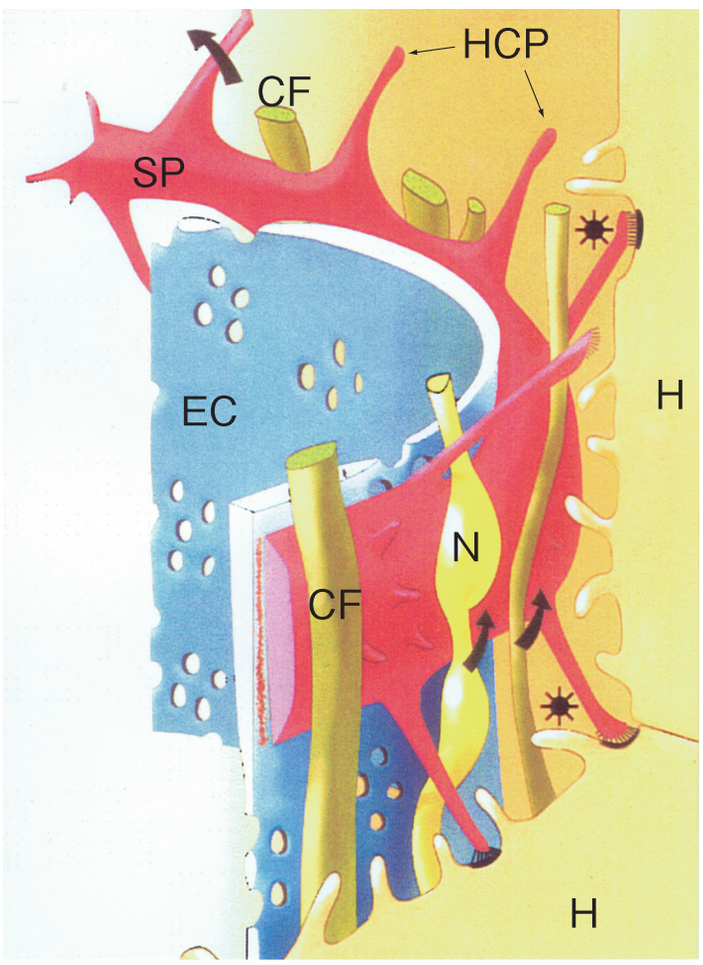
Vol.60

お茶の水醫學雑誌

Ochanomizu igaku zasshi

第 60 巻　第 2 号　2012 年



東京医科歯科大学
お茶の水医学会

目　次

総　説

肝臓の類洞壁細胞―概論 …… 和氣　健二郎 121

血管外科の過去・現在・未来 …… 岩井　武尚 133

アレルギー病はなぜ増えたか
―きれい好きの功罪検証 …… 藤田　紘一郎 141

症　例

術中所見より虫垂原発腹膜偽粘液腫を疑った
子宮粘液性平滑筋肉腫の１例 …… 大井手　志保 ほか 147

イレウス管が原因と考えられた腸重積の１例 …… 鈴木　道隆 ほか 157

お茶の水医科同窓会研究奨励賞 …… 162

東京医科歯科大学医歯学総合研究科（医学系）学位論文
2012 年 1 月から 3 月分 …… 167

編集後記 …… 235

お茶の水醫學雑誌投稿規程 …… 236

Contents

Review

An introduction of sinusoidal cells in the liver …… Kenjiro Wake 121

Vascular surgery: The past, present, and future …… Takehisa Iwai 133

Why are allergic diseases increasing
; the perils of being too fastidious …… Koichiro Fujita 141

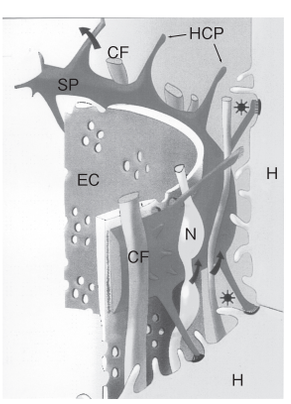
Original article

A case of Myxoid leiomyosarcoma of the uterus,
originally presumed to be pseudomyxoma peritonei …… Shiho Oid, et al 147

A case of adult intussusception caused by ileus tube …… Michitaka Suzuki, et al 157

Research Promotion Award 2011
from TMDU Medical Alumni Association …… 162

TMDU PhD Thesis from Graduate School of Medicine
approved from January to March 2012 …… 167



表紙の図

肝 Disse 腔の微細構造モデル.
CF：コラーゲン線維，EC：類洞内皮細胞，H：肝実質細胞；
HCP：肝星細胞の実質細胞接着突起（spine），N：神経線維；
SP：肝星細胞の内皮下突起　＊Disse 腔
（和氣健二郎先生提供）

肝臓の類洞壁細胞―概論

和氣　健二郎　東京医科歯科大学名誉教授
鶴見大学歯学部解剖・組織細胞学講座
(株)ミノファーゲン製薬　肝臓リサーチ･ユニット

要旨：Carl von Kupffer（1876）が最初に記載した肝臓の星細胞は，20 世紀の初頭以来マクロファージと誤認されてきたが，現代の形態学的手法によって再発見され，ビタミン A を貯蔵し，コラーゲンを産生する類洞周囲細胞であることが明らかになった．さらに Aschoff（1924）の網内系学説の基盤となった清野謙次（1914）のリチウム・カルミン生体染色を追試した結果，類洞内皮細胞はリンパ節の細網細胞と同様に，生体内に生じた老廃巨大分子を特異的に処理する網内系の重要な一員であることが再認識され，網内系をマクロファージ系とする van Furth ら（1970s）の単核食細胞系（MPS）は再検討されつつある．肝類洞壁を構成する新しい細胞も発見され，現在では，類洞壁細胞研究は肝臓病学のもっとも活発な研究分野の一つである．この総説では，肝星細胞，類洞内皮細胞，Kupffer 細胞，ピット細胞（NK 細胞），樹状細胞などについて，主に東京医科歯科大学のわれわれの教室で行ってきた研究成果を紹介したい．

Key words：肝臓，類洞壁細胞，肝星細胞，類洞内皮細胞，Kupffer 細胞，ピット細胞，NK 細胞，樹状細胞，細胞生物学，医学史

Ⅰ．緒　　言

類洞 sinusoid を“血管洞 sinus に類する”の意味から新たに命名し，毛細血管と明確に区別したのはハーバードの Charles Sedgwick Minot（1900）[1] である．Minot によれば，類洞の特徴は毛細血管より太く，内皮は実質組織に密着し，相互に太い交通枝によって不規則につながっている，毛細血管はそれ自身の形をもち豊富な結合組織によって取り巻かれている，これに対して，類洞の形は実質組織によって受動的に決められ，周囲に結合組織はきわめて少ないかまったく存在しない，発生の機構も通常の毛細血管とは異なる，としている．これらの特性には修正すべき点はあるものの，今日，肝類洞の特殊性が明らかにされてきたので，早期に類洞を毛細血管と区別した Minot の業績は高く評価されるべきであろう．

肝臓の類洞はその壁を構成する細胞の多様性と，それぞれの細胞のもつユニークな機能によって特徴づけられる．肝類洞壁を構成する細胞群は類洞壁細胞 sinusoidal cells と総称され，類洞内皮細胞，肝星細胞，Kupffer 細胞，単球由来マクロファージ，樹状細胞，NK 細胞などが含まれる．これらの細胞は互いに，また実質細胞とサイトカイン・ネットワークで結ばれ，肝臓という壮大な交響曲を奏でている．肝細胞板とそれに寄り沿う類洞は，多様な肝機能の“ホットスポット”であり，肝臓の構造的機能的最小単位といえるだろう．

