
博士論文要旨

論文提出者 久 貝 宗 弘

学位の種類 博士 (医学)
学位記の番号 甲第 1508 号
学位授与の日付 平成 26 年 3 月 28 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 谷脇雅史・教授 渡邊能行

論文題目及び掲載誌

Kugai M, Uchiyama K, Tsuji T, Yoriki H, Fukui A, Qin Y, Higashimura Y, Mizushima K,
Yoshida N, Katoda K, Kamada K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Yagi N,
Yoshikawa T, Shirasaka Y, Tamai I, Naito Y, Itoh Y.

MDR1 is Related to Intestinal Epithelial Injury Induced by Acetylsalicylic Acid
Cellular Physiology and Biochemistry 2013; 32: 942-950.

審査結果の要旨

血管イベントに起因する疾患に対するアスピリンの有効性が明らかとなり、また高齢者や肥満といった心・脳血管イベントの発症リスクの高い人口の増加に伴いアセチルサリチル酸 (アスピリン) の使用量は増加している。アスピリンを含む NSAIDs は近年、カプセル内視鏡や小腸内視鏡といったデバイスの開発に伴い、胃粘膜のみならず小腸粘膜にも障害をもたらすことが明らかとなったが、その予防・治療方法に関して確立したものが存在せず、その病態の解明および治療法の確立は急務と言えるものである。

申請者は上皮細胞に発現する排出型トランスポーターの一種である MDR1 に着目した。まずは Caco2 細胞に MDR1 を遺伝子導入することで恒常的に高発現している細胞を作製し、さらに MDR1 の選択的阻害剤であるベラパミルを用いることでアスピリンによる細胞障害の程度がいかに変化するか検討した。結果としては MDR1 の阻害剤であるベラパミルの前投与によりアスピリンによる Caco2 細胞傷害の程度は増悪し、逆に MDR1 の高発現 Caco2 細胞は非高発現 Caco2 細胞と比較して細胞傷害の程度が軽くなることが示された。Caco2 細胞は定常状態でもある程度 MDR1 を発現しているため、これらの結果より MDR1 がアスピリンによる Caco2 細胞傷害に関与していることが示された。

また、MDR1 によるアスピリンの薬物動態の検討のため、アスピリンのアセチル基の炭素を放射性同位体 (^{14}C) でラベルしたアスピリン (^{14}C アスピリン) を用い

てトランスウェル上で小腸上皮に分化した Caco2 細胞の flux study をおこなった。結果としては、MDR1 の選択的阻害剤であるベラパミルを投与することによって、アスピリンの仮想小腸上皮における吸収動態の変化が観察された。これによりアスピリンが MDR1 の基質の一つであることが示された。さらに、細胞内のアスピリンの濃度測定も ^{14}C アスピリンを用いて検討した。MDR1 の選択的阻害剤であるベラパミルを前投与することによりアスピリンを付加した Caco2 細胞内のアスピリン濃度は上昇し、MDR1 の高発現 Caco2 細胞においては細胞内に残留するアスピリン濃度は MDR1 非高発現 Caco2 細胞と比較して有意に低いことが示された。また、MDR1 高発現細胞に対してベラパミルを前投与することによって、アスピリン投与後の細胞内アスピリン濃度は上昇した。これら ^{14}C アスピリンを用いた検討においてもアスピリンが MDR1 の基質であること、すなわち細胞内に取り込まれたアスピリンが、MDR1 によって細胞外に排出されていることが証明された。

以上が本論文の要旨であるが、アスピリンによる小腸上皮傷害を軽減させる新規機構の一つ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 (1 編)

- 1) Fukui A, Naito Y, Handa O, Kugai M, Tsuji T, Yoriki H, Qin Y, Adachi S, Higashimura Y, Mizushima K, Kamada K, Katoda K, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Yagi N,

Kokura S, Yoshikawa T. Acetyl salicylic acid induces damage to intestinal epithelial cells by oxidation-related

modifications of ZO-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G927-936.

論文提出者 山田 剛 司

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1509号
学位授与の日付	平成26年3月28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 丸中良典・教授 高松哲郎

論文題目及び掲載誌

Yamada T, Horinaka M, Shinnoh M, Yoshioka T, Miki T, Sakai T.

