
博士論文要旨

論文提出者 菅 沼 泉

学位の種類 博士(医学)
学位記の番号 甲第1510号
学位授与の日付 平成26年3月31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 八木田和弘・教授 吉村了勇・教授 松田 修

論文題目及び掲載誌

Suganuma I, Mori T, Ito F, Tanaka Y, Sasaki A, Matsuo S, Kusuki I, Kitawaki J.

Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha Enhances Local Estrogen Biosynthesis by Stimulating Aromatase Activity in Endometriosis

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2014; 99: E1191-1198.

審査結果の要旨

子宮内膜症の発症・進展にはエストロゲンが関与しており、その病巣では唯一のエストロゲン生合成酵素であるアロマトラーゼが異常発現している。Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1 α)はステロイドホルモン合成に関わる転写共役因子である。しかし、子宮内膜症におけるPGC-1 α の発現や機能についての検討はこれまでにない。そこで申請者は、子宮内膜症におけるPGC-1 α のアロマトラーゼへの関与と子宮内膜症病巣局所におけるエストロゲン生合成への影響について検討した。

申請者はまず、子宮内膜症性卵巣嚢胞、同正所性子宮内膜、正常子宮内膜におけるPGC-1 α とアロマトラーゼ発現を免疫染色とリアルタイムPCRを用いて解析した。子宮内膜症性卵巣嚢胞におけるPGC-1 α 発現は子宮内膜より強く、その局在はアロマトラーゼと一致しmRNAレベルでも両者は相関していた。また、それらの初代培養間質細胞を用いてPGC-1 α のアロマトラーゼ発現機序への関与をexon I-specific RT-PCR, ChIP アッセイ, ルシフェラーゼアッセイ, リアルタイムPCRおよび酵素アッセイ法で検証した。さらにPGC-1 α 発現誘導に関与する因子について評価した。子宮内膜症性卵巣嚢胞間質細胞におけるアロマトラーゼの発現調節にはプロモーター (P) I.3 および PII が強く関与しており、PGC-1 α は両者の間に存在する nuclear receptor half-site を含む領域と相互作用していた。子宮内膜症性卵巣嚢胞間質細胞においてPGC-1 α 導入はアロマトラーゼのプロモーター活性、

mRNA発現、酵素活性を増強させた。アロマトラーゼ転写活性の増加は nuclear receptor half-site の変異により減弱した。PGC-1 α の発現は低酸素環境やエストロゲン暴露下では影響を受けなかったがTNF- α 刺激により誘導された。上記変化は正所性および正常内膜間質細胞では認めなかった。本研究により、子宮内膜症においてPGC-1 α はアロマトラーゼの発現/活性を亢進させることで、エストロゲンを介した増殖に関与している可能性が示唆された。その機序に関しては、steroidogenic factor 1 (SF-1)の結合部位である nuclear receptor half-site との相互作用が示されたことから、PGC-1 α がSF-1と共役してアロマトラーゼ発現を刺激したと示唆された。さらに、PGC-1 α がTNF- α によって誘導されることから子宮内膜症病巣局所においてPGC-1 α , TNF- α とエストロゲンによる悪循環の存在が予想される。したがって、PGC-1 α はアロマトラーゼを介した局所エストロゲン生合成において中心的な役割を持ち、子宮内膜症における新規治療標的となりうる。

以上が本論文の要旨であるが、子宮内膜症におけるアロマトラーゼを介した局所エストロゲン生合成とPGC-1 α の関連を示した最初の報告であり、さらにPGC-1 α を標的とした新たな治療が期待できる点で、医学的価値がある研究と認められる。

参 考 論 文 (1編)

- 1) Yamanaka K, Xu B, Suganuma I, Kusuki I, Mita S,

Shimizu Y, Mizuguchi K, Kitawaki J. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic

stromal cells in spheroid culture. *Fertil Steril* 2012; 97: 477-482.

論文提出者 劉 柏 宏

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 甲第 1511 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 31 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 渡邊能行・教授 奥田 司・教授 水野敏樹

論文題目及び掲載誌

Liu PH, Aoi W, Takami M, Terajima H, Tanimura Y, Naito Y, Ioth Y, Yosikawa T.

