
博士論文要旨

論文提出者 中西直彦

学位の種類 博士(医学)
学位記の番号 甲第1515号
学位授与の日付 平成26年4月25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 中屋隆明・教授 松田 修

論文題目及び掲載誌

Nakanishi N, Takahashi T, Ogata T, Adachi A, Imoto-Tsubakimoto H, Ueyama T, Matsubara H.
**PARM-1 Promotes Cardiomyogenic Differentiation Through Regulating
the BMP/Smad Signaling Pathway**
Biochemical and Biophysical Research Communications 2012; 428: 500-505.

審査結果の要旨

心臓の発生や心筋細胞の分化プロセスは高度に制御された過程であり、その分子メカニズムの解明は様々な心臓疾患に対する新規治療法の開発に大いに役立つと考えられるものの、詳細は未解明のまま残されている。心筋細胞に発現する分子の機能解析は、このような分子機序を解明する上で大きな手がかりになることが期待される場所である。たとえば prostatic androgen repressed message-1 (PARM-1) は去勢されたラットの前立腺組織に発現亢進が認められる遺伝子として同定されたものであるが、心筋細胞にその発現が認められるものとして知られている。また PARM-1 はマウス心臓において発生 10.5 日からその発現が検出でき、成熟心臓に至るまで強い発現が認められ、主として小胞体に局在する。しかしながら PARM-1 の心臓発生における役割はこれまで明らかにされておらず、申請者らは本研究において PARM-1 の心筋細胞発生における役割を検討した。

申請者らはマウス胚性癌細胞 (P19CL6 細胞) を用いて、まず、DMSO 刺激による心筋分化過程における PARM-1 の発現を検討した。その結果、分化 4 日目から PARM-1 の発現が認められ、分化 8 日目にピークを迎えることを見出した。これは中胚葉マーカーの発現に引き続くものであり、他方、心筋転写因子や心筋サルコメア蛋白の発現に先立つものであった。

次にレトロウイルスを用いて P19CL6 細胞に PARM-1 を過剰発現させ、やはり DMSO 刺激による心筋分化誘導系での検討を行なった。結果として PARM-1 過剰発現にて心筋分化細胞が増加していることを見出した。この

PARM-1 過剰発現 P19CL6 細胞では α -MHC と cTnI の発現が亢進しており、PARM-1 過剰発現によって心筋分化が促進されることが示唆された。

一方、未分化状態の LacZ 過剰発現 P19CL6 細胞と PARM-1 過剰発現 P19CL6 細胞に増殖能の差は認めず、観察された分化亢進は増殖能の活性化によるものではないものと考えられた。そして Oct3/4, Nanog, Eras といった未分化マーカーについては PARM-1 過剰発現細胞での変化は観察されなかった。しかし PARM-1 過剰発現 P19CL6 細胞では GATA4, Nkx2.5, Tbx5 といった心筋転写因子の発現亢進が認められ、くわえて Brachyury, Mesp1 といった中胚葉マーカーの発現に差を認めなかったことから、PARM-1 は心筋転写因子の発現亢進に関与しているものと申請者らは考察している。

Wnt シグナルや BMP シグナルも心筋分化において重要な役割を担っていることが知られている。こうした経路の検討では、Wnt シグナルの発現には変化を認めなかったものの、PARM-1 過剰発現 P19CL6 細胞で BMP2 の発現が当初から亢進し、分化 2 日目から 6 日目にかけて BMP2 ならびに BMP4 の発現が亢進することが観察された。BMP シグナルの下流に位置する Smad のリン酸化を評価したところ、Smad1/5/8 のリン酸化亢進が認められた。こうした結果を総合し、申請者らは、PARM-1 は中胚葉分化以降の BMP シグナルを活性化することによって心筋分化を促進する作用を持つものと結論づけた。

以上が本論文の要旨であるが、心筋細胞の分化プロセ

スの分子機序の一端を解明し、今後の新規心筋再生治療開発の上で有用となる基礎的知見を見出した点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (5 編)

