

2005. 6

特集号



国立大学法人 高知大学学報

(題字：相良祐輔学長)

高知大学学位授与記録第六号

広報・調査課発行

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15号	野村 展子	A cross-cultural study on expressed emotion in cares of people with dementia and schizophrenia: Japan and England (認知症並びに統合失調症の介護者にみる感情表出の異文化比較: 日本と英国の場合)	1
甲医博第16号	野崎 靖子	Polymorphisms of interleukin-1 β and β 3-adrenergic receptor in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis (日本人の非アルコール性脂肪肝炎患者におけるインターロイキン-1 β および β 3-アドレナリン受容体の遺伝子多型について)	4
甲医博第17号	森本 香理	Overexpression of carbonic anhydrase-related protein XI promotes proliferation and invasion of gastrointestinal stromal tumors (炭酸脱水酵素関連蛋白 XI の過剰発現は消化管間葉系腫瘍の増殖と浸潤を促進する)	7
乙医博第11号	大崎 康史	Three-dimensional stereotactic surface projection SPECT analysis in Parkinson's disease with and without dementia (痴呆を伴うパーキンソン病と痴呆を伴わないパーキンソン病における3D-SSP SPECT解析)	11
乙医博第12号	松本 千世	Molecular analysis of tumor suppressor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia (小児急性リンパ性白血病における癌抑制遺伝子解析) [1] Mutational analysis of the <i>Hel-N1</i> gene in childhood acute lymphoblastic leukemia with LOH at 9p21 (9p21にLOHを有する小児急性リンパ性白血病における <i>Hel-N1</i> 遺伝子の変異解析) [2] Germline mutation on the <i>p27/Kip1</i> gene in childhood acute lymphoblastic leukemia (小児急性リンパ性白血病における <i>p27/Kip1</i> 遺伝子の胚細胞変異) [3] Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (再発小児急性リンパ性白血病における異常メチル化の解析)	14

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
乙医博第13号	東 祐 史	<p>Expression and localization of histamine receptors in rat cochlea (ヒスタミンレセプターのラット内耳における発現と局在)</p> <p>[1] Expression of mRNA encoding the H1, H2, and H3 histamine receptors in the rat cochlea (ラット内耳におけるヒスタミンH1, H2, H3レセプターの発現)</p> <p>[2] Immunohistochemical localization of histamine receptors in rat cochlea (ラット内耳におけるヒスタミンレセプターの免疫組織学的局在)</p>	18
乙医博第14号	太 田 喜久子	<p>Effect of pitavastatin on transactivation of human serum paraoxonase1 gene (ピタバスタチンの血清パラオキシナーゼ遺伝子転写に及ぼす影響)</p>	22
乙医博第15号	大 西 剛 直	<p>CYP17 polymorphism as a risk factor of tamoxifen-induced hepatic steatosis in breast cancer patients (タモキシフェン誘発性脂肪肝の発症におけるCYP17遺伝子多型の関連)</p>	25

氏名(本籍)	野村 展子(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第15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17年4月28日
学位論文題目	A cross-cultural study on expressed emotion in carers of people with dementia and schizophrenia: Japan and England (認知症並びに統合失調症の介護者にみる感情表出の異文化比較:日本と英国の場合)
発表誌名	Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology (To be announced with regard to volume and page) 2005年7月

審査委員	主査	教授	大原	啓志
	副査	教授	中村	裕之
	副査	教授	土居	義典

論文の内容の要旨

家族の感情表出(EE)研究は、障害を持つ人とその家族(介護者)が日常生活の中で、お互いにどのように影響し合っているかを検討するもので、Camberwell Family Interview (CFI)を用いてEE評価する。過去30年間、EEの再発予測機能やEEをターゲットとした心理教育的な家族介入の再発防止効果などが広く示され、EE研究は安定した評価を得ている。特に統合失調症の研究においては、英国はじめ、ヨーロッパ、アメリカ他の国々でも再発予防の面で高い評価を得ており、わが国でも高知大学は研究拠点の1つとなっている。

今回我々は日本で初めての試みとして、EEを痴呆症(認知症)の患者とその家族に応用した。主に西洋で研究されてきたEEに準拠した評価基準が日本の認知症にもそのまま応用できるかどうか、また日英の患者の症状とEE評価をクロスさせて分析することにより、日英の家族介護負担度の違いを明らかにすることや、日英夫々の家族が負担を感じている領域を特定することが出来るかどうか等、認知症の家族教育の可能性をターゲットに調査を試みた。

対象は日英の認知症と統合失調症の患者とその家族80組で、内訳は①日本の認知症患者とその家族20組、②日本の統合失調症の患者とその家族20組、③英国のアルツハイマー患者とその家族20組、④英国の統合失調症とその家族20組である。患者情報としては、認知症では痴呆の重症度評価、ADL、精神症状評価など、統合失調症では精神症状評価を行った。家族情報としては、CFIによるEE評価、介護負担、一般健康診査などを収集した。

結果は以下のとおりである。

1. 日本と英国では Critical Comment (CC) の数に大きな差がみられた。CC が一番多かったのは英国の統合失調症患者の家族 (ES)、2 番目に多かったのは英国のアルツハイマー患者の家族 (ED)、3 番目は日本の統合失調症患者の家族 (JS)、一番少なかったのは日本の認知症の家族 (JD) であった。すなわち CC は疾患よりも文化による影響のほうが大きかった。
2. EE 評価と介護負担の間に有意差があったのは、JD のみであった。
3. CC のカット・オフ・ポイントの数値を、統合失調症で再発予測に使われる 6 から 2 に操作的に下げると、JD で認知障害や臨床の重症度との間で有意差が見られた。
4. 日本のサンプルでは JD も JS も共に肯定的言辭も否定的言辭も少ない傾向にあった。

今回得られた結果により、EE は認知症の患者とその家族を評価するメジャーとして文化を超えて適用できるインストルメントであることが示された。しかし、日本を含む東アジアの国々では EE 評価のカット・オフ・ポイントを設定する際にフレキシビリティを持たせる必要があること、また今後は病気や文化の差異に配慮しながら、より大きい数のサンプル数を用いて継続調査する必要があることが判明した。

将来の展望としては、今回得られた結果を土台にし、より多いサンプル数を得て、対象を日英の認知症患者とその家族に絞り込んで比較研究を継続し、例えば唾液コルチゾール等、英国で既に調査されている症状評価インストルメントを日本でも採用し、今回日英で大きな差の出た CC にコルチゾール値をクロスさせる等の調査も含めて、認知症の家族教育の方向性をターゲットに研究し、究極的には認知症患者と家族の QOL 向上に貢献していきたい。

論文審査の結果の要旨

家族の感情表出 (Expressed Emotion, EE) 研究は、障害を持つ人とその家族 (介護者) が日常生活の中でお互いにどのように理解し合っているかを検討するもので、Camberwell Family Interview (CFI) を用いて評価する。EE による評価は、再発予測機能や EE をターゲットとした心理教育的な家族介入の再発防止効果などが広く示され、とくに統合失調症においてその有用性が高く評価されてきた。近年、欧米では認知症 (痴呆症) についても EE の応用に関する研究が行われているが、我が国ではまだ検討されていない。

申請者は、我が国で初めての試みとして EE を認知症の患者とその家族に応用し、欧米で研究されてきた評価基準が、日本でもそのまま応用できるかを検討した。同時に、日本及びイギリスにおける統合失調症と認知症の EE 評価をクロスさせて分析することにより、EE における文化の影響を検討した。

対象は、日英の認知症と統合失調症の患者とその家族 80 組で、日本の認知症患者とその家族 (JD)、日本の統合失調症患者とその家族 (JS)、イギリスの認知症患者とその家族 (ED)、イギリスの統合失調症患者とその家族 (ES)、それぞれ 20 組である。CFI の信頼性は、それぞれ両国で確認された。EE の評価については、EE 及び 5 つの dimension 別 (critical comment (CC), hostility, emotional over-involvement, warmth, positive remarks) の検討が行われ、認知症については患者の認知及び身体機能、行動障害や症状、家族の精神症状や心理的負担感との関連が検討された。

結果は、以下のとおりである。

- 1) 日本とイギリスではCCの数に大きな差がみられ、ES>ED>JS>JDの順に多かった。両疾患ともイギリスで多いことから、CCには疾患より文化の影響が大きいと考えられた。
- 2) JDでは、CC評価と家族の介護負担の間に有意差がみられた。
- 3) JDでは、CCのカット・オフ・ポイントの数値を、統合失調症で再発予測に使われる6から2に下げると、認知障害や臨床的な重症度の間で有意差がみられた。
- 4) 日本のサンプルでは、JDもJSもともに家族に対する肯定的言辭も否定的言辭も少ない傾向にあった。

これらの結果から、文化的背景については、イギリスに比べて感情の表出が抑制される日本の文化がEEの評価に影響を与えると考えられる。認知症の患者とその家族を評価する方法としては、今回の検討でEEと家族の介護負担や患者の認知障害などとの間に関連がみられたことから、日本においても応用できることが示唆されたが、評価においてカット・オフ・ポイントを設定する際に、感情表出に関する文化に配慮したフレキシビリティをもたせる必要があることが判明した。

