

博士の学位の授与に係る論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

報告番号	学位	氏名	題目	授与日
乙第2356号	医学	おかじまちさと 岡島 千怜	Anatomical and histological study to determine the border of sole skin (足底皮膚の境界を決定するための解剖学的および組織学的研究)	平成29年6月21日
乙第2357号	医学	かわむら しゅんすけ 川村 俊輔	Resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta might be dangerous in patients with severe torso trauma: a propensity score analysis (重症体幹外傷への大動脈遮断バルーンの使用は危険であるかもしれない: 傾向スコア分析を用いた解析より)	平成29年7月19日
乙第2358号	医学	とば あゆみ 鳥羽 梓弓	精神科救急病棟における患者・医療者の感情活用に関する考察～援助関係の形成と患者の回復に焦点を当てて～	平成29年9月6日
乙第2359号	医学	ごらい かつや 五来 克也	Direct label-free measurement of the distribution of small molecular weight compound inside thick biological tissue using coherent Raman microspectroscopy (小分子化合物の生物組織内での分布の、コヒーレントラマン顕微分光を用いた非標識での直接測定)	平成29年9月6日
乙第2360号	医学	ふるやま たかき 古山 貴基	In vivo evaluation of a Ti-based bulk metallic glass alloy bar (チタン基金属ガラス合金棒の生体内評価)	平成30年1月17日
乙第2361号	医学	にべ よういち 仁部 洋一	Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63 (オートファジーはCep63を介して中心体数を制御する)	平成30年2月7日
乙第2362号	医学	あべ やすこ 阿部 庸子	A comparison of the regional circulation in the feet between dialysis and non-dialysis patients using indocyanine green angiography (インドシアニングリーンを用いた透析患者と非透析患者の足部局所循環の比較に関する研究)	平成30年3月7日
乙第2363号	医学	おおた さきこ 太田 沙紀子	Anatomical and histological study to determine the border of sole skin (足底皮膚の境界を決定するための解剖学的および組織学的研究)	平成30年3月7日
乙第2364号	歯学	わたなべ たけし 渡邊 毅	Resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta might be dangerous in patients with severe torso trauma: a propensity score analysis (重症体幹外傷への大動脈遮断バルーンの使用は危険であるかもしれない: 傾向スコア分析を用いた解析より)	平成30年1月17日
乙第2365号	歯学	しすわんたー るんちわー SRISUWANTHA Rungtiwa	精神科救急病棟における患者・医療者の感情活用に関する考察～援助関係の形成と患者の回復に焦点を当てて～	平成30年3月7日
乙第2366号	学術	るーぶさいそん あも ROOBTHAISONG んらたな Amonrattana	Direct label-free measurement of the distribution of small molecular weight compound inside thick biological tissue using coherent Raman microspectroscopy (小分子化合物の生物組織内での分布の、コヒーレントラマン顕微分光を用いた非標識での直接測定)	平成29年9月7日

報告番号	学位	氏名	題目	授与日
乙第2367号	看護学	とおやま ひろこ 遠山 寛子	In vivo evaluation of a Ti-based bulk metallic glass alloy bar (チタン基金属ガラス合金棒の生体内評価)	平成29年6月14日

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	岡島 千怜
論文審査担当者	主査 植竹 宏之 副査 三宅 智、小嶋 一幸
論文題目	Prognostic role of Child-Pugh score 5 and 6 in hepatocellular carcinoma patients who underwent curative hepatic resection
(論文内容の要旨) <要旨> 肝細胞癌に対する安全な肝切除において肝予備能の維持が不可欠であり、術前の予備能判定には Child-Pugh 分類が汎用され、肝切除適応の多くは Child-Pugh 分類 A である。本研究では肝切除成績等を解析し、Child-Pugh 分類 A 内のスコア 5 点と 6 点による予後の差に関して明らかにする。 2000 年 4 月～2011 年 3 月に当科で施行した肝細胞癌初回肝切除症例 445 例のうち、予後が明かな Child-Pugh A 328 例を対象として、Child-Pugh スコア 5 点 253 例、6 点 75 例の 2 群に分け、解析を行った。 生存率、無再発生存率、再発時期の検討では、生存率は 2 年生存率：5 点-84.8%/6 点-76.2%、5 年生存率：5 点-70.8%/6 点-67.7%。無再発生存率は 2 年無再発生存率：5 点-52.0%/6 点-23.7%、5 年無再発生存率：5 点-30.5%/6 点-11.9%。Child-Pugh5 点と 6 点の生存率曲線、無再発生存率曲線に有意差を認めた。また、再発時期は 2 年以内再発率：5 点-38.5%/6 点-64.4%、5 年以内再発率：5 点-47.3%/6 点-70.0%。早期再発で有意差を認めた。 臨床病理学的因子の検討では年齢、性差、肝炎ウイルス、死亡原因（癌死、肝不全死）、腫瘍径・腫瘍個数および背景肝において、Child-Pugh 5 点と 6 点で有意差は認められなかった。 Child-Pugh スコア 5 点と 6 点には生存率、無再発生存率、早期再発率に有意差があり、他の肝機能検査よりも生存率、無再発生存率の判別能が高く、予後予測因子として有用であると考ええる。 <緒言> 肝細胞癌に対する安全な肝切除において肝予備能の維持が不可欠である。世界的に汎用されている肝予備能判定には Child-Pugh 分類があり、肝切除適応の多くは Child-Pugh 分類 A である。しかし、Child-Pugh 分類 A にはスコア 5 点と 6 点があり、一括して評価することの妥当性は検証されていない。本研究は肝切除成績等を解析し、そのスコア 5 点と 6 点の意義を明らかにすることを目的とした。	

<方法>

2001年4月から2011年3月までに、当科において施行した肝細胞癌初回切除症例445例のうち、Child-Pugh分類でclass Aは412例（92.6%）、class Bは31例（6.9%）、class Cは2例（0.4%）であった。

Child-Pugh分類 class Aで治癒度B以上の根治切除を行った症例が328例で、このうち他病死34例・経過不明32例を除いた予後が明かなChild-Pugh分類 class A 328症例を対象としてChild-Pugh score 5点 253例、6点 75例の2群に分け、臨床病理学的因子、生存・無再発予後、予後予測因子、再発形式などに関してretrospective に検討を行った。

<結果>

1) Child-Pughスコア5点群vs6点群に対する臨床病理組織学的因子の検討

初回治療時のデータにおいて、背景因子では平均年齢、性別、肝炎ウイルスに関してスコア5点と6点に関係する差は認めなかった。腫瘍因子では腫瘍マーカーのPIVKAIIがスコア6点で有意に高値を示したが、AFP値・腫瘍個数・腫瘍径・pvp・pvv・術式に関してはスコア5点と6点で有意な差を認めなかった。肝予備能に関する因子では血小板値は差を認めなかったものの、AST、ALT、PT%、ICG、Alb、T-Bil、D-Bil、肝障害度ではスコア5点群の方が肝機能は有意に良好であった。

2) 生存予後について

Child-Pughスコア5点群とスコア6点群の累積生存率・累積無再発生存率の有意差検定では、Child-Pugh分類A 全328症例の1年/2年/5年生存率は、それぞれ88.4%/78.1%/58.4%。Child-Pughスコア5点 253例では1年/2年/5年生存率は90.9%/82.5%/62.4%、無再発生存率は67.6%/51.8%/30.1%であり、Child-Pughスコア6点 75例では生存率は80.6%/68.0%/47.6%と無再発生存率は36.9%/16.0%/5.9%であった。スコア5点とスコア6点の有意差を検討したところ、累積生存率では $P<0.0001$ 、無再発生存率では $P=0.0001$ と有意差を認めた。

3) 予後因子の解析について

臨床病理組織学的因子と全生存率、無再発生存率に関して多変量解析を行い、全生存率と無再発生存率に寄与する独立予後因子について検討を行った結果、全生存率に延長に関してはChild-Pugh scoreとD-Bilが独立因子であり、無再発生存率に関してはChild-Pugh scoreとAFPとなった。Child-Pugh scoreは全生存率・無再発生存率の両方において予後予測因子と考えられる。

4) 再発形式・再発予後の検討

Child-Pugh分類A 全328症例のうち、再発症例は196例、無再発症例は132例。再発症例のうちChild-Pughスコア5点と6点が137例（69.9%）と59例（30.1%）。無再発症例では116例（87.9%）と16例（12.1%）であった。再発率はChild-Pughスコア6点（1年/2年/5年：63.1%/84.0%/94.1%）はスコア5点（1年/2年/5年：32.4%/48.2%/69.9%）に比し、有意に高かった。無再発症例における生存率は、Child-Pughスコア5点（1年/2年/5年：93.1%/81.3%/58.5%）がスコア6点（1年/2年/5年：86.1%/69.8%/56.9%）より有意差を認めた（ $P=0.0494$ ）。

<考察>

肝予備能は肝細胞癌に対する肝切除後の予後に重要な影響があると報告されており、特定の因子として血清アルブミン値やビリルビン値などが注目されている。しかし、実際には肝細胞癌に対する肝切除適応の肝予備能の評価には、世界的にChild-Pugh分類が汎用されている。

Child-Pugh分類はA、B、Cに分類され、肝機能障害を呈する症例では術後肝不全のリスクが高いため、肝切除の適応となるのは主にChild-Pugh A症例である。Child-Pugh A内でもスコア5点と6点を比較するとスコア6点の方が明らかに肝機能の低下を認めており、予後に差があるかどうかの検討を行った。

本研究ではChild-Pughスコア5点はスコア6点に対する生存予後、無再発生存予後について検討を行ったところ、Child-Pughスコア5点はスコア6点に比し全生存率や、無再発生存率において有意な差を示した。さらに、臨床病理学的因子に対する検討では、腫瘍に関する因子に有意差を認めず、肝機能に関する因子では、Child-Pugh分類に含まれる因子（血清アルブミン値や間接ビリルビン）だけでなく、トランスアミナーゼやICG、直接ビリルビンなどでも有意な差を認めた。

予後に関連する臨床病理学的因子の評価では生存予後と無再発予後の因子はかなり共通しており、その中でも肝機能に関する因子に関しては、ほぼ全てがスコア5点群と6点群の間に有意な差を示し、スコア6点群の生存率、無再発率はスコア5点群よりも低かった。一方、腫瘍個数や門脈浸潤、腫瘍マーカーなどの腫瘍因子や手術術式に関してはスコア5点群と6点群では有意な差を示さず、生存・無再発予後には関与しない可能性が高いと考えられた。

多変量解析ではChild-Pughスコアは生存予後、無再発予後の両方の独立した予後予測因子であることを示した。また直接ビリルビンは生存予後、AFPは無再発予後に関して有効な予後因子として示された。直接ビリルビンはChild-Pugh分類に属さない因子であり、肝実質の機能を推定する特異的なマーカーの一つで、生存予後に関する重要な因子であった。また、AFPは肝内再発に関連する腫瘍マーカーであり、無再発生存率の予後予測因子であることが示された。さらに無再発症例に対する予後の評価では、Child-Pughスコア6点群は5点群より生存率に有意な差を認め、スコア6点群の生存予後が悪い理由として、肝不全死の頻度が高い可能性も考えられた。

次に再発症例に対して再発と再発後の予後に対しても評価を行った。初回再発症例のChild-Pughスコア5点群はスコア6点群との比較で再発頻度は低く、累積無再発生存率も有意に良好であった。しかし、初回再発後からの生存率にはスコア5点群と6点群で有意な差は認められなかった。肝内再発に関しては原発癌の肝内転移か異時性多中心性発癌によって発生し、スコア6点群の再発率が高いのは、背景肝の発癌性が高いことに由来することが示唆された。Child-Pughスコア6点群は発癌性に関与している炎症や線維化がスコア5点群と比較して高度であるため、Child-Pughスコア6点群の方がスコア5点群に比べ、異時性多中心性発癌による高い発癌性を有している可能性がある。

以上の結果より、Child-Pughスコア5点群の生存率が6点群に比較して良いのは、再発の頻度が低いことが関与していると考えられる。

<結語>

Child-Pugh分類Aにおけるスコア5点群と6点群の全生存率と無再発生存率には有意差があり、肝

細胞癌症例の肝切除の予後因子として有効であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2356 号	岡島 千怜
論文審査担当者	主 査 植竹 宏之 副 査 三宅 智、 小嶋 一幸	
【論文審査の要旨】 1. 論文内容 本論文は「肝細胞癌治癒肝切除症例における、Child-Pugh スコア 5 点と 6 点の予後因子としての相違」を示した論文である。 2. 論文審査 1) 研究目的の先駆性・独創性 肝細胞癌に対する安全な肝切除において肝予備能の維持が不可欠であり、術前の予備能判定には Child-Pugh 分類が汎用され、肝切除適応の多くは Child-Pugh 分類 A である。Child-Pugh 分類 A はスコア 5 点と 6 点で構成されるが、5 点と 6 点において、肝癌の臨床病理学的な差や予後に差があるかは明らかではない。申請者は後方視的に 5 点と 6 点の差を検討しており、その着眼点は評価に値するものである。 2) 社会的意義 本研究で得られた結果は以下の通りである。 ① スコア 5 点に比し 6 点では、発生する肝癌の悪性度が高い可能性が示唆された ② スコア 6 点では、肝癌切除後の予後が不良であった。 これらは、Child A の中で 5 点と 6 点は手術適応や切除範囲、術後の補助療法などを均一にすべきではない可能性を示唆しており、極めて有用な研究成果であると考えられる。 3) 研究方法・倫理観 本研究は臨床検査データを用いた後方視的研究である。倫理的な配慮も十分に行われている。 4) 考察・今後の発展性 申請者は「今までは 5 点と 6 点を Child A として同等としてきた。しかし、今回の検討からは、6 点は少数であるが予後不良群を抽出している可能性があり、手術適応や術後管理を異なるものとしなければならない可能性絵がある」と考察している。今後、コホート研究や介入研究でこの仮説を証明することが期待される。 3. その他 特記事項無し 4. 審査結果 以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。		

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	川村 俊輔
論文審査担当者	主査 森尾 友宏 副査 仁科 博史、川又 紀彦
論文題目	Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs
(論文内容の要旨) 【要旨】 単球は炎症時にマクロファージや樹状細胞 (DC) に分化するため、宿主防御や組織病理に大きく寄与する。近年、マウスにおいて単球のみに分化する共通単球前駆細胞 (common monocyte progenitors; cMoP) が同定された。本研究では、ヒト臍帯血や骨髄中の古典的顆粒球-単球前駆細胞 (conventional granulocyte-monocyte progenitors; cGMP) 中に存在する CLEC12A^{hi}CD64^{hi} 亜集団分画において、ヒト cMoP を同定した。ヒト cMoP は他のミエロイド系細胞、リンパ球系細胞への分化能を持たず、単球のみに分化する。また、cGMP 集団の中に、顆粒球と単球のみに分化し DC やリンパ球への分化能を全く持たない細胞集団を同定し、修正型 GMP と定義した。以上の成果は、現在のヒトミエロイド系細胞の分化系譜に新たな分化経路を書き加えると同時に、その理解を広げるものである。 【序論】 単球やマクロファージ、DC などの単核貪食細胞は組織恒常性の維持や免疫反応において重要な役割を担っている。組織常在性マクロファージの大部分は卵黄嚢由来マクロファージであるが、腸管、心臓、肺、乳腺、真皮などの一部のマクロファージは骨髄の単球に由来する。さらに、炎症は単球の組織への浸潤を促進し、恒常的な宿主防御反応や炎症性疾患との関連が深い単球由来マクロファージや DC に分化する。 単球は骨髄中の造血系幹細胞 (HSC) にその起源があり、前駆細胞の連続的な分化を介して供給されている。近年、マウスにおいて Ly6c^{hi} 単球と Ly6c^{lo} 単球を生み出す共通単球前駆細胞 (cMoP) が同定された。マウス cMoP は DC と単球を供給する前駆細胞である単球-DC 前駆細胞 (MDP) から生み出されることが証明されている。一方、ヒトにおいてミエロイド系細胞の前駆細胞としては共通ミエロイド前駆細胞 (CMP)、赤芽球系前駆細胞 (MEP)、そして顆粒球-単球前駆細胞 (GMP) などが IL-3 受容体 (CD123)、Flt3 (CD135)、CD45RA などの表面マーカーを用いて同定されてきた。そして近年、ヒト MDP が同定され、この発見によって単球への分化能をもつヒト cMoP の存在が示唆された。 ヒト cMoP を同定するために、我々は単球-マクロファージに発現する CD64 と CLEC12A に着	

目し、この二つのマーカーを用いて古典的顆粒球-単球前駆細胞 (conventional granulocyte-monocyte progenitors; cGMP) を四つの亜集団に分類した。そしてこの亜集団中の、CLEC12A^{hi}CD64^{hi} 分画にヒト cMoP を発見した。重要なことに、ヒト cMoP と MDP は GMP 中に確かに存在しており、これは GMP が真の GMP と他の前駆細胞によって構成されていることを示唆していた。そして、我々は CLEC12A^{hi}CD64^{int} 分画に単球と顆粒球のみを産生する真の GMP (revised GMP; rGMP) を発見するに至った。以上、ヒト cMoP と rGMP の発見はヒトミエロイド系細胞の分化系譜に新たな視点を与えるものである。

【方法】

本研究ではヒト臍帯血より単核細胞を分取し、その細胞に発現する表面抗原 (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD16, CD56, CD235ab 以上は lineage marker、CD34, CD38, CD10, CD123, CD45RA, Flt3, CLEC12A, CD64) に対する蛍光標識モノクローナル抗体で染色、その後フローサイトメーター (FCM) を用いて cGMP を四つの亜集団 (CLEC12A^{hi}CD64^{hi}, CLEC12A^{hi}CD64^{int}, CLEC12A⁺CD64⁻, CLEC12A⁻CD64⁻) に分類し、分取する。分取した細胞集団はコロニーアッセイ、サイトカイン (Flt3L, SCF, TPO) を添加した *in vitro* 培養と FCM による解析、シングルセル分化アッセイ、マイクロアレイ解析、GSEA 解析などの手法を用いて精査され、それぞれの細胞集団が持つ特徴を明らかにした。