- 1) Imoto-Tsubakimoto H, Takahashi T, Ueyama T, Ogata T, Adachi A, Nakanishi N, Mizushima K, Naito Y, Matsubara H. Serglycin is a novel adipocytokine highly expressed in epicardial adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432: 105-105.
- 2) Adachi A, Takahashi T, Ogata T, Imoto-Tsubakimoto H, Nakanishi N, Ueyama T, Matsubara H. NFAT5 regulates the canonical Wnt pathway and is required for cardiomyogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 426: 317-323.
- 3) Nakanishi N, Nishizawa S, Kitamura Y, Nakamura T, Matsumuro A, Sawada T, Matsubara H. The increased mortality from witnessed out-of-hospital cardiac arrest in the home. *Prehosp Emerg Care* 2011; 15: 271-277.
- 4) Nakanishi N, Nishizawa S, Kitamura Y, Nakamura T, Matsumuro A, Sawada T, Matsubara H. Circadian, weekly, and seasonal mortality variations in out-of-hospital cardiac arrest in Japan: analysis from AMI-Kyoto Multicenter Risk Study database. *Am J Emerg Med* 2011; 29: 1037-1043.
- 5) Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Ueyama T, Oh H, Matsubara H. PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *PLoS One* 2010; 5: e9746.

論文提出者 足立孝臣

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1516号
学位授与の日付	平成26年4月25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 松田 修・教授 佐和貞治

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Adachi T, Sugiyama N, Gondai T, Yagita H, Yokoyama T.

Blockade of Death Ligand TRAIL Inhibits Renal Ischemia Reperfusion Injury

Acta Histochemica et Cytochemica 2013; 46: 161-170.

審 査 結 果 の 要 旨

急性腎障害は高い死亡率をもつことから古来腎臓内科臨床上の重要な課題となってきた。近年、各種治療法が発展してきたものの、現在ではその慢性腎不全への移行が予後を不良とさせるもうひとつの大きな問題点となっている。ここでは急性腎障害を改善し、腎予後を改善する治療法が確立していないことがこの病態の制御上の隘路となっている。ひとつの手がかりとしてTNFスーパーファミリーが急性腎障害の病態形成に重要な役割を果たすことが明らかにされているものの、その詳細は不明のままである。こうした背景のもと、申請者らはTNFスーパーファミリーの一員であるTNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)の急性腎障害における役割の解明を試みた。

申請者らはまずマウス腎虚血再還流障害(IRI)モデル

を作製し、急性腎障害におけるTRAILの関与を解析した。ここでは血管クランプを用いてマウス左腎動脈を60分間途絶させ、腎IRIモデル群(IRI群)を作製した。そして腎IRI後1日、3日、28日で障害腎を採取し以下の解析を行った。

IRI後1日目において、比較対照群(シャム群)と比べ、IRI群ではTRAIL mRNAの発現が明らかに上昇していることを見出した。免疫染色では、IRI群にのみ尿細管上皮細胞の細胞質においてTRAILの発現を観察した。他方TRAILレセプターであるDR5は、IRI群においてIRI後1日目に明らかな発現上昇を認めた。また免疫染色では、IRI群にのみ尿細管上皮細胞にDR5の発現が観察された。DR5の下流因子であるcleaved-caspase8の発現をウェスタンブロット解析で検討したところ、IRI群

において IRI 後 1 日目に有意な発現上昇が認められた。以上の結果から、申請者らは腎 IRI における TRAIL シグナル経路の活性化が確認されたものと結論した。

続いて中和抗体による TRAIL 阻害実験を行ったところ、IRI 後 3 日目において、抗体投与群で明らかに尿細管障害が改善されることを申請者らは見出した。また、抗体投与群では IRI 後 1 日目において有意な TUNEL 陽性細胞数の減少が観察されたことから、ここでは尿細管アポトーシスが回避されたものと申請者らは解釈している。くわえて、抗体投与群では cleaved-caspase8 の有意な減少が認められた。炎症性サイトカイン・ケモカインである TNF α 、IL-2b、MCP-1、MIP-2 は、IRI 後 1 日目において、抗体投与群で有意に減少していた。好中球浸潤については、IRI 後 1 日目において、抗体投与群で有意な減少が認められた。また、マクロファージ浸潤は、IRI 後 3 日目において、抗体投与群で有意に減少していた。