類洞壁細胞の種類，性状，病態が明らかにされたのは，ようやくこの 30 ～ 40 年のことである．この研究の遅延は 20 世紀の初頭から数十年に及ぶ紆余曲折の研究史によっている，この概論では，最初にこの研究史を展望し，次いで錯誤がどのように是正されたかを述べ，最後に各類洞壁細胞の構造と機能について概説する．

Ⅱ．類洞壁細胞研究の史的展望

1．肝臓の星細胞と類洞周囲細胞

Carl von Kupffer（1876）[2] は塩化金法を用いて肝

連絡先：和氣　健二郎　k_wake@minophagen.co.jp

前　目次へ　次

表 1．肝臓の類洞周囲細胞として報告されてきた細胞

細胞名	発表者	検出法	特　徴
星細胞 Sternzellen	Kupffer (1876)[2]	塩化金法	星状の形
顆粒細胞 granular cells	Berkley (1893)[7]	Golgi 法	短い突起をもつ
周皮細胞 Pericyten	Zimmermann (1923)[8]	Golgi 法	毛細血管を取り巻く
脂肪摂取細胞 fat-storing cells	伊東俊夫 (1951)[9]	脂肪染色法	脂肪滴をもつ
介在細胞 interstitial cells	鈴木 清 (1958)[10]	鈴木鍍銀法	自律神経支配

臓の神経線維を染めようとしていた．その研究は徒労に終わったが，肝小葉内に塩化金を還元して黒化した星状の細胞が規則正しく散在していることを偶然発見した．この細胞は類洞 ※1) の外側に位置し，結合組織性の細胞と思われた．Kupffer はこの細胞を“Sternzellen”（星細胞）と命名し，Waldeyer 教授への書簡報告の形で発表した．その後，同門の Rothe (1882)[3] が同法を用いて数種の哺乳類肝臓の星細胞を検出した．Rothe は Kupffer の所見を再確認したうえ，新たに細胞質中に明るく抜けた球状の“封入体”を記載し，それを“小さな核”と考えた．Rothe の論文はミュンヘン大学学位論文集に収録されている．

その後，星細胞については沈黙を守っていた Kupffer（1898）[4] は，キールで開催された解剖学会で再び星細胞について報告し，以前は厚い組織切片で観察していたので，星細胞の位置を見誤っていた．薄い切片でよく観察してみると星細胞は特殊な内皮細胞で，静注した墨を貪食する，と訂正したのである．その根拠の一つとして Rothe が記載した“小さな核”を Kupffer は赤血球の貪食像と考えた．この発表は当時学会の注目を集めていた Metchnikoff（1884）[5] の食細胞の報告に影響されたものと思われる．Kupffer（1899）の訂正論文は 17 枚の石版カラー刷りの図を付した大部の原著として翌年発表された[6]．この論文は，従来不明であった星細胞の機能を明らかにしたものとして学会の高い評価を受けた．以後数十年にわたって“Kupffer の星状細胞は肝臓のマクロファージ”が教科書に定着した．

Kupffer（1899）[6] の論文は，20 世紀前半の組織学，病理組織学に大きな影響を及ぼした．第 1 は，最初に Kupffer（1876）自身が報告した類洞周囲の星細胞の存在が否定され，他にいくつかの類洞周囲細胞が報告されてきた（表 1）．しかしこれらの細胞の異同について議論されることはなく，多くは新規細胞の発見とみなされた．第 2 は，類洞内皮による異物の取り込みが生体染色の研究を刺激し，それを基盤として当時の学会を席巻した網内系学説へと発展した．さらに網内系学説の批判として，単核食細胞系の誕生という大きな流れをつくった．

2．網内系学説

1912 年にフライブルグの Aschoff のもとに留学した清野謙次は，留学前から取り組んでいたリチウム・カルミン生体染色の結果をまとめ，1914 年に単行本『カルミン生体染色』[11] を出版した．清野は静注したリチウム・カルミンを取り込む細胞群を組織球性細胞と命名した．組織球性細胞は網状内皮とその内皮から遊離して生じる組織球からなる．網状内皮 reticulo-endothelium とは肝臓などの毛細血管内皮とリンパ性器官の細網細胞とを統一的にとらえた名称であった．

Aschoff（1924）[12] は清野の組織球性細胞とコレステロールを取り込む細胞群（内皮性代謝装置，または脾装置と呼ばれた）を包括して網状内皮系統（網内系）reticulo-endothelial system（RES）を提唱した．網内系はリチウム・カルミンを取り込み，かつコレステロール代謝を営む内皮性および間葉性の細胞系統で，生体防御，炎症，免疫，血球の産生と破壊，胆汁色素の産生，鉄代謝など，生体の広範な機能を営む細胞系統であった．

網内系学説は 20 世紀前半の医学・生物学に大きな影響を及ぼした．本邦では Aschoff のもとに留学した長与又郎，川村麟也，緒方知三郎，村田宮吉，清野謙次，林　郁彦，三田村篤志郎，赤崎兼義らが網内系学説を伝承し，黎明期にあったわが国の病理学を発展させた[13]．

1920 年代に蛍光顕微鏡が開発されると，ビタミン A 自家蛍光が容易に観察できるようになった．ヒトでは体内の 70 ～ 85% のビタミン A が肝臓に貯蔵され，肝小葉内に散在する細胞が強いビタミン A 蛍光を発した．1970 年までに発表された約 40 編の論文はことごとくビタミン A の蛍光源を網内系 Kupffer 細胞としていた[14]．現代肝臓病学に指導的役割を果たした Hans Popper (1944)[15] も，240 例の病理解剖例を蛍光顕微鏡で観察し，ビタミン A 蛍光は網内系 Kupffer 細胞の細胞質を満たす脂肪滴から発すると発表していた．

一方，病理学会では，網内系 Kupffer 細胞の“脂肪

※1) 類洞の名称は前述の通り Minot の報告以降，特に英米系で使用されるようになった．Kupffer の論文には“肝小葉内毛細血管”と記載されていたが，本稿では“類洞”に統一した．

前　目次へ　次

化（Verfettung[16]）”が興味を呼んだ．Kupffer 細胞の脂肪化とは，肝実質細胞に脂肪変性がみられない場合でも，網内系 Kupffer 細胞が脂肪滴をもつ場合をいい，その頻度は欧米人で 40 ～ 70%，日本人は 13% であった．

20 世紀後半になると網内系学説に細部の修正が相次いだ．1970 年には電子顕微鏡観察によって肝類洞内皮から Kupffer 細胞への移行が否定された[17]．

1970 年代には van Furth らによる，すべてのマクロファージは血液単球に由来するとする単核食細胞系 mononuclear phagocyte system（MPS）[18] が登場した．網内系は単核食細胞系に置き換えられ，網内系＝マクロファージ系になり，貪食しない類洞内皮やリンパ節の細網細胞は網内系から除外された．この学会の流れは，Kupffer（1898, 1899）[4, 6] による星細胞の訂正論文とその影響を受けた清野（1914）[11] のリチウム・カルミン生体染色の研究に端を発している．

Ⅲ．錯誤の是正

1．星細胞の再発見

大阪市立大学解剖学教室の鈴木 清（1958）[10] は，Bielschowsky-Suzuki 鍍銀法を用いて肝臓を観察中に，自律神経が未知の特殊な細胞に終わることを観察し，この細胞を介在細胞 interstitial cells と命名した．介在細胞は類洞周囲にある星芒状の細胞で，鍍銀操作の最終段階で塩化金液で調色するといっそうそのコントラストを高めた．その特徴から鈴木は，介在細胞を Kupffer（1876）[2] が塩化金法で検出した星細胞と同じ細胞であるかもしれないと考えた，この仮説は，古い文献を座右にしていた鈴木にして閃いたものである．それを証明するためには，Kupffer の塩化金法を追試する必要があった．この追試を当時大学院生であった筆者が担当することになった．

