

2016. 5

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人  
高知大学学報

高知大学学位授与記録第七十九号

総務課広報係発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づきその論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

| 学位記番号    | 氏 名    | 学 位 論 文 の 題 目  | ページ |
|----------|--------|--|-----|
| 甲医博第156号 | 長瀧 充   | Mitochondrial DNA sequences of 37 collar-spined echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR reveals presence of two species: <i>Echinostoma revolutum</i> and <i>E. miyagawai</i><br>(タイとラオスにおける棘口吸虫のミトコンドリアDNAを用いた集団遺伝学的解析)  | 1   |
| 甲総医博第39号 | 芥川 知彰  | A new method for characterizing hand dysfunction in cervical spondylotic myelopathy: A preliminary study<br>(頸部脊椎症における上肢機能障害の新しい評価法の予備的研究)   | 6   |
| 甲総医博第40号 | 廣橋 健太郎 | Photothermal Ablation of Human Lung Cancer by Low-power Near-Infrared Laser and Topical Injection of Indocyanine Green<br>(ヒト肺癌に対する低出力近赤外線レーザーとインドシアニングリーンの局所注入を併用した光温熱治療)   | 10  |
| 甲総医博第41号 | 八百川 心  | Serial Assessment of Therapeutic Response to a New Radiosensitization Treatment, Kochi Oxydol-Radiation Therapy for Unresectable Carcinomas, Type II (KORTUC II), in patients with stage I/II Breast Cancer Using Breast Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging<br>(乳房造影MRIを用いて行ったI/II期の乳癌患者を対象とした新しい放射線増感療法(KORTUC II)の治療効果の評価) | 15  |
| 甲総医博第42号 | 仙頭 慎哉  | Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells induced by Tumor Cell-Derived Exosomes<br>(ヘパリン持続投与は口腔扁平上皮癌細胞由来のエクソソームによる癌の悪性度の亢進を抑制する)  | 20  |

| 学位記番号    | 氏 名    | 学 位 論 文 の 題 目  | ページ |
|----------|--------|--|-----|
| 甲総医博第43号 | 仲井 めぐみ | Bangle ( <i>Zingiber purpureum</i> ) improves spatial learning, reduces deficits in memory and promotes neurogenesis in the dentate gyrus of senescence-accelerated mouse P8<br>(インドネシア産ショウガ科食用植物Bangleの老化促進モデルマウスに対する認知機能改善効果)        | 26  |
| 甲総医博第44号 | 野口 修平  | Regulation of Gene Expression by Sodium Valproate in Epithelial-to-Mesenchymal Transition<br>(上皮間葉転換におけるバルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現制御)  | 32  |
| 甲総医博第45号 | 大出 佳寿  | Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease<br>(CKD患者における血漿可溶性プロレニン受容体の臨床的意義について)  | 37  |
| 甲総医博第46号 | 松本 竜季  | Small Heat Shock Protein Beta-1 (HSPB1) Is Upregulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury<br>(HSPB1 (Small Heat Shock Protein Beta-1) は急性腎障害において誘導され近位尿細管細胞のAutophagyとApoptosisを調整する) | 42  |

|         |   |
|---------|---|
| 氏名(本籍)  | 長瀧 充 (高知県)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 甲医博第156号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与年月日 | 平成28年2月23日  |
| 学位論文題目  | Mitochondrial DNA sequences of 37 collar-spined echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR reveals presence of two species: <i>Echinostoma revolutum</i> and <i>E. miyagawai</i><br>(タイとラオスにおける棘口吸虫のミトコンドリアDNAを用いた集団遺伝学的解析) |
| 発表誌名    | Infection, Genetics and Evolution 35: 56-62 2015年7月   |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 椎  | 秀人 |
|      | 副査 | 教授 | 菅沼 | 成文 |
|      | 副査 | 教授 | 奥原 | 義保 |

## 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 長 瀧 充

## 論文題目

Mitochondrial DNA sequences of 37 collar-spined echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR reveals presence of two species: *Echinostoma revolutum* and *E. miyagawai*.

(タイとラオスにおける棘口吸虫のミトコンドリア DNA を用いた  
集団遺伝学的解析)

(論文要旨)

寄生蠕虫類の一種である棘口吸虫は、世界各地に分布しており、人獣共通感染症である棘口吸虫症の病原体である。生活史は種により若干異なるが、概ね虫卵、ミラシジウム（第 1 中間宿主へ感染）、スポロシスト、レジア、セルカリア（第 2 中間宿主へ感染）、メタセルカリア（終宿主へ感染）、成虫へと形態を変化させる。第 2 中間宿主に寄生している幼虫（メタセルカリア）を経口摂取することによりヒトへの感染が成立する。主な症状は、腹痛、下痢、鼓腸、仙痛などであるが、特に小児では重篤な貧血、浮腫、十二指腸潰瘍を引き起こすこともある。主な診断方法としては、ホルマリン・エーテル法による糞便からの集卵、もしくは Kato-Katz 法による虫卵の検出である。第一選択薬としてプラジカンテル、その他メベンタゾール、オキシクロザニドによる治療方法が確立されている。ヒトへの感染例は特に東南アジアで多いが、疫学、ならびに生物学的研究についてはあまり報告されてこなかった。最近の調査によれば、2000-2004 年にラオスのメコン川流域の村々で 2074 名を対象に検査を行ったところ 22 名（1.1%）に、および 2007 年 6 月にカンボジアで 471 名を対象とした場合にも 56 名（11.9%）に感染が確認されるなど、比較的高い罹患率が認められている。

棘口吸虫は、世界的には少なくとも 60 種が知られ、その内 20 種がヒトに感染する。その 20 種の中でも 37 本の collar-spine（頭冠歯棘）を有する棘口吸虫、即ち「(*Echinostoma*) *revolutum* グループ」に分類されているものは極めて多くの多様性があり 10 種を占めている。特に *E. revolutum* がヨーロッパから、アジア、オセアニア、アメリカ大陸まで最も広く分布している種であり、東南アジアではこの *E. revolutum* が *revolutum* グループによる棘口吸虫症の主な病原種と考えられていた。近年、ミトコンドリア DNA における遺伝学的解析により、中央・北部ヨーロッパや北アメリカにおける cryptic 種の存在が明らかとなった。本研究では、東南アジアにおける *revolutum* グループの遺伝的多様性を明らかにすることを目的とし、タイおよびラオスでの調査を行った。




方法として、まず食肉処理施設で処理される家畜アヒルの腸より *E. revolutum* の成虫の回収を試み、タイ 10 施設より 92 個体、およびラオス 1 施設より 9 個体の計 101 個体が得られた。個体ごとに DNA 抽出、PCR による増幅を行い、ミトコンドリア DNA における 2 つの遺伝子領域、即ち CO1 領域の部分塩基配列 382bp、および ND1 領域の部分塩基配列 448bp を決定し、系統樹解析、ハプロタイプネットワーク解析、遺伝的分化解析を行った。

その結果、CO1 領域の Neighbor-joining (NJ) 法を用いた系統樹解析によって、タイとラオスの *revolutum* グループは、2つの種 (*E. revolutum*、*E. miyagawai*) に分類されることが明らかとなった。そして、種内の遺伝的多様性を CO1 領域に基づき解析したところ、*E. revolutum* は6ハプロタイプ、*E. miyagawai* は26ハプロタイプに分類された。*E. revolutum* と *E. miyagawai* の2種に分類されたそれらのデータを基に、東南アジア (タイとラオス) の *E. revolutum* 8個体、および *E. miyagawai* 14個体の計22個体について、ND1 遺伝子の部分塩基配列 448bp を決定し、アメリカ、ヨーロッパ、オーストラリアにおけるさらに多くのシーケンスデータを用いて大陸間での比較を行った。ND1 領域の Maximum Likelihood (ML) 法による系統樹解析によって、*E. revolutum* を大陸間で比較すると、東南アジア系統はヨーロッパ系統とクラスターを形成し、アメリカ系統とは形成しなかった。ハプロタイプ解析では、アメリカとユーラシア (東南アジア・ヨーロッパ) との間には20塩基サイトにおける置換による差異が認められた。さらに、その有意性を遺伝的分化解析により調べるため、集団間の固定指数  $\Phi_{ST}$  を算出した。アメリカと東南アジア間は、CO1 では  $\Phi_{ST}=0.797$  ( $P<0.001$ )、ND1 では  $\Phi_{ST}=0.862$  ( $P<0.001$ )、アメリカとヨーロッパ間の ND1 では  $\Phi_{ST}=0.856$  ( $P<0.001$ ) であり、各系統間に高度な遺伝的分化が存在することが明らかとなった。ちなみに、*E. miyagawai* の ND1 における東南アジア、ヨーロッパ、オーストラリアの各相互間では、 $\Phi_{ST}=0.021\sim 0.028$  ( $P=0.054\sim 0.171$ )、*E. revolutum* の ND1 における東南アジアとヨーロッパ間では、 $\Phi_{ST}=0.033$  ( $P=0.153$ ) であり、いずれも有意な遺伝的分化は認められなかった。

結論として、東南アジアで自由放牧されているアヒルの腸に寄生していた *revolutum* グループの集団遺伝学的解析により、*E. revolutum*、*E. miyagawai* の2つの複合種の存在を示唆する有力な証拠が明らかとなった。東南アジアにおける、*E. miyagawai* の存在が明らかとなったのは、今回が初めてである。また、*E. revolutum* は東南アジアを含むユーラシア大陸とアメリカ大陸との系統間で大きく異なることが明らかとなった。以前の東南アジアにおける症例では、形態学的特徴から *E. revolutum* であると結論付けられていた。しかし、本研究のサンプルでは、101個体中92個体は *E. miyagawai* であり、26ハプロタイプと遺伝的多様性も比較的高かったことから、以前の症例報告における病原虫は *E. revolutum* ではなく、*E. miyagawai* であった可能性が高い事が示唆された。また、以前に報告された系統樹解析データにおいても、小さなサンプルサイズと形態学的特徴による種の決定に誤りが認められた。現在の形態学的方法のみでは特異的な診断に乏しく、以前の症例報告の多くには誤診があった可能性が高いと考えられる。本研究によって、系統樹解析とハプロタイプネットワーク解析を併用した集団遺伝学的解析は、これらの多くの誤りを解決に導くための非常に有効なツールであるということが示唆された。また、遺伝学的データに基づいて確定されたサンプル種による形態学的診断法の見直しが急務であり、詳細なデータの収集を行っていくと共に、より大きなサンプルサイズでの *revolutum* グループの遺伝的多様性を調査する必要がある。

最後に、寄生蠕虫類の薬剤耐性株による影響が年々深刻化してきている。プラジカンテルに耐性を示すマンソン住血吸虫、およびベトナムにおける肝吸虫に対するプラジカンテルの有効性が低いことなどが報告されており、棘口吸虫のハプロタイプの違いによって、有効な薬剤が異なる可能性も示唆される。今後、寄生虫の薬剤感受性、耐性に関わるハプロタイプの調査の重要性はますます高まっていくと考えられる。