本論文は、日本におけるEEの認知症患者及び家族のQOL向上を目標とする家族介入への応用について初めて可能性を示唆した。また、日英における統合失調症を含めた国及び疾患をクロスさせた比較検討によって、両国の文化的背景によるEE評価への影響に関する理解を進展させたものといえる。EEを用いた認知症の家族介入については、サンプル数を増加させた検討や、家族介入後の追跡研究などによる検証が必要であるが、本論文はEEの認知症への応用について、文化的背景を踏まえたうえでその可能性を示唆した点で評価され、高知大学博士(医学)に値する研究であると認めた。

氏名(本籍)	野崎 靖子(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第16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17年6月30日
学位論文題目	Polymorphisms of interleukin-1 β and β 3-adrenergic receptor in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis. (日本人の非アルコール性脂肪肝炎患者におけるインターロイキン-1 β および β 3-アドレナリン受容体の遺伝子多型について)
発表誌名	Alcoholism: Clinical and Experimental Research 28(8):106S-110S 2004年8月

審査委員	主査	教授	中村 裕之
	副査	教授	大舘 祐治
	副査	教授	橋本 浩三

論文の内容の要旨

(目的) 欧米では、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)患者に多い合併症として、肥満、高中性脂肪血症、糖尿病が報告されている。NASHの発生機序としては、まず肝細胞への脂肪沈着が起こり、次に何らかの要因で炎症や線維化が起こる two-hit theory が支持されている。日本人におけるNASHの発生機序に関わる遺伝的背景を明らかにするために、 β 3-adrenergic receptor (β 3-AdRc) および interleukin-1 β (IL-1 β) の機能性遺伝子多型の関与について検討を行なった。

(方法) 肝生検により診断されたNASH63症例と、対照となる健常人100症例の白血球から genomic DNA を抽出した。得られた DNA について、 β 3-AdRc (T190A) と IL-1 β (T-511C) の遺伝子多型を polymerase chain reaction (PCR) と restriction fragment length polymorphism (RFLP) を用いて検出し、比較検討した。さらに遺伝子多型と臨床像の関係を検討した。

(結果) β 3-AdRc の遺伝子多型 (T190A) により、64番目のアミノ酸がトリプトファンからアルギニンに置換される (Trp64Arg (W64R))。この多型において R アリルの頻度は健常人の 18.0% に対し、NASH 症例で 30.2% と有意に高値であった (odds ratio=1.97; $p<0.01$)。また、R/- (W/R and R/R) genotype の頻度は健常人の 33% に対し、NASH 症例では 54% と有意に高値であった (odds ratio=2.39; $p<0.01$)。IL-1 β のプロモーター領域の遺伝子多型 (T-511C) では、T アリルの頻度が健常人の 53.0% に対し、NASH 症例では 74.6% と有意高値であった (odds ratio=2.60; $p<0.0001$)。また、T/T genotype は健常人で 27.0% に対し、NASH 症例では 63.5% と有意に高値であった (odds ratio=4.70; $p<0.0001$)。

β 3-AdRc の R/- genotype の NASH 症例では、W/W genotype の NASH 症例に比較し、BMI、内臓脂肪、皮下脂肪、血中中性脂肪、空腹時血糖、空腹時インスリン、homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR)、insulinogenic index が有意に高値を示した。

(考察) $\beta 3$ -AdRc の機能性遺伝子多型 (T190A) は、日本人の 2 型糖尿病において体重増加、インスリン抵抗性や早期発症との関連が報告されており、NASH 発症における "first hit" のひとつと考えられる。また、IL-1 β は proinflammatory cytokine であり、その機能性遺伝子多型 (T-511C) は IL-1 β を亢進させ、"second hit" のひとつと考えられる。日本人における NASH 発症には、肥満、耐糖能異常、高中性脂肪血症が関与していると考えられてきた。今回の我々の成績は、体質を形づくる遺伝子の機能的多型がいくつか重積することにより、個々人の NASH に対する感受性は決定されることを示している。今回得られた知見を生活習慣病の一形態である NASH の予知、予防の推進に役立てたい。

論文審査の結果の要旨

欧米では、非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 患者に多い合併症として、肥満、高中性脂肪血症、糖尿病が報告されている。NASH の発生機序としては、まず肝細胞への脂肪沈着が起こり、次に何らかの要因で炎症や線維化が起こる two-hit theory が支持されている。日本人における NASH の発生機序に関わる遺伝的背景を明らかにするために、 $\beta 3$ -adrenergic receptor ($\beta 3$ -AdRc) および interleukin-1 β (IL-1 β) の機能性遺伝子多型の関与について検討を行なった。

肝生検により診断された NASH63 症例と、対照となる健常人 100 症例の白血球から genomic DNA を抽出した。得られた DNA について、 $\beta 3$ -AdRc (T190A) と IL-1 β (T-511C) の遺伝子多型を polymerase chain reaction (PCR) と restriction fragment length polymorphism (RFLP) を用いて検出し、比較検討した。さらに遺伝子多型と臨床像の関係を検討した。

その結果、 $\beta 3$ -AdRc の 64 番目のアミノ酸がトリプトファンからアルギニンに置換される (Trp64Arg (W64R)) 一塩基多型 (T190A) に関しては、R アリルの頻度は健常人の 18.0% に対し、NASH 症例で 30.2% と有意に高値であった (odds ratio=1.97; $p<0.01$)。また、R/- (W/R and R/R) genotype の頻度は健常人の 33% に対し、NASH 症例では 54% と有意に高値であった (odds ratio=2.38; $p<0.01$)。IL-1 β のプロモーター領域の遺伝子多型 (T-511C) では、T アリルの頻度が健常人の 53.0% に対し、NASH 症例では 74.6% と有意に高値であった (odds ratio=2.60; $p<0.0001$)。また、T/T genotype は健常人で 27.0% に対し、NASH 症例では 63.5% と有意に高値であった (odds ratio=4.70; $p<0.0001$)。

臨床像との関係については、 $\beta 3$ -AdRc の R/- genotype の NASH 症例では、W/W genotype の NASH 症例に比較し、BMI、内臓脂肪、皮下脂肪、血中中性脂肪、空腹時インスリン、homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR)、insulinogenic index が有意に高値を示した。

β 3-AdRc の機能性遺伝子多型 (T190A) は、日本人の 2 型糖尿病において体重増加、インスリン抵抗性や早期発症との関連が報告されており、NASH 発症における”first hit”のひとつと考えられる。また、IL-1 β は proinflammatory cytokine であり、その機能性遺伝子多型 (T-511C) は IL-1 β を亢進させ、”second hit”のひとつと考えられる。日本人における NASH 発症には、肥満、耐糖能異常、高中性脂肪血症が関与していると考えられてきた。今回の申請者の成績は、体質を形づくる遺伝子の機能的多型がいくつか重積することにより、個々の NASH に対する感受性が決定されることを示している。今回得られた知見は、日本人における生活習慣病の一形態である NASH の予知に役立つことにより、NASH の予防に有効であることが示唆された。

本論文は上記のごとく、日本人の NASH 患者における感受性遺伝子を症例対照研究によって明らかにしただけでなく、諸臨床的所見との関係を明らかにすることで、今後、ますます増加することが予想される NASH の予防に対する遺伝子医学的根拠を与えた点で評価された。したがって、審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) の学位授与に値するものと判断した。

氏名(本籍)	森本 香理(兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第17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17年6月30日
学位論文題目	Overexpression of carbonic anhydrase-related protein XI promotes proliferation and invasion of gastrointestinal stromal tumors (炭酸脱水酵素関連蛋白XIの過剰発現は消化管間葉系腫瘍の増殖と浸潤を促進する)
発表誌名	Virchows Archiv (2005, in press)

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	今井	章介
	副査	教授	荒木	京二郎

論文の内容の要旨

(目的) 炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase ; CA) は $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ の反応を可逆的に触媒する亜鉛要求性の酵素であり、これまで15種類の遺伝子ファミリーが報告されている。このうち、3種類のアイソフォームは亜鉛の結合するヒスチジン残基を欠失するため、本来のCA活性を持たず、炭酸脱水酵素関連蛋白 (Carbonic anhydrase-related protein ; CA-RP) と呼ばれる (CA-RP VIII, X, XI)。CA-RPの機能は未だ不明であるが、大腸癌および肺非小細胞癌では正常上皮細胞に比べCA-RP VIIIの過剰発現が認められることが報告されている。3種類のCA-RPは共通して中枢神経細胞で発現が見られ、また消化管では壁在神経節細胞においてCA-RP VIIIおよびXの発現が見られる(副論文を参照)。以上の結果をふまえ、本研究では神経-筋の両方向への分化を示す消化管間葉系腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor ; 以下GIST) において3種類のCA-RPの発現を検討し、さらにCA-RP XIがGIST細胞の増殖および浸潤に及ぼす影響について解析した。

(方法)