Kupffer の塩化金法を追試した報告は Rothe（1882）[3] 以外に見当らなかった．この方法は操作が簡単であったが，結果はきわめて不安定であった．夕方にラットの肝臓を採取し，凍結ミクロトームで作製した新鮮切片を軽くクロム酸液で処理した後，希薄な塩化金液に一晩浸漬する．しかし毎日が失敗の連続であった※2)．

※2) 当時は固形飼料が市販され始めた頃で高価であったため，教室では動物飼育係が経験的に作製した飼料でラットを飼育していた．後にわかったことであるが，この飼料で飼育されたラットは肝臓のビタミン A 貯蔵量が少なく，塩化金反応は陰性もしくはきわめて弱いものであった．その後，このラットに過剰のビタミン A を投与すると，塩化金の強い反応がみられた．その後の実験から，塩化金反応はビタミン A による還元反応であることがわかった[21]．

ある日，他の実験に供した家兎の肝臓を試してみたところ，Kupffer や Rothe の記載通りの標本が得られた．その後ヒトを含む多種の肝臓を染色に供したが，同様に満足できる結果であった．

塩化金標本の星細胞は蛍光顕微鏡下のビタミン A 蛍光源に一致し，過剰のビタミン A 投与によって蛍光度と塩化金反応はともに増強した．その試料を電子顕微鏡で観察してみると，Disse 腔に存在する細胞の細胞質が多数の脂質滴で満たされ，その脂質滴表面に金粒子の沈着がみられた．この細胞は伊東（1951）[9] が報告した脂肪摂取細胞 fat-storing cells に一致していた．ビタミン A の蛍光源は星細胞の脂質滴であった．またビタミン A 過剰投与動物の肝臓切片を鍍銀染色してみると，介在細胞は大きく肥大し，細胞質内の好銀性網目構造が大きくなっていた．つまり介在細胞も，星細胞と同じ細胞であることが証明された．以上のビタミン A 過剰投与実験から以下の事実が明らかになった．① Kupffer（1876）の星細胞は網内系 Kupffer 細胞ではない，②脂肪摂取細胞と介在細胞はともに本来の星細胞にほかならない，③ビタミン A を貯蔵する細胞は Kupffer 細胞ではなく星細胞である[19, 20]．

種々の方法で報告されてきた類洞周囲細胞が，本来の星細胞と同じ細胞かどうかを判定するために，過剰のビタミン A を投与後，各方法を施行して同定する方法をビタミン A 過剰投与同定法と呼ぶことにした．その後この方法を用いて Golgi 法で報告されてきた Berkley の顆粒細胞[7] や Zimmermann の周皮細胞[8] も，星細胞と同一細胞であることが判明した．結局，研究史上報告されてきた数種の類洞周囲細胞（表 1）はすべて星細胞と同じ細胞であり，肝臓の Disse 腔にはただ 1 種の細胞しか存在しないことが明らかになった[14]．

2．網内系の再検討

網内系学説に向けられた批判は，主に①マクロファージは内皮細胞由来である，②類洞内皮細胞や細網細胞も貪食細胞である，の 2 点であった．第 1 の問題は前述した通り電子顕微鏡観察から解決されていた[17]．第 2 の問題については，Aschoff の原著を読むと，Aschoff 自身は網内系細胞による異物の取り込み機能を“Phagocytose”（貪食）とはいわず，慎重に“Speicherung”（取り込んで貯蔵するの意味）の用語を用いている．また清野もリチウム・カルミンの取り込みを“Karminspeicherung”（カルミン摂取）と記し，貪食とはいっていない，したがって，貪食は本来網内系の条件ではない．それがいつからか，貪食が網内系

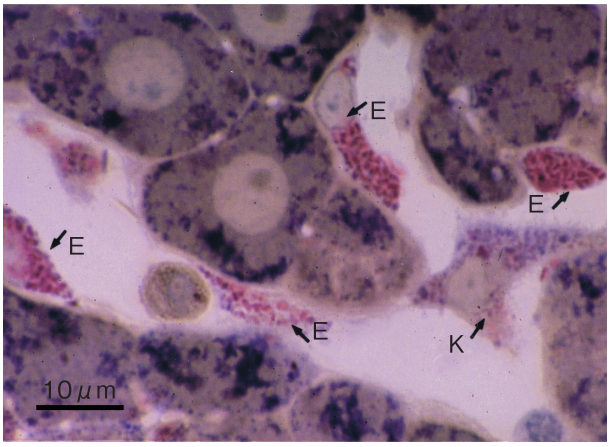


図 1．リチウム・カルミンを静注したラットの肝類洞類洞内皮細胞（E）が多量の色素を取り込み類洞腔内へ膨隆している．Kupffer 細胞（K）も色素を取り込んでいるが，内皮細胞より少なく，発達したリソゾーム中に取り込まれた色素は赤紫色を呈する（文献 23 より引用）．

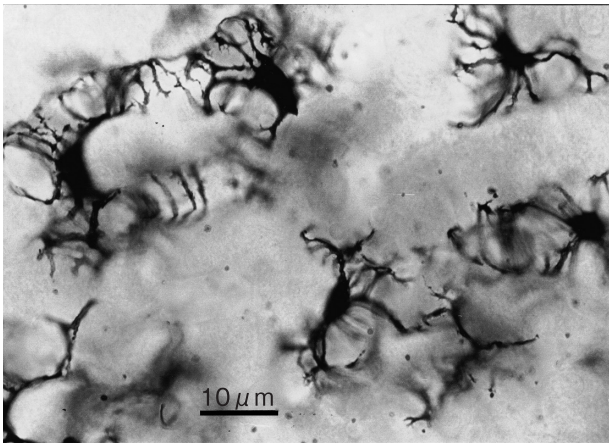


図 2　Golgi 法で染色したラット肝臓の星細胞
細胞体から出た数本の突起が枝分かれして類洞を取り巻いている（文献 37 より引用）．

細胞の条件にあげられるようになっていた．

これらの問題を含めて網内系を電子顕微鏡，組織化学，細胞分離法などの近代的手法によって洗い直す必要があった．ところが単核食細胞系の登場によって，網内系研究者の興味はすでにマクロファージ研究へ向かっていた．このような状況のもと，網内系学説の成立に大きく影響した清野のリチウム・カルミン生体染色法を現代の目で追試してみることにした．

清野の原法にのっとって調製したリチウム・カルミン液をラットに静注または腹腔内投与し，各種組織を観察した．投与カルミンは特に肝臓，リンパ節，大網に多く蓄積していた[22～24]．肝臓ではカルミンを取り込んだ細胞が類洞腔内に多数みられた（図 1）．その試料を電子顕微鏡で観察したところ，その多くは予想に反して Kupffer 細胞ではなく，類洞内皮細胞であった．カルミンを取り込んだ内皮細胞は類洞腔内に大きく膨隆しており，あたかも Kupffer 細胞のようにみえる．カルミン投与後電子顕微鏡で観察すると，カルミンの微小粒子が内皮細胞の内腔側細胞膜に吸着された後，被覆小胞によって細胞質内へ取り込まれエンドソームへ運ばれ，微小粒子が互いに融合して粗大顆粒を形成する．さらに粗大粒子はリソゾーム中へ移動する．つまり投与カルミンは貪食されるのではなく，被覆小胞によるエンドサイトーシスによって取り込まれていた．Kupffer 細胞や単球もカルミンを被覆小胞によって取り込むが，その量は類洞内皮細胞に比較して少なく，しかも発達したリソゾーム中の粒子はリソゾーム自体の黒色の色彩と重なって赤紫色を呈していた．リンパ節の細網細胞も同様に多数のカルミン粒子が観察された[24]が，これらの色素を取り込んだ細胞を教科書ではマクロファージと図示されていた．

