

博 士 論 文 要 旨

論文提出者 矢野 未央

学位の種類	博士 (医学)
学位記の番号	甲第 1552 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 谷脇雅史・教授 八木田和弘

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Kawasaki H, Hori H, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Matsumoto K, Kiyokawa N, Oda M, Sato A.

An Overall Characterization of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia with CRLF2 Overexpression Genes, Chromosomes and Cancer 2014; 53: 815-823.

審 査 結 果 の 要 旨

小児 B 前駆細胞型 ALL (BCP-ALL) における IKZF1 欠失の予後不良因子としての意義は確立しているが、CRLF2 高発現の予後因子としての意義については一見の見解は得られていない。

申請者は CRLF2 高発現が独立した予後不良因子となりうるか評価するため、日本小児白血病研究 ALL02 試験に登録された 167 例の BCP-ALL 患者の遺伝子解析を施行し、CRLF2 高発現例における分子生物学的および臨床的特徴を明らかにし、CRLF2 高発現が予後に与える影響を検討した。1) CRLF2 発現量についてはリアルタイム PCR 法、2) CRLF2 重複、IKZF1 遺伝子欠失については MLPA 法、3) P2RY8-CRLF2 再構成については RT-PCR および MLPA 法、4) CRLF2 高発現例の CRLF2 F232C 変異、IKZF1 遺伝子欠失例での JAK2 exon16, 20, 21 変異については直接塩基決定法にて解析した。また CRLF2 高発現の機序にかかわる新規融合遺伝子の検索のため IKZF1 欠失例を対象に mRNA シークエンスおよび 5' RACE 法による解析を行った。結果、CRLF2 高発現は 167 例中 30 例 (18%) に認められた。P2RY8-CRLF2 再構成は 167 例中 3 例 (1.8%) に認められ、全て CRLF2 高発現であった。CRLF2 重複は 167 例中 18 例 (11%) に認められ、CRLF2 高発現群に有意に多かった (11/30 vs 7/137, $P = 0.01$)。また CRLF2 重複例では IKZF1 欠失は認められなかった。CRLF2 高発現 30 例中 13 例 (43%) が CRLF2 重複もしくは P2RY8-CRLF2 再構成陽性であり高発現の機序と考えられた。残る 17 例中 IKZF1 欠失を伴う 7 例で施行した mRNA

シークエンスの結果、CRLF2 高発現に関わると推測される新規の遺伝子再構成 CSF2RA-CRLF2 を 1 例同定した。CRLF2 高発現の頻度は欧米からの報告と同程度だが、本邦の高発現例は CRLF2 重複が約 1/3 を占め、P2RY8-CRLF2 陽性率が欧米の報告に比して (35~43%) 極めて低い頻度 (10%) であった。CRLF2 遺伝子再構成はヒスパニックに多いこととされており、人種差が影響する可能性が示唆された。生存解析では 5 年無病生存率 (5y EFS)、5 年全生存率 (5y OS) 共に CRLF2 高発現・非高発現群間に有意差は認められなかった (高発現群 vs 非高発現群 5y EFS: 70.7% vs 75.4%, $\log \text{rank } P = 0.68$, 5y OS: 96.4% vs 82.1%, $\log \text{rank } P = 0.11$)。また、IKZF1 欠失を伴う CRLF2 高発現群は 5y EFS が低値であることが明らかとなった (CRLF2 高発現 (+) / IKZF1 欠失 (+): 44.4%, CRLF2 高発現 (+) / IKZF1 欠失 (-): 83.1%)。CRLF2 重複と IKZF1 欠失は相互排他的であり、CRLF2 重複例の予後が良好であることに関連していると考えられた。

以上が本論文の要旨であるが、CRLF2 高発現は本邦の小児 BCP-ALL の独立した予後不良因子ではない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) Sakamoto K, Imamura T, Yano M, Yoshida H, Fujiki A, Hirashima Y, Hosoi H. Sensitivity of MLL-rearranged AML cells to all-trans retinoic acid is associated with the level of H3K4me2 in the RAR α promoter region. Blood