(1) カハールの介在細胞およびGISTにおけるCA-RPの発現の検討 (免疫組織染色)
KIT (CD117)陽性のGIST手術切除標本22例(胃16例、十二指腸2例、小腸4例)において、CA-RP VIII, X, XIに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色(ABC法)を行った。また、GISTの起源とされるカハールの介在細胞 (internal cell of Cajal ; ICC) におけるCA-RPの発現を検討するため、ICCの過形成を示すvon Recklinghausen病患者の胃組織を用い免疫組織染色を行った。

(2) GISTの増殖および浸潤における CA-RP XI の役割の検討 (CA-RP XI 高発現 GIST 培養細胞株の作製) GIST の培養細胞株 (GIST-T1) に発現ベクター (pCIneo) を用いて CA-RP XI 遺伝子を導入し、同蛋白の高発現細胞株 (GIST-T1-CA11) を作製した。GIST-T1 と GIST-T1-CA11 における 3 種類の CA-RP の mRNA および蛋白発現を real-time PCR, RT-PCR-Southern blot、免疫細胞染色 (ABC 法) により検討した。また、GIST-T1 と GIST-T1-CA11 の *in vitro* での増殖能および浸潤能を MTT アッセイおよび Chemotaxis チャンバーを用いて検討した。

(結果)

- 1) von Recklinghausen 病患者より得た胃組織の連続切片における免疫組織染色の結果、ICC では KIT (CD117) および CD34 の強い発現が確認されたが、3 種類の CA-RP の発現は認められなかった。一方、既報 (副論文) のごとく、壁在神経節細胞では CA-RP VIII および XI の発現、特に神経節細胞の細胞質において CA-RP VIII の強い発現が認められた。
- 2) GIST 手術標本 22 例における免疫組織染色の結果、GIST 細胞の細胞質における CA-RP VIII および XI の発現が各々 13 例 (59%)、20 例 (91%) に見られた。CA-RP X の発現は全例で陰性であった。また、CA-RP VIII, XI の発現は腫瘍の中心部に比べ辺縁部で強く認められた。
- 3) real-time PCR および RT-PCR-Southern blot により、GIST-T1-CA11 では wild-type の GIST-T1 に比べ、CA-RP XI の mRNA の発現の増強 (real-time PCR で 6.8 倍) が見られた。また、免疫細胞染色により CA-RP XI 蛋白の発現 (細胞質全体に発現) の増強も確認された。一方、CA-RP VIII の mRNA 発現は CA-RP XI 遺伝子導入によりほぼ不変であったが (real-time PCR で 1.7 倍)、GIST-T1 では核周囲に見られた CA-RP VIII の発現が GIST-T1-CA11 では細胞質に均一に見られた。CA-RP X の mRNA および蛋白発現は GIST-T1 および GIST-T1-CA11 の両細胞において認められなかった。
- 4) MTT アッセイによる細胞増殖能の検討で、GIST-T1-CA11 は GIST-T1 に比し培養 48 時間および 72 時間後で有意な細胞数の増加を示した (各々 $P < 0.002$ 、 $P < 0.005$)。また、Chemotaxis チャンバーを用いた細胞浸潤能の検討では、GIST-T1 に比し GIST-T1-CA11 で有意な浸潤細胞数の増加が認められた ($P < 0.005$)。

(考察)

KIT および CD34 の発現が認められることより、GIST は ICC に由来すると考えられている。本研究の結果、ICC は CA-RP の発現を示さなかったが、GIST では細胞質に CA-RP VIII および XI の強い発現が認められた。また、CA-RP VIII および XI は腫瘍の辺縁部で強く発現していた。これらの結果より CA-RP VIII, XI が GIST の増殖および浸潤になんらかの役割を果たしていることが示唆された。22 例の GIST 組織切片における発現率から、CA-RP VIII (59%) および CA-RP X (0%) に比べ、CA-RP XI (91%) がより普遍的な役割を有すると考えられたため、本研究ではさらに CA-RP XI に焦点をあて、培養細胞株 GIST-T1 を用いて CA-RP XI の生物学的な機能を検討した。すなわち、CA-RP XI の高発現細胞株 (GIST-T1-CA11) を作製し、GIST-T1 野生株と比較検討した結果、GIST-T1-CA11 は GIST-T1 比し有意に細胞増殖能および浸潤能の増強を示した。肺癌細胞株である PC-9 では CA-RP VIII の強制発現により増殖能が増すことが報告されている。以上の結果より、

CA-RP は癌細胞の増殖および浸潤能を増強する機能を有すると考えられる。今後、この CA-RP の機能について分子レベルでの解析が期待される。

(結語)

ICC から GIST への腫瘍化の過程で、CA-RP VIII および XI の過剰発現が見られることを発見した。また、In vitro の検討で CA-RP XI が GIST 細胞の増殖および浸潤能を増強することを示した。本研究により、これまで不明である CA-RP の生物学的機能として、細胞の増殖および浸潤への関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

森本香理さんの学位審査は、平成17年6月9日15:00より、1時間余りにわたり行われた。まず、研究内容の発表を行った。

森本さんらは、これまでに同定された15種類の炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase; CA)遺伝子ファミリーの中で、酵素活性に必要なHisを欠いているアイソフォーム VIII, X, XI に注目した。これらは、CA-RP (CA-related protein)とよばれ、機能はわかっていない。CA-RP VIII は、ほぼユビキタスな発現をし、大腸癌や肺小細胞癌で過剰発現されていることがこれまでの研究で明らかになっている。CA-RP X, XI は、主として中枢神経系の神経細胞に発現されており、森本も共著となっている論文で、消化管神経叢でも発現されることが明らかになっている。本研究では、CA-RP XI の細胞の腫瘍化への影響を調べるため、神経あるいは筋細胞への分化能をもつ消化管悪性腫瘍であるGIST(gastrointestinal stromal tumor)の増殖および組織浸潤に及ぼすCA-RP 遺伝子産物の影響について調べた。

まず、GISTの起源とされるCajalの介在細胞(internal cell of Cajal; ICC)におけるCA-RPの発現を検討するため、ICCの過形成を示すvon Recklinghausen病の胃病変を用いて免疫組織染色を行った。染色に使ったモノクローナルIgM抗体は、以前に本学で開発されたものである。壁在神経節細胞にCA-RP VIII, X, XIの発現が確認された。特に、神経節細胞の細胞質にはCA-RP VIIIの強い発現がみられた。これは、この患者に特異的な観察に留まらず、正常組織に比べ、GIST手術標本22例中、CA-RP VIIIで59%、CA-RP XIは91%で高発現を示した。腫瘍組織中では辺縁部に強い染色がみられた。CA-RP Xの発現は陰性であった。

次に、CA-RP XIのGIST細胞の増殖および組織浸潤に及ぼす影響を調べるため、ヒトCA-RP XIのcDNAをCMVエンハンサー/プロモーターの下流につないだ発現ベクターを作製してGIST細胞株GIST-T1に導入し、transfectantを樹立した。興味深いことに、CA-RP XIを高発現するtransfectantでは、細胞増殖の増強がみられた。また、マトリゲルを使った細胞浸潤アッセイで、CA-RP XI遺伝子導入細胞では、有意に基底膜を越えて細胞侵入が増加した。これらの観察から、CA-RP XIはCAの酵素活性を欠くが、酵素活性とは別に、細胞の増殖、組織への浸潤に重要な機能を持っていることが示唆された。さらに、因果関係は今後の課題として残されるが、CA-RP XI transfectantでは、本来核周辺部に局在するCA-RP VIIIの細胞内分布が変化し、細胞質全体に分散する変化が観察された。CA-RP Xの発現は親株であるGIST-T1で陰性で、発現量に

CA-RP XI の高発現による影響は見られなかった。このことから、これまでに観察された CA-RP VIII に加え、CA-RP XI も癌化に伴い発現が増加し、その結果として、細胞の増殖能や組織への浸潤能が高まることが示唆された。CA-RP の機能はわかっていないが、最近、CA-RP VIII が、ER 膜に存在する IP₃R1 と会合して、IP₃ の会合を阻害することが報告されており、CA-RP XI がその反応に影響を与えることも可能性のひとつとして考察した。

森本さんは、この論文以前に共著者として進めてきた研究の背景の説明から始めて、研究内容について、きわめて明解に紹介をした。審査員からは以下のような質問があった。森本さんは、おおむね適切な応答をし、今後に残された問題点についても的確な認識があることがうかがわれた。

1. CA-RP XI の transfection について、今回の研究では permanent な遺伝子導入クローンを作製したが、クローン選択によるバイアスを否定できず、このクローンに特異的な性質を見ている可能性が残される。たとえばレトロウイルスベクターを使って効率的な遺伝子導入を行い、多クローン細胞集団で表現型解析をする option もあったのでは？

2. transfection 実験で、遺伝子の導入後、細胞の形態の変化、特に、細胞骨格に対する変化は観察していないか。一般に、細胞の腫瘍化に伴い、細胞骨格の変化は敏感であることが多く、また細胞の浸潤能とも関連が深い。