論文審査の結果の要旨

|      |      | 氏名    | 長瀧 充  |
|------|------|-------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 栂 秀人  |  |
|      | 副査氏名 | 菅沼 成文 |  |
|      | 副査氏名 | 奥原 義保 |  |

題目 Mitochondrial DNA sequences of 37 collar-spined echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR reveals presence of two species: *Echinostoma revolutum* and *E. miyagawai*  
 (タイとラオスにおける棘口吸虫のミトコンドリアDNAを用いた集団遺伝学的解析)

著者 Mitsuru Nagataki, Chairat Tantrawatpan, Takeshi Agatsuma, Tetsuro Sugiura, Kunyarat Duengai, Paiboon Sithithaworn, Ross H. Andrews, Trevor N. Petney, Weerachai Saijuntha

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Infection, Genetics and Evolution 35:56-62  
 2015年7月

要旨

寄生蠕虫類の一種である棘口吸虫は、人獣共通感染症の1つ、棘口吸虫症の病原体である。成虫はイヌ・ネズミ・ヒト等の哺乳類の腸管に寄生する。糞便と共に排出された中卵が水中で孵化し、モノアラガイ等の淡水巻貝を経てドジョウ、カエル、サンショウオなどの筋肉内に幼虫として寄生する。幼虫を摂取することで感染する。

主に家禽やヒトに寄生する棘口吸虫は、分子的に高度の多様性を有することが指摘されていた。*Echinostoma (E.) revolutum* がヨーロッパから、アジア、オセアニア、アメリカ大陸まで最も広く分布している種であり、東南アジアではこの *E. revolutum* が *revolutum* グループによる棘口吸虫症の主な病原種と考えられていた。本研究では、東南アジアにおける *revolutum* グループの遺伝学的多様性を明らかにする目的で、タイとラオスの家畜アヒルの腸より *E. revolutum* の成虫の回収を試み、タイ 10 施設より 92 個体とラオス 1 施設より 9 個体の計 101 個体を得られた。個体ごとに DNA 抽出、PCR による増幅を行い、ミトコンドリア DNA における 2 つの遺伝子領域、すなわち COI 領域の部分塩基配列 382bp と ND1 領域の部分塩基配列 448bp を決定し、系統樹解析、ハプロタイプネットワーク解析、遺伝的分化解析を行った。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) CO1 領域の Neighbor-joining (NJ) 法を用いた系統樹解析により、タイとラオスの *revolutum* グループは、2つの種 *E. revolutum* と *E. miyagawai* に分類されることが明らかになった。
- 2) 種内の遺伝学的多様性を CO1 領域に基づき解析したところ、*E. revolutum* は 6 ハプロタイプ、*E. miyagawai* は 26 ハプロタイプに分類された。
- 3) ND1 領域の Maximum Likelihood (ML) 法による系統樹解析により、*E. revolutum* を大陸間で比較すると、東南アジア系統はヨーロッパ系統とクラスターを形成し、アメリカ系統とはクラスターを形成しなかった。
- 4) ハプロタイプ解析では、アメリカとユーラシア（東南アジア・ヨーロッパ）との間には 20 塩基サイトにおける置換による差異が認められた。
- 5) その遺伝的な差異の有意性を遺伝的分化解析により調べるため、集団間の固定指数  $\Phi_{ST}$  を算出した。アメリカと東南アジア間は、CO1 では  $\Phi_{ST} = 0.797$  ( $P < 0.001$ )、ND1 では  $\Phi_{ST} = 0.862$  ( $P < 0.001$ )、アメリカとヨーロッパ間の ND1 では  $\Phi_{ST} = 0.856$  ( $P < 0.001$ ) であり、アメリカ系統と東南アジア系統・ヨーロッパ系統との間に高度な遺伝的分化が認められた。

以上の成績は、東南アジアのアヒルの腸に寄生していた *revolutum* グループの集団遺伝学的解析により、*E. revolutum* と *E. miyagawai* の 2 つの複合種が存在すること、*E. revolutum* は東南アジアを含むユーラシア大陸とアメリカ大陸との系統間で大きく異なることを明らかにしている。

以上のように、本論文は、系統樹解析とハプロタイプネットワーク解析を併用した集団遺伝学的解析が寄生蠕虫類の分類や進化を解析する際に非常に重要な理論的基盤を提供するのみならず、寄生蠕虫類の薬剤耐性株による影響が年々深刻化する中で、棘口吸虫のハプロタイプに特異的な薬剤を開発することにも大きく貢献することが期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。



|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | 芥川 知彰 (愛媛県)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 甲総医博第39号   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位授与年月日 | 平成28年2月23日   |
| 学位論文題目  | A new method for characterizing hand dysfunction in cervical spondylotic myelopathy: A preliminary study<br>(頸部脊椎症における上肢機能障害の新しい評価法の予備的研究) |
| 発表誌名    | Spinal Cord(in press)  |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 梶  | 秀人 |
|      | 副査 | 教授 | 古谷 | 博和 |
|      | 副査 | 教授 | 上羽 | 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 芥川 知彰

論文題目 A new method for characterizing hand dysfunction in cervical spondylotic myelopathy: A preliminary study  
(頸部脊髄症における上肢機能障害の新しい評価法の予備的研究)

(論文要旨)

【緒言】頸部脊髄症 (CSM) は、成人の非外傷性脊髄疾患の中でも発生頻度が最上位に位置づけられ、多くの患者は手の巧緻運動障害を呈する。また、CSM 患者の中には、適切なピンチ力を維持できずに「柔らかい物を握り潰してしまう」、「持っている物を落としてしまう」等と訴える者も少なからず存在する。これらの症状には、皮膚の微細な触圧覚や深部感覚の脊髄伝導路である脊髄後索への機械的圧迫が関与していると考えられるが、上肢の後索機能評価については簡便な客観的評価システムがないのが現状である。そこで本研究では、上肢後索機能の客観的評価システムを開発し、CSM 患者への臨床応用について検討した。【対象と方法】CSM 患者 32 名を簡便な質問への返答から後索障害が疑われる体験を有する者は Group A (19 名 31 肢)、有さない者は Group B (13 名 26 肢) に振り分けた。また、患者群と年齢、性別を揃えた健常例 16 名 30 肢を対照群とした。評価システムの概要は、ゴム製の測定部の内圧が開口部からチューブを介して圧力計と圧センサに分岐し、圧センサで感知した圧力がモニタリング装置を介して A/D 変換され、コンピュータにピンチ力 (mmHg) として経時的に保存される。ピンチ力調整能の評価として 2 種類の課題を設定した。課題 1 では、200g の重りを吊るした測定部を押しつぶさないよう最小限のピンチ力で台上から持ち上げて維持させた。課題 2 では圧力計を見ながら最大ピンチ力の 10, 20, 30% の各ピンチ力を維持させ、ピンチ力が定常状態に到達して 5 秒以上経過した後閉眼させ、その状態で 5 秒以上維持させた。データ解析では、(1) 課題 1 のピンチ力が定常状態に到達後 5 秒間の平均ピンチ力 ( $P_{m1}$ )、(2) 課題 2 の開眼中の平均ピンチ力に対する閉眼後 5 秒間の変動 (variability index ;  $VI_{10, 20, \text{and } 30\%}$ ) を求め、多重比較検定 (Steel-Dwass 法) を用いて 3 群で比較した ( $P < 0.05$ )。また、多重比較検定で有意差があったデータを従属変数に、年齢および上肢機能評価 (上肢 JOA スコア, 10 秒テスト, semmes-weinstein monofilament による手指触圧覚, 最大ピンチ力) の結果を独立変数にした重回帰分析を行い、ピンチ力調整能に関与する因子を検討した ( $P < 0.05$ )。【結果】(1) 課題 1 の  $P_{m1}$  は、Group A が他の 2 群より有意に大きかった。(2) 課題 2 の  $VI_{20\%}$ ,  $VI_{30\%}$  は、Group A が他の 2 群より有意に大きかった。重回帰分析では、手指触圧覚が  $P_{m1}$ ,  $VI_{20\%}$ ,  $VI_{30\%}$  (標準化係数 0.38~0.52) と、最大ピンチ力が  $VI_{20\%}$  (標準化係数 0.43) と有意な関係を認めた。【結語】Group A は、課題 1 で他の 2 群に比べて有意に大きなピンチ力を発揮しており、「柔らかい物を握り潰してしまう」という臨床症状を裏付ける客観的指標となる。また、 $VI$  と重回帰分析の結果から、上肢後索機能障害を有する CSM 患者は触圧覚からの情報のみではピンチ力を安定して維持することが困難となり、視覚情報を代償として用いていることが示唆された。本システムの開発によって、他の手法では困難な上肢後索機能障害を反映する客観的指標を示せたと考える。本システムの発展により、CSM 患者の術前評価や治療効果の判定への応用が期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

|      |      |   |
|------|------|---|
|      | 氏名   | 芥川 知彰   |
| 審査委員 | 主査氏名 | 梶 秀人   |
|      | 副査氏名 | 古谷 博和 印   |
|      | 副査氏名 | 上羽 哲也  |

題目 A new method for characterizing hand dysfunction in cervical spondylotic myelopathy: A preliminary study

(頸部脊椎症における上肢機能障害の新しい評価法の予備的研究)

著者 Tomoaki Akutagawa, Toshikazu Tani, Kazunobu Kida, Nobuaki Tadokoro, Hayato Enoki, Yasunori Nagano, Masahiko Ikeuchi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Spinal Cord  
 (in press)

### 要旨

頸椎症性脊髄症 (cervical spondylotic myelopathy: CSM) は、脊椎加齢変化に伴伴する脊髄障害により四肢の痺れ、両手巧緻運動障害、歩行障害、膀胱直腸障害などの症状を呈する疾患である。CSM 患者の中には、適切なピンチ力を維持できずに、「柔らかい物を握り潰してしまう」、「持っている物を落としてしまいます」といった症状を訴える者が少なからず存在する。これらの症状には、触圧覚や深部感覚の脊髄伝導路である脊髄後索への機械的圧迫が関与していると考えられる。しかしながら、上肢後索機能障害を客観的にかつ簡便に評価するシステムは確立されていなかった。そこで申請者らは、上肢後索機能障害の客観的評価システムとしてピンチ力調整能評価装置を開発し、その有効性を検討した。日常生活で不意に柔らかい物を握り潰してしまったり、持っている小物を落とすようなことがないか、という質問に対して、「ある」と返答した CSM 患者 19 名 31 肢 (Group A)、「ない」と返答した CSM 患者 13 名 26 肢 (Group B)、年齢、性別を揃えた健常者 16 名、30 肢の 3 群を対象とした。ピンチ力調整能評価装置は、ゴム製の測定部を把持した際の内圧が圧センサとモニタリング装置を