- Cancer J 2014; 4: e205.
- 2) 吉田秀樹, 今村俊彦, 矢野未央, 伊藤育世, 坂本謙一, 柴田真弓, 藤木 敦, 中島久和, 小阪喜太郎, 石田宏之, 細井 創. 小児急性リンパ性白血病治療における L-asparaginase 関連高血糖発症のリスク因子の検討. 日小児血液・がん会誌 2014; 51: 145-152.
- 3) Iwao Y, Ishii R, Tomita Y, Shibuya Y, Takano T, Hung

WC, Higuchi W, Isobe H, Nishiyama A, Yano M, Matsumoto T, Ogata K, Okubo T, Khokhlova O, Ho PL, Yamamoto T. The emerging ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in the community in Japan: associated infections, genetic diversity, and comparative genomics. J Infect Chemother 2012; 18: 228-240.

論文提出者 山本拓郎

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1553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 吉村了勇・教授 八木田和弘

論文題目及び掲載誌

Yamamoto T, Mori T, Sawada M, Kuroboshi H, Tatsumi H, Yoshioka T, Matsushima H, Iwasaku K, Kitawaki J.
Estrogen-related Receptor- γ Regulates Estrogen Receptor- α Responsiveness in Uterine Endometrial Cancer
 International Journal of Gynecological Cancer 2012; 22: 1509-1516.

審査結果の要旨

子宮体癌は女性生殖器由来の癌の中では一般的であるものの、診断・予後を規定するマーカーの研究は未だ十分ではない。長期的なエストロゲンへの暴露は子宮体癌の最も重要なリスクファクターであり、腫瘍の増殖にも関与すると考えられる。エストロゲンは estrogen receptor (ER) α や β に結合し、活性化させ、活性化した ER は DNA 上の estrogen response element (ERE) に結合することで遺伝子の転写を調節し、さまざまな作用を発揮する。このため、ERE を介した機能制御は子宮体癌において重要な役割を果たすと考えられる。estrogen-related receptor (ERR) は α , β , γ の3つのサブタイプを持ち、ERE に結合することで ER と同様に遺伝子の転写を調節するが、エストロゲンをリガンドとしない核内オーファン受容体とされている。申請者は子宮体癌における ERR γ が腫瘍の進展とエストロゲン応答に関してどのように影響するか検討した。

申請者は、まず子宮体癌臨床検体を用いて ERR γ と ER α の発現を免疫組織染色で検討した。ERR γ 陽性例は有意に progression free survival (PFS), overall survival (OS) が不良であり、ERR γ が子宮体癌において予後不良因子となりうることを示した。さらに ER α

の発現に基づいたサブセット解析を行うことで、ERR γ 陽性例が ER α 陰性例においてのみ予後不良因子となることを示した。このことから、ERR γ は ER α の発現の有無によりその機能を変化させる可能性が示唆された。

そこで、ERR γ 陰性子宮体癌細胞株 (ER α 陽性; Ishikawa, ER α 陰性; HEC1A) に ERR γ を強発現させることで、ERR γ の ERE 転写活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。ER α 陽性の Ishikawa 細胞では estradiol (E2) により ERE 転写活性が増強するが、ERR γ はその活性を抑制した。逆に、ER α 陰性の HEC1A 細胞では E2 による転写活性の増強は認めないが、ERR γ を過剰発現することで E2 添加時の ERE 転写活性の増強を確認した。次に、ERR の細胞増殖に対する影響を WST-8 assay を用いて検討した。pcDNA3.1 発現プラスミドベクターを細胞株に導入し、恒常的 ERR γ 発現株を樹立し、実験に用いた。ER α 陽性の Ishikawa 細胞では恒常的に ERR γ を発現させることで細胞増殖が抑制された。一方、ER α 陰性の HEC1A 細胞では ERR γ は細胞増殖を促進した。さらに、ERR γ に対するアゴニスト活性を有する DY131 の細胞増殖と ERE 転写活性に対する影響を検討した。ER α 陽性の

Ishikawa 細胞では DY131 を投与すると濃度依存性に ERE 転写活性を抑制し、高濃度においては細胞増殖が抑制された。一方、ER α 陰性の HEC1A 細胞では濃度依存性に ERE 転写活性が促進し、高濃度においては細胞増殖が促進された。本研究により、子宮体癌において、ERR γ は ER α の発現によってそのエストロゲン応答性と腫瘍の増殖能を変化させることが示された。

以上が本論文の要旨であるが、子宮体癌における ERR γ と ER α の関係とその働きを示した最初の報告であり、さらに DY131 のような ERR γ を標的とした薬剤が新たな子宮体癌治療法となりうることを示した点で、医学的価値がある研究と認める。

参 考 論 文 (3 編)

1) Yamamoto T, Mori T, Matsushima H, Sawada M,

Kitawaki J. Late, isolated metastasis from poorly differentiated gastric cancer to the uterine cervix. *Gynecol Oncol Rep* 2014; 8: 17-20.