3. In vitro でのマトリゲルの実験だけでなく、in vivo での細胞浸潤、転移能の実験が重要ではないか。

4. CA-RP VIII が大腸がんや肺がんで高発現をすることを示したが、大腸の慢性炎症性疾患において発現を見てみたことはあるか？

5. 増殖試験に使った formazan アッセイは、細胞数だけでなくミトコンドリアの代謝活性によっても高くなる。細胞数の変化を確認したか？

6. 組織染色に使った抗体の性質は？腫瘍の周辺部が濃く染まることについて、人工的な染めむらでないことは否定されているか？

氏名(本籍)	大崎 康史(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第11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17年4月5日
学位論文題目	Three-dimensional stereotactic surface projection SPECT analysis in Parkinson's disease with and without dementia (痴呆を伴うパーキンソン病と痴呆を伴わないパーキンソン病における3D-SSP SPECT解析)
発表誌名	Movement Disorders 2005年(in press)

審査委員	主査	教授	井上	新平
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	清水	恵司

論文の内容の要旨

背景：パーキンソン病は、進行を停止させうる治療がなく、かつ慢性に進行する疾患である。最近では、認知機能障害、抑うつとバランス障害が、PD患者の生活の質を低下させることが知られており、これらの症候を正しく評価することが重要である。

パーキンソン病の経過中に痴呆を合併する頻度は報告により0-81%とばらつきがあるが、ある報告によるとパーキンソン病患者は、そうでないものと比べて痴呆を発症する確率が約6倍高いという。その臨床像は、多くの場合、レビー小体病の臨床像に酷似しており、「変動のある意識・覚醒度の障害」と「幻視」が前景に立つ。

脳血流シンチグラフィ(SPECT)を用いた局所脳血流(rCBF)の評価は、最近までregion of interest(ROI)法が頻用されてきた。しかしこの方法には、パイアスがかかりやすいなど、いくつかの弱点がある。これに比べて、statistical parametric mapping法はパイアスがかかりにくく、負荷前後での評価に適している。Three-dimensional stereotactic surface projection(3D-SSP)法は、過程全体が自動化されており、表面から見たrCBFの低下部位と程度の描写、異なる個体間の比較、変性疾患で多く見られる萎縮脳における解析、により優れているとされる。

目的：まずパーキンソン病患者のrCBFを、3D-SSP法によるSPECTを用いて、年齢をマッチさせた健常者と比較すること。次にパーキンソン病の経過中に「痴呆」、「変動のある意識・覚醒度の障害」、「幻視」を認める例と、認めない例の3D-SSP SPECTを比較すること。

方法：当初の診断がパーキンソン病であった患者30例。パーキンソン病の診断は英国パーキンソン病協会の診断基準に従い、パーキンソン病・痴呆の診断はDLB国際ワークショップの診断基準に従った。30例のうち20例は経過中に「痴呆」を発症せず、いっぽう10例が「痴呆」を発症して(発病後平均9年)パーキンソン病・痴呆と診断された。

SPECT画像はTOSHIBA製カメラ(GCA9300A/HG)を用い、111MBq(3mCi)のIMPを静脈注射した10分後に撮像を開始した。3D-SSP法の解析はすでに報告されている方法に従った。各ピクセル値は健常者の平均「小脳」血流と比較した。一旦3D-SSP法による画像が得られたのち、次に23個のROIをおき、各々のZ値を算出した。ROIは、両側の、前頭被蓋、前頭底、側頭底、運動・感覚野、頭頂葉、頭頂連合野、頭頂葉内側面、後頭葉背面、視覚領、前部帯状回、後部帯状回、および橋においた。

結果：（１）パーキンソン病患者 30 例の 3D-SSP 解析では、両側の側頭底、前頭底、頭頂葉内側面、頭頂連合野、視覚領で rCBF の低下が見られた。Z スコアは、両側の側頭底、前頭底・頭頂葉内側面、視覚領、頭頂連合野の順で高値（血流が低下している）を呈した。（２）「痴呆なし」群のうち 1 例と「痴呆あり」群のうち 8 例が、「変動のある意識・覚醒度の障害」を認めた。また「痴呆なし」群のうち 9 例と「痴呆あり」群全例で、「幻視」を認めた。（３）両側前頭底・側頭底はパーキンソン病患者において最も高度の血流低下が認められたが、「痴呆」、「変動のある意識・覚醒度の障害」、「幻視」の有無の 2 群比較ではいずれにおいても有意差はなかった。（４）「痴呆あり」群は「痴呆なし」群に比べて、rCBF が後部帯状回でのみ、有意に低下していた ($P < 0.05$)。（５）「変動のある意識・覚醒度の障害を認める」群は、両側頭頂連合野 ($P < 0.01$)、頭頂葉内側面 ($P < 0.01$)、後頭葉後面 ($P < 0.05$) において、「変動のある意識・覚醒度の障害を認めない群」に比し、有意の rCBF の低下を認めた。（６）「幻視あり」群と「幻視なし」群の比較では、有意差はなかった。

結論：パーキンソン病患者の rCBF は、年齢をマッチさせた健常者に比べて、いくつかの部位で低下していることが 3D-SSP 法で示された。rCBF は両側の（１）側頭底、（２）前頭底・頭頂葉内側面、（３）視覚領、（４）頭頂連合野の順で低下していた。

本研究の最も興味深い結果は、経過中に痴呆を呈していないパーキンソン病患者と、経過中に痴呆を呈したパーキンソン病患者の rCBF を 3D-SSP 法で解析したことである。後者では前者に比べて、rCBF は、後部帯状回においてのみ有意に低下していた。しかしながら、側頭底、前頭底・頭頂葉内側面、視覚領、頭頂連合野において、後部帯状回よりも高度の rCBF の低下を認めた。

論文審査の結果の要旨

研究の背景

パーキンソン病は、慢性進行性で進行を停止させる治療がない難治の疾患である。最近では、患者の生活の質を低下させる要因として、認知機能障害、抑うつ、バランス障害が知られており、これらの症候を正しく評価することが重要である。

パーキンソン病の経過中に痴呆を合併する頻度は 0-81% とばらつきが大きい。この疾患の痴呆発症は、そうでない者に比べて約 6 倍高いという報告もある。臨床像は、多くの場合レビー小体病と酷似し、「変動のある意識・覚醒度の障害」と「幻視」が前景に立つ。

脳血流シンチグラフィ（SPECT）を用いた局所脳血流（rCBF）の評価は、最近まで region of interest (ROI) 法が頻用されてきた。しかしこの方法にはバイアスがかかりやすいなど、いくつかの弱点がある。これに比べて statistical parametric mapping 法はバイアスはかかりにくく、負荷前後での評価に適している。Three-dimensional stereotactic surface projection (3D-SSP) 法は、過程全体が自動化されており、表面から見た rCBF の低下部位と程度の描写、異なる個体間の比較、変性疾患で多く見られる萎縮脳における解析により優れている。

研究の目的

1. パーキンソン病患者の rCBF を 3D-SSP 法による SPECT を用いて、年齢をマッチさせた健常者と比較する。
2. 経過中に痴呆、変動のある意識・覚醒度の障害、幻視を認める例と認めない例で 3D-SSP を比較する。

研究方法

当初診断がパーキンソン病であった患者 30 例を用いた。診断は英国パーキンソン病協会の基準に従い、パーキンソン病・痴呆の診断は DLB 国際ワークショップの基準に従った。30 例中 10 例が経過中に痴呆を発症しパーキンソン病・痴呆と診断された。

SPECT 画像は TOSHIBA 製カメラ (GCA9300A/HG) を使い、111MBq (3mCi) の IMP を静脈注射した 10 分後に撮像を開始した。3D-SSP 法による画像が得られた後、23 個の ROI をおき、それぞれ Z 値を算出した。ROI は両側の前頭被蓋、前頭底、側頭底、運動・感覚野、頭頂葉、頭頂連合野、頭頂葉内側面、後頭葉背面、視覚領、前部帯状回、後部帯状回、および橋においた。

研究結果

1. パーキンソン病患者 30 例の 3D-SSP 解析では、両側の側頭底、前頭底、頭頂葉内側面、頭頂連合野、視覚領で rCBF の低下が見られた。Z スコアは、両側の側頭底、前頭底、頭頂葉内側面、視覚領、頭頂連合野の順で高値 (血流低下) を呈した。
2. 「変動のある意識・覚醒度の障害」は「痴呆なし」群で 1 例と「痴呆あり」群で 8 例に認めた。また「幻視」は「痴呆なし」群で 9 例と「痴呆あり」群で全例に認めた。
3. 両側の前頭底・側頭底はパーキンソン病において最も高度の血流低下が見られたが、「痴呆」、「変動のある意識・覚醒度の障害」、「幻視」の有無での有意差はなかった。
4. 「痴呆あり」群は「痴呆なし」群に比べて、rCBF が後部帯状回でのみ有意に低下していた ($p < 0.05$)。
5. 「変動のある意識・覚醒度の障害を認める」群は、両側頭頂連合野 ($p < 0.01$)、頭頂葉内側面 ($p < 0.01$)、後頭葉背面 ($p < 0.05$) において、この傷害を認めない群に比し有意に rCBF 低下を認めた。
6. 「幻視あり」群と「幻視なし」群の比較ではどの部位も有意差はなかった。

結論

パーキンソン病患者の rCBF は年齢をマッチさせた健常者に比べていくつかの部位で低下していることが 3D-SSP 法で示された。すなわち両側の (1) 側頭底、(2) 前頭底、頭頂葉内側面、(3) 視覚領、(4) 頭頂連合野の順で低下していた。

