

2006.5

特集号



(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十一号

評価広報課 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。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 19 号	金 頭 峰	STI571 (Glivec) suppresses the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1 ( STI571 (Glivec) は胃腸管間質腫瘍(GIST)の細胞株 GIST-T1 における血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を抑制する )	1
甲医博第 20 号	桑 原 昌 則	Treatment with HMG-CoA reductase inhibitors (statins) attenuates the progression of aortic valve stenosis in the elderly ( HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) の投与は高齢者の大動脈弁狭窄症の進行を抑制する )	5
甲医博第 21 号	邢 宇 彤	Supplementation of nucleoside-nucleotide mixture enhances functional recovery and energy metabolism following long-time hypothermic heart preservation ( 高エネルギー - リン酸化物ヌクレオシド - ヌクレオチド混合液添加保存液についての長期低温心臓保存の研究 )	8
甲医博第 22 号	Con Chin Sergio Arturo	<i>H. pylori</i> CagA status associated with gastric cancer incidence rate variability in Costa Rican regions ( 中南米コスタリカ国内における胃癌発生率の相違とヘリコバクター・ピロリ菌病原因子(CagA)との関連性 )	1 1
甲医博第 23 号	田 口 崇 文	Suppressive effects of DHEA and NF- B inhibitor parthenolide on corticotroph tumor cell growth and function <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ( In vitro 及び in vivo における DHEA と NF- B 阻害剤 parthenolide の ACTH 産生腫瘍細胞増生及び機能に対する抑制効果の検討 )	1 4
甲医博第 24 号	堀 野 太 郎	Suppressive effects of iron on TGF-β <sub>1</sub> production by renal proximal tubular epithelial cells (腎近位尿細管細胞からの TGF-β <sub>1</sub> 産生に対する鉄の抑制効果)	1 7
甲医博第 25 号	Marco Jorge Diego	Species assignation of Leishmania from human and canine American tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in north Argentina (アルゼンチン北部のアメリカ型皮膚リーシュマニア症流行地における原虫感染ヒトおよびイヌ由来株の多座位酵素電気泳動(MLEE)解析)	2 0

甲医博第 26 号	楊 洋	HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human prostate cancer LNCaP cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in conjunction with blockade of androgen receptor STAT3 and AKT signaling (ヒト免疫不全ウイルスプロテア - ゼ阻害剤はアンドロゲンレセプタ -、STAT3、AKT シグナルをブロックしてヒト前立腺癌細胞 LNCaP の増殖を抑制しアポト - シスを誘導する)	2 4
甲医博第 27 号	横 田 淳 子	Scavenging of reactive oxygen species by <i>Eriobrotrya japonica</i> seed extract ( 枇杷種子由来エキスの活性酸素消去作用 - 各種ラジカル消去及び脂質過酸化抑制能 - )	2 7
甲医博第 28 号	宮 野 伊 知 郎	Quantitative analysis of carotid atherosclerotic lesions and high-sensitivity C-reactive protein in community-dwelling elderly 80 years or older ( 地域在住高齢者 ( 80 歳以上 ) における頸動脈・動脈硬化性病変の定量的評価 : 高感度 C-reactive protein との対比検討 )	3 1
甲医博第 29 号	政 平 訓 貴	Olig2-positive progenitors in the embryonic spinal cord give rise not only to motoneurons and oligodendrocytes, but also to a subset of astrocytes and ependymal cells ( 胎仔期脊髄 Olig2 陽性前駆細胞は運動ニュー - ロンとオリゴデンドロサイトのみならずアストロサイトや上 衣細胞も産生する )	3 5
甲医博第 30 号	齋 藤 史 路	Role of IL-27-producing dendritic cells in Th1-immunity polarization in Lewis rats ( ルイスラットの Th1 型への分化における IL-27 産生樹 状細胞の役割 )	3 9

氏名(国籍)	金 頭 峰 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第19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18年3月23日
学位論文題目	STI571 (Glivec) suppresses the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1 (STI571 (Glivec) は胃腸管間質腫瘍(GIST)の細胞株 GIST-T1 における血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を抑制する)
発表誌名	World Journal of Gastroenterology 2005年(in press)

審査委員	主査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	大拙	祐治
	副査	教授	大西	三朗

## 論文の内容の要旨

胃腸管間質腫瘍 Gastrointestinal stromal tumor (GIST) は c-KIT, CD34 を発現していることがその特徴である。c-KIT は *c-kit* 遺伝子にコードされる受容体型チロシンキナーゼであり、血液幹細胞、精巣細胞、メラノサイト、カハールの介在細胞に発現し、細胞の増殖、分化に関与している。そのリガンドである stem cell factor (SCF) によりそのリン酸化を介した細胞内シグナル伝達が行われている。GIST の多くに *c-kit* 遺伝子の機能獲得性突然変異が見られ、リガンド非依存性の活性化に関与することから、*c-kit* 遺伝子の機能獲得性突然変異が GIST の発生の原因であると考えられている。*c-kit* 遺伝子変異の多くは傍細胞膜領域(エクソン 11) に集中して見られるが、細胞外領域やチロシンキナーゼ領域にも少数ながら存在する。また GIST は一般的な抗癌剤に対して不応で外科切除不能例では致死的であったが、近年開発された STI571(商品名 Glivec) が慢性骨髄性白血病で異常活性化している BCR-ABL の活性化を抑えることでその治療薬として使われるほか c-KIT の活性化を特異的に抑えることから c-KIT 陽性 GIST に対する治療薬としても効果を上げている。特に STI571 は GIST に頻度の高いエクソン 11 に変異のある c-KIT に対し感受性が高いことが報告されている。本研究では本学で樹立された GIST の細胞株 GIST-T1 を用いた。GIST-T1 はエクソン 11 にヘテロで 57bp の欠失があり、リガンド非依存性の c-KIT の活性化が認められている。

血管新生因子の一つである血管内皮増殖因子(VEGF)は血管内皮細胞特異的な増殖因子として、また強い血管透過性因子として見出されたタンパクであるが、近年腫瘍の増殖、転移などに深く関与していることが報告されている。VEGF は低酸素条件下に強く誘導されるが、さまざまな悪性腫瘍組織でもその発現が高く、また GIST についても VEGF の発現が高い症例は予後が悪いとの報告がなされている。

STI571 の GIST に対する抗腫瘍効果については多くの研究があるが、STI571 が GIST の VEGF の発現に対してどのような影響を与えるかについての報告はない。本研究では GIST における VEGF の発

現にSTI571がどのような影響を与えるかを検討するために GIST-T1 を用いて VEGF の発現を転写、翻訳レベルで検討した。さらに、GIST-T1 における VEGF 発現調節に関与するシグナル伝達について PI3K 抑制剤 (LY294002, wortmannin) または MEK 抑制剤 (PD98059) を使って検討した。PI3K と MEK は細胞内のタンパクとして細胞内の様々なタンパクのシグナル伝達に関与している。低酸素誘導因子 1 アルファ (HIF-1alpha) は、様々の悪性腫瘍での VEGF の発現に重要な役割を果たしている。GIST-T1 における VEGF の発現にもその影響を及ぼしているかについて検討を行った。また、GIST-T1 他細胞での VEGF の発現は c-KIT の活性化とどのような関係があるかについては野生型 c-KIT を発現している大腸癌細胞株 (DLD-1) を用いて検討した。

実験方法として VEGF の転写レベルは RT-PCR, 翻訳レベルはフローサイトメトリーと western blotting 法で検討した。c-KIT の活性化については immunoprecipitation で、HIF-1alpha の発現は RT-PCR とフローサイトメトリーで検討した。また、DLD-1 における SCF 刺激による VEGF の発現は RT-PCR で検討し、細胞の viability は MTT assay で確認した。

immunoprecipitation の結果では GIST-T1 細胞にはリガンド非依存性の c-KIT 活性化が認められ、STI571により c-KIT 活性化は阻害された。また RT-PCR と flow cytometry, western blotting での分析では GIST-T1 の VEGF の転写レベル、翻訳レベルでの発現が STI571 処理によって低下することが分かった。また SCF により VEGF の発現はさらに上昇し、その発現上昇は STI571 により阻止された。LY294002 と wortmannin は PI3K 抑制剤としてその下流である AKT 経路のシグナルを抑制する。AKT は、eNOS 活性を通して VEGF の発現を上昇させることが報告されている。また MEK はその下流である p44/42MAPK の活性化を促進する。RT-PCR の結果では PD98059, LY294002, wortmannin が VEGF の転写発現に影響を及ぼさなかった。また、GIST-T1 での HIF-1 alpha の転写、翻訳レベルは、STI571 の処理または SCF 刺激によって影響を受けなかった。DLD-1 では SCF (5,10ng/mL) で VEGF の発現が上昇していることが分かった。MTT assay による評価では STI571 が GIST-T1 細胞の細胞生存能を低下させることが分かった。

これらの結果は、c-KIT の活性化が VEGF の発現に重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。また AKT, p44/42 MAPK 及び HIF-1alpha は GIST-T1 細胞の VEGF 発現の調節に関与していないと考えられた。c-KIT 発現陽性 DLD-1 細胞株においても VEGF の発現が c-KIT により調節を受けていることが示唆された。GIST-T1 細胞において c-KIT の活性化が、その増殖、生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上より本研究では STI571 は GIST に対してその細胞増殖を抑えるだけでなく腫瘍血管新生を抑えることで抗腫瘍効果を発揮していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

胃腸管間質腫瘍 (GIST) は、消化管の蠕動運動のペースメーカーであるカハール介在細胞の腫瘍であり、その大部分は c-kit 受容体チロシンキナーゼ (KIT) の機能獲得性変異が原因となって発生する。最近まで GIST に対する有効な治療薬は無かったが、慢性骨髄性白血病の原因である BCR-ABL チロシンキナーゼに対する分子標的薬として開発された STI571 (商品名: グリベック) が KIT をも阻害したため、GIST の治療に用いられたところ、多くの症例で著効を示すことが判明した。また、血管新生因子の 1 つである血管内皮増殖因子 (VEGF) は

腫瘍の増殖、進展に深く関与することが知られているが、最近、その血中濃度が GIST 症例の多くで上昇していることが明らかになり、上昇群では予後不良との報告もなされている。

そこで、申請者らは、本学で樹立された KIT の傍細胞膜領域の変異により KIT チロシンキナーゼが構成的に活性化している GIST 細胞株 (GIST-T1) を用いて、VEGF 発現に及ぼす STI571 の作用と VEGF 発現に関わるシグナル分子とを明らかにすべく解析を行なった。

得られた結果は、以下のようにまとめられる。

(1) IP-Western により、STI571 が 1  $\mu\text{g/ml}$  (1.7  $\mu\text{M}$ ) の濃度で GIST-T1 における KIT のチロシンリン酸化を完全に抑制することを示した。

(2) STI571 が 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で GIST-T1 からの VEGF mRNA および蛋白の発現を濃度依存性に抑制した。

(3) KIT のリガンドである stem cell factor (SCF) の添加により GIST-T1 からの VEGF mRNA および蛋白の発現が亢進することを示した。さらに、SCF が野生型 KIT を発現する大腸癌細胞株 (DLD-1) からの VEGF mRNA の発現も促進したため、VEGF 発現の亢進は KIT の活性化に共通して認められる現象である可能性が示唆された。

(4) VEGF mRNA の転写制御には HIF-1 $\alpha$  が重要な役割を演じることが知られている。そこで、GIST-T1 における VEGF 発現への HIF-1 $\alpha$  の関与について明らかにするため、STI571 あるいは SCF 処理後の細胞における HIF-1 $\alpha$  の mRNA および蛋白の発現レベルについて検討したが、ほとんど変動を認めず、関与は否定的であることが示唆された。

(5) KIT 活性化のシグナルを伝える細胞内シグナル伝達系として MAP キナーゼ (MAPK) および PI3 キナーゼの経路が知られている。そこで、これらシグナル分子の VEGF 発現への関与について明らかにするため、細胞を MAPK キナーゼ (MEK) の阻害剤である PD98059、あるいは、PI3 キナーゼの阻害剤である LY294002 および Wortmannin で処理して、VEGF mRNA の発現レベルについて検討したが、変動を認めず、両経路の関与は否定的であることが判明した。

(6) MTT assay により、STI571 が 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で GIST-T1 の細胞増殖性を抑制することを示した。

以上により申請者らは、STI571 が GIST-T1 細胞株での VEGF の発現と細胞増殖性に対し抑制作用を示すことを明らかにした。さらに、KIT 活性化による VEGF 発現亢進のメカニズムについては、転写因子 HIF-1 $\alpha$  や KIT の下流の MAPK および PI3 キナーゼを介するものではなく、その他のシグナル経路が関与している可能性を示した。本論文では、細胞内 HIF-1 $\alpha$  蛋白の発現量を Western blot を実施せずに Flow cytometry のみの結果で定量的に評価するなど、若干の改善すべき点は見受けられた。しかしながら、STI571 が、細胞に対する直接的な

増殖抑制に加えて、VEGF 発現の抑制作用を介して GIST に対する抗腫瘍効果を発揮している可能性を初めて示したものであり、医学的に十分な価値を有すると認められた。したがって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(本籍)	桑原 昌則 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第20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18年3月23日
学位論文題目	Treatment with HMG-CoA reductase inhibitors (statins) attenuates the progression of aortic valve stenosis in the elderly (HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)の投与は高齢者の大動脈弁狭窄症の進行を抑制する)
発表誌名	Geriatrics and Gerontology International Volume 6 Issue 2(in press) 2006年6月(in press)