【結果】

cGMP 中に存在した四つの亜集団 CLEC12A^{hi}CD64^{hi}, CLEC12A^{hi}CD64^{int}, CLEC12A⁺CD64⁻, CLEC12A⁻CD64⁻ は以下のような分化能・特徴を有していた。

- CLEC12A^{hi}CD64^{hi} 分画：コロニー形成能を有し、そのコロニーはマクロファージ型であった。また、Flt3L, SCF, TPO を添加した *in vitro* 培養と FCM による解析により、CLEC12A^{hi}CD64^{hi} 細胞集団は単球のみに分化し、他のミエロイド系細胞やリンパ球への分化能を持たないことがわかった。さらに、網羅的転写解析により、単球の前駆細胞 (共通単球前駆細胞: cMoP) であること、またマウスの cMoP のカウンターパートであることが強く示唆された。
- CLEC12A^{hi}CD64^{int} 分画：コロニー形成能を有し、そのコロニーはマクロファージ型、顆粒球型そしてマクロファージ-顆粒球型であった。また、Flt3L, SCF, TPO を添加した *in vitro* 培養と FCM による解析により、CLEC12A^{hi}CD64^{int} 細胞集団は単球と顆粒球に分化し、他のミエロイド系細胞やリンパ球への分化能を持たないことがわかった。CLEC12A^{hi}CD64^{hi} 分画は CLEC12A^{hi}CD64^{int} 分画を介して分化することが *in vitro* の実験系によって示された。
- CLEC12A⁺CD64⁻ 分画：コロニー形成能を有し、そのコロニーはマクロファージ型、顆粒球型そしてマクロファージ-顆粒球型であった。また、Flt3L, SCF, TPO を添加した *in vitro* 培養と FCM による解析により、CLEC12A^{hi}CD64^{int} 細胞集団は顆粒球、単球、形質細胞様 DC、CD141⁺DC、CD141⁺DC への分化能を持つことがわかった。さらに、CLEC12A^{hi}CD64^{int} 細胞集団は NK 細胞、T 細胞への分化能を有していた。
- CLEC12A⁺CD64⁻ 分画：コロニー形成能を有し、マクロファージ型であった。また、Flt3L, SCF, TPO を添加した *in vitro* 培養と FCM による解析により、CLEC12A^{hi}CD64^{int} 細胞集団は

単球、形質細胞様 DC、CD141⁺DC、CD141⁺DC への分化能を持つことがわかった。さらに、CLEC12A^{hi}CD64^{int} 細胞集団は B 細胞、NK 細胞、T 細胞への分化能を有していた。

【結論】

cGMP 中に存在した四つの亜集団のうち、CLEC12A^{hi}CD64^{hi} は単球への分化能のみを有していたのでヒト cMoP として定義した。また、CLEC12A^{hi}CD64^{int} は単球と顆粒球への分化能を有しており現在まで定義されていた cGMP とは樹状細胞を産生しないという点で異なっていたため、同集団を真の GMP として新たに rGMP と定義した。

【考察】

本研究では cGMP よりヒト cMoP を同定するために、単球やマクロファージ、DC に発現する C-type lectin ファミリー (CLEC9a、CLEC12A、DC-SIGN など) やサイトカイン受容体 (CD115、CD116 など)、ケモカイン受容体 (CX₃CR1、CXCR4 など) やその他の表面抗原 (CD64 など) をスクリーニングした。その結果、cGMP 中に発現する C-type lectin である CLEC12A と FcγRI (CD64) を用いて cGMP が四つの亜集団に分かれることを見出し、最終的に rGMP とヒト cMoP を同定した。

さらに、マウス cMoP とヒト cMoP の比較を行いヒトマウス共に CLEC12A、CD64、そして CD117 を発現していたが、一方で、CD135 はヒト cMoP のみにその発現が認められることを明らかにした。また、マウス cMoP は MDP に由来することが報告されているが、ヒト cMoP は DC の分化能を持たない rGMP の下流に存在することが本研究で明らかとなっているため、ヒト cMoP は MDP ではなく rGMP の下流に存在することが示唆された。この違いがヒトとマウスのミエロイド系分化の違いを反映しているのか、またはマウス cGMP が未だ発見されていない rGMP を含むことに起因するものかは議論の余地がある。

また、今回 cGMP を四つの亜集団に分けたうち、CLEC12A⁺CD64⁻と CLEC12A⁺CD64⁺亜集団にはリンパ球への分化能が確認されたため、詳しい解析は行わなかった。これら分画はそれぞれ既に報告されている LMPP (lymphoid-primed multipotent progenitor) と MLP (multi-lymphoid progenitor) に似た分化能を持ち合わせているため、更なる解析が必要である。

ヒト cMoP は多くの単球を作り出し、単球はがん組織で腫瘍関連マクロファージ (TAM)、炎症性腸疾患で炎症惹起マクロファージ、骨疾患で破骨細胞に各々分化することが予想されるため、ヒト cMoP を標的とした新規治療法の開発が期待される。現在製薬企業との共同研究で、ヒト cMoP を標的とした治療薬の探索を進めている。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2357 号	川村 俊輔
論文審査担当者	主 査 森尾 友宏 副 査 仁科 博史、川又 紀彦	
【論文審査の要旨】 1. 論文内容 本論文はヒト顆粒球・単球系細胞の分化系譜において新たな分化経路を同定した論文である。 2. 論文審査 1) 研究目的の先駆性・独創性 近年、マウスにおいて Ly6c^{hi} 単球と Ly6c^{lo} 単球を生み出す共通単球前駆細胞（cMoP）が同定された。マウス cMoP は DC と単球を供給する前駆細胞である単球-DC 前駆細胞（MDP）から生み出される。一方、ヒトにおいてミエロイド系細胞の前駆細胞としては共通ミエロイド前駆細胞（CMP）、赤芽球系前駆細胞（MEP）、顆粒球-単球前駆細胞（GMP）などが同定されてきた。近年、ヒト MDP も同定されたが、単球への分化能をもつヒト cMoP の存在やその特性は明らかになっていない。そのような背景の下、申請者はヒト臍帯血を用い、表面抗原から様々な分画に分け、分化の各段階における細胞の特性を詳細に検討して分化経路を詳らかにしており、その着眼点は評価に値するものである。 2) 社会的意義 本研究で得られた主な成果は以下の通りである。 1) ヒト臍帯血や骨髄中の古典的顆粒球-単球前駆細胞（conventional granulocyte-monocyte progenitors; cGMP）中の CLEC12A^{hi}CD64^{hi} 亜集団分画において、ヒト cMoP を同定した。 2) cGMP 集団に、顆粒球と単球のみに分化し DC やリンパ球への分化能を全く持たない細胞集団：真の GMP（revised GMP: rGMP）を同定した。 3) CLEC12A+CD64-と CLEC12A+CD64-亜集団は単球、形質細胞様 DC などのミエロイド系細胞のみならず、リンパ球への分化能も有することを明らかにした。 以上のように申請者は主たる成果として、ヒト cMoP と rGMP の存在を明らかにしている。これはヒトミエロイド系細胞の分化系譜に新たな視点を与えるものである。また様々な働きを有する単球・樹状細胞の制御法開発などの点からも、臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。 3) 研究方法・倫理観 本研究ではヒト臍帯血由来単核細胞を用い、発現する表面抗原（lineage marker、CD34、CD38、		

CD10、CD123、CD45RA、Flt3、CLEC12A、CD64) に対するモノクローナル抗体で染色し、フローサイトメーター (FCM) にて cGMP を四つの亜集団 (CLEC12A^{hi}CD64^{hi}、CLEC12A^{hi}CD64^{int}、CLEC12A⁺CD64⁻、CLEC12A⁻CD64⁻) に分けて分取した。得られた細胞集団はコロニーアッセイ、サイトカインを添加した *in vitro* 培養、FCM による解析、シングルセル分化アッセイ、マイクロアレイ解析、GSEA 解析などの手法を用いて精査して、各細胞集団が持つ特徴を明らかにした。本手法は十分な免疫学的知識と優れた実験手技のもとで遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術が十分に高いことが示された。また本研究が極めて周到な準備の上に行われたことが窺われる。

4) 考察・今後の発展性

ヒト cMoP は単球を生成し、単球はがん組織で腫瘍関連マクロファージ (TAM)、炎症性腸疾患で炎症惹起マクロファージ、骨疾患で破骨細胞などに分化することが予想される。これらから申請者は本研究結果を発展させることにより、ヒト cMoP を標的とした新規治療法の開発が期待されるとしている。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。またリンパ球系にも分化する cGMP 亜群など今後検討を進める価値のある新しい課題が残されており、今後の研究の発展が期待される。

3. その他

4. 審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士 (医学) の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	鳥羽 梓弓
論文審査担当者	主査 古川 哲史 副査 平尾 見三、沢辺 元司
論文題目	Impact of age on left ventricular geometry and diastolic function in elderly patients with treated hypertension
(論文内容の要旨) <要旨> 高齢高血圧患者において、左室の形態、機能変化（左室リモデリング）は多く観察される病態であり、高齢者心不全の重要な誘因である。557名の平均年齢 74 ± 8.6 歳の高血圧患者において心臓超音波検査と24時間自動血圧測定検査を施行しその左室形態、機能と年齢、血圧などの関連性を調査した。対象患者のうち41.1%は左室肥大を呈し、77.9%は左室相対壁厚の増加（左室相対壁厚 > 0.42）を呈し31.8%は双方を満たしていた。全患者群においては、左室相対壁厚の増加は24時間収縮期血圧と年齢に相関していたが、左室肥大を除いた患者群においては左室相対壁厚の増加は年齢のみと相関していた。また、拡張機能に関する各種パラメーターは左室機能の影響を加味しても年齢と相関を持っていた。結果、年齢は、左室肥大の影響と独立して左室相対壁厚の増加と拡張機能の変化に関連していた。 <緒言> 心臓リモデリングとは、加齢と共に進行する左室の形態と機能の変化であり心血管イベントの発症と死亡とに関連があることが報告されている。 加齢と左室リモデリングとの関連は多くの研究でなされているが、左室リモデリングに影響する因子として高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満、慢性腎不全など様々なものが存在し、これらは加齢に従って進行するため、年齢が直接的に左室リモデリングに及ぼす影響は明らかになっていない。左室形態は左室心筋重量と左室相対壁厚を用いて次の4つの分類に分けられる。①正常（左室心筋重量、左室相対壁厚ともに正常）②求心性リモデリング（左室心筋重量正常、左室相対壁厚増加）③遠心性肥大（左室心筋重量増加、左室相対壁厚正常）④求心性肥大（左室心筋重量、左室相対壁厚ともに増加）左室相対壁厚と年齢の直接的な関係は明らかになっておらず、本論文ではこの関係性について評価を行っている。 また、拡張機能は年齢と共に増悪することが明らかになっているが、拡張機能に関しても左室の形態変化が及ぼす影響が存在する。本論文では左室形態の影響を考慮した上で拡張機能と年齢の直接的な関係について評価を行っている。	

<方法>

東京都健康長寿医療センター循環器外来に2005年1月から2007年6月の期間に通院中の高血圧患者1500名（年齢60歳以上）のカルテより後ろ向き調査を行い、病歴、薬歴、24時間自動血圧、心臓超音波の所見を評価した。心房細動、中等度以上の弁膜症、虚血性心疾患、拡張型または肥大型心筋症、壁運動異常、左室収縮率<50%、重度の拡張機能障害は除外した。また、自動血圧データがアーチファクトにより10%以上測定できていなかったものも除外し、最終的な対象患者数は557名であった。24時間自動血圧測定により24時間の平均収縮期血圧、拡張期血圧の測定、心臓超音波により左室心筋重量、左室相対壁厚、僧帽弁口血流速波形にて拡張早期波高、心房収縮期波高、拡張早期波の減速時間を測定した。左室形態は以下の通り定義した。求心性リモデリング（左室心筋重量 $\leq 104\text{g/m}^2$ 、左室相対壁厚 >0.42 ）、遠心性肥大（左室心筋重量 $>104\text{g/m}^2$ 、左室相対壁厚 ≤ 0.42 ）、求心性肥大（左室心筋重量 $>104\text{g/m}^2$ 、左室相対壁厚 >0.42 ）

<結果>

557名のうち左室形態が正常のものは71名（12.7%）、求心性リモデリングは257名（46.1%）、遠心性肥大は52名（9.3%）、求心性肥大は177名（31.8%）であった。24時間収縮期血圧は求心性肥大群で他の群と比較し有意に高値であった。全患者を対象として左室形態の変化を従属因子として多変量解析を行ったところ、24時間収縮期血圧は左室肥大、左室相対壁厚の増加（左室相対壁厚 >0.42 ）と独立して関連し、年齢は左室相対壁厚の増加のみと関連していた。左室肥大を除いた328名を対象として同様に左室形態の変化を従属因子として多変量解析を行ったところ、年齢のみが左室相対壁厚の増加と関連していた。

拡張機能のパラメーターを従属因子として多変量解析を行うと、いずれのパラメーター（拡張早期波高、拡張早期波高と心房収縮期波高の比、拡張早期波の減速時間、拡張早期波の減速時間と拡張早期波高の比）も年齢と独立して関連していた。

<考察>

高齢高血圧患者において、年齢は左室機能の変化と独立して左室相対壁厚の増加と関連していた。また、年齢は左室形態の変化と独立して左室拡張機能と関連していた。

高齢高血圧患者で最もよく見られる左室形態変化は求心性リモデリングである。求心性リモデリングの形態を持つ患者群は正常形態を持つ患者群よりも予後不良であり、求心性肥大は前述の4つの形態のうち最も心血管死や心不全の発症が多い。つまり、求心性の変化（左室相対壁厚の増加）は肥大の合併有無を問わず高齢高血圧患者において有害であると言える。

これまで、求心性変化と年齢との関連に関しては一貫した報告がなく、その理由として高血圧による左室の肥大性変化が求心性変化と相互作用し直接的な関連の評価を困難にしていた可能性がある。本論文では左室肥大を加味しても求心性変化（左室相対壁厚の増加）と年齢の関連性を示したことに意義があると考ええる。また、拡張機能は加齢によっても左室肥大によっても増悪することが報告されている。しかし加齢による拡張機能の変化が左室肥大と独立して起こることは明確になっていない。本論文では年齢と拡張機能が左室形態と独立して関連したことを示し、加齢による拡張機能低下が直接的な関与であることを示唆した。

加齢により求心性リモデリングが進行することは以下の関連が推察される；加齢による心筋細胞数の減少、残存心筋細胞の肥大、老化心筋細胞の異常な代謝エネルギー、心筋細胞自体の拡張障害や間質の線維化。左室リモデリング（求心性リモデリングと拡張機能低下）は心血管罹患率、死亡率に関連しているためリモデリングの予防は非常に重要である。血圧管理はさることながら、心筋細胞の加齢性変化を遅らせる可能性のある ω -3 脂肪酸やマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）インヒビターである TIMP、マイクロ RNA-34a の調節因子などが注目されており、今後の治療への発展が望まれる。

< 結論 >

年齢は、心不全や加齢性疾患に影響を及ぼす左室リモデリングと独立して関連している。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2358 号	鳥羽 梓弓
論文審査担当者	主 査 古川 哲史 副 査 平尾 見三、沢辺 元司	
【論文審査の要旨】		
1. 論文内容		
東京都健康長寿医療センターで、年齢 60 歳以上の高齢者で高血圧を有する患者で 24 時間自動血圧測定と心臓超音波検査を行った 1500 名中、心房細動、弁膜症、心筋症などのいくつかの除外項目を持たない 557 名を標本とした。これらの左室形態を、心臓超音波検査から求心性リモデリング、求心性肥大、遠心性肥大の 3 群に分け、臨床的背景、血圧、心臓超音波検査結果からこれらと関係する因子を多変量回帰分析により検討した。求心性リモデリングに、収縮期血圧と年齢が独立した因子として関係し、拡張機能に年齢と相対的左室壁厚が関係した。以上から、加齢は HEpEF の特徴とされる求心性リモデリングおよび拡張機能障害に独立した因子として関与することが示唆された。		
2. 論文審査		
1) 研究目的の先駆性・独創性		
高齢者における心不全では、左室駆出率などの収縮機能は保たれ、拡張機能が障害される HEpEF と呼ばれる特殊な病態を取るものが多いことが知られている。高齢者では、夜間高血圧が多く、これが心臓の形態に及ぼす影響が関係すると考えられているが、加齢自身が心臓の形態に及ぼす影響は知られていない。そこで、加齢の心臓形態に及ぼす影響を検討している点が、独創的である。その結果、加齢が左室肥大を伴わない相対的左室重量の増加と関係することは、高齢者で HEpEF が多いことと整合性のある結果であり、先駆性の高い研究といえる。		
2) 社会的意義		
心不全は、5 年生存率が 50%を割っており、また 70 歳以上の高齢者に多いことから、超高齢化社会を迎えたわが国ではその対策が社会的に求められている。高齢患者の集まる東京都健康長寿医療センターのデータの多数例を使った加齢の心臓形態に及ぼす影響の研究は、極めて社会的意義が高いものである。		
3) 研究方法・倫理観		
倫理観には特別に問題がない。高血圧と関係なく加齢の心臓形態に及ぼす影響を検討することを目的としているのに、高血圧患者に標本を絞った点は若干問題がある。非高血圧患者に限った解析を検討することが妥当だったのではないかと思われる。		

4) 考察・今後の発展性

加齢が、左室肥大を伴わない相対的左室重量の増加に関係する、という興味深い結果が得られた。この機序を、東京都健康長寿医療センターにおける連続剖検例を使って検討する基礎的な研究、およびこれらの臨床的特徴や予後などとの関連を研究する臨床的な研究へ展開することが期待される。

