
博士論文要旨

論文提出者 永原優理

学位の種類 博士(医学)
学位記の番号 甲第1528号
学位授与の日付 平成27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 北脇 城・教授 伏木信次・教授 細井 創

論文題目及び掲載誌

Nagahara Y, Nakamae T, Nishizawa S, Mizuhara Y, Moritoki Y, Wada Y,
Sakai Y, Yamashita T, Narumoto J, Miyata J, Yamada K, Fukui K.

**A Tract-based Spatial Statistics Study in Anorexia Nervosa:
Abnormality in the Fornix and the Cerebellum**

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2014; 51: 72-77.

審査結果の要旨

神経性無食欲症(anorexia nervosa; AN)は著しい痩せを伴う死亡率の高い精神疾患である。近年ANにおける脳白質の異常に関心が高まっており、拡散テンソル画像(diffusion tensor imaging; DTI)を用いた研究が行われてきたが、DTIに特化した解析方法を用いたものではなく、画像の前処理の問題が解決されていなかった。そのため申請者はDTIの解析に特化した統計手法である神経束空間統計(tract-based spatial statistics; TBSS)を用いた研究により、AN患者における白質の異常の同定を試みた。

17名の女性AN患者と、年齢、利き手を一致させた18名の健常女性を対象とし、明らかな身体疾患、精神遅滞や広汎性発達障害を認めるものは除外した。AN群のうち4名にうつ病の併存を認め、6名が向精神薬を内服していた。全ての被験者においてANの重症度をeating disorder inventory-II (EDI-II)にて評価し、3テスラMRシステムにて32軸方向の拡散強調画像を撮像した。次にそれぞれの被験者ごとのfractional anisotropy (FA)画像とmean diffusivity (MD)画像を作成し、それらを全被験者に共通する白質線維束を表す平均FAスケルトンに投射させ、順列に基づいたノンパラメトリックな推計をボクセルごとに行った。群間比較のため、年齢とbody mass index (BMI)の影響を除いて共分散分析を行った。クラスター形成の閾値を統計量 $t=3.0$ 、有意水準を $p<0.05$ として多重比較補正を行ったうえでFSL Randomize version 2.1を用いてクラスターワイズ解析を行った。

平均BMIはAN群が13.6、健常群が19.9、EDI合計点はAN群が77.8、健常群が23.8であった。FA、MDの群間比較では、健常者に比してAN患者において脳弓体部でMD高値を、左小脳半球でFA低値を認めた。加えて右脳梁と右上縦束においてMD低値の部位を認めた。薬剤を内服していないAN患者11名と健常者18名とでFA値とMD値を比較したところ、0.08という有意水準ではあるがAN患者において左小脳半球でFA値が低い領域を認めた。

脳弓は情動の調整、エピソード記憶や報酬処理、小脳外側は食物摂取、社会性、情動や恐怖反応などの機能を担っており、これらの機能の異常とANの発症や増悪との関連が報告されている。低いFA値は軸索の変性や脱髄など組織の方向性が障害されていることを、高いMD値は炎症や細胞外浮腫などで水分子の拡散能が上昇していることを意味しており、本研究の結果から小脳や脳弓の微細構造の異常が摂食障害の病態に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、TBSSという白質の解析に特化した方法でANにおける脳弓と小脳の白質の微細構造の異常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 (2編)

- 1) Choi H, Yamashita T, Wada Y, Kohigashi M, Mizuhara Y, Nagahara Y, Nishizawa S, Tominaga T, Fukui K.

Predictors for exacerbation/improvement of postpartum depression-A focus on anxiety, the mothers' experiences of being cared for by their parents in childhood and borderline personality: A perspective study in Japan. *J Affect Disorders* 2013; 150: 507-12.

2) Iida N, Shibata K, Nagahara Y, Okamura A, Matsuoka T, Nakamae T, Narumoto J, Fukui K. Case of dementia with Lewy bodies that progressed from schizoaffective disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 2013; 67: 281-2.

論文提出者 藤井 渉

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1529号
学位授与の日付	平成27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 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

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

The Journal of Immunology 2013; 191: 1073-1081.

審査結果の要旨

骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-Derived Suppressor Cells: MDSCs) は腫瘍や炎症などの病的環境で増加する骨髄系の細胞群で、L-arginine の代謝酵素である arginase 1 と inducible nitric oxide synthase (iNOS) の活性により T 細胞の抑制作用を発揮する。悪性腫瘍における MDSCs は T 細胞の抗腫瘍免疫応答を抑制することで腫瘍を増大させるといわれているが、関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) をはじめとする自己免疫性疾患における MDSCs の役割については不明である。

申請者は、RA の動物モデルであるコラーゲン誘導関節炎 (Collagen-Induced Arthritis: CIA) マウスにおける MDSCs の役割を解析した。雄性 DBA/1 マウスにウシ II 型コラーゲンをアジュバントとともに第 1 日および第 21 日に皮下注射し、CIA マウスを作製した。CIA マウスにおいて脾臓中の MDSCs は関節炎がピークとなる第 35 日に有意に増加した。次に CIA マウスの脾臓から免疫磁気細胞分離法により MDSCs を分離、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した CD4⁺ T 細胞と共培養し機能解析を行った。MDSCs との共培養により CD4⁺ T 細胞の増殖は有意に抑制され、またこの抑制効果は arginase 1 阻害剤および iNOS 阻害剤の添加によって打ち消されたことから MDSCs は arginase 1 および iNOS の活性により CD4⁺ T

細胞の増殖を抑制することが示された。さらに MDSCs が CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生能と分化能に与える影響を解析したところ、MDSCs との共培養により CD4⁺ T 細胞からの IFN γ , IL-2, TNF α , IL-6 産生は抑制、IL-10 産生は促進された。また、CIA の病態に関わる IL-17A 産生性 Th17 細胞への分化は MDSCs との共培養により有意に抑制された。最後に *in vivo* での MDSCs の役割を解明するため、CIA マウスへの MDSCs の養子移植を行った。CIA マウスに第 1 日および第 21 日の計 2 回 2×10^6 個の MDSCs を経静脈的に養子移植することにより CIA マウスの関節炎は著明に抑制され、血清中の TNF α および IL-6 の有意な低下と、単径リンパ節中の CD4⁺ T 細胞および Th17 細胞数の減少を認めた。さらに抗 Gr-1 中和抗体を用いて MDSCs を CIA マウスから枯渇させたところ、MDSCs を枯渇させた CIA マウスでは関節炎は自然軽快せずに遷延する傾向を示した。以上より MDSCs は CIA の自然軽快機構に関与していると考えられた。

以上が本論文の要旨であるが、MDSCs が CIA において病態抑制的に働き、その自然軽快機構に関与してい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) Fujii W, Ashihara E, Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells in autoimmune diseases. *Inflamm Regen* 2014; 34: 124-128.
- 2) Fujii W, Kohno M, Hirai H, 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 Rheumatol* 2012; 22: 630-634.
- 3) 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.

論文提出者 知念良顕

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1530 号
学位授与の日付	平成 27 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 伊藤義人・教授 奥田 司・教授 田代 啓

論文題目及び掲載誌

Chinen Y, Kuroda J, Shimura Y, Nagoshi H, Kiyota M, Yamamoto-Sugitani M, Mizutani S, Sakamoto N, Ri M, Kawata E, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Iida S, Taniwaki M.
Phosphoinositide Protein Kinase PDPK1 is a Crucial Cell Signaling Mediator in Multiple Myeloma
Cancer Research 2015; 54: 409-417.

審査結果の要旨

近年、多発性骨髄腫 (MM) の治療予後は新規薬剤の登場により著しく改善した。しかし依然として治癒は困難であり、最終的にはあらゆる治療薬に対して抵抗性を獲得、致死的転機をたどることには変わりはない。更なる予後の改善を求めるには、分子病態解明に基づく治療標的分子の同定と、それに対する新薬開発が今後の MM 治療戦略における重要な柱となる。

申請者は、治療標的分子は疾患単位で普遍的に発現しているものが望ましいと考え、MM における RSK2 の N 末端の恒常的リン酸化に着目した。RSK2 の N 末端は PDPK1 からリン酸化を受けるため、MM 細胞における PDPK1 の意義について検討した。まず、MM 細胞株を用いた実験では、PDPK1 は検討した 11 細胞株全てにおいて活性化していることを見出した。加えて、患者 MM 細胞による検討では、PDPK1 は初期の MM から治療抵抗性を獲得した終末期に至るまで普遍的に活性化していることを見出した。この所見は疾患形成に関わる染色体・遺伝子異常などの分子生物学的異常が多様である MM において、新規薬開発の点から極めて重要な知見であると考えられた。さらに、PDPK1 特異的低分子化合物

阻害剤や RNA 干渉を用いた実験の結果から、PDPK1 は MM における下流シグナルとして RSK2 だけでなく AKT も同時に支配しており、その結果、CCNDs, MYC, IRF4 などの MM における重要な転写因子を幅広く制御し、細胞死制御に必須の BIM, BAD, がん遺伝子 PLK1 を同時制御することで MM 細胞における細胞増殖および細胞死を制御することを見出した。一方で、IL-6, BAFF, IGF-1 などを用いたサイトカイン刺激は PDPK1 自体に影響を及ぼさないが、下流シグナルである RSK2 や AKT を活性化し、PDPK1 特異的低分子化合物阻害剤によりこれらのサイトカイン刺激の効果は減弱ないし消失することが示された。また、免疫組織学的手法を用いた 65 症例の検討から、少数例の PDPK1 陰性群では陽性群と比較し、全生存期間、新規薬剤や自家移植における無増悪生存期間が有意に延長することを証明した。最後に、薬剤併用実験では、PDPK1 特異的低分子化合物阻害剤は、既存の抗がん剤あるいは新規薬剤との併用により、MM 細胞に対して相加あるいは相乗効果を示すことが明らかになった。

以上が本論文の要旨であるが、PDPK1 は多様な分子

生物学的異常を伴うMMの病態形成に寄与する多くの分子を普遍的に制御し、PDPK1特異的低分子化合物阻害剤がMMに対する将来有望な治療標的分子となる可能性を明らかにした点で、医学上価値ある研究とみとめる。

参 考 論 文 (3 編)

- 1) Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Maegawa S, Tatekawa S, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. 8q24 amplified segments involve novel fusion genes between NSMCE2 and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemia J Hematol Oncol 2014; 7: 68.
- 2) Chinen Y, Taki T, Tsutsumi Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Sakamoto N, Kuroda J, Hriike S, Nishida K, Ohno H, Uike N, Taniwaki M. The leucine twenty homeobox (LEUTX) gene, which lacks a histone acetyltransferase domain, is fused to KAT6A in therapy-related acute myeloid leukemia with t(8; 19) (p11; q13). Genes Chromosomes Cancer 2014; 53: 299-308.
- 3) Chinen Y, Kuroda J, Ohshiro M, Shimura Y, Mizutani S, Nagoshi H, Sasaki N, Nakayama R, Kiyota M, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Taniwaki M. Low ADAMTS-13 activity during hemorrhagic events with disseminated intravascular coagulation. Int J Hematol 2013; 97: 511-519.