審査委員	主査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	笹栗	志朗
	副査	教授	杉浦	哲朗

## 論文の内容の要旨

(背景、目的) 人口の高齢化に伴い、非リウマチ性大動脈弁狭窄症の患者は増加し、临床上極めて重要な位置を占める。これまで、非リウマチ性大動脈弁狭窄症は加齢に伴う大動脈弁の退行性変化と考えられていた。しかし、近年、粥状性の動脈硬化と関連があると報告され、大動脈弁狭窄症の進行についても高血圧、喫煙、糖尿病等の動脈硬化の危険因子と関連があるという報告がなされる様になり、注目されている。これまでに我々は、非リウマチ性大動脈弁狭窄症の患者はリウマチ性大動脈弁狭窄症の患者に対して、大動脈の動脈硬化性変化が強いことを明らかにしてきた。今回の研究では、動脈硬化進展および心血管イベントの抑制効果が証明されている HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)の投与が、高齢者の非リウマチ性大動脈弁狭窄症の進行を抑制するかどうかを検討した。

(方法) 対象は 65 歳以上で 1994 年から 2002 年までの間に心エコー検査を施行した 12,353 例のうち、6 ヶ月以上の期間の後に 2 回目の検査を行った非リウマチ性大動脈弁狭窄症患者 33 例である。大動脈弁狭窄症の定義としては経胸壁心エコー検査で、大動脈弁に石灰化を認め、大動脈弁の流速が 2m/second 以上のものとした。また、リウマチ性心疾患、大動脈二尖弁、左室収縮機能障害、その他の弁膜症、先天性心疾患、家族性高脂血症、血液透析を合併している症



例は除外した。対象 33 名の平均年齢は  $75 \pm 6$  歳、初回心エコー時の平均大動脈弁流速  $3.1 \pm 1.0$  m/second、連続ドップラー波より求めた圧較差  $41.9 \pm 29.4$  mmHg であった。この患者をスタチン群 13 名、非スタチン群 20 名に分け以下の検討を行った。

(結果) (1)スタチン群と非スタチン群の間には年齢( $74 \pm 5$  歳 vs.  $75 \pm 5$  歳)、血圧( $139 \pm 12$  mmHg vs.  $137 \pm 27$  mmHg)、左室収縮機能(%FS) ( $40 \pm 8.4\%$  vs.  $37 \pm 5.6\%$ )、高血圧合併の割合( $92\%$  vs.  $70\%$ )、糖尿病合併の割合( $46\%$  vs.  $15\%$ )、ACE 阻害剤・ARB 服薬の割合( $31\%$  vs.  $20\%$ )、初回心エコー時の大動脈弁流速( $3.20 \pm 0.99$  vs.  $3.02 \pm 1.01$  m/second)、大動脈弁圧較差( $44.5 \pm 27.4$  mmHg vs.  $40.3 \pm 31.1$  mmHg)、フォローアップ期間( $31 \pm 23$  ヶ月 vs.  $30 \pm 20$  ヶ月)に有意差はみられなかった。経過中のコレステロール値には両群で差を認めなかった。

(2)スタチン群では 1 年あたりの流速の増加および圧較差増加が、非スタチン群に比べて有意に小さかった( $0.01 \pm 0.21$  vs.  $0.22 \pm 0.24$  m/second,  $p=0.014$ ,  $1.25 \pm$  mmHg/year vs.  $6.04 \pm$  mmHg/year,  $p=0.028$ )。

(3)多変量解析では、スタチン投与、年齢、初回心エコー時の大動脈弁圧較差、糖尿病、高血圧、ACE 阻害剤・ARB 服薬の 6 因子を含めて検討すると、スタチン投与のみが圧較差増加を抑制する独立した因子であった( $r=-0.48$ ,  $p<0.05$ )。

(考察) 今回の研究では、高齢者においてスタチンの投与が、非リウマチ性大動脈弁狭窄症の進行を抑制する可能性が示唆された。これまでの研究では、スタチン投与により、大動脈弁のカルシウム沈着が抑制されるという報告がある。また、大動脈弁石灰化の初期病変には、アポ B、アポ(a)などの脂質の沈着、マクロファージ、T 細胞の浸潤などの炎症性変化がみられ、スタチンの抗炎症作用と大動脈弁狭窄症の進行抑制との関連性が指摘されている。本研究ではスタチンが大動脈弁狭窄症の進行を抑制したメカニズムは明らかではないが、経過中のコレステロール値に有意差を認めないことより、スタチンの有する抗炎症などの pleiotrophic effect が重要な役割を果たしている可能性がある。

(結論および今後の展望) スタチン投与が高齢者の大動脈弁狭窄症の進行を抑制する可能性が、今回の研究で示唆された。高齢者大動脈弁狭窄症の予後は不良であり、また有効な薬物治療はこれまで無く、大動脈弁置換術が必要となるが、高齢者では手術が困難である事も多い。日本の人口の高齢化を考えると、内科治療で大動脈弁狭窄症の進行を遅らせることができれば、非常に有用な治療法の選択肢となると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

人口の高齢化とともに非リウマチ性大動脈弁狭窄症が増加し、病態の解明や治療法・予防法の開発が臨床的に重要になっている。申請者は、近年提唱された大動脈弁の粥状硬化による狭窄説に着目し、粥状硬化の進展防止効果が証明されているHMG-CoA還元酵素阻害剤（スタチン）の投与が高齢者の非リウマチ性大動脈弁狭窄症の進行を抑制するか否かを検討した。

対象として、レトロスペクティブに、平均年齢  $75 \pm 6$  歳の 33 例の非リウマチ性大動脈弁狭窄症の患者を選んだ。選ばれた症例では、心臓超音波の初回検査時に平均大動脈弁流速が  $3\text{m/sec}$ 、圧較差が  $42\text{mmHg}$  であった。スタチン内服群が 13 名、非内服群が 20 名で、平均観察期間は約 30 ヶ月であった。大動脈弁狭窄症の進展の評価には、大動脈弁流速と圧較差の変化を用いた。

スタチン非内服群では、観察期間における流速の増加が、 $0.22\text{m/sec}$  であったのに対し、内服群では、 $0.01\text{m/sec}$  で、スタチン内服群では、流速の増加が有意に抑制されていた。圧較差の増加は、スタチン非内服群で  $6\text{mmHg}$ 、内服群で  $1\text{mmHg}$  で、やはり、圧較差の増加は、スタチン内服により有意に抑制されていた。

このような結果から、申請者は、スタチン投与が非リウマチ性大動脈弁狭窄症の進展を抑制する可能性があるかと推察した。このようなスタチンの有益な効果発現の機序として、血管内皮と同様の細胞成分からなる弁組織における脂質の沈着やマクロファージ・T細胞の浸潤が、スタチンの有する抗動脈硬化作用や抗炎症作用により抑制されたのではないかと考察した。

以上のように、申請者の論文は、近年臨床的に重要になっている非リウマチ性大動脈弁狭窄症の進展を抑制する薬物療法の開発につながるものであり、審査員一同は、申請者の論文を、本学医学博士の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(国籍)	邢 宇 彤 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第21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18年3月23日
学位論文題目	Supplementation of nucleoside-nucleotide mixture enhances functional recovery and energy metabolism following long-time hypothermic heart preservation (高エネルギーリン酸化物ヌクレオシド-ヌクレオチド混合液添加保存液についての長期低温心臓保存の研究)
発表誌名	Journal of Surgical Research 127:144-150 2005年8月
<b>審査委員</b> 主査 教授 佐藤 隆幸 副査 教授 荒木 京二郎 副査 教授 杉浦 哲朗	

## 論文の内容の要旨

【目的】心臓移植は終末期心臓疾患の有効な治療として施行されている。しかし移植心の保存時間は4-6時間に限られており、心臓移植は時間的な制限を受けている。移植心の保存時間を延長させることは、心臓移植のために重要な課題となっている。そのために、保存液添加物として代謝基質であるグルコース、抗酸化物質であるグルタミン酸塩、アデノシンなどを加えることにより、心臓移植の問題点を解決すべく多くの研究がなされているが、顕著な結果は得られていない。我々は、ヌクレオシド-ヌクレオチド混合液が低温心臓保存時に高エネルギーリン酸塩の損失を補充し、保存後の心機能を改善させると同時に保存時間の延長に有効ではないかと推測し実験を施行した。

【方法】当科で開発された核酸成分製剤OG-VIは、30mM イノシン、30mM グアニル酸ナトリウムの2種類のプリン成分と30mM シチジン、22.5mM ウリジン、7.5mM チシジンの3種類のピリミジン成分で構成されるヌクレオシド-ヌクレオチド混合液である。長期低温ラット心臓保存モデルを作製し実験を施行した。雄性 Wister ラットの心臓を用い、保存液として生食、OG-VI、UW液、UW液+OG-VIの区分を設け、4℃の低温にて12時間保存を行った。12時間保存後にランゲンドルフ法による心機能評価とともに、高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)により心筋内の高エネルギー代謝物質の測定を行った。

次に、OG-VIの5種類の核酸成分をUW液にそれぞれ加えて同様の実験を行った。またHPLC法によって、保存液のヌクレオシド-ヌクレオチドの全体レベルを心臓保存の前後で測定した。

【結果】生食、OG-VI、UW液、UW液+OG-VIそれぞれグループで長期低温ラット心臓保存を施行した後、心機能検査として心拍出量(CO)、冠動脈フロー(CF)、大動脈フロー(AF)、Rate-Pressure Product (RPP)、左室1回拍出量(LVSV)と左室1回拍出力(LVSW)を測定した。生食やOG-VIのみのグループでは、UW液やUW液+OG-VIに比べて心機能検査値が全てにおいて低値であった。

UW液とUW液+OG-VIを比較しても、UW液(CO:71.6±4.7%、CF:62.5±2.9%、AF:77.4±5.9%、RPP:72.2±3.3%、LVSV:81.6±5.5%、LVSW:62.8±5.7%)でありUW液+OG-VI(CO:83.7±2.2%、CF:74.8±4.3%、AF:86.7±2.5%、RPP:85.7±5.5%、LVSV:89.3±3.6%、LVSW:79.5±6.1%)であった。UW液+OG-VIは、UW液に比べて心機能が10から20%ほど回復していた。さらに高エネルギーリン酸塩レベルでも生食とOG-VIのみでは値が低く、UW液(AMP値:1.04±0.07、ADP値:2.17±0.27、ATP値:4.10±0.09)とUW液+OG-VI(AMP値:1.22±0.05、ADP値:2.52±0.10、ATP値:4.98±0.08)であり、UW液にOG-VIを添加することで高エネルギーリン酸塩レベルでは0.2から1.0 μmol/gの増加を認めた。また、冠状血管抵抗(CVR)と心筋重量比(wet/dry weight)ではUW液+OG-VIグループが他のグループに比べて有意に低値であった。保存液として、OG-VIの各々の核酸成分をUW液に加えた実験では、単独での心機能の改善は得られなかった。保存液のヌクレオシド-ヌクレオチドの全体レベルを心臓保存の前後で測定した結果、心臓保存後のレベルが減少していた。

#### 【考察】

虚血時には、心筋細胞への酸素の供給が途絶え、ミトコンドリアのATP産生が消失するため収縮に必要な高エネルギーリン酸の供給ができなくなる。そのため虚血に陥った心筋の収縮蛋白付近でADP+ADP→ATP+AMPの反応が進行し、その結果ADPが枯渇する。よって再灌流されても、収縮蛋白付近でADPが存在しないので収縮不全は改善されない。さらに再灌流時には、心筋細胞内から心筋細胞外へとアデノシンヌクレオチドが急速に漏出するため、より一層、心筋収縮不全に陥る。我々は、UW液にヌクレオシド-ヌクレオチドの混合物を添加したグループが、UW液単独のグループに比べて、長期低温心臓保存後の心機能の回復に繋がることを見出した。外因性にATPの前駆物質であるアデノシンやイノシンを補うことによって、虚血再灌流における心筋ATPの回復や収縮不全を改善させ、心機能障害を改善することが明らかになった。

現在、保存時の心筋内代謝を抑制するためには、低温保存が最適と考えられている。今回、保存液のヌクレオシド-ヌクレオチドの全体レベルを心臓保存の前後で測定した結果、ヌクレオシド-ヌクレオチドのレベルは低下しており、低温心臓保存時に核酸代謝が行われることを示した。心臓保存液にヌクレオシド-ヌクレオチドの混合物を添加することは、低温保存時の心筋代謝を補助する可能性が示唆された。

OG-VIはヌクレオシドとヌクレオチドがバランス良く混合されているが、その構成比率は様々なヌクレオシド-ヌクレオチドを試した結果、その比率が決められている。OG-VIはヌクレオシド-ヌクレオチドのバランスがとれた成分で構成されており、タンパク質代謝とエネルギー代謝に良好な影響をもたらすという報告がなされている。OG-VIは、低温保存時や虚血-再灌流時に高エネルギーリン酸塩を補給することが示唆された。OG-VIの構成要素は、心筋細胞で高エネルギーリン酸塩の前駆体として利用され、ATPを合成するためのADPを供給し、ADPとCrPが反応しATPに置換される。この合成されたATPにより心筋収縮が改善された。

結論として、長期低温ラット心臓保存モデルにおいて、UW液にヌクレオシド-ヌクレオチドの混合物を添加することにより、心筋内のATPレベルが上昇し心機能の改善に繋がった。今後、ヌクレオシド-ヌクレオチドの混合物を心筋保護液や心臓保存液の成分の一つとして臨床応用できれば、移植心の長期保存が可能となり得るであろう。

## 論文審査の結果の要旨

心移植は、終末期心不全に対する唯一の有効な治療法である。しかし、移植心を摘出して移植するまでの保存時間が 4-6 時間に限られているため、輸送時のトラブルなどにより、しばしば移植を断念せざるを得ない場合がある。そこで、申請者は、摘出心の保存時間を延長する方法の開発を手がけた。