3. その他

特記事項なし。

4. 審査結果

最終諮問では、パワーポイントを用いた発表の後、論文に関する様々な質問を行った。質問では、研究デザイン、統計方法、結果の解釈、先行研究との相違点、研究、特に後ろ向き研究の限界、臨床的意義、など多岐にわたる質問を行った。特に、高血圧とは関係なく加齢の心臓形態に及ぼす影響の解明が目的である研究で、高血圧患者に標本を絞ることが妥当か、多変量回帰解析だけで両者が無関係と結論してよいのか、などに関して踏み込んだ質問を行ったが、おおむね満足のいく回答が得られた。副査の平尾教授、沢辺教授と協議の上、博士（医学）の授与に値する学識を十分に有すると判定する。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	五来 克也
論文審査担当者	主査 横関 博雄 副査 田邊 稔、中川 剛士
論文題目	Prediction of Skin Necrosis after Mastectomy for Breast Cancer Using Indocyanine Green Angiography Imaging
(論文内容の要旨) 本研究の背景と目的 乳癌手術における乳腺全摘術 (Simple mastectomy:Bt) は、乳輪乳頭を含め菱形に皮膚を切除し、その切開創から皮下乳腺の全摘を行う手術である。乳房再建には癌切除と同時に行う一次再建と、癌切除からしばらく時間が経過した後改めて行う二次再建がある。一次再建は手術回数が少なく済むことと、患者の乳房喪失感が軽減されることから、再建適応・希望患者にとっての第一選択となる。一次再建では、癌切除と同時に大胸筋下に組織拡張器 (Tissue Expander:TE) を挿入し、切除された分の皮膚を拡張しなければならない。これは術後 2～3 週間毎に TE 内に生理食塩水を注入することによって、数ヶ月かけて目標の大きさまで拡張する。拡張が終了した後、TE を抜去し、人工物 (Silicone Breast Implant:SBI) や自家組織で乳房を再建する。外観上再建乳房の表面を形成するのは拡張された胸部皮弁であるため、これを十分拡張できるかどうかは最終的な整容性に大きな影響を及ぼす。特に再建乳房を被覆する手段が胸部皮弁しか選択肢がない SBI による再建では極めて重要である。胸部皮弁の一部に壊死が生じ、その壊死創が広範で深い場合などは、二次治癒した部位が瘢痕拘縮を生じ、十分な皮膚の拡張が妨げられ、最終的な再建乳房の整容性が低下する。また壊死創から TE 感染を合併し、抜去を余儀なくされるケースもある。さらに壊死創の外科的な追加治療が必要となることで、本来の目的である癌治療において、術後の後治療 (化学療法や放射線照射など) が必要になった場合に、その開始時期が遅延し治療の妨げになる可能性がある。よって再建を行う形成外科の立場からは、術中に皮弁の損傷具合や血流状態を評価し、術後の創壊死を可能な限り予防する必要がある。 皮弁の血流を術中に評価する方法として、ICGA(Indocyanine Green Angiography)が有用である。ICGA に用いる PDE(Photo Dynamic eye : 浜松ホトニクス社製)は、励起光に対する ICG の反射光を可視化できる近赤外線カメラであるが、乳癌のセンチネルリンパ節の同定や、下肢のリンパ管造影などに幅広く応用されている。局所への注入で使用するが多いが、ICG を静注した後 PDE で皮膚を観察すると、深さ 2cm 程度までの細小血管を描出することが可能である。この ICGA を、乳癌切除後に TE を挿入した後の閉創前に行い、造影効果が不十分な血行不良と思われる皮膚の範囲をモニター上で判断して、予めトリミングすることで創壊死を予防する。この方法は非常に有効であるが、実際には造影所見のみで壊死するのか生きるのかを明確に判断する	

ことが困難な場合があり、トリミングするか否かを迷うケースがある。疑わしい領域全てをトリミングしてしまうと、閉創時に皮膚に過剰な緊張がかかり、それが原因で壊死に至るケースも考えられるため、より精度の高いトリミングを行うことが重要である。モニター上の造影所見以外に、客観的評価の指標として有用なのは相対輝度値(relative perfusion:RP)である。しかしながら、RP にも皮膚が壊死する場合と生きる場合の両方の可能性を有する境界領域が報告されており、判別困難なケースが存在する。

本研究の目的は、ICGA によるトリミング範囲決定法の精度を向上させるため、RP 以外の客観的な指標となり得るパラメーターを発見することである。今回検証を試みたのは、RP に加え、ICG 造影後最高輝度に到達するまでに要する時間(time:T)と、最高輝度へ到達するまでの増加率(slope:S=RP/T)である。これら 3 つの値を壊死部と非壊死部に分けて測定し、両群の差を比較検討した。さらに各パラメーターの壊死発生予測における感度、特異度を求め、皮膚壊死発生との関連性を検証した。

対象と方法

2012 年 4 月から ICGA によって術中にトリミング範囲を決定する方法を導入した。対象は静岡がんセンターで行われた乳腺全摘術に対する TE による一次再建例で、2014 年 8 月までの 81 例に対して行った (ICGA 施行群)。本法導入による臨床的な効果をまず立証する比較対象として、2006 年 4 月から 2012 年 3 月までに行った乳腺全摘術に対する TE 挿入一次再建例を用いた。これらは従来通り、執刀医の臨床的な判断で術中皮膚トリミングを行なったケースで、100 例(ICGA 未施行群)を対象とした。はじめに両群間における術後の創壊死率を比較し、ICGA 導入による壊死予防効果を検証した。2 番目に、本研究の目的でもある新たな客観的指標を見出すため、RP に加え T と S をその候補として検証する方針とした。方法としては、術後実際に壊死した部位と壊死しなかった部位を写真撮影で記録し、術中の ICGA 画像と照らし合わせ位置を確定し、上記 3 つのパラメーターを測定した。測定は ROI(resion of interests)Analysis software を用いて行なった。このソフトは ICGA の動画ファイルを PC 上で取り込み、指定したポイントの RP、T、S を同時に計測できるものである。この計測によって、将来的に壊死に陥る部位と生きる部位の各パラメーター実測値を集計し、壊死予測における感度、特異度、カットオフ値を求め、皮膚壊死発症との関連性を検討した。

結果と考察

第一段階である ICGA による予防的トリミング導入の効果に対する検証においては、ICGA 非施行群と ICGA 施行群で壊死率を比較したところ、それぞれ 31.7%、20.5% ($p=0.0961$) で、統計学的には有意な差を認めなかった。しかし ICGA 導入によって、外科的な治療を要する Grade III (皮下組織に達する壊死) の壊死を生じるケースが有意に減少し、患者への負担が軽減できたと考えられた。

本研究の最終目的である、新たな客観的指標を見出すための検証では、壊死部と非壊死部の両群間で、測定値 RP、S において統計学的に有意な差を認めた ($p<0.001$)。特に RP のカットオフ値は 34、感度は 83.8%、特異度は 98.5%と、特異度が高い傾向にあった。一方 S においては、

S0-50（最高輝度 R_{pmax} の 1/2 の値に達するまでの増加率）のカットオフ値が 0.4、感度 92.5%、特異度 76.9%、S0-100(開始から R_{pmax} に達するまでの増加率)は 0.2、91.3%、73.8%で、いずれも感度が高いという結果であった。これらを総合すると、基本的なトリミングの方針として、 R_p が 34 未満で S が小さく、緩やかに造影されていく部位は、予防的トリミングが必要であると推測される。また R_p が 34 以上にも関わらず、肉眼的に周囲の造影濃度より染まりが悪くトリミングせず温存することに迷うケースでは、S0-50 と S0-100 の値を確認し、両者が前述したカットオフ値より低い場合には、トリミングを考慮するべきであると推測される。

今回の検討で、新たなパラメーター単独で、壊死と非壊死部を予測することは不可能であった。しかし、従来から客観的指標として報告されている R_p に、増加率である S という新たなパラメーターを加えることで、今までトリミングに迷っていたエリアの正診率が向上する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2359 号	五来 克也
論文審査担当者	主 査 横関 博雄 副 査 田邊 稔、中川 剛士	
(論文審査の要旨) 1、論文内容 乳癌手術の乳腺全摘術後の TE(Tissue Expander)による同時再建では、胸部皮弁の創壊死が問題となっている。問題を解決するためには再建を行うときに術中に皮弁の損傷具合や血流状態を評価し、術後の壊死を可能な限り予防することが重要である。皮弁の血流を術中に評価する方法としては、ICGA(Indocyanine Green Angiography)が有用である。 申請者は近赤外線カメラである PDE(Photo Dynamic eye：浜松ホトニクス社製)を用いて、胸部皮膚の造影画像を映し出すことにより血流が悪い部位を肉眼的に判断し、その部位を予めトリミングすることで、術後の創壊死率の減少を試みた。その結果、ICGA 非施行群と ICGA 施行群間で術後の壊死率を比較したところ、それぞれ 31.7%、20.5% (p=0.0961) で、統計学的に有意な差を認めなかったが、ICGA 施行群において壊死率の低下を認めた。また壊死部と非壊死部の両群間で、客観的指標の候補とした各測定値を比較したところ、相対輝度値 (RP) RP、造影後最高輝度に到達するまでに要した時間(T)(S0-50、S50-100、S0-100)で統計学的に有意な差を認めた (p<0.001)。特に RP のカットオフ値は 34、感度は 83.8%、特異度は 98.5%、S0-50 のカットオフ値は 0.4、感度 92.5%、特異度 76.9%、S0-100 は 0.2、91.3%、73.8%で、RP は特異度が高く、最高輝度へ到達するまでの増加率(S=RP/T) は感度が高いことが示唆される結果であった。今回検証を試みたのは、RP に加え、造影後最高輝度に到達するまでに要した時間(T)と、最高輝度へ到達するまでの増加率であるがそれぞれ感度、特異度が高く今後壊死予測の指標として有用である可能性が示唆された。 2、論文審査 1) 研究目的の先駆性・独創性 申請者が近赤外線カメラである PDE を用いて、胸部皮膚の造影画像を映し出すことにより血流が悪い部位を肉眼的に判断し、その部位を予めトリミングすることで、術後の創壊死率の減少を試みた点と RP に加え、造影後最高輝度に到達するまでに要した時間(T)と、最高輝度へ到達するまでの増加率が壊死予測の指標として有用であることを明らかにした点は独創的で評価に値する。 2) 社会的意義 本研究で得られた結果は 1. 近赤外線カメラである PDE を用いて、胸部皮膚の造影画像を映し出すことにより血		

流が悪い部位を肉眼的に判断し、その部位を予めトリミングすることで、術後の創
壊死率の減少が期待できる点は臨床的に有意義である。

2. 相対輝度値 (RP) RP、造影後最高輝度に到達するまでに要した時間(T)、 最高輝度
へ到達するまでの増加率($S=RP/T$) がトリミングを行ううえで有用なマーカーであ
り治療アルゴリズムに使用できることを明らかにした点は臨床的に有意義である。

3. 研究方法・倫理観

研究にはICGAによって術中トリミング範囲を決定する方法を導入している。対象は乳腺全摘
術に対するTEによる同時再建例で、本法導入による臨床的な効果を検証する比較対象として、
乳腺全摘術に対するTEによる同時再建例を用いている。申請者の形成外科的手技、血流を測定
する研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周
到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

3、審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があると認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	古山 貴基
論文審査担当者	主査 清水 重臣 副査 石川 俊平、植竹 宏之
論文題目	Proteasome activity is required for the initiation of precancerous pancreatic lesions
(論文内容の要旨) <要旨> 一般に進行癌ではプロテアソーム活性が亢進している。しかし発癌におけるプロテアソーム活性の動態は、そのモニタリングが困難なことから知見に乏しい。本研究では、<i>Kras</i> 誘発性の膵発癌におけるプロテアソーム活性を <i>in vivo</i> にて可視化し、解析することを目的とした。<i>in vivo</i> におけるプロテアソーム活性可視化のため、ZsGreen-degronODC (Gdeg) レポーターを導入した新しい遺伝子改変マウスモデルを作成した。<i>Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}</i> マウスとの組み合わせにより、膵前癌病変である PanIN におけるプロテアソーム活性の解析を行った。<i>Gdeg</i> マウスの正常膵組織は Gdeg の蓄積を認め、プロテアソーム活性が低い状態であった。一方、<i>Gdeg;Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}</i> マウスにおける PanIN ではプロテアソーム活性の上昇が明瞭に観察された。Caerulein 投与を行うと膵組織におけるプロテアソーム活性の恒常的な上昇が観察されるとともに、PanIN 形成が促進された。プロテアソーム阻害剤の投与を行うと PanIN 形成が有意に抑制されたが ($P=0.001$)、一方で PnaIN 形成後にプロテアソーム阻害剤を投与しても PanIN の抑制効果は認められなかった。このことより、プロテアソーム活性は PanIN の発症段階に必要であることが示された。さらに、プロテアソームの阻害により PanIN 内の pERK および cyclin D1、NF-κB、Cox2 を含む pERK 下流の因子の発現低下が認められた。本研究により、PanIN の発症においてプロテアソーム活性の上昇が極めて重要な役割をもつことが示された。 <緒言> 膵癌はヒトのあらゆる悪性疾患の中で最も予後が不良であり、新規治療の開発が強く望まれている。膵発癌において最も早期に見られる遺伝子変異は <i>KRAS</i> の活性型変異であり、<i>KRAS</i> の恒常的活性化が膵発癌に重要である。また、<i>KRAS</i> 変異をもつ癌細胞はプロテアソームに強い依存性をもち、プロテアソーム阻害剤が合成致死的効果をもたらすことが報告されている。そのためプロテアソームは膵癌治療における標的の 1 つとして期待されるが、特に発癌の初期段階におけるプロテアソームの動態に関する知見は乏しい。その理由として、<i>in vivo</i> でのプロテアソーム活性の評価が困難なことが挙げられる。今回、我々は ZsGreen-degronODC(Gdeg)レポーターシステムを応用し、<i>in vivo</i> におけるプロテアソーム活性の可視化を可能とした新たな遺伝子改変マ	

ウスを確立した。本モデルを用いて膵前癌病変 PanIN の発症におけるプロテアソーム活性の動態およびその意義を明らかにした。

<方法>

ornithine decarboxylase(ODC)の degron 配列は非ユビキチン化のまま直接的にプロテアソームに認識され、速やかに蛋白分解作用を受ける。ZsGreen-degronODC (Gdeg) レポーターは緑色蛍光色素 ZsGreen と ODC degron 配列の融合蛋白 Gdeg を発現し、プロテアソーム活性低下時に Gdeg の細胞内蓄積を引き起こす。この Gdeg レポーターを遺伝子導入した新たな遺伝子改変マウス (*Gdeg* マウス) を作成した。*Gdeg* マウスを PanIN 発症モデルとして確立されている *Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* マウスと交配し、caerulein の投与を行うことで PanIN を誘発し、PanIN におけるプロテアソーム活性を評価した。次いで、Caerulein とプロテアソーム阻害剤の同時投与を行い、PanIN 発症におけるプロテアソーム活性の意義を検証した。また、Ras の主要な effector である pERK およびその下流の経路につき免疫組織学的解析を行い、プロテアソームとの関連性を検討した。さらに、Caerulein を投与し PanIN を形成させた後にプロテアソーム阻害剤を投与し、PanIN 形成後のプロテアソーム阻害の効果についても検証を行った。

<結果>

①*Gdeg* マウスの解析

Gdeg レポーター遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (*Gdeg* マウス) を作成した。*Gdeg* マウスの組織学的解析では、膵臓に顕著な *Gdeg* の蓄積を認めた。免疫染色の結果、amylase 陽性の膵腺房細胞に *Gdeg* の蓄積が認められ、膵腺房組織は通常状態では低プロテアソーム状態であった。一方で islet cell や cytokeratin 陽性の duct cell には *Gdeg* の蓄積は認められなかった。

②Caerulein 投与によるプロテアソーム活性の一過性変化

Caerulein による刺激が *Kras* 誘発性の PanIN 形成を促進することがこれまでに報告されている。*Gdeg* マウスに Caerulein を投与し、プロテアソーム活性の変化を検証した。膵腺房細胞における *Gdeg* は Caerulein 投与後 1 日で一旦減少したが、投与後 2 週間で回復が見られた。これらの観察から、Caerulein 投与が膵腺房のプロテアソーム活性を一過性に上昇させることが判明した。

③*Kras* 誘発性 PanIN におけるプロテアソーム活性の可視化

PanIN におけるプロテアソーム活性の観察のため、*Gdeg;Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* マウスを作成した。caerulein の投与を行わないと *Gdeg;Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* マウスの膵臓は形態学的にほぼ正常であり、PanIN の形成はごくわずかであった。膵腺房には多くの *Gdeg* 蓄積を認めたが、PanIN 領域では細胞内 *Gdeg* が完全に消失していた。caerulein の投与を行うと PanIN の形成は著明に促進され、PanIN 領域ではやはり *Gdeg* の細胞内蓄積は全く観察されなかった。以上の結果より、PanIN においてプロテアソーム活性が上昇していることが示された。

④プロテアソーム阻害による PanIN の抑制

PanIN 発症におけるプロテアソーム活性上昇の意義を検証するため、MG132 によるプロテアソームの阻害を行った。Caerulein と MG132 を同時投与した結果、膵組織内のプロテアソーム活性の上昇が抑えられるとともに PanIN 形成は有意に減少した ($P = 0.001$)。

⑤プロテアソーム阻害に伴う PanIN 内での Ras シグナル関連蛋白の発現変化

PanIN 発症におけるプロテアソーム阻害の影響をさらに検証するため、免疫組織染色による解析を行った。Ras の主要な effector の 1 つである pERK は PanIN において強い発現を認めたが、プロテアソーム阻害は PanIN における pERK の陽性細胞の割合を有意に減少させた。さらに pERK の下流の因子を解析したところ、cyclin D1 や NF- κ B、Cox2 の陽性細胞の割合も同様にプロテアソーム阻害により有意な減少が認められた。

⑥PanIN 形成後のプロテアソーム阻害の効果

さらに我々は PanIN が形成された後にプロテアソーム阻害剤を投与しその効果を検証した。結果、プロテアソーム阻害剤による PanIN 抑制は認められなかった。また免疫組織染色においても、PanIN 内での pERK、cyclin D1、NF- κ B、Cox2 の陽性細胞数に有意な変化は認められなかった。

< 考察 >

一般に癌細胞においてプロテアソーム活性は亢進しており、プロテアソームに対する依存が見られる。このように進行癌においてプロテアソームは重要な役割を持つが、発癌初期におけるプロテアソームの知見は乏しい。本研究で我々は *in vivo* におけるプロテアソーム活性を評価するために、Gdeg レポーターを導入した新たな遺伝子改変マウスを作成した。

Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D} マウスとの組み合わせにより、我々は PanIN 発症におけるプロテアソーム活性上昇の可視化に成功した。プロテアソーム阻害剤の投与により PanIN の形成は有意に減少が認められた。一方で PanIN がいったん形成された後ではプロテアソーム阻害剤の効果は認められなかった。これらの結果より、特に PanIN の発症においてプロテアソームの活性化が重要であることが示された。

我々はさらに Ras シグナルとプロテアソーム阻害との関連に注目した。PanIN では pERK の強染色像が見られ、RAS/MAPK/ERK 経路の活性化が認められた。プロテアソーム活性をの阻害により、PanIN における pERK の発現低下が認められた。さらに、RAS/MAPK/ERK 経路により制御される cyclin D1, NF- κ B, Cox2 についても PanIN における発現低下を認めた。これらの結果はプロテアソーム阻害による PanIN の減少そのものとの因果関係を完全には否定できないものの、プロテアソームが pERK およびその下流の細胞周期や炎症を制御する因子と関連する可能性を提示するものであった。

< 結論 >

本研究は膵前癌病変発症におけるプロテアソーム活性の重要性を証明した。プロテアソームは膵発癌の主要因子の 1 つとして、さらなる研究を行うに値すると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2360 号	古山 貴基
論文審査担当者	主 査 清水 重臣 副 査 石川 俊平、植竹 宏之	
(論文審査の要旨) 1. 論文内容 本論文は、膵臓がんの前がん病変である膵上皮内腫瘍性病変（以下、PanIN）の形成にプロテアソーム活性が重要な役割を果たしていることを、マウスモデルを用いて明らかにしたものである。 2. 論文審査 1) 研究目的の先駆性・独創性 膵臓がんの発生におけるプロテアソーム活性の関与は、そのモニタリングの困難さから、これまで明確な知見に乏しかった。本研究は、膵臓がんの前がん病変であるPanINの形成にプロテアソーム活性が必要であることを明らかにしたもので高く評価できる。 2) 社会的意義 本研究で申請者が提示した主な結果は以下の通りである。 1. ornithine decarboxylase(ODC)のdegron配列を基盤に、プロテアソーム活性をモニターできるトランスジェニックマウス (<i>Gdeg</i>マウス) を作成した。 2. <i>Gdeg</i> マウスの解析から、(1)膵腺房細胞の定常状態でのプロテアソーム活性は、他の細胞に比して低値であること、(2)<i>Cerulein</i> を用いて膵炎を誘導すると、プロテアソーム活性が一過性に上昇することを見出した。 3. <i>Gdeg</i>マウスと膵がんモデルマウスである<i>Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}</i>マウスを交配したところ、前がん病変であるPanIN領域では、プロテアソーム活性が上昇していることを見出した。 4. MG132 を用いてプロテアソーム活性を阻害したところ、Ras の effector である ERK のリン酸化抑制、さらに下流の cyclin D1 や NF-κB、Cox2 の発現量抑制が観察されたほか、PanIN 形成も有意に減少した。 3) 研究方法・倫理観 本研究の遂行には、遺伝学、細胞生物学、分子生物学などの知識が必要であり、申請者の学識と技術力が伺える。 4) 考察・今後の発展性 本論文は、膵臓がんの発がん機構の一端をモデルマウスにより明らかにした研究で、基礎的、		

臨床的に有用な研究である。

3. その他 なし

4. 審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	仁部 洋一
論文審査担当者	主査 稲澤 譲治 副査 畑 裕、 岡澤 均
論文題目	Novel polyubiquitin imaging system, PolyUb-FC, reveals that K33-linked polyubiquitin is recruited by SQSTM1/p62
(論文内容の要旨) <要旨> ユビキチンは、8 種の構造的に異なった鎖を形成することが知られているが、それぞれの鎖の機能はいまだ未知である。我々は、分割された蛍光色素 Kusabira Green (KG) を用いて、Polyubiquitin-mediated fluorescence complementation (PolyUb-FC)を確立した。PolyUb-FC は、モノユビキチンの状態では蛍光を有さず、ポリユビキチン鎖形成時のみ蛍光を発現する点や、種々の抗体と異なり生細胞での観察に於いて優れている。我々は、この PolyUb-FC を K33 鎖の解析に適用した。p62 (SQSTM1)は、ポリユビキチン化された基質を認識すると考えられている。我々は、p62 が K33 鎖と共局在することを見出し、また、このポリユビキチンの認識が p62 の UBA ドメインでなされていることを示した。さらに、この p62 と K33 鎖の相互作用は TRABID (K29/K33 鎖特異的脱ユビキチン化酵素) により制御されている可能性が示唆された。さらに我々は、K33 鎖と Light chain3 (LC3)の Puncta が共局在しており、これが p62 の欠損によって低下することを認めた。これらの結果は、非典型的ポリユビキチン鎖がオートファジーと関連していることを示唆する、新たな知見と考えられる。 <緒言> ユビキチンシステムは、様々な生命現象に関連する翻訳後修飾因子である。一方、オートファジーは既知のバルク分解系としてだけでなく、より限定的な基質に対する選択的オートファジーという経路において、特定のタンパク質や細胞内小器官、細菌などの分解に関与する。これら一見独立した二つの経路は各々、炎症性腸疾患などの消化器疾患の病態に関与する可能性が示されているが、共同的・共時的に機能する系もまた示唆されている。本研究で我々は、選択的オートファジーとポリユビキチン鎖形成が同時に関与する疾患の病態解明を最終的な目標とし、その端緒となる系の構築と応用を目指した。 まず、我々は現在困難であるユビキチン鎖の「鎖特異的イメージング」に取り組んだ。ユビキチンはその Lys 残基を介して複数のユビキチン同士が結合することで、7 種の構造的に異なるユビキチン鎖 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) を形成する。また、ユビキチンのアミノ末端の Met1 残基を介して、直鎖型ユビキチン鎖を形成する。これらのユビキチン鎖のなかで、K48	

鎖や、K63 鎖の機能は解明が進んでいるが、その他非典型的とよばれるポリユビキチン鎖(K6, K11, K27, K29, K33 and Met1) の機能は未知の部分が多い。生体内における動的なユビキチン鎖の形成を解析するために、各鎖特異的抗体や、蛍光色素複合型のポリユビキチン結合タンパク、蛍光タンパク複合型ユビキチンなどの応用が試みられているが、非典型的ユビキチン鎖の可視化は定かではない。そこで我々は、bimolecular fluorescence complementation (BiFC)を、非典型的ポリユビキチン鎖の解析に適用し、これを polyubiquitin-mediated fluorescence complementation (PolyUb-FC)と命名した。

非典型的ユビキチン鎖のうち、K33 鎖は、T-cell receptor (TCR) α -chain における Zap-70 によるリン酸化の抑制的制御や、タンパク質の輸送に関与している可能性が示唆されている。また、K29/33 鎖特異的脱ユビキチン化酵素として TRABID が知られており、このノックアウトマウスはデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎マウスモデルにおける腸炎の増悪が認められる。我々は、K33 鎖が炎症性腸疾患の病態の一端に関与している可能性を仮説として立て、このイメージングに Poly Ub-FC を応用し、同じく炎症性腸疾患との関与が指摘されるオートファジーとの連関を解析した。

一方、オートファジー関連タンパクの一つである p62(SQSTM1)は、TCR シグナルを含む様々な経路に関与することが知られている。また、p62はそのC末端のubiquitin-associated (UBA) ドメインを介して、ポリユビキチン化された基質を選択的オートファジーへと導く。我々は PolyUb-FC を用いて、K33 鎖化された基質が p62 の UBA ドメインを介してオートファゴソームへの誘導される過程を解析した。

<方法>

PolyUb-FC に用いる蛍光タンパクとして、monomeric Kusabira Green (mKG) を選択した。2つに分割された mKG の N 末端断片、C 末端断片それぞれの C 末端にユビキチンコード遺伝子を結合した複合タンパクを作成した。上述の 2 つの遺伝子を IRES ベクターにサブクローニングして発現の効率化を図り Poly Ub-FC とした。これを、HEK293T 細胞やマウス胎児線維芽細胞 (MEF) に遺伝子導入してポリユビキチン鎖形成の可視化を行った。また、mKG 断片を複合したユビキチンが、内在性のユビキチンと同様の動態を示すことを様々な誘導刺激を用いて解析した。さらに、K33 鎖以外の鎖を形成不可能とするため、mKG 断片と複合したユビキチン遺伝子の K33 以外の Lys 残基を Arg に置換した変異体を用いて PolyUb(K33)-FC を作成した。

また、オートファジー関連タンパクの一つである p62 ならびにその UBA ドメインを欠損させた p62 Δ UBA と、赤色蛍光タンパクである AsRED の複合体 (AsRED-p62/AsRED-p62 Δ UBA) を作成し、PolyUb(K33)-FC との共局在を解析した。また、p62 のノックダウン下で PolyUb(K33)-FC とオートファジー関連タンパクの一つである LC3 との共局在の変化を解析した。

<結果>

PolyUb-FC を HEK293T 細胞に遺伝子導入し観察すると、細胞内ならびに核内に dot 状の蛍光が確認された。またウェスタンブロットでは、ポリユビキチン形成を示唆するスメア状のバンド

が認められた。一方で、mKG 断片に結合したユビキチンの Lys 残基を全て Arg に置換し、ポリユビキチン鎖を形成不可能とした PolyUb(K0)-FC ではスメア状のバンドが消失しており、PolyUb-FC が Ub のリジンを介して結合していることが示された。

また、既知の様々な刺激で PolyUb-FC の蛍光発現を解析した。HEK293T 細胞に PolyUb-FC を遺伝子導入し、Neocarzinotatin (NCS)を用いて二本鎖 DNA 損傷を誘導、形成されるポリユビキチンの Foci を解析すると、刺激下で PolyUb-FC の Foci が有意に増加した。また、L-Leucyl-L-leucine methyl ester (LLOMe)を用いてライソゾームの障害を誘導すると、リアルタイムに損傷ライソゾームに現出する PolyUb-FC の蛍光発現を認めた。

次に、K33 鎖の特異的イメージングを行うため、PolyUb-FC のユビキチン遺伝子の Lys 残基を Arg に変異させ、PolyUb(K33)-FC を作成した。MEF にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、細胞質内にドット状の PolyUb(K33)-FC の蛍光が観察された。

以上のように作成した PolyUb(K33)-FC を用いて、K33 鎖とオートファジーの関連を、p62 を介した経路で証明しようと試みた。p62 に AsRED を結合したレポータープラスミドを作成し、PolyUb-FC とともに MEF に遺伝子導入し観察した。p62 と数種のユビキチン鎖との結合は既知であるが、PolyUb (K33)-FC と共局在した。また、p62 に FLAG-tag を結合したプラスミドを、PolyUb-FC と共に HEK293T 細胞に遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降 (IP) した。これをウェスタンブロットで解析するとスメア状のバンドが認められ、p62 により K33 鎖が認識される可能性が示唆された。さらに、AsRED-p62 (WT または Δ UBA) を PolyUb(K33)-FC と MEF に遺伝子導入し観察すると、p62 Δ UBA では PolyUb(K33)-FC との共局在が消失した。また、HEK293T 細胞に、Myc-tag を結合した K33onlyUb と FLAG-p62 (WT or Δ UBA) を遺伝子導入し FLAG 抗体で IP した。これをウェスタンブロットで解析すると、 Δ UBA には K33 鎖のスメアが認められなかった。以上から、p62 が UBA ドメインを介して K33 鎖を認識していると考えられた。

次に、K29/33 鎖特異的脱ユビキチン化酵素である TRABID をノックダウンした HEK293T 細胞に対して、FLAG-p62 と Myc-K33Ub を遺伝子導入し FLAG 抗体で IP した。これをウェスタンブロットで解析すると、p62 に結合しているポリユビキチンのスメアが明らかに増高した。これは、p62 に認識される K33 鎖化された基質の脱ユビキチン化が、TRABID によって制御されている可能性を示唆した。

最後に、HEK293T 細胞に PolyUb(K33)-FC を遺伝子導入し、内在性の LC3 を Alexa 594 で蛍光免疫染色後観察すると、PolyUb (K33)-FC と LC3 の共局在が認められた。ここで、p62 を siRNA を用いてノックダウンすると、共局在は明らかに低下した。これによって、p62 が K33 鎖化された基質をオートファゴソームへ誘導する役割をもつことが示唆された。

<考察>

我々は、PolyUb-FC 法を用いて非典型的ユビキチン鎖の可視化系を確立した。PolyUb-FC には他のポリユビキチン鎖可視化の方法に比して、3 つの長所がある。1 点目は、蛍光タンパクとユビキチン認識タンパクの複合体に比べて、非特異的蛍光が少ないことである。2 点目は、免疫

染色と違い固定の必要が無いため、生細胞内でのポリユビキチン形成を動的に解析できることである。3 つ目は、ユビキチン遺伝子に変異を入れることで、他の非特異的ユビキチン鎖にも比較的容易に応用可能な点である。また、K29 と K33 など複数の Lys を介して結合する鎖も知られているが、このような混合型ユビキチン鎖にも使用が可能と考えられる。一方で、mKG を結合したユビキチンであるため、ある種の鎖では KG の部分がユビキチン同士の結合を妨げる可能性も否定はできない。しかしながら、この方法は非典型的ポリユビキチン鎖、特に本研究では K33 鎖の解析には有用であると考えられた。

K33 鎖の機能はあまり知られていない。前述のように、T 細胞免疫での関与や、関連タンパクの異常による DSS 腸炎の増悪は、K33 鎖が腸管における免疫機構の一端を担っているという仮説を我々に提示する。PolyUb(K33)-FC は、今後 T 細胞免疫におけるユビキチンとオートファジーの果たす役割を解析するにあたり、有用なツールとなる。本研究で我々は、このユニークなツールを用いて、K33 結合型ポリユビキチン化された基質が、p62 の UBA ドメインを介してオートファゴソームに誘導されるという新しい現象を観察した。この現象が、どのような生理学的意味を持つのかは未だ定かではないが、今後我々は PolyUb-FC を用いてこの現象を誘導する刺激や、関連する基質の探索を進めていく。さらなる研究が、K33 結合型ポリユビキチン鎖のオートファジーにおける新しい機能の発見に寄与すると考えられる。

< 結論 >

可視化困難であった非典型的ポリユビキチンの可視化に成功した。PolyUb-FC を用いて、K33 鎖化された基質がオートファゴソームに誘導されているという新しい知見を示した。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2361 号	仁部 洋一
論文審査担当者	主 査 稲澤 譲治 副 査 畑 裕、 岡澤 均	
【論文審査の要旨】 1. 論文内容 本論文は、新規ポリユビキチンイメージング手法を用いて K33 結合型ポリユビキチン鎖が p62 を介してオートファゴソームへと誘導されることを発見した論文である。 2. 論文審査 1) 研究目的の先駆性・独創性 申請者は K33 結合型ポリユビキチン鎖が炎症性腸疾患の病態に関与するとの仮説を立て、細胞内でポリユビキチン鎖形成時にのみ蛍光を発するシステムを独自に構築し、これを用いて K33 と p62 の結合性と細胞内挙動を観察した。研究成果は先駆的かつ独創的な内容を含んでいる。 2) 社会的意義 K33 結合型ポリユビキチン化される基質の生理的制御の理解の端緒となる成果であり、疾患の病態理解の新しい切り口となる点において社会的意義は大きい。 3) 研究方法・倫理観 蛍光色素 Kusabira Green (KG) を用いて Polyubiquitin-mediated fluorescence complementation (PolyUb-FC)を確立し、細胞内の K33 結合型ユビキチン鎖の可視化に成功した。このシステムを用いて p62 と K33 鎖が共局在することを見出し、さらに LC3 との関連性を観察することで K33 鎖の基質が p62 を介してオートファゴソームへと誘導される過程を調べた。 4) 考察・今後の発展性 今後、K33 が結合する特異的基質が同定されることで、K33 結合型ポリユビキチン鎖のオートファジーにおける新機能とその変調によって惹起される疾患病態の理解へと発展するものと期待される。 3. その他 4. 審査結果 以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分価値があるものと認められた。		

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	阿部 庸子
論文審査担当者	主査 横田 隆徳 副査 藤原 武男 松島 英介
論文題目	Donepezil is associated with decreased in-hospital mortality as a result of pneumonia among older patients with dementia: A retrospective cohort study
(論文内容の要旨) <要旨> 日本の高齢者の死亡原因のひとつである肺炎は、平均寿命がのびるにつれ、その数は増加傾向にある。肺炎に関わる治療法や肺炎球菌ワクチンの接種など医療的対処法は改良されているものの、今後増え行く認知症の在院日数や死亡率に対する関与についての文献は少ないため、認知症高齢者の肺炎の背景因子とその影響について全国のDPCデータで解析を行った。その結果、認知症の存在は、肺炎重症度と同様に在院日数を延長させることが分かったが、死亡率には有意な影響がないことが分かった。特に、認知症があり、抗認知症薬であるドネペジル塩酸塩を処方・服薬されていた患者の死亡率が特に低いことが判明した。 <緒言> 認知症および肺炎は、高齢者に多い疾患である。日本では40%の超高齢者に認知症があると言われ、また、65歳以上の高齢者では年齢が高くなるにつれ、肺炎の罹患率が増しており、昨今の高齢者の死亡原因の第3位を占めるようになった。 文献的に、既に認知症と肺炎は相互に影響するものと指摘されており、肺炎による入院の危険因子として認知症が挙げられ、また、肺炎による入院自体が認知症の危険因子とも言われている。さらに、海外の病院データをまとめた文献において、認知症は在院日数を延長させたり、再入院をさせたりする危険因子として挙げられている。 認知症の治療としてアセチルコリンエステラーゼ阻害薬（以下、A c h E阻害薬）が処方されるが、これは病理学的な脳の修復をもたらすものではないが、認知症の進行を遅らせることが可能である。一方で、介護施設において、A c h E阻害薬を用いた患者の死亡率が低いという研究や、A c h E阻害薬が急性心筋梗塞の死亡率の低下と関連するというコホート研究が発表されている。これらは高齢者の免疫システムや血管の何らかの因子への影響を示唆しており、高齢者肺炎における治療過程にも影響が起きうる可能性を示唆している。本研究において、A c h E阻害薬であるドネペジル塩酸塩の死亡率、在院日数への影響を追求することにした。	

