

---

**博士論文要旨**

---

論文提出者 星野 温

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1487号
学位授与の日付	平成26年3月9日
学位授与の要件	最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
論文審査委員	教授 奥田 司・教授 田代 啓・教授 八木田和弘

## 論文題目及び掲載誌

Hoshino A, Matoba S, Iwai-Kanai E, Nakamura H, Kimata M, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Ariyoshi M, Mita Y, Ikeda K, Ueyama T; Okigaki M, Matsubara H.

**p53-TIGAR Axis Attenuates Mitophagy to Exacerbate Cardiac Damage after Ischemia**

The Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2012; 202: 52: 175-184.

## 審査結果の要旨

細胞老化や細胞死を制御するがん抑制遺伝子 p53 はエネルギー代謝やオートファジー制御にも関与することが報告されている。一方、エネルギー産生器官であるミトコンドリアは酸化ストレスや細胞死にも関与し、その機能維持が重要となるが、そのメカニズムとして不良ミトコンドリアをオートファジー機構にて処理する「ミトファジー」の存在が知られている。こうした背景のもと、申請者らは、p53 によるミトファジーの制御や虚血心筋障害への関与について検討した。

まずマウス心筋梗塞モデルにおいて、p53 欠損マウスでは野生型マウスの場合と異なり、虚血境界領域におけるアポトーシスが減少し遠隔期のリモデリングが抑制されることを確認した。ここでは、虚血境界領域でオートファジーが亢進し、電子顕微鏡像でミトコンドリアを内包するオートファゴソームが観察されたことから申請者らは p53 欠損マウスではミトファジーが起きていると推測した。逆に異常ミトコンドリアは有意に減少していた。オートファジー誘導因子を検索したところ、p53 欠損マウスではオートファジー抑制にはたらく TIGAR の有意な減少を認めた。他方、野生型マウスでは虚血境界領域で p53 の活性化に引き続く TIGAR の発現亢進が認められ、それに逆相関する形でオートファジーの抑制が認められた。

そこで申請者らは次のステップとして TIGAR 欠損マウスを作製した。このマウスでは、p53 欠損マウスと同様に虚血境界領域でのオートファジーの亢進とミトコンドリアの減少が認められた。ミトファジーの誘導因子で

ある Bnip3 の活性化が p53, TIGAR 欠損マウス共に観察されたことから、これらの遺伝子改変マウスではミトファジーが亢進しているものと考えられた。マウス新生仔初代培養心筋細胞を用いた疑似虚血モデルである低酸素・グルコース除去刺激実験を行なったところ、p53 や TIGAR ノックダウンによってミトファジーが亢進すること、その効果は Bnip3 ノックダウンによって消失すること、そして p53 ノックダウンによるミトファジー亢進効果はアデノウイルスを用いた TIGAR の強制発現にて消失することを見出した。このことから p53 欠損マウスにおけるミトファジー亢進は TIGAR の発現が抑制され Bnip3 が活性化することで引き起こされるものと申請者らは解釈した。

くわえて、p53 欠損マウスや TIGAR 欠損マウスにオートファジー阻害剤であるクロロキンを心筋梗塞後に投与する実験を行い、ミトファジーが抑制され虚血境界領域におけるアポトーシスや遠隔期の左室リモデリングが野生型マウスと同等まで悪化することを見出している。これらの結果から申請者らは、p53 欠損マウスの虚血に対する心筋保護効果は TIGAR 発現抑制を介したミトファジー活性化によるものであるものと結論付けた。

以上が本論文の要旨であるが、循環器内科臨床上の問題点となっている心筋梗塞後左室リモデリングによる心不全発症に対し、p53-TIGAR-Bnip3 シグナルカスケードへの介入によるミトコンドリア品質管理の活性化が新たな治療標的となりうることを明らかにした点で、医学上価値ある研究と認める。

## 参考文献 (3編)

- 1) Hoshino A, Nakamura T, Matsubara H. The bedtime administration ameliorates blood pressure variability and reduces urinary albumin excretion in amlodipine-olmesartan combination therapy. *Clin Exp Hypertens* 2010; 32: 416-422.
- 2) Hoshino A, Nakamura T, Enomoto S, Kawahito H, Kurata H, Nakahara Y, Ijichi T. Clinical utility of evaluating intracranial artery stenosis and silent brain infarction to predict the presence of subclinical coronary artery disease in ischemic stroke patients. *Intern Med* 2008; 47: 1775-1781.
- 3) Hoshino A, Nakamura T, Enomoto S, Kawahito H, Kurata H, Nakahara Y, Ijichi T. Prevalence of coronary artery disease in Japanese patients with cerebral infarction: impact of metabolic syndrome and intracranial large artery atherosclerosis. *Circ J* 2008; 72: 404-408.