論文提出者 早 田 洋 樹

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1531号
学位授与の日付	平成27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 佐和貞治・教授 伊藤義人

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Hayata H, Miyazaki H, Niisato N, Yokoyama N, Marunaka Y.

Lowered Extracellular pH is Involved in the Pathogenesis of Skeletal Muscle Insulin Resistance

Biochemical and Biophysical Research Communications 2014; 445: 170-174.

審 査 結 果 の 要 旨

インスリン抵抗性は2型糖尿病の基礎となる病態であり、高血圧、脂質異常症、肥満といった生活習慣病とも密接に関連しており、これらは全て心血管疾患の重要なリスクファクターである。骨格筋におけるインスリン抵抗性の病態は、insulinの骨格筋への作用が不十分となり、骨格筋細胞内へのglucose取込が低下するというものである。しかし、インスリン抵抗性の成因については大部分が未解明である。

近年、2型糖尿病モデルラット(OLETFラット)を用いた研究により、インスリン抵抗性の初期の段階で細胞外液pHの低下が引き起されていることを見出した。また、2型糖尿病患者において細胞外液pHの低下を示唆する疫学データが複数報告されている。そこで申請者は、細胞外液pHの低下がインスリン抵抗性の病態に関与しているという仮説を立て、ラット骨格筋由来培養細胞を

用い、細胞外液pH低下時のinsulinへの応答の変化について検討を行った。

各実験において、ラット骨格筋由来培養細胞株であるL6細胞を筋管細胞へ分化させて用いた。細胞外液のpHを7.4, 7.2, 7.0, 6.8に調整してinsulin刺激を加え、この時のinsulinに対する各応答について解析した。

Insulinがinsulin receptorと結合すると、insulin receptorおよび下流のシグナルであるAktがそれぞれリン酸化され活性化状態となる。これらのリン酸化レベルをWestern blotting法により解析した。細胞外液pH低下時には、insulin receptorおよびAktのリン酸化レベルがいずれも低下し、活性化が抑制された。Insulin receptorの細胞膜上発現レベルについて、細胞膜タンパク質バイオチン標識法を用いて解析を行ったが、細胞外液pHを変化させても細胞膜上発現レベルは変化しなかった。Insulin

と insulin receptor の結合性について、放射線ラベル標識された insulin を用いて binding assay を行ったところ、細胞外液 pH 低下時には細胞に結合した insulin が減少することがわかった。骨格筋細胞への glucose 取込について、放射線ラベル標識された 2-deoxyglucose (2DG, glucose 誘導体) を用いて実験を行ったところ、細胞外液 pH を低下させると、insulin 刺激による 2DG 取込増加量が減少することがわかった。以上のことから本研究は、骨格筋細胞において細胞外液 pH が低下すると insulin 刺激に対するシグナルが減弱し、glucose の骨格筋への取込が不十分となる、ということを示した。

以上が本論文の要旨であるが、インスリン抵抗性の成

因に細胞外液 pH 低下が関与するという新たな知見を加えた点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (1 編)

- 1) Aoi W, Hosogi S, Niisato N, Yokoyama N, Hayata H, Miyazaki H, Kusuzaki K, Fukuda T, Fukui M, Nakamura N, Marunaka Y. Improvement of insulin resistance, blood pressure and interstitial pH in early developmental stage of insulin resistance in OLETF rats by intake of propolis extracts. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432: 650-653.

論文提出者 孫 紅 昕

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1532 号
学位授与の日付	平成 27 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 中村直登・教授 水野敏樹・教授 伊藤義人

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Sun H, Niisato N, Inui T, Marunaka Y.

Insulin is Involved in Transcriptional Regulation of NKCC and the CFTR Cl⁻ Channel Through PI3K Activation and ERK Inactivation in Renal Epithelial Cells

Journal of Physiological Sciences 2014; 64: 433-443.

審 査 結 果 の 要 旨

これまでに経上皮 Cl⁻ 分泌・Cl⁻ トランスポーター・Cl⁻ チャネルは水分分泌の駆動力としてだけでなく、細胞増殖・細胞分化・細胞内情報伝達機構に多様な役割を担っていることが見出され、経上皮 Cl⁻ 分泌の制御メカニズムや制御因子解明の重要性がクローズアップされている。一方で、血糖値を調節する重要なホルモンであるインスリンは、腎遠位尿細管・皮質集合管で上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の膜発現量を増大させて Na⁺ 再吸収を亢進することが明らかにされており、2 型糖尿病で頻繁に見られる高血圧症発症の要因の 1 つとも考えられている。しかしながら、これまでの研究で、インスリンの Cl⁻ 分泌への作用についてはほとんど解明されていない。インスリンの Cl⁻ 分泌への影響およびその分子メカニズムの解明を目的として本研究を推進した。

申請者は、遠位尿細管・皮質集合管主細胞のモデル細胞であり *Xenopus laevis* 由来の A6 細胞を用いて電気生理

学的手法により Cl⁻ 分泌を、インスリンの細胞内情報伝達系に関しては Western blotting および Quantitative real-time PCR 法を用いて、インスリンの Cl⁻ 分泌への作用とそのメカニズムの解明を試みた。

はじめに、インスリンの Cl⁻ 分泌への作用を検討したところ、インスリン単独では経上皮 Cl⁻ 分泌に変化は認められなかったが、forskolin (cAMP の産生を亢進する薬剤) により亢進した Cl⁻ 分泌と管腔側膜上の Cl⁻ チャネル活性をさらに増強することを明らかにした。また、インスリンの Cl⁻ 分泌増強作用には少なくとも 3 時間以上が必要であることから、インスリンの増強メカニズムを解明する上で新たな遺伝子発現の関与について検討したところ、Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter (NKCC) と CFTR Cl⁻ チャネルの発現が mRNA レベルで亢進していることが明らかになった。次に、インスリンが NKCC と CFTR Cl⁻ チャネルの mRNA 発現を亢進するメカニズムについて

明らかにする目的でPI3KとERKの関与について検討したところ、PI3KはNKCC mRNA発現の正の制御因子であり、ERKはCFTR Cl⁻チャンネル mRNA発現の負の制御因子であることが明らかになった。さらに、インスリン単独ではCl⁻分泌を増強できないため、インスリンはNKCCとCFTR Cl⁻チャンネルの産生を亢進できるが、細胞膜上への移行にはcAMPが必要と考え、ERからGolgiへのタンパク質輸送阻害剤である brefeldin A (BFA)の影響について検討したところ、BFAはforskolinによるCl⁻分泌亢進とインスリンによる増強効果を抑制することが明らかとなった。以上のことから本研究は、インスリンはPI3K活性化とERK不活性化を介してNKCCとCFTR Cl⁻チャンネル発現を転写レベルで亢進し、2) NKCCとCFTR Cl⁻チャンネルの局在(膜への

移行)はcAMP依存的な経路により独立に制御され、3) cAMPはインスリンと協調的に経上皮Cl⁻分泌を制御することを明らかにした。

以上が本論文の要旨であるが、インスリンはPI3K活性化とERK不活性化を介してNKCCとCFTR Cl⁻チャンネル発現を転写レベルで亢進し、cAMPと協調的にCl⁻分泌を増強するという新たな知見を加えた点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (1編)

- 1) Sun H, Niisato N, Nishio K, Hamilton K, Marunaka Y. Distinct action of flavonoids, myricetin and quercetin, on epithelial Cl⁻ secretion: useful tools as regulators of Cl⁻ secretion. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 902735.

論文提出者 近 藤 裕

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 甲第1533号
 学位授与の日付 平成27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 高松哲郎・教授 松田 修・教授 加藤則人

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Kondo Y, Murayama Y, Konishi H, Morimura R, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Sakakura C, Takahashi K, Inoue K, Nakajima M, Otsuji E.

Fluorescent Detection of Peritoneal Metastasis in Human Colorectal Cancer Using 5-aminolevulinic Acid

International Journal of Oncology 2014; 45: 41-46.

審 査 結 果 の 要 旨

大腸癌腹膜播種の診断は治療方針決定に不可欠であるが、微小病変の診断は困難である。術中所見でも診断不可能な場合がしばしば存在し、新たな診断法の開発が望まれている。5-アミノレブリン酸(5-ALA)は癌患者に投与すると腫瘍特異的にプロトポルフィリンIX(PpIX)が蓄積する事が知られている。PpIXは波長405nmの青色光を照射する事で励起され、波長635nmにピークを有する赤色蛍光を呈する性質があり、脳神経外科や泌尿器科領域に於いて光線力学診断(PDD)に臨床利用されている。しかし、5-ALAを用いた大腸癌腹膜播種に対するPDDの報告は無い。

申請者は、BALB/c nude mouseを用い、EGFP導入ヒト大腸癌細胞株HT-29腹膜播種モデルを作製し大

腸癌腹膜播種に対するPDDにつき検討した。5-ALA hydrochloride 250 mg/kgを腹腔内投与4時間後に開腹すると、EGFP蛍光陽性な腹膜播種結節にPpIX由来と考えられる赤色蛍光を認めた。この結果を元に、2011年3月から2013年3月の間、術前に漿膜浸潤が疑われた大腸癌患者、男性9名、女性3名(39~84歳)を対象とし試験を実施した。5-ALA hydrochloride 15~20 mg/kg、最大用量1 g/bodyを手術3時間前に経口投与し、蛍光腹腔鏡にて術中観察を行った。白色光観察にて同定した全ての腹膜播種巣で蛍光観察にて赤色蛍光を認め、全症例で病理学的に腹膜播種陽性である事を確認した。1例に於いては、白色光観察にて同定困難であった微小平坦病変を蛍光観察にて容易に同定し得た。また、蛍光腹腔鏡画像

データを解析する事により、腹膜播種結節では非転移部である腹壁、腸管壁、脂肪織、肝表面に比して「赤色値/(赤色値+緑色値+青色値)」が有意に高値である事を認めた。これは PpIX 由来赤色蛍光強度の指標としての赤色値を、明るさ等の画像条件差で補正した値と考えられる。5-ALA 光線力学診断法は観測者の主観に依るところがあるが、本法を用いる事で定量診断が可能となる。5-ALA を用いた光線力学診断は低侵襲かつ簡素な検査機器にて検出可能である利点を有する。本研究では、白色光下で視認不可能な微小平坦病変が診断可能となる事で、大腸癌腹膜播種の診断精度向上に繋がると考えられた。5-ALA を用いた光線力学診断は、生検を行わずとも術中リアルタイムに腹膜播種診断が可能となり、病巣の完全摘除の助けになると考えられる。

以上が本論文の要旨であるが、5-ALA を用いた光線力

学診断は従来の腹腔鏡観察に比してより良好な大腸癌腹膜播種診断精度を有する事を明らかにした点で、医学上価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (2 編)

- 1) 北川真希, 小黒 厚, 近藤 裕, 高利 守, 山崎純也, 南里正明, 中川 登. 多発骨転移に播種性血管内凝固を合併し CDDP + CPT-11 併用療法が奏功した S-1 耐性胃癌の 1 例. 癌と治療 2010; 37: 165-168.
- 2) Kitagawa M, Koh T, Nakagawa N, Kondo Y, Nishio M, Oguro A, Sakakura C, Nanri M, Otsuji E. Gastrointestinal stromal tumor in a patient with neurofibromatosis: abscess formation in the tumor leading to bacteremia and seizure. Gastroenterology 2010; 4: 435-442.