本研究の最も興味深い点は、経過中に痴呆を呈した患者は後部帯状回のみ有意な血流低下が見られた点である。同時に側頭底、前頭底、頭頂葉内側面、視覚領、頭頂連合野における血流低下は、後部帯状回よりも高度であった。以上より、痴呆の進行段階で血流低下をきたす部位は異なることが示唆され、今後の痴呆の病態解明につながりうる所見が得られた。

氏名(本籍) 松下 千世(高知県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 乙医博第12号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与年月日 平成17年4月5日

学位論文題目 Molecular analysis of tumor suppressor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia
(小児急性リンパ性白血病における癌抑制遺伝子解析)

[1] Mutational analysis of the *Hel-N1* gene in childhood acute lymphoblastic leukemia with LOH at 9p21
(9p21にLOHを有する小児急性リンパ性白血病における*Hel-N1*遺伝子の変異解析)

[2] Germline mutation of the *p27/Kip1* gene in childhood acute lymphoblastic leukemia
(小児急性リンパ性白血病における*p27/Kip1*遺伝子の胚細胞変異)

[3] Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia
(再発小児急性リンパ性白血病における異常メチル化の解析)

発表誌名

- [1] Leukemia 13(4):650-651 1999年4月
- [2] Leukemia 16(5):956-958 2002年5月
- [3] ONCOLOGY REPORTS 12(1):97-99 2004年7月

審査委員	主査 教授	執印 太郎
	副査 教授	脇口 宏
	副査 教授	麻生 悌二郎

論文の内容の要旨

1) 染色体 9p21 の欠失は、小児急性リンパ性白血病 (ALL) において高頻度に認められる。この事はその欠失領域に小児 ALL の発症に重要な癌抑制遺伝子の存在を示唆する。一般に、9p21 欠失を有する症例では *p16* あるいは *p15* 遺伝子の欠失が認められるが、我々は以前、*p16* および *p15* 遺伝子の欠失を伴わない染色体 9p21 欠失を有する小児 ALL 症例を同定した。この事は、9p21 に他の標的遺伝子が存在することを示唆する。最近、染色体 9p21 上の *D9S126* の近傍に *Hel-N1* (Human *elav*-like neuronal protein 1) 癌抑制遺伝子が同定された。今

今回我々は、*Hel-N1* 遺伝子の変異を 31 例の小児 ALL において解析した。全ての症例は 9p21 の欠失を有し、14 例では *p16* および *p15* の欠失は認められなかった。*Hel-N1* 遺伝子を PCR-SSCP 法にて解析したが、点突然変異は認められなかった。*Hel-N1* 遺伝子近傍の *D9S126* にホモ接合性欠失を有する 1 例を同定したが、詳細に検討するとそのホモ接合性は *p16* 遺伝子座にまで及んでおり、*Hel-N1* 遺伝子がホモ接合性欠失の主な標的であるとは結論できなかった。以上の結果より、小児 ALL において、*Hel-N1* 遺伝子は 9p21 における標的遺伝子ではないと考えられる。しかしながら、9p21 に高頻度の LOH が認められる事は、小児 ALL の発生に関与している他の癌抑制遺伝子の存在を示唆する。

2) *p27/Kip1* 遺伝子は重要な細胞周期制御分子であり、G1 期から S 期への移行を抑制する。したがって、その不活化は細胞増殖を促進し、細胞悪性化の一因となる。*p27/Kip1* 遺伝子の発現減弱は悪性リンパ腫および多発性骨髄腫において認められ、その点突然変異は成人 T 細胞白血病で認められている。しかしながら、小児 ALL における異常はまだ報告されていない。今回我々は、PCR-SSCP 法を用いて小児 ALL における *p27/Kip1* 遺伝子変異を解析し、胚細胞変異を有する症例を同定した。患者白血病細胞においては、*p27/Kip1* 遺伝子のコドン 172 にグアニン (G) → アデニン (A) の変異が認められ、これに伴ってグルタミン酸がロイシンに置換されていた。患者正常細胞では正常配列 (G) と、異常配列 (A) の両方が認められたことから、これは胚細胞変異と考えられた。また、患者父親の正常細胞でも G と A の両配列が認められ、この変異は父親より遺伝したものと思われた。さらに、LOH 分析により、本例の白血病細胞は正常の *p27/Kip1* 遺伝子を含む染色体を欠失した事が明らかとなった。以上の結果より、胚細胞変異に引き続いて起こった LOH によって正常アレルが欠失し、*p27/Kip1* 遺伝子の機能が完全に失われて白血化したと示唆された。健常者 100 人の DNA を解析した結果、同様の異常は検出されず、この変異は遺伝子多型によるものでないと考えられた。

3) 癌抑制遺伝子の不活化は小児 ALL 発症の主要原因であるが、近年、癌抑制遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が、欠失や変異とともに癌抑制遺伝子不活化の原因の一つになっていることが明らかになった。今回我々は、再発小児 ALL における DNA メチル化を解析した。再発小児 ALL 9 例と健常者 10 例より抽出された DNA に関して、MSP (Methylation Specific PCR) 法を用いて、*p14*、*p15*、*p16*、*Rb*、*APC*、*FHIT*、*MGMT*、*hMLH1*、*DAPK*、*RIZ*、*RARβ* の計 11 遺伝子における DNA メチル化を解析した。各遺伝子におけるメチル化の頻度は、*MGMT* 56%、*RARβ* 44%、*p16* 22% であり、56% の患者で少なくとも 1 つの遺伝子にメチル化を認めた。メチル化が認められた症例に関しては、そのメチル化が再発時に獲得されたものか、あるいは初回診断時にすでに存在していたものかを明らかにするため、初回診断時のサンプルも解析した。再発時に *p16* および *MGMT* 遺伝子にメチル化を認めた症例では、全例において初回診断時にすでにメチル化しており、これらのメチル化は小児 ALL の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、再発時に *RARβ* 遺伝子がメチル化していた 4 例のうち、3 例は初回診断時にメチル化が認められず、*RARβ* 遺伝子のメチル化は小児 ALL の進行に関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

小児急性リンパ性白血病 (ALL) では様々な癌抑制遺伝子があることが予測されるが、その詳細は不明である。染色体 9p21 の欠失が高頻度に認められるため、その欠失領域に小児 ALL の発症に重要な癌抑制遺伝子の存在を示唆する。最近、染色体 9p21 上の *D9S126* の近傍に *Hel-N1* (Human *elav*-like neuronal protein 1) 癌抑制遺伝子が同定された。また、*p27/Kip1* 遺伝子は重要な細胞周期制御分子であり、G1 期から S 期への移行を抑制する。したがって、その不活化は細胞増殖を促進し、細胞悪性化の一因となる。*p27/Kip1* 遺伝子の発現減弱は悪性リンパ腫および多発性骨髄腫において認められ、その点突然変異は成人 T 細胞白血病で認められている。しかし小児 ALL における異常はまだ報告されていない。また、癌抑制遺伝子の不活化は小児 ALL 発症の主要原因であるが、近年、癌抑制遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が、欠失や変異とともに癌抑制遺伝子不活化の原因の一つになっていることが明らかになっている。

これらの背景より発表者は次の 3 点を検討した。① *Hel-N1* 遺伝子の変異を 31 例の小児 ALL において解析した。② PCR-SSCP 法を用いて小児 ALL における *p27/Kip1* 遺伝子変異を解析した。③ 再発小児 ALL 9 例と健常者 10 例より抽出された DNA に関して、MSP (Methylation Specific PCR) 法を用いて、*p14*, *p15*, *p16*, *Rb*, *APC*, *FHIT*, *MGMT*, *hMLH1*, *DAPK*, *RIZ*, *RARβ* の計 11 遺伝子における DNA メチル化を解析した。メチル化が認められた症例に関しては、そのメチル化が再発時に獲得されたものか、あるいは初回診断時にすでに存在していたものかを明らかにするため、初回診断時のサンプルも解析した。

その結果、①すべての検討症例では 9p21 の欠失を有し、14 例では *p16* および *p15* の欠失は認められなかった。また、*Hel-N1* 遺伝子を PCR-SSCP 法にて解析したが、点突然変異は認められなかった。*Hel-N1* 遺伝子近傍の *D9S126* にホモ接合性欠失を有する 1 例を同定したが *Hel-N1* 遺伝子がホモ接合性欠失の主な標的であるとは結論できなかった。②患者白血病細胞においては、*p27/Kip1* 遺伝子のコドン 172 にグアニン (G) →アデニン (A) の変異が認められ、これに伴ってグルタミン酸がロイシンに置換されていた。患者正常細胞では正常配列 (G) と、異常配列 (A) の両方が認められたことから、これは胚細胞変異と考えられた。また、患者父親の正常細胞でも G と A の両配列が認められ、この変異は父親より遺伝したものと思われた。健常者 100 人の DNA を解析した結果、同様の異常は検出されず、この変異は遺伝子多型によるものでないと考えられた。さらに、LOH 分析により、本例の白血病細胞は正常の *p27/Kip1* 遺伝子を含む染色体を欠失した事が明らかとなった。③遺伝子のメチル化解析でメチル化の頻度は、*MGMT* 56%、*RARβ* 44%、*p16* 22% であり、56% の患者で少なくとも 1 つの遺伝子にメチル化を認めた。再発時に *p16* および *MGMT* 遺伝子にメチル化を認めた症例では、全例において初回診断時にすでにメチル化しており、これらのメチル化は小児 ALL の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、再発時に *RARβ* 遺伝子がメチル化していた 4 例のうち 3 例は初回診断時にメチル化が認められなかった。

