を同定することができた。27本(57.4%)は第2肋間から分岐しており、第3肋間、第4肋間からそれぞれ6本(12.8%)、第1肋間から5本(10.6%)、第5肋間から2本(4.3%)、対側の第1肋間から1本(2.1%)分岐していた。また、皮膚から穿通枝までの距離が最も近い点と、最も遠い点において、その深さと皮下脂肪の厚さには強い相関関係があった。

内胸動脈穿通枝は典型的には、第2肋間から分岐し、水平に脂肪織内を蛇行しながら末梢へ分布することが分かった。また、皮下脂肪からの深さについても情報を得ることができたが、乳房再建術を行う際の皮弁作成に有用であると思われる。乳腺への血流は、外側胸動脈、肩甲下動脈、そして内胸動脈穿通枝があるが、外側胸動脈と肩甲下動脈は外側から流入する血管である。血管支配を考慮した乳房再建術はこれまでに発表されており、合併症が少ないと報告されている。一方で、内側から流入する内胸動脈穿通枝を考慮した術式は報告されていないが、それは、内胸動脈穿通枝の情報がほとんどないからであろう。今回の検討で、乳癌患者における内胸動脈穿通枝の分岐レベルやその走行についての情報を得ることができた。これらの情報を元に、新たな乳房再建術が検討されたなら、さらに合併症の少ない乳房再建術が行われることにつながるのではないかと考える。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	中 谷 貴 美 子
審 査 委 員	主 査 氏 名	由 利 和 也 
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘 
	副 査 氏 名	深 谷 孝 夫 

題 目      Perforating branches of the internal thoracic artery in women  
with breast cancer: An anatomical study for breast-conservation  
surgery  
(乳癌患者における内胸動脈穿通枝の解剖学的検討)

著 者      Kimiko Nakatani, Hironori Maeda, Yousuke Tanaka, Norihiko Hamada,  
Akihito Nishioka, Shiro Sasaguri, Yasuhiro Ogawa

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ),      年    月  
Oncology Reports 19(5): 1299-1303 2008年5月

### 要 旨

乳癌は、女性の癌の中では最も高い罹患率を示す癌であり今後も増加すると考えられているため、その治療は重要である。乳癌に対する乳房温存手術は1987年ころから始まり、2000年には乳癌の手術の40%を越え、現在では全体の50%程度行われている。乳房再建術として広背筋や腹直筋を利用したフラップが用いられるが、脂肪壊死や乳房の硬化などの晩期合併症が起こることがあり、術後の残存乳房に対する放射線照射や化学療法に影響をおよぼす。したがって、乳房温存手術では局所の血流を保つことが重要な要因であるといえる。一般に乳腺に分布する動脈には、乳房の内側より内胸動脈穿通枝、乳房の外側より外側胸動脈および肩甲下動脈がある。乳房温存手術においては、乳房の外側からの動脈を使用した再建術にはいくつかの報告があるが、乳房の内側よりの内胸動脈穿通枝を使用した方法についての報告はない。

一方、近年 MDCT (Multidetector-CT、多列検出器型 CT) が開発され、画像診

断は飛躍的に進歩した。MDCT では、エックス線照射装置が体の周りを一回転する間に連続撮影することが可能で照射時間の短縮や放射線被曝量の低減などの利点がある。MDCT では、腋窩を含めた全乳房（約 20cm）を 1mm スライス厚で一回の呼吸停止（約 25 秒）で撮影が可能である。これに造影剤を経静脈的に用いることで、動脈の走行を 3 次元的に観察することができる。本研究では、この MDCT angiography を用いて、内胸動脈穿通枝の走行および分布について検討を行った。

乳癌の疑いのもと MDCT angiography を施行した女性 38 例について検討を行ったところ、患側に合計 47 本の内胸動脈穿通枝が同定された。その中で 27 本（57.4%）は第 2 肋間から分岐しており、第 3 肋間、第 4 肋間からそれぞれ 6 本（12.8%）、第 1 肋間から 5 本（10.6%）、第 5 肋間から 2 本（4.3%）、対側の第 1 肋間から 1 本（2.1%）分岐していた。また、内胸動脈穿通枝は、皮下の脂肪組織内を胸壁に沿うように水平に乳腺に向かって走行していることが明らかとなった。その深さは、最も深いところで  $9.5 \pm 5.7$ mm を走行しており、その部位の皮下脂肪の厚さは  $14.6 \pm 8.8$ mm であった。また、内胸動脈穿通枝は最も浅いところで皮下  $2.7 \pm 1.9$ mm を走行し、その部位の皮下脂肪の厚さは、 $18.6 \pm 9.4$ mm であった。内胸動脈穿通枝は皮下脂肪内を、その厚さの 53% の深さから 14% の深さへと走行することが明らかとなった。また、最も浅い部位の胸骨からの距離は胸骨から乳頭への距離の 57% のところに認められた。

現在までのところ乳房の内側から流入する内胸動脈穿通枝の存在については知られているが、内胸動脈穿通枝の脂肪組織内における走行や内胸動脈穿通枝を使用した乳房再建術についての報告はない。今回の研究より内胸動脈穿通枝の分岐レベルやその走行についての情報が得られたことで、乳房の上内側部以外の乳癌の乳腺部分切除においては内胸動脈穿通枝を温存し、脂肪壊死を回避するようにすることが可能となった。さらに、内胸動脈穿通枝を用いた新たな乳房再建術が検討される基盤となるものと思われた。

以上のように本論文は、乳癌症例において乳腺を栄養する内胸動脈穿通枝の走行を MDCT angiography を用いて 3 次元的に解析し、新たな乳房再建術の可能性を示唆した点で評価され、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しいものと判断した。

氏名(本籍)	新井 淳一 (和歌山県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	甲医博第67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20年9月30日			
学位論文題目	Role of brain prostanoids in glucagon-like peptide-1-induced central activation of sympatho-adrenomedullary outflow in rats (ラット脳室内に投与したGLP-1は、脳内プロスタノイドを介して中枢性に交感神経-副腎髄質系を賦活する)			
発表誌名	Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (2008) 35, 965-970			
	<b>審査委員</b>	主査	教授	由利 和也
		副査	教授	椛 秀人
		副査	教授	本家 孝一

## 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 新井 淳一

## 論文題目

**ROLE OF BRAIN PROSTANOIDS IN GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1-INDUCED CENTRAL ACTIVATION OF SYMPATHO-ADRENOMEDULLARY OUTFLOW IN RATS** (ラット脳室内に投与した GLP-1 は、脳内プロスタノイドを介して中枢性に交感神経-副腎髄質系を賦活する)

(論文要旨)

### 【目的】

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は小腸粘膜の L 細胞から放出される 36 アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、膵ランゲルハンス島  $\beta$  細胞からのインスリン分泌促進作用及び  $\alpha$  細胞からのグルカゴン分泌抑制作用を有することが知られている。一方、脳内にも GLP-1 含有神経が自律神経調節の高位中枢の一つである視床下部室傍核に投射すること、脳室内あるいは静脈内に投与された GLP-1 が血圧上昇や心拍数増加を引き起こすと共に、自律神経制御に関与する脳内諸部位において最初期遺伝子産物 cFos の発現を誘導することなどが報告されている。しかしこの交感神経-副腎髄質系の中枢性賦活機序の詳細はいまだ明らかではない。そこで今回ラット脳室内に投与した GLP-1 による血中カテコールアミン増加作用を、脳内プロスタノイドとの関連で薬理的に解析した。

### 【方法】

実験にはウレタン麻酔した (1.0 g/kg) ウィスター系雄性ラット (体重 350 ~ 400 g) を用いた。脳定位に固定し、GLP-1 および種々の遮断薬を右側脳室内に微量注入し経時的に採血した。血漿中のカテコールアミンをアルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に測定した。

### 【結果】




(1) GLP-1 (0.3, 1.0 and 3.0 nmol/animal) の脳室内投与 (i. c. v.) は、用量依存的に血中アドレナリン (AD) およびノルアドレナリン (NA) を増加させた。

- (2) GLP-1 (1.0 nmol/animal, i. c. v.)によるADおよびNAの増加は、選択的 GLP-1 受容体遮断薬 exendin(5-39) (5 and 10 nmol/animal, i. c. v.)により用量依存的に抑制された。
- (3) GLP-1 (1.0 nmol/animal, i. c. v.)によるADおよびNAの増加は、シクロオキシゲナーゼ阻害薬インドメタシン (1.2  $\mu$ mol/animal) の脳室内前処置により共に抑制された。一方、リポキシゲナーゼ阻害薬バイカレイン (1.2  $\mu$ mol/animal, i. c. v.) では影響されなかった。
- (4) GLP-1 (1.0 nmol/animal, i. c. v.)によるAD増加は、選択的トロンボキサン $A_2$ 合成酵素阻害薬フレグレイト (1.8  $\mu$ mol/animal, i. c. v.) および選択的トロンボキサン $A_2$ 受容体遮断薬 (+)S-145 (250 and 625 nmol/animal, i. c. v.) により抑制された。しかし、GLP-1による血中 NA 増加作用はこれらの薬物により影響されなかった。
- (5) 急性両側副腎摘除によりGLP-1 によるAD増加は消失したが、NA の増加は影響されなかった。