論文提出者 平 島 相 治

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1534 号
学位授与の日付	平成 27 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 松田 修・教授 加藤則人・教授 奥田 司

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Hirajima S, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Tsujiura M, Nagata H, Kawaguchi T, Arita T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E.

Clinical Impact of Circulating miR-18a in Plasma of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

British Journal of Cancer 2013; 108: 1822-1829.

審 査 結 果 の 要 旨

機能性の短鎖型 non-coding RNA である micro RNA (miRNA) は、標的遺伝子の mRNA の 3' 末端の非翻訳領域に結合して mRNA の分解や転写の抑制を行うことで全遺伝子の約 30% の発現調節に関わり、様々な生命現象の維持に深く関与している。一方でその発現異常は多くのヒトの疾患で検出され、疾患の病態形成にも深く関与しており、特に癌の発症、進展において極めて重要な役割を果たすことが明らかとなっている。また近年 miRNA は、細胞外の血液、尿、唾液、母乳等の体液中でも比較的安定して存在することが明らかとなっている。その機序としてアポトーシスやネクロトーシス等の細胞崩壊により体液中へ放出されるのみならず、Argonaute 2 や HDL

等の蛋白と結合し、あるいはエキソソーム等の vesicle に封入されて血中をはじめ体液中で極めて高い安定性を獲得していることが明らかとなっている。

申請者は以上の背景から、食道扁平上皮癌患者血漿中の癌特異的な miRNA を探索し、新規バイオマーカーを同定することを目的として解析した。様々な癌種で潜在的に癌遺伝子的に働くと報告されている miR-17-92 cluster 内の 7 種類の miRNA に注目し、食道癌では報告のない miR-18a を解析対象とした。まず食道癌組織と食道癌細胞株において、それぞれ正常食道組織及び線維芽細胞株よりも miR-18a が高発現していることを確認した。さらに食道癌患者 106 例と健常人 54 例の血漿中の miR-

18a 濃度を quantitative RT-PCR を用いて、食道癌患者血漿で miR-18a 濃度が高値であることを明らかにした。さらに腫瘍の切除を行った 8 例について、切除前と切除 1 ヶ月後の血漿中の miR-18a 濃度を比較すると、術後に有意に低下するという結果を得た。また再発時において、術後で一度正常範囲内まで低下した miR-18a 濃度が再上昇した代表症例も認めた。miRNA は、血中で極めて安定していることと、癌組織特異性の高い miRNA が明らかであるため、血漿中の新たなバイオマーカーが同定できる可能性が高い。既に前立腺癌、悪性リンパ腫、口腔癌、膵癌、肺癌、舌癌、卵巣癌、大腸癌、乳癌、胃癌、食道癌、肝癌で報告されているが、報告済みの血中の癌特異的 miRNA で実地臨床に応用可能な感度や特異度をもつ miRNA は未だ少ない。今回食道扁平上皮癌において、癌存在診断において極めて感度、特異度が高く、また、モニタリング診断においても極めて有用と考えられる新規の血中バイオマーカー miR-18a を同定したことは極めて意義深く、将来実地臨床に寄与する可能性は高いと考えられる。

以上が本論文の要旨であり、食道扁平上皮癌患者における血漿中 microRNA の測定による癌の存在診断の有

性を明らかにした点で、医学上価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (3 編)

- 1) Hirajima S, Komatsu S, Ichikawa D, Kubota T, Okamoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, Ikoma H, Otsuji E. Liver metastasis is the only independent prognostic factor in AFP-producing gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6055-61.
- 2) Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Yagi N, Otsuji E. Plasma microRNA profiles: identification of miR-25 as a novel diagnostic and monitoring biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2014; 111: 1614-24.
- 3) Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, Morimura R, Tsujiura M, Konishi H, Takeshita H, Nagata H, Arita T, Hirajima S, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Taniguchi H, Otsuji E. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013; 108: 361-9.

論文提出者 川 口 耕

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第 1535 号
学位授与の日付	平成 27 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 加藤則人・教授 松田 修・教授 奥田 司

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, Morimura R, Tsujiura M, Konishi H, Takeshita H, Nagata H, Arita T, Hirajima S, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Taniguchi H, Otsuji E.

Clinical Impact of Circulating miR-221 in Plasma of Patients with Pancreatic Cancer

British Journal of Cancer 2013; 108: 361-369.

審 査 結 果 の 要 旨

膵癌は 5 年生存率が 5% 以下の極めて予後不良な難治性の癌であり、既存の画像診断による正確な進行度診断が困難であり開腹所見で非切除因子が同定される症例や術後早期に遠隔転移再発を来す症例が少なからず存在する。しかし、膵癌の悪性度や病期診断の指標となる臨床応用可能なバイオマーカーは未だ同定されていない。そこでヒトゲノムでは 4000 種類以上同定されている短鎖

型 non-coding RNA である microRNA に注目した。MicroRNA は転写・翻訳レベルで様々な遺伝子発現を制御し、また最近では microRNA は循環血液中中でエクソソームなどのマイクロベジクルに封入され、或いは、Ago2, HDL に代表される血中のタンパク質と結合して安定した状態で存在することも明らかとなっている。われわれは、胃癌・食道癌・膵癌等の消化器癌患者血漿中

での腫瘍由来の遊離 microRNA の定量的解析が安定して可能であることを報告してきた。

申請者はこれまで蓄積してきたバイオリソース、解析技術を基盤に、特に膀胱癌血中の新規バイオマーカー候補として、癌関連 microRNA としての報告がある癌遺伝子型 microRNA-221 (miR-221) に注目した。まず、14 症例の膀胱癌切除組織、6 種類の膀胱癌細胞株で正常膀胱組織に比べて miR-221 が有意に高発現していることを確認した。次に膀胱癌治療患者 47 症例と健常人 30 例の血漿中の miR-221 の RT-PCR 法による定量的発現解析を行い、膀胱癌患者血漿中の miR-221 濃度は健常人と比べ有意に高値であることを明らかにした。同時に、膀胱癌組織中で低発現との報告がある癌抑制遺伝子型 miR-375 の膀胱癌患者血漿中濃度を測定し、膀胱癌患者血漿中の miR-375 濃度は健常人と比較し低い傾向であることを明らかにした。さらに miR-221/miR-375 比を併用することで、膀胱癌患者 miR-221/miR-375 比は健常人のそれと比較し有意に高値であり膀胱癌存在診断マーカーとして有用である可能性を明らかにした。また膀胱癌組織中と血漿中での miR-221 発現の相関解析ならびに術前後の血漿中 miR-221 発現変化の解析により血漿中 miR-221 発現が腫瘍動態を反映している可能性を明らかにした。臨床病理学的因子との相関解析では、術前血漿中 miR-221 高濃度症例で有意に遠隔転移、肉眼的非治癒切除症例が多かった。以上の結果より、膀胱癌患者血漿中の miR-221 は、遠隔転移の有無、切除の可否予測を非侵襲的に可能とし、予後不良な膀胱癌患者の治療方針決定に寄与し得る次世代のバイオマーカーとして有望であると考えられた。

以上が本論文の要旨であるが、血漿中 miR-221 濃度が膀胱癌の存在診断のみならず腫瘍動態や悪性度を予測する低侵襲マーカーとして有望である可能性を世界で初めて明らかにした点で、医学上価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (10 編)

- 1) Kawaguchi T, Ochiai T, Ikoma H, Inoue K, Morimura R, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Nakanishi M, Ichikawa D, Okamoto K, Fujiwara H, Kokuba Y, Sonoyama T, Otsuji E. Prognostic impact of histological blood vessel invasion in patients with ampullary adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 1347-1350.
- 2) Kawaguchi T, Ichikawa D, Komatsu S, Okamoto K, Murayama Y, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Fujiwara H, Ochiai T, Kokuba Y, Sonoyama T, Nishimura T, Otsuji E. Clinical evaluation of JCGC and TNM staging on multidetector-row computed tomography in preoperative nodal staging of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 838-841.
- 3) Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, Okamoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ochiai T, Kokuba Y, Nishimura T, Otsuji E. Nodal counts on MDCT as a surrogate marker for surgical curability in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2465-2470.
- 4) Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Konishi H, Nagata H, Hirajima S, Kawaguchi T, Arita T, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12Suppl 1: S53-59.
- 5) Kashimoto K, Komatsu S, Ichikawa D, Arita T, Konishi H, Nagata H, Takeshita H, Nishimura Y, Hirajima S, Kawaguchi T, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Otsuji E. Overexpression of TRIM44 contributes to malignant outcome in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2012; 103: 2021-2026.
- 6) Komatsu S, Ichikawa D, Tsujiura M, Konishi H, Takeshita H, Nagata H, Kawaguchi T, Hirajima S, Arita T, Shiozaki A, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Prognostic impact of circulating miR-21 in the plasma of patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2013; 33: 271-276.
- 7) Hirajima S, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Tsujiura M, Nagata H, Kawaguchi T, Arita T, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Clinical impact of circulating miR-18a in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 14: 108: 1822-1829.
- 8) Nishimura Y, Komatsu S, Ichikawa D, Nagata H, Hirajima S, Takeshita H, Kawaguchi T, Arita T, Konishi H, Kashimoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Otsuji E. Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 2; 108: 1324-1331.
- 9) Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, Kubota T, Okamoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, Morimura R, Murayama Y, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Sakakura C, Otsuji E. Comparison of prognostic compatibility between seventh AJCC/TNM of the esophagus and 14 th JCGC staging systems in sievert type II adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2013; 33: 3461-3465.
- 10) Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Shoda K, Kawaguchi T, Hirajima S, Nagata H, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric

cancer. Anticancer Res 2013; 33: 3185-3193.

