

博士論文要旨

論文提出者 中村 英夫

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1521 号
学位授与の日付	平成 24 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 八木田和弘・教授 田代 啓・教授 奥田 司

論文題目及び掲載誌

Nakamura H, Matoba S, Iwai-Kanai E, Kimata M, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Ariyoshi M, Mita Y, Ikeda K, Okigaki M, Adachi S, Tanaka H, Takamatsu T, Matsubara H.
p53 Promotes Cardiac Dysfunction in Diabetic Mellitus Due to Excessive Mitochondrial Respiration-mediated ROS Generation and Lipid Accumulation
Circulation Heart Failure 2012; 5; 106-115.

審査結果の要旨

糖尿病患者の主要死因の一つとなる糖尿病性心筋症では、ミトコンドリアのエネルギー代謝異常が観察される。一方、申請者の所属研究グループでは、癌抑制遺伝子 p53 がミトコンドリア呼吸鎖の構成蛋白である SCO2 (Synthesis of Cytochrome C Oxidase 2) の発現を介してミトコンドリア呼吸能を制御していることをいち早く明らかにしてきた。こうした先行研究を受け、当該研究において申請者らは糖尿病性心筋症における p53 の役割の解明を試みた。

申請者らはまず、野生型 p53 (+/+) マウスと p53 欠損 (-/-) マウスの両者にストレプトゾトシン (STZ) を投与していずれも I 型糖尿病を発症させ、その心所見を解析した。その結果、野生型マウスでは経時的に心筋に p53 の発現が増加して心機能が低下するのに対し、p53 欠損 (-/-) マウスでは、心機能の低下はわずかにとどまることを見出した。この実験系を用いて以下の検討を進めた。

STZ 投与後 4 週の心筋を解析したところ、心筋細胞の形態、炎症細胞の浸潤、線維化の程度、そして微小血管数は、p53 の遺伝子型に関して差を認めなかった。他方、活性酸素による障害や脂肪酸の蓄積については、p53 (+/+) マウスで増加していたが、p53 (-/-) マウスでは増加していなかった。また、p53 (+/+) 糖尿病マウスでは、心筋のミトコンドリア呼吸能が亢進するのに対し、p53 (-/-) 糖尿病マウスでは亢進を認めなかった。加えて、p53 (+/+) マウスでは、ミトコンドリア呼吸鎖

の complex IV の活性が有意に亢進しており、p53 (-/-) マウスでは complex IV 活性の亢進を認めず、この両者に明らかな相違が観察された。

糖尿病心においてミトコンドリア呼吸鎖 complex IV の活性上昇する理由として、申請者らはその構成分子の一つである SCO2 の関与を想定して、引き続き検討を進めた。その結果、p53 (+/+) 糖尿病心では SCO2 蛋白の発現が増加するが、p53 (-/-) 糖尿病心では増加しないことを見出した。また培養心筋細胞に SCO2 を過剰発現させ培養すると、脂肪酸の代謝および取り込みとミトコンドリアでの活性酸素産生が増加することも確認した。このことから、申請者らは SCO2 は脂肪酸代謝、取り込み、そして活性酸素産生に大きな役割を果たしているものと考察している。

SCO2 欠損 (-/-) マウスは胎生致死であるため、申請者らは引き続き SCO2 ヘテロ接合 (+/-) マウスを用いて SCO2 の役割を検討した。組織学的検索、ミトコンドリア呼吸評価、そして心機能評価いずれにおいても SCO2 (+/-) I 型糖尿病マウスは p53 (-/-) I 型糖尿病マウスと同様の表現型を示した。加えて、II 型糖尿病のモデルである *db/db* マウスにおいても、STZ による I 型糖尿病モデルで認められた p53 および SCO2 の発現、組織学的変化、ミトコンドリア呼吸能の変化、そして心機能障害が出現することを確認した。すなわち糖尿病において誘導される p53 および SCO2 は、ミトコンドリア呼吸能と脂肪酸代謝を亢進させ、活性酸素を増加

させることがここに示され、p53/SCO2 シグナルが糖尿病性心筋症の代謝異常に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

以上が本論文の要旨であるが、糖尿病における心筋障害発症メカニズムについての新知見を解明し、あらたな治療標的シグナル経路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 (4 編)