これまでの先行研究により、30 分程度の短期心筋虚血後の再灌流傷害が、虚血中の心筋細胞内のアデノシン 3 リン酸（以下、ATP）の減少にもとづく ATP の前駆物質、アデノシンやイノシンの枯渇によって増悪することがわかっている。また、申請者の所属教室で開発された、3 種類のヌクレオシドと 2 種類のヌクレオチドからなる核酸成分製剤（以下、OG-6）が短期心筋虚血後の再灌流傷害を抑制することもわかっていたことから、この OG-6 が摘出心の長期保存に有用か否かを検討した。

比較する保存液として、生理食塩水（以下、生食）、標準的保存液（University of Wisconsin solution, 以下 UW）、OG-6、UW+OG-6 の 4 種を用いた。ラットから摘出した心臓をいずれかの保存液を用いて低温（4℃）保存し、12 時間後にランゲンドルフ灌流装置を用いて心機能の測定を行った。また HPLC 法により心筋組織内の ATP などの高エネルギーリン酸塩含量および保存液中のヌクレオシド・ヌクレオチドの変化を定量した。

その結果、心機能の温存効果は、UW+OG-6 の場合が最良で、ついで、UW、OG-6、生食の順であった。心筋組織内の ATP などの高エネルギーリン酸塩含量も同様の結果であった。保存液中のヌクレオシド・ヌクレオチドは、保存中の心筋組織におけるこれらの消費を反映して、すべての成分において減少が認められた。

以上の結果は、従来、標準的保存液として用いられている UW 液に核酸成分製剤を添加することにより、保存中にも、心筋細胞内に ATP の前駆物質であるヌクレオシド・ヌクレオチドが供給され、再灌流時に迅速に ATP 産生が再開され、細胞内 ATP 含量が回復することを示唆している。すなわち、摘出心の保存時間の延長が核酸成分製剤を添加した保存液によって可能になることを示している。

したがって、申請者の論文は、心移植における摘出心の保存時間延長につながる技術の開発に貢献するものと評価され、審査員一同は、本論文を、本学医学博士の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(国籍)	Con Chin Sergio Arturo (コスタリカ)															
学位の種類	博士(医学)															
学位記番号	甲医博第22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18年3月23日															
学位論文題目	<i>H. pylori</i> CagA status associated with gastric cancer incidence rate variability in Costa Rican regions (中南米コスタリカ国内における胃癌発生率の相違とヘリコバクター・ピロリ菌病原因子(CagA)との関連性)															
発表誌名	Journal of Gastroenterology 2006年(in press)															
<table> <tr> <td>審査委員</td> <td>主査</td> <td>教授</td> <td>今井</td> <td>章介</td> </tr> <tr> <td></td> <td>副査</td> <td>教授</td> <td>大拙</td> <td>祐治</td> </tr> <tr> <td></td> <td>副査</td> <td>教授</td> <td>大西</td> <td>三朗</td> </tr> </table>		審査委員	主査	教授	今井	章介		副査	教授	大拙	祐治		副査	教授	大西	三朗
審査委員	主査	教授	今井	章介												
	副査	教授	大拙	祐治												
	副査	教授	大西	三朗												

## 論文の内容の要旨

背景・目的：1983-1997年間の疫学的調査で胃癌高発生国である日本やチリを含む30ヶ国中、コスタリカの胃癌発生・死亡率は男女ともに最も高かった。コスタリカは人口約400万人、面積5.1km<sup>2</sup>の小さな国であるにもかかわらず、胃癌発生率は10万人当たり30-40人から7-15人と大きな地域差を認める。ゆえに、これら背景因子を解明する目的で非胃癌患者を主たる対象に組織学的検査および血清CagA抗体価を測定し、コスタリカ国内における胃癌発生率の高・低地域間での比較解析を実施した。また、得られたピロリ菌臨床分離株(胃癌患者由来も含む)についてはcagA遺伝子保有率を解析した。

方法：消化性潰瘍患者180人を胃癌の高発生率地域(A群：91人)と低発生率地域(B群：89人)の2群に分類し、組織診断は各患者から内視鏡学的に採取した5個(2：前庭部、2：胃体部、1：胃角部)の生検組織にてシドニーシステム分類(炎症の程度、炎症の広がり、萎縮および腸上皮化生)に従い2名の病理医が独立して実施した。さらに、前庭部より採取した3個の生検組織にて、ピロリ菌感染をウレアーゼ試験、グラム染色、HE染色標本の検鏡にて診断し、うち1個はピロリ菌培養に供した。血清CagA抗体価はEIA法で測定しcagA遺伝子は培養に成功した臨床分離株からDNAを抽出後PCR法にて解析した。cagA遺伝子が検出されなかった場合は市販キット(multiple PCR kit)を使用して再確認した。統計学的解析はChi-square test, Fisher exact probability test (STATA SE (version 8) statistical software) および multiple logistic regression analysis (SPSS 13.0 J (SPSS Japan Inc. 2005)) にて行い p < 0.05 を有意差とした。

結果：ピロリ菌感染率はA(73%)、B(63%)群間で差は認めなかった。しかし、血清CagA抗体陽性率はA(79%)、B(54%) (p=0.02)であり胃癌高発生率地域で有意に高値を示した。さらに対象

60歳以下で解析すると、血清 CagA 抗体陽性率は A (81%)、B (49%) ( $p < 0.01$ ) とより差は拡大した。両群間 (全体でも対象 60 歳以下でも) には組織学的所見 (炎症の胃体部進展、萎縮性胃炎、中一高度の好中球浸潤) の出現率は差を認めなかった。一方、血清 CagA 抗体陽性 ( $n=82$ ) と陰性 ( $n=40$ ) 患者間では全ての組織学的所見が陽性患者群で有意差をもって高頻度に認められた ( $p = 0.003$ )。ピロリ菌分離培養に成功して得られた 22 株 (A 群) と 11 株 (B 群) の PCR 解析結果は、22 株中 7 株 (A 群) で *cagA* 遺伝子は検出できなかったが、B 群は全 11 株で *cagA* 遺伝子を検出した。また、胃癌患者 26 人中 24 人が血清 CagA 抗体陽性を示し、うち得られたピロリ菌臨床分離株 8 株全てに *cagA* 遺伝子を検出した。

結論：コスタリカ国内 (胃癌発生率の高い地域群 vs. 低い地域群間) でのピロリ菌感染率には差を認めないが、血清 CagA 抗体陽性率は高い地域群に有意に高く、また血清 CagA 抗体陽性患者は陰性患者よりも有意に組織障害 (炎症の胃体部進展、萎縮性胃炎、中一高度の好中球浸潤) が高度である事より、コスタリカ国内 (胃癌発生率の相違地域間) においてはピロリ菌感染のみでなくピロリ菌有する病原因子 CagA が胃病変の重症化に関与し牽いては胃癌の進展に重要な役割を担っていると考えられた。また、血清 CagA 抗体測定が胃病変 (重症化) から胃癌進展のリスクマーカーとして臨床応用可能であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

1983-1997 年間の疫学調査で、胃癌高発生国である日本やチリを含む 30 ヶ国中、中米コスタリカが胃癌の発生、死亡率において男女ともに最も高かった。コスタリカは小さな国 (面積 5.1 万 km<sup>2</sup>、人口約 400 万人) であるが、国内での胃癌発生率には人口 10 万対最大 40 から 7 と大きな地域差を認める。したがって、その発生率にかかわる因子の解析が国内で比較的实施し易いという利点がある。一方、*Helicobacter pylori* (以下ピロリ菌) が慢性萎縮性胃炎から胃癌発生に関与する重要な感染性因子となっていることは衆知である。

このような背景に基づき、本研究はコスタリカ国内における胃癌発生の背景因子を解明する目的で、同国内の胃癌発生率の高・低地域に居住する非胃癌患者を主な対象として、ピロリ菌感染率、主要なピロリ菌病原遺伝子と目される *cagA* 遺伝子関連事項および組織学的所見の比較検討を行った。

消化性潰瘍患者 180 人を胃癌の高発生率地域 (A 群 : 91 人) と低発生率地域 (B 群 : 89 人) の 2 群に分類した。組織診断は各患者から内視鏡的に採取した 5 個 (2 : 前庭部、2 : 胃体部、1 : 胃角部) の生検組織をもとに、シドニーシステム分類 (炎症の程度、炎症の広がり、萎縮および腸上皮化生) にのっとり 2 名の病理医が独立して実施した。

ピロリ菌感染は、前庭部より別途採取した 3 個の生検組織を用いて、ウレアーゼ試験、グラム染色、HE 染色標本の検鏡、ピロリ菌培養にて診断した。血清 CagA 抗体は EIA 法で測定し、臨床分離菌株の *cagA* 遺伝子の有無は PCR 法にて検索した。*cagA* 遺伝子が検出されなかった場合は multiplex PCR にて *cagA* 遺伝子陰性菌株の感染であることを確認した。

統計学的解析は  $\chi^2$  検定、Fisher exact probability test (STATA SE (version 8) statistical software) および multiple logistic regression analysis (SPSS 13.0 J (SPSS Japan Inc. 2005)) にて行い、 $p < 0.05$  を有意差とした。

結果の要点は以下のようにまとめられる。

- 1) ピロリ菌感染率は A (73%) 群、B (63%) 群間で有意差は認めず、組織学的所見（炎症の胃体部進展、萎縮性胃炎、中～高度の好中球浸潤）の出現率にも有意差を認めなかった。
- 2) しかし、血清 CagA 抗体陽性率は A 群 vs B 群が 79% vs 54% と有意 ( $p = 0.02$ ) に胃癌高発生地域で高く、さらに年齢 60 歳以下に限ると 81% vs 49% ( $p < 0.01$ ) と有意差はより拡大した。
- 3) 一方、血清 CagA 抗体陽性 ( $n = 82$ ) と陰性 ( $n = 40$ ) 患者間では全ての組織学的所見が陽性患者群で有意に高頻度に認められた ( $p = 0.003$ )。
- 4) 分離培養で得られたピロリ菌が A 群 22 株、B 群 11 株あったが、PCR 解析の結果、A 群 22 株中の 7 株で *cagA* 遺伝子が検出されなかった以外はすべて *cagA* 遺伝子を有していた。*cagA* 遺伝子欠失に関しては、ピロリ菌が持続感染する際、感染宿主の免疫排除機構から逃れる菌側の持つ防御反応としてときに認められる、*cagPAI* 遺伝子領域の喪失に関連するものと推定された。
- 5) 別に実施した胃癌患者 26 人中 24 人が血清 CagA 抗体陽性であり、このうち得られたピロリ菌臨床分離株 8 株全てに *cagA* 遺伝子を検出した。

これらの成績から、申請者は、コスタリカ国内での *cagA* 遺伝子陽性ピロリ菌の浸淫状況が胃癌発生率に密接にかかわるリスクファクターのひとつとなっていると結論した。本研究は、血清 CagA 抗体測定が胃病変の重症化から胃癌進展へのリスクマーカーとしての臨床応用の可能性も示すものとして意義がある。申請者は、*vacA* など他のピロリ菌の病原関連遺伝子や、菌に対するサイトカイン反応性など host 側の要因についても検討を続ける意志があり、今後の展開も期待できることから、審査員一同は当論文を高知大学大学院博士（医学）に値するものと評価した。



氏名(本籍)	田口 崇文(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第23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18年3月23日
学位論文題目	Suppressive effects of DHEA and NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide on corticotroph tumor cell growth and function <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ( <i>In vitro</i> 及び <i>in vivo</i> における DHEA と NF- $\kappa$ B 阻害剤 parthenolide の ACTH 産生腫瘍細胞増生及び機能に対する抑制効果の検討)
発表誌名	Journal of Endocrinology 188(2) 2006年2月掲載

審査委員	主査	教授	執印	太郎
	副査	教授	大拙	祐治
	副査	教授	深谷	孝夫

## 論文の内容の要旨

【目的】 Dehydroepiandrosterone (DHEA) は ACTH に反応して副腎皮質から分泌される副腎性アンドロゲンである。DHEA には、心血管保護効果、免疫刺激作用、NF $\kappa$ B 活性の阻害を介した抗酸化作用、抗腫瘍効果などが報告されている。DHEA を含めた NF $\kappa$ B 阻害作用を有す薬剤は、細胞死を誘導しうることから、近年、癌・炎症治療薬として重要な薬剤と考えられている。しかしながら、DHEA の生理学的作用機序は明らかでなく、その内分泌機能に及ぼす影響も明確ではない。我々は有効な薬物療法に乏しいクッシング病や異所性クッシング症候群に対する新たな薬物療法の可能性及び治療戦略を探るべく、マウス下垂体腫瘍細胞株 AtT-20 細胞を用いて、DHEA 及び NF $\kappa$ B 阻害剤 parthenolide (PRT) の腫瘍増生及び proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子転写活性、ACTH・corticosterone 分泌に及ぼす効果を、*in vitro* 及び *in vivo* の系において検討した。

【方法】 *In vitro* において、AtT-20 細胞に rat POMC gene promotor-luciferase fusion gene を安定性に導入した AtT-20PL 細胞を用いて、DHEA、17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)、testosterone (T) 単独及び、DHEA と PRT を同時添加し、24 時間後の POMC 遺伝子転写活性を luciferase assay system で測定、medium 中の ACTH を immunoradiometric assay 法で測定した。また、DHEA 及び PRT 添加時の survivin 遺伝子及び NF $\kappa$ B 遺伝子転写活性を評価した。さらに DHEA 添加時の形態変化と NF $\kappa$ B 細胞内局在を immunocytochemistry で、NF $\kappa$ B binding activity を electrophoretic mobility shift assay で評価した。また MTT assay 及びフローサイ

トメトリーにより DHEA のアポトーシス誘導性を評価した。

In vivo においては、AtT-20 細胞皮下移植 BALB/C ノードマウスを用いて、vehicle、DHEA (8mg/mouse/day) 及び PRT (200µg/mouse/day) を各々単独または同時に 21 日間連日皮下投与後断頭し、腫瘍重量及び Taqman real time RT-PCR 法による腫瘍部及び肝臓での survivin mRNA の発現や血中 corticosterone を評価した。