本研究により、(1) ラットの脳室内に投与した GLP-1 は、脳内GLP-1 受容体の賦活を介した脳内シクロオキシゲナーゼ経路の活性化により交感神経-副腎髄質系を賦活すること、さらに(2) 副腎髄質系の賦活にはトロンボキサン $A_2$ が、一方、交感神経系の賦活にはトロンボキサン $A_2$ 以外のプロスタノイド(おそらくプロスタグランジン $E_2$ )が関与することが推測された。



## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	新 井 淳 一
審 査 委 員	主 査 氏 名	由 利 和 也 
	副 査 氏 名	椛 秀 人 
	副 査 氏 名	本 家 孝 一 

題 目     Role of brain prostanoids in glucagon-like peptide-1-induced central activation of sympatho-adrenomedullary outflow in rats  
 (ラット脳室内に投与した GLP-1 は、脳内プロスタノイドを介して中枢性に交感神経-副腎髄質系を賦活する)

著 者     Junichi Arai, Shoshiro Okada, Naoko Yamaguchi-shima, Takahiro Shimizu, Tsuyoshi Sasaki, Mieko Yorimitsu, Hiroshi Wakiguchi, Kunihiko Yokotani

発表誌名、巻 (号)、ページ (    ~    )、     年    月  
 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology    2008 年掲載予定

### 要 旨

消化管ホルモンである glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は小腸の L 細胞から分泌され、膵臓に作用してインスリンの分泌促進やグルカゴンの分泌抑制に働くことが知られている。また、中枢神経系において延髄孤束核に GLP-1 含有ニューロンが存在し脳内に広く投射していることや GLP-1 受容体も広範に分布していることが知られている。さらに GLP-1 を脳室内に投与することにより血圧上昇や心拍数増加が引き起こされることが報告され、GLP-1 が中枢性に交感神経-副腎髄質系を賦活していることが示唆された。今回の研究では、ラットの脳室内に GLP-1 および各種遮断薬を投与し、GLP-1 の交感神経-副腎髄質系の中枢性賦活のメカニズムについて検討した。

ウレタン麻酔下にウィスター系雄ラットの大腿動脈にカニューレーションを行った後、脳定位装置に固定した。頭蓋骨に孔を開け、ステンレスカニューレを脳室内に挿入した。ステンレスカニューレよりGLP-1を右側脳室内に投与し大腿動脈より経時的に採血を行い、血中のアドレナリン (AD) およびノルアドレナリン (NA) 値をHPLCにて電気化学的に測定した。GLP-1受容体遮断薬にはexendin、シクロオキシゲナーゼ阻害薬にはインドメタシン、リポキシゲナーゼ阻害薬にはバイカレイン、選択的トロンボキサン $A_2$ 合成酵素阻害薬にはフレグレイト、選択的トロンボキサン $A_2$ 受容体遮断薬には (+) S-145を用いた。また、両側副腎摘除ラットを用いて交感神経系の作用を解析した。

その結果、GLP-1の脳室内投与により、血中AD、NAが有意に増加した。GLP-1によるAD、NAの増加は、選択的 GLP-1 受容体遮断薬 exendin、シクロオキシゲナーゼ阻害薬インドメタシンにより抑制された。GLP-1によるAD、NAの増加はリポキシゲナーゼ阻害薬バイカレインでは抑制されなかった。GLP-1によるAD増加は、選択的トロンボキサン $A_2$ 合成酵素阻害薬フレグレイト、選択的トロンボキサン $A_2$ 受容体遮断薬 (+) S-145により抑制されたが、GLP-1によるNA 増加はフレグレイト、(+ ) S-145により抑制されなかった。ラットの両側副腎を摘除するとGLP-1 によるAD増加は消失したが、NA の増加は認められた。

中枢神経系においてGLP-1 は、GLP-1 受容体を介したシクロオキシゲナーゼ経路の活性化により交感神経-副腎髄質系を賦活すること、GLP-1による副腎髄質からのAD分泌にはトロンボキサン $A_2$ が、交感神経系からのNA分泌にはトロンボキサン $A_2$ 以外のプロスタノイド (プロスタグランジン $E_2$ ) が関与することが示唆された。

以上のように、本論文は消化管ホルモンであるGLP-1が中枢神経系において交感神経-副腎髄質系を賦活し、カテコールアミンの分泌を調節することを明らかにした点で高く評価される。審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい優れた内容であると判断した。

氏名(本籍)	中居 永一 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第68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20年9月30日
学位論文題目	Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma (神経膠芽腫由来の腫瘍幹細胞におけるMDR1の発現増強と薬剤耐性について)
発表誌名	Cancer Investigation 2008年掲載予定
	<b>審査委員</b> 主査 教授 宇高 恵子 副査 教授 横山 彰仁 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 中居 永一

## 論文題目

Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma (神経膠芽腫由来の腫瘍幹細胞におけるMDR1の発現増強と薬剤耐性について)

### (論文要旨)

膠芽腫 (GBMs) は最も悪性度の高い腫瘍であり、摘出術、放射線療法、化学療法の単独、併用に関わらず、発見後の平均余命が1年程度である。しかも、過去20年間、平均余命の明らかな改善は認められないので、より効果的な新しい治療法の確立が必要とされている。GBMsは高い浸潤性を示すため、正常脳組織を保存しながらの全摘はほぼ不可能であるが故に、術後に放射線、化学療法を適用するが、再発、増悪を繰り返し、完治は困難である。

近年、GBMsの腫瘍組織において多分化能を保持し、高い造腫瘍性を示す神経幹細胞様の性質をもつ腫瘍幹細胞の存在が示唆された。この細胞がDNA修復経路の活性上昇により放射線抵抗性を示すことから治療抵抗性の一因として考えられている。また、腫瘍細胞株には高い薬剤排出能を示すside population (SP)が存在することが示唆され、このSPは、体性幹細胞マーカーCD133を発現する腫瘍幹細胞を含むと考えられている。

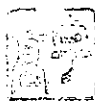
多剤耐性遺伝子 Multiple drug resistance 1 (MDR1) は、膠芽腫を含む星状細胞腫の悪性度に相関した発現を示すABCトランスポーターの一つである。しかしながら、癌幹細胞におけるMDR1の発現量は検討されていない。本研究では、GBM細胞株U87MGから腫瘍幹細胞(U87CS)を分離し、腫瘍細胞の分化レベルとMDR1の発現量および薬剤抵抗性の相関を解析した。最初に、U87CSとU87MGにおいてCD133の発現量を定量的RT-PCRにより比較した。CD133の発現がU87MGに対してU87CSで約8.5倍増加していることから、この培養により腫瘍幹細胞が濃縮されていることが確認された。次に、MDR1はU87CSにおいてU87MGの約47倍高発現し、細胞分化の誘導に伴い低下することが検出された。この発現様式を*in vivo*で観察するためにU87CSをヌードマウス脳内に移植し、形成された腫瘍において、CD133とMDR1の発現の相関性を免疫組織化学染色法により検索した。CD133陽性の腫瘍幹細胞は、腫瘍塊の中心部で少なく、偏縁部に多く存在し、MDR1を共発現していることが観察された。さらに、GBMs患者組織においてもCD133陽性細胞とMDR1を強発現する細胞が同一であることが検出された。

MDR1がU87CSで高発現しているので、抗ガン剤に対する感受性をMTT試験で測定した。U87MGと比較して、U87CSはDoxorubicin、etoposide、carboplatin、BCNUに対して高い抵抗性を示した。そして、Flowcytometric analysisによりU87CSとU87MGにおけるDoxorubicinの排出能を比較するとU87CSではDoxorubicinの取り込み量は低く、ABCトランスポーター阻害剤の添加によりその量は増大した。つまり、U87CSはABCトランスポーターによりDoxorubicinを積極的に排出し、薬剤に対する抵抗性を獲得していることが示された。

これらの結果から、腫瘍幹細胞U87CSは、MDR1を高発現し、ABCトランスポーターによる高い薬剤排出能により多剤耐性を示すことが示唆された。また、MDR1の発現制御機構は腫瘍細胞の分化レベルと相関していることが明らかとなり、腫瘍細胞の分化制御による治療法が重要であると考えられた。悪性脳腫瘍の予後とMDR1を発現する腫

瘍幹細胞の腫瘍組織内の存在頻度の関連性を明白にするために、さらに原発、化学療法後の再発を含む多症例に関する研究が必要である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	中 居 永 一
審 査 委 員	主 査 氏 名	宇 高 恵 子      印 
	副 査 氏 名	横 山 彰 仁      印
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘      印