論文提出者 祐 成 毅

学位の種類 博士 (医学)
 学位記の番号 甲第 1536 号
 学位授与の日付 平成 27 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 奥田 司・教授 八木田和弘・教授 渡邊能行

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Sukenari T, Horii M, Ikoma K, Kido M, Hayashi S, Hara Y, Yamasaki T, Matsuda KI, Kawata M, Kubo T.
**Cortical Bone Water Changes in Ovariectomized Rats During the Early Postoperative Period:
 Objective Evaluation Using Sweep Imaging with Fourier Transform**
 Journal of Magnetic Resonance Imaging 2015; 42: 128-135.

審 査 結 果 の 要 旨

骨粗鬆症では高い骨密度でも骨折を生じることがあり、骨質の評価も重要である。磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI と略) において、骨組織からの信号を検出するために ultra-short echo time imaging や sweep imaging with Fourier transform (SWIFT と略) が発展しており ultra-short echo time imaging を用いた皮質骨内の水分測定が骨質の評価に有用であるとの報告がある。本研究の目的は、卵巣摘出術 (ovariectomy: OVX と略) を行ったラットの術後早期における脛骨を用いて、MRI で測定した皮質骨の信号雑音比 (signal-to-noise ratio: SNR と略) の変化と組織像の関係を解明し、SWIFT を用いた骨粗鬆症の早期診断に対する可能性を検討することである。

申請者は、動物として 12 週齢の雌性 Sprague-Dawley ラットを用いた。偽手術 (Sham 群) および卵巣摘出術 (OVX 群) を行い、術後 2, 4, 8 および 12 週で脛骨を摘出した。プロトン密度強調画像 (proton density-weighted image: PDWI と略) および SWIFT による MR 画像を撮像し、脛骨近位 1/3 の横断像で皮質骨の SNR を算出した。二重エネルギー X 線吸収測定法 (dual-energy X-ray absorptiometry: DEXA と略) で脛骨全体の骨密度を、マイクロコンピュータ断層撮影で脛骨の皮質骨骨密度を測定した。組織により皮質骨孔領域および新生骨領域の全皮質骨領域に対する割合を算出した。

皮質骨の SNR は、PDWI では Sham 群と OVX 群の間で有意差を認めず、SWIFT では術後 8, 12 週の OVX 群で Sham 群より有意に高かった。脛骨全体の骨密度およ

び皮質骨骨密度は全ての術後週数において OVX 群で Sham 群より有意に低下していた。皮質骨骨密度と SWIFT による皮質骨の SNR (SWIFT-SNR と略) は弱い正の相関を認めた。皮質骨孔領域は両群で経時的に減少した。新生骨領域は、術後 8, 12 週の OVX 群で Sham 群より有意に大きく、SWIFT-SNR と正の相関を示した。

本研究において DEXA で OVX 群における骨密度の低下を確認したが、DEXA では骨質や皮質骨単独の評価はできない。皮質骨骨密度と SWIFT-SNR との相関が弱かったことから、SWIFT-SNR が皮質骨骨密度以外の要素も反映している可能性がある。SWIFT は自由水だけでなく結合水も検出可能である。MRI による皮質骨の SNR の結果、皮質骨孔領域の経時的な減少および新生骨領域の OVX 群での増大と SWIFT-SNR との正の相関結果は、OVX ラットの皮質骨内で結合水が増加している可能性を示す。今回の結合水の増加はコラーゲンやヒドロキシアパタイトの構造変化を表し、皮質骨骨質の早期変化を捉えている可能性がある。

以上が本論文の要旨であるが、SWIFT を用いた MRI における皮質骨の SNR の測定が、骨粗鬆症を早期に診断する方法として臨床応用につなが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 (10 編)

- 1) Hara Y, Ikoma K, Kido M, Sukenari T, Arai Y, Fujiwara H, Kawata M, Kubo T. Diffusion tensor imaging assesses triceps surae dysfunction after Achilles

- tenotomy in rats. *J Magn Reson Imaging* 2015; 41: 1541-1548.
- 2) Kida Y, Morihara T, Kotoura Y, Hojo T, Tachiiri H, Sukenari T, Iwata Y, Furukawa R, Oda R, Arai Y, Fujiwara H, Kubo T. Prevalence and clinical characteristics of osteochondritis dissecans of the humeral capitellum among adolescent baseball players. *Am J Sports Med* 2014; Jun 18pii 0363: 546514-536843.
- 3) Furukawa R, Morihara T, Arai Y, Ito H, Kida Y, Sukenari T, Horii M, Ikoma K, Fujiwara H, Kubo T. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging for subscapularis tendon tears using radial-slice magnetic resonance images. *J Shoulder Elbow Surg* 2014; 23: e-283-290.
- 4) 小椋明子, 森原 徹, 祐成 毅, 古川龍平, 堀井基行, 久保俊一, 黒川正夫. 3.0T放射状MRIによる肩関節唇の評価. *肩関節* 2013; 37: 465-468.
- 5) 森原 徹, 本多宏明, 堀井基行, 古川龍平, 木田圭重, 小椋明子, 祐成 毅, 大久保直輝, 藤原浩芳, 久保俊一. 3.0T放射状MRIを用いた肩腱板断裂範囲の評価法. *肩関節* 2013; 37: 965-970.
- 6) 堀井基行, 森原 徹, 池田 巧, 祐成 毅, 久保俊一. 整形外科 innovation とリハビリテーション医学への提言 大腿骨近位部骨折と健康寿命. *Jpn J Rehabil Med* 2013; 50: 819-825.
- 7) 木田圭重, 森原 徹, 祐成 毅, 藤原浩芳, 堀井基行, 久保俊一, 立入久和, 岩田圭生, 黒川正夫. 母床からの骨髄由来細胞は腱板修復部に移動する. *肩関節* 2012; 36: 515-522.
- 8) 祐成 毅, 森原 徹, 小椋明子, 立入久和, 堀井基行, 久保俊一, 平田正純, 黒川正夫. 腱板大・広範囲断裂に対する Debye-Patte 変法の腱板前進長評価. *肩関節* 2012; 36: 965-968.
- 9) 森原 徹, 堀井基行, 岩田圭生, 立入久和, 木田圭重, 古川龍平, 祐成 毅, 久保俊一, 黒川正夫. 放射線MRI撮像を用いた肩関節前方関節唇の評価. *肩関節* 2012; 36: 821-823.
- 10) 立入久和, 森原 徹, 仲川春彦, 木田圭重, 祐成 毅, 堀井基行, 久保俊一, 三浦雄一郎, 福島秀晃, 黒川正夫. 肩すくめ動作における棘上筋・棘下筋の筋活動. *肩関節* 2011; 35: 719-722.

論文提出者 林 成 樹

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 甲第1537号
 学位授与の日付 平成27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 田尻達郎・教授 奥田 司・教授 渡邊能行

論文題目及び掲載誌

Hayashi S, Fujioka M, Ikoma K, Saito M, Ueshima K, Ishida M, Kuribayashi M, Ikegami A, Mazda O, Kubo T.
Evaluation of Femoral Perfusion in a Rabbit Model of Steroid-induced Osteonecrosis by Dynamic Contrast-Enhanced MRI with a High Magnetic Field MRI System
Journal of Magnetic Resonance Imaging 2015; 41: 935-940.

審査結果の要旨

ステロイド性大腿骨頭壊死症はステロイドの全身投与後に大腿骨頭が阻血性壊死に陥る難治性疾患である。股関節機能の障害により生活の質が著しく低下することが多い。各種の疾患治療の目的でステロイドを使用した後に大腿骨頭壊死症を発症する患者が存在するため、病態の解明および予防法の開発が続けられている。ステロイド性骨壊死の主たる病因はステロイド投与後に生じる骨

内の循環障害である。家兎ステロイド性骨壊死モデルを用いた研究で骨内の阻血につながる変化はステロイド投与後早期であると推察されているが、骨内の血行動態は明らかになっていない。このような背景から高磁場磁気共鳴画像(magnetic resonance imaging; MRIと略)装置を用いたdynamic contrast-enhanced MRI(DCE-MRIと略)でステロイド投与後早期の大腿骨内の血流を評価す

ることを目的とした。

申請者は、28週齢以上の雄性日本白色家兎9羽を対象とした。殿筋内に酢酸メチルプレドニゾロン 20 mg/kg を単回投与し、家兎ステロイド性骨壊死モデルを作製した。吸入麻酔下に7.04Tの高磁場MRI装置を用いて骨壊死好発部位である両大腿骨近位部のDCE-MRIを撮像した。撮像時期はステロイド投与前、ステロイド投与後1, 5, 10および14日目とした。Spoiled gradient echo法を用いたT1強調画像を40回連続で撮像した。10回目の撮像終了後に造影剤を急速に静脈内投与した。骨壊死好発部位に関心領域を設定し、信号強度を測定した。測定した信号強度をもとにenhancement ratio (ERと略)、initial slope (ISと略)、およびarea under the curve (AUCと略)を算出し、統計学的に比較した。

大腿骨内の骨壊死好発部位におけるステロイド投与後のER, ISおよびAUCの値はステロイド投与前と比較して有意に低下した (ER: $P < 0.05$, IS: $P < 0.01$, AUC: $P < 0.05$)。ステロイド投与後1日目に5大腿骨でER, ISおよびAUCの値すべてが低下し、5日目までに半数以上の大腿骨で3つの値いずれも低下した。

骨壊死好発部位において、3つの変数ともに有意に低下したため、血流が低下していると考えた。ステロイド投与後1日目から血流が低下している大腿骨があり、血流低下の時期は早期から生じている可能性がある。家兎ステロイド性骨壊死モデルを用いた研究でステロイド投与後3から5日目の早期において骨内に血管内皮細胞増殖因子の発現やデオキシリボ核酸の酸化障害が生じていることが明らかにされている。本研究の結果から血管内

皮細胞増殖因子の発現やデオキシリボ核酸の酸化障害が生じる時期に骨内の血行動態も変化している可能性を示した。

以上が本論文の要旨であるが、家兎ステロイド性骨壊死モデルに対して血行動態を*in vivo*で評価し、ステロイド投与後早期から骨内の血流が低下していることを示した点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (4編)

- 1) Sukenari T, Horii M, Ikoma K, Kido M, Hayashi S, Hara Y, Yamasaki T, Matsuda KI, Kawata M, Kubo T. Cortical bone water changes in ovariectomized rats during the early postoperative period: objective evaluation using sweep imaging with fourier transform. *J Magn Reson Imaging* 2015; 42: 128-135.
- 2) 林 成樹, 藤岡幹浩, 上島圭一郎, 齊藤正純, 齋木大器, 池上 徹, 久保俊一. 大径骨頭を用いた metal on metal THA 術後早期に骨溶解を生じた一例. *日人工関節会誌* 2013; 43: 655-656.
- 3) 池上 徹, 藤岡幹浩, 齊藤正純, 鎌田陽一郎, 林成樹, 上島圭一郎, 久保俊一. Groin pain のために FHR から THA に再置換した症例における寛骨臼軟骨の組織学的評価. *Hip Joint* 2013; 39: 1033-1037.
- 4) 佐藤史英, 藤岡幹浩, 上島圭一郎, 齊藤正純, 林成樹, 久保俊一. 人工股関節全置換術を施行するにあたり三次元光造形モデルが有用であった強直股関節の2例. *Hip Joint* 2012; 38: 1050-1054.