論文提出者 原田 憲一

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1488 号
学位授与の日付	平成 26 年 2 月 12 日
学位授与の要件	最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
論文審査委員	教授 佐和貞治・教授 奥田 司・教授 加藤則人

## 論文題目及び掲載誌

Harada K, Harada Y, Beika M, Koizumi N, Inoue K, Murayama Y, Kuriu Y, Nakanishi M, Minamikawa T, Yamaoka Y, Dai P, Yanagisawa A, Otsuji E, Takamatsu T.

**Detection of Lymph Node Metastases in Human Colorectal Cancer**

**by Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence with Spectral Unmixing**

*International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14: 23140-23152.

## 審査結果の要旨

転移リンパ節の正確な評価は大腸癌患者の適切な治療に必要な不可欠である。リンパ節転移の検出方法としては、HE染色標本による病理組織学的解析が標準的な方法として用いられる。しかし、通常1個のリンパ節について1~2枚作成された標本を鏡検し診断を行うため、その感度には限界があり、リンパ節転移を検出する新しい方法が求められている。

申請者は、5-aminolevulinic acid (5-ALA) による protoporphyrin IX (PpIX) の蛍光が大腸癌転移リンパ節を描出可能か検討した。非癌細胞においては、PpIXの蛍光は蛍光を有しないヘムに速やかに代謝されるが、癌細胞においては選択的に蓄積され青色光励起により635 nm付近の赤い蛍光を放つ。これは、癌細胞における ferrochelatase 活性の低下と porphobilinogen deaminase 活性の増加による。申請者らは、以前に胃癌患者リンパ節において、PpIX蛍光が強い自家蛍光によって覆われてしまうことを報告している。それゆえ、PpIX蛍光を検出するために

は自家蛍光を取り除くことが重要である。今回の研究ではPpIX蛍光にオーバーラップするコラーゲン自家蛍光を取り除くために、spectral unmixing法を用いた。進行大腸癌患者17人の切除リンパ節を用いて検討した。手術2時間前に15 mg/kgの5-ALAを投与後、87個のリンパ節に対して蛍光スペクトラルイメージングと病理組織学的診断を行った。spectral unmixing法による転移リンパ節のPpIX蛍光輝度は非転移リンパ節のPpIX蛍光輝度と比較すると10.2倍高い値であった。ROC解析では、spectral unmixing法を用いたPpIXの蛍光輝度による転移リンパ節のAUCは0.95であり、感度、特異度、正確度はそれぞれ88.3%、92.0%、87.4%であった。これらの結果は、spectral unmixing法を用いることによりPpIX蛍光は大腸癌リンパ節転移を描出可能なことを示しており、この迅速かつ簡便な方法は摘出リンパ節の肉眼的評価に応用可能なことが示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、spectral unmixing法を

用いることにより PpIX蛍光が大腸癌リンパ節転移検出に有用であり、日常臨床にも応用の可能性があることを明らかにしたという点で、医学上価値ある研究と認める。

### 参考論文 (3編)

1) Koizumi N, Harada Y, Murayama Y, Harada K, Beika M, Yamaoka Y, Dai P, Komatsu S, Kubota T, Ichikawa D, Okamoto K, Yanagisawa A, Otsuji E, Takamatsu T. Detection of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in patients with gastric cancer. *An Surg Oncol* 2013; 20: 3541-3548.

2) Harada K, Ochiai T, Inoue K, Soga K, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Kokuba Y, Sonoyama T, Otsuji E. Optimal surgical treatment for patients with pT2 gallbladder cancer. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 14-9.

3) 原田憲一, 白方秀二, 岡山徳成, 小出一真, 濱頭憲一郎, 能見伸八郎. 腹部内臓血管3枝に閉塞性病変を有する腹部アンギーナに対して大動脈・上腸間膜動脈バイパス術を施行した1手術例. *臨外* 2013.09; 68: 1113-1117.