2) Kataoka H, Mori T, Yamamoto T, Sawada M, Kuroboshi H, Tatsumi H, Iwasaku K, Kitawaki J. Outcome of fertility-sparing treatment with medroxyprogesterone acetate for atypical hyperplasia and endometrial carcinoma in young Japanese women. *Eur J Gynaecol Oncol* 2014; 35: 11-5.

3) Ijichi S, Mori T, Suganuma I, Yamamoto T, Matsushima H, Ito F, Akiyama M, Kusuki I, Kitawaki J. Clear cell carcinoma arising from cesarean section scar endometriosis: case report and review of the literature. *Case Rep Obst Gynecol* 2014; 642483.

論文提出者 伊 藤 文 武

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第 1554 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 吉村了勇・教授 夜久 均

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Ito F, Tatsumi H, Mori T, Suganuma I, Tanaka Y, Sasaki A, Matsuo S, Iwasa K, Kitawaki J.
Medroxyprogesterone Acetate Enhances Monocyte-Endothelial Interaction Under Flow Conditions by Stimulating the Expression of Cell Adhesion Molecules
The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2014; 99: 2188-2197.

審 査 結 果 の 要 旨

閉経後女性では同年齢の男性に比し動脈硬化を含む心血管疾患の発症率が高い。閉経後女性での血中女性ホルモン(エストロゲン)は男性よりも有意に低いことからエストロゲンの動脈硬化保護作用が示唆されてきた。しかし、大規模臨床試験におけるホルモン補充療法(HRT)の動脈硬化に対する予防効果は期待されたほどではなかった。その原因の一つとしてHRTにエストロゲンとともに使用される黄体ホルモン(プロゲステロン)の種類により、血管内皮への炎症反応が促進される可能性が指摘されている。そのため各種プロゲステロンの動脈硬化発症リスクを個別に検討し、新規HRTレジメンを開発することが望まれている。

動脈硬化発症の初期段階では血管内皮への接着分子を

介した単球接着が引き金となる。申請者は単球の血管内皮への接着反応を検証しうる flow chamber system を確立させている。この system においては、一定の shear stress を血管内皮に負荷させ、in vivo に近い状態で接着反応を検証することが可能である。

申請者は、この system に分子化学的手法を併用して、各種プロゲステロンの動脈硬化への影響を詳細に検討した。その結果、プロゲステロンの中でもHRTで最も常用されている酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)のみが、血管内皮モデルとして使用したヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)での接着分子 mRNA およびタンパク発現を増加させることが明らかになった。さらに flow chamber system において、MPA が、HUVEC への

単球接着を亢進させることを示した。対照的に、天然型のプロゲステロンや他の新規合成プロゲステンではこれらの作用はみられなかった。このMPAの単球接着亢進作用は、接着分子の siRNA を用いた knockdown により抑制された。また、MPA の接着分子増加作用と各種ステロイド受容体との関連を抑制実験により調べたところ、MPA の作用は一部グルココルチコイド受容体を介しているが、アンドロゲン受容体は介していないことが明らかとなった。以上のことから、閉経後女性における標準的な HRT で使用される MPA が動脈硬化発症のリスクとなることが示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、従来の HRT レジメンに繁用されてきた MPA の危険性を基礎実験により初めて証明し、今後のより安全な新規 HRT レジメンの開発に寄与する点で、医学上価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (3 編)

- 1) Suganuma I, Mori T, Ito F, Tanaka Y, Sasaki A, Matsuo S, Kusuki I, Kitawaki J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 α enhances local estrogen biosynthesis by stimulating aromatase activity in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E1191-1198.
- 2) Sasaki A, Akita K, Ito F, Mori T, Kitawaki J, Nakada H. Difference in mesothelin-binding ability of serum CA125 between patients with endometriosis and epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2015; 136: 1985-1990.
- 3) Ito F, Okubo T, Yasuo T, Mori T, Iwasa K, Iwasaku K, Kitawaki J. Premature delivery due to intrauterine Candida infection that caused neonatal congenital cutaneous candidiasis: a case report. *Obstet Gynaecol Res* 2013; 39: 341-343.