題 目    Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma  
 (神経膠芽腫由来の腫瘍幹細胞における MDR1 の発現増強と薬剤耐性について)

著 者    Eiichi Nakai, Kaechang Park, Toshio Yawata, Takahiro Chihara, Ayano Kumazawa, Hiromichi Nakabayashi, Keiji Shimizu

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ),    年    月  
 Cancer Investigation    2008年掲載予定

### 要 旨

中居永一さんの公開学位審査は、平成21年9月1日17時より、約1時間にわたって行いました。まず、研究内容の発表を行いました。

#### 背景と目的

Cancer stem (CS) cells は、放射線抵抗性や高い薬剤排出能をもつ傾向があり、残存して予後悪化させる原因となることが、報告されている。脳腫瘍の中でも悪性度の高い膠芽腫では、CS の存在が示唆されるものの、これまでに、Kondoらが glioma の細胞株で、CS に相当する細胞種の存在を記載したのに留まっている。CS は、もともと、細胞内に浸透する蛍光色素に染まりにくい side population として同定され、multiple drug resistance (MDR) 遺伝子群の発現レベルやその産物の機能が高いことが特徴として報告されている。そこで申請者らは、glioblastoma multiforme (GBM) の細胞株である U87MG を用いて、CS に相当する細胞の誘導を検討し、その特徴や、*in vivo* における腫瘍形成能について研究を行った。さらに、自然発症の GBM 患者の腫瘍組織の中にも、CS の特徴をもつ細胞種が存在するかどうか、解析を進めた。

## 方法

LIF、EGF、bFGFを含む neuronal stem cell (NSC) メディウムで培養することにより、SC の特徴を持つ細胞が誘導されることが知られている。そこで申請者らは、GBM の細胞株 U87MG を NSC で培養して、細胞の変化を観察した。また、MDR1 および CD133 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で定量し、フローサイトメトリーによる観察を行った。さらに、細胞の薬剤耐性の測定や、in vivo での、ヌードマウスへの脳内接種を行った。ヒトの自然発症 GBM の免疫組織染色も試みた。

## 結果

NSC メディウムで培養すると、U87MG は球状の細胞塊となり、CD133 および MDR1 の発現が顕著に上昇するなど、CS に特徴的な変化が誘導された。これらの細胞には、Dox、BCNU、VP-16、Carboplatin に対する薬剤耐性の上昇が確認された。さらに、ヌードマウスの脳に移植したところ、U87MG は生着しなかったが、U87SC は脳実質内に腫瘍塊を形成した。マウスの脳内で成長した腫瘍は、in vivo でも、CD133 や MDR1 を高発現する細胞を多く含み、特に、腫瘍の内部の細胞に、その頻度が高かった。さらに、自然発症の GBM 患者の腫瘍組織においても、局所で CD133 および MDR1 を高発現する細胞が散見された。

## 考察

マウスおよびヒトの GBM において、これまでに他の腫瘍で報告された CS の特徴を有する細胞が確認され、臨床経過を理解したり、治療計画を立てたりする上で、きわめて重要であることが示唆された。特に、ヌードマウスを使った腫瘍接種実験により、in vivo での腫瘍の成長に関して腫瘍病理学的に異なる性質を有する、臨床的にもきわめて重要な細胞種であることが示された。

審査員からは、活発な議論が持ちかけられた。まず、特定の腫瘍細胞株に特化した観察である可能性やリアルタイム PCR のデータの取り方等について指摘があった。次に、CS の性質が誘導された細胞の可逆的について、特に in vivo における細胞の性質の可逆性について質問があった。また、ヒトの腫瘍組織における SC の分布や、原発腫瘍と再発腫瘍における、SC の違いについて、質問や議論があった。

これらの質問や議論に対し、申請者は、おおむね適切な答えをし、根拠をあげて説明をした。さらに、今後、治療法を開発する上で、新たな方向性として、CS を人為的に分化させることにより、放射線や抗がん剤による治療の効果を上げる工夫など、いくつかの発展性について紹介をした。申請者は研究を主体的に進めており、研究にかかる技術や考察能力の向上が明らかであった。このため、審査員一同、申請者の研究は、高知大学大学院医学系研究科(博士)に値する内容を持ったものであると判断しました。

氏名(本籍)	佐藤 哲也(岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第69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20年9月30日
学位論文題目	Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in renal transplant recipients (小児腎移植患者のEBウイルス量とkiller T細胞のモニタリング)
発表誌名	Clinical Nephrology 2008;50 2008年掲載予定

審査委員	主査	教授	執印	太郎
	副査	教授	寺田	典生
	副査	教授	杉浦	哲朗

## 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 佐藤哲也

論文題目 **Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in renal transplant recipients**  
(小児腎移植患者のEBウイルス量とkiller T細胞のモニタリング)

(論文要旨)

[緒言]

小児の臓器移植患者において、移植後の免疫抑制状態による感染症の発症は重篤な合併症である。特に Epstein-Bar ウイルス (EBV) 感染症に関して治療法は確立されたものはなく、またモニタリング方法に関しても一定の見解が得られていないのが現状である。近年、移植の低年齢化に伴い、移植前に EBV 未感染レシピエントの割合が増加しており、EBV 既感染ドナー臓器から EBV が持ち込まれ、致死率の高い合併症である移植後リンパ増殖症 (PTLD) の発症頻度が増加することが懸念されている。小児臓器移植患者において、現時点では末梢血 EBV genome 量のモニタリングが、有効な指標と考えられているが、より有効なモニタリング方法が必要である。こうした背景から、小児腎移植患者において、特に EBV 未感染レシピエントで、EBV genome 量、リンパ球サブセット、EBV 特異的 killer T 細胞の比率を経時的に追跡し、PTLD の発症を予防するモニタリング方法の確立をめざした。

[対象と方法]

腎移植前 EBV 未感染 13 例 (年齢中央値 11.0 歳) と既感染 9 例 (年齢中央値 15.2 歳) を対象に、real-time PCR 法による末梢血 EBV genome 量、テトラマー法による EBV 特異的 killer T 細胞の比率、及び非特異的 killer T 細胞 (CD8 陽性 / HLA-DR 陽性細胞) の比率を約 1 年間経時的に測定した。Real-time PCR 法のプライマー、プローブは LMP1 領域を増幅するように設計し、LightCycler system (Roche diagnostics) で EBV genome 量を測定した。非特異的 killer T 細胞は、末梢血リンパ球で CD8xHLA-DR の 2 重染色を行い、flow cytometer で CD8 陽性 / HLA-DR 陽性細胞 (CD8/DR 細胞) の割合を検出した。EBV 特異的 killer T 細胞 (CTL) は、末梢血リンパ球で、HLA-A24 拘束性 CTL を latent antigen として EBNA3A、3B を、lytic antigen として BRLF1、BMLF1 を用い、CD8 抗体との 2 重染色を行い、flow cytometer で HLA-A24 拘束性 CTL の割合を検出した。

[結果]


EBV 未感染例のうち、4 例で EBV 関連症状が認められ、うち 2 例が PTLD を発症した。既感染例で

は EBV 関連症状は認められなかった。経過中の EB ウイルス量の最高値は未感染例で有意に高値であった。未感染例のうち、有 EBV 関連症状例 4 例は無症状例と比較して EB ウイルス量の最高値が有意に高値であった。HLA - A24 を持つ未感染例 8 例中 6 例で、EBV 特異的 CTL が誘導されたが、PTLD の 2 例のうち 1 例は治療開始前に CTL が誘導されなかった。未感染例において、EBV genome 量が 400 copies/ $\mu$ g DNA を超えた時点で、無症状例 5 例の CD8/DR 細胞の割合は、EBV 関連症状有 4 例に比して有意に高値であった。

#### [ 考察 ]

EBV 未感染レシピエントの腎移植では、初感染は移植後 6 ヶ月までにみられ、1 年前後で EBV 関連症状が認められることが多いため、移植後 1 年間は 1-3 ヶ月毎に EBV をモニタリングする必要があり、genome 量と killer T 細胞両者の経時的測定が有用と考えられた。高 genome 量かつ EBV 特異的 CTL および CD8/DR 細胞の低比率は、PTLD を含む EBV 関連症発症の予測因子となり得る可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名		佐 藤 哲 也
審 査 委 員	主 査 氏 名	執 印 太 郎	印
	副 査 氏 名	寺 田 典 生	
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗	印

題 目     Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in renal transplant recipients  
 (小児腎移植患者のEBウイルス量とkiller T細胞のモニタリング)

著 者     Tetsuya Sato, Mikiya Fujieda, Akihiko Maeda, Eriko Tanaka,  
 Masakazu Miyamura, Hiroko Chikamoto, Masataka Hisano, Yuko Akioka,  
 Yoshihito Ishiura, Sumitaka Dohno, Motoshi Hattori, Hiroshi Wakiguchi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ),     年 月  
 Clinical Nephrology 2008;50     2008年掲載予定