- 1) Kimata M, Matoba S, Iwai-Kanai E, Nakamura H, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Mita Y, Okigaki M, Ikeda K, Tatsumi T, Matsubara H. p53 and TIGAR regulate cardiac myocyte energy homeostasis under hypoxic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 229: 1908-1916.
- 2) 的場聖明, 中村英夫, 松原弘明. 細胞移植治療. *日臨* 2010 Apr; 68: 726-730.
- 3) 川人浩之, 中村英夫, 的場聖明, 辰巳哲也, 松原弘明. 骨髄細胞移植による血管再生療法. *Heart View* 2007; 111: 1404-1409.
- 4) 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. *J Mol Cell Cardiol* 2012 Jan; 52: 175-184.

論文提出者 塩 津 弥 生

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1522 号
学位授与の日付	平成 24 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 酒井敏行・教授 奥田 司

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Shiotsu Y, Mori Y, Nishimura M, Sakoda C, Tokoro T, Hatta T, Maki N, Iida K, Iwamoto N, Ono T, Matsuoka E, Kishimoto N, Tamagaki K, Matsubara H, Kosaki A.
Plasma S100A12 Level is Associated with Cardiovascular Disease in Hemodialysis Patients
Clinical Journal of the American Society of Nephrology 2011; 6: 718-723.

審 査 結 果 の 要 旨

粥状動脈硬化症にともなう心血管疾患 (CVD) は、慢性腎臓病 (CKD) 患者、特に血液透析 (HD) 患者において罹患率が高く、主要な死因となることから、CVD の管理や予防は重要である。CKD 患者における CVD の頻度の高さについては、古典的 CVD 危険因子だけでは説明が困難とされ、その他の因子が重要な役割を担っている可能性が考えられている。

S100 蛋白質のサブタイプである S100A12 は、Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) の内因性リガンドの 1 つであり、ヒト好中球や単球/マクロファージに発現、分泌されることが報告されており、炎症を基盤とする動脈硬化の進展に寄与していることが示唆されている。こうした背景を受け申請者らは、HD 患者における血漿 S100A12 蛋白と CVD との関連性について、横断研究による検討をおこなった。

当該研究では 550 名の HD 患者 (平均年齢 63.4 歳) を対象としたが、うち 197 名 (35.8%) に CVD の既往を認めた。HD 患者における血漿 S100A12 蛋白平均値は 25.1 ± 22.4 ng/ml であり、申請者が属する研究グループによる先行研究で測定された健常人における 10.8 ± 6.3 ng/ml に比較して有意に高値であった ($p < 0.001$)。対象 HD 患者の中で、CVD 既往のある群 197 名においては CVD 既往のない群 353 名と比較して、血漿 S100A12 蛋白平均値が有意に高値であった (33.8 ± 28.1 vs 20.2 ± 16.6 ng/ml; $p < 0.001$)。多重ロジスティック回帰分析によって、血漿 S100A12 蛋白値が CVD 既往の有意でかつ独立した規定因子となることを見出した (オッズ比 (OR), 1.28; 95% 信頼区間 (CI), 1.13~1.44; $p < 0.001$)。さらに全対象患者を四分位して検討したところ、血漿 S100A12 蛋白値がより高値であるほど CVD のリスクも上昇する

ことが判明した。

本研究によって、血漿 S100A12 蛋白が HD 患者の CVD 既往に関連する因子であることが明確にされたものと評価できる。一般に CVD を惹起する動脈硬化の原因の一つとして慢性炎症の存在があげられているが、近年では CKD も慢性炎症状態にあると認識されており、最近の 1000 名以上の CKD 患者における前向きコホート研究では、CRP 高値と心臓死の関連性について有意な関係が示されている。CKD 患者における慢性炎症の原因についての詳細はまだ不明な点も多いが、RAGE 系の関与も一因として考えられる。実際、S100A12 は RAGE の内因性リガンドとして報告され、S100A12 が RAGE を介する炎症に重要な役割を果たしているという知見が蓄積されてきている。今回の結果からも血漿 S100A12 蛋白値は高度な CKD 患者の慢性炎症を反映し、その中でも同蛋白が高値であるほど動脈硬化が高度であり、そのために CVD の合併が多いことが示唆される。今後、前向き研究によって S100A12 蛋白が HD 患者における CVD 発症を予知する新規バイオマーカーとして立証され、臨床的治療選択に大きな役割を果たすことが期待される。