The Astaxanthin-induced Improvement in Lipid Metabolism During Exercise is Mediated by a PGC-1 α Increase in Skeletal Muscle

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 2014; 54: 86-89.

審査結果の要旨

アスタキサンチンは天然カロテノイドの一種であり、高い抗酸化力を有す。継続的なアスタキサンチン摂取には、運動持久力の向上作用、筋疲労改善作用、運動時の脂肪燃焼効率化作用、脂肪組織重量および血中脂質の低下作用などが報告されている。一方、アスタキサンチンによる脂質代謝促進作用の一部には、筋細胞内のミトコンドリア局在酵素の carnitine parmitoyl transferase I の活性化が関与することが明らかとなっているが、その詳細メカニズムについてはまだ解明されていない。

申請者は、アスタキサンチンによる脂質代謝促進作用の分子機構を明らかにするために、実験動物を用いてアスタキサンチン摂取と運動負荷による影響について生理学および生化学的手法により検討した。7週齢の ICR 雄性マウスを 1 週間の予備飼育後、コントロール飼料と 0.02% のアスタキサンチン含有飼料を 2 週間摂取させた。摂取後、安静群と運動群にわけ、運動群は 30 分間、分速 25 m でトレッドミル走による一過性急性運動を負荷した。安静群では体重、血糖値、血中乳酸値、筋間質 pH に飼料による差は認めなかった。一過性急性運動負荷後、コントロール群に比較してアスタキサンチン飼育群で血漿遊離脂肪酸の有意な減少を認めたが、血糖値、血中乳酸値には差を認めなかった。一過性急性運動負荷後に筋間質 pH はコントロール群で有意に低下したが、その低下はアスタキサンチン群で有意に改善した。下肢骨格筋における peroxisome proliferator-activated recep-

tor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) によって発現調節を受ける cytochrome c と fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5) の発現をウェスタンブロット法により評価したが、コントロール群と比較してアスタキサンチン群で PGC-1 α 、cytochrome c、FNDC5 の発現は有意に増大した。これらの結果より、アスタキサンチン摂取により骨格筋の PGC-1 α 発現増加を介したミトコンドリア合成系の活性化が誘導され、運動後における血漿遊離脂肪酸がアスタキサンチン群で有意に低値を示したことから血漿遊離脂肪酸が筋肉内に取り込まれ利用されたと考えられた。さらに、アスタキサンチン群で運動による筋間質 pH の低下が抑制されことから、ミトコンドリアでの有酸素代謝が高まり、代謝性アシドーシスが軽減されたことが考えられた。結果として運動持久力の向上、体脂肪量の減少を効率化することが示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、アスタキサンチン摂取による脂質代謝改善作用に PGC-1 α 発現増加を伴うミトコンドリア機能活性化の機序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) Aoi W, Naito Y, Takagi T, Kokura S, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Tanimura Y, Liu PH, Koyama R, Ichikawa H, Yoshikawa T. Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of

- iNOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 14-19.
- 2) Aoi W, Naito Y, Liu PH, Uchiyama K, Akagiri S, Mizushima K, Yoshikawa T. Regular exercise prevents high-sucrose diet-induced fatty liver via improvement of hepatic lipid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 413: 330-335.
- 3) Aoi W, Naito Y, Takagi T, Tanimura Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Liu PH, Mizushima K, Hirai Y, Koyama R, Wada S, Higashi A, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. *Gut* 2013; 62: 882-889.

論文提出者 木村 礼子

学位の種類 博士 (医学)
 学位記の番号 甲第 1512 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 31 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 谷脇雅史・教授 奥田 司・教授 八木田和弘

論文題目及び掲載誌

Kimura R, Ishikawa T, Kokura S, Mizushima K, Adachi S, Okajima M, Matsuyama T, Okayama T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Yagi N, Naito Y, Itoh Y.

The Inhibitory Effect of Heat Treatment Against Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 2014; 55: 56-61.