### 要 旨

小児の臓器移植患者において移植後の免疫抑制状態による感染症の発症は重篤な合併症の1つである。特に Epstein-Barr ウイルス(以下 EBV)感染症に関して治療法は確立したものはなく、モニタリング方法に関しても一定の見解がない。

近年、移植の低年齢化に伴い、移植前に EBV 未感染レシピエントの割合が増加しており、EBV 感染者特に成人のドナー臓器から EBV が持ち込まれ、致死率の高い合併症である移植後リンパ増殖症(以下 PTLD)の発症頻度の増加が懸念されている。現時点では末梢血 EBV genome 量のモニタリングが有効な指標とされているが、さらに有効なモニタリング方法が必要である。この背景から、本論文の申請者は小児腎移植患者において、PTLDの発症を予防する方法の確立をめざし、腎移植前 EBV 未感染 13 例(年齢中央値 11.0 歳)、既感染 9 例(年齢中央値 15.2 歳)を対象に、real-time PCR 法による末梢血 EBV genome 量、テトラマー法による EBV 特異的 Killer T 細胞(HLA-A24 拘束性 CTL)比率、及び非特異的 Killer T 細胞(CD8+/HLA-DR+細胞)の比率を約 1 年間、経時的に測定し結果を検討した。その結果、EBV 未感染例のうち、4 例で EBV 関連症状が認められ、うち 2 例が移植後リンパ増殖症を発症した。EBV 既感染例では EBV 関連症状は認められなかった。経過中の EB ウイルス量の最高値は未感染例で有意に高値であ

った。未感染例のうち、有 EBV 関連症状例 4 例は無症状例と比較して EB ウイルス量の最高値が有意に高値であった。HLA-A24 を持つ未感染例 8 例中 6 例で、EBV 特異的 CTL が誘導されたが、PTLD の 2 例のうち 1 例は治療開始前に CTL が誘導されなかった。未感染例において、EBV genome 量が 400 copies/ ug DNA を超えた時点で、無症状例 5 例の CD8+/ HLA-DR+細胞の割合は、EBV 関連症状有 4 例に比して有意に高値であった。

これらより下記の 3 つの結論を出した。

1. EBV のモニタリングとして genome 量だけでなく、killer T 細胞(EBV 特異的 Killer T 細胞や CD8+DR+細胞)の測定も重要と考えられた。
2. EBV の高 genome 量かつ EBV 特異的 CTL および CD8+DR+細胞の低比率は PTL D を含む EBV 関連症発症の予測因子となり得る可能性が示唆された。
3. CD8+DR+細胞は簡易に測定でき全症例で測定する価値のあるマーカーと考えられた。

これらから申請者の論文は小児の臓器移植患者の EBV 感染症による移植後リンパ増殖症に新規の知見を発表した内容であり学位論文に値すると評価した。

氏名(本籍)	香川 亨(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第41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20年4月15日
学位論文題目	Angiotensin II receptor blocker inhibits tumor necrosis factor alpha-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells (アンジオテンシンII受容体拮抗薬はヒト腎近位尿細管上皮細胞において 腫瘍壊死因子 $\alpha$ による細胞傷害を阻害する)
発表誌名	Nephrology 2008年(in press)

審査委員	主査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	土居	義典
	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 香川 亨

## 論文題目

Angiotensin II receptor blocker inhibits  
tumor necrosis factor alpha-induced cell damage  
in human renal proximal tubular epithelial cells  
(アンジオテンシンII受容体拮抗薬はヒト腎近位尿細管上皮細胞に  
おいて腫瘍壊死因子 $\alpha$ による細胞障害を阻害する)

### (論文要旨)

【目的】アンジオテンシンII 1型(AT1)受容体拮抗薬(ARB)は現在、臓器保護効果も期待できる降圧薬として広く使われている。この臓器保護効果は、降圧によるものだけではなく、それとは異なる機序でも発揮されると考えられている。例えばメカニカルストレスは、アンジオテンシンIIの非存在下にAT1受容体を活性化させ細胞内シグナル伝達を生じるが、ARBはAT1受容体の逆アゴニストとしてそれを抑制しうる。一方、腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )は、細胞内活性酸素種(ROS)の産生やアポトーシスを誘導する炎症性サイトカインの一つである。IgA腎症や糖尿病性腎症などの腎臓病では腎内TNF $\alpha$ 濃度が上昇していると報告されており、TNF $\alpha$ は腎障害において重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、腎障害に対するARBの腎保護効果を検討するために、ヒト近位尿細管上皮細胞(RPTEC)を用いて、TNF $\alpha$ による細胞障害に対するARB及びアンジオテンシンII 2型(AT2)受容体拮抗薬の効果を*in vitro*の系にて検討した。


【方法】RPTECをTNF $\alpha$  1型受容体、AT1受容体及びAT2受容体に特異的な抗体で免疫細胞化学法を用いて染色した。また、RPTECに、TNF $\alpha$ 単独及びTNF $\alpha$ とARB(olmesartan, valsartan)あるいはAT2受容体拮抗薬PD123319を同時添加し、24時間後に細胞障害の指標としてRPTECからmedium中に放出されたlactate dehydrogenase(LDH)、N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase(NAG)を測定した。次にTNF $\alpha$ に誘導されるアポトーシスに対するARB、AT2受容体拮抗薬の効果を調べるために、RPTECに、TNF $\alpha$ 単独及びTNF $\alpha$ とARB(olmesartan, valsartan)あるいはAT2受容体拮抗薬PD123319を同時添加し、8時間後にCaspase 3/7 activityを測定した。さらに、TNF $\alpha$ に誘導される酸化ストレスに対するARB、AT2受容体拮抗薬の効果を調べるために、RPTECにTNF $\alpha$ 単独及びTNF $\alpha$ とARB(olmesartan, valsartan)あるいはAT2受容体拮抗薬PD123319を同時添加し、24時間後にRPTEC内のp22phox蛋白をWestern Blotting法にて評価した。

【結果】RPTECにおいてTNF $\alpha$  1型受容体、AT1受容体及びAT2受容体は染色され、TNF $\alpha$ の添加によってAT1受容体の染色は強められた。TNF $\alpha$ 単独の添加により、RPTECからのLDH、NAGの放出は増加したが、olmesartan、valsartan及びPD123319のいずれかを同時に添加すると、TNF $\alpha$ によるLDH、NAGの放出は減少した。olmesartanあるいはvalsartanとPD123319の2剤を添加するとTNF $\alpha$ によるLDH、NAGの放出はさらに減少し、相加効果を認めた。TNF $\alpha$ 単独の添加により、RPTEC内のカスパーゼ3/7活性はわずかだが増加した。TNF $\alpha$ とolmesartan、valsartan及びPD123319のい

ずれかを同時に添加すると、同等に TNF $\alpha$  によるカスパーゼ 3/7 活性の増加を抑えたが、olmesartan あるいは valsartan と PD123319 の 2 剤を添加しても相加効果は認めなかった。TNF $\alpha$  単独の添加により、RPTEC 内の p22phox 蛋白濃度は増加したが、olmesartan あるいは valsartan を同時に添加すると、TNF $\alpha$  による p22phox 蛋白濃度の増加は抑えられた。しかしこの効果は、PD123319 には認めなかった。

【結語】TNF $\alpha$  は RPTEC において細胞障害を引き起こし、ARB はカスパーゼ 3/7 活性や NAD (P)H oxidase の阻害を介してアポトーシスや酸化ストレスの一部を抑制し、細胞保護効果を発揮することが示された。AT2 受容体拮抗薬は、ARB とは部分的に異なる機序で細胞保護効果を示し、両者の併用には相加効果を認めた。AT1、AT2 受容体両者の遮断は、腎尿細管障害において新たな腎保護となる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	香 川 亨
審 査 委 員	主 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	土 居 義 典 印
	副 査 氏 名	執 印 太 郎 印

題 目    Angiotensin II receptor blocker inhibits tumor necrosis factor alpha-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells  
 (アンジオテンシン II 受容体拮抗薬はヒト腎近位尿細管上皮細胞において腫瘍壊死因子  $\alpha$  による細胞傷害を阻害する)

著 者    Toru Kagawa, Toshihiro Takao, Taro Horino, Reiko Matsumoto, Kousuke Inoue, Tatsuhito Morita, Kozo Hashimoto

発表誌名、巻 (号)、ページ (    ~    ),    年    月  
 Nephrology 2008 年 (in press)