論文提出者 木村正志

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1555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 伏木信次・教授 細井 創・教授 福居顯二

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Kimura T, Kitaura H, Masuda H, Kameyama S, Saito Y, Sugai K, Otsuki T, Nakazawa A, Morota N, Yamamoto T, Iida K, Nakagawa M, Mizuno T, Takahashi H, Kakita A.

Characteristic Expression of p57/Kip2 in Balloon Cells in Focal Cortical Dysplasia
Neuropathology 2015; 7. doi: 10.1111/neup.12199. [Epub ahead of print]

審 査 結 果 の 要 旨

Balloon cell は、限局性皮質異形成タイプ IIb (FCD IIb)、結節性硬化症 (TSC)、片側巨脳症 (HME) を含む様々な皮質形成異常をきたす疾患において認められる病理学的特徴のひとつである。Balloon cell の由来やその形成機序については未だ不明である。最近の研究では、異常な幹細胞が balloon cell 形成に関与する、radial glial progenitor cells 由来である、radial glial cells が異常分化したもの、正常な分化に失敗して細胞周期が停止した異常な細胞が残存したものといった可能性が報告・検討されており、balloon cell の形成機序において、細胞周期の調節不全が非常に重要であると推測されている。

申請者は、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害因子のうちの Cip/Kip ファミリーのメンバーで、細胞周期の調節や増殖、分化に関わる蛋白質である p57/Kip2 について、FCD IIb, TSC, HME の balloon cell における免疫組織化学的発現について検討した。対象は、臨床的に難治性てんかんを呈し、外科的切除術を施行された FCD IIb 26 例, TSC 17 例, HME 6 例の切除標本である。それぞれの症例につき p57/Kip2 染色した 1 切片を用いて balloon cell を同定し、p57/Kip2 陽性のものを計数した。また、FCD IIb 群のいくつかの切片を用いて p57/Kip2 免疫電子顕微鏡像を確認した。FCD IIb では、balloon cell

はさまざまな p57/Kip2 陽性像を呈し、弱い dot 状、強い dot 状、網状、および突起状に陽性となるものが認められた。p57/Kip2 陽性構造は細胞質膜と突起の近位部に限局しているように見え、核や核周辺部、細胞質では認められなかった。細胞質辺縁に dot 状に陽性構造をもつものは主として皮質で多く認められ、突起状に陽性構造をもつものは主として皮質深層および灰白境界で認められた。一方、TSC ではほとんどの balloon cell が p57/Kip2 陰性であった。HME で見られた balloon cell では、FCD IIb と類似した p57/Kip2 陽性像を認めた。免疫電子顕微鏡像では、balloon cell の p57/Kip2 免疫原性は主として、細胞質辺縁および突起近位部のフィラメント上に認められた。

p57/Kip2 は CDK 阻害因子である Cip/Kip ファミリーのひとつで、細胞周期を調整することが知られている。中枢神経系の発生においては、神経発生、分化、遊走などの様々な段階に関与することが明らかとなっている。最近の報告では、Cip/Kip ファミリーの蛋白質が神経細胞やグリア細胞への分化を制御していると考えられている。Balloon cell は神経細胞やグリア細胞に分化する前

駆細胞の異常な分化によって形成されると考えられていることから、本研究で明らかになった balloon cell における p57/Kip2 蛋白質の発現は、神経前駆細胞の異常な分化と関係している可能性が考えられた。また、balloon cell における p57/Kip2 の発現において FCD IIb、TSC、HME のあいだに差が見られ、これらの疾患の病態形成機序の相違に関係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、これまでに報告のない FCD の balloon cell における p57/Kip2 の発現と局在を明らかにし、TSC のそれとの差異を示した点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (1 編)

- 1) Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi T. Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology* 2014; 34: 392-397.