審査結果の要旨

膵癌は浸潤・転移能が高く、診断時に既に切除不能であることが多い。さらに、切除不能膵癌は放射線・抗がん剤治療に抵抗性であることが多く、これらの理由で膵癌は極めて予後不良な癌の1つである。近年、上皮間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) が、がん細胞の浸潤・転移に重要であることが明らかとなってきた。申請者らは、浸潤・転移能が極めて高いとされる膵癌症例を対象に、Gemcitabine + Hyperthermia (HT) 併用療法の第II相臨床試験を行い、特に局所進行癌において良好な成績であることを報告した。この結果から、HTは膵癌の浸潤・転移に対して抑制作用を有する可能性があると考えられたため、ヒト膵癌細胞株を用いて TGF- β 1 誘導 EMT に対する温熱処理の抑制効果について検討した。ヒト膵癌細胞株 (PANC-1, MIAPaCa-2, BxPC-3) を、TGF- β 1 (10 ng/ml, 48 時間) で刺激し、細胞の形態変化、EMT マーカーの変化 (E-cadherin, Vimentin, Zeb-1, Snail 等) を免疫蛍光染色、RT-PCR で評価した。温熱処理が EMT に及ぼす影響については、EMT 誘導刺激前に 43°C・1 時間の温熱刺激を行い、その EMT 抑制効果の評価した。TGF- β 1 刺激によって、EMT に特徴的な紡錘形の細胞形態変化を認めた。上皮

系マーカーである E-cadherin は BxPC-3 で発現を認め、TGF- β 1 刺激によって発現が低下し、温熱処理によって回復した。同様の変化が Western blot でも確認できた。間葉系マーカーである Vimentin は免疫蛍光染色にて3つの細胞株すべてにおいて発現を確認でき、TGF- β 1 刺激で発現は上昇し、温熱処理によって低下した。同様の変化が RT-PCR でも確認できた。E-cadherin の転写抑制因子である Snail, Zeb-1 は TGF- β 1 刺激によって発現は上昇し、温熱処理によって低下した。温熱処理の TGF- β 1 誘導 EMT に対する抑制機序を明らかにするために、PANC-1 において smad2 発現およびリン酸化 smad2 を Western blot で評価した。TGF- β 1 刺激によって smad2 のリン酸化は亢進し、温熱処理によってそれは低下した。次に Wound healing assay で PANC-1 の運動能の評価を行ったところ、TGF- β 1 刺激群は細胞運動能が著明に亢進したが、温熱処理はそれを抑制した。本研究によりヒト膵癌細胞株において温熱処理が TGF- β 1 誘導 EMT を抑制することが示され、その機序の1つとして smad2 のリン酸化抑制が関与していることが示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、これまで温熱処理の EMT 抑制効果およびその抑制メカニズムについて詳細

に検討した報告はなく、温熱処理が EMT 抑制を介してがんの浸潤・転移を抑制する可能性を示した点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (2 編)

1) Sakai H, Kokura S, Ishikawa T, Tsuchiya R, Okajima M, Matsuyama T, Adachi S, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Yagi N, Naito Y, Yoshikawa T. Effects of anticancer agents on cell viability, proliferative activity and cytokine production of

peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Biochem Nutr* 2013; 52: 64-71.

2) Okajima M, Kokura S, Ishikawa T, Mizushima K, Tsuchiya R, Matsuyama T, Adachi S, Okayama T, Sakamoto N, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Yagi N, Naito Y, Yoshikawa T. Anoxia/reoxygenation induces epithelial-mesenchymal transition in human colon cancer cell lines. *Oncol Rep* 2013; 29: 2311-2317.

論文提出者 東 裕美子

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第 1513 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 31 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 伏木信次・教授 八木田和弘・教授 福居顯二

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Azuma Y, Tokuda T, Shimamura M, Kyotani A, Sasayama H, Yoshida T, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake N, Ueyama M, Nagai Y, Yamaguchi M.

Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a Strong Modulator of Motor Neuron Degeneration Induced by Knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*
Human Molecular Genetics 2014; 23: 3467-3480.