### 論文提出者 松村 篤

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1489号
学位授与の日付	平成25年2月12日
学位授与の要件	最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
論文審査委員	教授 佐和貞治・教授 奥田 司・教授 加藤則人

### 論文題目及び掲載誌

Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Kokuba Y, Nakamura T, Matsumoto K, Otsuji E.

#### HGF Regulates VEGF Expression Via the C-Met Receptor Downstream Pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 Murine Cells

*International Journal Of Oncology* 2013; 42: 535-542.

### 審査結果の要旨

血管新生は悪性腫瘍の進行に不可欠であるが、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) は、特に重要な役割を担っている。VEGF 発現を制御する主要な転写因子は HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ) であり、低酸素条件下で安定・蓄積して、VEGF 遺伝子の発現を促進する。一方、HGF (Hepatocyte Growth Factor) は、腫瘍-間質相互作用を仲介するサイトカインとして認識されている。そこで、我々は間質由来の HGF が腫瘍細胞の VEGF 発現を促進させ、腫瘍血管新生を促すのではないかと仮定した。しかし、HGF/c-Met シグナルが、低酸素条件下の腫瘍環境の中で、VEGF 発現を制御するメカニズムは明らかでない。

申請者は本研究において、以前、マウス大腸癌細胞株 (CT26) 腫瘍の成長や血管新生を阻害することを示した HGF アンタゴニストである NK4 の安定発現細胞株 (CT26-NK4) を、コントロール群として MOCK 遺伝子導

入細胞株 (CT26-NEO) を用いた。同系マウスの CT26-NK4 移植片のホモジネート中の VEGF 濃度は、CT26-NEO に比べて有意に低値であった。また、CT26-NEO の培養上清中の VEGF 濃度は、HGF 添加と低酸素条件下で上昇し、CT26-NK4 の VEGF 濃度上昇は抑制されていた。CT26 細胞の VEGF 発現は、HGF/c-Met シグナルによって制御されており、NK4 は、低酸素条件下でも VEGF 発現を抑制した。さらに、HGF/c-Met の細胞内経路である PI3K/Akt, MAPK, STAT3 のそれぞれのインヒビターを添加すると、正常酸素/低酸素条件下のいずれにおいても、培養上清中の VEGF 濃度が抑制され、各 pathway が低酸素条件下での VEGF 発現調節に関わっていた。核タンパク中の HIF1 $\alpha$  の DNA 結合活性を ELISA 法で測定し、HIF1 $\alpha$  の発現はウェスタンブロットティング法で検出した。Total RNA を抽出し、Real-time PCR 法を用いて解析した。HIF1 $\alpha$  タンパクの合成や転写活性、VEGF

mRNA 発現は、HGF 添加や低酸素条件で上昇を認めたが、各 pathway のインヒビターで抑制された。また、これらは CT26-NK4 で抑制されていた。このことから、HGF/c-Met シグナルは HIF1 $\alpha$  の発現や転写活性を制御しており、CT26 細胞の HIF1 $\alpha$  を介した VEGF 発現を制御することが示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、HGF は腫瘍細胞内の PI3K/Akt, MAPK, STAT3 の活性化を介して、HIF1 $\alpha$  や VEGF の発現を促進するというメカニズムを明らかにした点で、医学上価値ある研究と認める。

### 参 考 論 文 (1 編)

- 1) Kubota T, Matsumura M, Taiyoh H, Izumiya Y, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. Interruption of the HGF paracrine loop by NK4, an HGF antagonist, reduces VEGF expression of CT26 cells. *Oncol Rep* 2013; 30: 567-572.

論文提出者 渡 辺 彰 英

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	乙第 2105 号
学位授与の日付	平成 26 年 2 月 12 日
学位授与の要件	学力の確認及び論文審査合格
論文審査委員	教授 柳澤昭夫・教授 矢部千尋・教授 高松哲郎

### 論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Watanabe A, Imai K, Kinoshita S.

**Impact of High Myopia and Duration of Hard Contact Lens wear on the Progression of Ptosis**

*Japanese Journal of Ophthalmology* 2013; 57: 206-210.