A Novel HDAC Inhibitor OBP-801 and a PI3K Inhibitor LY294002

Synergistically Induce Apoptosis Via the Suppression of Survivin and XIAP in Renal Cell Carcinoma

International Journal of Oncology 2013; 43: 1080-1086.

審査結果の要旨

腎細胞癌は抗癌剤および放射線に対する感受性が低いことが以前から知られている。近年、腎細胞癌における分子標的治療薬の開発が大きく進み、ソラフェニブ、スニチニブ、エペロリムス、テムシロリムス、アキシチニブの5剤が本邦でも使用可能となっているが、十分な効果は得られていないのが現状である。HDAC阻害剤は、様々な癌種に対して細胞周期停止やアポトーシスを誘導することが報告されている。また、多くの腎細胞癌でPI3K-Akt経路の異常活性化がみられ、PI3K阻害剤LY294002が腎細胞癌に対してアポトーシスを誘導することが報告されている。

申請者は腎癌細胞株786-Oを用いて、新規HDAC阻害剤OBP-801と既存のPI3K阻害剤LY294002の併用効果、および分子メカニズム解析を行った。まずOBP-801/LY294002併用処理による細胞増殖抑制効果の増強がWST-8 assayで示され(P<0.05)、この併用効果はcombination indexにより相乗的であることが判明した。Flow cytometryを用いた解析では、OBP-801/LY294002併用処理により著明なアポトーシス誘導効果が認められた(P<0.05)。このアポトーシス誘導効果はpan-caspase阻害剤であるzVAD-fmkによって有意に抑制され(P<0.05)、併用処理によるcaspaseの活性化がWestern blotにて確認された。また、併用処理により細胞内ROSの有意な蓄積がみられ、併用処理によるアポトーシスはROS scavengerであるNACによりほぼ完全に抑制された(P<0.05)。これらの結果より、OBP-801/LY294002併

用処理により誘導されるアポトーシスがcaspase依存性かつROS依存性であることが示唆された。また、2剤併用によりアポトーシス阻害分子であるsurvivinとXIAPの発現減少がWestern blotで確認され、この発現減少はNACにより阻害された。さらに、survivinとXIAPの過剰発現により2剤併用によるアポトーシスの部分的な抑制が認められた(P<0.05)。以上より、ROSを介したsurvivinとXIAPの下方制御がOBP-801とLY294002併用によるアポトーシスの分子機構の一つであることが示された。また、OBP-801は現在臨床で最も使用されているSAHAに比べ、LY294002との併用によるアポトーシス誘導効果が強いことが示された。

以上が本論文の要旨であるが、腎細胞癌において新規HDAC阻害剤OBP-801とPI3K抑制薬LY294002の併用がsurvivinとXIAPのROS依存的な下方制御により相乗的にアポトーシスを誘導することを示した最初の報告であり、これらの薬剤の併用による新たな腎細胞癌に対する治療戦略が期待できる点で、医学上価値ある研究と認める。

参考文献(6編)

- 1) Yoshioka T, Yogosawa S, Yamada T, Kitawaki J, Sakai T. Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumu-

- lation of ROS. *Gynecol Oncol* 2013; 129: 425-432.
- 2) Shinnoh M, Horinaka M, Yasuda T, Yoshikawa S, Morita M, Yamada T, Miki T, Sakai T. Clostridium butyricum MIYAIRI 588 shows antitumor effects by enhancing the release of TRAIL from neutrophils through MMP-8. *Int J Oncol* 2013; 42: 903-911.
- 3) 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; 87: 263-269.
- 4) Takaha N, Okihara K, Kamoi K, Kimura Y, Yamada T, Kawauchi A, Kobayashi K, Yamazaki H, Nishimura T, Miki T. Optimal duration of androgen deprivation in combination with radiation therapy for Japanese men with high-risk prostate cancer. *Urol Int* 2011; 87: 28-34.
- 5) Ukimura O, Hirahara N, Fujihara A, Yamada T, Iwata T, Kamoi K, Okihara K, Ito H, Nishimura T, Miki T. Technique for a hybrid system of real-time transrectal ultrasound with preoperative magnetic resonance imaging in the guidance of targeted prostate biopsy. *Int J Urol* 2010; 17: 890-893.
- 6) Okihara K, Kamoi K, Kanazawa M, Yamada T, Ukimura O, Kawauchi A, Miki T. Transrectal ultrasound navigation during minilaparotomy retropubic radical prostatectomy: impact on positive margin rates and prediction of earlier return to urinary continence. *Int J Urol* 2009; 16: 820-825.