【結果】In vitro において、DHEA 単独添加は POMC 遺伝子転写活性及び ACTH 分泌を減少させたが、E<sub>2</sub> 及び T は影響を与えなかった。PRT は同様に POMC 遺伝子転写活性を阻害し、DHEA との同時添加において相加的な減弱効果を示した。さらに DHEA、PRT は、NFκB 及び survivin 遺伝子転写活性を減弱させ、PRT との併用により NFκB 遺伝子転写活性に相加的な減弱効果を示した。以上の効果は NFκB binding activity においても同様に認められた。形態的には DHEA 添加により核の濃縮を認め、またフローサイトメトリー及び MTT アッセイでは、DHEA 添加がアポトーシスによると思われる細胞死を誘導することが示唆された。

In vivo においては、DHEA/PRT 併用群のみが他群に比し、断頭時腫瘍重量及び腫瘍部 survivin mRNA 発現の有意な減少を示したが、正常肝組織 survivin mRNA 発現量は、群間で有意差を認めなかった。マウス血中 corticosterone は control 群に比し、DHEA 群及び DHEA/PRT 併用群において有意な減少を認めた。

【結語】 DHEA は、少なくとも一部は転写活性 NFκB の抑制を介して、POMC 遺伝子の発現抑制ならびにアポトーシスの誘導を生じ、parthenolide との併用により腫瘍増殖に対しても抑制的に作用することが示された。これらのアポトーシス誘導療法は、ホルモン産生腫瘍に対する治療戦略の一つになりうる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ACTH 依存性の Cushing 病は下垂体や異所性に発症する腫瘍性の病態であり、治療が困難で生命を脅かす疾患の 1 つである。本論文では申請者らは Cushing 病に対して新たな薬物療法の可能性を探るためにそのモデルとしてマウス ACTH 産生腫瘍細胞株 AtT20/D16V に対して Dehydroepiandrosterone (以下 DHEA) と NFκB 阻害剤 parthenolide (以下 PRT) による proopiomelanocortin (以下 POMC) 遺伝子の転写活性や、ACTH・corticosterone 分泌に及ぼす効果や腫瘍増殖の抑制効果を in vitro および in vivo で検討した。腫瘍増殖抑制については特に NFκB による転写活性とその結果の survivin の発現抑制に注目して検討した。

その結果で以下のことが明らかとなった。

- 1) In vitro での検討結果として ACTH 産生腫瘍細胞株 AtT20/D16V に対して DHEA 添加は NFκB の結合部位を持ち ACTH の前駆体である POMC の遺伝子プロモーターの転写活性を容量依存性および時間依存性に減少させたが、DHEA の代謝産物である Estradiol や Testosterone は影響を与えなかった。

- 2) DHEA 処理は AtT20/D16V に対して培養細胞の形態、MTT assay や flowcytometry による AnnexinV 陽性細胞の所見で apoptosis 様の細胞死の結果を示した。
- 3) PRT は同様に POMC 遺伝子転写活性を阻害し、DHEA との同時添加において相加的に POMC 遺伝子転写活性の減弱効果を示した。
- 4) DHEA と PRT はそれぞれ NFκB 依存性の転写活性及び survivin 遺伝子の転写活性を減弱させ、PRT との併用により NFκB 遺伝子の転写活性に相加的に減弱効果を示した。AtT20/D16V の核抽出物の NFκB の consensus 配列への結合活性においても同様に減弱効果が認められた。
- 5) In vivo の検討結果として AtT20/D16V による nude mice への腫瘍作成実験では DHEA と PRT 併用群のみが他群に比し、断頭時の腫瘍重量と腫瘍部 survivin mRNA 発現の有意な減少を示したが、正常肝組織 survivin mRNA 発現量は、群間で有意差を認めなかった。マウス血中 corticosterone は control 群に比し、DHEA 群及び DHEA と PRT 併用群において有意な減少を認めた。

これらのことから DHEA は、少なくとも一部については転写活性化蛋白 NFκB の抑制を介して、POMC 遺伝子の発現抑制ならびにアポトーシスの誘導を生じた。また、NFκB 阻害剤である PRT との併用により腫瘍増殖に対しても抑制的に作用することが示された。このようなアポトーシス誘導療法は、ホルモン産生腫瘍に対する薬剤による新しい治療戦略の一つになりうる可能性を示した点で本研究は興味深い内容であり、かつ新規の知見を含んだ、優れた結果で学位論文に値すると評価した。

氏名(本籍)	堀野 太郎 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第24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18年3月23日
学位論文題目	Suppressive effects of iron on TGF- $\beta_1$ production by renal proximal tubular epithelial cells (腎近位尿細管細胞からの TGF- $\beta_1$ 産生に対する鉄の抑制効果)
発表誌名	Nephron Experimental Nephrology 100(1):e1-e10 2005年2月

審査委員	主査	教授	田口	博國
	副査	教授	大舘	祐治
	副査	教授	執印	太郎

## 論文の内容の要旨

【背景及び目的】細胞内で産生されたスーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)により過酸化水素( $H_2O_2$ )、さらにカタラーゼによって水( $H_2O$ )となる。スーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )は鉄を触媒とする反応を介して酸素となる。しかし、2価鉄を触媒としたフェントン反応を介して $H_2O_2$ はより組織障害性の高いヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )になる。これらの活性酸素は細胞膜の過酸化、蛋白の変性を惹起し組織障害を引き起こす。鉄は血清や尿に由来するヘモグロビン(Hb)、ミオグロビン、トランスフェリン(Tf)に結合した形態で腎に運ばれ、腎で遊離した鉄は細胞障害性に働くと考えられている。我々は以前、腎生検組織の腎尿細管上皮内の鉄沈着は尿細管間質障害の程度と正相関することを報告した。腎尿細管間質の線維化は慢性腎疾患の進行を示す本質的な組織学的変化と考えられる。TGF- $\beta_1$ は線維化を促すサイトカインであると同時に抗炎症サイトカインとして腎疾患進展に重要な役割を演じていると考えられる。我々は鉄が酸化ストレスを介してヒト腎近位尿細管上皮細胞(RPTEC)からのTGF- $\beta_1$ 産生に影響を与えていると仮定し、培養ヒトRPTECを用いてTGF- $\beta_1$ 発現に対する鉄の直接的効果をmRNAレベル及び蛋白レベルで検討した。【方法】ヒトRPTECをDMEM/F12で培養し、第3～第6継代のものを以下の実験に使用した。添加する鉄としてはクエン酸鉄(0.1mM=620 $\mu$ g/dl、濃度依存性をみるため0.01-1.0mMを使用)、鉄キレート剤としてdesferrioxamine(DFX, 1.0mM)を使用した。鉄のRPTEC内への取り込みをベルリン・ブルー染色で、TGF- $\beta_1$ および8-OHdGの発現はモノクローナル抗体を用いた免疫染色で観察した。培養液中のTGF- $\beta_1$ 濃度をELISA法で、細胞内のTGF- $\beta_1$ mRNA発現をRNase Protection Assay(RPA)にて測定した。鉄負荷後72時間までの経時的な効果と、鉄負荷後24

時間での鉄の濃度依存性効果につき検討した。【結果】ヒト RPTEC においてクエン酸鉄は添加した鉄濃度依存的に細胞内に取り込まれ、DFX はこれを抑制した。TGF- $\beta$ 1 は鉄無添加状態で細胞質に発現を認めたが、クエン酸鉄添加により発現の抑制が認められた。クエン酸鉄と DFX 両者の添加でこの効果は消失した。鉄無添加状態で培養液中 TGF- $\beta$ 1 濃度は 72 時間までの観察中、増加し続けた。クエン酸鉄は負荷 6 時間後以降で TGF- $\beta$ 1 の分泌を抑制する傾向を認め 48 時間以降で有意な抑制を認めた。クエン酸鉄は添加した濃度依存性に TGF- $\beta$ 1 の分泌および mRNA 発現を抑制した。クエン酸鉄は添加は 8-OHdG の発現を増強した。DFX はクエン酸鉄添加による TGF- $\beta$ 1 産生抑制や 8-OHdG の発現増強を解除した。【考察】本研究ではヒト培養 RPTEC は通常状態で TGF- $\beta$ 1 を産生していることと鉄が TGF- $\beta$ 1 産生を抑制すること、また添加する鉄濃度依存性に細胞質内への鉄取り込みは増加し、TGF- $\beta$ 1 発現は mRNA レベルと蛋白レベルで減少することが明らかになった。このことより細胞内鉄濃度の変化が TGF- $\beta$ 1 に対して遺伝子発現レベルで影響を与えていると考えられた。TGF- $\beta$ 1 の線維化促進効果と抗炎症効果は密接して関係していると考えられる。急性炎症期には TGF- $\beta$ 1 の増加が細胞外器質を産生亢進させ組織修復をおこなっているが、炎症の慢性化に伴い組織の線維化促進につながると考えられる。我々の結果から蛋白尿や血尿からの鉄は TGF- $\beta$ 1 産生の減少を介して腎疾患の急性炎症期の組織修復を抑制している可能性が考えられた。TGF- $\beta$ 1 発現に関する鉄の効果は DFX により消去され、鉄キレート剤が急性腎障害を抑制する可能性も示唆された。本研究では酸化ストレスを評価するため、感受性のある酸化ストレスマーカーである 8OHdG の発現も検討したが、鉄はヒト RPTEC での 8OHdG 発現を刺激し、DFX はこの効果を消去することを示した。このことより鉄はヒト RPTEC において酸化ストレスの原因になると考えられる。【結論】鉄はヒト RPTEC において mRNA レベル及び蛋白レベルにて TGF- $\beta$ 1 発現を減少させ、TGF- $\beta$ 1 による腎修復を抑制することを介して腎障害を進展させることが示唆された。鉄キレート剤は炎症性腎疾患、特に尿細管障害の急性期において有効な治療戦略となりうる可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

鉄イオンによる組織障害はヘモクロマトーシスでは糖尿病や肝硬変などの臓器障害をおこすことが知られているが腎障害は発作性夜間血色素尿症での大量のヘモグロビン尿で腎障害が起こることがあり、腎の尿細管上皮細胞への鉄沈着は腎障害をひきおこすと考えられる。申請者らは以前に腎生検組織の腎尿細管上皮細胞への鉄沈着は尿細管間質障害の程度と正相関することを報告しているが、腎尿細管間質の線維化は慢性腎疾患の進行を示す本質的な組織学的変化と考えられる。そこで申請者は鉄が酸化ストレスを介してヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) からの TGF- $\beta$ 1 産生に影響を与えていると仮定して以下の実験を行った。

方法はヒト RPTEC を DMEM/F12 で培養し、第 3～第 6 継代のものを用いて、クエン酸鉄を添加し

て、鉄負荷後72時間までの経時的な効果と、鉄負荷後24時間での鉄の濃度依存性効果につき検討した。鉄のRPTEC内への取り込みはベルリン・ブルー染色で観察した。TGF- $\beta$ 1および8-OHdGの発現はモノクローナル抗体を用いた免疫染色で観察した。培養液中のTGF- $\beta$ 1濃度をELISA法で、細胞内のTGF- $\beta$ 1mRNA発現をRnase Protection Assayにて測定した。鉄キレート剤としてdesferrioxamine (DFX, 1.0mM)を使用し、クエン酸鉄と同時に投与してその影響を観察した。

結果として以下の5点が明らかにされた。

1. ヒトRPTECにおいてクエン酸鉄は添加した鉄濃度依存的に細胞内に取り込まれ、DFXはこれを抑制した。
2. TGF- $\beta$ 1は鉄無添加状態で細胞質に発現を認めたが、クエン酸鉄添加により発現の抑制が認められた。クエン酸鉄とDFX両者の添加でこの効果は消失した。鉄無添加状態で培養液中TGF- $\beta$ 1濃度は72時間まで増加し続けたのに対し、クエン酸鉄添加は負荷6時間後以降でTGF- $\beta$ 1の分泌を抑制する傾向を認め48時間以降で有意な抑制を認めた。
3. クエン酸鉄は添加した濃度依存性にTGF- $\beta$ 1のmRNA発現を抑制した。
4. クエン酸鉄は添加は8-OHdGの発現を増強した。
5. DFXはクエン酸鉄添加によるTGF- $\beta$ 1産生抑制や8-OHdGの発現増強を解除した。

TGF- $\beta$ は組織の繊維化との関連で慢性腎疾患での繊維化促進の面から考えるとその増加は腎障害の促進因子とも考えられるが、一方正常組織の損傷に際しその修復時に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。申請者の研究は鉄イオンの負荷により腎尿細管上皮細胞でのTGF- $\beta$ 1産生抑制がおこることを示したもので、腎尿細管障害の急性期にはTGF- $\beta$ 1の増加が細胞外器質を産生亢進させ組織修復をおこなっているということを示唆する所見を得ている。したがって蛋白尿や血尿時に尿細管上皮で再吸収され沈着した鉄はTGF- $\beta$ 1産生の減少を介して腎疾患の急性炎症期の組織修復を抑制している可能性が考えられた。またこの2価鉄は細胞内で産生されたスーパーオキシドに起因する過酸化水素の触媒として組織障害性の高いヒドロキシラジカルを作り出して腎障害の原因となりうることをクエン酸鉄負荷による8-OHdGの発現をみることによって明らかにした。本論文の考察で引用したRobertsらはTGF- $\beta$ 1がスーパーオキシドの産生を抑制すると述べており、クエン酸鉄の負荷によりスーパーオキシドの産生亢進とTGF- $\beta$ 1産生の減少は腎障害の成因としての鉄イオンの意義を示したものと見えよう。また鉄キレート剤DFXの腎障害早期での使用の有用性も示唆された。