介して A/D 変換され、コンピュータにピンチ力 (mmHg) として経時的に保存されるように設計された。その上で、ピンチ力調整能の評価に際し 2 種類の課題を設定した。課題 1 では、200 g の重りを吊るした測定部を押しつぶさないよう最小限のピンチ力で台上から持ち上げて維持させた。課題 2 では、圧力計を見ながら最大ピンチ力の 10、20、30% の各ピンチ力を維持させ、ピンチ力が定常状態に到達して 5 秒以上経過した後に閉眼させ、その状態で 5 秒以上維持させた。具体的には (1) 課題 1 のピンチ力が定常状態に到達後 5 秒間の平均ピンチ力 ( $P_{ml}$ )、(2) 課題 2 の開眼中の平均ピンチ力に対する閉眼後 5 秒間の変動 (variability index;  $VI_{10, 20, 30\%}$ ) を測定し、Steel-Dwss 法による多重比較検定を用いて 3 群間を比較した。また、多重比較検定で有意差があったデータを従属変数に、年齢および上肢機能評価 (上肢 JOA スコア、10 秒テスト、モノフィラメント知覚テストを使った手指触圧覚テスト、最大ピンチ力) の結果を独立変数にした重回帰分析を行い、ピンチ力調整能に関与する因子を検討した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 課題 1 の  $P_{ml}$  は、Group A が他の 2 群より有意に大きかった。
- 2) 課題 2 の  $VI_{20\%}$  と  $VI_{30\%}$  は、Group A が他の 2 群より有意に大きかった。
- 3) 重回帰分析により、手指触圧覚と  $P_{ml}$ 、 $VI_{20\%}$ 、 $VI_{30\%}$  (標準化係数 0.38~0.52) との間に、最大ピンチ力と  $VI_{20\%}$  (標準化係数-0.43) との間に有意な関係が認められた。

以上の成績は、申請者らが開発したピンチ力調整能評価装置を用いることにより上肢の後索機能障害を数値化して客観的に評価することが可能であることを示している。

以上のように、本論文は他の方法では困難な上肢後索機能障害の数値化による客観的評価方法を示したことで、今後 CSM 患者の術前評価や治療効果の判定への応用が期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。

|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | 廣橋 健太郎 (和歌山県)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 甲総医博第40号   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位授与年月日 | 平成28年3月3日  |
| 学位論文題目  | Photothermal Ablation of Human Lung Cancer by Low-power Near-Infrared Laser and Topical Injection of Indocyanine Green<br>(ヒト肺癌に対する低出力近赤外線レーザーとインドシアニングリーンの局所注入を併用した光温熱治療) |
| 発表誌名    | Journal of Bronchology and Interventional Pulmonology 22(2) : 99~106.  |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 佐藤 | 隆幸 |
|      | 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 廣橋 健太郎

論文題目 Photothermal Ablation of Human Lung Cancer by Low-power Near-Infrared Laser and Topical Injection of Indocyanine Green.  
(ヒト肺癌に対する低出力近赤外線レーザーと  
インドシアニンググリーンの局所注入を併用した光温熱治療)

(論文要旨)

本研究は肺癌に対する低出力近赤外線レーザーとインドシアニンググリーン(ICG)の局所注入を組み合わせた光温熱治療の有効性を検証したものである。

背景としては、早期非小細胞肺癌の標準治療はリンパ節郭清を伴った外科的切除であるが、近年併存症のために外科的切除が選択出来ない症例が増加している現状がある。そのような症例に対しては、体幹部定位放射線治療(SBRT)やラジオ波焼灼治療(RFA)、凍結治療が選択肢となり得るが、SBRTは局所再発に対して繰り返し加療できないこと、RFAや凍結治療は経皮的アプローチのために気胸などの合併症が問題となる。

我々は、これらの問題点を克服する治療方法として、経気管支鏡アプローチによるレーザー治療の有効性を検討した。肺癌に対する既存の気管支鏡下レーザー治療は主に二つあり、一つは中枢気道に狭窄を来すような局所進行肺癌に対して姑息的に施行される高出力レーザー治療であるが、レーザーファイバー径が太く中層・末梢病変の治療には適さない。もう一つは、中枢気管支内に発生した早期扁平上皮癌に対して根治を期待し施行される光線力学的治療(PDT)である。PDTは腫瘍親和性感受性物質と低出力レーザー光により光線力学的反応が生じ、励起状態(一重項状態)から基底状態に遷移する際に生じる活性酸素が細胞を変性・壊死に陥らせる治療法である。腫瘍親和性感受性物質を静脈内投与するために日光過敏症が副作用としてみられ屋外での活動が制限されるという問題点がある。いずれの経気管支鏡レーザー治療も、主に中枢気道病変をターゲットとしており、原発性肺癌の大半を占める中層・末梢肺病変の治療には普及していない。




我々は、気管支鏡的に末梢肺病変まで到達可能な極細気管支鏡を用いることとした。ただし、細径の気管支鏡の鉗子口を通過し得るレーザーファイバーはレーザー出力が制限されるため、レーザー照射単独では十分な治療効果が得られないと考えた。この問題点を解決するために、生体内で比較的組織透過性に優れた近赤外線レーザーと近赤外線光を吸収し熱に変換する特徴を持つICGに着目し、低出力レーザーと光感受性物質としてのICGの局所注入を組み合わせた新たな低侵襲治療を開発するに至った。

まず、温熱治療による細胞傷害を評価するために、ヒト肺癌細胞を用いたin-vitro実験を行った。温熱治療後の細胞傷害の程度は、MTS assayと再培養の2つの評価方法で検証した。MTS assayでは59℃以上の温熱治療では5分間で酵素活性が失われることを確認した。一方で、再培養では

55°Cの温熱治療では5分間、53°Cでは10分間で細胞死に至ることが示された。次に、近赤外線レーザー照射時の ICG 濃度と局所温度上昇の関係について机上実験を行い評価した。0.5g/L の ICG 溶液 1mL に対して 250mW の 808nm レーザーを照射すると、1分間で 20°Cの温度上昇が得られ、最終的に 30°C以上の温度上昇が得られることが判明した。これは、基礎体温を考慮すると、生体内では肺癌を死滅するのに十分な温度上昇であると考えた。これらの基礎実験の結果をもとに、ヒト肺癌細胞を移植したマウス皮下腫瘍モデルを用いて in-vivo 実験を施行した。ICG 局所注入とレーザー照射を組み合わせた ICG 群(n=3)と生理食塩水の局所注入とレーザー照射を組み合わせた生食群(n=3)に振り分けた。その結果、生食群では全てのマウスで腫瘍が増大したのに対して、ICG 群ではいずれも腫瘍の縮小を認め、3匹中2匹では肉眼的に腫瘍が消失した。

ヒト肺癌細胞を用いて作成したマウス皮下腫瘍モデルにおいて、ICG 局所注入と低出力近赤外線レーザー照射を組み合わせた光温熱治療の有効性が証明された。

## 論文審査の結果の要旨

|      | 氏名  |
|------|---|
|      | 廣橋 健太郎  |
| 審査委員 | 主査氏名            佐藤 隆幸  |
|      | 副査氏名            横山 彰仁  |
|      | 副査氏名            花崎 和弘  |

**題 目**      Photothermal Ablation of Human Lung Cancer by Low-power Near-Infrared Laser and Topical Injection of Indocyanine Green  
 (ヒト肺癌に対する低出力近赤外線レーザーとインドシアニンググリーンの局所注入を併用した光温熱治療)

**著 者**      Kentaro Hirohashi, Takashi Anayama, Hironobu Wada, Takahiro Nakajima, Tatsuya Kato, Shaf Keshavjee, Kazumasa Orihashi, and Kazuhiro Yasufuku

**発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月**  
 Journal of Bronchology and Interventional Pulmonology 22(2) : 99~106.  
 2015年4月

**要 旨**

早期非小細胞肺癌の標準治療はリンパ節郭清を伴う外科的切除であるが、併存症のためその適応とならない場合には、定位放射線療法、ラジオ波焼灼療法、凍結療法が代替治療となる。しかし、定位放射線療法は、繰り返し適用が困難なため局所再発には対応できないことが多い。また、ラジオ波焼灼療法や凍結療法は、気胸などの合併症が問題となっている。そこで、申請者は、経気管支鏡的に、近赤外光吸収性のインドシアニンググリーンを患部に注入し、経気管支鏡的に、低出力近赤外線レーザー光を照射する全気管支鏡的光温熱療法を立案し、その有効性を in vivo および動物実験で検証した。

まず、ヒト肺癌細胞の培養系を用いて、一過性の温度上昇による細胞傷害性について、MTS 酵素活性試験および顕微鏡観察を行い検討した。その結果、培養温度



を59℃に5分間暴露することにより、ほとんどの癌細胞が死滅することがわかった。ついで、上記のような温度上昇をもたらすことができるレーザー照射の条件を検討した。使用したレーザーは、波長808nm、照射出力250mWで、照射面積は、直径10mm、照射距離10mmとした。このようなレーザー照射の場合、もっとも効率的に温度上昇をもたらすことのできる最適なインドシアニンググリーン水溶液濃度は、0.5g/Lで、照射時間1分で約20℃、5分で30℃近くの温度上昇が期待されることがわかった。

最後に、ヒト肺癌細胞を皮下に移植したマウス腫瘍モデルを用いて、当該光温熱療法の有効性を評価した。インドシアニンググリーン水溶液(0.5g/L, 50 $\mu$ L)を皮下腫瘍部に注入し、レーザー照射を体表より10分間行い、その後、腫瘍サイズの観察を最長60日間行った。その結果、非治療群では、腫瘍サイズが増大し続けたが、治療群では、腫瘍サイズの速やかな減少が認められ観察期間中続いた。

このような結果から、申請者は、申請者らが発案した全気管支鏡的光温熱療法によって肺癌の縮小効果が得られる可能性がある、と結論付けた。

審査員一同は、臨床的には、レーザー照射中の組織内温度のリアルタイムモニタリングの方法、インドシアニンググリーンの組織内濃度の難制御性に課題があるが、肺癌に対する新しい治療法を提案する独創的かつ画期的研究論文であることから、本論文を、本学博士(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)  | 八百川 心 (高知県)   |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 甲総医博第41号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与年月日 | 平成28年3月3日   |
| 学位論文題目  | Serial Assessment of Therapeutic Response to a New Radiosensitization Treatment, Kochi Oxydol-Radiation Therapy for Unresectable Carcinomas, Type II (KORTUC II), in patients with stage I/II Breast Cancer Using Breast Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging<br>(乳房造影MR Iを用いて行ったI/II期の乳癌患者を対象とした新しい放射線増感療法(KORTUC II)の治療効果の評価) |
| 発表誌名    | Cancers 8 (1) (Online Published: 22 December 2015)  |