これらの結果を受け、申請者らは、腎萎縮自体の改善の有無へと検討を進めた。その結果、対照群では、IRI28 日後において腎臓は萎縮したが、抗体による TRAIL 阻害群では腎萎縮を認めなかった。すなわち対照群において尿細管構造の減少と間質の線維化が出現するのに対し、抗体投与群では腎萎縮が著明に改善することを明らかにした。

以上が本論文の要旨であるが、申請者らは腎 IRI による急性腎障害の病態形成に TRAIL シグナルが深く関与していることを明らかにし、かつ、その阻害が急性腎障害並びに腎予後を改善させることを示した。急性腎障害治療の新規ストラテジーの可能性を示した点で、医学的価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (3 編)

- 1) Adachi T, Sugiyama N, Yagita H, Yokoyama T. Renal atrophy after ischemia-reperfusion injury depends on massive tubular apoptosis induced by TNF α in the later phase. *Med Mol Morphol* 2014; 47: 213-223.
- 2) 足立孝臣, 八田 告, 木村健二郎. 腎梗塞, 富野康日己 編. エキスパートのための腎臓内科学 2009; 279-283.
- 3) Kusaba T, Mori Y, Masami O, Hiroko N, Adachi T, Sugishita C, Sonomura K, Kimura T, Kishimoto N, Nakagawa H, Okigaki M, Hatta T, Matsubara H. Sodium restriction improves the gustatory threshold for salty taste in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 76: 638-643.

論文提出者 大 東 淳 子

学位の種類 博士 (医学)
学位記の番号 甲第 1517 号
学位授与の日付 平成 26 年 4 月 25 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 松田 修・教授 大辻英吾

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Daito J, Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Takamatsu T.
**Neutrophil Phagocytosis of Platelets in the Early Phase of
2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-induced Dermatitis in Mice**
Acta Histochemica et Cytochemica 2014; 47: 67-74.

審 査 結 果 の 要 旨

血小板は止血や血栓の形成だけでなく、炎症過程において重要な役割を果たしている。一方好中球は炎症の場で動員され、病原体を貪食し除去するなど大切な働きをする。最近では、急性心筋梗塞や真性多血症などの末梢血中において、好中球が血小板を貪食することが報告さ

れている。皮膚の炎症においても、血小板が白血球や血管内皮細胞を活性化することや PF4 などのケモカインを放出すること、血小板と白血球が複合体を形成し白血球の遊走を促すことが明らかにされているが、その時空間的な局在については明らかにされていない。

申請者は、2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) を用いた接触皮膚炎モデルマウスにおいて、血小板と好中球の動態、局在を調べるために、HE 染色と共焦点顕微鏡法、超解像顕微鏡法を用いて免疫組織化学的研究を行った。TNCB でモデルマウスの右外耳に皮膚炎を惹起後、0, 2, 4, 8, 12, 24 時間で両外耳を切除し、それぞれ外耳の厚さを測定後 HE 染色を行った。右外耳では厚さが増加したが、左外耳では厚さに変化は認めなかった。HE 染色では右外耳で真皮に浮腫を認め、惹起後 4 時間では血管内で好中球が増加、惹起後 8 時間以後の組織では、血管外に多数の好中球を認めたが、リンパ球、好酸球に明らかな変化は認めなかった。一方左外耳については、惹起後いずれの時間帯においても組織学的な変化を認めなかった。また、免疫組織化学染色では、惹起 2 時間後より血小板が血管内で増加し血管内皮細胞に接着、4 時間後には血管内で CD41 陽性の血小板が多数凝集している様子が確認できた。8 時間後以降では核周囲に CD41 陽性の破碎状血小板を認める細胞が出現し、血管外にも同様の細胞を認めた。惹起後 12 時間、24 時間と時間が経過するにつれて、血管外に破碎状血小板を有する細胞が増加した。しかし経過中、血管外では円盤状の通常の CD41 陽性血小板は全く認めなかった。また破碎状血小板を有する細胞は Ly-6G 陽性であり、好中球であることが分かった。そして破碎状血小板は活性の無い状態であり、好中球に貪食された後の血小板であると考えられた。これらの結果から、TNCB 接触皮膚炎モデルマウスにおいて、惹起後まもなくより血小板が血管内で