### 審 査 結 果 の 要 旨

ハードコンタクトレンズ (以下 HCL) に伴う眼瞼下垂は、若年から中年によくみられる疾患である。この病態は、HCL 長期装用者に起こる腱膜性下垂であり、HCL を外す際に上眼瞼を外側へ引くことで挙筋腱膜の菲薄化や瞼板からの乖離などが起こることに起因すると数多くの論文が報告してきた。過去には、片眼に HCL、片眼に SCL を装用させた 11 例について検討し、4 週間以内に 5 例で HCL 装用眼のみに眼瞼下垂が発症し、HCL の装用中止によって改善したという HCL を外す際の変化以外の原因を示唆する報告もある。また、申請者が加齢性眼瞼下垂と HCL 眼瞼下垂の組織学的検討を行った研究では、HCL 眼瞼下垂ではミュラー筋の線維化を認めたが、加齢性眼瞼下垂ではほとんど認めなかった。以上のように、HCL 眼瞼下垂の病態は、HCL を外す際の挙筋腱膜の変化だけでは説明できず、未だ明らかになっていない。

そこで、申請者は、強度近視と装用年数が HCL 眼瞼下垂に与える影響について、眼瞼下垂の程度を 4 段階に分類し、年齢、平均等価球度数、装用年数との関連につ

いて検討した。HCL 装用中の 98 例 194 眼を眼瞼下垂の程度で分類した結果、下垂なし 11 眼、軽度 37 眼、中等度 47 眼、重度 99 眼であった。平均等価球度数は、下垂なし群で  $-4.80 \pm 1.72D$ 、軽度群で  $-5.57 \pm 2.10D$ 、中等度群で  $-6.28 \pm 2.44D$ 、重度群で  $-8.34 \pm 3.84D$  で、重度群とその他の 3 群との間にそれぞれ有意な差を認めた。平均装用年数は、下垂なし群で  $31 \pm 11$  年、軽度群で  $29 \pm 10$  年、中等度群で  $30 \pm 9$  年、重度群で  $34 \pm 8$  年で、重度群と中等度群、重度群と軽度群の間に有意差を認めた。パス解析の結果、平均等価球度数、装用年数および年齢が有意に下垂の重症度と関連していた。また、重度群とその他の群の 2 群に分けて多変量解析を行った結果、重症眼瞼下垂は、年齢と装用期間が増えること、平均等価球度数が低下することと関連していた。これらの結果は、HCL を外す際の外力が眼瞼下垂の原因という説では説明できず、むしろ強度近視に伴いエッジが厚い HCL を長期装用することが徐々に眼瞼下垂を進行させることを示唆し、強度近視と長期装用は HCL 眼瞼下垂進行のリスクファクターであることを明確にした。

以上が本論文の要旨であるが、HCL眼瞼下垂における多症例の臨床データを解析し、HCL眼瞼下垂の病態とリスクファクターについて新しい知見を明らかにした点で、医学上価値ある研究と認める。

#### 参 考 論 文 (2 編)

- 1) Watanabe A, Araki B, Noso K, Kakizaki H, Kinoshita S. Histopathology of blepharoptosis induced by prolonged hard contact lens wear. *Am J Ophthalmol* 2006; 141: 1092-1096.
- 2) 渡辺彰英. CLと眼瞼下垂. *日本コンタクトレンズ学誌* 2012; 54: 59-61.

#### 論文提出者 鈴木 啓

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	乙第2106号
学位授与の日付	平成26年2月12日
学位授与の要件	学力の確認及び論文審査合格
論文審査委員	教授 河田光博・教授 横山尚彦・教授 加藤則人

#### 論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Suzuki K, Kawauchi A, Nakamura T, Itoi S, Ito T, So J, Ukimura O, Hagiwara A, Yamagishi H, Miki T.  
**Histologic and Electrophysiological Study of Nerve Regeneration Using  
 a Polyglycolic Acid-collagen Nerve Conduit Filled with Collagen Sponge in Canine Model**  
*UROLOGY* 2009; 74: 958-963.