以上が本論文の要旨であるが、申請者らによって血漿 S100A12 蛋白が HD 患者の CVD に関連する因子であることが明らかにされた点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (8 編)

- 1) Shiotsu Y, Mori Y, Hatta T, Maki N, Iida K, Matsuoka E, Kado H, Ishida R, Kishimoto N, Tamagaki K, Nishimura M, Iwamoto N, Ono T, Matsubara H, Kosaki A. Plasma S100A12 levels and peripheral arterial disease in end-stage renal disease. *Nephron Extra* 2011; 1: 242-250.
- 2) Mori Y, Shiotsu Y, Matsuoka E, Kado H, Ishida R, Matsubara H. Chronic inflammation and S100A12/ Receptor for advanced glycation endproducts axis: a novel risk factor for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease? *Hemodialysis-Different Aspects, Croatia: Intech*, 2011: 245-252.
- 3) Yamahara H, Kishimoto N, Nakata M, Okazaki A, Kimura T, Sonomura K, Matsuoka E, Shiotsu Y, Adachi T, Matsubara H, Iwasaka T, Mori Y. Direct aldosterone action as a profibrotic factor via ROS-mediated SGK1 in peritoneal fibroblasts. *Kidney Blood Press Res* 2009; 32: 185-193.
- 4) 塩津弥生, 八田 告, 木村健二郎. 腎血管性高血圧. 富野康日己 編. エキスパートのための腎臓内科学, 東京: 中外医学社, 2009: 284-288.
- 5) 塩津弥生, 八田 告, 木村健二郎. 腎血管性高血圧と RAA 系. 腎と透析. 東京: 東京医学社, 2008; 64: 377-381.
- 6) 塩津弥生, 八田 告, 丹田修司, 立川弘孝, 榎 系, 澤田克徳. 脾臓低形成に Invasive pneumococcal bacteremia をきたした 1 例. *日透析医会誌* 2007; 40: 925-929.
- 7) 玉垣圭一, 岡崎明子, 足立孝臣, 塩津弥生, 森 泰清. 間質性腎障害と多尿. 排尿障害プラクティス. 東京: メディカルレビュー社, 2009; 17: 107-112.
- 8) Kusaba T, Mori Y, Matsuoka E, Shiotsu Y, Adachi T, Okazaki A, Matsubara H. Nocturnal urinary sodium excretion reflects nocturnal high blood pressure in chronic kidney disease patients. *日臨生理会誌* 2008; 38: 251-258.

論文提出者 村上 憲

学位の種類 博士(医学)
学位記の番号 甲第1523号
学位授与の日付 平成26年11月14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 吉村了勇・教授 水野敏樹・教授 伊藤義人

論文題目及び掲載誌

Murakami K, Kohno M, Kadoya M, Nagahara H, Fujii W, Seno T, Yamamoto A,
Oda R, Fujiwara H, Kubo T, Morita S, Nakada H, Hla T, Kawahito Y.
**Knock Out of S1P3 Receptor Signaling Attenuates Inflammation
and Fibrosis in Bleomycin-induced Lung Injury Mice Model**
PLoS ONE 2014; 9: e106792.

審査結果の要旨

肺線維症は、治療抵抗性の予後不良な疾患である。肺が障害されることにより炎症細胞の増加、サイトカインの放出そして最終的に線維芽細胞の活動の増加が起きる。スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、5種類のG蛋白質共役受容体(S1P1-5)を介して、細胞増殖、分化、遊走、血管形成を含む多くの重要な細胞プロセスに関与する生理活性物質である。肺疾患におけるS1P3の役割の解明は未だ不十分である。申請者は、S1P3レセプター・シグナリングの役割を解明するために、S1P3 KOマウスを用いてプレオマイシン誘導された肺線維症モデルを作成し分析した。