類洞内皮細胞がカルミンを取り込むことをいっそう確実にするため，カルミン投与後，類洞内皮が特異的に取り込む蛍光標識した変性コラーゲンを投与して観察すると，カルミンと蛍光源が一致した[23]．細胞分離した類洞内皮細胞でも同様な結果を得た[23]．

以上の結果からカルミンは変性コラーゲン，マンノース，放出されたリソゾーム蛋白質などの巨大分子と同様に，類洞内皮細胞に受容体介在性エンドサイトーシスによって取り込まれることが明らかになった．

Ⅳ．肝類洞壁細胞の構造と機能

20 世紀の初頭以来数十年にわたった根深い錯誤が是正されると，肝臓研究の対象が類洞壁細胞にも向けられるようになった．1977 年には国際肝類洞壁細胞シンポジウムが，また本邦でも 1987 年に肝類洞壁細胞研究会が発足した．東京医科歯科大学の筆者の教室では，星細胞や Kupffer 細胞，類洞内皮細胞の研究の過程で，NK 細胞や樹状細胞が類洞腔内に発見され，第 4，第 5 の類洞壁細胞として認められるようになった．以下これら各類洞壁細胞の性状について，筆者らが行った研究を中心に概説する．

1．肝星細胞　hepatic stellate cells（HSC）※3)

肝星細胞については多くの総説[14, 26～31]があるので，詳細を参照されたい．肝星細胞は類洞の外側に位置し，細胞体から出る数本の太い細胞質突起が分枝を繰り返し類洞内皮を取り巻いている（図 2）．内皮下突起と呼

※3) この細胞に付されていた多数の名称[14]は 1996 年国際的に hepatic stellate cell に統一された．

前　目次へ　次

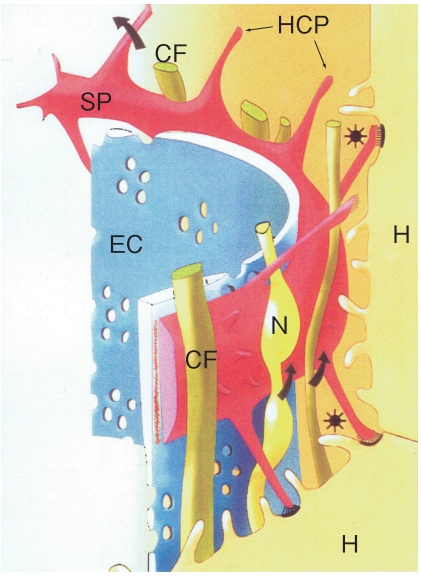


図 3. Disse 腔の立体像を示す模式図
有窓の類洞内皮（EC）を星細胞の 1 本の内皮下突起が取り巻いている．その突起の側縁から棘状突起（spine，実質細胞接着突起，HCP）が斜めに立ち上がり，その先端部で実質細胞（H）に接着している．内皮下突起と spine および実質細胞でつくられるトンネル内を神経線維（N）とコラーゲン線維（CF）が通る（文献 25 より引用）＊ Disse 腔．

ばれるこの突起は，その側縁から棘状の小突起 spine を多数突出させているので鋸歯状を呈する．Spine は実質細胞接着突起とも呼ばれるように，内皮の外側面から斜めに立ち上がり，Disse 腔中を斜走し，その先端付近で実質細胞に接着している[25]（図 3）．つまり星細胞は，一方で内皮と，他方で実質細胞に接着している．さらに数本の類洞間突起が細胞体または内皮下突起の起始部から出て，肝細胞板を貫通して隣の類洞を取り巻く．1 個の星細胞が 2，3 本の類洞を束ねており，星細胞 1 個が取り巻く類洞の長さは数十～百数十 μm にも達している．ざっと計算すると 1 個の星細胞が接着する類洞内皮細胞数は 1 ～ 3 個，実質細胞数は 20 ～ 40 個である．この 3 種の細胞がつくる細胞複合体を星細胞単位 stellon と呼ぶことにした[25]．Stellon は独立したものではなく，隣の stellon と一部重複している．このように星細胞は突起を広く薄く広げ，門脈血流–実質細胞間の物質交流にじゃまになる細胞の厚い核周部分を相対的に小さくしている．肝臓は，上皮–間葉相関と血管–実質間の物質交流という二律背反する関係を構造的に巧みに解決している．

以上のような細胞の位置関係から，Disse 腔の定義を“類洞内皮と実質細胞間の腔”から“類洞内皮–星細胞の複合体と実質細胞間の腔”に変更しなければならない．星細胞の spine は Disse 腔を斜めに橋渡ししているので，類洞内皮のクッションの役割を演じている．このクッションによるポンプ作用で，内皮の fenestrae を介する液性交流が促進される．コラーゲン線維や自律神経線維は spine と実質細胞が形成するトンネル内を走行している（図 3）．肝線維化では内皮と星細胞間にもコラーゲン線維がみられるようになり，星細胞は線維束に包まれる．

星細胞の主な機能はビタミン A の貯蔵[20, 21, 27]，コラーゲンの産生[32, 33]，および収縮[34]である．星細胞が活性化した場合にはこのバランスが崩れて肝障害をもたらす．星細胞の活性化とは，炎症時に Kupffer 細胞などのマクロファージが放出する炎症性サイトカイン，インターロイキン–1（IL–1）の作用によってレシチン・レチノール・アセチールトランスフェラーゼ（LRAT）の産生が抑制される結果[35]，貯蔵ビタミン A が減少し，より収縮性の強い筋線維芽細胞 myofibroblasts へ形質変換 phenotypic switching することをいう[33]．LRAT は貯蔵ビタミン A（レチノール）のエステル化に働く．動物実験ではビタミン A の過剰投与が実験的肝線維化を抑制する[36]．星細胞を分離してプラスチックシャーレ上で培養した場合にも星細胞は急速に活性化するので，活性化のモデルとして用いられる．星細胞の活性化を阻止できれば，肝線維化の予防と治療につながるので，目下の緊急課題である．

星細胞 1 個当りのビタミン A 貯蔵量には，肝小葉内部域差 heterogeneity がみられる．門脈域を P，中心静脈を C，P–P 線と C–C 線の交差点を M とすれば，ビタミン A 貯蔵量は P から C へ向かって，また P から M へ向かって次第に減少する[37, 38]．ビタミン A 量が少ない領域は血流の下流域，もしくは血流の乏しい部位である．その部位はブタ血清投与による線維化が起こりやすい領域[39]に一致している．

ビタミン A 貯蔵細胞が星細胞であることが明らかになり，ビタミン A 代謝の全貌が細胞レベルで明らかにされてきた[26, 31, 40]．腸管から吸収されたレチニール・エステルはキロミクロンとしてリンパを介して運ばれ，キロミクロン・レムナントに分解され肝実質細胞へ取り込まれる．レチニール・エステルは加水分解されて遊離したレチノールは，大部分，実質細胞が産生するレチノール結合蛋白と結合して星細胞へ運ばれ貯蔵される．ビタミン A が十分に摂取されている状態では，肝臓のビタミン A 量の 80％は星細胞で貯蔵され，残りは実質細胞にとどまる．しかし，生体がビタミン A 欠乏状態にあると，実質細胞から星細胞へのビタミン A の輸送は抑制されて直接，網膜などの