<方法>

本研究では、日本の診断群分類別包括支払い制度（a diagnosis procedure combination/per diem payment system：DPC/PDPS、以下DPC制度）による厚生労働省のデータベースから、データを抽出して解析を行った。国内では、DPC制度を採用している80の大学病院および約1,600の非大学病院があり、そのうち1,507病院より研究の同意を得て、約680万症例から解析対象を絞ることになった。

2010年8月から2012年3月までの期間に、肺炎（ICDコードで、J13、J14、J15）を契機に入院した症例で、なおかつ、入院時の患者年齢が65歳以上のケースを抽出したところ、その数は39,336件であったが、該当期間内に複数回入院していたケース（13,724件）は除外した。また、患者の背景情報として、性別、年齢、アルツハイマー型認知症（F00）またはアルツハイマー病（G30）の併存の有無、ドネペジル塩酸塩服用の有無、入院時の歩行（移動）機能、食事介助レベル、救急車による搬送の有無、A-DROP、心不全（I50）の併存の有無、呼吸器リハビリテーションの実施の有無をあげ、これらを因子とした死亡率・在院日数への影響について多変量解析を行った。なお、本研究は、東京医科歯科大学における研究倫理審査委員会の承認を得て行われた（#788）。

<結果>

全国の病院に肺炎を契機に入院した65歳の症例25,602件の患者の平均年齢は、全体で 80.98 ± 8.17 歳、認知症併存群（2,013人）は 85.03 ± 6.63 歳、非認知症併存群（23,589人）は 80.6 ± 8.19 歳と有意に認知症併存群のほうが高齢であった。平均在院日数は、認知症併存群で27.08日、非認知症併存群で21.18日と認知症併存群のほうが有意に長かったが、死亡率は、認知症併存群で12.8%、非認知症併存群で11.7%と有意差は認められなかった。認知症併存群をドネペジル塩酸塩の服用の有無で分けたところ、死亡率は、ドネペジル塩酸塩服用群（578人）で5.54%、同非服用群（1,435人）で15.75%であった。

死亡率への各因子についての全体的な多重ロジスティック回帰分析では、男性、高齢、救急搬送有り、脱水有り、低酸素有り、意識障害有り、低血圧有り、歩行（移動）要介助、食事要介助、心不全の併存有りの場合に、オッズ比が上昇することが分かった。しかし、呼吸器リハビリテーション実施有り、および認知症有りでもオッズ比が0.79、0.71と低値をとることが分かった。認知症併存の有無で分けた2群について解析をしたところ、認知症併存群でオッズ比に有意差が出たのは男性、脱水、意識障害、低血圧、食事要介助、ドネペジル塩酸塩の服用であり、前6項目は1.92以上であったが、ドネペジル塩酸塩のみ0.36と低値であった。

在院日数に関する多変量解析では、全体では救急搬送有りの場合に、入院期間が短くなり、それ以外の項目は、在院日数を長期化させる因子と考えられた。また、それらの傾向は、認知症併存群では薄れることが判明した。

<考察>

肺炎で入院した高齢者の死亡率には、肺炎の重症度をはじめ、様々な要因が増悪因子として関わっているが、認知症群のドネペジル塩酸塩を利用した患者については64%も死亡率を低下さ

せていることが分かったが、その機序はいまだ解明されていないのが現状である。文献的には、抗炎症サイトカインの増加や炎症誘発性サイトカインの減少が論じられている。また、迷走神経を経た心血管作用が間接的に肺炎による死亡率の減少に関与している可能性も考えられている。そのほか、前頭葉の血流改善、胃酸分泌の制御機序が肺炎を減じるなど挙げられるものの、一定の結論には至っていない。

一方で、この研究にはD P Cデータが用いられていることから、次のような制限があるので考慮が必要である。まず、D P Cを採用されていない病院が対象外となっているため、療養型病床における認知症肺炎患者が解析に含まれていない。当時のD P Cデータでは認知症の重症度が項目として無く、国内で販売されていたA c h E阻害薬はドネペジル塩酸塩だけであったため、それが認知症の重症度との関連性や、他のA c h E阻害薬でも同様のことが言えるかどうかは未解析である。さらに、ドネペジル塩酸塩の用量の調整や中断がデータには加味されていない。付け加えるならば、認知症病名がついていないのに、ドネペジル塩酸塩が処方されているケースがあるなど、入力データに不備がある場合も少なくなく、いずれも新期間におけるデータによる次の解析が必要と考えられる。

< 結論 >

D P Cデータの解析により、ドネペジル塩酸塩は、認知症を合併する高齢者肺炎の入院死亡率を低下させることが分かった。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2362 号	阿部 庸子
論文審査担当者	主 査 横田 隆徳 副 査 藤原 武男 松島 英介	
【論文審査の要旨】		
1. 論文内容		
日本の高齢者の死亡原因のひとつである肺炎は、平均寿命がのびるにつれ、その数は増加傾向にある。肺炎に関わる治療法や肺炎球菌ワクチンの接種など医療的対処法は改良されているものの、今後増え行く認知症の在院日数や死亡率に対する関与についての文献は少ないため、認知症高齢者の肺炎の背景因子とその影響について全国のDPCデータで解析を行った。その結果、認知症の存在は、肺炎重症度と同様に在院日数を延長させることが分かったが、死亡率には有意な影響がないことが分かった。特に、認知症があり、抗認知症薬であるドネペジル塩酸塩を処方・服薬されていた患者の死亡率が特に低いことが判明した。		
2. 論文審査		
1) 研究目的の先駆性・独創性		
DPC データを用いた多数例の解析である点。 認知症患者の肺炎に対して、抗認知症薬であるドネペジル塩酸塩の処方との関係を明らかにした点。		
2) 社会的意義		
認知症と肺炎が相互に影響し合うことが指摘されているが、抗認知症薬であるドネペジル塩酸塩が予後に影響するかにアプローチした点に意義がある。		
3) 研究方法・倫理観		
本研究では、日本の診断群分類別包括支払い制度（a diagnosis procedure combination/per diem payment system：DPC/PDPS、以下DPC制度）による厚生労働省のデータベースから、データを抽出して解析を行った。国内では、DPC制度を採用している80の大学病院および約1,600の非大学病院があり、そのうち1,507病院より研究の同意を得て、約680万症例から解析対象を絞ることになった。 2010年8月から2012年3月までの期間に、肺炎（ICDコードで、J13、J14、J15）を契機に入院した症例で、なおかつ、入院時の患者年齢が65歳以上のケースを抽出したところ、その数は39,336件であったが、該当期間内に複数回入院していたケース（13,724件）は除外した。また、患者の背景情報として、性別、年齢、アルツハイマー型認知症（F00）またはアルツハイマ		

一病（G30）の併存の有無、ドネペジル塩酸塩服用の有無、入院時の歩行（移動）機能、食事介助レベル、救急車による搬送の有無、A-DROP、心不全（I50）の併存の有無、呼吸器リハビリテーションの実施の有無をあげ、これらを因子とした死亡率・在院日数への影響について多変量解析を行った。なお、本研究は、東京医科歯科大学における研究倫理審査委員会の承認を得て行われた

4）考察・今後の発展性

死亡率は、認知症併存群で 12.8%、非認知症併存群で 11.7%と有意差は認められなかったが、認知症併存群をドネペジル塩酸塩の服用の有無で分けたところ、死亡率は、ドネペジル塩酸塩服用群（578 人）で 5.54%、同非服用群（1,435 人）で 15.75%であった。

死亡率への各因子についての全体的な多重ロジスティック回帰分析では、男性、高齢、救急搬送有り、脱水有り、低酸素有り、意識障害有り、低血圧有り、歩行（移動）要介助、食事要介助、心不全の併存有りの場合に、オッズ比が上昇することが分かった。認知症があり、抗認知症薬であるドネペジル塩酸塩を処方・服薬されていた患者の死亡率が特に低いことは、ドネペジル塩酸塩に認知症患者への既知と異なる有効性のある可能性が示唆された。

3. その他

4. 審査結果

認知症がありドネペジル塩酸塩を処方・服用している患者では死亡率が特に低いことが判明した。その機序については解明されていないが、ドネペジル塩酸塩が AchE 阻害剤であることから、抗炎症サイトカインの増加や炎症誘発性サイトカインの減少などによって肺炎が改善することが考えられた。試問では DPC データを用いることの限界が議論された。さらに、認知症コードの確からしさ、入院前のドネペジル塩酸塩の処方状況、認知症の重症度が不明であり、その上でこの研究結果をどのように解釈すべきかについて確認したところ、既存データの二次解析であり、使用した DPC データの時期においても限界があるとのことであった。因果関係は言えないまでも、ドネペジル塩酸塩の有効性に関する前向き研究の必要性を示唆する研究という点で評価できる。ドネペジル塩酸塩を処方のされた群が、処方のされていない群に比較して 3 倍も死亡率が低い理由について、ドネペジル塩酸塩が処方されていない群に寝たきりの重症例が多いことが明らかである一方、重症度をスコアで揃えても死亡率が低いこと結果の解釈について検討した。DPC データの限界から考察には限界があるが、ドネペジル塩酸塩の有効性に関する未知の薬効が示唆されたと評価した。

以上より、申請者は本学医学博士の学位授与に値する十分な学識を有すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	太田 沙紀子
論文審査担当者	主査 高瀬 浩造 副査 藤原 武男、吉本 貴宣
論文題目	Improvements in Diabetic Patients' Outcomes in a Clinical Decision Support System
(論文内容の要旨) <要旨> 背景： 情報通信技術を活用した糖尿病の疾病予防や管理への期待が高まっている。しかしながら糖尿病の疾病管理において、臨床意思決定支援システムの効果を検証した先行研究は限られている。そのため本研究では、糖尿病の疾病管理における臨床意思決定支援システムの効果を検証する。 方法： 臨床意思決定支援システムの効果検証を目的として、本システムの導入前後の糖尿病患者の血液検査データを比較した。本システムの主な機能は、(1) 各患者の経時的な HbA1c 値等の表示、および異常な検査値 (HbA1c $\geq 8.4\%$ 等) の強調表示、(2) 地域の重症糖尿病患者の一覧表示である。本システムは、2011 年 4 月に病院 1 か所と診療所 10 か所に導入した。データ分析には、導入前の 2010 年 10 月から 6 ヶ月間と、導入後の 2012 年 3 月から 6 ヶ月間の血液検査データ (HbA1c、空腹時血糖、LDL-C、eGFR) を用いた。主要アウトカムは HbA1c の改善として、本システム導入前後の重症群 (HbA1c $\geq 8.4\%$) と中等症群 (HbA1c $< 8.4\%$) の HbA1c 値を、ウィルコクソン符号順位検定で分析した。 結果： 糖尿病患者 705 人の血液検査データを分析した。臨床意思決定支援システムで頻繁に強調表示された重症群 (HbA1c $\geq 8.4\%$) では、HbA1c 値が $9.49 \pm 1.13\%$ から $8.73 \pm 1.23\%$ に有意に改善した ($p < 0.001$, $d = 0.642$)。一方で中等症群 (HbA1c $< 8.4\%$) の HbA1c 値は、$7.61 \pm 0.40\%$ から $7.70 \pm 0.65\%$ に有意に悪化した ($p = 0.025$, $d = 0.158$)。 結論： 臨床意思決定支援システムを用いて異常値を強調的に表示した群では、HbA1c 値が有意に改善した。本研究により糖尿病の疾病管理において、臨床意思決定支援システムの潜在的な有効性が示唆された。 <諸言> 糖尿病患者の増加に伴い、医療情報技術を活用した糖尿病予防や管理への期待が高まっている。医療情報技術とは、電子カルテ、電子処方、個人健康記録、遠隔モニタリング、遠隔医療、臨床	

意思決定支援システム等である。臨床意思決定支援システム（Clinical Decision Support System: CDSS）とは、臨床上的の判断根拠を提示し、治療やケアに関する医療従事者の意思決定を支援するシステムである。近年、電子カルテに組み込まれた臨床意思決定支援システムが、医療安全の向上や医療提供の効率化に貢献すると期待されている。しかしながら糖尿病の疾病管理では、臨床意思決定支援システムの効果に関する先行研究が少ない。そのため本研究では、糖尿病の疾病管理に関する臨床意思決定支援システムの有効性を検証した。

本研究で用いた臨床意思決定支援システムは、日本の「糖尿病治療ガイド」や「糖尿病診療ガイドライン」、対象地域の「糖尿病地域連携パス」に準じて開発し、2011年4月に対象地域の病院1か所と診療所10か所に段階的に導入した。本システムの主な機能は、(1) 各患者の経時的なHbA1c値の表示、および異常値（HbA1c $\geq 8.4\%$ [8.0%, JDS 値]）の強調表示（赤色表示）、(2) 地域の重症糖尿病患者の一覧表示である。対象地域では、診療所の医師と病院の専門医が連携して糖尿病の疾病管理をするため、診療所の医師と病院の専門医に対して、地域の重症糖尿病患者の一覧を表示した。

<方法>

研究デザインは後ろ向き観察研究である。対象者は、(1) 対象病院および診療所で継続して糖尿病の治療を受けている者、(2) 20歳以上の者、(3) 2010年10月から2011年3月、2011年10月から2012年3月において、血液検査を少なくとも2回以上受けた者、(3) 本システム導入前の平均HbA1c値が6.9% [6.5%, JDS 値] 以上の者を対象とした。対象期間は、システム導入前の6ヶ月間（2010年10月から2011年3月）と導入後の6ヶ月間（2011年10月から2012年3月）とした。HbA1c値は、過去数カ月間の平均的な血糖値を反映するため、システム導入直後の6ヶ月間（2011年4月から2011年9月）は分析対象から除外した。また、HbA1c値はJDS値から国際基準のNGSP値に換算して分析した(NGSP 値[%]=JDS 値[%]+0.4%)。

データ分析では、主要アウトカムはHbA1c値の改善として、重症群（HbA1c $\geq 8.4\%$ [8.0%, JDS 値]）と中等症群（HbA1c $< 8.4\%$ [8.0%, JDS 値]）において、本システム導入前後の血液検査データをウィルコクソン符号順位検定を用いて分析した。

<結果>

糖尿病患者705人の血液検査データを分析した。臨床意思決定支援システムで頻繁に検査異常値が強調表示された重症群（HbA1c $\geq 8.4\%$ [8.0%, JDS 値]）では、 $9.49 \pm 1.13\%$ から $8.73 \pm 1.23\%$ に有意に改善した（ $p < 0.001$, $d = 0.642$ ）。一方で中等症群（HbA1c $< 8.4\%$ [8.0%, JDS 値]）では、 $7.61 \pm 0.40\%$ から $7.70 \pm 0.65\%$ に有意に悪化した（ $p = 0.025$, $d = 0.158$ ）。

空腹時血糖値に関しては、重症群（空腹時血糖値 ≥ 160 mg/dl）は 211.6 ± 46.2 mg/dl から 205 ± 52.2 mg/dl に有意に改善した（ $p < 0.001$, $d = 0.224$ ）。対照的に中等症群（空腹時血糖値 < 160 mg/dl）は、 144.2 ± 9.2 mg/dl から 165.2 ± 37.9 mg/dl に有意に悪化した（ $p < 0.001$, $d = 0.613$ ）。

システム導入前の平均HbA1c値とシステム導入前後の差とのピアソン相関係数は、-0.56 (95%CI -0.60 から -0.50, $p < 0.001$) であった。

<考察>

臨床意思決定支援システムの有効性の検証を目的として、システム導入前後のそれぞれ6ヶ月間における血液検査データを比較した。具体的には、2010年10月から2012年3月までの糖尿病患者の血液検査データ（HbA1c、空腹時血糖、LDL-C、eGFR）を用い、重症群（HbA1c $\geq$ 8.4% [8.0%, JDS 値]）と中等症群（HbA1c $<$ 8.4% [8.0%, JDS 値]）において、本システムの導入前後の血液検査データを比較した。

データ分析の結果、臨床意思決定支援システムで頻繁に検査異常値が強調表示された重症群（HbA1c $\geq$ 8.4%）では、有意に HbA1c 値が改善した（ $p < 0.001$ ）。一方で中等症群（HbA1c $<$ 8.4%）では有意に HbA1c 値が悪化した（ $p = 0.025$ ）。

本システムの主機能は、異常な検査値（HbA1c $\geq$ 8.4%）の強調表示、および地域の重症糖尿病患者の一覧表示であった。そのため重症群（HbA1c $\geq$ 8.4%）は、中等症群（HbA1c $<$ 8.4%）と比較して、本システムにおいて検査の異常値が繰り返し強調された。米国の先行研究によると、臨床意思決定支援システムを利用して反復的に検査異常値を通知することにより、ガイドラインに準拠した治療・ケアの実施率が向上した。つまり反復通知が治療やケア方針の決定に影響を与え、ガイドライン遵守を高める可能性が示唆された。本研究においても、検査異常値をシステム上で繰り返し強制的に表示した群では、血液検査値が有意に改善した。このことから臨床意思決定支援システムを用いて、医療従事者に対して異常検査値を強調表示することは、異常検査値の見落としを防ぎ、糖尿病治療ガイドラインや糖尿病地域連携パスに準じた治療やケアを促進し、その結果、糖尿病患者の血液検査値が改善すると推察される。この臨床意思決定支援システムが患者アウトカムを改善するメカニズムを解明するためには、医療従事者のシステム閲覧履歴や治療やケア方針に関して、今後も分析する必要がある。

本研究の限界として、対象者をシステム利用群と対照群に無作為に割付しなかったため、血液検査データの平均への回帰の可能性が否定できない。地域医療情報システムの研究において、無作為化比較試験の実施は非常に困難であるが、質の高い科学的根拠を示すためには無作為化比較試験の実施が必要である。本研究にはこれらの限界があるが、本研究の成果は臨床意思決定支援システムの潜在的な有効性を示唆しており、今後の臨床意思決定支援システムを用いた糖尿病管理の発展に寄与する。