申請者は、7~10週齢のS1P3ノックアウトマウス(S1P3KO)とC57BL/6J野生型マウス(WT)に対し、プレオマイシン塩酸塩溶液2.15 U/kgの経気管支投与を行った。対照群には、生理食塩水の経気管支投与を行った。投与後7日目に各群マウスの気管支洗浄液(BALF)を採取した。また、投与後7日、28日目の各群マウスの肺を採取し、パラフィン切片を作成し、肺の炎症、線維化を比較した。またBALFを分析し、S1P3KO-WT両群のBALF中の細胞数、細胞分画、サイトカイン・ケモカイン濃度、コラーゲン量、S1P濃度を比較した。結果は、WTと比較してS1P3KOマウスの体重減少の割合が有意に少なかった。プレオマイシン投与後7日目の肺組織では、S1P3KOマウスの肺組織ではWTと比較して炎症の程度が軽度であった。また、28日目の肺組織では、S1P3KOマウスでは線維化は軽度であった。肺切片の肺の線維化を表すスコアは、投与後7日目ではWTとS1P3KOで有意な差は認めなかったが、28日目では、S1P3KOで有意に低値であった。プレオマイシン投与後

7日目のBALF中の総細胞数は、S1P3KOでは有意に少なかった。しかし、細胞分画では両群に差はなかった。BALF中のコラーゲン量は、プレオマイシン投与後7日目、28日目ともに、S1P3KOマウスでは低値であった。特に投与後28日目において、その差は顕著であった。プレオマイシン投与後7日目のBALF中のMonocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)濃度、Transforming growth factor- β (TGF- β)濃度では、WTマウスとS1P3KOマウスで有意な差を認めなかったが、Connective tissue growth factor(CTGF)濃度に関しては、WTと比較してS1P3KOでは有意に低値であった。生食投与を行った群に関しては、BALF中の細胞数以外は、WTとS1P3KOで差を認めない、または両群ともに感度以下であった。

S1PとTGF- β シグナリングが相互に干渉していることを示す研究がいくつか存在する。これらの報告は、S1P3レセプターが線維化における重要な役割を果たすことを示している。本研究ではS1P3シグナリングがCTGF発現を介していることを示した。他方で、S1Pが細胞外マトリックス(ECM)合成を誘導するためにPI3K/AktとERK1/2つのシグナリングを起動させること示しており、S1P3-CTGFの経路のもう一つのメカニズムの存在を示唆している報告も存在する。

以上が本論文の要旨であるが、プレオマイシン誘導肺線維症モデルの炎症と線維化におけるS1P3シグナリングの重要性を示し、S1P3シグナリングがCTGF発現を介して肺線維症の発症を引き起こすことを示唆している。この経路は間質性肺炎などの肺疾患の治療ターゲット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。

参考論文 (3編)

- 1) Seno T, Hamaguchi M, Ashihara E, Kohno M, Ishino H, Yamamoto A, Kadoya M, Nakamura K, Murakami K, Matoba S, Maekawa T, Kawahito Y. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J_2 reduces the formation of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. PLoS ONE 2011; 6: e25541.
- 2) Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Kajitani N,

Fujioka K, Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Myeloid-Derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. J Immunology 2013; 191: 1073-1081.

- 3) Fujii W, Kohno M, Ishino H, Nakabayashi A, Fujioka K, Kida T, Nagahara H, Murakami K, Nakamura K, Seno T, Yamamoto A, Kawahito Y. The rapid efficacy of abatacept in a patient with rheumatoid vasculitis. Mod Rheumatology 2012; 22: 630-634.

論文提出者 中村直美

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1524号
学位授与の日付	平成26年11月14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 八木田和弘・教授 松田 修

論文題目及び掲載誌

Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Kinoshita S, Katoh N.
Toll-like Receptor 3 Increases Allergic and Irritant Contact Dermatitis
 Journal of Investigative Dermatology 2015; 135: 411-417.

審査結果の要旨

自然免疫は病原体の初期認識に重要な役割を果たし、病原体固有に存在する構造 (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識する。哺乳類では、Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) が PAMPs を認識する主要な受容体である。TLR は 11 種類同定されており、マクロファージや樹状細胞、顆粒球、NK 細胞、T 細胞、線維芽細胞、上皮細胞などに発現している。TLR3 は、ウイルスの 2 本鎖 RNA や Poly (I:C) を外因性リガンドとして認識し免疫反応を誘導する。近年 TLR3 はウイルス感染だけでなく、アレルギー炎症への関与も報告されているが、代表的なアレルギー炎症性皮膚疾患である、アレルギー性接触皮膚炎における TLR3 の役割は未だ解明されていない。