ビタミンAの標的上皮細胞へ輸送される[40]．

下等脊椎動物のヤツメウナギの成体はサケ，マスに吸い付き吸血するので大量のビタミンAが体内に蓄積している．この時期のヤツメウナギを観察してみると、ビタミンA貯蔵部位は蔵側中胚葉と中間中胚葉に限局され，体壁側中胚葉にはまったく貯蔵されていない[41,42]．すなわち腸壁，心臓，血管壁，鰓[43]，肝臓（肝星細胞，被膜，Glisson鞘），腎臓（被膜，尿細管周囲の細胞，メサンギウム細胞[44]），精巣，卵巣など，内臓諸器官の線維芽細胞様細胞がことごとく多量のビタミンA脂質滴をもっている．他方，脳，脊随，脊索，皮下脂肪，皮膚の線維芽細胞にはビタミンAは貯蔵されていない．哺乳類ではビタミンA貯蔵はほとんど肝臓の星細胞に限局しているが，過剰のビタミンAが投与されると，上記の内臓諸器官の間葉細胞にもビタミンAの貯蔵がみられるようになる．この現象は古くから栄養学者の間で“ビタミンAが溢れる”といわれてきた．以上の結果から，脊椎動物の間葉組織は，内臓系のビタミンA貯蔵細胞系と体壁系の線維芽細胞系の2系統に区別されることが示唆される．最近話題になっている内臓脂肪と皮下脂肪の質的差異も，間葉組織の基本的な違いによるように思われる．最近，肝星細胞に第4のグロビン，サイトグロビン（旧名はstellate cell activation-association protein（STAP）が発見された[45]．その機能はなお不明であるが，免疫組織化学反応は全身のビタミンA貯蔵細胞系に陽性である[46]．個体発生において，肝星細胞は横中隔の間葉細胞に由来し，さらに発生初期へたどれば，少なくともその一部は，横中隔をおおう中皮細胞にその起源が求められる[47]．

2．類洞内皮細胞　sinusoidal endothelial cells

類洞内皮細胞は類洞内腔を限界する1層の有窓性内皮細胞であるが，毛細血管の有窓内皮とは異なり基底膜がなく，小孔fenestraeに隔壁diaphragmaを欠く．小孔が集合してつくる内皮の薄い部分を篩板sieve plateと呼ぶ．血液中の粒子はその大きさによってふるい分けられ，血液の液性成分や小さいキロミクロンは小孔を自由に通過して類洞外側のDisse腔へ流入し，実質細胞の表面膜を洗う．小孔の径はヒトでは107±1.5nmで，ラット（Sprague Dawley rat，161±2.7nm），マウス（C57BL/6，141±5.4 nm）と比較してかなり小さい[48]．この違いが，ヒトではアデノウイルスベクターを用いる肝実質細胞標的の遺伝子治療が動物実験ほど有効ではない理由とされている[48]．肝線維化が進行すると，類洞内皮に基底膜が発達し小孔も減少・消失する．この変化は毛細血管化capillarizationと呼ばれる[49]．小孔には小葉内部域差がみられ，中心静脈域（ゾーン3）に比較して門脈周囲域（ゾーン1）では小孔の径は大きいが，数は少なく[50]，篩板の総面積は小さい[51]．

類洞内皮細胞の内腔側細胞膜には多数の被覆小胞が観察される．類洞内皮に取り込まれる物体の大きさは通常0.1μmといわれているが，Krebs–Riger液灌流下でラテックス粒子は0.8μmの大きさまで取り込む[52]．ただし，その取り込み機構は貪食によるものではなく，広いグラスリン被覆膜による．その被覆膜の広さは2μm^2に及び，通常の被覆小胞の20個分に相当する．類洞内皮細胞の類洞腔側細胞膜直下にはきわめて広い範囲にわたってクラスミン網が広がっている．この所見は，類洞内皮細胞が受容体介在性エンドサイトーシスを行う旺盛な細胞であることを示している．

肝類洞内皮細胞は肝類洞スカベンジャー内皮細胞liver sinusoidal scavenger endothelial cell（LS–SEC）と呼ばれ，その受容体には以下のものがある[53]．①スカベンジャー受容体（SR）を介してヒアルロン酸，コンドロイチン硫酸，酸化LDL，プロコラーゲンI, III などを，②マンノース受容体（MR）を介して流出したリソゾーム酵素，コラーゲンα鎖（I, II, III, IV, V, XI）などを，③Fc-γ受容体（Fc-γR）を介して可溶性IgG免疫複合体を取り込む．最近SRには8種の亜型が報告されているが，肝類洞内皮に存在する型はSR–A, SR–B, SR–H（stabilin–1, stabilin–2）である[53]．類洞内皮細胞は自然免疫に関与し，TLR 4とTLR 9が同定されている[54,55]．TLR–9は微生物のDNAを認識するので，生体染色に用いられたリチウム・カルミン（上述）を認識する可能性がある[※4]．獲得免疫では，類洞内皮細胞は樹状細胞と同様にMHC class I, IIやCD40，CD80，CD86の分子を発現するが，native CD4+T細胞からT_{h1}細胞へ分化させることができず，逆にT_{h0}を刺激して免疫寛容へ誘導するといわれる[56, 57]．

肝類洞内皮細胞の発生をニワトリ胚で観察したところ，孵卵3～4日に横中隔間葉細胞が類洞腔を限界するように配列し，一次類洞を形成する．この一次類洞が胚の主血管とつながると，それを通路として卵黄嚢の血島から輸送されてきた血管芽細胞angioblastが一次類洞壁に接着し，二次類洞内皮が形成される[58]．このvasculogenesisの形式は，一般毛細血管の発生と同様である．しかし類洞では，洞状の太い一次類洞

[※4] コチニール（中南米産のカイガラムシの一種）その雌はアリなどの天敵が嫌う赤い色素カルミン酸をつくって身を護る．カルミンはそのコチニールからつくられた動物性の染料である．

前 目次へ 次

が以後発達する肝細胞索によって分断狭小化し，受動的に類洞の形態が決まる．その結果，成熟した類洞網には肝細胞索の圧迫によって生じた管腔をもたない索状の類洞部分が観察される[51]．

3．Kupffer 細胞と単球由来マクロファージ

Kupffer がキールの解剖学会で“星細胞は特殊な内皮細胞”と“訂正”論文を発表したのは 1898 年 4 月 18 日であった．奇しくもその 1 週間後の 4 月 25 日，ポーランドのクラクフの科学アカデミーでは，Browicz が“肝臓の貪食細胞は血管内腔に宙吊りになっている細胞”と発表していた[59, 60]．現在の Kupffer 細胞をより正確に記載したのは Kupffer ではなく，Browicz であった．

一般にマクロファージは血管外の疎性結合組織に分布するが，血管内に定住するのは，ヒトでは肝臓と脾臓ぐらいである．しかしウシ，ヤギ，ヒツジでは，肝臓に Kupffer 細胞はきわめて少なく，ほとんどが肺の毛細血管中にみられる．これらのマクロファージは肺胞マクロファージとは別に肺血管内マクロファージ pulmonary intravascular macrophage（IPM）と呼ばれ，その接着部の面積は肺の毛細血管内皮のほぼ 7 %を占める[61]．これらの家畜が風邪をひくと，増加した IPM のためにガス交換面積が減少し呼吸障害を起こしやすい．肝と肺における血管内マクロファージの出現頻度は，ヒト，ラット，マウスを一方の極とし，ウシ，ヤギ，ヒツジを他方の極とすると，多くの哺乳類それぞれの出現比率は両極の間に分布する．血管内マクロファージ（Kupffer 細胞）は肝固有のマクロファージであるということは，たまたまわれわれがよく観察する動物種に限っていえることである．