### 要 旨

腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は、細胞内活性酸素の産生やアポトーシスを誘導する炎症性サイトカインの一つであり、IgA 腎症や糖尿病性腎症などの腎障害において重要な役割を果たしている。最近、アンジオテンシン II (Ang II) 受容体タイプ 1 (AT1 受容体) 遮断薬が糖尿病性腎症における活性酸素産生を抑制することが報告されている。さらに、Ang II 非存在下でのメカニカルストレスによる AT1 受容体の活性化、AT1 受容体遮断薬の逆アゴニスト作用による活性酸素産生の抑制などが報告されている。AT 受容体は現在少なくとも 2 つの受容体サブタイプ (AT1 受容体と AT2 受容体) が存在し、それぞれに特異的な遮断薬が開発されている。そこで申請者は、TNF- $\alpha$  の腎障害作用における Ang II 受容体の役割を受容体サブタイプレベルで明らかにするため、TNF- $\alpha$  の培養ヒト近位尿細管上皮細胞への障害作用に対する AT1 及び AT2 受容体遮断薬の効果を解析した。

はじめに、(1) ヒト近位尿細管上皮細胞 (以下、尿細管上皮細胞と略) における TNF- $\alpha$  1 型受容体、AT1 受容体、AT2 受容体の存在を免疫細胞化学的に解析した。(2) さらに、TNF- $\alpha$  による、(a) 尿細管上皮細胞からの LDH (lactate dehydrogenase) および NAG (N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase) 放出、(b) 尿細管上皮細胞



胞内 Caspase 3/7 の活性増加、(c) 尿細管上皮細胞における p22phox 蛋白の発現、に対する AT1 及び AT2 受容体遮断薬の影響を解析した。AT1 受容体遮断薬として olmesartan, valsartan, AT2 受容体遮断薬として PD123319 を用いた。

得られた成績を以下に示す。

(1) 尿細管上皮細胞における TNF- $\alpha$  1 型受容体、AT1 受容体および AT2 受容体の存在を明らかにした。TNF- $\alpha$  の添加により AT1 受容体の発現が増強した。(2) TNF- $\alpha$  による LDH と NAG の放出増加は、olmesartan、valsartan、あるいは PD123319 により減少した。AT1 および AT2 受容体遮断薬の併用(olmesartan/PD123319 と valsartan/PD123319) によりその抑制効果は増強した(相加効果あり)。(3) TNF- $\alpha$  によるカスパーゼ 3/7 活性の増加は、olmesartan、valsartan、PD123319 の単独投与により抑制されたが、AT1 および AT2 受容体遮断薬の併用による相加効果は認めなかった。(4) TNF- $\alpha$  による p22phox 蛋白発現の増加は、olmesartan あるいは valsartan により抑制されたが、PD123319 は無効であった。

以上の成績から、AT1 受容体遮断薬は、TNF- $\alpha$  によるヒト近位尿細管上皮細胞のアポトーシスや酸化ストレスを抑制して細胞保護効果を示すこと、さらに、AT2 受容体遮断薬は AT1 受容体遮断薬とは異なる機序で細胞保護効果を示すことを明らかにし、両遮断薬の新たな腎保護薬としての可能性を示した。

従って、審査員一同は、AT1 受容体遮断薬と AT2 受容体遮断薬が新たな腎保護薬となる可能性を示した価値ある論文と評価し、高知大学博士(医学)に相応しいと判断した。

氏名(本籍)	近澤 成和 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第1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20年6月17日
学位論文題目	Expression of angiogenesis-related genes regulates different steps in the process of tumor growth and metastasis in human urothelial cell carcinoma of the urinary bladder (膀胱尿路上皮癌の腫瘍増生および転移の過程における血管新生関連遺伝子の経時的発現の変化)
発表誌名	Pathobiology 2008(in press)
	<b>審査委員</b> 主査 教授 降幡 睦夫 副査 教授 小川 恭弘 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 近澤成和

## 論文題目

Expression of Angiogenesis-related Genes Regulates Different Steps in the Process of Tumor Growth and Metastasis in Human Urothelial Cell Carcinoma of the Urinary Bladder

(膀胱尿路上皮癌の腫瘍増生および転移の過程における血管新生関連遺伝子の経時的発現の変化)

(論文要旨)

【目的】我々は、膀胱尿路上皮癌 (urothelial cancer; UC)において、腫瘍内血管新生に加え、線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、インターロイキン-8 (IL-8)といった主たる血管新生因子が、これまでのように全病期を通しての個別のマーカ的存在としてではなく、増殖、浸潤、転移という腫瘍発育の各段階で経時的発現変化を示す可能性を解明すべく、本研究を行った。

【対象と方法】ヒト UC 細胞株 253J-P およびこれを親株として athymic nude mouse にて *In vivo* selection を5回繰り返し得られた高腫瘍形成能、高転移能を有する細胞株 253J B-V を用いて、勾配希釈法を用いたクローニング法によって、bFGF、VEGF、IL-8 の各因子の高発現および低発現を示す特異的細胞株6株 (bFGF 高発現 253J B-V [bFGF-High]、bFGF 低発現 253J B-V [bFGF-Low]、VEGF 高発現 253J B-V [VEGF-High]、VEGF 低発現 253J B-V [VEGF-Low]、IL-8 高発現 253J B-V [IL-8-High]、IL-8 低発現 253J B-V [IL-8-Low]) を獲得し、樹立した。*In vitro* で、これら特異的クローン細胞株は親株 253J B-V と比較して、いずれもその細胞増殖に差はなく、また VEGF、bFGF、IL-8 の RNA 発現および蛋白発現は常に安定していた。

各特異的クローン細胞株を athymic Nude Mouse の膀胱に同所移植 ( $10^6$  cells / 50 $\mu$ l) し、移植後1週、2週、4週、8週および12週目に腫瘍およびリンパ節転移を harvest し、各特異的クローン細胞株間の腫瘍形成能およびリンパ節転移能を経時的に比較検討した。さらに各特異的クローン細胞株の各病期での獲得腫瘍における腫瘍内新生血管数(MVD)、血管新生因子 bFGF、VEGF、IL-8 各因子の発現を、免疫組織化学染色、*In situ* hybridization を用いて検討した。




【結果】親株 253J B-V と比較して、bFGF および IL-8 の高発現クローン細胞株は、移植1-2週後という初期に有意な腫瘍増殖を、また4週後という比較的初期に転移を認めた。一方、bFGF および IL-8 の低発現クローン細胞株は全病期において、比較的腫瘍増殖の抑制、腫瘍数減少、転移の抑制を認めた。しかし、VEGF に関しては、全病期において腫瘍形成能、転移能に影響を示さなかった。

また、親株 253J B-V と比較して、いずれの高発現クローン細胞株も、特に移植1週後という初期を中心に腫瘍内新生血管数は有意に増加しており、各特異的因子も有意に発現増強し

ていた。一方、いずれの低発現クローン細胞株も、特に 1 週後という初期を中心に腫瘍内新生血管数は有意に減少しており、各特異的因子も有意に発現減弱していた。しかし、bFGF の特異的クローン細胞株のみはこの現象が 2 週後にもみられたものの、その他いずれの特異的クローン細胞株における腫瘍内新生血管数も特異的血管新生因子発現も 4 週目以後、徐々に親株 253JB-V と同様のレベルとなった。

【まとめ】以上の結果より、膀胱尿路上皮癌の血管新生および血管新生因子、特に bFGF および IL-8 の発現は、腫瘍発育のごく初期に重要な意義をもつことが示された。つまり、腫瘍に対する初期治療としてこれら因子を制御することで、より有効な系統的抗血管新生因子効果が得られると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	近 澤 成 和
審 査 委 員	主 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	小 川 恭 弘 
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘 

題 目      Expression of angiogenesis-related genes regulates different steps in the process of tumor growth and metastasis in human urothelial cell carcinoma of the urinary bladder  
 (膀胱尿路上皮癌の腫瘍増生および転移の過程における血管新生関連遺伝子の経時的発現の変化)

著 者      Masakazu Chikazawa, Keiji Inoue, Satoshi Fukata, Takashi Karashima  
 Taro Shuin

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ),      年    月  
 Pathobiology    2008年(in press)