以上のように本研究は鉄負荷によるTGF- $\beta$ 1産生の抑制という新知見を報告し、腎障害の修復におけるTGF- $\beta$ 1の意義を明らかにし腎疾患での鉄キレート剤の使用という新方向を示唆したもので、審査員全員が高知大学博士(医学)に相応しいものであることを認めた。

氏名(国籍)	Marco Jorge Diego (アルゼンティン)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第25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18年3月23日
学位論文題目	Species assignation of <i>Leishmania</i> from human and canine tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in north Argentina (アルゼンチン北部のアメリカ型皮膚リーシュマニア症流行地における原虫感染ヒトおよびイヌ由来株の多座位酵素電気泳動(MLEE)解析)
発表誌名	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72巻(5), 606-611 2005年5月

審査委員	主査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	今井	章介
	副査	教授	小玉	肇

## 論文の内容の要旨

リーシュマニア症は微小な吸血性昆虫であるサシチョウバエによって媒介される典型的な人獣共通原虫性疾患であり、世界保健機関(WHO)が西暦2000年にImproved Control of TDR Diseasesに定めた8大ターゲット疾患の1つである。本症は熱帯や亜熱帯地域で広く流行し世界の公衆衛生学上大きな問題となっている。その感染者は1200万~1500万人で、4大陸88カ国で3億5000万以上の人々が感染の危険にさらされている。リーシュマニア症は、新大陸ではアメリカ合衆国南部のテキサス州からアルゼンチン北部に至る広い地域や国(22カ国)で流行している。また、旧大陸ではインド、アフガニスタン、パキスタンのほか、地中海沿岸諸国やアフリカ大陸の広い地域に分布している。病原虫は*Leishmania*属に属し、ヒトその他の哺乳類では細網内皮系細胞とくにマクロファージ内に寄生して分裂増殖する。ヒトに病原性を持つ*Leishmania*属の原虫は20数種にのぼる。このため、本症患者では宿主と原虫種の組み合わせにより種々の臨床症状を呈するが、大別すると致死的な経過をたどる内臓型のカラアザールのほか、皮膚型、粘膜皮膚型、汎発性皮膚型などがみられる。したがって、各流行地における患者由来原虫を分離・同定して正確な診断を下すことは治療計画や予後予測の上でも重要である。アルゼンチン北部ではヒトやイヌの皮膚リーシュマニア症の症例が報告されているが、その病原虫や伝播の実態については不明な点が多く残されている。アルゼンチン北部流行地の病原虫としてはこれまでに3種が報告されているが、解析手技の問題や解析原虫株数が少ないなどの問題があり信頼性に乏しい。申請者らは、これまでに本調査地域のリーシュマニア原虫感染イヌにおける臨床症状や寄生虫学的・血清学的特長を研究し、イヌはこの流

行地におけるヒト皮膚リーシュマニア症の保虫宿主としてあまり大きな役割を果たしていないものと推定したが、感染犬由来原虫株の分離・解析には至っていない。

本研究はアルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地の患者や感染犬から分離した原虫を多座位酵素電気泳動(MLEE)によって解析し、*Leishmania* 原虫種と患者でみられる臨床症状との関係を検討したものである。また、本研究で観察された原虫の種内多型(変異)と患者の病型との関係や、種内多型とヒト皮膚リーシュマニア症の伝播サイクルにおける保虫宿主としてのイヌの役割・位置づけについても検討した。

得られた結果は以下のように要約される。アルゼンチン国サルタ(Salta)県やコリエンテス(Corrientes)県の皮膚および粘膜皮膚リーシュマニア症患者から分離した16株と原虫感染イヌから分離した1株、計17株をMLEEによって解析した。電気泳動に際してはWHO指定リファレンス株 *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) chagasi* の7株も含めて解析した。また、MLEEでは各酵素についてALAT, ASAT, G6PDH, 6GPDH, GPI, MDH, ME, MPI, NH, PGM, PKの11酵素系によるアイソザイム分析を行った。その結果、患者由来13株のうち9株はKMS-1、4株はKMS-2 ザイモディーム(zymodeme)に分類されたが、これらの株は全て *L. (V.) braziliensis* と同定された。また、皮膚リーシュマニア症患者から分離された2株はKMS-4酵素プロファイルに属し *L. (V.) guyanensis* と同定された。一方、イヌから分離された株は *L. (V.) braziliensis* と同定されたが、その酵素プロファイルはKMS-3に分類され、ヒト分離株のいずれとも一致しなかった。ヒトおよびイヌからの分離株は *L. (V.) braziliensis* に属するが、その酵素プロファイルを異にしたことは、今後、リーシュマニア症の保虫宿主としてのイヌの役割を検討していく上で極めて興味深い知見である。なお、イヌから *Leishmania* 原虫を分離し、培養、そしてMLEE解析に成功した例は、アルゼンチン国のリーシュマニア症流行地においては今回が最初であり、流行地における本症の保虫宿主対策を検討する上で有用な情報を提供した。

以上のように、本論文は1) アルゼンチン北部の皮膚リーシュマニア症流行地における病原虫としては、*L. (V.) braziliensis* が主体であるが *L. (V.) guyanensis* も関与していることを明らかにするとともに、2) ヒトおよびイヌ分離株のMLEE分析結果に基づき、患者の臨床症状と *Leishmania* 原虫の種内多型(変異)との関係、あるいは保虫宿主(イヌ)における種内多型とヒト由来原虫との関係について検討し、MLEEによるこの種の解析の重要性についても指摘した。また、3) 遺伝距離(Jaccard distance)の計算に基づき、アルゼンチン *Leishmania* 原虫株の分子系統樹(phenogram)を作成し、WHOリファレンス株との比較を試みた点も新知見である。なお、これらの情報は新大陸リーシュマニア症の伝播疫学および医学生物学に貢献するところ大である。

## 論文審査の結果の要旨

リーシュマニア症は微小な吸血性昆虫であるサシチョウバエによって媒介される典型的な人獣共通原虫性疾患である。本症は熱帯や亜熱帯地域で広く流行し、世界保健機関(WHO)が定めた8大ターゲット疾患の1つであり、世界の公衆衛生学上大きな問題となっている。病原虫は *Leishmania* 属に属し、本症患者では致死的な経過をたどる内臓型のほ



か、皮膚型、粘膜皮膚型、汎発性皮膚型など宿主と原虫種の組み合わせにより種々の臨床症状を呈する。したがって、各流行地における患者由来原虫を分離・同定して正確な診断を下すことは治療計画や予後予測の上でも重要である。アルゼンチン北部ではヒトやイヌの皮膚リーシュマニア症の症例が報告されているが、その病原虫や伝播の実態については不明な点が多く残されている。申請者らは、アルゼンチン北部のリーシュマニア症流行地の患者や感染犬から分離した原虫を多座位酵素電気泳動 (MLEE) によって解析し、*Leishmania* 原虫種と臨床症状との関係を検討した。また、原虫の種内多型 (変異) と病型との関係や、ヒト皮膚リーシュマニア症の伝播サイクルにおける保虫宿主としてのイヌの役割・位置づけについても検討した。

#### [方法]

アルゼンチン国サルタ (Salta) 県やコリエンテス (Corrientes) 県の皮膚および粘膜皮膚リーシュマニア症患者から分離した 16 株と原虫感染イヌから分離した 1 株、計 17 株を MLEE によって解析した。電気泳動に際しては WHO 指定リファレンス株の 7 株も含めて解析した。また、MLEE では 11 酵素型 (ALAT、ASAT、G6PDH、6GPDH、GPI、MDH、ME、MPI、NH、PGM、PK) によるアイソザイム分析を行った。また、保虫宿主 (イヌ) における種内多型とヒト由来原虫との関係につき MLEE を用いて解析した。

#### [結果]

得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 患者由来 13 株のうち 9 株は KMS-1、4 株は KMS-2 ザイモデーム (zymodeme) に分類されたが、これらの株は全て *L. (V.) braziliensis* と同定された。また、皮膚リーシュマニア症患者から分類された 2 株は KMS-4 酵素プロファイルに属し、*L. (V.) guyanensis* と同定された。この同定結果は、別に実施した DNA-based の分析結果とも矛盾しなかった。
- 2) アルゼンチン国のリーシュマニア症流行地において、初めてイヌから *Leishmania* 原虫を分離し、培養、そして MLEE 解析に成功した。イヌから分離された株は *L. (V.) braziliensis* と同定され、その酵素プロファイルは KMS-3 に分類されたが、ヒト分離株のいずれとも一致しなかった。
- 3) 遺伝距離 (Jaccard distance) の計算に基づきアルゼンチン *Leishmania* 原虫株の分子系統樹 (phenogram) を作成し、WHO リファレンス株と比較した。

申請者らはアルゼンチン北部の皮膚リーシュマニア症流行地における *Leishmania* 原虫の種 (species) および株 (strain) をアイソザイムレベルで決定した。さらに、流行地由来株を用いた抗原により、患者の臨床症状と *Leishmania* 原虫の種内多型 (変異) との関係、および保虫宿主 (イヌ) における種内多型とヒト由来原虫との関係について検討することによ

り、MLEEによる解析の重要性を指摘した。また、流行地由来原虫から作成した抗原とWHO株由来抗原との間では特異性および感受性に大きな差異がみられ、流行地株抗原が極めて優れていることよりリーシュマニア症の免疫診断に際しては、それぞれの流行地(国)由来の原虫株抗原を用いて診断することの必要性を示した。以上、これらの成果は新大陸リーシュマニア症の伝播疫学および医学生物学に貢献するところ大であり、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると評価された。

氏名(国籍)	楊 洋 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第26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18年3月23日
学位論文題目	HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human prostate cancer LNCaP cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in conjunction with blockade of androgen receptor STAT3 and AKT signaling (ヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼ阻害剤はアンドロゲンレセプター、STAT3、AKT シグナルをブロックしてヒト前立腺癌細胞 LNCaP の増殖を抑制しアポトーシスを誘導する)
発表誌名	Cancer Science 96:425-433 2005年7月

審査委員	主査	教授	執印	太郎
	副査	教授	西岡	豊
	副査	教授	麻生	悌二郎

## 論文の内容の要旨

本研究はエイズの治療薬として使用されている Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) プロテアーゼ阻害の一つであるネルフィナビルがヒト前立腺癌細胞由来の LNCaP, DU145, PC3 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する事をそれぞれ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイ、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) アッセイで明らかにした。申請者らはネルフィナビルの前立腺癌細胞増殖抑制効果のメカニズムについて詳細な解析を行った。LNCaP 細胞はアンドロゲンレセプターを発現しており男性ホルモン、テストステロンがその増殖の制御に関わっている。アンドロゲンレセプターのレスポンスエレメントを用いたレポーターアッセイにより、ネルフィナビルがアンドロゲンレセプターシグナルをブロックする事を明らかにした。ウエスタンブロット法でネルフィナビルはこのアンドロゲンレセプターの発現を蛋白質レベルで低下させる事を明らかにした。つまり、ネルフィナビルは LNCaP 細胞においてアンドロゲンレセプターの発現量を低下させそのシグナルをブロックしている事が示唆された。前立腺特異抗原 PSA は前立腺癌の腫瘍マーカーとして広く臨床の場で用いられ、その発現はアンドロゲンレセプターシグナルにより制御されている。予想どおり、ネルフィナビルは LNCaP 細胞において PSA の発現量を低下させた。DU145 細胞や PC-3 細胞はアンドロゲンレセプターを発現しておらずこれらの細胞増殖は男性ホルモンの支配下でない。従って、ネルフィナビルは他の細胞増殖刺激シグナ

ルをブロックしこれらの細胞増殖を阻害したと考えられた。申請者らは DU145, LNCaP 細胞では signal transducers and activators of transcription 3 (STAT 3)シグナルが、PC-3, LNCaP 細胞ではセリン・スレオニンキナーゼ Akt シグナルが活性化していることをそれぞれ、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Akt キナーゼアッセイで明らかにした。そしてネルフィナヴィルはこれらのシグナルを効果的に阻害しうることを見出した。更に申請者らは in vivo 実験でネルフィナヴィルの有効性、安全性について検討を加えた。ヌードマウスの背中下の皮下に LNCaP 細胞( $5 \times 10^6$ )を移植し腫瘍が  $100 \text{ mm}^3$  の大きさに達したらコントロール群( $n=6$ )、治療群( $n=6$ )の二群に無作為に分けた。コントロール群には蒸留水を、治療群にはネルフィナヴィル( $60 \text{ mg/kg}$ )を週に 5 回胃ゾンデで強制内服させた。週に一回腫瘍径、マウスの体重を計測した。三週間の治療後にマウスを犠牲死させ、腫瘍を摘出しその重量を計測、また犠牲死直前に採血を行い血清中の PSA のレベルを測定した。ネルフィナヴィル投与により LNCaP 細胞の腫瘍( $290 \pm 94$  vs  $101 \pm 41 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.05$ )、重量( $102 \pm 63$  vs  $24 \pm 24 \text{ mg}$ ,  $p < 0.01$ )、PSA 値  $5.3 \pm 1.9 \text{ ng/ml}$  vs  $2.2 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$ ,  $p = 0.03$ )ともにコントロール群と比べて優意に低下した。体重減少等の副作用は認められなかった。

以上より、ネルフィナヴィルは前立腺癌の治療に有用と思われる。またそれ以外でも、STAT 3 や Akt シグナルが活性化している癌においてもその有用性が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究はエイズの治療薬として使用されている Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) プロテアーゼ阻害剤 (PI) の一つであるネルフィナヴィル (以下 NFV) がヒト前立腺癌細胞株の LNCaP、DU145、PC-3 細胞の増殖を抑制することを示し、その増殖抑制効果のメカニズムについて in vitro 及び in vivo で解析を行ったという内容である。