< 結論 >

臨床意思決定支援システムの有効性の検証を目的として、システム導入前後における血液検査データを比較した。臨床意思決定支援システムの主機能は、(1)検査の異常値（HbA1c $\geq$ 8.4%）の強調表示、および(2)地域の重症糖尿病患者の一覧表示であった。2010年10月から2012年3月までの糖尿病患者の血液検査データを用い、重症群（HbA1c $\geq$ 8.4%）と中等症群（HbA1c $<$ 8.4%）において、糖尿病患者 705 人の血液検査データを分析した。臨床意思決定支援システムにおいて検査の異常値が繰り返し強調表示された重症群では、HbA1c 値が $9.49 \pm 1.13\%$ から $8.73 \pm 1.23\%$ に有意に改善した。

血液検査データの異常値を強調表示した群で患者アウトカムが改善し、糖尿病の疾病管理における臨床意思決定支援システムの潜在的な有効性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2363 号	太田 沙紀子
論文審査担当者	主 査 高瀬 浩造 副 査 藤原 武男、吉本 貴宣	
【論文審査の要旨】		
1. 論文内容		
IT 技術を用いた臨床判断支援システムの導入が、糖尿病患者の重症度指標の改善にどのような影響を与えるのかを調査した研究論文である。		
2. 論文審査		
1) 研究目的の先駆性・独創性		
現在の予防医学の標的として糖尿病は特に重要であり、医師を含めた医療スタッフおよび患者の意識改革の重要性が叫ばれている。また、医療従事者の行動変容に対する IT 技術の活用も活発になってきており、診療情報に基づく診療支援により臨床判断に有益な影響を与える簡単な臨床判断支援システムが安価に導入できることから、その有用性の評価が求められている。申請者らは、複数の診療所と総合病院を接続する具体的な地域診療情報ネットワークを構築し、そこに臨床判断支援システムを搭載し、糖尿病患者の診療情報を継続的に収集することにより、システムの有用性を評価検討した。		
2) 社会的意義		
本研究の十分な成果が得られれば、比較的安価に導入できる臨床判断支援システムにより、糖尿病患者の病態の進行を抑制し、予防的な利用の有効性が証明できることになり、全国的な普及に貢献することが期待できる。結果として、糖尿病の進行が抑制されることにより眼合併症・腎合併症の発生が減少し、医学的な成果を上げることが期待できる。		
3) 研究方法・倫理観		
2011 年 4 月より千葉県東金地区の 1 総合病院と 10 診療所で地域診療情報ネットワーク（わかしおねっと）を構成し、HbA1c、FBS、eGFR などの糖尿病関連診療情報の共有を開始した。また、このシステム上で、検査結果の異常値のハイライト表示（HbA1c $\geq$ 8.4%の患者では赤くハイライトされる）と HbA1c $\geq$ 8.4%の患者のリストを提示する臨床判断支援を開始した。		
対象症例は、（1）上記ネットワーク参加医療機関において継続的に糖尿病治療を受けており、（2）20 歳以上、（3）2010 年 10 月から 2011 年 3 月（臨床判断支援開始前）および 2011 年 10 月から 2012 年 3 月（臨床判断支援開始 6 か月以降）のそれぞれの期間で血液検査をうけており、（4）2011 年 3 月以前の平均 HbA1c 値が 6.9%以上のものとした。		
なお、本研究は臨床判断支援をパラメータとした観察研究であり、本学の倫理審査委員会の承認を受けて実施された。		

結果は、HbA1c $\geq$ 8.4%の重症群では HbA1c 値が 9.49%から 8.73%に低下 ($p<0.001$ 、 $d=0.642$) し、HbA1c $<$ 8.4%の中等症群では HbA1c 値は 7.61%から 7.70%に悪化 ($p=0.025$ 、 $d=0.158$) していた。FBS の重症群 (FBS $\geq$ 160mg/dl) では FBS は 211.6 から 205 まで低下 ($p<0.001$ 、 $d=0.224$) し、中等症群 (FBS $<$ 160mg/dl) では 144.2 から 165.2 に悪化 ($p<0.001$ 、 $d=0.613$) していた。

4) 考察・今後の発展性

本研究では、臨床判断支援システムの導入前後の比較において、支援システムのターゲットとなった重症群で HbA1c および FBS の有意な改善が見られたのに対して、中等症群では有意な悪化が観察された。ただし、これらの観察データは典型的な「平均への回帰現象」の様相を呈しており、コントロールが設定されていない本研究で臨床判断支援システムの導入の成果であると主張するのは困難である。本論文には記載されていないが、システム導入後の聞き取り調査において、参加した医師は異常値のハイライトにより専門医療機関への紹介などへの認識が高まり、また重症例の提示により受診勧奨の機会が増加したと述べている。また、ネットワーク参加医療機関において未受診率が低下していること、総合病院への紹介患者数が増加していることが確認されている。

本研究は研究デザイン自体に問題があり、臨床判断支援システムの直接的効果を評価することはできないが、このようなシステムの導入と運用にフィージビリティがあること、また他の地域において合理的なコントロールを設定したうえで類似の調査研究を実施することの妥当性は示されたものと考えられる。

3. その他

本研究の実証実験としての研究デザインの問題点は否定できないため、申請者の研究者としての素養を確認する目的で、「同じような環境で臨床判断支援システムの有効性を証明するために必要な研究デザインはどのようなものであったのか」についてのレポート提出を課した。なお、そのレポートの内容はおおむね満足できるものであった。

4. 審査結果

以上から、本論文は追加提出されたレポートを加味して博士（医学）の学位を申請する価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	渡辺 毅
論文審査担当者	主査 中島 友紀 副査 渡部 徹郎 清水 重臣
論文題目	Apoptosis Signal-regulating Kinase1(ASK1)-p38 Pathway-dependent Cytoplasmic Translocation of the Orphan Nuclear Receptor NR4A2 Is Required for Oxidative Stress-induced Necrosis
(論文内容の要旨) <要旨> p38 MAP キナーゼは多様な細胞内ストレス応答において重要な役割を果たしている。p38 経路の解析は広く行われているが、p38 誘導性の細胞死の分子機序については不明な点が多い。ASK1 は p38 の上流の MAP3 キナーゼであり酸化ストレスをはじめ、多様なストレスによって活性化する。NR4A2 は核内に局在する転写因子であることが良く知られているが、p38 によるリン酸化で核外に移行することが分かった。NR4A2 のリン酸化されない変異体が細胞死促進活性を失うことから、ASK1-p38 経路依存的な NR4A2 の核外移行が酸化ストレス誘導性の細胞死に必要であることが示唆された。 <緒言> Apoptosis signal-regulating kinase1(ASK1)は多様な細胞内外のストレスに応答し、c-jun N-terminal kinase(JNK)やp38 MAPキナーゼ経路を活性化するMAP3キナーゼである。酸化ストレスはASK1をよく活性化するストレスとして知られている。我々はASK1が酸化ストレス誘導性の細胞死に対しJNKやp38を活性化することで関与することを報告している。 最近、申請者らは、NR4Aファミリーの1つであるNR4A2がp38の標的分子であることを報告した。NR4Aファミリーは3つのメンバーで構成されており、それぞれ、NR4A1(Nur77)、NR4A2(Nurr1)、NR4A3 (NOR-1)と呼ばれている。これらは分化やサイトカイン産生などで重要な役割を果たす転写因子としての機能が知られている。転写因子としての機能の他にNR4Aファミリーには、細胞死誘導活性があることが知られている。当初、T細胞におけるNR4A1のアポトーシス誘導能については転写活性依存的であると考えられていたが、近年、NR4A1やNR4A3が核外に移行しアポトーシス誘導に関与することが報告された。さらにNR4A1はLPS + Z-VAD-fmk(汎カスパーゼ阻害剤)刺激が誘導するカスパーゼ非依存的な細胞死であるネクローシスにも関与することが報告されている。 以上のように、NR4Aファミリーと細胞死誘導に関する研究は広く行われているが、NR4A2のアポトーシスやネクローシスにおける機能については不明な点が多い。 本研究では、NR4A2が酸化ストレス下においてASK1-p38経路によってリン酸化されることで	

核外に移行することを示した。さらに、NR4A2のリン酸化部位のアラニン置換を行うと、NR4A2の核外移行および細胞死誘導能が抑制されることがわかった。これらの結果はp38依存的なリン酸化が、NR4A2に細胞死誘導能を与えていることを示唆している。

p38阻害剤が、酸化ストレス誘導性のネクロシスの個体でのモデルである虚血再灌流障害を抑制することが報告されている。このことはp38がアポトーシスだけでなく、酸化ストレス誘導性のネクロシスも制御することを示唆しているが、ネクロシスを誘導する局面において、p38下流の分子機構は十分に知られていなかった。今回の申請者らの発見はp38が関与するネクロシスの分子機構を理解する重要な手がかりになると考えられる。

<方法>

細胞死アッセイ：

細胞死は、細胞が壊れたことの指標であるLDH放出と、アポトーシスの指標であるカスパーゼ3活性により検討した。LDHアッセイはLDH細胞毒性テスト（Wako）を用いて行った。細胞外、培地中に放出されたLDH活性は全体のLDH活性のうちの割合として計算した。

カスパーゼ3活性の計測はCPP32/caspase-3 fluorometric protease assay kit (Medical and Biological Laboratories)を用いて行った。

NR4A2のリン酸化の検出：

イムノブロットによるバンドシフトおよび、リン酸化抗体を用いて検出した。

バンドシフトがリン酸化によるものであることは、 λ フォスファターゼ(New England Biolabs)処理によりバンドのシフトダウンが起こることにより示した。

NR4A2核外移行の定量：

NR4A2の核外移行は細胞免疫染色および、イムノブロットにより示した。定量はArray Scan VTI(Thermo Scientific Cellomics)を用いて行った。

<結果>

① ASK1-p38経路はH₂O₂誘導性のネクロシスに必要である

様々な濃度のH₂O₂でHeLa細胞を刺激したところ、1mMではカスパーゼ3活性の上昇が、3 mMではLDH放出が確認された。このことは、1 mM H₂O₂刺激ではアポトーシスが、3 mM H₂O₂刺激ではネクロシスが誘導されることを示唆している。ASK1のノックダウンおよびp38、JNKの各種阻害剤を用いたところ、ASK1のノックダウンおよびp38の阻害剤処理により3 mM H₂O₂刺激によるLDH放出が抑制された。この結果から高濃度H₂O₂刺激によるHeLa細胞のネクロシスにはASK1-p38経路が必要であることが示唆された。

② NR4A2はH₂O₂誘導性のネクロシスに必要である

結果①における3 mM H₂O₂刺激によるLDH放出がNR4A2のノックダウンにより抑制された。このことは高濃度 H₂O₂ 刺激による HeLa 細胞のネクロシスには NR4A2 が必要であることを

示唆している。

③ H₂O₂によって誘導される NR4A2 のリン酸化は ASK1-p38 経路が必要である

3 mM H₂O₂ 刺激によって NR4A2 のイムノブロットにおけるバンドのシフトアップがおこる。このシフトアップは λ フォスファターゼ処理、および、ASK1、p38 の阻害剤、さらには NR4A2 の p38 によるリン酸化候補部位のアラニン置換によって抑制される。この結果から H₂O₂ 刺激による NR4A2 のリン酸化が ASK1-p38 経路依存的である可能性が示唆された。

④ H₂O₂によって誘導される NR4A2 の核外移行には ASK1-p38 経路が必要である

3 mM H₂O₂ 刺激によって NR4A2 の核外移行が起こることを、細胞免疫染色およびイムノブロットで確認した。この NR4A2 の核外移行は ASK1 のノックダウン、および ASK1 や p38 の阻害剤処理によって抑制される。このことは H₂O₂ 刺激による NR4A2 の核外移行は ASK1-p38 経路依存的であることを示唆している。

⑤ H₂O₂によって誘導される NR4A2 の核外移行は p38 によるリン酸化の候補部位をアラニン置換にすることで抑制される

NR4A2 には p38 による候補リン酸化部位 (SP、TP サイト) が全部で 15 個存在する。15 個のうち、NR4A2 の N 末から 126 番目のセリン、129 番目のスレオニン、132 番目のスレオニンをアラニンに置換した変異体(3A 変異体)は H₂O₂ 刺激による核外移行が減弱する。このことは H₂O₂ 刺激による NR4A2 の核外移行には 126 番目のセリン、129 番目のスレオニン、132 番目のスレオニンがリン酸化されることが必要であることを示唆している。

⑥ H₂O₂によって誘導される細胞死には NR4A2 のリン酸化が必要である

3 mM H₂O₂ 刺激による HeLa 細胞の LDH 放出は NR4A2 のノックダウンにより抑制されるが、siRNA 抵抗性を持たせた NR4A2 をトランスフェクションすると、細胞死がレスキューされる。かわりに⑤の 3A 変異体をトランスフェクションしても、細胞死がレスキューされない。このことは H₂O₂ 刺激による HeLa 細胞のネクロシスには NR4A2 の 126 番目のセリン、129 番目のスレオニン、132 番目のスレオニンがリン酸化されることが必要であることを示唆している。

<考察>

申請者らは、酸化ストレス下において、NR4A2 が ASK1-p38 経路にリン酸化され、核外へ移行することを示した。NR4A2 の核外移行は p38 による候補リン酸化部位をアラニン置換することで抑制され、このアラニン変異体は細胞死誘導能を持たないことも見出された。これらの結果から、酸化ストレスにより活性化した ASK1-p38 経路にリン酸化された NR4A2 が核外へ移行することが細胞死誘導に必要であることが考えられる。近年、NR4A2 の細胞質局在が、脳の虚血再灌流モデルや、膀胱がんの組織においてみられることが報告されている。これらの状況における NR4A2 の細胞死誘導能については知られていないが、今回の結果が、これら病態における治療標的の発見につながることを期待している。

<結論>

H₂O₂ 刺激による HeLa 細胞のネクローシスには、ASK1-p38 経路による NR4A2 のリン酸化、そしてリン酸化によって誘導される NR4A2 の核外移行が必要である。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2364 号	渡 辺 毅
論文審査担当者	主 査 中島 友紀 副 査 渡部 徹郎 清水 重臣	
論 文 題 目	Apoptosis Signal-regulating Kinase1(ASK1)-p38 Pathway-dependent Cytoplasmic Translocation of the Orphan Nuclear Receptor NR4A2 Is Required for Oxidative Stress-induced Necrosis	
(論文審査の要旨)		
Apoptosis Signal-regulating Kinase 1(ASK1)はストレス応答性 MAP キナーゼ経路の最上流に位置する MAP3K であり、多様なストレスに応答し、JNK 経路や p38 経路を活性化することで、細胞死や炎症を誘導する。ASK1 を活性化する刺激の 1 つに過酸化水素刺激がある。今までに、過酸化水素依存的な JNK、p38 の活性化に ASK1 が必要であること、及び、過酸化水素刺激依存的な細胞死に ASK1 が必要であることが多くの細胞において示されている。一方、過酸化水素刺激はその濃度によって、アポトーシスだけではなく、カスパーゼ非依存的なネクローシスを誘導することが知られている。しかし、ASK1 が制御する酸化ストレス誘導性の細胞死の種類については今まで十分な解析がなされていなかった。 本研究では、過酸化酸素刺激誘導性の細胞死に対する ASK1 の必要性が示されている HeLa 細胞において、過酸化水素刺激の濃度による細胞死の種類の変化を検討した。その結果、1 mM の過酸化水素刺激では、アポトーシスが、3 mM の過酸化水素刺激ではネクローシスが誘導されることが見出された。このうち、3 mM の過酸化水素刺激誘導性のネクローシスに対し、ASK1 および p38 の必要性が示された。 高濃度過酸化水素刺激依存的なネクローシスに対する ASK1-p38 経路の必要性が示された一方で、p38 経路下流の機構は十分な解析がなされていない。そこで、p38 の下流の標的の候補として、p38 に直接リン酸化され制御される分子として同定された NR4A2 に注目した。核内受容体 NR4A ファミリーは 3 つのメンバーで構成されており、それぞれ NR4A1(Nur77)、NR4A2(nurr1)、NR4A3 (NOR-1) と呼ばれている。これらは分化やサイトカイン産生などで重要な役割を果たす転写因子としての機能が知られている。また、NR4A 1 や NR4A3 は、アポトーシスを誘導する機能が報告されている。申請者らは NR4A2 が p38 下流において制御を受け、高濃度過酸化水素刺激依存的なネクローシスに関与するのではないかと仮説をたて、実験を行った。 その結果、NR4A2 の 3 mM 過酸化水素刺激誘導性のネクローシスに対する必要性、3 mM 過酸化水素刺激依存的な NR4A2 のリン酸化に対する ASK1、p38 の必要性が示された。さらに、NR4A2 に 15 個存在する p38 による候補リン酸化部位それぞれのリン酸化されない変異体を作成することで、NR4A2 のリン酸化部位の同定を試みた。その結果、NR4A2 の 126 番目のセリン、129 番目のスレオニン、132 番目のスレオニンが p38 によるリン酸化部位であること		

が示された。

以前、p38 が NR4A2 を直接リン酸化し、転写活性を増強することが示唆されている。そこで NR4A2 が高濃度過酸化水素刺激誘導性のネクローシスを制御する機構として転写活性の増強が関与するのではないかと考えた。しかし、アクチノマイシン D 処理を行い、細胞の転写を抑制することでネクローシスを抑制することができなかったことから、転写非依存的な機構の存在が示唆された。

NR4A ファミリーと細胞死の関連として、NR4A1 や NR4A3 は刺激に応答して、核外へ移行、ミトコンドリアに局在することでアポトーシスを誘導することが報告されている。そこで申請者らは高濃度過酸化水素刺激に応答して NR4A2 も核外に移行し、ネクローシスを誘導するのではないかと考えた。免疫染色、イムノブロットによる検討を行ったところ、NR4A2 が高濃度過酸化水素刺激依存的に核外へ移行すること、NR4A2 の核外移行に ASK1,p38 が必要であること、リン酸化されない変異体は核外への移行が抑制されることが示された。

最後に申請者らはリン酸化されない変異体を用いた、細胞死の戻し実験を行うことで、高濃度過酸化水素刺激誘導性のネクローシスに対する NR4A2 のリン酸化の必要性が示唆された。