**審査委員** 主査 教授 山本 哲也  
 副査 教授 村上 一郎  
 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 八百川 心

## 論文題目

Serial Assessment of Therapeutic Response to a New Radiosensitization Treatment, Kochi Oxydol-Radiation Therapy for Unresectable Carcinomas, Type II (KORTUC II), in patients with stage I/II Breast Cancer Using Breast Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging

(乳房造影 MRI を用いて行った I/II 期の乳癌患者を対象とした新しい放射線増感療法 (KORTUC II) の治療効果の評価)

### (論文要旨)

#### 背景および目的

現在の放射線治療で用いられているリニアックは低酸素性腫瘍細胞の存在や抗酸化酵素により、大きな腫瘍に対して効果を発揮することが出来ない。そこで、酸素を供給し、抗酸化酵素をブロックすることにより、低酸素性腫瘍細胞の放射線感受性を増感できるのではないかと考え、過酸化水素を用いた酵素標的・増感放射線療法 Kochi Oxydol-Radiation Therapy for Unresectable Carcinomas (KORTUC) が開発された。KORTUC I として表在性の局所進行悪性腫瘍に対して過酸化水素の放射線増感効果を利用して放射線治療を行ったのに続き、主に軟部組織の悪性腫瘍および進行乳癌に対して、低濃度の過酸化水素とヒアルロン酸を含有する放射線増感剤を腫瘍内に局注することで放射線の効果を最大限に引き出す全く新しい治療法、KORTUC II が開発された。これにより、早期乳癌に対して放射線治療のみで局所制御を可能とし、非手術での乳房温存治療を行える可能性が生まれた。しかし、その非手術という性質上から、治療後の永久病理組織結果は得られないため、臨床効果を確認するためには画像による確認ないし経過観察が必要となる。また、新開発の治療法であるためこれまで長期にわたる治療成績に関する報告が無かったということもあり、経時的な経過観察に関する報告が望まれていた。

経過観察の手段となる様々な画像検査の中でも、造影剤を用いた乳房 MRI 検査は乳癌の存在診断、質的診断、広がり診断など様々な用途に用いられており、近年においては乳癌の診断および治療に欠かせないものとなってきている。そこで、本研究では、I、II 期の乳癌患者に対して行われた KORTUC II の治療効果について乳房造影 MRI を用いて評価することを目的とした。

#### 対象患者および方法

対象とした患者は 2006 年 10 月から 2011 年 4 月までに高知大学医学部附属病院において、酵素標的・増感放射線療法 KORTUC II を受け、かつ治療後に複数回の MRI を撮像できた I、II 期の乳癌患者 21 名である。いずれの患者も十分なインフォームド・コンセントを得た上で本治療を希望された。この 21 名は、いずれも本人の拒否、または高齢などの理

由により、非手術、かつ抗癌化学療法を行っていない。ただし、針生検での病理組織検査にてエストロゲンレセプタ陽性であった症例には、KORTUC II 施行後にアロマターゼ阻害剤の投与を開始した。これらの患者の KORTUC II 治療前および後において MRI を経時的に撮影、画像所見を比較・検討し治療効果の評価を行った。また、同時期に撮影された他のモダリティにおける所見との比較も行った。

乳癌に対する放射線治療は 4MV の X 線を用いて、主に接線非対向 4 門照射にて、1 日 2.75Gy×週 5 回で総線量 44Gy の寡分割照射を行った。増感剤の局注は、放射線治療 6 回目より開始し、超音波ガイド下に週 2 回、放射線治療開始前に行った。増感剤は独自に開発したもの（0.5%過酸化水素+0.88%ヒアルロン酸）で、人体に注入しても安全、かつ腫瘍内に注入後 24 時間以上の間、腫瘍組織内の酸素分圧を適切に保持できるという特徴を有している。




## 結果

2014 年 10 月末時点での全症例 21 例の平均経過観察期間は、61.9 ヶ月であり乳房造影 MRI 上にて全例において臨床的な腫瘍消失である clinically complete response (cCR) を確認することができており、1 例を除き遠隔転移も認めていない。また、治療後最初の造影 MRI では腫瘍の消失を認めることが出来ず、2 回目以降の MRI にて消失を確認できた症例が今回は 21 例中 7 例あり、腫瘍の消失を MRI 上で確認できるまでに要した期間は平均で 14 ヶ月であった。

## 考察および結論

乳癌に対する増感放射線療法 KORTUC II の臨床効果を確認するためには、非手術という点からどうしても画像を用いる必要があるが、局所診断をする際に乳房造影 MRI 検査は、広がり診断に優れている、高感度であるという点で他のモダリティと比較しても非常に有用であると考えられる。その乳房 MRI 検査を用いた今回の調査では 21 症例中 20 例 (95.2%) において、平均経過観察期間 61.9 ヶ月もの間にわたり、良好な治療効果が確認できた。この結果は、初期乳癌に関しては、高齢者や手術拒否の乳癌患者に対しても非手術での乳房温存療法が可能になったということを示唆するものである。

## 論文審査の結果の要旨

|      | 氏名   | 八百川 心   |
|------|------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 山本 哲也  |
|      | 副査氏名 | 村上 一郎  |
|      | 副査氏名 | 花崎 和弘  |

**題 目** Serial Assessment of Therapeutic Response to a New Radiosensitization Treatment, Kochi Oxydol-Radiation Therapy for Unresectable Carcinomas, Type II (KORTUC II), in patients with stage I/II Breast Cancer Using Breast Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging  
 (乳房造影MR Iを用いて行ったI/II期の乳癌患者を対象とした新しい放射線増感療法(KORTUC II)の治療効果の評価)

**著 者** Shin Yaogawa, Yasuhiro Ogawa, Shiho Morita-Tokuhiro, Akira Tsuzuki, Ryo Akima, Kenji Itoh, Kazuo Morio, Hiroaki Yasunami, Masahide Onogawa, Shinji Kariya, Munenobu Nogami, Akihito Nishioka, Mitsuhiko Miyamura

**発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月**  
 Cancers 8 (1) (Online Published: 22 December 2015)

**要 旨**

**【背景・目的】**放射線治療における問題点は、治療抵抗性を獲得した低酸素性腫瘍細胞の存在や治療効果を減弱させる抗酸化酵素の存在である。そこで、申請者らのグループは、酸素を供給するとともに抗酸化酵素を阻害することにより放射線治療の効果を増強できるのではないかと考え、過酸化水素を用いた酵素標的・増感放射線療法(KORTUC I)を開発し、表在性の局所進行悪性腫瘍に応用してきた。その後、主に軟部組織の悪性腫瘍および進行乳癌に対して、低濃度の過酸化水素とヒアルロン酸を含有する放射線増感剤を腫瘍内に局注して放射線を照射する治療法 KORTUC IIを開発した。KORTUC IIにより、早期乳癌は放射線治療のみで局所制御が可能となり、非手術で乳房温存治療を行うことができる可能性が生まれた。

非手術での乳房温存療法においては、治療効果を病理組織学的に確かめることができないため、画像検査による治療効果の判定および経過観察が重要であ

る。画像検査の中では造影剤を用いた乳房 MRI 検査が有用であるが、KORTUC II の治療効果の判定および経過観察に対しての有用性については明らかにされていない。そこで、申請者らは I および II 期の早期乳癌に対する KORTUC II の治療効果を乳房造影 MRI を用いて評価した。

【対象と方法】対象は、2006 年 10 月から 2011 年 4 月までの期間に、高知大学医学部附属病院にて酵素標的・増感放射線療法 KORTUC II を受けた後、複数回の乳房造影 MRI 検査を実施できた 0、I および II 期の乳癌患者 21 名 (22 病変) である。いずれの症例も本人の意志あるいは高齢などの理由で手術および抗癌剤による化学療法は行わず、十分なインフォームド・コンセントの後、KORTUC II を実施した。KORTUC II は、4MV の X 線を用いて、2.75Gy/日×5 回/週で、総線量 44Gy の寡分割照射を行うとともに、0.5%過酸化水素+0.83%ヒアルロン酸からなる増感剤を、放射線治療 6 回目から 2 回/週、放射線治療前に超音波ガイド下に局注した。その後、20 例ではタモキシフェンあるいはアロマターゼ阻害剤を投与した。

これらの症例に対し、KORTUC II 治療前、治療 3~6 か月後およびその後約半年ごとに乳房造影 MRI を撮影し、画像所見を比較・検討して治療効果の評価を行った。MRI 検査は、脂肪抑制 T2 強調画像、拡散強調画像、ダイナミック MRI および 3D fast spoiled gradient echo sequence にて解析するとともに、同時期に撮影された PET-CT 画像およびマンモグラフィ画像における所見と比較検討した。

【結果】全症例において KORTUC II が完遂でき、重篤な合併症も認められなかった。22 病変いずれにおいても造影乳房 MRI 上 clinically complete response (cCR) を確認することができたが、治療後最初の MRI で cCR が確認できたのは 14 病変 (63.6%) で、残りの 8 病変 (36.4%) では 2 回目の MRI で cCR が確認できた。腫瘍の消失を MRI 上で確認できるまでに要した期間は平均で 14 か月であった。2014 年 10 月末時点での経過観察期間は 35~92 か月、平均 61.9 か月であるが、22 病変中 21 病変 (95.5%) で再発は認められていない。

【まとめ】以上より、早期乳癌症例に対する KORTUC II を用いた非手術乳房温存療法の治療効果の判定には半年ごとの造影乳房 MRI が有用であること、さらには、造影乳房 MRI 上で腫瘍の消失を確認するためには約 14 か月の経過観察が必要であることが明らかとなった。

【審査報告】審査員からは、病理組織型と造影乳房 MRI との関係や再発病変と非再発病変における画像所見についての質問、さらには、今回の結果を踏まえての将来的展望についての議論がなされた。本論文は、KORTUC II の治療効果を経時的に造影乳房 MRI にて評価し、その有用性を明らかにするとともに治療効果を認めるまでに要する期間について初めて検討した論文である。

学位論文に加え、八百川氏は優れた研究意欲・能力を有すると考えられ、以上をふまえ、審査員一同、申請者の研究は、高知大学博士 (医学) の学位を授与するにふさわしい内容であると判断した。

|         |   |
|---------|---|
| 氏名(本籍)  | 仙頭 慎哉 (高知県)   |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 甲総医博第42号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与年月日 | 平成28年3月23日  |
| 学位論文題目  | Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells induced by Tumor Cell-Derived Exosomes<br>(ヘパリン持続投与は口腔扁平上皮癌細胞由来のエクソソームによる癌の悪性度の亢進を抑制する) |
| 発表誌名    | PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0148454 February 5, 2016  |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 宇高 | 恵子 |
|      | 副査 | 教授 | 佐野 | 栄紀 |
|      | 副査 | 教授 | 福島 | 敦樹 |