以上の結果より、次の点が明らかとなった。①小児 ALL において、*Hel-N1* 遺伝子は 9p21 における標的遺伝子ではないと考えられる。そのため小児 ALL の発症に関与している他の癌抑

制遺伝子の存在を示唆する。②胚細胞変異に引き続いて起こった LOH によって正常アレルが欠失し、*p27/Kip1* 遺伝子の機能が完全に失われて白血病化したと示唆された。③検討した遺伝子のメチル化が小児 ALL の発症に関与している事が示唆された。また、*p16* および *MGMT* のメチル化は初発時から発症に関与しており *RARβ* 遺伝子のメチル化は再発に関与していることが示唆された。

上記の内容に関して口頭発表が行われ、質疑応答がなされた結果、審査員一同はこれらの論文が本学学位論文として十分な内容を有するものと判定した。

氏名(本籍)	東 祐史(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第13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17年4月5日
学位論文題目	Expression and localization of histamine receptors in rat cochlea (ヒスタミンレセプターのラット内耳における発現と局在) [1] Expression of mRNA encoding the H1, H2, and H3 histamine receptors in the rat cochlea (ラット内耳におけるヒスタミンH1, H2, H3レセプターの発現) [2] Immunohistochemical localization of histamine receptors in rat cochlea (ラット内耳におけるヒスタミンレセプターの免疫組織学的局在)
発表誌名	[1] Neuroreport 14(3);423-425 2003年3月 [2] Laryngoscope 114(12);2249-2251 2004年12月

審査委員	主査 教授	瀬口 春道
	副査 教授	椛 秀人
	副査 教授	橋本 浩三

論文の内容の要旨

【目的】ヒスタミンは生体アミンのひとつであり、中枢神経系では、ヒスタミンニューロンとして神経伝達物質または神経調節物質として働いており、ヒスタミンレセプターが広範に局在し、睡眠覚醒、神経内分泌、摂食や自律神経機能などに関与している。また、末梢では即時型免疫反応や胃酸分泌に関与していることが知られている。

さらに、ヒスタミンの標的細胞に発現しているヒスタミンレセプターは、H1, H2 および H3 レセプターに分類され、これらを介してさまざまな生理作用を担っている。

内耳とヒスタミンの関係については、内耳微小循環や神経伝達物質に関する報告があるが、その受容体の発現や局在に関する報告はない。そこで今回、RT-PCR と免疫染色を用いてヒスタミンレセプターのラット内耳における発現と局在について検討した。

【方法】

1. RT-PCR

対象は Wistar 系ラット 12 匹、灌流はネンブタール深麻酔下に PBS にて、経心灌流ののち、脳、内耳を直ちに摘出し、total RNA を抽出した。それとは別に、内耳を実体顕微鏡下に lateral portion (血管条、ラセン靭帯)、medial portion (コルチ器)、modiolus (蝸牛軸) に分離採取し、同様に total RNA を抽出し、DNase 処理を加えた。

RT-PCR は、Total RNA を逆転写し cDNA を作成、内耳および脳組織の cDNA について、H1, H2 および H3 レセプターに対する特異的なプライマーを用いて PCR を施行。

PCR産物の検出は、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色で行った。
また、それぞれのPCR産物はサイクルシーケンス法にて塩基配列を確認した。

2. 免疫染色

対象はWistar系ラット。PBS、4%パラホルムアルデヒドにて経心灌流ののち、側頭骨を採取し、24時間固定、10%EDTAにて1週間脱灰ののち凍結切片を作成。10%ヤギ血清でブロッキングしたのち、一次抗体でovernightインキュベーション。

一次抗体には、Chemiconのrabbit anti-histamine H1, H2, H3 receptorをそれぞれ使用、抗体濃度は1:200。二次抗体にはAlexa546 anti-rabbit antibodyを用いて6時間インキュベーションしたのち、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3. 二重染色

さらに、ラセン神経節細胞I型、II型細胞のどちらが免疫陽性か調べるために、II型細胞で陽性を示すneurofilament 200kDとヒスタミンレセプターの二重染色をそれぞれ行い、同様に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】

1. RT-PCR

ラットの内耳と脳において、それぞれH1, H2, H3レセプターの発現を認め、シーケンスでは、それぞれ既知の塩基配列と一致した。

内耳をそれぞれ、modiolus, medial portion, lateral portionに分けたサンプルのRT-PCRの結果は、H1, H2, H3レセプターともにmodiolusのみに発現していた。

1. 免疫染色

H1, H2, H3レセプターともにラセン神経節のみに陽性に染まり、血管条やラセン靭帯、コルチ器などには陽性所見は認められなかった。

3. 二重染色

ラセン神経質細胞において、neurofilament 200kDで陽性を示すII型細胞では、ヒスタミンH1, H2, H3レセプターともにほとんど陽性を示さなかった。

【考察】

内耳におけるヒスタミンの生理学的な機能については、いくつかの報告があるが、明らかでない点が多い。カエルの平衡器官の電気生理学的な実験で、ヒスタミンは前庭有毛細胞の神経伝達物質として働く可能性が示唆されている。

しかしながら、蝸牛については、ほ乳類内耳におけるヒスタミンの電気生理学的な報告が2つあるだけである。Minodaらは10, 50microMの鼓室階へのヒスタミン灌流ではCompound Action Potentialの増加を認め、この増加はヒスタミンH1, H2レセプターのアнтаゴニストによって抑制されたと報告しており、ヒスタミンが内耳において神経伝達物質として働いている可能性と、ヒスタミンレセプターの内耳における存在の可能性を示唆していた。

今回、ヒスタミンレセプターが、ラセン神経節細胞に発現していたことにより、ヒスタミンが内耳において何らかの生理的な機能をもっている可能性が考えられた。

しかし、今後、さらに生理実験を行い、内耳へどのような影響を与えるか、明らかにする必要があると考える。

論文審査の結果の要旨

【目的】ヒスタミンは生体アミンのひとつで、正常組織、血液中など広く生体内に存在することが知られている。中枢神経系では、ヒスタミンニューロンとして神経伝達物質または神経調節物質として働いており、ヒスタミンレセプターが広範に局在し、睡眠覚醒、神経内分泌、摂食や自律神経機能などに関与している。また、末梢では即時型免疫反応や胃酸分泌に関与していることが知られている。ヒスタミンの標的細胞に発現しているヒスタミンレセプターは、H1, H2 および H3 レセプターに分類され、これらを介してさまざまな生理作用を担っている。内耳とヒスタミンの関係については、内耳微小循環や神経伝達物質に関する報告が見られるが、その受容体の発現や局在に関する報告は全くない。本学位申請者は、RT-PCR (論文1) と免疫染色 (論文2) を用いて、ヒスタミンレセプターのラット内耳における発現と局在について検討を行った。

【方法および結果】

1. RT-PCR

材料として Wistar 系ラットを用いた。ネンブタール深麻酔下に PBS にて経心灌流の後、脳、内耳を摘出、total RNA を抽出した。それとは別に、内耳を実体顕微鏡下に lateral portion (血管条、ラセン靭帯)、medial portion (コルチ器)、modiolus (蝸牛軸) に分離採取し、同様に total RNA を抽出し、DNase 処理を加えた。RT-PCR は、total RNA を逆転写し cDNA を作成、内耳および脳組織の cDNA について、H1, H2 および H3 レセプターに対する特異的なプライマーを用いて PCR を施行した。PCR 産物の検出は、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色で行った。また、それぞれの PCR 産物はサイクルシーケンス法にて塩基配列を確認した。

ラットの内耳と脳において、H1, H2, H3 レセプターの発現を認めた。シーケンスは、それぞれ既知の塩基配列と一致した。内耳をそれぞれ、modiolus, medial portion, lateral portion に分けたサンプルの RT-PCR の結果は、H1, H2, H3 レセプターともに modiolus のみに発現していた。

2. 免疫染色

Wistar 系ラットを PBS 緩衝 4%パラフォルムアルデヒドにて経心灌流の後、側頭骨を採取、24時間同固定液にて固定後、10%EDTA にて1週間脱灰、凍結切片を作成した。10%ヤギ血清でブロッキングした後、Chemicon の rabbit anti-histamine H1, H2, H3 receptor 一次抗体を 1:200 に希釈し、overnight 反応した。二次抗体には Alexa546 標識 anti-rabbit antibody を用いて6時間反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ラセン神経節細胞において、neurofilament 200kD で陽性を示すⅡ型細胞では、ヒスタミン H1, H2, H3 レセプターともに殆ど陽性を示さなかった。