論文提出者 隈 康彦

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 乙第2108号
 学位授与の日付 平成26年3月28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 奥田 司・教授 伊藤義人・教授 松田 修

論文題目及び掲載誌

Tsutsumi Y, Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Nishida K, Kobayashi S, Yokokawa Y, Taki T, Sasaki N, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Taniwaki M.

Deletion or Methylation of *CDKN2A/2B* and *PVT1* Rearrangement Occur Frequently in Highly Aggressive B-cell Lymphomas Harboring 8q24 Abnormality

Leukemia & Lymphoma 2013; 54: 2760-2764.

審査結果の要旨

Burkitt リンパ腫やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の一部を含む高悪性度 B 細胞リンパ腫では、8 番染色体長腕 q24 (8q24) 異常が高頻度に見られ、通常 *MYC* 遺伝子が関与していると考えられている。このうちの一部の *MYC* と *BCL2* (18q21) 異常が共存するリンパ腫を、WHO 分類 2008 では double-hit lymphoma (DHL) と分類している。DHL は DLBCL と Burkitt リンパ腫の中間型 (intermediate BL/DLBCL) に位置づけられ、一般に予後不良とされる。

申請者は、8q24 異常とともに B 細胞に特異的な遺伝子異常を同時に有する B 細胞リンパ腫 (DHL を含む) を分子細胞遺伝学的に解析した。病型の内訳は Burkitt-

like リンパ腫が 3 例、DLBCL が 5 例である。8q24 異常の検出は、5 例は G 分染法または SKY 法で、3 例は FISH 法で行った。FISH 法では、8q24 遺伝子再構成の検出のため、*MYC* プローブと BAC クローンから作製した *PVT1* 特異的プローブを使用した。また *IGH* 転座、*BCL2* 転座、*BCL6* 転座、免疫グロブリン λ 鎖転座ならびに *CDKN2A/2B* 遺伝子欠失の検出のため、それぞれに特異的な FISH プローブを使用した。その結果、4 例では 8q24 異常の切断点は *MYC* 遺伝子領域内に、2 例ではそのテロメア側の *PVT1* 遺伝子内に存在した。その他に *MYC* と *IGH* (*C γ*) の融合と、*MYC* と *PVT1* の増幅 (6-7 コピー) が、それぞれ 1 例で認められた。一方、*BCL2*

異常は5例 (*BCL2-IGH* 転座が4例, 高度増幅が1例) に認められ, *BCL6-IGH* と *BCL6-IGL* 転座を各1例に認めた. 1例では *MYC*, *BCL2*, *BCL6* の全てに異常がみられた. オリゴヌクレオチドアレイによるゲノムコピー数の解析では, 5例に9p21.3領域の欠失を認めた. その共通領域は *CDKN2A* (p14, p16 蛋白をコード) と *CDKN2B* (p15 蛋白をコード) のみが含まれる69kbに局限していた. 次にメチル化特異的PCR法でプロモーター領域のメチル化状態を検討したところ, *p16* と *p15* のメチル化をそれぞれ1例ずつ認め, 8例中7例で *CDKN2A/2B* 遺伝子が不活化していると考えられた. 8例はいずれも進行病期であり, リツキサンを含んだ免疫化学療法により3例で寛解が得られたが, 残り5例は病状が進行し, 全8例の生存期間中央値は6.7か月であった. このように8q24 (*MYC/PVT1*) と *BCL2* の両者の異常をもつ典型的なDHLの予後不良に, *CDKN2A/2B* の不活化が関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, double-hit lymphomaにおける *CDKN2A/2B* の不活化および *PVT1* の関与を明らかにしたことは, 高悪性度B細胞リンパ腫の悪性化のメカニズムを明らかにすることに貢献するものであり, 医学上価値ある研究と認める.

参 考 論 文 (3編)

副論文: Kobayashi T, Tsutsumi Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, Mizutani S, Matsumoto Y, Nishida K, Horiike S, Asano N, Nakamura

S, Kuroda J, Taniwaki M. Double-hit lymphomas constitute a highly aggressive subgroup in diffuse large B-cell lymphomas in the era of rituximab. *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42: 1035-1042.