申請者は、アレルギー性接触皮膚炎における TLR3 の関与を調べるため、wild type, *Tlr3* knockout (KO), *TLR3* transgenic (Tg) マウスを用い、接触過敏反応 (contact hypersensitivity: CHS) を誘導した。マウスの腹部に 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) を塗布し感作させ、7日後に耳介に TNCB を塗布し CHS を惹起した。24

時間後に耳介の厚さを計測し、病理組織学的に検討を行い、炎症細胞数をカウントし、炎症を評価した。wild type マウスに比べ、*Tlr3* KO マウスでは、耳介の腫脹、炎症細胞の浸潤や浮腫が抑制されており、*TLR3* Tg マウスでは増強がみられた。

次に、TNCB にて感作した wild type マウス、*Tlr3* KO マウスから採取したリンパ球を、それぞれ、未感作の *Tlr3* KO マウス、wild type マウスに養子移入し、直ちに耳介に TNCB を塗布し、24時間後に炎症反応を評価した。感作した wild type マウスから採取したリンパ球を未感作の *Tlr3* KO マウスに養子移入した群で炎症反応が抑制されており、惹起相での TLR3 の関与が示唆された。

また、wild type, *Tlr3* KO, *TLR3* Tg マウスにクロトン油を耳介に塗布し、6時間後に炎症反応を評価した。*Tlr3* KO マウスでは、炎症反応が抑制されており、*TLR3* Tg マウスではそれらの増強がみられ、抗原非特異的な炎症にも TLR3 が関与することが明らかとなった。

さらに、マウスの腹部に fluorescein isothiocyanate を塗布し、これを貪食しリンパ節へ遊走した樹状細胞をフ

ローサイトメトリーにて解析し、樹状細胞の遊走能を調べたところ、wild type, *Tlr3* KO マウス間で有意差を認めなかった。樹状細胞の抗原提示能は、樹状細胞を、CFSEで染色した allogeneic なリンパ球と共に培養し、増殖したリンパ球を解析したが、wild type, *Tlr3* KO 間で有意差を認めなかった。リンパ球の増殖能も Wild type, *Tlr3* KO 間で有意差は見られなかった。

keratinocyte や fibroblast も種々のサイトカイン、ケモカインを産生し、炎症を増強する。接触皮膚炎を起こしたマウス耳介組織や初代培養細胞にて、アレルギー性および刺激性接触皮膚炎に重要なサイトカイン、ケモカインをリアルタイム定量 PCR にて測定したところ、IP-10 と RANTES が wild type マウスに比べ、*Tlr3* KO マウスでは有意に産生が抑制されていた。

以上が本論文の要旨であるが、TLR3 がアレルギー性および刺激性接触皮膚炎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 論 文 (7編)

- 1) Kanno S, Asai J, Nakamura N, Komori S, Iida S, Hanada K, Komiyama T, Takenaka H, Katoh N.

Myxofibrosarcoma arising from a chronic burn scar. *J Dermatol* 2014; 41: 279-280.

- 2) Mizutani H, Masuda K, Nakamura N, Takenaka H, Tsuruta D, Katoh N. Cutaneous and laryngeal squamous cell carcinoma in mixed epidermolysis bullosa, kindler syndrome. *Case Rep Dermatol* 2012; 4: 133-138.
- 3) Nakamura N, Asai J, Daito J, Takenaka H, Katoh N. Interstitial granulomatous dermatitis? An unusual presentation in the mucosa and periungual skin. *J Dermatol* 2011; 38: 382-385.
- 4) 中村直美, 益田浩司, 竹中秀也, 加藤則人. 甲状腺機能亢進症患者に生じ、タクロリムス軟膏が奏功した角層下膿疱症の1例. *皮膚臨床* 2011; 53: 1159-1161.
- 5) 中村直美, 加藤則人. The Red Scrotum Syndrome の1例. *皮膚臨床* 2010; 52: 1490-1491.
- 6) 中村直美, 井上和之, 市橋かおり, 上田英一郎, 竹中秀也, 加藤則人, 岸本三郎. 増殖性天疱瘡の1例. *皮膚臨床* 2008; 50: 1774-1775.
- 7) 木梨直美, 市橋かおり, 竹中秀也, 加藤則人, 岸本三郎, 加賀美潔. 角層内血腫にて黒色を呈した単発性被角血管腫の1例. *西日本皮膚* 2007; 69: 266-268.