3. 二重染色

ラセン神経節細胞 I 型、II 型細胞のどちらが免疫陽性が調べるために、II 型細胞で陽性を示す neurofilament 200kD とヒスタミンレセプターの二重染色をそれぞれ行い、同様に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

H1, H2, H3 レセプターともに I 型ラセン神経節のみに陽性に染まり、血管条やラセン靭帯、コルチ器などには陽性所見は認められなかった。

【考察】

これらの結果より、ヒスタミンレセプターは、H1, H2, H3 レセプターともに I 型ラセン神経節細胞にのみに発現していた。内耳におけるヒスタミンの生理学的な機能については、いくつかの報告があり、カエルの平衡器官の電気生理学的実験で、ヒスタミンは前庭有毛細胞の神経伝達物質として働く可能性が示唆されている。また、蝸牛については、哺乳類内耳におけるヒスタミンの電気生理学的報告が 2 つ見られ、Minoda らは 10, 50 μ M の鼓室階へのヒスタミン灌流では Compound Action Potential の増加を認め、この増加はヒスタミン H1, H2 レセプターのアンタゴニストによって抑制されたと報告しており、ヒスタミンが内耳において神経伝達物質として働いている可能性と、ヒスタミンレセプターの内耳における存在の可能性を示唆していた。しかしながら、内耳におけるヒスタミンの機能については、まだ不明な点が多く、ヒスタミンが内耳において何らかの生理的な機能をもっている可能性が考えられ、今後、さらに生理実験を行い、内耳へどのような影響を与えるか、明らかにする必要がある。

以上、本学位申請者は、ヒスタミン H1, H2, H3 レセプターが、内耳の I 型ラセン神経節細胞に局在することを、初めて明らかにした。本研究に用いた方法は適切で、結果、考察ともに良く記載されている。今後、内耳におけるヒスタミンの機能につき、明らかにしていく必要があるが、本論文はその基礎として、独創性に富み、有意義である。よって審査員一同は、本論文を学位の授与に値するものと判定した。

氏名(本籍)	大田 喜久子(兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第14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17年4月5日
学位論文題目	Effect of pitavastatin on transactivation of human serum paraoxonase 1 gene (ピタバスタチンの血清パラオキシナーゼ遺伝子転写に及ぼす影響)
発表誌名	Metabolism 54(2):142-150 2005年2月

審査委員	主査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	杉浦	哲朗

論文の内容の要旨

【目的】血清パラオキシナーゼ1 (PON1) は、高比重リポ蛋白 (HDL) 上に存在し、低比重リポ蛋白 (LDL) の酸化を抑制することにより、動脈硬化の進展を抑制すると推定されている。われわれは PON1 遺伝子の転写に、転写因子 Sp1 が関与していることを報告した。一方、HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) が動脈硬化を抑制する機序として、コレステロール低下作用によらない別の多面的作用が注目を集めている。そのひとつにスタチンの抗酸化作用が推定されるが、その詳細な機序については明らかでない。これらのことより、スタチンの抗酸化作用に PON1 が関与するかどうかは重要な問題である。今回、われわれは、スタチンが PON1 プロモーター活性に及ぼす影響を、培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにて検討した。

【方法】PON1 遺伝子 5' 上流にあるプロモーター領域の種々の長さの DNA 配列を、ルシフェラーゼ発現ベクターに導入した。これらを培養細胞 (HepG2 細胞および HEK293 細胞) にトランスフェクションした後、スタチンにより刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、PON1 遺伝子上流に結合する転写因子 Sp1 の影響については、ゲルシフトアッセイ (EMSA) にて検討した。

【結果】(1) Sp1 結合部位を含むプロモーター領域を導入した発現ベクターでは、HepG2 細胞において、スタチンのひとつであるピタバスタチン刺激により PON1 プロモーター活性は増強したが、Sp1 結合部位を含まない領域を導入した発現ベクターでは増強しなかった。

(2) PON1 プロモーター活性は、ピタバスタチン刺激後 24 時間で最大となり、その作用はピタバスタチンの濃度依存性に増強した。(3) HEK293 細胞においても、同様にピタバスタチン刺激で PON1 プロモーター活性は増強した。(4) ピタバスタチン以外の脂溶性スタチンであるアトロバスタチン、シンバスタチンでも同様に PON1 プロモーター活性は増強した。(4) Sp1 の過剰発現により PON1 プロモーター活性は増強し、Sp1 阻害剤である

ミトラマイシン添加により、ピタバスタチンによる PON1 プロモーター活性の増強作用は消失した。(5) EMSA においては、PON1 遺伝子上流の DNA フラグメントと Sp1 の結合を認めたが、ピタバスタチン刺激でその結合に変化はみられなかった。(6) ピタバスタチン刺激による PON1 プロモーター活性の増強作用は、メバロン酸代謝カスケードの中間代謝産物であるメバロン酸 (MV) あるいはファルネシルピロリン酸 (FPP) の同時添加で減弱するが、ゲラニルゲラニルピロリン酸の同時添加では不変であった。(7) ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤添加では PON1 プロモーター活性は増加するが、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤添加では増加しなかった。

[結論]ピタバスタチンは、HepG2 細胞、HEK293 細胞において、抗酸化作用をもつ PON1 のプロモーター活性を増加させたことより、スタチンの抗酸化作用の中には PON1 を介した機序が存在することが推定された。また、その作用は、メバロン酸代謝カスケード中の MV、FPP の抑制を介した機序であることが明らかとなった。さらに、スタチンの PON1 プロモーター活性増強作用は、最終的には転写因子 Sp1 を介していることが示された。今後、スタチンと PON1 の関連をさらに詳細に検討していくことは、動脈硬化進展の抑制を考えるうえで有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

血清パラオキシナーゼ 1 (PON1) は、高比重リポ蛋白 (HDL) 上に存在し、低比重リポ蛋白 (LDL) の酸化を抑制することにより、動脈硬化の進展に対して抑制的に作用すると考えられている。申請者らのグループは最近 PON1 遺伝子の発現には、転写因子 Sp1 の作用が重要であることを明らかにし報告している。一方、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) が動脈硬化を抑制する機序として、コレステロール低下によらない多面的な作用が注目されている。その内の一つとしてスタチンの抗酸化作用が挙げられるが、その機構については不明である。そこで、申請者らはスタチンの抗酸化作用に PON1 が関与しているのではないかという仮説を立て、その検証のためスタチンの PON1 遺伝子の発現に及ぼす作用とその機構について解析を行なった。

方法としては、PON1 遺伝子の発現制御領域とルシフェラーゼ遺伝子とを連結して作製したレポーターを HepG2 あるいは HEK293 細胞株に導入した後、培養液に種々の薬剤や阻害剤を添加してルシフェラーゼ活性を測定し、PON1 遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。また、PON1 遺伝子プロモーターに結合する転写因子 Sp1 への影響については、ゲルシフトアッセイ (EMSA) を用いて検討した。

得られた結果は以下のようにまとめられる。

- 1) PON1 遺伝子発現制御領域の内 Sp1 結合配列を含む領域を導入したレポーターの使用では、HepG2 細胞において、スタチンの一つであるピタバスタチンの添加が PON1 の転写活性を増強したが、Sp1 結合配列を欠く領域を導入したレポーターでは増強作用を認めなかった。

- 2) ピタバスタチン刺激による PON1 転写活性の増強は、刺激後 24 時間で最大となった。また、加えたピタバスタチンの濃度依存性に増強された。
- 3) ピタバスタチン以外の脂溶性スタチンであるアトロバスタチン、シンバスタチンも同様に PON1 の転写活性を増強した。また、この増強作用は肝臓由来の細胞だけでなく腎臓由来の HEK293 細胞においても認められた。
- 4) Sp1 の過剰発現により PON1 転写活性は増強し、Sp1 阻害剤であるミトラマイシン添加により、ピタバスタチンによる PON1 転写の増強作用は消失した。
- 5) Sp1 は PON1 遺伝子プロモーターを含む DNA 断片と結合して複合体を形成するが、ピタバスタチン刺激によりその活性に変動を認めなかった。
- 6) ピタバスタチン刺激による PON1 転写活性の増強作用は、メバロン酸代謝経路の中間代謝産物であるメバロン酸あるいはファルネシルピロリン酸の同時添加により抑制されたが、ゲラニルゲラニルピロリン酸の同時添加では不変であった。
- 7) ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の添加により PON1 転写活性は増強したが、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤の添加では不変であった。

以上により申請者らは、ピタバスタチンが LDL の酸化を抑制する PON1 の転写を増強する作用をもつことを発見し、スタチンの抗酸化作用の中には PON1 を介した機序が存在する可能性を示した。また、その作用は、メバロン酸代謝経路中のメバロン酸あるいはファルネシルピロリン酸の抑制を介したものであることを明らかにした。さらに、スタチンによる PON1 転写の増強は、最終的には転写因子 Sp1 の作用を介して生じるが、スタチンが Sp1 の PON1 プロモーターへの結合には影響しなかったことから、その機構として DNA 結合能以外の転写機能の活性化、あるいは、Sp1 以外の転写因子も関与している可能性が示唆された。

本論文は、スタチンが抗酸化作用をもつ PON1 の遺伝子発現を活性化することを、作用機序の一部の解明とともに示したものであり、高知大学博士（医学）の学位に十分値するものと評価した。