審 査 結 果 の 要 旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子として報告されている TDP43, FUS は RNA 代謝に関与するとされているが、その生体内の役割はまだ十分明らかにされていない。

申請者は FUS のショウジョウバエホモログである *Cabeza* (以下 *Caz*) をノックダウン (KD) したショウジョウバエを用いて、その表現型を修飾する因子を探索した。

【方法】複眼原基特異的 *Caz*-KD ショウジョウバエを作製し、その表現型を指標として家族性 ALS の原因遺伝子に変異を有するショウジョウバエ系統を交配し、次世代で観察される複眼の表現型が増強・抑圧する系統をスクリーニングした。次に神経特異的 *Caz*-KD ショウジョウバエを作製し、運動能力と神経筋接合部 (NMJ) における運動ニューロンの形態を観察し、複眼特異的 *Caz*-KD のスクリーニングで得られた *ter94* との遺伝学的相互作用を調べた。

【結果】複眼原基特異的 *Caz*-KD において認められた個眼の融合や剛毛の消失などの *rough eye* 表現型は、*VCP* のショウジョウバエホモログ *ter94* 変異系統との交配により増強し、*ter94* 過剰発現系統との交配により抑圧された。また、神経特異的 *Caz*-KD で認められた運動ニューロン障害を示す表現型 (運動能力の低下, NMJ における synaptic branch の短縮) は、*ter94* 変異系統との交配により増強、*ter94* 過剰発現系統との交配で抑圧された。

【考察】これまでの報告から、VCP は (A) RNP complex からの TDP-43 の除去 (B) 細胞質から核への shuttling 機能 (C) autophagy による分解への誘導などの多彩な機能を有すると考えられている。また、先行文献では *ter94* の polyQ モデルショウジョウバエに対する効果と *Caz*-KD に対する効果は全く逆の結果が報告されている。これらの現象を説明し得る理由として、(B) の細胞質から核への shuttling が挙げられると考えた。 *Caz*-

KDでは, *ter94* 変異により細胞質から核への shuttling 機能が働かなければ Caz の細胞質から核内への移行ができず, *ter94* 過剰発現により Caz の細胞質から核内への移行が増強されることで, 核内での Caz タンパク量が増加するのではないかと考えている. これとは逆に, polyQ モデルでは核内に凝集体が出来る事が主たる病因であることから, *ter94* 過剰発現で細胞質から核への shuttling 機能が増強すれば polyQ 分子の核への供給が増加して核内凝集体が増え, *ter94* 変異で細胞質から核への shuttling 機能が低下すれば polyQ 分子の供給が低下し核内凝集体が減少する可能性がある. これらのことより, VCP は FUS/TDP-43 および polyQ の細胞質から核への shuttling の機能を担っている可能性が考えられる.

以上が本論文の要旨であるが, *FUS* のショウジョウバエホモログ Caz と *VCP* のショウジョウバエホモログ *ter94* は遺伝学的相互作用があることを世界で初めて明らかにし, 根本治療薬への糸口となり得る事実を見出した点で, 医学上価値のある研究と認める.

参 考 論 文 (7 編)

- 1) Sasayama H, Shimamura M, Tokuda T, Azuma Y, Yoshida T, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake N, Nagai Y, Yamaguchi M. Knockdown of the *Drosophila* fused in sarcoma (FUS) Homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. PLoS One 2012; 7: e39483.
- 2) Azuma Y, Shiga K, Ishii R, Yamaguchi T, Niwa F, Nakagawa M. Polymyositis with atypical pathological features associated with thymic carcinoma. Intern Med 2009; 48: 163-168.
- 3) 東裕美子, 今井啓輔, 小田健一郎, 丹羽文俊, 牧野雅弘, 巨島文子. 両側頸部血行再建術後に圧受容器反射不全を呈した 1 例. 臨床神経学 2007; 47: 657-661.
- 4) 東裕美子, 滋賀健介, 木村彩香, 水野敏樹, 中川正法. 後頭神経痛で発症した多発性硬化症の 1 例. 神経内科 2009; 71: 410-412.
- 5) Niwa F, Tokuda T, Kimura M, Azuma Y, Mizuno T, Nakagawa M. Self-remitting and reversible parkinsonism associated with neuro-Sweet disease. Intern Med 2010; 49: 1201-1204.
- 6) Imai K, Makino M, Niwa F, Takegami T, Koike H, Azuma Y, Oshima F, Oda K, Kakita K. Tandem balloon protection during emergency carotid artery stenting of a stenotic ICA lesion with intraluminal thrombus. J Endovasc Ther 2007; 14: 214-218.
- 7) Taki M, Nin F, Hasegawa T, Sakaguchi, H, Suzuki T, Hisa Y, Azuma Y, Nakagawa M. A case report of HTLV-I associated myelopathy presenting with cerebellar ataxia and nystagmus. Auris Nasus Larynx 2011; 38: 411-414.