論文提出者 上 田 崇

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	乙第2115号
学位授与の日付	平成26年11月14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 八木田和弘・教授 酒井敏行・教授 加藤則人

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Ueda T, Ito S, Shiraishi T, Kulkarni P, Ueno A, Nakagawa H, Kimura Y, Hongo F, Kamoi K, Kawauchi A, Miki T.

Hyper-expression of PAX2 in Human Metastatic Prostate Tumors and Its Role as a Cancer Promoter in an in Vitro Invasion Model

Prostate 2013; 73: 1403-1412.

審 査 結 果 の 要 旨

リガンド非依存性転写因子 PAX (Paired Box) ファミリーに属する因子は様々な組織の分化に重要な機能を果たすが、一方でその機能破綻が発癌および癌増悪に繋がる事が報告されている。PAX2 はリガンド依存性転写因子 AR (androgen receptor) よりも早期の段階で前立腺分化に作用し、前立腺癌細胞での発現が報告されており、前立腺癌の発生、増悪において重要な機能を持つと

推測される。今回申請者は前立腺癌増悪における PAX2 の分子機能解析を行う事を目的とした。

申請者は、正常前立腺細胞モデルとして PrEC 細胞株、前立腺癌細胞モデルとして LNCaP, PC3, DU145, 22Rv1 細胞株を用い、それぞれの細胞株における PAX2 の発現レベルをリアルタイム RT-PCR とウェスタンブロットで検討した。その結果、PrEC と比較して前立腺

癌細胞株において mRNA, 蛋白レベルで PAX2 が高発現することが判明した。さらに PAX2 ノックダウンにより前立腺癌細胞株の増殖が抑制された。以上より PAX2 が癌の増悪を促進することが示唆されたため、前立腺癌細胞患者検体を用いて PAX2 の発現レベルを検討した。手術または剖検を施行された患者の検体より正常部位、原発巣、転移巣を抽出し、リアルタイム RT-PCR, 免疫染色を行った。その結果正常部位、原発巣と比較して転移巣において mRNA, 蛋白レベルで PAX2 が高発現することが判明し、PAX2 は転移促進に機能する可能性が示唆された。癌の転移は、原発巣からの遊離と浸潤、脈管への侵入、脈管内の移動、標的組織への接着、定着と増殖といった段階を経て成立する。その中で癌の浸潤は Matrigel assay を用いて in vitro で評価可能であり、PAX2 ノックダウンにより前立腺癌細胞の浸潤能が低下することが判明した。次に PAX2 が癌細胞の浸潤を促進するメカニズムを解明する目的でマイクロアレイ解析を行った。Gene Set Enrichment Analysis の結果 PAX2 ノックダウンにより癌関連遺伝子の変動している事が判明した。さらに Gene Ontology 解析の結果 PAX2 の標的遺伝子の大多数が細胞組成蛋白に関連づけられ、さらにカドヘリンを初めとした膜蛋白に分類される事が判明した。申請者は、さらに膜蛋白の中で癌細胞の浸潤と関連することが報告されているカドヘリンに注目し、リアルタイム

PCR とウェスタンブロッティングを行ったところ、N カドヘリンが PAX2 により制御されることが判明した。すなわち、PAX2 が N カドヘリンの発現誘導を介して前立腺癌細胞の浸潤を促進している可能性が示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、PAX2 が前立腺癌の増悪・転移促進に関与することを明らかにし、今後の転移性前立腺癌の新規治療標的になる可能性があり医学的価値がある研究と認められる。

参 考 論 文 (3 編)

- 1) Takaha N, Okihara K, Kamoi K, Hongo F, Iwata T, Yano K, Ueda T, Takeuchi I, Yamada T, Kawauchi A, Miki T. Feasibility of tri-weekly docetaxel-based chemotherapy for elderly patients (age 75 and older) with castration-resistant prostate cancer. *Urol Int* 2011; 26; 87: 263-269.
- 2) 上田 崇, 長嶋隆夫, 佐藤 暢, 小山正樹, 岡田晃一, 伊藤吉三, 岩元則幸. MPO-ANCA 関連糸球体腎炎の治療中に併発したニューモシスティスカリニ肺炎の 1 例. *日透析医学会誌* 2005; 38: 1655-1659.
- 3) 上田 崇, 浮村 理, 佐藤 暢, 水谷陽一, 中尾昌宏, 三木恒治. 縦隔気腫を伴った膀胱自然破裂の 1 例. *泌紀* 2002; 48: 363-365.