氏名(本籍)	大西 剛直 (大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第15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17年4月19日
学位論文題目	CYP17 polymorphism as a risk factor of tamoxifen-induced hepatic steatosis in breast cancer patients (タモキシフェン誘発性脂肪肝の発症におけるCYP17遺伝子多型の関連)
発表誌名	ONCOLOGY REPORTS 13(3):485-489 2005年3月

審査委員	主査	教授	橋本 浩三
	副査	教授	中村 裕之
	副査	教授	荒木 京二郎

論文の内容の要旨

【背景】

乳癌内分泌治療の第一選択薬であるタモキシフェンは高頻度に脂肪肝を誘発するが、近年、これらに非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)が含まれることや、肝硬変への進行例も報告され、そのリスクの把握と管理に関心が高まっている。特に、肥満や糖尿病、高脂血症を有する症例は高リスク群とされ、より厳重な管理が求められている。しかし、これらを伴わない患者においても、タモキシフェンの内服中に約30%が脂肪肝を呈しており、他の因子の影響も疑われる。今回我々は、アロマターゼ欠損マウスにおいて、エストロゲン欠乏と脂肪肝の関連が示された過去の報告を基に、エストロゲン濃度に影響を与えるとされる酵素 P450c17 α の遺伝子多型 CYP17(T1931C 変異)に着目し、本症への遺伝的関与の有無を検証した。

【対象と方法】

タモキシフェンの内服を2年以上継続した女性乳癌患者180例を対象とした。平均年齢は49.6歳(21~80歳)で、body mass index (BMI) の平均値は22.9 kg/m²(16.2~31.3 kg/m²)であった。内服開始時に、(1) アルコール多飲歴(>20 g/day)、(2) 糖尿病、(3) 既知の脂肪肝、(4) 既知の肝炎、肝機能異常、(5) ステロイド療法の既往、を有する症例は除外した。

肝の脂肪沈着は、年に1度の非造影CTにより評価した。診断は、村田らの方法に準じ、肝実質と脾実質に設定した複数の関心領域(ROI)からCT値を計測し、両者の比(肝脾比)の最低値が0.9未満であったものを脂肪肝とした。

多型解析には、末梢血より型のごとく抽出したDNAに対しPCR-RFLP法を用い、判定された対立遺伝子は、過去の報告に基づいてA1(1931T)とA2(1931C)に分類した。

タモキシフェンの内服中に脂肪肝を発症した症例と発症しなかった症例において、両群の多型分布を比較検討した。また、肝脾比を評価した時期のBMI、空腹時血糖、総コレステロール、ALT、ASTについて多型別の平均値を比較し、これらとの因果関係の有無について調べた。統計解析には、カイ2乗検定とStudent's t-testを用いた。

【結果】

タモキシフェンの内服中、31.7% (57/180 例)が肝脾比 0.9 未満により脂肪肝と診断された(平均年齢 50.0 歳, SD = 11.7 歳; 平均 BMI 24.3kg/m², SD = 2.5kg/m²)。一方、68.3% (123/180 例)は肝脾比の低下を認めなかった(平均年齢 49.3 歳, SD = 11.4 歳; 平均 BMI 22.3kg/m², SD = 2.7kg/m²)。

遺伝子型は、脂肪肝群で A1/A1 が 10 例 (17.5%)、A1/A2 が 29 例 (50.9%)、A2/A2 が 18 例 (31.6%) で、非脂肪肝群では、A1/A1 が 44 例 (35.8%)、A1/A2 が 57 例 (46.3%)、A2/A2 が 22 例 (17.9%) であった。2 群間の分布には有意差が認められ ($p = 0.021$)、脂肪肝群で A2 のアレル頻度は有意に高かった(オッズ比 = 1.90, 95%信頼区間 = 1.21- 2.99)。

A2 保有群(126 例)と非保有群(54 例)の比較において、肝脾比の平均値は有意差を示したが (0.84±0.44 vs. 1.01±0.34; $p = 0.02$)、BMI、空腹時血糖、総コレステロール、ALT、AST には差異を認めなかった ($p > 0.05$)。

【結論】

タモキシフェン内服中の脂肪肝発症に CYP17 多型の関与が示唆された。酵素 P450c17 α の転写活性に影響を与え、エストロゲン合成を促進させるとされる A2 遺伝子は、今回の検討で脂肪肝のリスクアレルであることが示唆された。今後、その重み付けを行うために、関連因子の更なる探索と、因子間の相互作用について検証していくことが重要と考える。このような取り組みは、病因の解明に大きく貢献するとともに、患者ごとに異なるリスクの把握と管理を可能にするものと思われる。

論文審査の結果の要旨

乳癌患者に対する内分泌治療として使用されるタモキシフェンは高頻度に脂肪肝を誘発し、一部は非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis ; NASH) や肝硬変に進展させることが知られている。その原因としてタモキシフェンがエストロゲン受容体でエストロゲンと拮抗することによるエストロゲン作用阻害が考えられている。一般に NASH では肥満、高中性脂肪血症、インスリン抵抗性がリスクファクターとされているが、これらのリスクを持たない患者でも、タモキシフェンにより脂肪肝が発症しており、他の因子が発症に関与していることも考えられる。本研究で申請者らは、エストロゲン産生に影響を与えると考えられるステロイド産生酵素 P450c17 α (17 α hydroxylase/17, 20-lyase) をコードしている遺伝子である CYP17 の遺伝子多型と、タモキシフェンによる脂肪肝発症との関連について検討した。

対象は、女性乳癌患者 180 名であり、年齢は 21~80 歳 (平均 49.6 歳)、体格指数 (BMI) は 16.2~31.3 kg/m² (平均 22.9 kg/m²) である。これらの患者は乳癌の保存的手術、全身的化学療法、乳房や腋窩リンパ腺への放射線療法に加え、タモキシフェンを 2 年間以上 (3 年間は 40 mg/day、その後は 20 mg/day) 内服している。

内服開始時に、アルコール多飲歴 (>20 g/day)、糖尿病、脂肪肝、肝炎、肝機能障害の既往歴、ステロイドによる治療歴を有する患者は対象から除外している。脂肪肝の診断は年1度非造影 CT 撮影を行い、肝臓と脾臓に設定した複数の領域から CT 値を計算し、肝臓と脾臓の CT 値の比 (L/S ratio) の最低値が 0.9 未満のものを脂肪肝とした。CYP17 の遺伝子多型の検索は、末梢血から抽出した DNA を用い、CYP17 のプロモーター部分の多型を含む 421 塩基を PCR 法で増幅し、制限酵素 MspA II を用いた RFLP 法により行った。判定されたアレルのうち 1931T を A1、1931C を A2 と分類した。

得られた結果として、180 名のタモキシフェン内服患者中 31.7% (57 名; 平均 BMI 24.3 kg/m²) が脂肪肝と診断された。脂肪肝を呈した群のうち、CYP17 の遺伝子型が A1/A1 を持つ者が 17.5% (10 名)、A1/A2 が 50.9% (29 名)、A2/A2 が 31.6% (18 名) であった。脂肪肝を呈さなかった 123 名 (平均 BMI 22.3 kg/m²) では A1/A1 が 35.8% (44 名)、A1/A2 が 46.3% (57 名)、A2/A2 が 17.9% (22 名) であった。両群間で多型の頻度分布に有意差 (p=0.021) が認められた。また、脂肪肝を呈した群で A2 のアレル頻度が有意に高頻度であった (P=0.005、オッズ比=1.90)。A1/A1 群と A2 アレルを有する群 (A1/A2 群+A2/A2 群) の間で、L/S ratio の平均に有意差が認められたが (1.10±0.34 vs 0.84±0.44; P=0.02)、ALT、AST、BMI、空腹時血糖、総コレステロール値には差が認められなかった。

申請者らは、以上の結果や脂肪肝の発症リスクファクターとして報告されている他の因子の遺伝子多型とタモキシフェンによる脂肪肝の発症に関連がないことから、CYP17 の A2 アレルがタモキシフェンによる脂肪肝発症のリスクファクターであると結論した。今回検討された多型は CYP17 のプロモーター領域に存在し、一般に A2 アレルは、CYP17 の転写活性を亢進させることより、A2 アレルは血中エストロゲン濃度上昇に関与することも報告されている。タモキシフェンによる脂肪肝発症の原因が、エストロゲンの作用阻害とされていることを考えれば、今回の結果は一見矛盾する結果である。しかし、タモキシフェン使用前に A2 アレル保有者がより高いエストロゲン濃度を有しているとするれば、タモキシフェン内服によるエストロゲン濃度の低下や作用の阻害が、脂肪肝発生により強い影響を及ぼした可能性がある。今回はこの点を実証するには至っておらず、今後これらの点や他の因子間との相互作用などを検証していくことが課題である。しかし、本論文は、タモキシフェンによる脂肪肝発症に CYP17 の多型が関与しており、エストロゲン合成を促進させるとされる A2 アレルが、脂肪肝のリスクであることを初めて明らかにした点で、独創性に富み、意義がある。したがって本論文は博士の学位の授与に値するものと判定された。