Kupffer 細胞が肝類洞腔内に常在することは，門脈血中を運ばれてくる腸管由来の異物や抗原を処理するうえで好都合である．Kupffer 細胞の類洞腔内分布度は，門脈周囲域から中心静脈方向へ向かってゾーン 1，2，3 に分けると，4:3:2 でゾーン 1 がもっとも多い[62]．Kupffer 細胞の表面膜にある自然免疫受容体 TLR–4 が，門脈によって運ばれてくる腸内細菌のエンドトキシン，LPS を認識する．するとアダプター分子 MyD–88 を経てシグナル伝達され，TNF–α，IL–1β，cIL–6v10，IL–12，IL–18 などを放出する[63, 64]．IL–12 と IL–18 は後述する NK 細胞を活性化し，IFNγ の産生を促す．同じく細胞の表面膜にある TLR–2 はグラム陽性菌細胞壁のリポペプチドに対する受容体で，受容後は TLR–4 と共通のシグナル伝達を行う．Kupffer 細胞のエンドゾーム膜には TLR–3 と TLR–9 が存在し，前者はウイルス由来の RNA を受容して IFNβ を産生する一方，TLR–4 シグナルルートと合流して上記サイトカインを放出する．後者は細菌由来の非メチル化 CpGDNA を受容し，IFNα を産生する．

Kupffer 細胞の取り込み機構には貪食と被覆小胞によるエンドサイトーシスがみられ，貪食はさらに，①波打ち膜による異物の包み込み，②異物の沈み込み，③赤血球のような大きい物体の貪食には異物の表面に沿った細胞質の競り上がりの 3 型があり，いずれもアクチンが関与する[52]．貪食された物質はファゴゾームを経て発達したリソゾームへ輸送され分解を受ける．Kupffer 細胞が異物を貪食すると，急速に Ca^{2+} が細胞内へ流入する．この Ca^{2+}inflax によって細胞は活性化し，O_2 産生やホスホリパーゼ A2 の活性化，種々のアラキドン酸の合成放出などの 2 次的反応が起こる[65]．

Kupffer 細胞（resident or fixed macrophage）のほかに，肝類洞には滲出マクロファージ（exdate or free macrophage ）が観察される．Kupffer 細胞の起源は卵黄嚢の前駆細胞に求められ[66]，後者は血液単球に由来する．Kupffer 細胞が長いアメーバ状の細胞質突起を出して類洞内皮に接着しているのに対し，滲出性マクロファージは小型で突起の発達はよくない．またペルオキシダーゼ反応が前者では粗面小胞体，Golgi 装置に陽性であるが，後者ではリソゾームにのみ陽性である．また両者は，それぞれの特異抗体を用いて免疫組織化学的に染め分けられる．四塩化炭素単回投与による Balb/c マウスの急性肝炎モデルでは，投与 3 ～ 5 日目に単球と滲出マクロファージが増加して肉芽腫を形成するが，7 日目以降のアポトーシスによって肉芽腫は縮小・消失する[67]．滲出マクロファージの増加は一過性で，緊急時の救援部隊といえる．

4．Pit cell（NK 細胞）とその他の large granular lymphocytes（LGL）

1976 年，ライデン大学の電子顕微鏡研究室からラット肝類洞内に電子密度の高い顆粒をもつ未知の細胞が，“pit cell”（pit はオランダ語で顆粒）の名称で報告された[68]．その顆粒は下垂体前葉の内分泌細胞の顆粒に類似していたため，肝臓の内分泌細胞の可能性が示唆された．その後学会では，この細胞がしばしば話題にあがったが，誰もそれをみたことがなく，その存在すら疑問視する研究者も現れた．1982 年になって，筆者らの研究室の大学院生が電子顕微鏡で肝臓を観察中に，pit cell と思われる細胞に偶然遭遇した．その微細構造を精査したところ，確かに pit cell であったが，内分泌細胞とする根拠に乏しく，むしろリンパ球の 1 種と思われた[69, 70]．その頃，末梢血中に NK 活

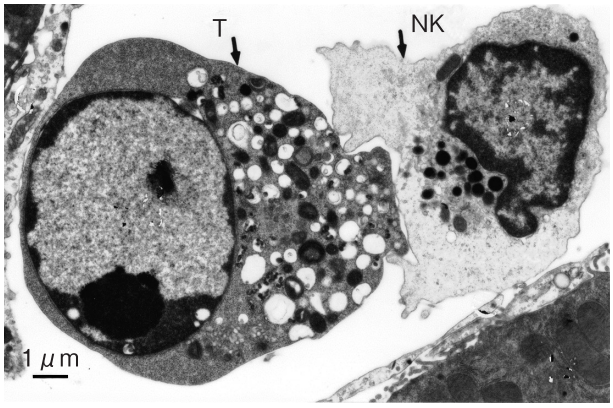


図 4．静注した YAC–1 腫瘍細胞（T）に類洞腔中の NK 細胞（NK, pit cell）が接着し，腫瘍細胞はアポトーシスに陥っている（金田研司撮影）．

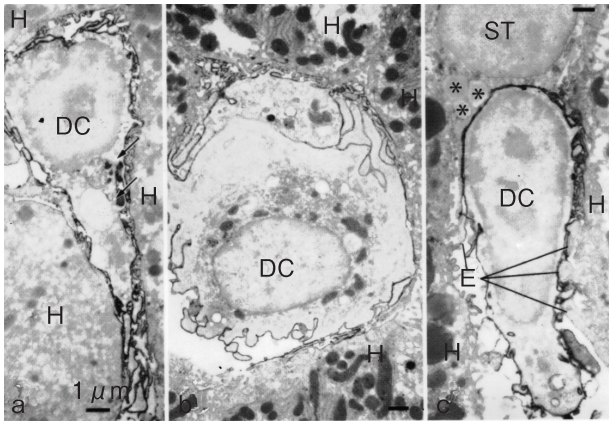


図 5．類洞腔から Disse 腔中へ移動中の樹状細胞（DC）（OX-6 免疫染色）．（文献 83 より引用）．H：実質細胞 ,ST：星細胞

性をもつ large granular lymphocyte（LGL）が報告されていた[71]．早速，末梢血から LGL を分離し，その構造を pit cell と比較したところ，pit cell は LGL に一致した[72]．その細胞質内には電子密度大の粗大顆粒のほかに，Golgi 装置の近傍に径 0.17 ～ 0.20 μm で，内部に 1 本の小杆状構造が橋渡ししている小胞がみつかった[69]．この小胞を rod-cored vesicle（RCV）と命名した[※5]．RCV は BRM（生物学的反応修飾物質）として溶連菌製剤 OK–432 を投与すると著しく増加し NK 活性が上昇した[73]．Pit cell は *in vivo*, *in vitro* で Yac–1 腫瘍細胞に接着して障害させた[74, 75]（図 4）．

正常ラット肝の pit cell の出現頻度は低く，0.5μm 厚の切片で，1 小葉当り約 10 個，全類洞壁細胞の約 3 %に相当し，ゾーン 1 に多い．肝臓以外にも末梢血，肺の毛細血管内，脾臓（赤脾髄），骨髄，小腸，気管，精巣上皮などの上皮内に観察されるが，リンパ節，白脾髄，胸腺などのリンパ性器官にはまれにしかみられない．OK–432 投与によって末梢器官の細胞数は増加し，類洞内皮や中心静脈内皮上をローリングする pit cell が増加する[75]．分離培養した類洞上皮細胞上におかれた分離 pit cell は，偽足を先頭に顆粒部分を後にして盛んにアメーバ状に動き回る．また培養下で腫瘍細胞と共存させて動画で観察すると，偽足を先頭に腫瘍細胞に近づき，接着すると 180° 回転し，顆粒部分を腫瘍細胞に向け，細胞は振り子状運動をしたり，腫瘍細胞を押したり引いたりを繰り返す．腫瘍細胞はそのうちアポトーシスに陥る[75]．腫瘍細胞との接着部を電子顕微鏡で観察すると，pit cell はリング状突起を腫瘍細胞内へ陥入させ，その先端部で細胞間接着装置をつくり，リング状突起と腫瘍との間にできた腔所へ pit cell の顆粒が放出される．顆粒中に含まれていたパーフォリンが腫瘍細胞膜に孔を開け，その孔を通してグランザイムが細胞中へ注入され，DNA を断片化するといわれる．