LNCaP 細胞は男性ホルモン依存性癌でアンドロゲンレセプターを発現しており男性ホルモン、テストステロンが増殖の制御に関わっている。まず、申請者らは NFV が他の PI に比べて有意に LNCaP、DU145、PC-3 細胞の増殖を抑制し LNCaP 細胞のアポトーシスを誘導する事を MTT アッセイ、TUNEL 法で明らかにした。また LNCaP において、種々の cell cycle 関連蛋白のうち p27 を著明に誘導すること、p21 を軽度に誘導すること、p53 の発現には特に影響を与えないことを明らかにした。

前立腺特異的抗原 PSA は前立腺癌の腫瘍マーカーとして広く臨床の場で用いられ、その発現はアンドロゲンレセプターシグナルにより制御されている。予想通り、NFV は LNCaP 細胞において PSA の発現量を低下させた。さらにウエスタンブロット法で長期間の NFV の存在下でデヒドロテストステロンによる細胞核内のアンドロゲンレセプター (以下 AR) の発現を蛋白質レベルで低下させる事を明らかにした。しかし、AR の細胞核内への移行はそれほど低下

させないことを明らかにした。さらにアンドロゲンレセプターのレスポンスエレメントを用いたレポーターアッセイにより、NFVがアンドロゲンレセプターシグナルをブロックする事を明らかにした。つまり、NFVはLNCaP細胞においてアンドロゲンレセプターの発現量を低下させ、さらにそのシグナルをブロックしている事が示唆された。

ヒト前立腺癌では signal transducers and activators of transcription 3 (STAT 3) シグナルや PI3kinase-Akt (PKB) 経路が男性ホルモン非依存性の増殖に coactivator として関与しているといわれている。男性ホルモン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 細胞や PC-3 細胞はアンドロゲンレセプターを発現しておらずこれらの細胞増殖は男性ホルモンの支配下でない。従って、NFVは他の細胞増殖刺激シグナルをブロックしこれらの細胞増殖を阻害したと考えられる。申請者らは DU145、LNCaP 細胞では signal transducers and activators of transcription 3 (STAT 3) シグナルが、LNCaP、PC-3 細胞ではセリン・スレオニンキナーゼ Akt シグナルが活性化していることをそれぞれ、enzyme-linked immunosolvent assay (ELISA)、Akt キナーゼアッセイで明らかにした。そして NFV はこれらのシグナルを効果的に阻害していることを明らかにした。

in vivo 実験で申請者らはさらに NFV の有効性、安全性について検討を加えた。ヌードマウスの背中の皮下に LNCaP 細胞 ( $5 \times 10^6$ ) を移植し腫瘍が  $100 \text{ mm}^3$  の大きさに達したらコントロール群 (n=6)、治療群 (n=6) の二群に無作為に分けた。コントロール群には蒸留水を、治療群には NFV (60 mg/kg) を週に 5 回胃ゾンデで強制内服させた。週に一回腫瘍径、マウスの体重を計測した。3 週間の治療後にマウスを解剖し、腫瘍を摘出してその重量を計測し、また解剖直前に採血を行い血清中の PSA のレベルを測定した。その結果、NFV 投与により LNCaP 細胞の腫瘍体積、重量、PSA 値ともにコントロール群と比べて有意に低下していた。体重減少や主要臓器の副作用は認められなかった。

以上の結果より申請者らは NFV 投与が前立腺癌のホルモン依存性前立腺癌のみならず STAT 3 や PI3kinase-Akt シグナルが活性化しているとされるホルモン非依存性癌の治療に有効と考えられると結論した。今後その有用性が期待される。

氏名(本籍)	横田 淳子(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第27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18年3月23日
学位論文題目	Scavenging of reactive oxygen species by <i>Eriobrotrya japonica</i> seed extract (枇杷種子由来エキスの活性酸素消去作用—各種ラジカル消去及び脂質過酸化抑制能—)
発表誌名	Biological & Pharmaceutical Bulletin 29(3) 2006年3月(予定)

審査委員	主査	教授	本家	孝一
	副査	教授	橋本	浩三
	副査	教授	山本	哲也

## 論文の内容の要旨

【緒言】近年、疾病と酸化ストレスとの因果関係について解明が進み、生活習慣病はもとより各種難治性疾患の発症及び進展、さらには老化の過程において、「酸化」が大きく関与していることが明らかとなった。これら疾病の予防・治療には、抗酸化物質の摂取が有用とされ、種々の検討が行われている。このような背景から、我々は枇杷種子由来エキスを用いて種々の検討を行い、枇杷種子由来エキスが強い抗酸化作用を有することを発見した。また、その抗酸化作用は $\cdot\text{OH}$ ラジカル及び $\text{O}_2$ ラジカルにも作用することを明らかにした。

今回、枇杷種子由来エキスの持つ抗酸化作用に及ぼす含有成分の影響を明らかにするため、枇杷種子由来エキスを極性の異なる溶媒で抽出し、得られた各溶媒分画の抗酸化作用を検討した。また、各溶媒分画を用いて含有成分の同定を行うとともに、それら含有成分の抗酸化作用を検討した。得られた各溶媒分画及び含有成分の抗酸化活性についてはラジカル消去活性(DPPH,  $\text{O}_2$ ラジカル)及び脂質過酸化抑制能を指標とした。その結果をもとに、枇杷種子由来エキスの酸化ストレス抑制メカニズムについても併せて検討を行った。

【方法】枇杷種子由来エキスの調製は、枇杷の種子1kgを粉碎後、70% Ethanol 2Lに1週間浸漬し上清を分取、エバポレーターにて濃縮を行った。得られたエキスを各種溶媒〔Hexane(Hex)、Ethyl Acetate(EtOAc)、

n-Butanol(n-BuOH)、Methanol(MeOH)及び Water(H<sub>2</sub>O) ] で分画し、各種溶媒分画を得た。枇杷種子由来エキス及び各種溶媒分画について抗酸化活性の測定及び成分分析を行った。抗酸化活性は、ラジカル消去能と脂質過酸化抑制能にて評価した。ラジカル消去能は、DPPH 及び O<sub>2</sub>-ラジカル消去活性を ESR 法により測定した。また、脂質過酸化抑制能は、ラット肝ミクロソームを用いた対照として抗酸化ビタミンである L-ascorbic acid や DL- $\alpha$ -tocopherol を用いた。成分分析は、Polyphenol 含有量の測定及び含有成分の構造決定、アミノ酸分析により行った。Polyphenol 含有量は、Folin-Denis 法を用いて測定し、(+)-Catechin 相当量として求めた。Polyphenol の構造決定は、Diaion HP20 等のイオン交換樹脂、Sephadex LH20・G50 等の分子ふるいカラム及び HPLC 法により成分を単離・精製し、NMR 法等の機器分析により行った。アミノ酸分析は、HITACHI L-8500A 型日立高速アミノ酸分析計を用いて行った。また、含有成分について、ラジカル消去能及び脂質過酸化抑制能を枇杷種子由来エキスと同様の方法にて測定した。

【結果・考察】枇杷種子由来エキスの DPPH 及び O<sub>2</sub>-ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub> 値) は、L-ascorbic acid 及び DL- $\alpha$ -tocopherol に比べ低値を示し、強い抗酸化作用が認められた。各種溶媒分画のラジカル消去活性は抽出溶媒により異なり、極性の高い MeOH 及び H<sub>2</sub>O 分画の IC<sub>50</sub> 値は低値を示した。また、枇杷種子由来エキスの脂質過酸化抑制能 (IC<sub>50</sub> 値) は、L-ascorbic acid 及び DL- $\alpha$ -tocopherol に比べ低値を示し、強い抗酸化作用が認められた。各種溶媒分画の脂質過酸化抑制能は抽出溶媒により異なり、極性の高い H<sub>2</sub>O 分画、極性の低い Hex 及び EtOAc 分画の IC<sub>50</sub> 値は低値を示し、このことより、これらの分画に活性成分の存在が示唆された。一方、Polyphenol 含有量は、各種溶媒分画により異なり、極性の高い H<sub>2</sub>O 分画において最も高値を示した。H<sub>2</sub>O 分画を単離、精製を行い、得られた物質について構造決定を行った結果、Caffeic acid 及び Chrologenic acid を同定した。また、アミノ酸分析では、H<sub>2</sub>O 分画において、8 種の必須アミノ酸及び 7 種の非必須アミノ酸を同定した。含有成分の DPPH 及び O<sub>2</sub>-ラジカル消去活性は、Caffeic acid 及び Chrologenic acid において、強い活性が認められた。また、脂質過酸化抑制能が強い Hex 分画及び EtOAc 分画においては、既報にある  $\beta$ -sitosterol が含有されており、強い脂質過酸化抑制能が認められた。一方、多種含有されていたアミノ酸は、いずれも、ラジカル消去活性及び脂質過酸化抑制能は弱いものであっ

た。

これらのことより、枇杷種子由来エキスの抗酸化作用発現には、ラジカル消去作用を有する Polyphenol 類の Caffeic acid、Chrologenic acid 及びプリベンティブな作用として各種細胞等からの活性酸素種の過剰な生成機構に抑制的に関与する  $\beta$ -sitosterol 等の化合物が、大きく関与するものと考察した。一方、枇杷種子由来エキスに多種含有されるアミノ酸の抗酸化作用は弱いことより、アミノ酸が抗酸化作用を有するのではなく、生体内に吸収されることによって抗酸化酵素活性を増強し、生体調節機能に影響すると推察されるが、詳細については今後の検討課題である。

以上、枇杷種子由来エキスは、含有する多数の成分が相加・相乗的に関与する強い抗酸化作用を有し、現在までに有用性が認められている疾患以外にも、様々な疾患に対する予防・治療に有用であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景および目的】

近年、生活習慣病や各種難治性疾患の病態、あるいは老化に酸化ストレスが関与することが知られ、これらの予防・治療に抗酸化物質が有用であることが示されている。著者の研究室では、枇杷種子エキスが強い抗酸化作用を有することを見出し、その抗酸化作用はヒドロキシラジカル及びスーパーオキシドアニオンラジカルに作用することを明らかにしてきた。そこで、著者は、枇杷種子エキス内の抗酸化活性成分を明らかにし、枇杷種子エキスの酸化ストレス抑制メカニズムを解明することを目的とした。

### 【方法】

枇杷の種子 1 kg を粉碎後、70%エタノール 2 L に 1 週間浸漬し、上清を濃縮して枇杷種子エキスとした。得られたエキスを、極性の低い溶媒から順に、ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール、メタノール、水で分画した。得られた各画分について抗酸化活性の測定を行った。抗酸化活性は、ラジカル消去能と脂質過酸化抑制能にて評価した。ラジカル消去能は、ジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) あるいはキサンチン・キサンチンオキシダーゼにより産生させたスーパーオキシドラジカルの消失度を電子スピン共鳴法により測定した。脂質過酸化抑制能は、ラット肝ミクロソームのペルフェリルイオン依存性脂質過酸化反応によって生じる二次産物のマロンジアルデヒドをチオバルビツール酸法で定量することにより評価した。成分分析としては、ポリフェノール含有量の測定、ポリフェノール成分の構造決定、アミノ酸分析を行った。ポリフェノール含有量は Folin-Denis 法を用いて測定した。ポリフェノール成分は、イオン交換クロマト、ゲルろ過、HPLC を用いて



単離精製した後、核磁気共鳴法と逆相 HPLC を用いて構造決定した。アミノ酸分析は、アミノ酸分析計 (HITACHI L-8500A 型) を用いて行った。含有成分についても、ラジカル消去能及び脂質過酸化抑制能を上記と同様の方法でアッセイした。

#### 【結果・考察】

重量濃度で比較した場合、枇杷種子エキスの DPPH 及びスーパーオキシドラジカル消去活性は、L-アスコルビン酸や DL- $\alpha$ -トコフェロールよりも強かった。各種溶媒分画のラジカル消去活性は、極性溶媒のメタノールや水で分画したものが強い活性を示した。一方、枇杷種子エキスの脂質過酸化抑制能は、DL- $\alpha$ -トコフェロールとほぼ同程度の活性を示した。各種溶媒分画の脂質過酸化抑制能は溶媒間であまり差異がなく、ヘキサン画分にも強い活性がみられた。

枇杷種子エキスのポリフェノール含有量は、0.54%であった。各種溶媒分画のポリフェノール含有量は、溶媒の極性に相関し、水画分で 0.56%と最も高く、ヘキサン画分には 0%であった。水画分からポリフェノールを単離精製して構造決定を行った結果、カフェ酸とクロロゲン酸を同定した。両者は、強いラジカル消去能と脂質過酸化抑制能を有していた。ヘキサン画分が有する脂質過酸化抑制能の一部は、同画分に含まれる  $\beta$ -シトステロールの脂質過酸化抑制能で説明可能であった。一方、水画分には、7種の必須アミノ酸及び8種の非必須アミノ酸が含まれていたが、これらアミノ酸のラジカル消去活性及び脂質過酸化抑制能は弱かった。アミノ酸は、生体内に吸収されることによって間接的に抗酸化酵素活性を増強するのかもしれない。

以上の知見より、枇杷種子エキスの抗酸化作用発現には、ラジカル消去能と脂質過酸化抑制能の両方を有するポリフェノール類、および脂質過酸化抑制能を有する  $\beta$ -シトステロールが寄与していると考えられた。しかし、ポリフェノールだけでは枇杷種子エキスのもつ強いラジカル消去能を説明できず、未同定の成分を含めて多種の成分が相加・相乗的に働いて強い抗酸化作用を発揮すると考えられる。

本論文は、枇杷種子由来エキスの抗酸化作用機序の一端を明らかにし、酸化ストレスが関与する様々な疾患に対する予防・治療法開発のための足がかりを与えた。よって、本論文は本学の学位に値すると判断した。