増加し血管内皮細胞に接着、惹起後 8 時間後頃より血管内で好中球が血小板を貪食すること、血管外組織では通常の血小板は認めず好中球に貪食された破碎状血小板のみ認めることが分かった。

以上が本論文の要旨であるが、接触皮膚炎における血小板と好中球の動態・局在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 (5 編)

- 1) 大東淳子, 井口 愛, 白井智彦, 浅井 純, 益田浩司, 竹中秀也, 加藤則人, 岸本三郎. 急速に拡大した壞疽性膿皮症の 1 例. 臨皮 2008; 62: 589-592.
- 2) Daito J, Katoh N, Asai J, Ueda E, Takenaka H, Ishii N, Hashimoto T, Kishimoto S. Brunsting-Perry cicatricial pemphigoid associated with autoantibodies to the C-terminal domain of BP180. Br J Dermatol 2008; 159: 984-986.
- 3) 大東淳子, 浅井 純, 奈良武史, 竹中秀也, 加藤則人, 岸本三郎. 皮膚限局性結節性アミロイドーシスの 1 例. 臨皮 2008; 62: 995-997.
- 4) Daito J, Hanada K, Katoh N, Katoh S, Sakamoto K, Asai J, Takenaka H, Kishimoto S. Symmetrical drug-related intertriginous and flexural exanthema caused by valacyclovir. Dermatology 2009; 218: 60-62.
- 5) 大東淳子, 浅井 純, 益田浩司, 竹中秀也, 加藤則人, 岸本三郎. 5-フルオロウラシルによる手足症候群の 1 例. 臨皮 2009; 63: 363-366.

論文提出者 姜 艶

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第 1518 号
学位授与の日付	平成 26 年 4 月 25 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 夜久 均・教授 濱岡建城

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Jiang Y, Tanaka H, Matsuyama T, Yamaoka Y, Takamatsu T.
**Pacing-induced Non-uniform Ca^{2+} Dynamics
 in Rat Atria Revealed by Rapid-scanning Confocal Microscopy**
 Acta Histochemica et Cytochemica 2014; 47: 59-65.

審 査 結 果 の 要 旨

近年、心臓の興奮・収縮において中心的役割を演じる

カルシウムイオン (以下 Ca^{2+}) の細胞内動態が可視化で

きようになり、心筋の生理・病理研究は著しい発展を遂げた。しかしながら心臓のリザーバとして機能する心房の Ca^{2+} 動態研究は単離細胞を対象としたものに留まり、心臓内で機能している心房筋細胞の Ca^{2+} 動態はほとんど明らかにされていない。

申請者は、*in situ* 共焦点レーザー顕微鏡を用いて心房の細胞レベルでの Ca^{2+} 動態の可視化を試み、その特性を解析した。 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fluo4-AM を負荷した成獣 Wistar ラット心臓を標準 Tyrode 液でラングンドルフ灌流 (25°C) し、1~4 Hz の電氣的駆動下の左右心耳にカバーガラスを置き、ニポウ式共焦点スキャナを用いてその蛍光シグナルを CCD カメラで取得 (30 ミリ秒毎) した。また di-4-ANEPPS の共焦点レーザー顕微鏡画像から心筋の形態を評価した。