論文提出者 山 崎 哲 朗

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1538号
学位授与の日付	平成27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 奥田 司・教授 池谷 博・教授 八木田和弘

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Yamasaki T, Fujiwara H, Oda R, Mikami Y, Ikeda T, Nagae M, Shirai T, Morisaki M, Ikoma K, Masugi-Tokita M, Yamada K, Kawata M, Kubo T.

***In vivo* Evaluation of Rabbit Sciatic Nerve Regeneration with Diffusion Tensor Imaging (DTI): Correlations with Histology and Behavior**
Magnetic Resonance Imaging 2015; 33: 95-101.

審査結果の要旨

末梢神経損傷は外傷や炎症で生じる、臨床現場で遭遇する頻度の高い疾患である。治療法の選択のためには、神経損傷の部位と程度を正確に診断することが不可欠である。拡散テンソル法 (diffusion tensor imaging; DTI と略) は、磁気共鳴画像法の撮像手法である。DTI は水分子の拡散異方性を定量的に解析することで、組織の配向性を画像化できる。本研究の目的は、ヒトへの臨床応用に向けて、中動物である家兎の坐骨神経損傷モデルを用い、DTI による末梢神経損傷および再生の評価の有用性を検証することである。

申請者は、日本白色家兎の右側坐骨神経を結紮し圧挫損傷モデルを作成した。高磁 MRI 装置 (7.04 T) を用いて神経損傷前および損傷後 2, 4, 6, 8 週に坐骨神経を DTI で撮像した。得られた画像から坐骨神経の fractional anisotropy (FA と略), λ_{\parallel} および λ_{\perp} を算出し、経時的変化を検討した。組織学的評価のために坐骨神経損傷前および損傷後 2, 4, 6, 8 週に右坐骨神経を摘出し、切片を作製して軸索数および髄鞘化軸索面積率を計測した。坐骨神経損傷前および損傷後 2, 4, 6, 8 週に toe-spreading index (TSI と略) を用いて運動機能を測定した。

FA はコントロールと比して坐骨神経損傷後 2, 4 週で有意に低下した。4 週以降は徐々に上昇し、損傷後 6 週ではコントロールと有意差はなかった。 λ_{\perp} は損傷後 2 週に有意に上昇した。その後速やかに低下し、損傷後 4 週ではコントロールと有意差がなかった。 λ_{\parallel} は有意差がなかった。坐骨神経損傷後の組織学的検討では、軸索数、髄鞘化軸索面積率ともに損傷後 2 週で有意に低下し、その後回復する傾向があった。損傷後 8 週で軸索数は損傷前と有意差がない値に回復した。FA は軸索数、髄鞘化軸索面積率と有意に相関していた。 λ_{\perp} は髄鞘化軸索面積率と相関していた。TSI を用いた運動機能評価は神経損傷後 6 週以降に回復する傾向を示した。FA は TSI と有意に相関していた。

本研究結果では、坐骨神経損傷後の FA および λ_{\perp} の変化は組織学的変化と相関していた。これらの結果、ラットを用いて行った研究結果と一致しており、個体の種や

大きさによらず DTI を用いて末梢神経損傷および再生を評価できることを示した。さらに、FA は運動機能評価とも強い相関があり、末梢神経損傷後の神経機能回復の指標となる可能性を示した。

以上が本論文の要旨であるが、DTI は末梢神経損傷後の回復過程を非侵襲的、客観的、定量的に評価できる有用な評価法であることを証明した点で、医学上価値ある研究と認める。

参考論文 (5 編)

- 1) Sukenari T, Horii M, Ikoma K, Kido M, Hayashi S, Hara Y, Yamasaki T, Matsuda KI, Kawata M, Kubo T. Cortical bone water changes in ovariectomized rats during the early postoperative period: objective evaluation using sweep imaging with Fourier transform. *J Magn Reson Imaging*. 2015; 42: 128-135.
- 2) Taniguchi D, Tokunaga D, Oda R, Fujiwara H, Ikeda T, Ikoma K, Kishida A, Yamasaki T, Kawahito Y, Seno T, Ito H, Kubo T. Maximum intensity projection with magnetic resonance imaging for evaluating synovitis of the hand in rheumatoid arthritis: comparison with clinical and ultrasound findings. *Clin Rheumatol* 2014; 33: 911-917.
- 3) 山崎哲朗, 池田 巧, 上島圭一郎, 三上靖夫, 長谷 齊, 久保秀一, 久保俊一. 変形性股関節症を伴う頸椎病変による下肢痙縮に対しバクロフェン髄腔内療法を行い歩行能力の向上が得られた 1 例. *中部整災会誌* 2012; 55: 461-464.
- 4) 森崎真介, 小田 良, 藤原浩芳, 岸田愛子, 山崎哲朗, 久保俊一. 末梢神経再生における拡散テンソル法の有用性に関する検討. *日手外科会誌* 2012; 28: 350-352.
- 5) 山崎哲朗, 中村文紀, 田久保興徳, 山田哲也, 西垣泰典, 竹下秀之. 大腿骨人工骨頭置換術後の歩行機能に与える年齢および認知症の影響. *滋賀医* 2010; 32: 48-51.

論文提出者 原 佑 輔

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 甲第1539号
 学位授与の日付 平成27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 伊藤義人・教授 渡邊能行

論文題目及び掲載誌

Hara Y, Ikoma K, Kido M, Sukenari T, Arai Y, Fujiwara H, Kawata M, Kubo T.

Diffusion Tensor Imaging Assesses Triceps Surae Dysfunction after Achilles Tenotomy in Rats

Journal of Magnetic Resonance Imaging 2015; 41: 1541-1548.

審査結果の要旨

アキレス腱断裂は、日常診療で遭遇する頻度の高い外傷であるが、下腿三頭筋の機能低下が問題となる。骨格筋の機能評価には徒手筋力検査や機器による筋力測定が用いられる。しかし受傷後急性期に筋力測定を行うと腱の修復に影響を与えるため、骨格筋の機能を定量的に評価できる画像法が必要である。一方、磁気共鳴画像法の中で拡散テンソル法 (diffusion tensor imaging: DTI と略) は、水分子の拡散異方性を定量的に解析することができる撮像法である。DTI は異方性の高い線維性の組織において、病理学的変化に伴う異方性の乱れを非侵襲的に画像化できる。筋組織は高い異方性を有していることから、近年筋組織における微小内部構造の変化や病態の評価に利用されている。骨格筋機能は筋組織の微小内部構造に依存するため、DTI は骨格筋機能を反映する可能性がある。以上の背景から、DTI と骨格筋機能との関連を解析した。

申請者は、下腿三頭筋機能不全モデルとして、アキレス腱切離術を右後肢に施行した12週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した。高磁場磁気共鳴装置 (7.04T) を用いて切離術前、切離術後2週および4週に下腿三頭筋の磁気共鳴画像を撮像した。下腿三頭筋筋腹を関心領域に設定し、関心領域のDTIパラメータである λ_1 、 λ_2 、 λ_3 およびfractional anisotropyを算出した。組織学的検討として、下腿三頭筋筋腹の凍結切片を作製した。筋機能評価として、切離術後に足関節底屈力を測定した。形態評価のために下腿三頭筋の筋腹長軸長および横断面積を算出した。DTIパラメータ、機能測定および形態計測の結果を経時的に解析した。DTIパラメータと機能および形態評価の経時変化を統計学的に比較検討した。

DTIパラメータである λ_1 、 λ_2 および λ_3 は切離術後低下し、fractional anisotropyは増加した。筋束の境界は不

明瞭となり筋束間は開大した。切離術後に足関節底屈力は低下し、下腿三頭筋筋腹長軸長は短縮し、横断面積は減少した。DTIパラメータと運動機能において、 λ_1 と底屈力に相関を認めた。形態計測の結果、 λ_1 と下腿三頭筋筋腹長軸長が相関した。

申請者は切離術後に筋萎縮の所見に加え、腱の伸長および筋腹長軸長の短縮を確認した。DTIパラメータの中で λ_1 と骨格筋機能が強く相関し、 λ_1 は筋腹長軸長の変化とも相関していた。 λ_1 の低下は下腿三頭筋筋腹長軸長の短縮による異方性の低下を示し、骨格筋機能低下の主要素であると考えた。 λ_1 は切離術後の骨格筋機能を定量的に評価できるパラメータであり、DTIは骨格筋機能評価の指標となる可能性を示した。

以上が本論文の要旨であるが、DTIがアキレス腱切離術後の下腿三頭筋機能不全に対して有用であり、骨格筋機能を評価できる画像法となることを示した点で、医学上価値ある研究と認める。

参考論文 (10編)

- 1) Hara Y, Ikoma K, Arai Y, Ohashi S, Maki M, Kubo T. Alternation of hindfoot alignment after total knee arthroplasty using a novel hindfoot alignment view. J Arthroplasty 2015; 30: 126-129.
- 2) Imai K, Ikoma K, Imai R, Fujiwara H, Kido M, Hara Y, Ono T, Kubo T. Tarsal tunnel syndrome in hemodialysis patients: a case series. Foot Ankle Int 2013; 34: 439-444.
- 3) Ikoma K, Noguchi M, Nagasawa K, Maki M, Kido M, Hara Y, Kubo T. A new radiographic view of the hindfoot. J Foot Ankle Res 2013; 6: 1-5.
- 4) Kido M, Ikoma K, Hara Y, Matsuda K, Kawata M,