以上の結果から、NR4A2 は ASK1-p38 経路依存的なリン酸化をうけ、核外に移行することで、高濃度過酸化水素刺激誘導性のネクローシスを制御することが見出された。酸化ストレス誘導性のネクローシスの生体での例として虚血性疾患が挙げられる。以前、ASK1 や p38 の虚血再灌流モデルにおける必要性が示されていることから、本研究で示されたシグナル伝達経路が虚血性疾患に関与することが示唆される。また、がん組織における NR4A2 の細胞質局在も報告されており、本研究はこれら疾患の病態を理解する上で極めて有益であり、さらには創薬開発の分子基盤につながることも期待される。よって、本論文は博士(歯学)の学位を申請するに十分価値のあるものと考えられる。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	SRISUWANTHA Rungtiwa
論文審査担当者	主査 木下 淳博 副査 東 みゆき、 芦田 浩
論文題目	<i>Porphyromonas Gingivalis</i> Elevated High-Mobility Group Box 1 Levels After Myocardial Infarction in Mice
(論文内容の要旨) Introduction High-mobility group box protein 1 (HMGB1) was initially identified as a nuclear protein implicated in maintaining the nucleosome structure and the regulation of gene transcription. HMGB1 acts as a cytokine released actively by immune cells and passively by necrotic cells or damaged cells under inflammatory or injurious conditions. It is widely accepted that HMGB1 is a danger signal, acting as a link between cellular damage and inflammation, activating the immune system. After released, HMGB1 is capable of activating an inflammatory response, then transferring the injury signal to nearby immune cells. Cells undergoing apoptosis also release HMGB1, but they are immunologically inactive. HMGB1 interacts with several receptors that can be activated by exogenous (TLR-2, TLR-4) and endogenous (RAGE) ligands. Myocardial infarction (MI) is an irreversible necrosis of heart muscle caused by the occlusion of a coronary artery secondary to prolonged lack of oxygen supply, leading to tissue necrosis and defect formation. Increasing evidence exists for the importance of extracellular HMGB1 in the pathophysiology of MI. HMGB1 was upregulated and released by ischemic tissue necrosis <i>in vivo</i>. The prolonged presence of active inflammation can be harmful for the injured heart and eventually results in heart failure. Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by gram-negative anaerobic bacteria that results in bone resorption, destruction of the connective tissue, and loss of teeth. <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P.g.</i>) is a major pathogen in human periodontitis. Recently, there might be a connection between periodontitis and cardiovascular disease (CVD), including MI. Ten to fifteen% of the periodontal patients had been linked to CVD. Patients with periodontitis were at risk for bacteremia from brushing or dental treatment. The periodontal bacteria may invade the peripheral vessels, and some bacteria may infiltrate in the heart. <i>P.g.</i> bacteremia could induce MI in mice and it might possibly induce severe MI by repeat <i>P.g.</i> infection. Periodontopathic pathogens deteriorated ventricular remodeling after MI and other cardiovascular diseases. We hypothesized that infection with <i>P.g.</i> could cause an adverse outcome after MI via HMGB1. Thus, the purpose of this study was to investigate the effect of <i>P.g.</i> on HMGB1 expression after MI in mice.	

Materials and Methods

Male C57BL/6J wild type mice were obtained from Japan Clea, Co. Coil-shaped chambers (subcutaneous chamber model) were surgically implanted in the dorsal region of each mouse, used as a biological compartment to inoculate bacteria by injection. *P.g.* (0.1 mL of 10^8 CFUs/mL) or phosphate-buffered saline (PBS) (0.1 mL) was injected into the chambers to induce inflammation once a week for two weeks. Then the mice were subjected to MI induction. Left lateral thoracotomy was performed, and the left anterior descending (LAD) coronary artery was ligated using a nylon suture. The mice were allowed to recover on a warmed surface. The mice were evaluated for up to five days and fourteen days after MI and then sacrificed to obtain samples. Plasma samples were obtained when the mice were sacrificed on days 5 and 14, and the level of plasma HMGB1 was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with an immunoassay kit. The control levels of HMGB1 on day 0 prior to the MI induction (*P.g.* inoculation only), and mice with sham operation were also measured. Twelve sections were prepared through the heart on day 5 for immunohistochemistry. The sections were incubated with rabbit polyclonal anti-HMGB1 as the primary reagent (1:1000) at 4°C for overnight and incubated with biotinylated donkey anti-rabbit antibodies (1:200) as the secondary reagent in room temperature for 1 hour. The sections were developed with an avidin–biotin alkaline phosphatase and observed under a microscope. In all cases, parallel incubations with nonimmune IgGs of the relevant species served as negative control. The immunohistochemical results were determined by counting the positively stained cells in each section under a light microscope. The positive cells were counted in each whole heart sample and compared them among the following myocardial areas: 1) infarcted area (anterior wall), 2) peri-infarcted area (lateral and septal wall), and 3) remote viable area (inferior wall). All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. All statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t*-test. A value of $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

The results show the plasma level of HMGB1 protein significantly increased in the *P.g.*-inoculated MI mice group compared to the PBS-injected MI mice on day 5 (27.75 ± 0.89 versus 12.67 ± 0.20 , $P < 0.05$), but not on day 14 (24.31 ± 2.23 versus 21.05 ± 1.21). The control serum samples on day 0 prior to the MI induction and mice with sham operation showed low HMGB1 levels. In order to confirm the effect of *P.g.* infection on HMGB1 expression in MI hearts, we performed immunohistochemistry on day 5. In the PBS-injected MI group, HMGB1 was mainly expressed in cardiomyocytes, immune cells, and vascular endothelial cells. However, HMGB1 was seen broadly in degenerated cardiomyocytes, extracellular fields, immune cells, and vascular endothelial cells in the *P.g.*-inoculated MI group. A significant increase in the number of HMGB1 positive cells was observed in the *P.g.*-inoculated MI group compared to the PBS-injected MI group. (6023.33 ± 1406.74 versus 3139.33 ± 940.44 , $P < 0.05$). We compared the HMGB1 positive cell numbers among the following myocardial areas: 1) infarcted area (anterior wall), 2) peri-infarcted area (lateral and septal wall), and 3) remote viable area (inferior wall). The HMGB1 positive cells in all areas in the *P.g.*-inoculated MI group showed significant increase compared to those in the PBS-injected MI group.

Discussion

This study suggests that infection with *P.g.* after MI enhanced myocardial HMGB1 expression, there is a possible relationship between periodontitis and post-infarction myocardial inflammation through HMGB-1. High serum levels of HMGB1 may cause cardiac inflammation and dysfunction after MI. *P.g.* elevated the early release of HMGB1 from post-MI damaged cells, necrotic cell and inflammatory cells that were likely to trigger and sustain the initial inflammation. Moreover, the myocardial ischemia and chronic inflammation induced by a periodontal pathogen influenced all areas of the hearts. The direct relationship between *P.g.* infection and HMGB1 expression is unknown. Because *P.g.* is recognized via TLRs, its infection can aggravate HMGB1-induced MI. HMGB1 enhances the production of other pro-inflammatory cytokines, which might further promote inflammatory cell adhesion and infiltration into the myocardium and enhance tissue injury. Excessive inflammation post-MI has been shown to impair infarct healing. There are several patents proposed for controlling the production, secretion and neutralization of HMGB1 such as anti-HMGB1 antibodies, anti-TLR-2 antibodies and HMGB-A box as a competitive antagonist of HMGB1. Early HMGB1 increase might influence MI hearts, thus, the therapeutic target phase of HMGB1 on MI with *P.g.* infection might be early time points than late phases after MI. Future studies are needed to clarify its effects and safety before it is used in clinical settings.

(和文による要約)

High-mobility group box 1 (HMGB1) は、核タンパク質として最初に同定された。現在では HMGB1 は、炎症性または有害な条件下で壊死細胞や免疫系細胞から放出される炎症性サイトカインとしても知られている。心筋梗塞 (MI) は、冠状動脈の閉塞による長期の酸素供給不足が、心筋の組織壊死および変性をもたらす冠動脈疾患である。MI 後の心筋組織炎症の結果として起こる組織変性では、細胞外 HMGB1 のもつ役割の重要性が報告されている。

一方、歯周病は歯周病原細菌によって引き起こされる慢性炎症疾患である。歯周病は、歯周組織で産生された炎症性サイトカインや、細菌またはその毒素が全身を循環することで心血管疾患に影響を与える可能性がある。

本研究では、MI モデルマウスに歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) を感染させることで、歯周病が MI 後の心筋細胞に発現する HMGB1 に与える影響を調査した。

その結果、*P.g.* 感染 MI モデルマウスでは、非感染 MI モデルマウスに比較して、血清中の HMGB1 濃度が有意に高かった。また、MI から 5 日後の心筋組織病理切片の観察では、*P.g.* 感染 MI モデルマウスでは、非感染 MI モデルマウスに比較して、変性した心筋細胞や細胞外領域、免疫細胞に有意に発現が大きかった。以上から、*P.g.* 感染は血清中、MI 組織での HMGB1 産生亢進を介してマウス MI 後の炎症を亢進する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2365 号	SRISUWANTHA Rungtiwa
論文審査担当者	主 査 木下 淳博 副 査 東 みゆき、 芦田 浩	
論 文 題 目	Porphyromonas Gingivalis Elevated High-Mobility Group Box 1 Levels After Myocardial Infarction in Mice	
(論文審査の要旨) 歯周炎は、口腔内細菌によって引き起こされる慢性炎症性疾患であり、骨吸収、結合組織の破壊および歯の損失をもたらす疾患である。口腔内細菌の中でも <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P.g.</i>) は、主要な歯周病原細菌である。また、心筋梗塞 (MI) は、長期の酸素供給不足に続く冠動脈の閉塞が心筋組織壊死を引き起こす心疾患である。MI 後は、組織壊死に続き、心筋組織における炎症と組織修復が起こるが、MI 後に炎症が持続すると、心不全を引き起こす可能性が高まる。 歯周炎と MI を含む心血管疾患 (CVD) の関連は数多く報告されている。申請者らも、<i>P.g.</i> の感染が MI および他の心臓血管疾患後の心室リモデリングを悪化させ、MI 後の生存率を低下させたことを報告している。申請者らは、High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) が、免疫細胞や壊死細胞または損傷細胞によって放出されること、HMGB1 放出により損傷シグナルを近くの免疫細胞に伝達することに着目し、<i>P.g.</i>感染が MI 後の HMGB1 発現に与える影響を明らかにすることを目的として本研究を行った。 本研究において申請者らは、マウスの冠動脈左前下降枝を結紮し、MI モデルを作製して、その背中にコイル状のチャンバーを埋入し、代表的な歯周病原細菌である <i>P.g.</i>を感染させた。MI モデルマウスへの <i>P.g.</i>接種の有無で <i>P.g.</i>接種 MI マウス群、PBS 接種 MI マウス群の 2 群を設定し、MI 後、5 日目と 14 日目に <i>P.g.</i>感染の影響を解析した。 その結果、次の通りの結果を得た。 - MI 後 5 日目では、<i>P.g.</i>接種 MI マウス群の方が PBS 接種 MI マウス群よりも、血清中 HMGB1 濃度が有意に高かった。14 日目には有意差は認められなかった。 - MI 後 5 日目の心臓組織の HMGB 1 発現を免疫染色で観察したところ、PBS 接種 MI マウス群では、心筋細胞、血管内皮細胞、免疫細胞において HMGB 1 陽性細胞が認められたが、<i>P.g.</i>接種 MI マウス群では、さらに壊死または変性した心筋細胞や、細胞外基質においても HMGB 1 陽性細胞が認められた。 - 免疫染色で HMGB1 陽性細胞数を計測したところ、<i>P.g.</i>接種 MI マウス群の方が PBS 接種 MI マウス群よりも、HMGB1 陽性細胞数が有意に多く、計測を 1) 梗塞領域 (前壁)、2) 梗塞周囲領域 (側方および中隔壁)、3) 遠隔生存領域 (下壁) に分けて解析した場合も同様であった。 これらの結果から、申請者らは以下通り考察した。		

*P.g.*感染により、MI 後 5 日で血清中 HMGB1 濃度の上昇が認められ、HMGB1 陽性細胞が有意に多く認められたことから、*P.g.*感染が、MI 後の損傷細胞、壊死細胞、炎症細胞からの HMGB1 の放出を促進したと考えた。また、歯周病原細菌によって誘発された心筋虚血および慢性炎症は、心臓のすべての領域に影響を与えたと考察した。さらに、得られた一連の結果は、MI 後の HMGB1 陽性細胞の発現と歯周病原細菌感染との関連性を示すものであり、*P.g.*感染が MI 後の心筋組織の変性と機能不全を助長すると考察した。

本研究結果は、*P.g.*感染により循環器疾患に影響を及ぼす可能性を示した点で高く評価できる。本研究は MI 後の心筋組織で、歯周病原細菌による HMGB1 陽性細胞発現の亢進を *in vivo* で示した最初の報告である。歯周病と循環器疾患との関連性を知る上で極めて重要なものであり、今後の歯周病学・循環器内科学の発展に寄与するものと考えられる。

よって本論文は、博士(歯学)の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	ROOBTHAISONG Amonrattana
論文審査担当者	主 査 鈴木 敏彦 副 査 和泉 雄一, 丸川 恵理子
論 文 題 目	YvqE and CovRS of Group A <i>Streptococcus</i> Play a Pivotal Role in Viability and Phenotypic Adaptations to Multiple Environmental Stresses
(論文の内容の要旨) <緒言> A 群レンサ球菌は主にヒトに感染し、咽頭炎や扁桃炎といった軽微な疾患から壊死性筋膜炎といった重篤な疾患などの様々な感染症疾患に関連している。細菌が生体環境に生息、生存するためには、様々な環境ストレスに適応する必要があり、そのための遺伝子発現制御機構のひとつに二成分制御系がある。二成分制御系は、環境変化を感知するセンサーであるヒスチジンキナーゼと、反応応答において遺伝子発現制御を行なうレスポンスレギュレーターから成る。この二成分制御系により、細菌の代謝、病原性、抗生剤耐性や環境ストレス応答を制御する。これまでのゲノム解析の結果、本菌には 12 種類の二成分制御系が存在し、そのなかのひとつ CovRS 二成分制御系は本菌の病原性制御に重要であることなどが明らかになっている。一方で、YvqEC などの CovRS 以外の二成分制御系については知見が少なく、その生理的な機能も不明である。本研究では、実験室株である JRS4 株と劇症型感染症患者由来の SSI-1 株を用いて、CovRS と YvqEC の役割と相互関連性について解析を行なった。 <方法> A 群レンサ球菌の実験室株である JRS4 (M6)と劇症型感染症患者由来株 SSI-1 (M3)を用い、それぞれにおいて二成分制御系の <i>covR/covS</i> 遺伝子と <i>yvqE/yvqC</i> 遺伝子の欠損株 ($\Delta yvqE$, $\Delta yvqC$, $\Delta yvqEC$, $\Delta covS$, $\Delta covR$, $\Delta covRS$, $\Delta yvqEC\Delta covRS$) とそれらの相補株を作製し、様々な環境ストレス条件下での増殖能を解析した。さらに、薬剤耐性やヒト上皮細胞への付着、侵入、生存能、またヒト血中での増殖能を調べた。 <結果> JRS4 と SSI-1 株それぞれにおける遺伝子欠損株の増殖速度を測定した結果、いずれの欠損株も親株との間に有意な差異は認められなかったが、SSI-1$\Delta yvqE$, SSI-1$\Delta yvqEC$, JRS4$\Delta covRS$ 欠損株で親株よりもわずかに増殖に遅れが認められた。さらに、OD₆₀₀ が 0.3 及び 0.8 における CFU (colony forming unit)を測定した結果、いずれの OD₆₀₀ 値においても JRS4$\Delta yvqE$ と JRS4$\Delta yvqC$ が親株よりも 1~2-log 低いことが明らかとなった。また遺伝子相補株では親株と同程度に回復した。この結果から、<i>yvqE/yvqC</i> は JRS4 において菌の生存に寄与することが示唆された。 この <i>yvqE/yvqC</i> 欠損株の生菌数の減少を確認するために、LIVE/DEAD 染色法を行った。その結果、親株に比べて JRS4$\Delta yvqE$ と JRS4$\Delta yvqC$ は死菌の割合が有意に高いことが明らかになった。さらにこれらの欠損株は、菌体同士が集まって凝集化していた。このような <i>yvqE/yvqC</i> 欠損による死菌の増加は、SSI-1 株では認められなかったことから、株特異的であることが示唆された。	

次に、菌を蛍光標識したバンコマイシンと DAPI を用いて染色し、細胞壁と染色体の観察を行った。その結果、親株においては一般的な細胞分裂と核様体、対称的な隔壁が認められたが、*yvqE/yvqC* 欠損株の観察によって、細胞分裂異常や形態異常が示唆された。さらに、電子顕微鏡観察により細胞壁を観察した結果、*JRS4ΔyvqE* と *JRS4ΔyvqC* は親株に比べてペプチドグリカン層が薄く、*JRS4ΔyvqE* では異常な隔壁が認められた。そこで、細胞壁合成や細胞分裂に関わる遺伝子の発現を qRT-PCR 法により解析した結果、*pbp1B* と *ftsL* 遺伝子の mRNA 量が 1/2 以下に減少していることが明らかになった。以上の結果から、二成分制御系 YvqEC は、本菌の細胞壁合成と細胞分裂に寄与していることが示された。

YvqEC と CovRS の環境ストレスに対する役割を調べるため、浸透圧や酸、熱、酸化ストレス下における増殖速度を解析した。その結果、*JRS4* と *SSI-1* の両株において、*yvqEC*、*covRS* の両欠損 (*ΔyvqECΔcovRS*) により、調べた全ての環境ストレス下で顕著な増殖の遅延が生じた。これらの影響は遺伝子の相補により回復した。すなわち、YvqEC と CovRS 二成分制御系は環境ストレスに対して相乗的に機能していることが示唆された。

次に、この YvqEC と CovRS による協調的な二成分制御系が細胞壁を標的とした抗生剤に対する耐性に寄与するかを調べた。その結果、*yvqEC*、*covRS* の両欠損株は親株やいずれかの欠損株よりもペニシリン G、バシトラシン、ナイシンに対して高い感受性を示した。なお、遺伝子相補株は親株と同程度の感受性を示した。以上の結果から、YvqEC と CovRS は抗生剤耐性においても協調的に寄与することが示唆された。