心房筋と心室筋の形態・構造を比較すると、心室筋には細胞質内に横行管 (T 管) が密に分布していたのに対し、心房筋には T 管は殆ど認めなかった。16 例の心房を用いて fluo4 の蛍光強度変化を高速共焦点観察すると、5 例では個々の心房筋細胞が電氣的興奮に伴って均一な蛍光強度の一過性上昇 (Ca^{2+} トランジェント) を示し、その持続時間は興奮頻度依存性に短縮、振幅は各頻度の興奮で概ね一定していたが、4 Hz の高頻度刺激では一拍毎に軽度の増減を示すオルタナンス現象が観察された。これに対し、残り 11 例の心房では個々の心房筋細胞で Ca^{2+} 動態が不均一化し、電氣的興奮に伴って細胞内局所に生じる巣状の一過性 Ca^{2+} 濃度上昇や高 Ca^{2+} 濃度領域の細胞内波状伝播 (Ca^{2+} 波) が観察された。 Ca^{2+} 動態の不均一性は細胞間にも認められ、3~4 Hz の高頻度

刺激では高度の Ca^{2+} オルタナンスを認めるなど、刺激頻度の上昇に伴い顕著になった。心房を高頻度駆動 (5 Hz) することにより細胞内 Ca^{2+} 負荷を試みたところ、駆動停止後には Ca^{2+} 波など異常な Ca^{2+} 濃度の上昇は殆ど認めなかった。本研究により、生きた丸ごとの心臓において心房筋細胞が興奮頻度に依存して空間的に不均一な Ca^{2+} 動態を示すことが明らかになった。刺激頻度の上昇に伴う Ca^{2+} 動態の不均一化は、興奮に伴う Ca^{2+} 貯蔵量の累積的な低下や筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体の不応性が関わっているものと推測されるが、心房筋の未発達な T 管も Ca^{2+} 動態不均一化の一因と考えられる。

以上が本論文の要旨であるが、機能している心臓で観察された心筋 Ca^{2+} 動態の不均一性は、心房性不整脈や不全心の病態を考える上で重要な知見であり、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (2 編)

- 1) Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF- β signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res* 2009; 315: 1190-1199.
- 2) Matsuyama TA, Tanaka H, Adachi T, Jiang Y, Ishibashi-Ueda H, Takamatsu T. Intrinsic left atrial histoanatomy as the basis for reentrant excitation causing atrial fibrillation/flutter in rats. *Heart Rhythm* 2013; 10: 1342-1348.

論文提出者 藤 堂 桃 子

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1519 号
学位授与の日付	平成 26 年 4 月 25 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 松田 修・教授 佐和貞治・教授 加藤則人

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Todo M, Horinaka M, Tomosugi M, Tanaka R, Ikawa H, Sowa Y, Ishikawa H, Fujiwara H, Otsuji E, Sakai T.
Ibuprofen Enhances TRAIL-Induced Apoptosis Through DR5 Upregulation
Oncology Reports 2013; 30: 2379-2384.

審 査 結 果 の 要 旨

多くの非ステロイド性解熱鎮痛薬 (NSAIDs)、特にアスピリンが各種の癌細胞、特に大腸癌に対し化学予防効

果を持つと報告されている。しかし副作用の点から、申請者らは、より安全な NSAIDs として汎用されているイブプロフェンに着目した。イブプロフェンの癌化学予防効果について実験を行った報告はいまだ存在しない。一方、我々のグループは癌の化学予防および治療において TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) に着目し、TRAIL 感受性を増強する物質を多数発表してきた。TRAIL は TNF ファミリーに属する抗腫瘍性サイトカインであり、癌細胞に特異的にアポトーシスを誘導するが、正常細胞に対してはほとんど影響を及ぼさない。TRAIL 経路を活性化することが癌予防および治療において重要であると考え、イブプロフェンが大腸癌細胞に対して TRAIL 感受性を増強できるか検討した。