- 1) Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nitta M, Otsuki T, Nishida K, Okuda K, Sakamoto N, Kobayashi S, Yamamoto-Sugitani M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Frequent *PVT1* rearrangement and novel chimeric genes *PVT1-NBEA* and *PVT1-WWOX* occur in multiple myeloma with 8q24 abnormality. *Cancer Res* 2012; 72: 4954-4962.
- 2) Kobayashi S, Taki T, Chinen Y, Tsutsumi Y, Ohshiro M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Identification of *IGHC δ-BACH2* fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 117: 2319-2331.
- 3) Sasaki N, Kuroda J, Nagoshi H, Yamamoto M, Kobayashi S, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Shimura Y, Matsumoto Y, Taki T, Nishida K, Horiike S, Akao Y, Taniwaki M. Bcl-2 is a better therapeutic target than c-Myc, but attacking both could be a more effective treatment strategy for B-cell lymphoma with concurrent Bcl-2 and c-Myc overexpression. *Exp Hematol* 2011; 50: 207-216.

論文提出者 外 崎 円

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	乙第2109号
学位授与の日付	平成26年3月28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 小野勝彦・教授 峯浦一喜

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Tonosaki M, Itoh K, Umekage M, Kishimoto T, Yaoi T, Lemmon VP, Fushiki S.
L1cam is Crucial for Cell Locomotion and Terminal Translocation for the Soma in Radial Migration during Murine Corticogenesis
PLoS One 2014; 9: e86186.

審 査 結 果 の 要 旨

神経細胞接着分子 L1cam (L1 cell adhesion molecule,

以下 L1) はヒトの X 染色体連鎖性水頭症の責任遺伝子と

して知られている。マウスの大脳皮質形成過程において、L1分子の発現抑制により皮質神経細胞遊走遅延や細胞分化方向の異常が生じることが報告されたが、そのメカニズムは未解明であった。

そこで、本申請者はタイムラプス観察による細胞動態解析を企図した。はじめにpGeneClip™ hMGFP vectorにL1を標的とした配列を組み込んだshRNAを5種類、スクランブル配列を組み込んだネガティブコントロールshRNAを作製した。発現ベクターを導入（以下、遺伝子導入）後に胎仔脳を取り出し200 μm厚の大脳壁スライスを作製し組織培養した。レーザ共焦点顕微鏡でタイムラプス画像を取得しL1の発現抑制が細胞遊走に及ぼす変化を対照細胞と比較解析した。

胎齢13.5日（E13.5）で遺伝子導入しE14.5で作製した脳スライスを用いて3日間観察したところ、L1発現が抑制された細胞（L1KD細胞）では中間帯での細胞遊走速度が48時間以降で有意に低下した（Student's *t*-test, *p* = 0.004）。E15.5で作製した脳スライスを用いた観察では、対照細胞は原皮質帯まで遊走後、先導突起がすばやく短縮することにより細胞体が皮質板の最上部まで引き

上げられた。これに対しL1KD細胞では、先導突起がより長くかつ彎曲していた。突起の曲線性の指標とした曲線度（Curvature Index）は、L1KD細胞では対照細胞に比して有意に増加していた（Student's *t*-test, 0h: *p* = 0.0431; 1h: *p* = 0.0193）。これらの結果より、哺乳類の大脳皮質形成過程における放射状遊走の各相の進行に、L1が機能的に極めて深く関わっていることが示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、shRNAを用いてマウス終脳・脳室層でL1ノックダウンを行うことにより、大脳皮質形成過程におけるL1の神経細胞移動への関与を細胞レベルで解明し、L1変異による遺伝性神経疾患の病態理解への示唆を得た点で、医学上価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (1編)

- 1) Kishimoto T, Itoh K, Umekage M, Tonosaki M, Yaoi T, Fukui K, Lemmon VP, Fushiki S. Downregulation of L1 perturbs neuronal migration and alters the expression of transcription factors in murine neocortex. *J Neurosci Res* 2013; 91: 42-50.

論文提出者 西 垣 勝

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	乙第2110号
学位授与の日付	平成26年3月28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 奥田 司・教授 伊藤義人・教授 中屋隆明

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Nishigaki M, Yamamoto T, Ichioka H, Honjo K, Yamamoto K, Oseko F, Kita M, Mazda O, Kanamura N.

β-cryptoxanthin Regulates Bone Resorption Related-cytokine Production in Human Periodontal Ligament Cells

Archives of Oral Biology 2013; 58: 880-886.