氏名(本籍)	宮野 伊知郎(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第28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18年3月31日
学位論文題目	Quantitative analysis of carotid atherosclerotic lesions and high-sensitivity C-reactive protein in community-dwelling elderly 80 years or older (地域在住高齢者(80歳以上)における頸動脈・動脈硬化性病変の定量的評価: 高感度C-reactive proteinとの対比検討)
発表誌名	Geriatrics and Gerontology International vol.6 Issue3 2006年9月(予定)

審査委員	主査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	橋本	浩三

## 論文の内容の要旨

【背景】動脈硬化は、高血圧、糖尿病、高脂血症などの危険因子との関連において論じられ、各種危険因子と動脈硬化の重症度や心血管事故発症との関連について多くの報告がある。近年、従来の危険因子に加えて、高感度CRP(hs-CRP)、サイトカインなどの炎症マーカーと心血管疾患発症に関する検討がなされ、動脈硬化成立の過程で慢性炎症の果たす役割の重要性が、ほぼ確立されたと言える。

動脈硬化性病変診断には、冠動脈造影、脳血管造影などが用いられるが、侵襲度が高く、MRI、CTなどの低侵襲で良好な画像の得られる検査法も、大規模設備が必要で、広く普及するには至っていない。これらに対し近年、頸動脈エコー法の進歩により、動脈硬化性病変の非侵襲的観察が可能になり広く普及しつつある。報告によれば、頸動脈エコーでの病変の重症度は、血圧、血清脂質、血糖値、喫煙などの危険因子および、合併する心血管疾患とも関連することが明らかとなっている。

一方、動脈硬化性病変と各種危険因子との関連を論ずる上で考慮すべき重要な要因に『年齢』がある。ただ、多くの報告での検討対象は、前期高齢者(65~74歳)までの年齢層であり、特に80歳以上に関する報告は少ない。また、過去の報告は医療施設受診者を中心とする疾患群を対象としたものが主であり、日常生活活動度(ADL)が自立した地域在住高齢者での検討はほとんどない。

今回我々は地域在住高齢者を中心に、頸動脈の動脈硬化性病変を、従来の評価法より精度の高い、超音波画像自動計測システムを用いて定量的に評価した。

その結果と各種危険因子とを対比検討し、特に最近注目されている hs-CRP と動脈硬化性病変との関連について、80 歳以上の高齢者での意義を検討した。

【方法】対象は 2003、2004 年の高知県香北町の高齢者健診受診者 179 名（平均年齢  $78 \pm 6$  歳、男性 69 名、女性 110 名）。全員に内容を説明のうえ書面にて同意を得た。

検査は、座位随時血圧、body mass index (BMI)、血糖値、ヘモグロビン A1c、血清脂質などの一般的項目に加え、hs-CRP を測定した。また、高血圧、糖尿病、高脂血症の既往ならび喫煙習慣の聞き取り調査も行った。ただし hs-CRP に影響する急性炎症性疾患、自己免疫性疾患、悪性腫瘍、不安定な心血管疾患を有する対象や、一般に hs-CRP 高値の原因として、心血管系以外の疾患を考慮する必要があるとされる hs-CRP  $1.0\text{mg/dl}$  以上の例も除外した。

頸動脈エコー（機種 TOSHIBA Nemio）は、11-MHz のプローベを用い、B-mode 法で両側総頸動脈を観察した。得られた画像を自動計測ソフト（Intima Scope, Media Cross 社）で解析し、内膜中膜複合体最大値（max IMT）を計測した。測定部位は総頸動脈分岐部より近位 2cm の範囲の総頸動脈後壁で、プラークを含む最大肥厚部位を max IMT とした。

【結果】対象を 65-79 歳の young-old 群（113 名、 $74 \pm 3$  歳）、80 歳以上の old-old 群（66 名、 $84 \pm 3$  歳）の 2 群に分け比較すると、両群間で hs-CRP に有意差は認めなかったが、max IMT の平均値は有意に old-old 群で高値であった（ $p=0.016$ ）。

また young-old 群、old-old 群各々を、max IMT 値により、正常群（ $<1.1$  mm）、軽度肥厚群（ $1.1-2.2$  mm）、中等度以上肥厚群（ $\geq 2.3$  mm）の subgroup 3 群に分類し、3 群間の検査データを比較した。Young-old 群では中等度以上肥厚群の hs-CRP が他の 2 群より有意に高値であったが（ $p < 0.05$ ）、他の危険因子について差はなかった。一方 old-old 群では、hs-CRP は 3 群間に有意差は認めず、Hb-A1c 値が軽度および中等度以上肥厚群において、正常群より高値であった（ $p < 0.01$ ）。

多重ロジスティック回帰による検討でも、young-old 群で hs-CRP は中等度以上肥厚群と強い関連（ $p=0.022$ ）があったが、old-old 群では有意な関連性を認めなかった。また、old-old 群においてのみ、糖尿病の有無と中等度以上肥厚とが有意な関連を認めた（ $p=0.047$ ）。

【考察】hs-CRP と心血管事故発症や死亡との関連が報告されているが、80 歳以上での検討はほとんどない。今回の我々の検討では、80 歳以上では 79 歳以下とは異なり、max IMT の中等度以上の肥厚と hs-CRP 間に有意の関連性を認めず、動脈硬化の予測因子とはならなかった。

現時点ではこの結果を説明する明確なデータはない。しかしながら推定される理由として、今回の検討が、重篤な心血管疾患の既往がなく、また危険因子の比較的少ない自立した、一般の地域在住の高齢者を対象としたものであることが挙げられる。CRP は血管炎症のマーカーである一方、各種の危険因子との直接的な関連によって上昇するとの報告もある。したがって今回のように全体に心血管系の危険因子の少ない一般の高齢者健診では、血管病変の予測因子としての hs-CRP の意義が薄れる可能性も考えられる。その一方で、加齢そのものや、合併する心血管疾患以外の疾病が、CRP のレベルと関連するとの報告もあるが、80 歳以上の高齢者では十分な検討はなされていない。

我々の検討では、80歳以上は79歳以下と比較して、hs-CRPは同等であるにもかかわらずmax IMTはより肥厚していた。このことより80歳以上の年齢層では、動脈硬化の進展には、より若い年齢層とは異なった独自の因子が関与する可能性も考えられる。今回の検討で、80歳以上においてのみmax IMTの肥厚と関連したHb-A1cの軽度高値も、独自の因子の一つである可能性が考えられる。高齢者での軽度の耐糖能異常が動脈硬化に及ぼす影響について検討が必要である。

今回の研究のもう一つの特徴として、超音波画像の定量的評価がある。頸動脈エコーは、動脈硬化性病変の重症度評価に有用であるが、従来のmax IMTの計測方法は、計測ポイントが少なく、最肥厚部位を視覚的に判断するなど精度に問題があった。今回我々は、近年その高い精度による有用性が報告されているIMT自動計測法を導入し、高分解能エコーによるデジタル画像からmax IMTを計測した。このソフトは、2cmの範囲で60か所のIMTを自動計測でき、その最大値をmax IMTとして同定するため、従来の測定法に比べ高い精度でmax IMT計測が可能となった。

【結語】動脈硬化関連因子（hs-CRPおよび従来の危険因子）のもつ意義は、各年齢層によって異なることが示唆された。特に今回、ADLの自立した地域在住の80歳以上の高齢者では、健診における動脈硬化性病変のマーカーとしてのhs-CRPの有用性が低下することが示唆された。今後は、80歳以上における頸動脈病変の進行と関連因子について、より多くの対象による縦断的検討が必要と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

〔背景〕従来の動脈硬化に対する危険因子に加えて高感度CRP（hs-CRP）などの炎症マーカーと心血管疾患発症との関連が検討され、動脈硬化成立の過程で慢性炎症の果たす役割の重要性が報告されている。動脈硬化性病変の最終診断は血管造影が臨床上用いられるが、侵襲度が高い。これに対し、頸動脈エコー法は動脈硬化性病変を非侵襲的に評価することが可能で、頸動脈エコーでの病変の重症度は各種危険因子および脳・心血管疾患の発症とも関連することが明らかとなっている。一方、動脈硬化性病変の重要な関連因子に「年齢」があるが、多くの報告での対象は医療施設受診者を中心とする疾患群で前期高齢者（65歳～74歳）までの年齢層であり、後期高齢者（80歳以上）で日常生活活動度（ADL）が自立した地域在住高齢者での検討はほとんどない。

今回、申請者らは超音波画像自動計測システムを用い地域在住高齢者に対し頸動脈の動脈硬化性病変を定量的に評価し、各種危険因子の動脈硬化性病変に対する意義を検討した。

[方法] 対象は2003年と2004年に高知県香北町の高齢者検診受診者179名(平均年齢78±6歳、男性69名、女性110名)で、65~79歳のyoung-old群113名(74±3歳)と80歳以上のold-old群66名(84±3歳)の2群に分けた。B-mode頸動脈エコー法で総頸動脈分岐部より近位2cmの範囲を測定し、プラークを含む最大肥厚部位を内膜中膜複合体最大値(max IMT)とした。得られた画像を自動計測ソフト(Intima Scope、Media Cross社)で解析し、max IMT値により正常群(<1.1mm)、軽度肥厚群(1.1-2.2mm)、中等度以上肥厚群(≥2.3mm)の3群に分類した。

[結果] 得られた結果は以下のように要約される。

- 1) hs-CRPはyoung-old群とold-old群間に有意差は認めなかったが、max IMTはold-old群でyoung-old群に比し有意に高値であった(p=0.016)。
- 2) hs-CRPはyoung-old群では中等度以上肥厚群で他の2群に比し有意な高値(p<0.05)を示したが、old-old群では3群間のhs-CRPに有意差は認めなかった。
- 3) old-old群ではHb-A1c値が軽度および中等度以上肥厚群において、正常群より高値であった(p<0.01)。
- 4) 多重ロジスティック回帰分析では、young-old群で中等度以上肥厚とhs-CRPとは関連(p=0.022)を認めたが、old-old群では両者に有意な関連を認めなかった。一方、old-old群では中等度以上肥厚と糖尿病とに有意な関連を認めた(p=0.047)。

申請者らは、重篤な心血管疾患の既往がなく危険因子の比較的少ない自立した地域在住の高齢者を対象に、頸動脈の動脈硬化性病変の重症度を評価し、80歳以上は79歳以下と比較してmax IMTはより肥厚しているに関わらず、hs-CRPは同等であることを報告した。このことにより、動脈硬化関連マーカーの持つ意義は前期高齢者と後期高齢者では異なり、80歳以上の後期高齢者では動脈硬化性病変のマーカーとしてのhs-CRPの有用性が低下することが示唆された。今後、80歳以上における動脈硬化関連因子の臨床的意義はより多くの対象による縦断的検討が必要と考えられるが、申請者らは我が国において初めて80歳以上の地域在住高齢者における動脈硬化性病変マーカーの意義について検討し、その成果は今後の地域在住高齢者の生活習慣指導や健診のあり方について貢献するところ大であり、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると評価された。

氏名(本籍)	政平 訓貴 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第29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18年3月31日
学位論文題目	Olig2-positive progenitors in the embryonic spinal cord give rise not only to motoneurons and oligodendrocytes, but also to a subset of astrocytes and ependymal cells (胎仔期脊髄 Olig2 陽性前駆細胞は運動ニューロンとオリゴデンドロサイトのみならずアストロサイトや上衣細胞も産生する)
発表誌名	Developmental Biology 2006年(in Press)

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	土居	義典
	副査	教授	谷	俊一

### 論文の内容の要旨

胎仔期脊髄では、運動ニューロン (MN) とオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OLP) は神経管腹側の pMN ドメインという限局した部位から連続的に生じる。Olig1/2 は発生初期に pMN ドメイン特異的に発現する basic helix-loop-helix 型転写因子である。Olig2 は、強制発現により MN と OLP の発生が誘導すること、ノックアウトマウスの脊髄で MN と OLP が消失することから、両者の発生に必須の遺伝子と考えられる。また、Olig2-GFP マウス、Olig1-Cre マウスを用いた細胞系譜解析により、Olig1/2 陽性 pMN ドメインからは MN と OLP が産生されるがアストロサイト (AS) などは生じないことが示唆され、MN と OLP は共通の前駆細胞から生み出されるというモデルが提唱された。しかし、いずれの細胞標識システムも問題点があり、他の細胞種が生じる可能性は否定できない。そこでタモキシフェン (TM) 依存性遺伝子組み換え酵素である CreER を用いて、時期特異的に Olig2 陽性細胞のみを持続的に標識することで、より厳密な細胞系譜解析を試みた。その結果、Olig2 陽性細胞からは MN と OLP のみならず一部の AS や上衣細胞 (Ep) もが生み出されることを直接的に証明した。

【方法】

Olig2 の発現は胎生 9 日 (E9) から E11 までは pMN ドメインに限局している。Olig2 陽性 pMN ドメインの細胞系譜解析を正確に行うためには、Olig2 の発現が pMN ドメインに限局している時期のみで Olig2 陽性細胞を標識する必要がある。そこで、Olig2 遺伝子座に TM 依存性 Cre リコンビナーゼ (CreER) をノックインしたマウスと、Cre による

組み換えによってレポーター遺伝子(LacZ または EGFP)を発現するレポーターマウスから、ダブルトランスジェニックマウス(Olig2-CreER<sup>TMKI</sup>/CAT-Z or Olig2-CreER<sup>TMKI</sup>/ZEG)を作成した。このマウスでは TM 投与時に Olig2 陽性細胞で遺伝子組み換えが起こり、レポーター遺伝子が発現する。レポーター遺伝子発現は組み換えをおこした細胞から派生した細胞にも受け継がれる。これを野生型マウスと交配させ、任意の時期に 4-ヒドロキシタモキシフェンを母体に腹腔内投与し、一定期間の後、胎子を回収してダブルトランスジェニックマウスの脊髄におけるレポーター遺伝子の発現パターンを調べ、細胞種特異的マーカーとの二重染色や電子顕微鏡下での形態観察により、Olig2 陽性 pMN ドメインからどのような細胞が生まれるのかを特定した。