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に対するアポトーシス誘導作用をフローサイトメトリーによって調べた結果、イブプロフェンは著明な TRAIL 感受性増強作用を示した ($P < 0.01$)。イブプロフェンによるアポトーシス関連分子の発現量変化について解析した結果、TRAIL の特異的受容体の一つである DR5 の発現誘導効果が mRNA レベルで認められた ($P < 0.01$)。さらに、アポトーシス阻害因子である survivin, XIAP の発現の抑制も認められた。DR5/Fc キメラおよび caspase 阻害剤である zVAD-FMK による阻害実験を行ったところ、有意なアポトーシス抑制効果が認められたことから ($P < 0.01$)、イブプロフェン/TRAIL 併用によるアポトーシスが TRAIL と受容体の結合によって引き起こされ、かつ caspase 依存性であることが確認された。ヒト正常末梢血単核球 (PBMC) を用い、イブプロフェンと TRAIL 併用による影響を評価した結果、これらイブプロフェンの作用は PBMC におい

ては一切認められなかったことから、癌細胞特異的な効果が期待される。

本論文において申請者らは、イブプロフェンが TRAIL 感受性増強作用を有することを初めて報告した。近年、ヒトリコンビナント TRAIL は癌の化学予防および治療において将来性のある薬剤として期待されている。さらに申請者らは、TRAIL の産生誘導成分を見出し、報告している。したがってイブプロフェンと TRAIL 誘導成分との併用が、癌の化学予防に有益になりうると期待している。

以上が本論文の要旨であるが、申請者らは、イブプロフェンが臨床的にも安全で効果があることから、大腸腺腫および大腸癌に対しての予防介入研究を提案したいと考えており、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (2 編)

- 1) Okamura S, Fujiwara H, Yoneda M, Furutani A, Todo M, Ikai A, Tada H, Okamura H, Umehara S, Shiozaki A, Kubota T, Komatsu S, Ichikawa D, Okamoto K, Ochiai T, Otsuji E. Overexpression of IL-6 by gene transfer stimulates IL-8-mediated invasiveness of KYSE170 esophageal carcinoma cells. *Anticancer Res* 2013; 33: 1483-1489.
- 2) Umehara S, Fujiwara H, Shiozaki A, Todo M, Furutani A, Yoneda M, Ikai A, Tada H, Komatsu S, Ichikawa D, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Otsuji E. PSK induces apoptosis through the inhibition of activated STAT3 in human esophageal carcinoma cells. *Int J Oncol* 2012; 41: 61-66.

論文提出者 古 谷 晃 伸

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1520 号
学位授与の日付	平成 26 年 4 月 25 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 松田 修・教授 佐和貞治・教授 加藤則人

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Furutani A, Sowa Y, Fujiwara H, Otsuji E, Sakai T.
**The Novel HDAC Inhibitor OBP-801/YM753 Enhances the Effects of 5-fluorouracil
 with Radiation on Esophageal Squamous Carcinoma Cells**
Oncology Research 2014; 21: 281-286.

審査結果の要旨

切除可能食道がんに対して日本では外科切除が標準的な治療であるが、切除可能である食道がんは30~40%にとどまる。遠隔転移のない切除不能食道がんに対しては化学放射線療法が標準的な治療であるが、切除不能進行食道がんに対する化学放射線療法の2年生存率は31.5%と報告されており、さらなる効果的な治療が必要とされている。

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤はさまざまながん細胞に対して5-FUの効果を増強すると報告されている。さらに、HDAC阻害剤は放射線の効果を増強するという報告もある。しかし、HDAC阻害剤が5-FUと放射線の併用療法の効果を増強するという報告は今のところない。そのため、申請者は食道扁平上皮がん細胞株KYSE170を用いて新規HDAC阻害剤であるOBP-801/YM753が、5-FUと放射線の併用療法の効果を増強するかどうかを調べた。

WST-8アッセイにより、OBP-801/YM753および5-FUは濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示し、それぞれIC50は4 nMと2.5 μ Mであった。OBP-801/YM753 (4 nM)と5-FU (1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M)の併用は、同濃度の5-FU単独使用と比較すると、より強い細胞増殖抑制効果を示した。コロニー形成アッセイにより、OBP-801/YM753 + 放射線 + 5-FUの三者併用は、それぞれの単独使用や二者併用と比較して、有意に強いコロニー形成阻害効果を示した。ウェスタンブロットアッセイにより、KYSE170に5-FU処理を行うことによりthymidylate synthase (TS) タンパクの発現上昇を認めた。また、OBP-801/YM753処理は濃度依存性にp21タンパクおよびアセチル化ヒストンH4タンパクの発現を増加させ、