### 要 旨

【背景、目的】個体の発生や発育にとって、血管新生は不可欠な生命現象である。ところが、この血管新生はヒト悪性腫瘍においても、増殖、浸潤、転移という腫瘍発育の各段階に密接に関与している。この腫瘍血管新生の研究は1970年代のFolkmanらによる研究にはじまり、1980年代の基礎研究、特に血管新生因子の単離、解析、そして、1990年代の臨床研究への発展と続いている。最近では、この血管新生因子を標的とする、いわゆる抗血管新生因子治療も臨床応用されてきた。これまで腫瘍の増殖、浸潤、転移は、腫瘍内血管新生に加え、線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、インターロイキン-8(IL-8)などの血管新生関連遺伝子や、マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)(MMP-9、-2)および接着因子E-カドヘリン(E-cadherin)などの転移関連遺伝子の発現が重要であることが多くの癌腫で示されている。しかし、これまでの報告は、単一因子のみを対象とした解析やその結果の比較のみが大多数を占める。抗血管新生因子治療に関しても、血管新生を軸とした増殖、浸潤、転移という腫瘍発育の各段階での各因子の作用機序、程度、相互関係が解明されないまま、単一因子を対象として、全病期に対して画一的に行われている点が必要な問題であり、改善の余地がある。そこで当論文は、膀胱尿路上皮癌(urothelial cancer; UC)において、bFGF、VEGF、IL-8といった主たる血管新生因子に関して、これまでのように全病期を通しての個別のマーカー的存在としてではなく、増殖、浸潤、転移という腫瘍発育の各段階における、経時的な発現変化を解明することで、UCの腫瘍動態及び進展における関与を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】ヒト膀胱尿路上皮癌 (urothelial cancer; UC) 細胞株 253J-P およびこれを親株として athymic nude mouse にて *In vivo* selection を 5 回繰り返して得られた高腫瘍形成能、高転移能を有する細胞株 253J B-V を用いて、勾配希釈法を用いたクローニング法によって、bFGF、VEGF、IL-8 の各因子の高発現および低発現を示す特異的細胞株 6 株 (the highest bFGF-expressing 253J B-V clone [bFGF-High]、the lowest bFGF-expressing 253J B-V clone [bFGF-Low]、the highest VEGF-expressing 253J B-V clone [VEGF-High]、the lowest VEGF-expressing 253J B-V clone [VEGF-Low]、the highest IL-8-expressing 253J B-V clone [IL-8-High]、the lowest IL-8-expressing 253J B-V clone [IL-8-Low]) を獲得し、樹立した。*In vitro* で、これら特異的クローン細胞株は親株 253J B-V と比較して、いずれもその細胞増殖に差はなく、また VEGF、bFGF、IL-8 の RNA 発現および蛋白発現は常に安定していた。

各特異的クローン細胞株を athymic nude mouse の膀胱に同種移植 ( $10^6$  cells / 50 $\mu$ l) し、移植後 1 週、2 週、4 週、8 週および 12 週目に腫瘍およびリンパ節転移を harvest し、各特異的クローン細胞株間の腫瘍形成能およびリンパ節転移能を経時的に比較検討した。さらに各特異的クローン細胞株の各病期での獲得腫瘍における腫瘍内新生血管数 (MVD)、血管新生因子 bFGF、VEGF、IL-8 各因子の発現を、免疫組織化学染色、*In situ* hybridization を用いて検討した。

【結果、考察】親株 253J B-V と比較して、bFGF および IL-8 の高発現クローン細胞株 (bFGF-High, IL-8-High) は、移植 1-2 週後という初期に有意な腫瘍増殖を、また 4 週後という比較的初期に転移を認めた。一方、bFGF および IL-8 の低発現クローン細胞株 (bFGF-Low, IL-8-Low) は全病期において、比較的腫瘍増殖の抑制、腫瘍数減少、転移の抑制を認めた。しかし、VEGF に関しては、全病期において腫瘍形成能、転移能に影響を示さなかった。

また、親株 253J B-V と比較して、いずれの高発現クローン細胞株 (bFGF-High, VEGF-High, IL-8-High) も、特に移植 1 週後という初期を中心に腫瘍内新生血管数は有意に増加しており、各特異的因子も有意に発現増強していた。一方、いずれの低発現クローン細胞株 (bFGF-Low, VEGF-Low, IL-8-Low) も、特に 1 週後という初期を中心に腫瘍内新生血管数は有意に減少しており、各特異的因子も有意に発現減弱していた。しかし、bFGF の特異的クローン細胞株 (bFGF-High, -Low) のみはこの現象が 2 週後にもみられたものの、その他いずれの特異的クローン細胞株における腫瘍内新生血管数も特異的血管新生因子発現も 4 週目以後、徐々に親株 253J B-V と同様のレベルとなった。

以上の結果より、UC における血管新生および血管新生因子、特に bFGF および IL-8 の発現は、腫瘍発育のごく初期に重要な意義をもつことが示された。つまり、腫瘍に対する初期治療としてこれら因子を制御することで、より有効な系統的抗血管新生因子効果が得られると考えられた。

本論文は、bFGF、VEGF、IL-8 といった主たる血管新生因子を、これまでのように全病期を通しての個別のマーカ的存在としてではなく、増殖、浸潤、転移という腫瘍発育の各段階における、経時的な発現変化に着目して分子生物学的及び組織学的に評価したもので、特に bFGF および IL-8 の発現は、腫瘍発育のごく初期に重要な意義をもつことが示され、UC の早期における系統的抗血管新生因子療法の可能性を示唆したことにより、本論文は本学の学位に値すると判断した。

氏名(本籍)	土岐 真治 (愛媛県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第2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20年9月5日
学位論文題目	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG and <i>Lactobacillus casei</i> suppress <i>escherichia coli</i> -induced chemokine expression in intestinal epithelial cells ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GGと <i>Lactobacillus casei</i> は、大腸菌によって誘導される腸管上皮細胞のケモカイン発現を抑制する)
発表誌名	International Archives of Allergy and Immunology 2008年 (in press)
	<b>審査委員</b> 主査 教授 宇高 恵子 副査 教授 佐野 栄紀 副査 教授 山本 哲也

## 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 土岐 真治

## 論文題目

***Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* Suppress *Escherichia coli*-induced Chemokine Expression in Intestinal Epithelial Cells**

(*Lactobacillus rhamnosus* GG と *Lactobacillus casei* は、大腸菌によって誘導される腸管上皮細胞のケモカイン発現を抑制する)  
(論文要旨)

### 【背景】

近年の研究から、アレルギー疾患の発症には遺伝要因と環境要因の両者が複雑に関わっており、特に乳幼児期におけるウイルスや細菌への暴露がアレルギーの発症を抑制することなどが報告されている（衛生仮説）。一方、「内なる外」と言われる腸内細菌叢も環境要因の一つであり、これまでに乳幼児期に乳酸菌が少ない児ほどアレルギーになりやすいことが複数の論文で報告されている。また、妊娠中の母胎や新生児期の児がある種の乳酸菌の投与を受けるとアトピー性皮膚炎の発症が抑制されることも報告されている。

これらのことから、腸管上皮は単に栄養の吸収だけでなく、腸内細菌の種類に応じて宿主の免疫系の発達を制御する働きを担っていることが推測される。しかしこれまでに腸内の乳酸菌がどのようにして宿主の免疫系に影響を及ぼすかについてはほとんど明らかになっていない。

今回私達は、腸内細菌叢が腸管上皮細胞からのケモカインの産生を介して宿主の免疫系に影響を及ぼすという仮説をたて、その仮説を証明するために、種々の腸内細菌に暴露した腸管上皮細胞のケモカイン遺伝子発現を比較検討した。

### 【方法】

腸管上皮細胞株である Caco-2 を培養して単層膜を形成させ、異なる濃度の生きた腸内細菌及び加熱死菌で 1~3 時間刺激を行った。また、乳酸菌と非病原性大腸菌や各種菌体成分との共刺激も行った。ケモカイン遺伝子の発現は、Caco-2 から Total RNA を抽出し、定量的 real-time PCR 法により測定した。



## 【結果】

腸内の常在細菌である非病原性大腸菌の刺激によって、CCL20, CXCL8, CXCL10 と CX3CL1 の遺伝子発現が菌の濃度依存的に誘導された。一方、*Lactobacillus rhamnosus* GG (*LGG*) と *Lactobacillus casei* (*L. casei*) は、これらのケモカインの遺伝子発現を全く誘導しなかった。しかし、別の数種類の乳酸菌種ではこれらのケモカインの発現が軽度誘導された。また、非病原性大腸菌や各種菌体成分によって誘導される CCL20 と CXCL10 の発現は *LGG* との共培養によって有意に抑制された。

## 【考察】



ケモカインは、白血球の選択的な遊走を制御して宿主の免疫系に影響を及ぼす。CCL20 は Th17 細胞や未成熟樹状細胞を、CXCL8 は好中球を、CXCL10 は Th1 細胞と NK 細胞を遊走させる事が知られている。

今回私達は非病原性大腸菌がこれらのケモカインの発現を強く誘導し、乳酸菌のなかでも一部の菌種ではこれらのケモカイン誘導が軽度認められるのに対して、*LGG* や *L. casei* ではケモカインの誘導はほとんど認められないことを初めて明らかとした。このことは腸管上皮細胞が異なった種類の腸内細菌や乳酸菌を個別に認識してケモカインの産生を誘導しうることを意味している。また、これらのケモカインの発現の程度はこれまでの介入試験における有効性と逆相関していたことから、腸管上皮細胞からのケモカイン産生誘導能は臨床的に有効な乳酸菌を選別するための新たなマーカーになり得る可能性が示唆された。