審 査 結 果 の 要 旨

歯周病の発生には、細菌感染だけでなく、非細菌感染であるメカニカルストレス（MS）も深く関与している。歯周組織の破壊を抑制するためには、歯根膜の特性を解明することが肝要である。これまでに申請者らは、ヒト歯根膜（h-PDL）細胞が歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) に対して多くのサイトカインを産生し、歯根膜に影響を与えることを報告してきた。さらに、生理的咬合圧と同等のMSが、歯根膜に対してサ

イトカイン産生誘導能を有することも明らかにされている。一方β-クリプトキサンチン（β-cry）は、近年、歯槽骨吸収を抑制すると報告されているが、この分子メカニズムは未だ明らかではない。そこで申請者らはβ-cryがh-PDL細胞における骨吸収に関連するサイトカイン産生にどのような影響を与えるか検討を加えた。

申請者らは、上顎智歯からh-PDL細胞を採取し、初代培養後に3から4代継代したものをを用いて検討を行った。

また、歯周病原菌としては、偏性嫌気性グラム陰性桿菌 *P.gingivalis* (ATCC 33277) を 5% 羊血寒天培地上で嫌気培養し、 1×10^7 CFU/ml に調整したものを使用した。まず培養 h-PDL 細胞を、 β -cry 刺激群、静水圧負荷装置による MS (1 ないし 6MPa, 60 分間) 負荷群 (MS 群)、そして *P.gingivalis* 刺激群 (細菌群) に分け、RT-PCR 法および ELISA を用いて各種サイトカインの発現を検討し対照群との比較を行った。また、倒立位相差顕微鏡を用いて、h-PDL 細胞の形態学的変化について鏡検を行い、検討を加えた。

結果として、h-PDL 細胞に β -cry 添加しても、IL (インターロイキン)-1 β 、IL-6、IL-8、そして TNF (腫瘍壊死因子)- α mRNA の発現は認められないが、*P.gingivalis* で刺激すると、これらサイトカインの mRNA の発現が誘導されることが示された。また、6MPa の MS 負荷によっても h-PDL 細胞の IL-6 や IL-8 mRNA の発現亢進が誘導されることも明らかにされた。重要なことに、こうした培養刺激系に β -cry を負荷させると、*P.gingivalis* および MS に対する h-PDL 細胞の IL-6、IL-8 産生量が有意に減少することを申請者らは見出している。他方、 β -cry は、h-PDL 細胞の形態や viability に影響を与えなかった。さらに申請者らは骨吸収に関与する RANKL と OPG 発現について検討をすすめて、培養 h-PDL 細胞に β -cry 添加しても RANKL mRNA 発現は誘導されないものの、OPG mRNA の発現が誘導されることを明らかにした。OPG 産生については ELISA による蛋白レベルでも確認された。こうした結果から、細菌感染のみならず生

理的咬合圧刺激によっても h-PDL 細胞からの炎症性サイトカインの産生が誘導されること、そして β -cry の投与は、こうした炎症性サイトカインの発現を抑えることが明らかにされた。

以上が本論文の要旨であるが、歯周病のメカニズムの一端を明らかにし、また新たな炎症・骨吸収予防法の可能性が示唆された点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (4 編)

- 1) 山本俊郎, 市岡宏顕, 山本健太, 赤松佑紀, 西垣勝, 大迫文重, 雨宮 傑, 坂下敦宏, 中村 亨, 喜多正和, 金村成智. β -cryptoxanthin がメカニカルストレスに対する歯根膜のサイトカイン産生に与える影響. 日歯保存誌 2011; 54: 88-96.
- 2) 雨宮 傑, 足立圭司, 赤松佑紀, 西垣 勝, 大迫文重, 山本俊郎, 金村成智. 羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞における免疫組織化学的検討. 日歯保存誌 2010; 53: 214-221.
- 3) 山本俊郎, 赤松佑紀, 西垣 勝, 大迫文重, 雨宮 傑, 中村 亨, 金村成智. *P.gingivalis* 感染に対するマウス心臓の炎症性サイトカイン発現. 日歯保存誌 2010; 31: 172-178.
- 4) Amemiya T, Adachi K, Nishigaki M, Yamamoto T, Kanamura N. Experiences of preclinical use of periodontal ligament-derived cell sheet cultured on human amniotic membrane. J Oral Tissue Engin 2008; 6: 106-112.