当初われわれは，形態的に pit cell は LGL で NK 細胞としてきたが，その後の研究から LGL には NK 細胞以外にも LAK（lymphokine activated killer cell）細胞，胸腺外リンパ球，NKT 細胞などが含まれることが報告されてきた．これらのリンパ球について簡単にふれておきたい．LAK 細胞は NK 細胞が IL–2 の刺激により活性化し，強い細胞障害作用をもつ形質変換した LGL で，NK 細胞よりやや大きく，細胞小器官がよく発達し，電子密度大の顆粒も大きい．小胞には RCV と，半月状の物質を入れている DCV（demilune-cored vesicle）をもつものが区別される[76]．胸腺外分化T細胞は胸腺外の肝や腸で分化をとげる小型顆粒をもつLGLで，$\alpha\beta$T 細胞と$\gamma\delta$T 細胞が区別される[77]．NKT 細胞も胸腺発生以前の胎生期に胸腺外組織で分化を開始するので，胸腺外分化 T 細胞に分類される T 細胞で，糖脂質のみを認識し，IFNγ，IL–1，TNF，IL–6 を産生する[78]．

5．樹状細胞

樹状細胞の研究は，昨年ノーベル賞に輝き亡くった Steinman による脾細胞に混在する Ia 抗原陽性細胞の発見に始まる[79]．肝臓では樹状細胞は Grisson 鞘内に少数観察されていたが，われわれは Grisson 鞘内にとどまらず，類洞腔や Disse 腔内にも見出し，第 5 の類洞壁細胞として報告した[80]（図 5）．樹状細胞はプロフェッショナルでもっとも強力な抗原提示細胞である．肝臓では類洞腔内で取り込んだ抗原に MHC クラス II

[※5] 粗大顆粒はリソゾームで，パーフォリンやグランザイム B を含む．RCV は分泌顆粒と考えられるが，その内容物はいまだに不明である．

前 目次へ 次

(Ia) 分子を結合させ，Grisson 鞘内のリンパ管を通って肝臓の局所リンパ節へ移動し，そこでナイーブ T 細胞に抗原を提示する[81, 82]．肝臓内の樹状細胞は細胞質の極性が明瞭で，核の一側は発達した Golgi 装置など細胞小器官がよく発達し，他側は無構造のヒアロプラズマで，ときにイカの足様に先端へ向かって急に細くなる特徴的な２～３本の細胞質突起をみることが多い[83]．皮膚の樹状細胞にみられる Birbeck 顆粒は，肝臓の樹状細胞にはみられない．

V．結　　語

肝類洞壁細胞の根深い錯誤が是正され，さらに新規細胞の発見によって，胆道系細胞，被膜および Grisson 鞘内結合組織細胞に加えて，肝臓の構成細胞の全種類がほぼ明らかになった．さらに肝臓内の，また肝臓外から送られてくる幹細胞の機能が同定されつつある．肝臓の機能や病態が細胞レベルで説明されるようになり，同時に新規細胞の発見が新たな研究を刺激してきた．肝門が臓器の解剖学的な門であるのに対して，類洞壁は肝臓の機能的な門といえよう．その壁の，それぞれの細胞が類洞血と肝実質の間に介在し，独自に，また互いに連携し合って肝臓の機能と病態を制御している．

謝　辞

本論文の内容は主として東京医科歯科大学医学部旧解剖学第１講座の肝臓研究グループによるものである．稿を終えるにあたり，本グループに属していた妹尾春樹，佐藤哲二，安達栄治郎，金田研司，段千恵子，Wichai Ekataksin, Bhunchet Ekapot, 岸江孝男，山本 均，史 家 嵐，鄒 珍珍，Peter Bauer，河合由樹子，藤枝弘樹，本松清行，増田 昭，Wayuni Lukita-Atmadja，小久保喜弘，金子道成の諸氏に感謝の意を表す．

本論文を，執筆中に急逝された故萬年 甫 東京医科歯科大学名誉教授の御霊前に捧げる．

文　献

1) Minot CS：On a hitherto unrecognized form of blood circulation without capillaries in the organs of vertebrata. J Boston Soc Med Sci 4：133–134, 1900.
2) von Kupffer C：Ueber Sternzellen der Leber, Briefliche Mitteilung an Prof. Waldeyer. Arch Mikr Anat 12：353–358, 1876.
3) Rothe P：Ueber die Sternzellen der Leber, Inaug Dissertation Munich University, 1882.
4) von Kupffer C：Ueber die sogenannten Sternzellen der Leber. Verh ant Ges. 12 Versammlung in Kiel, p80–86, 1898.
5) Metchnikoff E：Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien；Beitrag zur Lehre ueber den Kampf der Phagocyten gegen Karankheitserreger. Virchow Arch Pathol Anat 96：177–195, 1884.
6) von Kupffer C：Ueber die sogenannten Sternzellen der Saegethierleber. Arch Mikr Anat 54：254–288, 1899.
7) Berkley HJ：Studies in the histology of the liver：III. the perivascular cells of the rabbit's liver. Anat Anz 8：787–792, 1893.
8) Zimmermann KW：Der feinere Bau der Blutcapillaren . Zfd ges Anat 63：29–109, 1923.
9) 伊東俊夫：人のクッペル氏細胞と肝毛細血管壁に見られる脂肪摂取細胞の研究．解剖誌 26：42，1951.
10) 鈴木 清：組織の鍍銀法．実験治療 No. 310–320，1958.
11) Kiyono K：Zur vitale Karminspeicherung, Gustav Fischer, Jena, 1914.
12) Aschoff L：Das reticulo-endotheliale System. Erg Inn Med Kinderh 26：1–118, 1924.
13) 和氣健二郎：網内系はもうないか（1～5）ミクロスコピア 19：103–107，201–206，2002，20：15–20，101–105, 2003，21：197–200，2003.
14) Wake K：Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. Int Rev Cytol 66：303-353, 1980.
15) Popper H：Distribution of vitamin A in tissue as revealed fluorescence microscopy. Physiol Rev 24：205–224, 1944.
16) 吉田富三：肝星細胞の脂肪化に就いて．日病誌 30：188–192，1940.
17) Wisse E:An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. J Ultrastruct Res 31：125–150，1970.
18) van Furth R，Chn ZA，Hirsch JG et al：The mononuclear phagocyte system；a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull WHO 46：845–852，1972.
19) Wake K：Distribution of vitamin A in the liver. ed by Miyake M，Proc 5th Ann General Meeting of Jap Hiostochem Ass，Tokyo，p103–106，1964.
20) Wake K：'Sternzellen' in the liver；perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. Am J Anat 132：429–462，1971.
21) Wake K：Development of vitamin A-rich lipid drop lets in multivesicular bodies of rat liver stellate cells. J Cell Biol 63：683–691，1974.
22) Kawai Y，Wake K：Uptake of lithium carmine by sinusoidal endothelial cells in the liver；a conside ration for liver reticulo-endothelial system (RES). Acta Anat Nippon 70：S76，1995.
23) Kawai Y, Smedsrod B，Elvevold K et al：Uptake of lithium carmine by sinusoidal endothelial and Kupffer cells of the rat liver: new insights into the classical vital staining and the reticulo-endothelial system. Cell Tissue Res 292：395–410，1998.
24) Wake K，Kawai Y，Smedsrod B：Re-evaluation of