#### 審 査 結 果 の 要 旨

術後神経機能障害を起こす泌尿器科領域の代表的な手術として、勃起機能障害を起こす根治的前立腺全摘除術と根治的膀胱全摘除術、また射精機能障害を起こす後腹膜リンパ節郭清術がある。近年、積極的に神経温存術が施行されているが、根治性などの問題から温存術の適応とならない症例も多いのが現状であり、代わりに自家神経移植が行われることもある。しかし、自家神経移植には麻痺や、手術時間の延長、追加の皮膚切開、神経腫の形成といった合併症の問題がある。神経再生には欠損部の末梢側まで再生を誘導するための誘導骨格が必要であり、その機能を有している人工神経導管は末梢神経修復にとって有望な代替手段である。

申請者は自律神経である下腹神経の欠損部をPGA-コラーゲンチューブを用いて神経再生を誘導し、機能回復を確認することと、それに要する時間を組織学および電気生理学的に解明することを本研究の目的とした。実験には18匹の雄のビーグル犬を2匹はコントロール群とし、残りの16匹は手術群として術後2週間後と2, 3, 4, 5, 6, 7, 8ヶ月後に2匹ずつ神経再生の機能回復を検討した。手術は下腹神経の右側のみを1cm切除し、

その欠損に対し2cmのPGAコラーゲン複合チューブを神経断端の中枢側および末梢側をそれぞれ5mmずつチューブの中に挿入する形で埋め込んだ。電気生理学的検索としては、腰内蔵神経を30V, 2ms, 10Hzの条件で連続刺激した。術後6ヶ月までのすべての手術群と7ヶ月目の1匹については反応を認めなかった。術後7ヶ月目の残り1匹に関しては、膀胱頸部内圧のみ33mmHgの上昇を認め、術後8ヶ月目のものでは、コントロール群と同様に、精管内圧が76mmHgまで、膀胱頸部内圧は24mmHgまで上昇し前立腺被膜は1.1Gの収縮を示した。組織学的には術後2ヶ月でトルイジンブルー染色陽性の神経組織の存在が、チューブの移植部位から摘出した組織と末梢側で確認できた。

以上の結果より、自律神経である下腹神経が標的臓器への神経再支配を完了するのに必要な期間は7~8ヶ月であることを明らかにした。前立腺全摘除術の際に、腓腹神経を勃起神経再生用導管として移植することによって、早ければ8ヶ月で勃起機能の回復が見られ、勃起機能の十分な改善は手術後14~18ヶ月で観察されている。この勃起神経の機能回復までの期間は、我々の人工神経



導管を用いて行った実験結果とほぼ一致しており、人工神経導管を臨床応用した場合には8ヶ月以降でも、さらなる神経の再生による機能の回復が期待できると考えられた。

以上が本論文の要旨であるが、PGA コラーゲンチューブを使用することで摘出を余儀なくされた自律神経の欠損で起こる機能障害から神経の再生を促進し、神経機能が回復することを明らかにし、術後神経機能障害の予防に有用であることを示唆し、医学上価値ある研究と認める。

#### 参 考 論 文 (4 編)

- 1) Ito T, Nakamura T, Suzuki K, Takagi T, Toba T, Hagiwara A, Kihara K, Miki T, Yamagishi H, Shimizu Y. Regeneration of hypogastric nerve using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with collagen sponge proved electrophysiologically in a canine model. *Int J Arti Organs* 2003; 26: 245-251.
- 2) Ukimura O, Ushijima S, Honjo H, Iwata T, Suzuki K, Hirahara N, Okihara K, Mizutani Y, Kawauchi A, Miki T. Neuroselective current perception threshold evaluation of bladder mucosal sensory function. *Eur Urol* 2004; 45: 70-76.
- 3) Ukimura O, Iwata T, Ushijima S, Inaba M, Suzuki K, Honjo H, Okihara K, Mizutani Y, Kawauchi A, Miki T. Possible contribution of prostatic anterior fibromuscular stroma to age-related urinary disturbance in reference to pressure-flow study. *Ultrasound in Med. & Biol.* 2004; 30: 575-581.
- 4) Ukimura O, Kanazawa M, Fujihara A, Kamoi K, Okihara K, Miki T, Yoneda K, Terasaki T, Nakanouchi T, Nakamura J, Naya Y, Inoue W, Yamada T, Yamada H, Kojima M, Suzuki K, Toiyama D, Ushijima S. Naftopijil versus tamsulosin hydrochloride for lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia with special reference to the storage symptom: a prospective randomized controlled study. *Int J Urol* 2008; 15: 1049-1054.