TSタンパクの発現を減少させた。OBP-801/YM753と5-FUの併用は、5-FUによるTSタンパクの発現上昇を効果的に低下させた。一方、放射線照射はTSタンパクの発現に影響を与えなかった。Guava ViaCountアッセイにより、OBP-801/YM753と放射線併用はOBP-801/YM753および放射線単独より効果的に細胞の生存率の低下を示した。

OBP-801/YM753と5-FU併用の効果増強は、OBP-801/YM753によるTSタンパクの低下によるものと考えられる。OBP-801/YM753と放射線照射併用の効果増強は、DSBsの増加による細胞死の増加と考えられる。OBP-801/YM753が5-FUの効果と放射線照射のそれぞれを増強するという結果から、三者併用が二者併用や単独使用と比べて有意にコロニー形成阻害効果が強いことを説明しうる。以上の結果からOBP-801/YM753と5-FUと放射線の三者併用療法は食道がん患者にとって有望な治療法となるであろう。

以上が本論文の要旨であるが、OBP-801/YM753が5-FUと放射線の併用療法の効果を増強す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 (1編)

- 1) Yoneda M, Fujiwara H, Furutani A, Ikai A, Tada H, Shiozaki A, Komatsu S, Kubota T, Ichikawa D, Okamoto K, Konishi H, Murayama Y, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ochiai T, Otsuji E. Prognostic impact of tumor IL-6 expression after preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2013; 6: 2699-2705.

論文提出者 尾原知行

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 乙第2111号
 学位授与の日付 平成26年4月25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 水野敏樹・教授 中村直登・教授 渡邊能行

論文題目及び掲載誌

Ohara T, Kokubo Y, Toyoda K, Koga M, Nakamura S, Nagatsuka K, Minematsu K, Nakagawa M, Miyamoto Y.
**Impact of Chronic Kidney Disease on Carotid Atherosclerosis According to
 Blood Pressure Category: The Suita Study**
 Stroke 2013; 44: 3537-3579.

審査結果の要旨

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)は、一般住民における心血管病発症の独立した危険因子として近年注目を集めている。しかしながらCKDと全身の動脈硬化を反映するとされる頸動脈内膜中膜肥厚(intima-media thickness; IMT)などの頸動脈硬化の指標の独立した関連性に関しては、これまでの報告で一定の見解が得られていない。

申請者はCKDの頸動脈硬化に与える影響は、高血圧などの血管危険因子の存在の有無により異なるとの仮説をたて、一般住民においてCKDの頸動脈硬化に与える影響を血圧カテゴリー毎に検討した。今回の研究では吹田研究の参加者で2002年から2004年の健診時に頸部血管超音波検査を受けた3446名(男性1602名/女性1844名、年齢 62 ± 11 歳)を対象とした。頸動脈硬化症の指標として、頸動脈超音波検査で測定した最大IMT値(頸動脈の測定可能部位で最大のIMT値)、狭窄病変(頸動脈の面積狭窄率25%以上)の有無を用いた。腎機能に関しては日本腎臓学会が提唱する計算式を用いて推算糸球体濾過量(estimated glomerular filtration rate; eGFR)を計算し、 $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ をCKDと定義した。血圧カテゴリーは健診時の血圧測定値により4群(Optimal/Normal/High-normal/Hypertension)に分類した。腎機能と頸動脈硬化指標の関連を解析した結果では、CKD群は $eGFR > 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 群と比較して、血管危険因子などの多変量調整を行った頸動脈硬化指標に有意な差を認めなかった。血圧カテゴリー毎のCKDと頸動脈硬化指標の解析では、多変量調整最大IMT値は、非CKD/Optimal群と比較して、男女ともにCKDの有無にかかわらずHypertension群で有意に高値であった。またCKD群の多変量調整最大IMT値は、Hypertension群