論文提出者 榎 本 裕 子

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1525 号
学位授与の日付	平成 25 年 4 月 26 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

Tsubakimoto-Imoto H, Takahashi T, Ueyama T, Ogata T, Adachi A, Nakanishi N, Mizushima K, Naito Y, Matsubara H.

Serglycin in a Novel Adipocytokine Highly Expressed in Epicardial Adipose Tissue
Biochemical and Biophysical Research Communications 2013: 432; 105-110.

審 査 結 果 の 要 旨

脂肪組織は単なるエネルギー源貯蔵のための組織ではなく、最近では、多くの生理活性物質を放出する内分泌器官としての役割が認識されてきている。特に、この臓器から分泌されるアディポサイトカインはメタボリック

シンドロームや心血管病の進展に関与するものとして注目されている。また、脂肪組織の中でも、心外膜脂肪 (EAT) はケモカインと炎症性サイトカインを分泌することによって冠動脈疾患 (CAD) などの心血管病の進展に

重要な役割を果たしていることが示唆されているものの、その詳細は明らかにされていない。こうした背景のもと申請者らは、EAT、腹腔内脂肪 (OAT)、そして皮下脂肪 (SCAT) の三者における遺伝子発現プロファイルを検討し、EAT 特異的に高発現する分子の特定を試みた。

申請者は、まず、CAD患者のサンプルを用いてEATにおけるDNAマイクロアレイ解析を行い、その結果をOATやSCATでの解析結果と比較した。その結果15304個のプロンプがこの三者の脂肪組織に共通して上昇していることを見出した。一方、EATのみで選択的に上昇するものとして321個のプロンプを特定し、そのなかから申請者らは炎症と免疫応答に関連するものとして55個の遺伝子に絞って検討を加えた。この中にはIL1 β 、IL6、IL8、そしてケモカインレセプター2など35のものがOATに比較してEATにおいて2倍以上に上昇していることを見出した。このなかでも、造血細胞において高度に発現することが知られるプロテオグリカンであるserglycinがEAT特異的にきわめて高く発現していることを特定した。

定量的リアルタイムPCRでは、CAD患者におけるserglycinのmRNA発現はSCATに比べて約13倍高いものであった。また、免疫染色によってserglycin分子がEATの脂肪細胞膜に存在することを確認した。次に申請者は、3T3L1細胞を用いて試験管内での脂肪分化においてその発現がどのようになるか検討し、脂肪分化とともにserglycinのmRNAと蛋白の発現が上昇し、分化した3T3L1細胞からserglycinが分泌されることを見出した。さらに、炎症性サイトカインによってserglycinが誘導されるかどうかを、やはり3T3L1細胞の試験管内分化系を用いて検討したところ、TNF α 刺激によってserglycinのmRNA発現が誘導されることを見出した。重要なことに、serglycinの蛋白発現は細胞ライセート中では変化はみられず、他方、TNF α 刺激によって培養液中のserglycin量が増加することを確認した。こうした結果から、TNF α は脂肪細胞からのserglycinの分泌を刺激しているもの

と、申請者らは解釈している。くわえて申請者らはウェスタンブロット解析を行なって、実際に、serglycinがヒト血清中で検出されることを確認している。こうした結果から、CADにおいてEAT由来のserglycinとTNF α が互いのクロストークを介して、CADの進展と進行に寄与している可能性が示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、CADにおけるEAT由来の生理活性物質の役割についての理解を深めるとともに、CAD治療における新たな分子標的を特定してゆく上で有用な知見がもたらされた点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (4 編)

- 1) 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.
- 2) Nakanishi N, Takahashi T, Ogata T, Adachi A, Tsubakimoto-Imoto 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.
- 3) Adachi A, Takahashi T, Ogata T, Tsubakimoto-Imoto H, Nakanishi N, Ueyama T, Matsubara H. NFAT5 regulates the canonical Wnt pathway and is required for cardiomyogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 426: 317-323.
- 4) Asada S, Takahashi T, Isodono K, Imoto H, Adachi A, Ogata T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Downregulation of Dicer Expression by Serum Withdrawal Sensitizes Human Endothelial Cells to Apoptosis. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2008; 295: 2512-2521.