- Umeda M, Kubo T. Selective visualization of rabbit knee cartilage using MR imaging with a double-contrast agent. *J Magn Reson Imaging* 2014; 39: 1186-1190.
- 5) Sukenari T, Horii M, Ikoma K, Kido M, Hayashi S, Hara Y, Yamasaki T, Matsuda KI, Kawata M, Kubo T. Cortical bone water changes in ovariectomized rats during the early postoperative period: objective evaluation using sweep imaging with Fourier transform. *J Magn Reson Imaging* 2015; 42: 128-135.
- 6) 原 佑輔, 徳永大作, 新井祐志, 小田 良, 寺内竜, 久保俊一. 再置換の要した人工膝関節全置換術後脱臼の1例. *整形外科* 2014; 4: 333-335.
- 7) 生駒和也, 牧 昌弘, 今井 寛, 城戸優充, 原 佑輔, 久保俊一, 北篠達也. 足関節後方インピンジメン
- ト症候群に対する鏡視下手術の治療経験. *日足の外科会誌* 2013; 34: 41-46.
- 8) 牧 昌弘, 生駒和也, 今井 寛, 城戸優充, 原 佑輔, 久保俊一, 盛房周平. 変形性足関節症に対して行った鏡視下足関節固定術の治療成績. *日足の外科会誌* 2013; 34: 181-184.
- 9) 牧 昌弘, 生駒和也, 盛房周平, 今井 寛, 城戸優充, 原 佑輔, 久保俊一. 足底腱膜炎におけるMR画像所見. *日足の外科会誌* 2014; 35: 205-207.
- 10) 大橋鈴世, 生駒和也, 牧 昌弘, 今井 寛, 城戸優充, 原 佑輔, 久保俊一. 下肢内旋変形に伴った一次性変形性Lisfranc関節症の2例. *日足の外科会誌* 2014; 35: 293-296.

論文提出者 萩 寛 志

学位の種類 博士 (医学)
 学位記の番号 甲第 1540 号
 学位授与の日付 平成 27 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 水野敏樹・教授 福居顯二

論文題目及び掲載誌

Ogi H, Itoh K, Fushiki S.

**Social Behavior is Perturbed in Mice after Exposure to Bisphenol A:
 a Novel Assessment Employing an IntelliCage**
Brain and Behavior 2013; 3: 223-228.

審査結果の要旨

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネートやエポキシ樹脂製造に使用される化学物質であり、日常的にヒトは BPA に曝露されている。近年、発達障害児童の増加と環境化学物質曝露との関連が指摘され、疫学調査でヒト妊娠中期母体尿中 BPA 濃度と出生児童の精神・情緒面での問題行動との間に相関が示されているものの、その科学的根拠は不十分である。

申請者は、胎生期・授乳期の BPA 曝露が社会行動にどのような影響を与えるかを明らかにするために、自然な行動表現型を集団生活下に計測できる装置 IntelliCage を用いて、BPA 曝露によるマウスの行動変化を解析した。C57BL/6J 妊娠マウスを対象に、BPA 曝露群 (BPA 群) には 0.01% エタノールに溶かした BPA 500 µg/kg 体重 (最大無毒性量 NOAEL の 100 分の 1) を、vehicle 対照群に

は同量のエタノールを、胎齢 0.5 日から生後 3 週まで 1 日 1 回栄養チューブにより経口投与した。生後 11 週 (雌) あるいは生後 13 週 (雄) に、対照群として 2 出生仔集団 (複数の母獣からの雌雄各々 n=8 を 2 組)、BPA 群として 1 出生仔集団 (複数の母獣からの雌雄各々 n=8 を 1 組) を設け、IntelliCage による行動実験を行った。セッションは、3 日間の適応期間とその後 12.5 日間のノーズポークセッション (NP1) で構成した。適応期間にはドアは常時開き自由に飲水可能であるが、NP1 ではドアは閉じ飲水のためにノーズポーク 1 回が必要となる。解析は、活動量、嗜好性、社会性に関連する複数指標を、暗期/明期、飲水あり (報酬あり)/飲水なし (報酬なし) の区分に分け、主に BPA 群と対照群間で比較評価を行った。BPA 群雌は、明期の非飲水区分および総合 (飲水+

非飲水)の訪問回数が有意に少なかった。BPA 群雄は、暗期の飲水を伴う訪問以外全ての区分でコーナー滞在時間が有意に長かった。このことから、BPA 曝露は、雌で非活動期の必須でない活動を抑制し、雄で報酬獲得場所への嗜好性を増強することが示唆された。他個体への追従性を表す指標では、BPA 群雄は、全区分を総合した場合と飲水を伴う訪問について有意に低値を示し、BPA 群雄は報酬関連行動に関して、他個体の影響をより受けやすいことを示唆した。

以上が本論文の要旨であるが、胎生期・授乳期の BPA 曝露が報酬行動や他個体からの影響などマウスの社会行動に性差をもって影響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 (4 編)

1) Tando S, Itoh K, Yaoi T, Ogi H, Goto S, Mori M, Fushiki S. Bisphenol A exposure disrupts the

development of the locus coeruleus-noradrenergic system in mice. *Neuropathology* 2014; 34: 527-534.

2) Itoh K, Ogi H, Yaoi T, Yoshifuji K, Pooh R, Yamasaki M, Fushiki S. Semilobar holoprosencephaly with a unique traversed sylvian sulcus. *Neuropathology Appl Neurobiol* 2011; 37: 685-688.

3) Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 563-567.

4) Fujimori A, Yaoi T, Ogi H, Wang B, Suetomi K, Sekine E, Yu D, Kato T, Takahashi S, Okayasu R, Itoh K, Fushiki S. Ionizing radiation downregulates ASPM, a gene responsible for microcephaly in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 953-957.

論文提出者 名 幸 義 仁

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第 1541 号
学位授与の日付	平成 27 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 奥田 司・教授 松田 修・教授 夜久 均

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Nako Y, Shiozaki A, Ichikawa D, Komatsu S, Konishi H, Itaka D, Ishii H, Ikoma H, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Nakahari T, Marunaka Y, Otsuji E.

Enhancement of the Cytocidal Effects of Hypotonic Solution Using a Chloride Channel Blocker in Pancreatic Cancer Cells

Pancreatology 2012; 12: 440-8.

審 査 結 果 の 要 旨

膵癌患者の予後は不良であり、その要因として術後早期再発が挙げられる。中でも、腹膜播種は予後に重要な因子となるため、制御方法の確立が膵癌治療における課題の一つである。これまで腫瘍細胞における蒸留水殺細胞効果についていくつかの報告を認めており、申請者らも以前に蒸留水による低浸透圧刺激が、食道癌、胃癌細胞をいずれも 5 分以内に断片化させた事を報告した。しかしながら、膵癌細胞における蒸留水殺細胞効果を検証した報告は存在しない。

この研究において、申請者は、蒸留水が膵癌細胞の細

胞容積増加に続いて細胞破壊をもたらす事を示し、再培養実験で、膵癌細胞株における蒸留水殺細胞効果を証明した。さらに、Cell Lab Quanta を用いて、膵癌細胞株において様々な浸透圧下での連続細胞容積変化を解析し、蒸留水 (0 mosmol/kg H₂O) における細胞断片化を認めただ一方で、緩徐な低浸透圧下では一旦膨化した後の調節性容量減少 (regulatory volume decreases: RVD) を観察した。これらの結果は、膵癌細胞の断片化には極度の低浸透圧刺激が必要である事を示していた。さらに低浸透圧溶液により引き起こされた細胞膨化を増強するため

に、膀胱癌細胞株にクロライドチャンネルブロッカーである 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid: NPPB を用いた実験を試みた。NPPB は低浸透圧刺激時に RVD を抑制することにより全ての細胞膨化を促進し、低浸透圧溶液の殺細胞効果を増強した。これらの結果は、膀胱癌細胞の RVD において、クロライドイオンチャンネル活性増加は主な制御メカニズムであり、低浸透圧刺激時のクロライドチャンネル抑制は、細胞膨化を増強し殺細胞効果を増大させる事を示している。近年、癌におけるイオン輸送体の発現・機能解析に関する研究報告は増加しており、診断・治療への新たな応用が期待されている。本研究は、膀胱癌細胞におけるクロライドチャンネル活性に焦点をあて、その制御により低浸透圧殺細胞効果が増強できることを示した。この結果は、個々の膀胱癌患者のイオン輸送体発現を理解することが、その活性制御による低浸透圧殺細胞効果を予測する上で重要となる可能性を示唆している。

以上が本論文の要旨であるが、膀胱癌細胞株における、低浸透圧刺激による殺細胞効果とクロライドイオンチャンネルブロッカーを用いた殺細胞効果増強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) Shiozaki A, Nakashima S, Ichikawa D, Fujiwara H,

Konishi H, Komatsu S, Kubota T, Okamoto K, Iitaka D, Shimizu H, Nako Y, Takemoto K, Kishimoto M, Otsuji E. Prognostic significance of p21 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Anti cancer Res* 2013; 33: 4329-4335.

2) Ishimoto T, Shiozaki A, Ichikawa D, Fujiwara H, Konishi H, Komatsu S, Kubota T, Okamoto K, Nakashima S, Shimizu H, Nako Y, Kishimoto M, Otsuji E. E2F5 as an independent prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Anti cancer Res* 2013; 33: 5415-5420.

3) Shiozaki A, Iitaka D, Ichikawa D, Nakashima S, Fujiwara H, Okamoto K, Kubota T, Komatsu S, Kosuga T, Takeshita H, Shimizu H, Nako Y, Sasagawa H, Kishimoto M, Otsuji E. xCT, component of cysteine/glutamate transporter, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol* 2014; 49: 853-863.

4) Shiozaki A, Nako Y, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Kishimoto M, Marunaka Y, Otsuji E. Role of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in cell cycle progression in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6844-6859.

論文提出者 北 川 真 希

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1542号
学位授与の日付	平成27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 奥田 司・教授 夜久 均・教授 松田 修

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Kitagawa M, Shiozaki A, Ichikawa D, Nakashima S, Kosuga T, Konishi H, Komatsu S, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E.

Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis of Gastric Cancer MKN28 Cells: Role of the Inhibitor of Apoptosis Family Members

Archives of Biochemistry and Biophysics 2015; 566: 43-48.