## 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 仙頭 慎哉

## 論文題目

Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells induced by Tumor Cell-Derived Exosomes

(ヘパリン持続投与は口腔扁平上皮癌細胞由来のエクソソームによる癌の悪性度の亢進を抑制する)

(論文要旨)

エクソソームは種々の細胞から分泌される径 30~100nm の脂質二重膜で囲まれた膜小胞で、内部には miRNA、mRNA 等の核酸や種々の蛋白質などを含有するとともに、表面には CD9 や CD63 といった膜貫通型蛋白質を含む様々な分子が発現されている。エクソソームは従来細胞内で不要になった物質を細胞外に排出する機構として考えられていたが、近年、Fusion、Receptor-mediated uptake および Internalization といった機序によりレシピエント細胞に影響を及ぼすことが示されている。腫瘍の発育・進展においても、免疫系からのエスケープや細胞間の情報伝達による増殖・浸潤能の亢進など、エクソソームが重要な役割を演じており、癌における増殖・浸潤・転移のメディエーターとして作用することが明らかにされている。そこで、著者らは口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞が分泌するエクソソームが OSC 細胞に及ぼす作用やその機序について検討するとともにエクソソームを標的とした癌治療の可能性について検討した。




株化 OSC 細胞である OSC-3 および OSC-4 の培養上清より Total Exosome Isolation Kit を用いてエクソソームを分離した後、PKH26 で標識し、OSC 細胞と共培養すると、エクソソームが OSC 細胞へ取り込まれることが共焦点レーザー顕微鏡で確認された。次に、OSC-3 および OSC-4 を各細胞から分離したエクソソームで処理すると、濃度依存的に OSC-3 および OSC-4 の増殖・遊走・浸潤が促進された。そこで、エクソソームがどのようなシグナル経路を介して作用を発現しているかを確認するために、Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit を用いてリン酸化が亢進するシグナル伝達分子を同定したところ、OSC 細胞をエクソソームで処理すると p-ERK、p-JNK、p-38 $\alpha$ 、p-GSK-3 および p-Akt のリン酸化レベルがコントロールの 1.5 倍以上に亢進した。さらに、ERK、JNK および Akt の阻害剤の存在下で OSC 細胞をエクソソームで処理したところ、エクソソームによる OSC 細胞の増殖、遊走および浸潤促進作用が減弱した。これらのことより、エクソソームの OSC 細胞における増殖・遊走・浸潤促進作用には、ERK、JNK および Akt シグナルが重要であることが示唆された。これらとともに、*in vivo* におけるエクソソームの作用を検討するために、OSC-4 を OSC-4 の培養上清より分離したエクソソームとともに BALB/c ノーマウスの背部皮下に移植して経時的に腫瘍径を計測すると、エクソソームの濃度依存的に腫瘍の増殖が促進された。以上のことより、OSC 細胞から分泌されるエクソソームは OSC 細胞自身の発育・進展に密接に関与していることが示唆された。



次に、エクソソームを標的とした癌治療の可能性を検討すべく、エクソソームの取り込みに関与するヘパラン硫酸プロテオグリカンと高い親和性を有するヘパリンがエクソソームの作用に及ぼす影響について検討した。OSC-4をヘパリンで1時間前処理した後、エクソソームを添加すると、添加4時間後まではエクソソームのOSC-4への取り込みが抑制された。そこで、エクソソームの細胞増殖・遊走・浸潤促進作用に及ぼすヘパリンの影響を検討したところ、ヘパリンの単回投与では影響は認められなかったが、4時間ごとに反復投与するとエクソソームの細胞増殖・遊走・浸潤促進作用が有意に抑制された。さらに、*in vivo*においてもヌードマウスに移植したOSC-4の増殖はヘパリンを持続投与することにより有意に抑制された。

以上より、エクソソームは腫瘍に対して促進的に働くもののヘパリンにより腫瘍細胞へのエクソソームの取り込みを阻害することで腫瘍の発育を抑制できる可能性が示され、エクソソームを標的とした新規癌治療の可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

|      | 氏名   | 仙頭 慎哉   |
|------|------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 宇高 恵子  |
|      | 副査氏名 | 佐野 栄紀  |
|      | 副査氏名 | 福島 敦樹  |

題 目 Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells induced by Tumor Cell-Derived Exosomes  
 (へパリン持続投与は口腔扁平上皮癌細胞由来のエクソソームによる癌の悪性度の亢進を抑制する)

著 者

Shinya Sento, Eri Sasabe, Tetsuya Yamamoto

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 PLOS ONE  
 DOI:10.1371/journal.pone.0148454  
 Februarv 5, 2016

要 旨

仙頭慎哉さんの学位審査は、2016年2月24日18時より、約1時間行いました。まず、公開にて研究内容の発表をしました。

**【目的】**

仙頭さんは、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 OSC3 および OSC4 を用いて、それらが分泌する exosome を介した細胞間の情報伝達による腫瘍細胞の変化について研究しました。さらに、exosome の uptake を妨げるへパリンを持続注入することの抗腫瘍効果を調べました。

**【方法と結果】**

まず、それぞれの腫瘍細胞株の培養上清から分離キットを用いて exosome を調製し、in vitro で同系の腫瘍細胞に加えたところ、exosome が細胞内に取り込まれることが観察され、

それらの細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が高まりました。そこで、exosome 投与後に起こる細胞内の変化を、proteome 解析のリン酸化キナーゼパネルで概観したところ、Akt, ERK, JNK のリン酸化の増強が見られ、細胞の状態変化の原因となっていることが推測されました。そこで、これらキナーゼの阻害剤を使って exosome 投与後の変化への影響をみたところ、exosome 投与によりかさ上げされた増殖能、遊走能、浸潤能の大部分が、それぞれの阻害剤の単独添加によっても抑制されました。

次に、exosome を与えた OSC-4 細胞をヌード BALB/c マウスに接種して in vivo での腫瘍成長をみたところ、投与した exosome の量に応じて腫瘍の成長が促進され、exosome 非投与群と比べて有意の差がみられました。そこで、この exosome による腫瘍促進を阻止できる方法がないか、検討しました。一般に、exosome の取り込みは、細胞表面のヘパラン硫酸を含むプロテオグリカンへの吸着から始まり、この反応が、ヘパリンにより阻害されることが知られているため、OSC-4 においてもヘパリンによる抑制効果がみられるか、調べました。まず、in vitro の実験系にヘパリンを加えると、最大 4 時間まで、exosome の取り込みが阻害されることがわかりました。In vitro における増殖能、遊走能、浸潤能は、ヘパリンの単独投与でははっきり差がみられなかったものの、4 時間ごとにヘパリンの添加を続けると、有意に抑制されました。最後に、OSC-4 をヌードマウスに接種し、ヘパリンを持続投与するポンプを皮下に植えこんで腫瘍の成長に対する影響を調べたところ、OSC-4 の接種時に exosome を加えることによる腫瘍促進効果は、ヘパリンの持続投与によりキャンセルされました。

#### 【考察】

以上の結果から、少なくとも口腔扁平上皮癌の細胞株を用いた解析において、腫瘍細胞間で、exosome を介した情報のやり取りが起こり、その結果として、受け取った細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が増強することが明らかとなりました。ただし、この実験では、細胞数にして 50 倍程度の細胞の上清から集めた exosome を使って腫瘍細胞の変化が起きており、自然な固形腫瘍の組織内で、exosome を介した情報伝達が、どの程度生理的役割を果たしているかは、今後見ていく必要があると考えられました。

本研究により、ヘパリン投与をすることで、exosome を介した腫瘍の悪性を抑制できる可能性が出てきました。ヘパリン投与を受けた担癌患者の生存が延長することも、いくつかの前向き・後ろ向き試験で報告されています。本研究では、ヘパリン投与の制癌効果は、ヘパリンを持続的に供給した場合に限られ、また、exosome を加えていない腫瘍の成長には影響していないため、今後、どのような形で臨床応用ができるのか、考えていく必要性が認識されました。

#### 【審査員からの質疑】

審査官からは、以下のような質問がありました。

- Exosome を介して腫瘍細胞に形質の変化が誘導されたと推測するのであれば、形質の異なる腫瘍細胞から採取した exosome が、それぞれ親株の性質を伝えるかどうか、特異性を確認する必要があるのではないかと。
- In vivo の固形腫瘍の場合、exosome を介した形質の変化が生理的意義のあるものであれば、敢えて腫瘍細胞に exosome を与えていない対照群でも、heparin 持続投与による腫瘍の成長抑制が観察されてもよいのではないかと。
- Kinase inhibitor の増殖抑制効果は、悪性腫瘍細胞であれば、exosome 添加のあるなしにかかわらず、観察されてもよいのではないかと？それとも、敢えて、exosome 添加によるかさ上げ分に対する効果を見る濃度に調節してあるのか。
- Proteome 解析結果について、有意な差と認識する足切線のコンセンサスは？
- Exosome による形質の変化は一度起こると持続するものか？

これらの質疑に、仙頭さんは根拠を示して説明をし、議論することができました。以上をふまえ、審査員一同、仙頭さんの研究内容は、高知大学博士（医学）の学位を授与するにふさわしい内容の研究であると判断しました。

|         |   |
|---------|---|
| 氏名(本籍)  | 仲井 めぐみ (徳島県)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 甲総医博第43号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与年月日 | 平成28年3月23日  |
| 学位論文題目  | Bangle ( <i>Zingiber purpureum</i> ) improves spatial learning, reduces deficits in memory and promotes neurogenesis in the dentate gyrus of senescence-accelerated mouse P8<br>(インドネシア産ショウガ科食用植物Bangleの老化促進モデルマウスに対する認知機能改善効果) |
| 発表誌名    | Journal of Medicinal Food (in press)  |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 森信 | 繁  |
|      | 副査 | 教授 | 齊藤 | 源顕 |
|      | 副査 | 教授 | 西原 | 利治 |

## 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 仲井 めぐみ

## 論文題目

Bangle (*Zingiber purpureum*) improves spatial learning, reduces deficits in memory and promotes neurogenesis in the dentate gyrus of senescence-accelerated mouse P8

(インドネシア産ショウガ科食用植物 Bangle の

老化促進モデルマウスに対する認知機能改善効果)

(論文要旨)

【緒言】超高齢化社会の到来に伴い、認知症などの神経変性疾患が極めて深刻な社会問題となっており、その治療薬開発が望まれている。しかしながら、現在、日本で承認されている薬剤は、障害された神経を修復させる作用はなく、治療効果に限界があると言われている。