また、*LGG* は、非病原性大腸菌によって誘導される腸管上皮細胞からのケモカインだけでなく各種菌体成分によって誘導されるケモカイン産生も抑制したことから、その作用点は腸管上皮細胞表面での競合ではなく、腸管上皮細胞におけるシグナル伝達系に作用している可能性が示唆された。

今回明らかとなった、非病原性大腸菌がこれらのケモカインを誘導することや、*LGG* と *L. casei* がこれらのケモカインを誘導せず、また非病原性大腸菌によるこれらのケモカインの誘導を抑制する事自体が、どのようにしてアレルギー疾患の発症に影響を与えるかについては現時点では不明であり、今後さらなる検討が必要である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名		土 岐 真 治
審 査 委 員	主 査 氏 名	宇 高 恵 子	
	副 査 氏 名	佐 野 栄 紀	印
	副 査 氏 名	山 本 哲 也	

題 目 *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* suppress *escherichia coli*-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells  
 (*Lactobacillus rhamnosus* GGと*Lactobacillus casei*は、大腸菌によって誘導される腸管上皮細胞のケモカイン発現を抑制する)

著 者 Shinji Toki, Shinji Kagaya, Miwa Shinohara, Hiroshi Wakiguchi, Takashi Matsumoto, Yoshihisa Takahata, Fumiki Morimatsu, Hirohisa Saito, Kenji Matsumoto

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
 International Archives of Allergy and Immunology 2008年 (in press)

### 要 旨

#### 【背景・目的】

これまで、アレルギー疾患児の腸内細菌叢では*Lactobacillus*属細菌(乳酸菌)が少ないこと、さらには、乳酸菌の摂取により乳幼児のアトピー性皮膚炎の発症が抑制されることが報告されているが、それらのメカニズムについては十分に分かっていない。そこで、乳酸菌の持つアレルギー発症抑制機序の一端を明らかにすべく、腸内細菌が腸管上皮細胞のケモカイン遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

#### 【材料・方法】

大腸癌細胞株である Caco-2 細胞を単層培養したものを腸管上皮細胞(IEL)と見立て、それに*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)、*Lactobacillus casei* (*L. casei*)、*Escherichia coli* (*E. coli*)および他の腸内細菌を加えて培養し、各ケモカイン遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて、産生された各ケモカイン量を ELISA 法にて検討した。

#### 【結果】

Caco-2 細胞に熱処理により不活化した *E. coli* を加えると、3 時間以内に *E. coli* の菌数依存的に CCL20、CXCL8、CXCL10、CX3CL1 などのケモカイン遺伝子の転写ならびにそれらの遺伝子産物

の産生が亢進した。この亢進作用は *LGG* および *L. casei* では認められなかったものの、他の乳酸菌を含む 5 種類の腸内細菌では認められた。一方、Th2 細胞を誘導する CCL22 および CCL28 遺伝子の転写の亢進はいずれの細菌によっても誘導されなかった。さらに、ケモカインの転写を亢進させる菌数の *E. coli* とともに同数の *LGG* あるいは *L. casei* を Caco-2 細胞に添加すると、*E. coli* による各ケモカイン遺伝子の転写亢進はいずれの乳酸菌によっても抑制された。

Caco-2 細胞は、病原体関連分子パターンを認識するレセプターの中で TLR2、3、5、6、7、9 および CARD4 の mRNA を発現していた。Caco-2 細胞の各ケモカイン mRNA 発現は、TLR2 のリガンドであるペプチドグリカン (PGN) および TLR5 のリガンドである Flagellin の添加により増強したが、TLR3 のリガンドである PolyI:C および TLR4 のリガンドであるリポポリサッカライドでは影響されなかった。そこで、PGN あるいは Flagellin とともに *LGG* を Caco-2 細胞に添加したところ、PGN および Flagellin による mRNA 発現の亢進は抑制された。

*L. casei* は Hsp70 発現誘導を介してサルモネラ菌による CXCL8 誘導を抑制することが報告されていることより、Caco-2 細胞の HSP70 発現に及ぼす *LGG* および *L. casei* の影響を検討したところ、*LGG* は Hsp70 の発現を増強したが、*L. casei* は Hsp70 発現に影響を及ぼさなかった。さらに、*E. coli* によるケモカイン誘導を抑制する低濃度の酪酸は Hsp70 発現を誘導しなかった。

#### 【まとめ】

7 種類の腸内細菌の中で、*LGG* および *L. casei* のみが非病原性大腸菌 *E. coli* によって誘導される Caco-2 細胞からのケモカイン産生を抑制することが明らかとなった。*LGG* は、*E. coli* のみならず PGN および Flagellin によって誘導されるケモカイン産生をも抑制したことより、その抑制作用は単に *LGG* が Caco-2 細胞上の *E. coli* 結合部位を競合的に阻害することによるのではなく、Caco-2 細胞に発現されている TLR などの病原体関連分子パターン受容体を介するシグナル伝達系を介していることが示唆された。さらに、*LGG* および *L. casei* によるケモカイン誘導抑制作用は、サルモネラ菌によるケモカイン誘導とは異なり Hsp70 を介してではなく、他の因子を介していることが明らかとなった。

*LGG* および *L. casei* は脾臓において Th1 誘導型サイトカイン産生を誘導するが、一方、他の乳酸菌は Th2 誘導型サイトカイン産生を誘導することが報告されている。さらに、これまでの乳酸菌を用いた臨床試験結果において、統一した見解が得られていない。これらは、使用した乳酸菌の種類による効果の違いに基づくものと考えられ、*LGG* および *L. casei* は生体に対して他の乳酸菌とは異なる応答を誘導することが示唆される。

アレルギー疾患以外にも Crohn 病で乳酸菌の摂取により症状の改善が見られたという報告がある。Crohn 病の病態形成に 1 つの役割を演じているとされている Th17 細胞は CCL20 レセプターを発現していることより、乳酸菌による Crohn 病の症状抑制効果にケモカイン産生の抑制が関与している可能性が示唆される。今後は、*LGG* や *L. casei* などの乳酸菌によるケモカイン産生抑制がアレルギー疾患の発症抑制にどのように関与しているかを検討する必要がある。

研究内容の発表後、審査員からデータの提示方法に対するコメントや、Caco-2 細胞株を正常の上皮細胞に見立てることの妥当性、アトピー性皮膚炎との関連性や皮膚角化細胞との反応性の違い、生理的意義などについて質問があり、申請者はこれらについての的確な応答をした。これまで科学的に切り込むことが難しかった IEL の腸内細菌に対する反応について、定量的な実験系を樹立した解析がなされており、今後、有効成分の絞込みや作用機序の解明に進める基礎作りの研究であり、高知大学の学位に値する内容であった。

氏名(本籍)	西川 宏志(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第3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20年9月5日
学位論文題目	T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of <i>Escherichia coli</i> urinary tract infections (大腸菌性尿路感染症に対する治療選択肢としてのT-evenバクテリオファージの検討)
発表誌名	Archives of Virology 2008 153(3): 507-515 2008年3月
	<b>審査委員</b> 主査 教授 脇口 宏 副査 教授 横山 彰仁 副査 教授 杉浦 哲朗

## 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 西川 宏志

## 論文題目

T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of  
*Escherichia coli* urinary tract infections

(大腸菌性尿路感染症に対する治療選択肢としての T-even  
バクテリオファージの検討)

(論文要旨)

【目的】近年、多剤耐性細菌による感染症の蔓延が治療学的に問題となっている。本研究では、抗生物質に代わる治療選択肢としてのバクテリオファージ療法の有用性を、大腸菌性尿路感染症を対象として検討した。

【方法】バクテリオファージ (ファージ) T4 および大腸菌 B 株は、American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。また、高知大学医学部附属病院における尿路感染症患者より分離された病原大腸菌 (その内 12 株) の培養液と濾過した環境水 (孔径  $0.45\mu\text{m}$  フィルター使用) を混合培養後、その溶菌液中から単一プラーク法により新規ファージ計 7 株を分離した。その内、尿路病原大腸菌に対し広宿主域を示したファージ KEP10 について、以下の解析を行なった。KEP10 の形態は、CsCl 密度勾配超遠心法により精製後 2% 酢酸ウラニルによる陰染色を行ない、透過型電子顕微鏡により検討した。KEP10 の他のファージとの遺伝学的関係は、KEP10 DNA を鋳型として主要頭部タンパク質遺伝子および尾繊維タンパク質遺伝子の PCR 増幅を行ない、その増幅産物の塩基配列 (推定アミノ酸配列) の解読後、BLAST 検索を行ない検討した。動物実験では、BALB/c マウス (8 週齢前後、雌) を使用した。ファージのマウスの体内における動態は、KEP10 および T4 をマウス腹腔内に投与後、経時的に各臓器を摘出・破碎を行ない、破碎液中のプラーク数の計測により検討した。ファージの尿中安定性は、KEP10 および T4 をマウスおよびヒトより採取した尿に接種後  $37^{\circ}\text{C}$  で保温し、プラーク数の経時的測定を行ない検討した。尿路感染モデルは、致死菌量 ( $5 \times 10^9$  cells) の大腸菌 ECU5 株を経尿道的にマウス膀胱内に接種し、4 時間の排尿抑制を行なうことにより作成した。ファージ投与実験では、致死量の ECU5 株を膀胱内に接種後、KEP10、T4 あるいは対照としてファージを含まない培地のみ腹腔内投与を行ない、生存率への影響を検討した。