A 群レンサ球菌のヒト上皮細胞との相互作用における YvqEC と CovRS の役割を調べるため、それぞれの欠損株を HeLa 細胞に感染させ、細胞への侵入率、細胞傷害性を解析した。その結果、細胞傷害性への影響は認められなかったが、*yvqEC* 欠損により細胞への侵入率が増加した。一方、*covRS* 遺伝子欠損株は低い侵入率を示した。

本菌の病原性に重要とされるヒアルロン酸 (HA) の産生量ならびにヒト血中における生存率を解析した。その結果、HA 産生と血中生存率には相関が見られ、また *JRS4*、*SSI-1* の両株において *covRS* が血中における生存 (増殖) 能に寄与していることが示唆された。

< 考察 >

YvqEC と CovRS の生理的な役割及び環境ストレスに対する機能を解析した結果、YvqEC 二成分制御系の欠失により生存菌数の減少や細胞分裂以上が認められ、細胞壁合成制御に関わる *pbp1B* や *ftsL* の発現減少も認められた。YvqEC が直接的にこれらの遺伝子発現を制御しているかどうかは不明であり、過去の報告で YvqEC やこのホモログが GAS や他菌種において細胞分裂に寄与するとの報告は見られないことから、GAS の生存に必須な二成分制御系 VicRK との関連性について今後解析を進める必要がある。また、YvqEC と CovRS は、相乗効果的に様々な環境ストレス応答に寄与することが明らかになった。複数の二成分制御系は互いにネットワークを構築することで様々な環境変化に対して複雑で精巧に遺伝子発現を制御すると考えられるが、今後、YvqEC と CovRS がどのように協調し、またどの遺伝子の発現制御を行っているのかを明らかにすることで、本菌の環境応答機構の解明に大きく貢献できると考えられる。

< 結論 >

本研究では、病原性の異なる 2 株を用いて、二成分制御系 YvqEC と CovRS の生理的な役割及び環境ストレスに対する機能を解析した。その結果、新たに i) YvqEC 二成分制御系が細胞壁の合成や細胞分裂の制御に関わること、ii) YvqEC と CovRS が相乗的に環境ストレス応答に寄与することを明らかにした。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 2366 号	ROOBTHAISONG Amonrattana
論文審査担当者	主 査 鈴木 敏彦 副 査 和泉 雄一，丸川 恵理子	
論 文 題 目	YvqE and CovRS of Group A <i>Streptococcus</i> Play a Pivotal Role in Viability and Phenotypic Adaptations to Multiple Environmental Stresses	
(論文審査の要旨) A 群レンサ球菌は、急性感染症として咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、劇症型 A 群レンサ球菌感染症、続発症として急性リウマチ熱、急性糸球体腎炎などを引き起こすグラム陽性の病原細菌である。細菌が様々な生体環境に適応するための遺伝子発現制御機構のひとつに二成分制御系がある。二成分制御系は、環境変化を感知するセンサーであるヒスチジンキナーゼと、反応応答において遺伝子発現制御を行なうレスポンスレギュレーターから成る。本菌には 12 種類の二成分制御系が存在し、そのなかのひとつ CovRS については本菌の病原性に重要であることが報告されている一方で、YvqEC などの CovRS 以外の二成分制御系については知見が少なく、その生理的な機能も不明である。 本研究では、実験室株である JRS4 株と劇症型感染症患者由来の SSI-1 株を用いて、CovRS と YvqEC の生理的な役割と様々な環境ストレス条件下における機能の解析を行なった。covR/covS 遺伝子と yvqE/yvqC 遺伝子の欠損株 ($\Delta yvqE$, $\Delta yvqC$, $\Delta yvqEC$, $\Delta covS$, $\Delta covR$, $\Delta covRS$, $\Delta yvqEC\Delta covRS$) とそれらの相補株を作製し、環境ストレス条件下における増殖能や薬剤感受性を解析した。 本研究で得られた主な結果は以下の通りである。 JRS4 株由来の yvqE/yvqC 欠損株において生菌数の減少を認めた。また、当該欠損株を蛍光標識したバンコマイシンと DAPI にて染色し共焦点顕微鏡を用いて解析したところ、細胞壁の合成と細胞分裂に異常が認められた。また電子顕微鏡観察によりペプチドグリカン層の厚さ減少が認められた。さらに、qRT-PCR 法により遺伝子発現を調べたところ、細胞分裂に関わる遺伝子群の発現が減少していることが明らかになった。以上の結果から、YvqEC 二成分制御系は A 群レンサ球菌の細胞壁合成・細胞分裂の制御に関与することが示唆された。 YvqEC と CovRS の環境ストレスに対する役割を調べるため、浸透圧や酸、熱、酸化ストレス下における増殖速度を解析した。その結果、JRS4 と SSI-1 の両株において、yvqEC、covRS の両欠損 ($\Delta yvqEC\Delta covRS$) により、調べた全ての環境ストレス下で顕著な増殖遅延が生じた。これらの影響は遺伝子の相補により回復した。すなわち、YvqEC と CovRS 二成分制御系は環境ストレスに対して相乗的に機能していることが示唆された。 次に、この YvqEC と CovRS による協調的な二成分制御系が細胞壁を標的とした抗生剤に対する耐性に寄与するかを調べた。その結果、yvqEC、covRS の両欠損株は親株やいずれかの欠損株よりもペニシリン G、バシトラシン、ナイシンに対して高い感受性を示した。なお、遺伝子相補株は親株と同程度の感受性を示した。以上の結果から、YvqEC と CovRS は抗生剤耐性においても協調的に寄与することが示唆された。		

A 群レンサ球菌のヒト上皮細胞との相互作用における YvqEC と CovRS の役割を調べるため、それぞれの欠損株を HeLa 細胞に感染させ、細胞への侵入率、細胞傷害性を解析した。その結果、細胞傷害性への影響は認められなかったが、*yvqEC* 欠損により細胞への侵入率が増加した。一方、*covRS* 遺伝子欠損株は低い侵入率を示した。

本菌の病原性に重要とされるヒアルロン酸 (HA) の産生量ならびにヒト血中における生存率を解析した。その結果、HA 産生と血中生存率には相関が見られ、また JRS4、SSI-1 の両株において *covRS* が血中における生存 (増殖) 能に寄与していることが示唆された。

本研究において、A 群レンサ球菌の二成分制御系 YvqEC が細胞壁合成や細胞分裂などの生存に必須な生理的機能に関与することを示し、YvqEC と CovRS が協調的に環境応答に機能していることを明らかにできた点は、今後本菌による感染症治療・予防法への重要な知見となり、臨床的意義が大きい。本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

以上の成果は今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きく、よって、本論文は博士 (学術) の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	遠山 寛子
論文審査担当者	主査 田上 美千佳 副査 緒方 泰子 山崎 智子
論文題目	Using Narrative Approach for Anticipatory Grief Among Family Caregivers at Home
(論文内容の要旨) <結言> 終末期における家族介護者は、何らかの形で自分の存在意義や介護に対する役割意識を持っており精神的な支えにしている。在宅では、限られた家族員の中で主たる家族介護者が一人であることが多く、介護の負担が重くなっている現状がある。以上のことから、在宅療養において家族介護者が自分の感情（予期悲嘆）に向き合い対峙できるように効果的な介入が必要となる。 本研究では、家族介護者が自ら語ることで引き出された語りの内容を研究者がフィードバックしていくナラティブアプローチによる介入により家族介護者は、終末期の症状により影響を受けやすいこの時期の揺れ動く感情表出（予期悲嘆）だけではなく、客観的に自己の感情に気付くことができるようになる。したがって、家族介護者の予期悲嘆への介入方法としてナラティブアプローチが効果的であると考えられる。 そこで、在宅で最期を看取る家族介護者に対するナラティブアプローチによる語りが予期悲嘆の変化のプロセスに及ぼす影響を明らかにすることを本研究の目的とした。 <対象と方法> <u>研究対象</u> 主治医により余命 6 ヶ月であると診断され訪問看護サービスを受けているがん患者（以下療養者）を、在宅で看取る予定の主たる家族介護者を対象とした。 <u>データ</u> 研究者が療養者の看取りまで、作成した介入モデルに基づくナラティブアプローチを複数回行った。介入毎のすべてのやり取りの内容を語りのデータとした。得られたデータは介入毎に分析をし、その内容を元に対象者に毎回フィードバックしながら介入を繰り返した。 <u>分析方法</u> 対象者と研究者の語りの内容は、質的帰納的に分析をおこなった。抽出された内容の固まりを意味が分かるように 1 つの文章で表現し、これをサブストーリーとした。類似した内容のサブストーリーを集約し、語りの内容を包含して記述したものをストーリーとした。抽出された個別のストーリーを共通する意味内容ごとに集約し、変化のプロセスの概要を理解できるように表現し、	

これをテーマとした。これらの分析を質的研究の経験のある研究者と質的研究のエキスパート 1～2 名により実施した。分析結果が妥当であるかどうかを別の研究者複数で内容を確認した。すべての結果を訪問の度に対象者に内容の確認をおこなった。

倫理的配慮

本研究は、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」「日本看護協会看護研究における倫理指針」を遵守して実施された。研究対象者には書面による承諾を得た。また、本研究は東京慈恵会医科大学の倫理委員会の承認（20-279）を得た。

<結果>

対象者

5ヶ所の訪問看護ステーションより紹介を受けた 11 名の家族介護者のうち、途中で入院した方や介入前に亡くなった方などを除いた 2 名を対象とした。対象者 A は 20 代、対象者 B は 50 代であった。訪問回数は 6 回と 3 回であった。

ナラティブアプローチによる家族介護者（対象者）の予期悲嘆のリフレーミング

1) 対象者 A の予期悲嘆のリフレーミング

対象者 A は元々看護師であることから、**看護師として母を患者と捉えてしまい娘として感情表出できず、介護者役割に囚われていることを語り始めた。娘として関わりたい思いに気づき自分の気持ちのはけ口がない状況を語った。自分の家族内における介護者役割について、父を支持するという期待に戸惑いながら同じ家族としては関われない寂しさを語った。家族内における介護者役割遂行上の課題と自分の思いに揺らぐことで、それぞれの事象は個別の課題であると気付いていった。ナラティブアプローチを継続していく中で、父親が気持ちの整理ができ父と一緒に母の看取りに向き合うことで、父親の予期悲嘆を支えていたことから少し開放されたことが明らかになった。このような語りを繰り返す中で、家族として揃って別れを予測し喪失へ向けて自分を立て直す有りようが明らかになった。**

2) 対象者 B の予期悲嘆のリフレーミング

対象者 B は、**告知をしないと決めた自分が全てを受け負う、誰にも頼れないことを自分自身に納得させるという介護者役割を遂行するという強い決意に縛られた語りがあった。たった一人の介護者としての責任と介護の限界を実感し思った以上の負担に気付くこととなった。嫁として直接介入できない家族役割上の課題に対して夫の役割代行を十分にはできないという思いと、亡くなり逝く夫に対する思いに揺れている状況が明らかになった。急激に悪化している療養者の状態に対して混乱しており、死んで欲しくない思いが別れを直視させない語りがあった。夫の状態が悪化していきっている中でお墓の話を語ることで、あきらめきれない思いもあるが、夫との別れを想定できるようになって別れを予測した気持ちを表すようになった。**

予期悲嘆のリフレーミングの共通性：4つのテーマ

始めに対象者らは、**家族内で期待されている役割に囚われていることを語った。双方ともに、**

自分が果たしたいと思っている役割ではない家族内における介護者役割に囚われていることが明らかになった。次に、家族の中で求められる役割を**家族内で期待に応じることが今の自分ではないことに気づいていった**。語りを継続していく中で、対象者 AB 共に家族から期待されている自分の役割が本意ではないということに気づき、思いが揺れ動きながら看取りに向けて喪失の準備を始め、**死に逝く家族として患者と向き合うことができるようになっていった**。

最終的には双方共に、当初自分たちの中で囚われていた家族内の介護者役割から解放され、**家族の立場から喪失を予測して悲しむことができるようになった**。

介入者側のナラティブ

予期悲嘆の介入モデルに基づき介入した結果、介入者の語りの共通テーマが抽出された。

家族内における介護者自身の役割に焦点をあて、**患者との関わり方を問う**ことで、家族介護者は葛藤や孤独といった感情が内包された家族役割に囚われた語りを始めた。

次に、家族内で**期待される役割に対する思いを表出させた**。そして、家族介護者にとって**優先的な役割に対する語りを促す**ことで、課題の存在に気付けるようにし、課題を表在化した。

話が進み揺らいでいる家族介護者に対して、**優先的な役割遂行を妨げているものは何か、語りを促す**このことにより、家族は介護者役割に囚われない現実への直面化が促され課題を解体した。

最終的に、家族介護者に対して**自分の立ち位置の確認を促す**ことで、喪失へ向けた介護者ではなく家族としての感情のあぶり出しがされ、悲しみに浸ることが促された。

< 考案 >

予期悲嘆は、介護者役割と関係喪失に対処する役割の割合を変化させながら移行していく

本研究では、家族介護者の予期悲嘆は介護者役割と関係性喪失に対処する役割という 2 つの役割の割合をナラティブアプローチによって変化させ、リフレーミングしながら移行していくことが明らかになった。

つまり、介護者役割が大きくなれば関係性喪失に対処する役割は抑制され、自己の感情はさらにその中に内包されていく。一方で、介護者役割から解き放たれれば関係性喪失に対処する役割は大きくなり、内包されていた自己の感情を表出できる。

したがって、できるだけ早期の段階で介護者役割の囚われから解放し、死に逝く患者との関係性喪失に対処する役割に目を向けることが重要である。そして、死別までの限られた時間の中で 2 つの家族役割変化に気づき、介護者役割から解放され、喪失に向け新たに家族関係を修復し対処していく作業を繰り返す。

ナラティブアプローチが介護者役割と関係喪失に対処する役割を促進させる

関係性喪失に対処する役割にアプローチするのではなく、介護者役割にアプローチすることで家族介護者は、その役割に囚われていることに気づき、解放され、自ら自己の感情と向き合い、自分たちの形で喪失に対処するというリフレーミングを促進させることが明らかになった。

併存する 2 つの家族役割のリフレーミングを効果的に移行していくためには、第三者による意図的な誘導ではなく、家族介護者自身が、自ら語る中で気付いていくことが重要である。ナラテ

ィブアプローチによって、気付きが促されることから、予期悲嘆への影響は多大であるといえる。

介護者役割を強めない家族看護

在宅において看護師は、患者を看取る・介護する者としての家族と、喪失体験をするケアの対象としての家族の両側面から捉えようとする。在宅ではケアの中心的な役割を担うのは家族介護者であることから、家族介護者が介護しやすいよう介護環境を整えること、技術的なサポートや各公的サービスの導入を進めるなど、介護者役割に対する責任を全うし、より良いケア提供者となるべく支援している。家族もそれに答えようとすることから、ケアの対象としての家族、つまり純粋に患者と向き合い見取りに向かう家族の立場を取れなくなっていくと考える。

在宅における看取りの際に看護師は、家族介護者が介護者役割を全うできるような技術的支援や観察すべき内容の教授を行うだけではなく、むしろ介護者役割は不十分であっても責任に囚われることなく患者としっかりと向かい合い感情を露呈できるような支援が重要であると考ええる。

< 結語 >

本研究において在宅最期を看取る家族の予期悲嘆は、喪失に伴うあらゆる感情ではなく、介護者役割と関係性喪失に対処する役割という2つの役割の割合を変化させリフレーミングしながら自ら気づく感情であることがナラティブアプローチという介入をすることで明らかになった。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	乙 第 2367 号	遠 山 寛 子
論文審査担当者	主 査 田 上 美千佳 副 査 緒 方 泰子 山 崎 智子	
(論文審査の要旨) 本研究は、日本での終末期がん患者の在宅移行の増加が予想される中、在宅で最期を看取る家族介護者に対するナラティブアプローチによる語りが、予期悲嘆の変化のプロセスに及ぼす影響を明らかにしたものである。 訪問看護ステーション5か所から紹介され、主治医より余命6か月と診断されたがん患者（療養者）11名のうち、途中入院・介入前死亡を除く2名の家族介護者を分析対象とした。2名の内訳は、対象者Aは療養者の娘で20歳代の看護師、対象者Bは療養者の妻で50歳代のがんサバイバーであった。申請者が作成した予期悲嘆介入モデルを基に、各対象者にナラティブアプローチを基盤とした面接を、療養者宅で週1回、1回30-40分行った。その回数は各6回、3回であった。介入の結果、家族介護者は、家族内で期待されている介護者役割にとらわれていることに自ら気づき、死に逝く療養者の家族として療養者と向き合い、最終的には、家族の立場から喪失を予測して悲しむという、予期悲嘆のプロセスを経験することができた。 そこで、ナラティブアプローチを基盤にした面接の有用性として、介護者に療養者とのかわり方を問う、家族の中で期待される役割に対する思いを表出させる、優先的な役割に対する語りを促すことで課題を表在化した。次に、優先的な役割遂行を妨げているものは何かの語りを促すことで、介護者役割にとらわれない現実への直面化が促進され、課題が解体した。さらに、介護者に自分の立ち位置の確認を促すことで、家族の立場から喪失を受入れ、悲しみに浸ることの促進が示された。 これらの結果から、予期悲嘆は介護者役割と関係喪失に対処する役割という2つ役割の割合を変化させながら移行していき自ら気づく感情であること、ナラティブアプローチが介護者役割と関係喪失に対処する役割を促進させることを考察した。看護への示唆として、介護者役割へのとらわれを見極め、介護者役割を強いることなく療養者と向き合い感情を表出できるような支援の重要性が示された。 本研究は、終末期がん患者の病状が急速に悪化する中で、家族が介護者として没頭するあまりに、療養者との関係喪失に対峙することができないままに死別する家族の苦悩や、主介護者が一人で介護者役割を引き受けることの負担の増加に着目し、ナラティブアプローチを基盤にした語りによって予期悲嘆のプロセスを歩むことのできる介入方法を見出した点は意義深い。また、家族をこれから喪失するという非常に厳しい状況にある対象者をリクルートして、介入研究を行った点にも意義がある。 以上の点を踏まえ、本研究論文が博士論文（看護学）に値すると判断した。		