審 査 結 果 の 要 旨

TNF- α は炎症や細胞の生存、アポトーシスなど多彩な作用を有するサイトカインであり、癌の増殖やそれに伴う炎症に密接に関与している。多くの細胞に

において、TNF- α は単独ではアポトーシスを誘導せず、cycloheximide (CHX, タンパク合成阻害剤) や NF- κ B 阻害剤, Smac mimetics を併用することでアポトーシス

を誘導する。これは TNF- α 単独では、NF- κ B の活性化を介して、IAP ファミリーや c-FLIP などの抗アポトーシス蛋白が誘導され、caspase-8 の活性化が阻害されるためとされている。

申請者は、ヒト胃癌細胞株 MKN28 細胞を用いて、TNF- α /CHX 併用によりアポトーシスを誘導した際の IAP ファミリー (cIAP1, cIAP2, XIAP, survivin) の動態について解析を行った。その結果、NF- κ B により誘導される抗アポトーシス蛋白の合成阻害だけではなく、抗アポトーシス蛋白の分解促進がアポトーシスの誘導に関与していることが示唆された。TNF- α により cIAP2 が誘導される一方、CHX は XIAP と survivin の発現量を低下させた。cIAP1 および XIAP は TNF- α /CHX 併用で分解の促進を認めた。Survivin には分解の促進を認めなかった。TNF- α による cIAP2 の誘導は BMS-345541 (NF- κ B 阻害剤) により抑制された。MKN28 細胞に TNF- α /CHX を作用させると survivin の減少、カスパーゼ 8 とカスパーゼ 3 の活性化に続き cIAP1 および XIAP の減少を認め、アポトーシスが誘導された。プロテアソーム阻害剤により TNF- α /CHX による survivin, cIAP1, および XIAP の分解は抑制された。カスパーゼ阻害剤 (z-VAD-fmk) は TNF- α /CHX によるアポトーシスを抑制したが、survivin, cIAP1, および XIAP の分解は抑制しなかった。TNF- α および BMS -345541 併用により誘導されるアポトーシスは TNF- α /CHX により誘導されるものと比較して有意に少なかった。また、MKN28 細胞には TNF- α 受容体の内 TNFR1 のみならず正常の胃上皮細胞にはない TNFR2 の発現を認めた。このことから、癌細胞では TNFR2 が異常発現している可能性が示唆された。多くの癌には炎症と局所の TNF- α の産生が随伴している。したがって、TNF- α /CHX によるアポトーシスに関わる分子は、癌治療において重要な分子標的となりうると考える。

以上が本論文の要旨であるが、CHX 存在下において TNF- α に抗アポトーシス蛋白のプロテアソームにおける分解を促進する作用があることを明らかにし、その経路に関わる分子が癌治療において分子標的となり得る可能性を示唆した点で、医学上価値ある研究と認める。

参考論文 (6編)

- 1) Kitagawa M, Niisato N, Shiozaki A, Ohta-Fujimoto M, Hosogi S, Miyazaki H, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. A regulatory role of K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter in the cell cycle progression of breast cancer MDA-MB-231 cells. Arch Biochem Biophys 2013; 539: 92-8.
- 2) Shiozaki A, Kosuga T, Ichikawa D, Komatsu S, Fujiwara H, Okamoto K, Iitaka D, Nakashima S, Shimizu H, Ishimoto T, Kitagawa M, Nakou Y, Kishimoto M, Liu M, Otsuji E. XB130 as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol 2013; 20: 3140-50.
- 3) Kitagawa M, Ichikawa D, Komatsu S, Okamoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ochiai T, Kokuba Y, Sonoyama T, Otsuji E. Evaluation of lymph node metastasis in patients with gastric cancer: a comparison of the directionality of lymph node metastasis and the total number of metastatic lymph nodes. Surg Today 2013; 43: 130-5.
- 4) Kitagawa M, Yamaoka N, Imura K, Sakita M, Kato M, Toda K, Otsuji E. Recurrent extensive idiopathic pneumatoses intestinalis of the small intestine with pneumoperitoneum: effective treatment with the surgical intervention. J Biomed Graph Comp 2012; 2: 121-26.
- 5) Kitagawa M, Ikoma H, Ochiai T, Ishii H, Shiozaki A, Kuriu Y, Nakanishi M, Ichikawa D, Okamoto K, Fujiwara H, Sakakura C, Kokuba Y, Sonoyama T, Otsuji E. Total pancreatectomy for pancreatic carcinoma: evaluation of safety and efficacy. Hepatogastroenterology 2012; 59: 907-10.
- 6) Kitagawa M, Ichikawa D, Komatsu S, Okamoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ochiai T, Kokuba Y, Otsuji E. The directionality of lymphatic spreading as a prognostic factor in gastric cancer: uni-or multidirectional lymphatic metastases. Hepatogastroenterology 2011; 58: 2148-51.

論文提出者 中島慎吾

学位の種類 博士(医学)
学位記の番号 甲第1543号
学位授与の日付 平成27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 奥田 司・教授 松田 修・教授 夜久 均

論文題目及び掲載誌

Nakashima S, Shiozaki A, Ichikawa D, Komatsu S, Konishi H, Iitaka D, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Kishimoto M, Otsuji E.
Anti-Phosphohistone H3 as an Independent Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma
Anticancer Research 2013; 33: 461-467.

審査結果の要旨

ヌクレオソームを形成する蛋白の一つであるヒストン H3 のセリン 10 のリン酸化はクロマチン凝集と関連し、細胞周期の late G2 期から M 期終了までの間生じるため、anti phosphohistone H3 (PHH3) は mitosis の specific marker として最近用いられるようになった。今までに髄膜腫、悪性黒色腫、卵巣癌、胃癌など様々な癌腫との関連が報告されているが、食道扁平上皮癌との関連を示した報告例は認めていない。また、PHH3 と proliferation marker の Ki-67 との関連を示した報告は認めるが、一定の見解に至っていない。

申請者は以上の背景から、食道扁平上皮癌根治切除標本 50 例を用いて、PHH3 の免疫染色を行い、食道扁平上皮癌における PHH3 の発現・予後との関連および臨床病理学的因子・Ki-67・p21 との関係について検討を行った。評価方法は最も発現の高い部位での high power field 連続 10 視野における核陽性数 (mitotic index = PHH3 MI) を用いた。PHH3 MI と種々の臨床病理学的因子を比較したところ、分化度が低くなるほど、index が増加傾向にあったが、有意差は認めず、その他の因子とも関連を認めなかった。また、Ki67, p21 との関連も調べたが、相関を認めなかった。ついで、生存に関する単変量解析を行ったところ、PHH3 MI = 10 を cut off 値とすることで、有意に低発現群が予後良好であることを明らかにした。その cut off 値 10 で二群にわけて、種々の臨床病理学的因子と比較したところ、組織型において、高分化型が低発現群で多くなり、有意な相関関係を認めた。さらに、多変量解析を行ったところ、N 因子と PHH3 MI が独立した予後因子として描出された。PHH3 MI は今までの報告において、測定方法や cut off 値が様々であり、一定の見

解に至っていないが、食道扁平上皮癌においては、最も多く用いられている測定方法を用いて、cut off 値を 10 にすることで、予後を反映し、組織型とも相関することを示した。また、PHH3 と Ki-67 が相関しなかった理由として、Ki-67 は細胞周期のすべての過程で発現しているが、PHH3 は分裂期のみで発現しており、それぞれの細胞において、細胞周期の進行速度が異なるのが原因ではないかと示唆された。PHH3 MI の測定は Ki-67 labeling index の測定と比べて簡便であり、PHH3 はすでに実臨床で使用されている Ki-67 よりもより臨床に即した proliferation marker であると思われた。

以上が本論文の要旨であるが、今回の研究は食道扁平上皮癌と PHH3 の関係を世界で初めて示した報告例であり、将来、実地臨床に寄与する可能性は高いと考えられ、医学上価値のある研究と認める。

参考文献 (6 編)

- 1) Nakashima S, Shiozaki S, Fujiwara H, Murayama Y, Komatsu S, Ikoma H, Kuriu Y, Nakanishi M, Ichikawa D, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Otsuji E. Spontaneous rupture of the esophagus with extensive bowel necrosis caused by nonocclusive mesenteric ischemia: report of a case. Surg Today 2012; 42: 1107-1110.
- 2) Shiozaki A, Nakashima S, Ichikawa D, Fujiwara H, Konishi H, Komatsu S, Kubota T, Okamoto K, Iitaka D, Shimizu H, Nako Y, Takemoto K, Kishimoto M, Otsuji E. Prognostic significance of p21 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Research 2013; 33: 4329-4335.

- 3) Shiozaki A, Kosuga T, Ichikawa D, Komatsu S, Fujiwara H, Okamoto K, Iitaka D, Nakashima S, Shimizu H, Ishimoto T, Kitagawa M, Nako Y, Kishimoto M, Liu M, Otsuji E. XB130 as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 3140-3150.
- 4) Shiozaki A, Iitaka D, Ichikawa D, Nakashima S, Fujiwara H, Okamoto K, Kubota T, Komatsu S, Kosuga T, Takeshita H, Shimizu H, Nako Y, Sasagawa H, Kishimoto M, Otsuji E. xCT, component of cysteine/glutamate transporter, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol* 2014; 49: 853-863.
- 5) Sasagawa H, Shiozaki A, Iitaka D, Ichikawa D, Komatsu S, Fujiwara H, Okamoto K, Nakashima S, Kinoshita O, Murayama Y, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ochiai T, Kokuba Y, Otsuji E. Ki-67 labeling index as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 2012; 9: 195-202.
- 6) Shiozaki A, Ichikawa D, Takemoto K, Nako Y, Nakashima S, Shimizu H, Kitagawa M, Kosuga T, Konishi H, Komatsu S, Fujiwara H, Okamoto K, Marunaka Y, Otsuji E. Efficacy of a hypotonic treatment for peritoneal dissemination from gastric cancer cells: an *in vivo* evaluation. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 707089 doi: 10.1155/2014/707089.

論文提出者 丸山悠子

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 甲第1544号
 学位授与の日付 平成27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 酒井敏行・教授 松田修・教授 矢部千尋

論文題目及び掲載誌

Maruyama Y, Maruyama K, Kato Y, Kajiya K, Moritoh S, Yamamoto K, Matsumoto Y,
 Sawane M, Kerjaschki D, Nakazawa T, Kinoshita S.

The Effect of Podoplanin Inhibition on Lymphangiogenesis Under Pathological Conditions

Investigative Ophthalmology and Visual Science 2014; 55: 4813-4822.