一方で、食品の第三次機能としての健康保持効果や疾病に対する予防効果が注目されている。増大する医療費抑制の観点も含め、平成 27 年 4 月より、食品の新たな機能性表示制度も施行され、セルフメディケーションによる予防医学がさらに推奨されるようになった。このような背景から、我々は、神経変性疾患予防食材の開発を目的とし、様々な植物資源から神経栄養因子様低分子化合物の探索研究を行っている。中でも、インドネシア産ショウガ科食用植物 Bangle (*Zingiber purpureum*) のラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12 細胞) に対する分化誘導作用およびラット胎仔大脳皮質由来初代培養神経細胞に対する突起伸展促進作用を見出し、その活性成分が cis 体と trans 体のフェニルブテノイド二量体であることを明らかにした。さらに、Bangle の認知機能に及ぼす効果を行動的に評価することを目的とし、老化促進モデルマウス (senescence-accelerated mouse P8 : SAMP8) に対する空間学習記憶能について検討した。また、海馬組織における神経新生作用についての組織学的検討も併せて行った。

【方法】Bangle 抽出物は、乾燥した Bangle 根茎 500g を 70% Ethanol 2L に 3 日間浸漬し、濾過後、濃縮し、得られたエキス (46.1g 収率 9.2% ; エキス中に含まれる cis 体、trans 体のフェニルブテノイド二量体はそれぞれ 0.63%、0.30%) を用いた。

実験動物は、老化促進モデルマウス SAMP8 (日本エスエルシー株式会社, 雄性、8 週齢) を用いた。コントロール群には CE-2 (日本クレア株式会社) を、Bangle 摂取群には、食品としてのヒト日常摂取量から換算した量である 0.075% Bangle 抽出物含有 CE-2 を、4 週間自由に摂取させた後、海馬依存的学習・記憶行動試験である Morris 水迷路試験を行った。本試験は、空間学習の指標である学習試行を 1 日 4 回 6 日間行い、7 日目に空間記憶の指標であるプローブ試行を実施した。学習試行は、遊泳速度、平均到達時間と総移動距離を評価項目とした。またプローブ試行は、ゴールエリアの滞在時間を評価項目とし、他エリアの滞在時間と比較した。水迷路試験後、脳を摘出し、海馬組織を Ki67 抗体 (細胞増殖マーカー) を用いた蛍光多重免疫染色を行い、Ki67 陽性細胞数をカウントした。




【結果・考察】 Bangle 抽出物投与開始後の体重の変化と食餌摂取量については、コントロール群と Bangle 摂取群を比較して有意な差はなかった。Morris 水迷路試験の学習試行において、遊泳速度は、コントロール群と Bangle 摂取群を比較して有意な差はなかった。平均到達時間について、Bangle 摂取群は、試行を重ねる毎に平均到達時間は短縮し、試行 6 日目ではコントロール群と比較して有意に短くなった。 $(p < 0.05)$  総移動距離については、コントロール群と Bangle 摂取群を比較して有意な差はなかったが、平均到達時間の結果と同様の傾向が得られた。プローブ試行において、ゴールエリア滞在時間は、コントロール群と比較して Bangle 摂取群で有意に長くなった。 $(p < 0.05)$  また、各群において、ゴールエリア滞在時間と他エリア滞在時間を比較すると、コントロール群においては有意な差はなかったが、Bangle 摂取群ではゴールエリア滞在時間が有意に長くなった。 $(p < 0.01)$  さらに、海馬歯状回における Ki67 陽性細胞数をカウントし、コントロール群と Bangle 摂取群を比較したところ、Bangle 摂取群で有意に増加していることが明らかとなった。 $(p < 0.05)$

以上の結果より、インドネシア産ショウガ科食用植物 Bangle は、老化促進モデルマウスに対し空間学習記憶障害を改善する作用を示し、海馬歯状回における神経新生を促進することが明らかとなった。これらの作用は、活性成分であるフェニルブテノイド二量体の神経栄養因子様作用に起因すると推察された。また、Bangle は、日常摂取可能な安全性の高い食品であることから、認知機能低下を予防する食品として有用であると考えられる。

本研究から、Bangle は、高齢化に伴い増加が懸念される認知症など神経変性疾患の予防や、認知症患者数の増大による介護・医療費の高騰の抑制等、予防医学に大いに貢献できる素材と考えられる。また、フェニルブテノイド二量体は、創薬シーズとして認知機能改善薬リード化合物として有用と考えられ、臨床応用が期待できると考えられる。



## 論文審査の結果の要旨

|      | 氏名   | 仲井 めぐみ  |
|------|------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 森信 繁   |
|      | 副査氏名 | 齊藤 源顕  |
|      | 副査氏名 | 西原 利治  |

題 目 Bangle (*Zingiber purpureum*) improves spatial learning, reduces deficits in memory and promotes neurogenesis in the dentate gyrus of senescence-accelerated mouse P8  
 (インドネシア産ショウガ科食用植物Bangleの老化促進モデルマウスに対する認知機能改善効果)

著 者 Megumi Nakai, Michiro Iizuka, Nobuaki Matsui, Kazuko Hosogi, Akiko Imai, Noriaki Abe, Hisashi Shiraishi, Ayumu Hirata, Yusuke Yagi, Kohei Jobu, Junko Yokota, Eishin Kato, Shinya Hosoda, Saburo Yoshioka, Kenichi Harada, Miwa Kubo, Yoshiyasu Fukuyama, Mitsuhiko Miyamura

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

Journal of Medicinal Food (in press)

要 旨

【緒言】超高齢化社会の到来に伴い、認知症などの神経変性疾患が極めて深刻な社会問題となっており、その治療薬開発が望まれている。しかしながら、現在、日本で承認されている薬剤は、障害された神経を修復させる作用はなく、治療効果に限界があると言われている。

一方で、食品の第三次機能としての健康保持効果や疾病に対する予防効果が注目されている。増大する医療費抑制の観点も含め、平成27年4月より、食品の新たな機能性表示制度も施行され、セルフメディケーションによる予防医学がさらに推奨されるようになった。このような背景から、我々は、神経変性疾患予防食材の開発を目的とし、様々な植物資源から神経栄養因子様低分子化合物の探索研究を行っている。中でも、インドネシア産ショウガ科食用植物 Bangle (*Zingiber purpureum*) のラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12 細胞) に対する分化誘導作用およびラット胎仔大脳皮質由来初代培養神経細胞に対する突起伸展促進作用を見出し、その活性成分が cis 体と trans 体のフェニルブテノイド二量体であることを明らかにした。さらに、Bangle の認知機能に及ぼす効果を行動的に評価することを目的とし、老化促進モデルマウス (senescence-accelerated mouse P8 : SAMP8) に対する空間学習記憶能について検討した。また、海馬組織における神経新生作用についての組織学的検討も併せて行った。

【方法】 Bangle 抽出物は、乾燥した Bangle 根茎 500g を 70% Ethanol 2L に 3 日間浸漬し、濾過後、濃縮し、得られたエキス (46.1g 収率 9.2% ; エキス中に含まれる cis 体、trans 体のフェニルブテノイド二量体はそれぞれ 0.63%、0.30%) を用いた。

実験動物は、老化促進モデルマウス SAMP8 (日本エスエルシー株式会社, 雄性, 8 週齢) を用いた。コントロール群には CE-2 (日本クレア株式会社) を、Bangle 摂取群には、食品としてのヒト日常摂取量から換算した量である 0.075% Bangle 抽出物含有 CE-2 を、4 週間自由に摂取させた後、海馬依存的学習・記憶行動試験である Morris 水迷路試験を行った。本試験は、空間学習の指標である学習試行を 1 日 4 回 6 日間行い、7 日目に空間記憶の指標であるプローブ試行を実施した。学習試行は、遊泳速度、平均到達時間と総移動距離を評価項目とした。またプローブ試行は、ゴールエリアの滞在時間を評価項目とし、他エリアの滞在時間と比較した。水迷路試験後、脳を摘出し、海馬組織を Ki67 抗体 (細胞増殖マーカー) を用いた蛍光多重免疫染色を行い、Ki67 陽性細胞数をカウントした。

【結果・考察】 Bangle 抽出物投与開始後の体重の変化と食餌摂取量については、コントロール群と Bangle 摂取群を比較して有意な差はなかった。Morris 水迷路試験の学習試行において、遊泳速度は、コントロール群と Bangle 摂取群を比較して有意な差はなかった。平均到達時間について、Bangle 摂取群は、試行を重ねる毎に平均到達時間は短縮し、試行 6 日目ではコントロール群と比較して有意に短くなった。 ( $p < 0.05$ ) 総移動距離については、コントロール群と Bangle 摂取群を比較して有意な差はなかったが、平均到達時間の結果と同様の傾向が得られた。プローブ試行において、ゴールエリア滞在時間は、コントロール群と比較して Bangle 摂取群で有意に長くなった。 ( $p < 0.05$ ) また、各群において、ゴールエリア滞在時間と他エリア滞在時間を比較すると、コントロール群においては有意な差はなかったが、Bangle 摂取群ではゴールエリア滞在時間が有意に長くなった。 ( $p < 0.01$ ) さらに、海馬歯状回における Ki67 陽性細胞数をカウントし、コントロール群と Bangle 摂取群を比較したところ、Bangle 摂取群で有意に増加していることが明らかとなった。 ( $p < 0.05$ )

以上の結果より、インドネシア産ショウガ科食用植物 Bangle は、老化促進モデルマウスに対し空間学習記憶障害を改善する作用を示し、海馬歯状回における神経新生を促進することが明らかとなった。これらの作用は、活性成分であるフェニルブテノイド二量体の神経栄養因子様作用に起因すると推察された。また、Bangle は、日常摂取可能な安全性の高い食品であることから、認知機能低下を予防する食品として有用であると考えられる。

本研究から、Bangle は、高齢化に伴い増加が懸念される認知症など神経変性疾患の予防や、認知症患者数の増大による介護・医療費の高騰の抑制等、予防医学に大いに貢献できる素材と考えられる。また、フェニルブテノイド二量体は、創薬シーズとして認知機能改善薬リード化合物として有用と考えられ、臨床応用が期待できると考えられる。

|         |   |
|---------|---|
| 氏名(本籍)  | 野口 修平 (長野県)   |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 甲総医博第44号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与年月日 | 平成28年3月23日  |
| 学位論文題目  | Regulation of Gene Expression by Sodium Valproate in Epithelial-to-Mesenchymal Transition<br>(上皮間葉転換におけるバルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現制御) |
| 発表誌名    | Lung 193(5): 691-700 2015年8月19日   |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 齊藤 | 源頭 |
|      | 副査 | 教授 | 本家 | 孝一 |
|      | 副査 | 教授 | 横山 | 彰仁 |

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名

野口 修平

論文題目

Regulation of Gene Expression by Sodium Valproate in  
Epithelial-to-Mesenchymal Transition.