【結果および考察】(1) 検討した大腸菌計 42 株 (尿路病原大腸菌 41 株および大腸菌 B 株) に対し、T4 はこれらの 14% をのみ溶菌できたが、KEP10 は 67% を溶菌可能であった。これから、大腸菌性尿路感染症の治療用ファージとしては、KEP10 の方が T4 よりも適していると考えられた。(2) KEP10 は形態的には family *Myoviridae* の morphotype A2 に属するファージであり、DNA 解析を行った結果、これらは T-even ファージに属すると考えられた。(3) KEP10、T4 をマウス腹腔内に投与すると、いずれも 4 時間以内に検討した全ての臓器で検出された。

これにより、腹腔内に投与されたファージは迅速に血中および全身各臓器に移行することが確認された。また各臓器において、投与後 24 時間は比較的高いレベルでファージが検出され続けた。(4) 代謝ケージを使用した間接実験により、腹腔内に投与された T4 ファージの一部分が尿中に移行している可能性が示唆された。また、KEP10 および T4 ともマウスおよびヒト尿中において、37℃で少なくとも 24 時間安定であることが示された。(5) 致死量の ECU5 株をマウス膀胱に接種後、対照として培地を腹腔内投与すると、全てが 3 日以内に死亡した。常在菌と区別するためにリファンピシン耐性マーカーを付与した ECU5 株 (ECU5RIF1) を膀胱内接種すると、接種後 5 時間で既に血中に菌が移行し菌血症を起こしていることが確認された。一方、致死量の ECU5 株を膀胱に接種後、KEP10 を MOI (multiplicity of infection) 60 で腹腔内投与すると、90%のマウスが生存し、有意の致死抑制効果が認められた。また同様に T4 投与群においても、MOI 60 の投与で 100%の致死抑制効果が認められた。(6) 以上から KEP10 および T4 は、腹腔内投与後に、血中、各臓器、および尿中において尿路病原大腸菌を溶菌し、感染制御効果を発現している可能性が示唆された。

【結論】以上から、大腸菌性尿路感染症に対するファージ治療の有効性が示唆された。また、KEP10 は、大腸菌性尿路感染症に対する治療用候補ファージとしての適格性を有していると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	西 川 宏 志
審 査 委 員	主 査 氏 名	脇 口 宏 印
	副 査 氏 名	横 山 彰 仁 印
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 印

題 目 T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of *Escherichia coli* urinary tract infections  
(大腸菌性尿路感染症に対する治療選択肢としての T-even バクテリオファージの検討)

著 者 H. Nishikawa, M. Yasuda, J. Uchiyama, M. Rashel, Y. Maeda, I. Takemura, S. Sugihara, T. Ujihara, Y. Shimizu, T. Shuin, S. Matsuzaki

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Archives of Virology 2008 153(3): 507-515 2008年3月

### 要 旨

#### 【背景・目的】

近年、多剤耐性菌による感染症が増加し、将来的に化学療法に支障を来すことが危惧されている。メチシリン耐性ブドウ球菌 MRSA に始まり、ペニシリン耐性肺炎球菌 PRSP、βラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ桿菌 BLNAR、多剤耐性緑膿菌など耐性菌の問題は枚挙にいとまがない。尿路感染症は細菌感染症の中で頻度の高い感染症であるが、腎盂腎炎から敗血症へと極めて重症な感染症に進展することが稀ではない。わが国では、尿路感染症の主な起因菌である大腸菌 *E. coli* に対する治療に対してニューキノロン系抗菌薬が第1選択として使用されてきたが、単純性尿路感染症の患者からの分離菌でもキノロン耐性大腸菌の増加が深刻な問題になっている。欧米諸国では、大腸菌による尿路感染症に対する治療には ST 合剤あるいは trimethoprim 単剤が経験的に使用されているが、ST 合剤耐性大腸菌は 18~20%の多さで、多剤耐性の尿路病原性大腸菌 (UPEC) の出現も報告されている。今後、新薬の開発はあるにしても、UPEC など耐性大腸菌の増加が尿路感染症の治療に対して大きな障壁となることが危惧されており、抗菌薬とは全く別の治療薬の開発が望まれるところである。

バクテリオファージ (以下ファージと略) は細菌に特異的に感染し溶菌を起こすウイルスであ

る。1920 年頃に d'Herelle によってファージの抗菌作用が発見されたが、初期の臨床応用効果は芳しいものではなく、ファージ療法は 1940 年代には西欧諸国では断念され、わずかに旧ソ連など東欧諸国で研究が継続されてきた。最近の耐性菌出現の増加により、西欧諸国でも抗菌薬で治療困難な細菌感染症に対するファージ療法が再評価されるようになってきた。

申請者らは致命的耐性細菌感染症に対する有効なファージ療法の確立を目的に、マウスにおける黄色ブドウ球菌、緑膿菌感染症に対するファージ療法の有効性と安全性を報告してきた。当論文では大腸菌による尿路感染症に対するファージ療法をマウスモデルで開発することを目的とした。

【対象と方法】標準株としてファージ T4 と大腸菌 B 株を用いた。尿路感染症臨床分離大腸菌 41 株のうち 12 株を用いて申請者らが独自に分離した新規ファージ 7 株の内から幅広い溶菌活性を示した KEP10 を当論文の研究対象ファージに採用した。KEP10 の形態は透過型電子顕微鏡を用いて分析し、遺伝学的分析は主要頭部タンパク質遺伝子と尾繊維タンパク質遺伝子の PCR 産物の塩基配列を検討した。ファージの体内動態はマウスの腹腔内投与後、経時的に臓器を摘出・粉碎し、粉碎液中のファージ数をプラーク法で測定した。尿路感染モデルは 8 週齢前後の雌 BALB/c マウスを用い、大腸菌は T4、KEP10 の両者に感受性があった ECU5 株を使用した。大腸菌致死菌量 ( $5 \times 10^9$  個) を経尿道的に膀胱内に接種し、4 時間の排尿抑制を行った。ファージ投与実験は大腸菌接種直後に MOI60 の T4、KEP10 あるいは培地を腹腔内に接種し、生存率を検討した。

【結果・考察】UPEC 臨床分離 41 株、大腸菌 B 株に対して T4 は 14% の菌株に対してのみ溶菌したに過ぎなかったが、KEP10 は 67% の菌株を溶菌した。KEP10 は UPEC に対する溶菌スペクトルが広く、ファージ療法臨床応用の候補ファージとして T4 より適していると考えられた。

KEP10 は伸長した 20 面体の頭部と伸縮性のある尾部からなりたっており、family Myoviridae の morphotype A2 に属し、DNA 解析の結果で T4 と同様に T-even ファージに属すると考えられた。

KEP10、T4 ファージをマウス腹腔内投与したところ、いずれも 4 時間以内に血液を含む全身の臓器から検出され、少なくとも 24 時間は比較的高力価のファージが検出された。すなわち、両ファージは腹腔内投与後速やかに血液内に移行し、全身臓器に運搬されることから大腸菌によるどの臓器の感染症に対しても治療可能であることが示唆された。

代謝ケージを使用した間接的実験で、T4 ファージは尿中にも排泄されることが示唆された。また、KEP10、T4 ファージはいずれもマウスおよびヒト尿中において、37°C で少なくとも 24 時間は安定であり、尿中の大腸菌に対しても有効であることが示唆された。

致死量の ECU5 株を膀胱内接種したマウスでは接種後 5 時間で菌血症を起こしていることが確認され、全例 3 日以内に死亡した。これに対して、MOI 60 の T4 あるいは KEP10 ファージを投与したマウスのそれぞれ 100%、90% が生存し、尿路感染モデルでもファージ療法の有効性が確認された。

本論文は、筆者らが独自に発見した KEP10 ファージの形態、遺伝学的特徴を明らかにすると共に、マウスにおける体内動態から全身臓器に拡散すること、尿路病原性大腸菌 UPEC に対する抗菌スペクトルが広く、動物感染モデルでも極めて有効であることが示され、耐性菌を含む大腸菌性尿路感染症の新規治療薬の候補ファージとして適格性のあることを明らかにしたもので、臨床的に



も極めて価値あるものであり、本学の学位に値すると審査員一同は判断した。