審査結果の要旨

角膜は通常血管、リンパ管の欠如した透明組織であるが、角膜移植後等の炎症期には血管、リンパ管が角膜実質内に新生する。角膜の炎症期リンパ管新生にはマクロファージが関与していることが明らかになっている。また角膜内に新生したリンパ管の維持はマクロファージの存在に依存していることが知られている。

申請者はリンパ管内皮細胞特異的マーカーである podoplanin の中和抗体 (PMab-1, NZ-1) を用いることで、角膜炎症、角膜移植時のリンパ管新生と拒絶反応、マクロファージによる炎症を抑制できるかどうか検討を行った。まずマウス角膜縫合モデル (C57BL/6) で角膜のリンパ管新生およびマクロファージの浸潤について検討したところ、PMab-1 投与群でいずれも有意に抑制された。マウス角膜移植モデル (レシピエント BALB/c, ドナー C57BL/6) で検討したところ、PMab-1 投与群ではマクロファージの

浸潤が抑制され、拒絶反応が有意に抑制された。またマウス耳の創傷治癒モデル (C57BL/6) でリンパ管新生について検討したところ、PMab-1 投与群で有意に抑制された。次にマウス腹腔内細胞 (PEC) を Lipopolysaccharide (LPS), LPS + Interferon gamma (IFN- γ) で刺激し、PEC の podoplanin 発現変化について検討した。LPS 単独刺激後に podoplanin の発現は上昇し、PMab-1 投与により抑制された。また TNF- α の分泌レベルは LPS 単独刺激後で PMab-1 投与により有意に低下していたが、LPS + IFN- γ で刺激後の TNF- α の分泌レベルは LPS 単独刺激後に比較して高く、PMab-1 投与では抑制出来なかった。次に LPS 刺激による PMab-1 の炎症抑制経路を検討したところ、NF- κ B, MAPK 経路に関わるタンパクの発現が PMab-1 投与群で抑制された。さらにヒトリンパ管内皮細胞 (LEC) を用いて tube formation assay を検討したと

ころ、NZ-1 投与により LEC によるリンパ管の形成が濃度依存的に抑制され、podoplanin がマクロファージ同様 LEC にも直接作用することが分かった。以上の結果より、podoplanin 中和抗体はマクロファージをはじめとする炎症細胞の機能を制御し、炎症細胞の浸潤と拒絶反応の抑制、およびリンパ管内皮への直接的作用によりリンパ管新生の抑制に関与したと考えられた。

以上が本論文の要旨であるが、podoplanin を制御することで、炎症期におけるマクロファージの機能とリンパ管内皮への直接的な作用で、リンパ管新生を抑制し、角膜移植後の拒絶反応を抑制出来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) Maruyama Y, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Kinoshita S.

Effects of long-term topical prostaglandin therapy on central corneal thickness. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014; 30: 440-444.

2) Maruyama Y, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Kinoshita S. Morphological analysis of age-related iridocorneal angle changes in normal and glaucomatous cases using anterior segment optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol* 2014; 8: 113-118.

3) Maruyama K, Nakazawa T, Cursiefen C, Maruyama Y, Van Rooijen N, D' Amore PA, Kinoshita S. The maintenance of lymphatic vessels in the cornea is dependent on the presence of macrophages. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 3145-3153.

論文提出者 中 川 絃 子

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1545 号
学位授与の日付	平成 27 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 吉村了勇・教授 田代 啓・教授 奥田 司

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Nakagawa H, Inatomi T, Hieda O, Sotozono C, Yokoi N, Iliakis B, Miller TD, Ulrickson C, Kinoshita S.

Clinical Outcomes in Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty with Internationally Shipped Precut Donor Corneas
American Journal of Ophthalmology 2014; 157: 50-55.

審 査 結 果 の 要 旨

角膜内皮細胞が減少することで発症する水疱性角膜症に対しては、従来行われていた全層角膜移植術 (PKP) にかわって角膜内皮移植術: Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) が第一選択となっている。この移植術にはプレカットドナー角膜が必要であり、米国国内でプレカットドナーを用いて行った DSAEK の安全性についての報告は複数ある。しかし国外への長時間の空輸を経たプレカットドナー角膜の安全性についての報告は未だない。そこで、申請者は国外からのプレカットドナー角膜を用いた DSAEK の安全性および有効性について検討するために本研究を行った。

申請者はまずプレカット後の国際輸送がドナー角膜に与える影響について検討を行った。米国シアトルのアイ

バンクである SightLife から京都市立医科大学眼科の関連施設に送付されたプレカットドナー角膜について、米国アイバンクで測定したプレカット前の角膜内皮細胞密度 (endothelial cell density: ECD) と手術直前に測定した ECD とを比較し、角膜内皮細胞減少率を算出したところ、米国—日本間の輸送とそれによる長時間保存の角膜内皮細胞密度に与える影響は軽微であった。次に国外プレカットドナー角膜を用いて施行した DSAEK について術後 3 年間の臨床成績 (視力改善効果、角膜内皮細胞密度の推移、術後合併症の発症率) をレトロスペクティブに検討した。視力改善は迅速であり、術前と比較して術後 1 ヶ月の時点で有意な改善を認めた。術後の平均内皮細胞密度減少率に関しては、今回の検討と国内ドナー

を使用した既報とではほぼ同等であった。術後合併症頻度に関しても国内ドナー角膜を用いた既報における発症率とほぼ同等であった。

本研究の結果、米国から国際輸送されたプレカットドナー角膜における角膜内皮細胞密度の減少率は僅かであり、合併症の割合も低く、臨床成績も国内プレカットドナーを用いた既報と比較して同等の成績であった。DSAEK手術の普及とともに国外プレカットドナー角膜への需要が高まりつつあるが、今回、国外プレカットドナー角膜の安全性と有効性が示されたことは意義深い。

以上が本論文の要旨であるが、国外プレカットドナー角膜を用いた DSAEK の安全性および有効性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) Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Nakagawa H,

- Hamuro J, Kinoshita S. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea*. 2013; 32: 1167-1170.
- 2) Kawasaki S, Yamasaki K, Nakagawa H, Shinomiya K, Nakatsukasa M, Nakai Y, Kinoshita S. A novel mutation (p.Glu 1389 AspfsX16) of the phosphoinositide kinase, FYVE finger containing gene found in a Japanese patient with fleck corneal dystrophy. *Mol Vis*. 2012; 18: 2954-2960.
- 3) 中川 紘子, 稲富 勉, 稗田 牧, 外園千恵, 横井則彦, 木下 茂. Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty 術後における角膜内皮細胞密度の変化と影響因子の検討. *あたらしい眼科*. 2011; 28: 715-718.

論文提出者 北 澤 耕 司

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第 1546 号
学位授与の日付	平成 27 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 田代 啓・教授 酒井敏行・教授 奥田 司

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Kitazawa K, Kawasaki S, Shinomiya K, Keita A, Matsuda A, Funaki T, Yamasaki K, Nakatsukasa M, Ebihara N, Murakami A, Hamuro J, Kinoshita S.

Establishment of a Human Corneal Epithelial Cell Line Lacking the Functional TACSTD2 Gene as an *in Vitro* Model for Gelatinous Drop-Like Dystrophy
Investigative Ophthalmology & Visual Science 2013; 54: 5701-5711.

審 査 結 果 の 要 旨

膠様滴状角膜ジストロフィ (GDLD) は常染色体劣性遺伝で、tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2) 遺伝子の機能喪失性変異によって生じる。日本で数多く報告され、有病率は 1/30,000 であるが、欧米では極めてまれな疾患である。角膜上皮のバリア機能低下による角膜上皮下へのアミロイドの沈着を特徴とし、最終的に角膜は混濁し、著明な視力低下を引き起こす。早期にはソフトコンタクトレンズによる角膜上皮保護やレーザー表層切除、晩期の角膜混濁に対しては全層角膜移植や層状角膜移植が適応ではあるが、容易に再発するため予後不良である。そのため、病態の本質を標的

とする新しい治療法の開発が求められている。

申請者は、新しい治療法の開発や病態の解明のための *in vitro* モデルとして、GDLD 患者由来の不死化角膜上皮細胞の樹立を試みた。GDLD 患者の角膜組織から単離した角膜上皮細胞に、レンチウィスルベクターにクローニングした SV40 large T 遺伝子と hTERT 遺伝子を導入し、機能解析をおこなった。導入した細胞は分裂回数が 100 回を超えても増殖し続け、両遺伝子を導入していない細胞と比較すると、高い N/C 比をもつ細胞形態を維持していた。またすでに報告されている不死化細胞ラインと同様にテロメラーゼ活性をもち、高いコロニー

形成能も有していた。これらのことからSV40 large TとhTERT遺伝子の導入による不死化細胞の樹立に成功したと考えられた。次に樹立細胞のバリア機能とタイトジャンクション関連タンパク発現についての解析を行った。バリア機能は不死化細胞を増殖培地で培養し、コンフルエント後に分化培地に変更し、測定した電気抵抗値からバリア機能を算出した。GDL D由来の不死化角膜上皮細胞は正常由来の不死化角膜上皮細胞と比較すると有意にバリア機能の低下を認めた。またタイトジャンクション関連タンパクであるClaudin1 (CLDN1)とClaudin7 (CLDN7)タンパクは、in vivoのGDL D角膜上皮と同様に、発現レベルの低下を示した。さらにCLDN1とCLDN7タンパクの局在が細胞膜上から細胞質へと変化した。最後に、樹立したGDL D不死化角膜上皮細胞を用いてwild typeのTACSTD2遺伝子による遺伝子治療の可能性を検討した。TACSTD2遺伝子をレンチウイルスベクターにクローニングして、GDL D不死化

角膜上皮細胞に導入した。遺伝子導入後、CLDN1とCLDN7のタンパク発現レベルは正常角膜上皮細胞とほぼ同等の発現レベルまで改善した。また発現レベルだけではなく、CLDN1とCLDN7のタンパク局在は正常角膜上皮と同様に細胞膜上に正常化した。このことは、TACSTD2の遺伝子導入がGDL Dのバリア機能を改善させる新しい治療になることを示唆する。

以上が本論文の要旨であるが、疾患病態を反映するin vitroモデルを作成したことと、それを用いて遺伝子治療の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 (1 編)

- 1) Kinoshita S, Kawasaki S, Kitazawa K, Shinomiya K. Establishment of a human conjunctival epithelial cell line lacking the functional TACSTD2 gene. Trans Am Ophthalmol Soc 2012; 110: 166-177.