論文提出者 大 村 学

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第 1556 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 谷脇雅史・教授 酒井敏行・教授 奥田 司

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Ohmura G, Tsujikawa T, Yaguchi T, Kawamura N, Mikami S, Sugiyama J, Nakamura K, Kobayashi A, Iwata T, Nakano H, Shimada T, Hisa Y, Kawakami Y.
Aberrant Myosin 1b Expression Promotes Cell Migration and Lymph Node Metastasis of HNSCC
Molecular Cancer Research 2015; 13: 721-731.

審 査 結 果 の 要 旨

頭頸部扁平上皮癌は全世界で 6 番目に多い悪性腫瘍である。近年の集学的治療の発達により頭頸部癌の局所制御率が改善した一方で、転移・再発の影響により、過去 30 年間での 5 年生存率の改善はわずかに留まっている。頭頸部癌はリンパ節への転移臓器特異性が高く、リンパ節転移を伴わずに遠隔転移を生じる頻度は低く、リンパ節転移の存在は予後不良と強く相関している。したがって、頭頸部癌治療の進歩において、リンパ節転移の機序を解明し、予測・制御することは極めて重要である。癌

細胞はその運動能により、近接組織に浸潤し最終的には遠隔臓器へ転移する。細胞運動は糸状突起や葉状突起、浸潤突起といった細胞膜突起の形成に始まる多段階の機構により制御される。細胞運動の亢進は癌の浸潤・転移を促進する。しかしながら、頭頸部癌における細胞運動の転移への関係についての理解は不十分である。

研究の端緒として、申請者はマイクロアレーデータベースを用いたメタアナリシスで、15 種類の固形癌のなかで扁平上皮癌、特に頭頸部癌で特異的に Myosin 1b (以

下 Myo1b) が高発現することを見出した。癌における Myo1b の発現やその働きに関する報告は国内外を問わず過去になく、生命情報学的手法を用いることで、過去に報告のない研究対象を見出した。臨床検体でも同一患者の正常組織と癌組織を比較し、癌組織で Myo1b が高発現することを確認した。その上で、頭頸部癌組織における Myo1b の発現が、リンパ節転移と相関することを免疫組織化学染色によって明らかにしている。この成果は、頭頸部癌頸部リンパ節転移の早期診断につながる可能性を秘めている。次いで申請者は、Myo1b 高発現株である SAS と HSC-4 を用いた創傷治癒試験とトランスウェル遊走試験で、Myo1b に対する RNAi は細胞遊走能・浸潤能を有意に抑制し、細胞増殖には変化がないことを確認した。さらに、申請者は Myo1b 発現が細胞遊走を促進する機構を解明するため、細胞運動先端端について細胞蛍光染色を用いて解析した。その結果、細胞膜の突起形成が Myo1b ノックダウンで有意に抑制されることを明らかにした。以上より Myo1b が頭頸部癌細胞の増殖に関与せず、遊走・浸潤を細胞膜の突起形成を介して促進することが示された。さらに、ヌードマウスを用いた頸部リンパ節転移モデルを構築し、その解析により、生体内においても Myo1b をノックダウンすると腫瘍増殖に関連せず頸部リンパ節転移を抑制することを明らかにし

た。この結果は Myo1b が頸部リンパ節転移に対する治療標的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、頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節転移における Myo1b の関与についての知見は、新たな診断および治療の発展につながる可能性を有し、医学的価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (3 編)

- 1) 大村 学, 辻川敬裕, 渡邊大樹, 四ノ宮 隆, 柴田敏章, 馬場 均, 高原哲夫, 久 育男. 小児に発生した声門下顆粒細胞腫例. 耳鼻臨床 2008; 101: 13-20.
- 2) Tsujikawa T, Yaguchi T, Ohmura G, Ohta S, Kobayashi A, Kawamura N, Fujita T, Nakano H, Shimada T, Takahashi T, Nakao R, Yanagisawa A, Hisa Y, Kawakami Y. Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2013; 131: 2721-2982.
- 3) 谷口智憲, 里美良輔, 西尾 浩, 杉山重里, 大村学, 中村謙太, 川村 直, 小林明日香, 河上 裕. 腫瘍免疫学とがん免疫療法. 化学療法・分子標的薬による抗腫瘍免疫応答の制御. *実験医* 2013; 31: 1938-1944.