(上皮間葉転換におけるバルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現制御)

(論文要旨)

肺線維症は粉じん等の環境因子への曝露に起因して、肺胞上皮細胞から間葉系細胞への変化“Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)”や、肺線維芽細胞の異常な増殖、コラーゲン等の細胞外マトリックスの蓄積による線維化が起こる病気である。その疾患発症の分子メカニズムの多くは未解明であり、治療が困難で予後が不良の疾患である。

肺線維症に関連する遺伝子はいくつか知られているものの、それらの遺伝子一つ一つを制御しても完全に肺線維症の進行を止めることができないことから複数の遺伝子が複雑に関与していると考えられる。近年、肺線維症においても遺伝子発現制御に重要な因子であるヒストンの化学修飾についての研究がなされ、ヒストン H3、H4 のアセチル化が減少することが明らかになり、肺線維症関連遺伝子の遺伝子発現制御にヒストンの化学修飾が重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、多くの研究はヒストン化学修飾残基、および種類を特定するに至っていない。

本研究ではヒストン化学修飾を介した肺線維症関連遺伝子の遺伝子発現制御の解明を目指し、肺線維症において最も重要なメカニズムの一つである EMT に着目し、その網羅的遺伝子発現量解析による肺線維症関連遺伝子の変動と、EMT において重要な働きをするヒストン化学修飾の残基、種類の特定を試みた。更に、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) を用い、ヒストンのアセチル化を制御することで肺線維症関連遺伝子の発現量への影響を解析し、ヒストン化学修飾と肺線維症関連遺伝子の関係を明らかにし、EMT の分子メカニズムの解析を試みた。

ヒト肺胞上皮細胞系の培養細胞である A549 にトランスフォーミング増殖因子 TGF- $\beta$ 1 で EMT を誘導する系を用い、RNA シーケンシングにより網羅的遺伝子発現量解析を行い、肺線維症関連遺伝子の特定を試みた。その結果、*SERPINE1*、*LAMC2* といった既知の肺線維症関連遺伝子のほか、肺線維症との関連が未知の *GATSLS2* といった遺伝子の発現量の有意な変化が確認できた。また、ウエスタンブロッティングにより様々な種類のヒストンアセチル化、およびメチル化状態を解析した結果、ヒストンアセチル化の減少が確認でき、特に遺伝子発現促進に関わるアセチル化ヒストン H3K27 (H3K27ac) が大幅に減少していることが確認できた。更に、VPA の添加により、これらのアセチル化の減少を抑制できることが分かった。




また、*AGR2*、*ID2*、*GATSLS2* や、上皮系細胞のマーカー遺伝子である *CDHI* は EMT の誘導により発現量が減少し、VPA がその減少を抑制した。*CDHI* については、抗 H3K27ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降による転写開始点周辺の H3K27ac の局在を解析したところ、EMT の誘導による発現量の変化に対応して

H3K27ac の局在が減少し、VPA の添加によりその局在が増加した。

一方で、EMT の誘導により発現量の上昇した肺線維症関連遺伝子である *SERPINE1*、*LAMC2*、*TGFBI*、*COL1A1* や間葉系細胞のマーカー遺伝子である *CDH2*、*VIM* に関しては、*COL1A1* 遺伝子を除いて VPA による発現量増加の抑制がみられなかった。これらのうち、*SERPINE1* は発現量と H3K27ac の局在に相関が見られたが、*COL1A1* 遺伝子発現は H3K27ac の局在とは関連がないことが明らかとなった。よって、VPA による *COL1A1* の発現抑制は H3K27ac 以外の要因が強く働いているものと考えられる。

以上のことから、EMT の進行に伴い発現が抑制される上皮系細胞のマーカー遺伝子の制御は H3K27ac の脱アセチル化によるものであり、VPA による HDAC の阻害でその発現抑制を阻害することができるが、発現が促進される間葉系細胞のマーカー遺伝子や肺線維症関連遺伝子は、VPA ではその発現促進を阻害できないことが分かった。しかしながら、肺線維症関連遺伝子等の発現を抑制する機能を持つ薬剤が見つければ、その薬剤と VPA の併用により肺線維症の治療への効果が期待できることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

|      |      | 氏名    | 野口 修平   |
|------|------|-------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 齊藤 源顕 |  |
|      | 副査氏名 | 本家 孝一 |  |
|      | 副査氏名 | 横山 彰仁 |  |

題目 Regulation of Gene Expression by Sodium Valproate in Epithelial-to-Mesenchymal Transition.

(上皮間葉転換におけるバルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現制御)

著者

Shuhei Noguchi, Masamitsu Eitoku, Shigeharu Moriya, Shinji Kondo, Hidenori Kiyosawa, Takashi Watanabe, Narufumi Suganuma

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

Lung 193(5): 691-700  
2015年8月19日

要旨

肺線維症の疾患発症の分子メカニズムは未解明であり、治療が困難で予後が不良の疾患である。近年、肺線維症の発症に関連する遺伝子の発現制御にヒストンの化学修飾が重要な役割を果たしていることが示唆されたが、ヒストン化学修飾残基、および種類は特定されていない。本研究ではヒストン化学修飾を介した肺線維症関連遺伝子の遺伝子発現制御の解明を目指し、Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)に着目し、その網羅的遺伝子発現量解析による肺線維症関連遺伝子の変動と、EMTにおいて重要な働きをするヒストン化学修飾の残基、種類の特定を試みた。更に、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) を用い、ヒストンのアセチル化を制御することで肺線維症関連遺伝子の発現量への影響を解析し、ヒストン化学修飾と肺線維症関連遺伝子の関係を明らかにし、EMTの分子メカニズムの解析を試みた。

ヒト肺胞上皮細胞系の培養細胞であるA549にトランスフォーミング増殖因子TGF-β1でEMTを誘導する系を用い、RNAシーケンシングにより網羅的遺伝子発現量解析を行い、肺線維

ヒト肺胞上皮細胞系の培養細胞である A549 にトランスフォーミング増殖因子 TGF- $\beta$ 1 で EMT を誘導する系を用い、RNA シーケンシングにより網羅的遺伝子発現量解析を行い、肺線維症関連遺伝子の特定を試みた。その結果、*SERPINE1*、*LAMC2* といった既知の肺線維症関連遺伝子のほか、肺線維症との関連が未知の *GATSL2* といった遺伝子の発現量の有意な変化が確認できた。また、ウエスタンブロッティングにより様々な種類のヒストンアセチル化、およびメチル化状態を解析した結果、ヒストンアセチル化の減少が確認でき、特に遺伝子発現促進に関わるアセチル化ヒストン H3K27 (H3K27ac) が大幅に減少していることが確認できた。VPA の添加により、これらのアセチル化の減少を抑制できることが分かった。また、*AGR2*、*ID2*、*GATSL2* や上皮系細胞のマーカー遺伝子である *CDH1* は EMT の誘導により発現量が減少し、VPA がその減少を抑制した。*CDH1* については、抗 H3K27ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降による転写開始点周辺の H3K27ac の局在を解析したところ、EMT の誘導による発現量の変化に対応して H3K27ac の局在が減少し、VPA の添加によりその局在が増加した。一方で、EMT の誘導により発現量の上昇した肺線維症関連遺伝子である *SERPINE1*、*LAMC2*、*TGFBI*、*COL1A1* や間葉系細胞のマーカー遺伝子である *CDH2*、*VIM* に関しては、*COL1A1* 遺伝子を除いて VPA による発現量増加の抑制がみられなかった。これらのうち、*SERPINE1* は発現量と H3K27ac の局在に相関が見られたが、*COL1A1* 遺伝子発現は H3K27ac の局在とは関連がないことが明らかとなった。よって、VPA による *COL1A1* の発現抑制は H3K27ac 以外の要因が強く働いているものと考えられる。

以上のことから、EMT の進行に伴い発現が抑制される上皮系細胞のマーカー遺伝子の制御は H3K27ac の脱アセチル化によるものであり、VPA による HDAC の阻害でその発現抑制を阻害することができるが、発現が促進される間葉系細胞のマーカー遺伝子や肺線維症関連遺伝子は、VPA ではその発現促進を阻害できないことが分かった。

本研究では EMT において重要な働きをするヒストン化学修飾として H3K27ac の脱アセチル化を同定し、それによって上皮系細胞のマーカー遺伝子の発現抑制が制御されていることを明らかにした。一方で、EMT によって発現促進する間葉系細胞のマーカー遺伝子や肺線維症関連遺伝子は、これら遺伝子の転写開始点周辺において H3K27ac が増加するため、VPA ではその発現促進を阻害できないことを解明した。更に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬が肺線維症の新規治療法となる可能性が示された。今後、肺線維症関連遺伝子等の発現を抑制する薬剤について、さらなる詳細な探索・検討が必要であると思われる。

以上のように、本論文はヒストン脱アセチル化酵素阻害薬が肺線維症の新規治療法となりうる可能性を示し、肺線維症に対する新薬の開発が期待される。以上を総合的に判断し、審査員一同は申請者の学力および研究遂行能力が高知大学博士 (医学) の学位を授与されるに相応するものと判断した。

|         |   |
|---------|---|
| 氏名(本籍)  | 大出 佳寿 (高知県)   |
| 学位の種類   | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 甲総医博第45号  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与年月日 | 平成28年3月23日  |
| 学位論文題目  | Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease<br><br>(CKD患者における血漿可溶型プロレニン受容体の臨床的意義について) |
| 発表誌名    | Clinical and Experimental Nephrology, 17 (6), 848~856. 2013年12月17日  |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 北岡 | 裕章 |
|      | 副査 | 教授 | 前田 | 長正 |
|      | 副査 | 教授 | 奥原 | 義保 |

## 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

大出 佳寿

論文題目

Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease.