#### 【結果】

Olig2-CreER<sup>TMKI</sup>/CAT-Z において E9.5 で TM 投与し E11.5 で解析すると、pMN ドメインおよび MN が存在する脊髄前角に標識細胞が存在し、脊髄前角の細胞は MN のマーカーである Isl1 陽性であった。脊髄前角の MN は既に Olig2 陰性であった。つまりレポーター遺伝子発現は、その後の Olig2 発現の有無に関係なく維持されることが確認された。さらに Olig2 陰性の MN が Olig2 陽性 pMN ドメインから生まれることが初めて直接的に証明した。E14.5 での解析では標識細胞は pMN ドメイン、脊髄前角、中間層に認められ、MN と OLP に分化していることがわかった。さらに E18.5 ではそれらに加えて軟膜直下や中心管周囲にも標識細胞が認められ、前者は AS マーカーである GFAP 陽性であった。さらに、我々の考案した方法\*を用いて電子顕微鏡下で標識細胞の形態を観察したところ、中心管周囲の標識細胞は Ep に、軟膜下の標識細胞は AS に特徴的な構造を持つことを確認した。別のレポーターマウス (Olig2-CreER<sup>TMKI</sup>/ZEG) を用いた解析でも同様の結果が得られた。最後に pMN ドメインの Olig2 陽性細胞が、均一な集団であるか、それともヘテロな集団であるかを調べる為に、pMN ドメインにおける Olig2 発現と、ラジアルグリアマーカーの RC2、MN マーカーの Hb9、Ngn2 の発現とを比較した。E11.5 の pMN ドメインには、RC2 陽性の Olig2 陽性ラジアルグリアと RC2 陰性の Olig2 陽性細胞が混在していた。また E10.5 の pMN ドメインには、MN マーカー陽性の MN にコミットした Olig2 陽性細胞と、陰性の MN にコミットしていない Olig2 陽性細胞が混在していた。つまり、pMN ドメイン内の Olig2 陽性細胞は、形態、分化段階ともにヘテロな集団である事が示された。

#### 【考察】

これまで Olig2 ノックアウトマウスの解析や Olig2-GFP, Olig1-Cre マウスを用いた細胞系譜解析から MN と OLP は共通の前駆細胞から生まれるというモデルが支配的であった。しかし今回の解析結果から pMN ドメイン内の Olig2 陽性細胞は MN と OLP 以外に AS や Ep も産生することが示された。つまり、pMN ドメイン内の細胞構成は、従来考えられていたよりも複雑であり、MN などの特定の細胞種にコミットした前駆細胞を始め、MN、OPC、AS、あるいは Ep を生み出す、Olig2 陽性の多能性細胞を含む可能性も残されていると考えられる。

\*Masahira, N., Ding, L., Takebayashi, H., Shimizu, K., Ikenaka, K., Ono, K. 2005. Improved preservation of X-gal reaction product for electron microscopy using hydroxypropyl methacrylate. *Neurosci Lett* 374, 17-20.

## 論文審査の結果の要旨

最近の医学・生物学の発展、とりわけ細胞の発生・分化の分野における展開は目覚ましいものがあり、近い将来、その応用としての再生医療が現実のものとなると予測される。中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどの細胞は、共通の神経幹細胞に由来し、発生過程や部位に応じてそれぞれの細胞系譜をたどっていくということが分かってきた。

胎仔期脊髄において運動ニューロン (MN) とオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OLP) は、脊髄腹側の pMN ドメインという限局した部位から生み出される。発生初期に pMN ドメインに特異的に発現する basic helix-loop-helix 型転写因子である Olig2 が同定されている。Olig2 は、機能発現実験および機能喪失実験により、運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生に必須の分子であることが示されている。

中枢神経系の発生・分化過程を明らかにするためには、細胞系譜解析をどのように行うかが重要な鍵となる。Olig2-GFP マウス、Olig1-Cre マウスを用いた細胞系譜解析により、Olig1/2 陽性 pMN ドメインからは MN と OLP が生じ、アストロサイト (AS) は生じないとの知見が報じられている。この知見は、MN と OLP は共通の前駆細胞から生み出され、MN、OLP、AS の 3 者を生み出す前駆細胞はないということを示唆している。しかしながら、Olig2-GFP マウスでは、GFP の発現は Olig2 の発現に依存するため、Olig2 が発現しなくなると細胞系譜の追跡が難しくなるという問題があった。また、Olig1-Cre マウスでは、Olig2 よりも発現が弱いとか、発現が pMN ドメインに限局しないなどの問題があった。Olig2 陽性 pMN ドメインの細胞系譜解析を正確に行うためには、Olig2 の発現が pMN ドメインに限局している時期のみに Olig2 陽性細胞を標識する必要がある。

そこで申請者は、Olig2 遺伝子座にタモキシフェン (TM) 依存性 Cre リコンビナーゼ (CreER<sup>TM</sup>) を挿入したマウスと、loxP 配列における組み換えによるマーカー遺伝子 (lacZ または EGFP) を発現するレポーターマウスのダブルトランスジェニックマウスを作製し、このマウスを用いて時期特異的に Olig2 陽性細胞のみを持続的に標識することで、より厳密な細胞系譜解析ができると考えた。このダブルトランスジェニックマウスでは、TM 投与時に Olig2 陽性細胞で遺伝子組み換えが起こり、レポーター遺伝子が発現することになる。

具体的には、作製したダブルトランスジェニックマウスの雄を野生型の雌と交配させ、任意の時期に 4-ヒドロキシタモキシフェンを母体の腹腔内に投与し、一定期間後、胎仔を回収してダブルトランスジェニックマウスの脊髄におけるレポーター遺伝子の発現パターンを調べ、細胞種に特異的なマーカーとの二重染色や電子顕微鏡下で



の形態観察により、Olig2 陽性 pMN ドメインから生み出される細胞を特定した。

得られた成績のうち要点を纏めると次のようになる。

1) 胎生 9.5 日 (E9.5) に TM を投与し、E11.5 で解析すると、pMN ドメイン及び脊髄前角の Isl1 (MN のマーカー) 陽性細胞に標識が認められ、脊髄前角の MN はすでに Olig2 陰性であったことから、Olig2 陰性の MN が Olig2 陽性 pMN ドメインから生み出されること、レポーター遺伝子の発現が Olig2 の発現の有無に関わらず維持されていることが判明した。

2) E14.5 で解析すると、標識細胞が pMN ドメインや脊髄前角のほか、中間層にも認められることから、MN と OLP に分化していることがわかった。

3) E18.5 では、さらに軟膜直下の GFAP (AS マーカー) 陽性細胞や中心管周囲の上皮細胞 (Ep) にも標識が認められたことから、pMN ドメイン内の Olig2 陽性細胞から MN と OLP のほか、AS や Ep も生み出されることが明らかとなった。

4) pMN ドメインにおける Olig2 発現と RC2 (ラジアルグリアマーカー)、Hb9 (MN マーカー)、Ngn2 の発現を比較したところ、pMN ドメイン内の Olig2 陽性細胞は、形態、分化段階ともにヘテロな集団であることが判明した。

以上の成績から、pMN ドメインは、従来考えられていたよりも複雑であり、MN と OLP のほか、AS や Ep をも生み出す Olig2 陽性の多能性細胞を含む可能性が示唆された。

本論文は、中枢神経系の発生・分化機構の解明のみならず、グリオーマなどの神経疾患の病態解明や治療法の開発にも大きく寄与することが期待され、高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと認められる。

氏名(本籍)	齋藤 史路 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第30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18年3月31日
学位論文題目	Role of IL-27-producing dendritic cells in Th1-immunity polarization in Lewis rats (レイスラットのTh1型への分化におけるIL-27産生樹状細胞の役割)
発表誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications 338(4):1773-1778 2005年12月

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	今井	章介
	副査	教授	脇口	宏

## 論文の内容の要旨

我々のからだは細胞性免疫と液性免疫によって守られている。この両者を調節しているのがヘルパーT (Th) 細胞であり、前者は1型ヘルパーT (Th1) 細胞、後者は2型ヘルパーT (Th2) 細胞が主に関与している。この二つの細胞集団は産生するサイトカインによって相互にバランスをとっているが、このバランスの破綻によって多くの免疫疾患が引き起こされる。破綻の原因にはさまざまな要因が挙げられているが、未だ詳細は解明されていない。そこで、我々は Th1/Th2 モデルラット (Lewis/Brown Norway ラット) を用い、Th1 細胞への分化機序について検討した。それぞれのラットの footpad にオブアルブミン(OVA)と complete Freund adjuvant (CFA)の emulsion を接種し、*in vivo*での免疫応答における各種サイトカインの発現を調べた。その結果、接種後3日目の比較的早い段階で、両ラット間で IL-27 遺伝子の発現量に顕著な差が認められた。この反応は OVA 抗原特異的な獲得免疫反応ではなく、CFA 中の結核死菌に対する自然免疫反応によるものと考えられたので、未刺激のラット脾臓細胞を *in vitro*で結核死菌処理して IL-27 遺伝子の発現を調べたところ、Lewis(LEW)ラットでは発現が誘導され、Brown Norway (BN)ラットでは影響を受けないことが分かった。定量的 PCR による解析では、IL-27 遺伝子の発現は LEW ラット脾臓細胞が BN ラットよりも 4.6 倍高いことがわかった。また、結核死菌処理後の T-bet や IL-12Rβ2 遺伝子の発現においても両ラット間で有意な差が観察された。T-bet や IL-12Rβ2 遺伝子は IL-27 遺伝子の下流にあり、Th1 誘導のマスターレギュレーターとして知られているため、LEW ラットでは IL-27 遺伝子の発現の上昇が原因で、Th1 へと誘導されることが示唆された。次に、rat IL-27 に対する抗体を作製して免疫染色し、結核死菌処理後の脾臓細胞中の IL-27 陽性

細胞数の割合を計測したところ、LEW ラットは0.54%で、BN ラット(0.16%)よりも3.4 倍多いことが判った。また、IL-27 陽性細胞が樹状細胞様であったため、樹状細胞に発現している MHC Class II に対する抗体(OX6 抗体)を用いてポジティブセレクションを行ない、脾臓細胞から OX6 陽性細胞を分離し、抗 IL-27 抗体で免疫染色して OX6 陽性細胞数に対する IL-27 陽性細胞数の割合を計測したところ、LEW ラットで38.7%、BN ラットで17.3%存在し、LEW ラットの方が2.2 倍多く存在することがわかった。次に未刺激ラット骨髄細胞から樹状細胞を誘導し、骨髄由来樹状細胞の IL-27 遺伝子の発現や、IL-27 陽性細胞数を調べたところ、LEW ラットに発現が高く、数も多いことが分かった。以上の結果より、LEW ラットが Th1 優位であるのは、IL-27 の発現が強く、また、IL-27 産生細胞数も多いことによると考えられた。以上の結果より、IL-27 遺伝子の発現量が Th1/Th2 バランスを左右する重要なサイトカインであることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

斉藤さんは、CD4 T細胞の Th1/Th2 サイトカインバランスの不均衡によるアレルギーや自己免疫疾患の病態を理解するため、モデルラット (Th1 優位である Lewis ラット、および Th2 優位の応答をする Brown Norway ラット) における関連遺伝子発現の比較を試みた。本研究で注目したのは、最近 Th1 機能の発現に関与することが報告された IL-27 である。IL-27 は、Th1 の表現型を特徴づける INF- $\gamma$  や IL-12R $\beta$  2 の発現誘導をする転写因子である T-bet の発現を誘導することが報告されていることから、Th1 の表現型を誘導する因子のうち上流に位置するものである可能性が高い。そこで今回の研究では、IL-27 の遺伝子発現を Th1/Th2 サイトカインバランスが対極的な位置にある Lewis ラット (LEW) と、Brown Norway (BN) ラットの間で比較した。

結核菌を投与したラットの脾細胞における IL-27 の発現を比較したところ、投与後数時間から数日間にわたり発現誘導が起こり、その程度は、Th1 優位な免疫応答をする LEW で顕著であった。これとは対照的に、BN ではわずかな変化にとどまった。LEW の脾細胞では、IL-27 のレセプターである WSX-1 の発現や、IL-27 に制御されることが報告されている Th1 関連遺伝子、T-bet、IL-12R $\beta$ 、IFN- $\gamma$  の発現誘導も同様の時間経過で起こっており、これらについても LEW では、NB に比べて発現量が有意に高かった。

脾臓で IL-27 を産生するのがどのような細胞であるかを調べるため、ラット IL-27 に対するモノクローナル抗体を作成し、組織染色をしたところ、樹状細胞様の形態をもつ細胞が陽性に染まった。それらの細胞は、OX6 陽性、MHC Class II 陽性で、樹状細胞であることが示唆された。これら IL-27 陽性細胞は、LEW では NB より数が多かった。これらの細胞は脾臓からわずかしかな単離できないため、次に骨髄細胞から樹状細胞を誘導し、IL-27 産生能とラットの系統間での違いを調べた。すると、骨髄から分化誘導した樹状細胞には、高頻度に IL-27 遺伝子の発現がみら

れた。さらに IL-27 陽性細胞数は、LEW では NB より数が多いことが分かった。これらの結果から、LEW では、樹状細胞における IL-27 の高発現および、その下流に位置する Th1 関連遺伝子産物の脾細胞での高発現が、Th1 優位の表現型を導いている可能性が示唆された。

斉藤さんは、これらの研究成果について明解に説明をし、審査員の質問にも適切に回答をした。審査員一同、斉藤さんの研究は、高知大学大学院医学系研究科の博士論文として十分な内容を備えたものと判断した。