論文提出者 小 泉 英 貴

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1514 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 31 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 水野敏樹・教授 伏木信次・教授 八木田和弘

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Koizumi H, Morigaki R, Okita S, Nagahiro S, Kaji R, Nakagawa M, Goto S.
**Response of Striosomal Opioid Signaling to Dopamine Depletion
 in 6-hydroxydopamine-lesioned Rat Model of Parkinson's Disease: a Potential Compensatory Role**
 Frontiers in Cellular Neuroscience 2013; 7: 74.

審 査 結 果 の 要 旨

哺乳類の線条体は均質な構造ではなく, ストリオゾームとマトリックスと呼ばれる二つの機能的に異なるものから構成される. オピオイドレセプターは μ , δ , κ と呼ば

れる主に3つのサブクラス(それぞれMOR, DOR, KOR)からなり様々な脳の機能に関与する. ストリオゾームのオピオイドシグナルは線条体活動の強力な調整因子とし

で知られているが、運動障害の病態生理におけるその機能は十分解明されていない。

申請者はチラミドシグナル増幅法 (TSA 法) を用いた免疫組織染色によりラット線条体のオピオイドレセプターの分布を調べ、さらに 6- ハイドロキシドパミン (6-OHDA) を用いたパーキンソン病モデルラットによりドパミン欠乏状態のオピオイドレセプターの変化を検討した。

この結果、線条体において MOR はストリオゾームや subcallosal streak といった背側線条体にモザイク状の高信号域を認め、一方側坐核といった腹側線条体は不明瞭であった。本研究では DOR も同様のモザイクパターンを認め、二重染色では DOR と MOR の染色パターンは一致していた。またパーキンソン病モデルでは MOR と DOR が患側のストリオゾームと subcallosal streak で有意に低下しており、マトリックスでは変化は示さなかった。KOR ではいずれの変化も認められなかった。

以上より背側線条体において MOR と DOR はストリオゾームに優位に発現していることから、オピオイドレセプターを介した調整は線条体コンパートメントによって異なることが示された。またパーキンソン病モデルでは間接路の脱抑制によるオピオイドリガンドの増加によりストリオゾームで MOR、DOR の代償的なダウンレギュレーションがみられた。これらのことからストリオゾームにおけるオピオイドシグナルがストリオゾーム・黒質緻密層の連絡やコンパートメント間の連絡を介して、

線条体の出力系として重要な役割を果たすマトリックス活動を調整することでパーキンソン病において代償的な役割を果たしている可能性が考えられた。

以上が本論文の要旨であるが、ストリオゾームにおけるオピオイドシグナルがパーキンソン病において代償的な役割を果たし、これがパーキンソン病や L-dopa 誘発性ジスキネジアといった運動合併症の新たな治療法につながる可能性を示した点において医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (3 編)

- 1) Goto S, Kawarai T, Morigaki M, Okita S, Koizumi H, Nagahiro S, Munoz EL, Lee LV, Kaji R. Defects in the striatal neuropeptide Y system in X-linked dystonia-parkinsonism. *Brain* 2013; 136: 1555-67.
- 2) Yamamura Y, Morigaki R, Kasahara J, Yokoyama H, Tanabe A, Okita S, Koizumi H, Nagahiro S, Kaji R, Goto S. Dopamine signaling negatively regulates striatal phosphorylation of Cdk5 at tyrosine 15 in mice. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 12. doi: 10.3389/fncel. 2013. 00012.
- 3) Okita S, Morigaki R, Koizumi H, Kaji R, Nagahiro S, Goto S. Cell type-specific localization of optineurin in the striatal neurons of mice: implications for neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Neuroscience* 2012; 202: 363-70.