(CKD 患者における血漿可溶型プロレニン受容体の臨床的意義について)

(論文要旨)

## <目的>

(プロ)レニンはレニンの前駆体であり、脳・心・肺・肝・腎・骨格筋・腓・脂肪・胎盤などの重要臓器に存在する(プロ)レニン受容体 [(P)RR] と結合することで生理活性を獲得する。そして、(プロ)レニンと結合後、(プロ)レニン受容体はそのリガンド結合部位が切断され、可溶型(プロ)レニン受容体 [s(P)RR] として血漿中に存在する。慢性腎臓病 (CKD) 患者における s(P)RR と(プロ)レニンの動態は不明な点が多く、今回我々は CKD 患者における s(P)RR と(プロ)レニンの臨床的意義について検討を行った。

## <方法>

対象は当院及び関連医療機関の腎臓内科外来に通院中の患者 374 名。s(P)RR 濃度と血漿(プロ)レニン濃度、血清 Cr や尿蛋白等の腎機能関連マーカーを測定した。また、測定し得た限りにおいて、s(P)RR 濃度と血漿(プロ)レニン濃度と 1 年後 (289 名)・2 年後 (168 名) の腎機能変化率との比較を行った。

## <結果>




s(P)RR 濃度は血清 Cr と正の相関を認め、その他の腎機能関連マーカーとも相関を認めた。s(P)RR 濃度は ARB 内服群において非 ARB 内服群に比して、有意に低値であった。s(P)RR 濃度は糖尿病患者群において非糖尿病患者群に比して、高血圧患者群において非高血圧患者群に比して、有意に低値であった。一方、血漿(プロ)レニン濃度は腎機能と相関を認めなかった。s(P)RR 濃度は血漿(プロ)レニン濃度と相関を認めなかった。多変量解析を行った結果、eGFR

が s(P)RR に最も強い影響を与え、次いで ARB、糖尿病が s(P)RR と関連を認めた。1年後まで血清を測定し得た 289 名において、s(P)RR 濃度は腎機能変化率と正の相関を示し、2年後まで測定し得た 168 名においても、s(P)RR 濃度は腎機能変化率と正の相関を示した。

<総括>

s(P)RR は CKD 患者において腎機能と相関しており、腎機能障害に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、s(P)RR は腎機能予後予測マーカーとなる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

|      | 氏名   | 大出 佳寿   |
|------|------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 北岡 裕章  |
|      | 副査氏名 | 前田 長正  |
|      | 副査氏名 | 奥原 義保  |

題目 Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease

(CKD患者における血漿可溶型プロレニン受容体の臨床的意義について)

著者 Kazu Hamada, Yoshinori Taniguchi, Yoshiko Shimamura, Kosuke Inoue, Koji Ogata, Masayuki Ishihara, Taro Horino, Shimpei Fujimoto, Takashi Ohguro, Yukio Yoshimoto, Mika Ikebe, Kenji Yuasa, Eri Hoshino, Tatsuo Iiyama, Atsuhiko Ichihara, Yoshio Terada.

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Clinical and Experimental Nephrology, 17 (6), 848~856.  
 2013年12月17日

### 要旨

#### 【目的】

(プロ)レニンはレニンの前駆体であり、脳・心・肺・肝・腎・骨格筋・膵・脂肪・胎盤などの重要臓器に存在する(プロ)レニン受容体[(P)RR]と結合することで生理活性を獲得する。そして、(プロ)レニンと結合後、(プロ)レニン受容体はそのリガンド結合部位が切断され、可溶型(プロ)レニン受容体[s(P)RR]として血漿中に存在する。慢性腎臓病(CKD)患者におけるs(P)RRと(プロ)レニンの動態は不明な点が多く、今回我々はCKD患者におけるs(P)RRと(プロ)レニンの臨床的意義について検討を行った。

## 【方法】

対象は当院及び関連医療機関の腎臓内科外来に通院中の患者 374 名。s(P)RR 濃度と血漿(プロ)レニン濃度、血清 Cr や尿蛋白等の腎機能関連マーカーを測定した。また、測定し得た限りにおいて、s(P)RR 濃度と血漿(プロ)レニン濃度と 1 年後(289 名)・2 年後(168 名)の腎機能変化率との比較を行った。

## 【結果】

s(P)RR 濃度は血清 Cr と正の相関を認め、その他の腎機能関連マーカーとも相関を認めた。s(P)RR 濃度は ARB 内服群において非 ARB 内服群に比して、有意に低値であった。s(P)RR 濃度は糖尿病患者群において非糖尿病患者群に比して、高血圧患者群において非高血圧患者群に比して、有意に低値であった。一方、血漿(プロ)レニン濃度は腎機能と相関を認めなかった。s(P)RR 濃度は血漿(プロ)レニン濃度と相関を認めなかった。多変量解析を行った結果、eGFR が s(P)RR に最も強い影響を与え、次いで ARB、糖尿病が s(P)RR と関連を認めた。1 年後まで血清を測定し得た 289 名において、s(P)RR 濃度は腎機能変化率と正の相関を示し、2 年後まで測定し得た 168 名においても、s(P)RR 濃度は腎機能変化率と正の相関を示した。

## 【総括】

s(P)RR は CKD 患者において腎機能と相関しており、腎機能障害に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、s(P)RR は腎機能予後予測マーカーとなる可能性が示唆された。

本研究の結果より、血中可溶性(プロ)レニン受容体は、慢性腎臓病の重症度と関係するのみならず、将来の腎機能悪化の予測因子となる可能性が示された。今後、この新しい知見が、慢性腎臓病における病態把握や予後改善のための介入に寄与すると考えられる。よって、本論文は、高知大学博士(医学)に値すると判断した。

|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | 松本 竜季 (岡山県)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 甲総医博第46号   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位授与年月日 | 平成28年3月23日   |
| 学位論文題目  | Small Heat Shock Protein Beta-1 (HSPB1) Is Upregulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury<br>(HSPB1 (Small Heat Shock Protein Beta-1) は急性腎障害において誘導され近位尿細管細胞のAutophagyとApoptosisを調整する) |
| 発表誌名    | PLoS One. 2015; 10(5): e0126229 2015年5月  |

|      |    |    |    |    |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 藤枝 | 幹也 |
|      | 副査 | 教授 | 椛  | 秀人 |
|      | 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 松本 竜季

## 論文題目

Small Heat Shock Protein Beta-1 (HSPB1) Is Upregulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury (HSPB-1は急性腎障害において誘導され近位尿細管細胞のAutophagyとApoptosisを調整する)




(論文要旨)

Heat shock protein(HSP)は細胞がストレスにさらされた際発現が上昇して細胞を保護する蛋白質であり、シャペロン機能や細胞内蛋白輸送に関わっている。HSPは熱のほか活性酸素、感染、炎症、飢餓、低酸素など細胞に対する様々なストレスにより誘導されることが知られている。オートファジーは細胞内の蛋白質を分解する仕組みのひとつであり、細胞内に蓄積した異常蛋白質を分解したり、細胞質内に侵入した病原微生物を排除することで生体の恒常性維持に関与している。急性腎障害におけるオートファジーの役割は不明であるが、HSPファミリーは熱や他の細胞ストレスに応答してオートファジーを調節することが知られている。しかし、27kDaの小分子型のHSPB1のオートファジーへの役割は不明である。今回、我々は急性腎障害の病態におけるHSPB1の役割について検討した。

方法として、ラットの腎虚血/再灌流による急性腎障害モデル(I/Rモデル)、および培養尿細管細胞を使用し、I/Rモデルの腎臓におけるHSPB1の発現、また培養尿細管細胞を用いてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>や低酸素下でのHSPB1の発現を評価した。オートファジーにおける役割を明らかにするため、green fluorescent protein light chain 3(GFP-LC3)安定発現細胞にHSPB1を遺伝子導入しオートファジーを検出した。また、siRNAを用いてHSPB1の発現を抑制し、オートファジーの変化を検討した。

その結果、HSPB1はラット腎虚血/再灌流により近位尿細管で誘導されLC3と共局在していた。酸化ストレス下の培養尿細管細胞においてもHSPB1はmRNA・蛋白レベルでH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度依存性に誘導され、HSPB1を過剰発現させるとオートファジーが誘導された。siRNAによるHSPB1の発現抑制でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるオートファジーの誘導は減弱した。HSPB1の遺伝子導入によりLC3-IIの発現亢進とp62の発現低下が起こりAutophagic fluxの亢進が認められた。さらにHSPB1の遺伝子導入によりアポトーシスの抑制が認められた。これらの結果から、HSPB1はオートファジーとアポトーシスを調節し急性腎障害の病態において重要な働きをしている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

|      |      | 氏名    | 松本 竜季   |
|------|------|-------|---|
| 審査委員 | 主査氏名 | 藤枝 幹也 |  |
|      | 副査氏名 | 椛 秀人  |  |
|      | 副査氏名 | 執印 太郎 |  |

題目 Small Heat Shock Protein Beta-1 (HSPB1) Is Upregulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury

(HSPB1 (Small Heat Shock Protein Beta-1) は急性腎障害において誘導され近位尿細管細胞のAutophagyとApoptosisを調整する)

著者 Tatsuki Matsumoto, Madoka Urushido, Haruna Ide, Masayuki Ishihara, Kazu Hamada-Ode, Yoshiko shimamura, Koji Ogata, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Takafumi Taguchi, Taro Horino, Shimpei Fujimoto, Toshio Terada

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

PLoS One. 2015; 10(5): e0126229  
2015年5月

### 要旨

#### 背景

Heat shock protein (HSP) は発熱、活性酸素、感染、炎症、低酸素などのストレス時に誘導される蛋白であり細胞保護作用がある。さらに、HSP ファミリーは細胞ストレスに応答してオートファジーを調整することが知られているが、急性腎障害におけるオートファジーの役割については十分検討されていない。HSP ファミリー中のヒトの細胞に広く認められる small HSP superfamily に属する 27kDa の小分子型 HSP beta-1 (HSPB1) のオートファジーについての役割は不明である。そのため、急性腎障害における HSPB1 の役割について検討した。

#### 方法

ラットの腎虚血/再灌流(I/R モデル)による急性腎障害モデルと培養ラット尿細管細胞を用いて、I/R モデルにおける腎での HSPB1 の発現、培養尿細管細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や低酸素下での HSPB1

の発現を検討した。オートファジーにおける役割を検討するために、green fluorescent protein light chain 3 (GFP-LC3)安定発現細胞に HSPB1 を遺伝子導入しオートファジーを検出した。Small interfering RNAs (siRNA)導入により HSPB1 の発現を抑制しオートファジーに対する影響を検討した。

#### 結果

HSPB1 は、I/R モデルにおいて近位尿細管に染色され、LC3 と共局在していた。HSPB1 の messenger RNA (mRNA)と蛋白は I/R 障害 6-72 時間後に発現が認められた。

培養尿細管細胞において HSPB1 は mRNA・蛋白とともに  $H_2O_2$  濃度依存性に誘導され、HSPB1 過剰発現によりオートファジーが誘導された。siRNA による HSPB1 発現抑制により  $H_2O_2$  によるオートファジーの誘導は減弱した。HSPB1 遺伝子導入によりオートファジー促進 (autophagic flux)を示す LC3-II 蛋白が増加し、オートファジー抑制を示す p62 蛋白は抑制されていた。さらに、HSPB1 の遺伝子導入によりアポトーシスの抑制が観察された。

#### 考察

HSPB1 は急性腎障害の酸化的ストレス時に増加し、腎尿細管細胞にオートファジーを促進しアポトーシスを抑制することが判明した。これらのことから HSPB1 の発現増加は、急性腎障害時の病態において重要な働き、尿細管細胞の保護作用をおこなっている可能性が示唆された。

著者らの急性腎障害における HSPB1 の役割についての検討、特に、オートファジーとアポトーシスに及ぼす影響についての検討は、世界初である。さらにこの知見は、急性腎障害の病態を解明すると同時に新たな治療法の可能性を感じさせる大変、意義深い研究である。よって、審査員一同、本論文が、高知大学博士(医科学)に相応しい価値あるものと判断した。

公開審査による最終試験を行った。申請者は、

これらを総合して、審査員一同、本申請者は高知大学博士(医学)の称号に相応しい知識と資質を有すると判断し、合格と判定した。