でのみ非CKD群と比較して有意に高値であった。狭窄病変有病の多変量調整オッズ比は、非CKD/Optimal群と比較して、High-normal群、Hypertension群で高く、狭窄病変有病率におけるCKDの影響は、特にHypertension群で突出していた。(多変量調整オッズ比[95%信頼区間]:非CKD/Hypertension群2.21[1.53~3.19], CKD/Hypertension群3.16[2.05~4.88])。以上一般住民においてCKDは頸動脈硬化症と独立して関連しなかったが、高血圧に罹患している場合にはCKDは頸動脈硬化と有意に関連した。本研究結果からは、CKD症例のリスク層別化には高血圧などの心血管危険因子の有無も考慮されるべきであることが示唆された。ただし本研究は横断研究であるため、CKD、高血圧と頸動脈硬化症の因果関係を証明はできない。今後高血圧合併のCKDが頸動脈硬化進展の高リスク群であるのか、さらには高血圧、CKDへの治療介入により頸動脈硬化の進展を抑制できるのかを縦断研究で明らかにしなければならない。

以上が本論文の要旨であるが、一般住民の横断研究で、CKDが高血圧の存在下で頸動脈硬化症と独立して関連す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(10編)

- 1) Ohara T, Nagakane Y, Tanaka E, Morii F, Koizumi T, Yamamoto Y. Clinical and radiological features of stroke patients with poor outcomes who do not receive intravenous thrombolysis because of mild symptoms. Eur Neurol 2013; 69: 4-7.
- 2) Ohara T, Yamamoto Y, Tamura A, Ishii R, Murai T. The infarct location predicts progressive motor deficits

- in patients with acute lacunar infarction in the lenticulostriate artery territory. *J Neurol Sci* 2010; 293: 87-91.
- 3) Ohara T, Toyoda K, Otsubo R, Nagatsuka K, Kubota Y, Yasaka M, Naritomi H, Minematsu K. Eccentric stenosis of the carotid artery is associated with ipsilateral cerebrovascular events. *AJNR* 2008; 29: 1200-1203.
- 4) 尾原知行, 山本康正, 田中瑛次郎, 藤並 潤, 森井美貴子, 石井亮太郎, 小泉 崇, 永金義成. 脳静脈血栓症連続10症例の臨床像, 画像所見の検討. *脳卒中* 2013; 35: 167-173.
- 5) 尾原知行, 山本康正, 永金義成, 田中瑛次郎, 森井美貴子, 小泉 崇. 一過性脳虚血発作 (TIA) の病型分類—ラクナ TIA の臨床的重要性—. *臨神経* 2011; 51: 406-411.
- 6) 尾原知行, 山本康正, 大岩海陽, 林 正道, 中川正法. 血管病変を考慮したラクナ梗塞の臨床的検討—ラクナ梗塞の数とサイズによる細分類—. *臨神経* 2005; 45: 6-12.
- 7) Kobayashi J, Ohara T, Minematsu K, Nagatsuka K, Toyoda K. Etiological mechanisms of isolated pontine infarcts based on arterial territory involvement. *J Neurol Sci* 2014; 339: 113-117.
- 8) Yamamoto Y, Ohara T, Nagakane Y, Tanaka E, Morii F, Koizumi T, Akiguchi I. Chronic kidney disease, 24-h blood pressure and small vessel diseases are independently associated with cognitive impairment in lacunar infarct patients. *Hypertens Res* 2011; 34:1276-1282.
- 9) Yamamoto Y, Ohara T, Hamanaka M, Hosomi A, Tamura A, Akiguchi I. Characteristics of intracranial branch atheromatous disease and its association with progressive motor deficits. *J Neurol Sci* 2011; 304: 78-82.
- 10) Yamamoto Y, Ohara T, Ishii R, Tanaka E, Murai T, Morii F, Tamura A, Oohara R. A combined treatment for acute larger lacunar-type infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011; 20: 387-394.