the reticulo-endothelial system. Ital J Anat Embryol **196**：261–269, 2001.
25) Wake K：Hepatic stellate cells；three-dimensional structure, localization, heterogeneity and development. Proc Japan Academy Ser B **82**:155–164, 2006.
26) Blomhoff R, Wake K：Perisinusoidal stellate cells of the liver：important roles in retinol metabolism and fibrosis. FASEB J **5**：271–277, 1991.
27) Senoo H, Sato M, Imai K：Hepatic stellate cells；from the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix. Acta Anat Nippon **72**：79–94, 1997.
28) Li D, Friedman SL：Hepatic stellate cells；morphology, function, and regulation. The Liver Biology and Pathobiology, ed by Arias IM, Boyer JL, Chisari FV et al, 4th Ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p455–468, 2001.
29) Sato M, Suzuki S, Senoo H：Hepatic stellate cells；unique characteristics in cell biology and phenotype. Cell Struct Funct **28**：105–112, 2003.
30) Friedman SL：Hepatic stellate cells；protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. Physiol Rev **88**：125–172, 2008.
31) Senoo H, Yoshikawa K, Morii M et al：Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative；past, present and future. Cell Biol Int **34**：1247–1272, 2010.
32) Senoo H, Hata R, Nagai R et al:Stellate cell (vitamin A-storing cells) are the primary site of collagen synthesis in non-parenchymal cells in the liver. Biomed Res **5**：441–458, 1984.
33) Friedaman SL：The cellular basis of hepatic fibrosis：mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med **328**：1828–1835, 1993.
34) Kawada N, Klein H, Decker K：Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. Biochem J **285**：367–371,
35) Kida Y, Xia Z, Zheng S et al：Interleukin–1 as an injury signal mobilizes retinyl esters in hepatic stellate cells through down regulation of lecithin retinol acetyltransferase. PloS One **6**：1–12, 2011.
36) Senoo H, Wake K：Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. Lab Invest **52**：182–194, 1985.
37) Wake K, Sato T：Intralobular heterogeneity of peri sinusoidal stellate cells in porcine liver. Cell Tissue Res **273**：227–237, 1993.
38) Zou Z, Ekataksin W, Wake K：Zonal and regional differences identified from precision mapping of vitamin A-storing lipid droplet of addressing the intralobular area of heterogeneity. Hepatology **27**：1098–1108, 1998.
39) Bhunchet E, Wake K：Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. Hepatology **16**：1452–1473, 1992.
40) Batres RO, Oslon JA：A marginal vitamin A status alters the distribution of vitamin A among parenchymal and stellate cells in rat liver. J Nutr **117**：874–879, 1987.
41) Wake K, Motomatsu K, Senoo H：Stellate cells storing retinol in the liver of adult lamprey, *Lampetra japonica*. Cell Tissue Res **249**：289–299, 1987.
42) Wold HL, Wake K, Higashi N et al：Vitamin A distribution and content in tissues of the lamprey, *Lampetra japonica*. Anat Rec Part A 276A：134–142, 2004.
43) Wake K. Sato T, Ekataksin W et al：Pillar cells in gill filaments of the lamprey, *Lampetra japonica*, store retinol. Biomed Res 10［Suppl 3］：597–605, 1989.
44) Bauer P, Wake K：Mesangial cells of the lamprey, *Lampetra japonica*, store vitamin A. Arch Histol Cytol **59**：71–78, 1996.
45) Kawada N, Kristensen DB, Asahina K et al：Characterization of a stellate cell activation；association protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. J Biol Chem **276**：25318–25323, 2001.
46) Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y et al：Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. Lab Invest **84**：91–101, 2004.
47) Asahina K, Zhou B, Pu W T et al：Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. Hepatology **53**：983–995, 2011.
48) Jacobs F, Wisse E, De Geeest B：The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. Am J Pathol 176：14–21, 2010.
49) Schaffner F, Popper H：Capillarization of hepatic sinusoids in man. Gastroenterology 44：239–242, 1963.
50) Wisse E, De Zanger RB, Charles K et al：The liver sieve：consideration concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. Hepatology **5**：683–692, 1985.
51) Wake K, Motomatsu K, Dan C et al：Three dimensional structure of endothelial cells in hepatic sinusoids of the rat revealed by the Golgi method. Cell Tissue Res **253**：563–571, 1988.
52) Dan C, Wake K：Mode of endocytosis of latex particles in sinusoidal endothelial cells of normal and perfused rat liver. Exp Cell Res **158**：75–85, 1985.
53) Soerensen KK, McCourt P, Berg T et al：The scave-nger endothelial cell – a new player in homeostasis and immunity. Am Physiol Rev (in press).
54) Uhrig A, Banafsche R, Kremer M et al：Development and functional consequences of LP Stolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. J Leukoc Biol **77**：626–633, 2005.
55) Martin-Armas M, Simon-Santamaria J, Pettersen I et al：Toll-like receptor (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediate the effect of CpG-oligonucleotides. J Hepatol **44**：939–946, 2006.

56) Knolle PA, Gerken G：Local control of the immune response in the liver. Immunol Rev **174**：21–34, 2000.
57) Crispe IN：Hepatic T cells and liver tolerance. Nat Rev Immunol **3**：51-62, 2003.
58) Wake K, Inoue K, Hara Y et al：Morphologicalevidence for differentiation from circulating angioblasts to sinusoidal and vascular endothelial cells in the chick embryo. 12th Int Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid. Pasadena, California, Oral presentation Abstracts No. 36, 2010.
59) Browicz T：Ueber intravasculare Zellen in den Blutcapillaren der Leberacini. Anz Akademie Wissenschft in Krakau, April, p80–86, 1898.
60) 和氣健二郎：Browicz の食細胞と Kupffer の「いわゆる星細胞」. 解剖誌 **84**：17–21, 2009.
61) Warner AE, Brain JD：The cell biology and pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages. Am J Physiol **258**：L1–L11, 1990.
62) Kaneda K, Wake K：Distribution and morphological characteristics of the pit cellsin the liver of a rat. Cell Tissue Rss 233：485–505, 1982.
63) Akira S, Umetsu S, Takeuchi O：Pathoigenrecognition and innate immunity. Cell **124**：783–801, 2006.
64) Seki E, Brenner DA：Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: Update. Hepatology **48**：322–335, 2008.
65) Wake K, Decker K, Kirn A et al：Cell biology and knetics of Kupffer cells in the liver. Int Rev Cytol **118**：173–229, 1989.
66) Naito M, Yamamura F, Nishikawa S et al：Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in culture. J Leukoc Biol 46：1–10, 1989.
67) Lukita-Atmadja W, Sato T, Wake K：Granuloma formation in the liver of Balb/c mice intoxicated with carbon tetrachloride. Virchows Archiv B Cell Pathol 64：247–257, 1993.
68) Wisse E, van't Norrdende JM, van der Heule J et al：The pit cell；a new cell type occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. Cell Tissue Res **173**：423–435, 1976.
69) Kaneda K, Wake K, Senoo H：The rod-cored vesicles in the pit cell. Sinusoidal Liver Cells, ed by Knook DL, Wisse E, Elsevier, Amsterdam, p77–84, 1982.
70) Kaneda K, Wake K：Distribution and morphological characterization of the pit cells in the liver of the rat. Cell Tissue Res 233：485–505, 1983.
71) Saksela E, Timonen T, Ranki A et al：Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. Immunol Res 44：71–123, 1979.
72) Kaneda K, Dan C, Wake K：Pit cells as natural killer cells. Biomed Res 4：567–576, 1983.
73) Dan C, Kaneda K, Wake K：A striking increase in rod-cored vesicles in pit cells (natural killer cells) and augmentation of the liver-associated natural killer activity by streptococcal preparation (OK432). Biomed Res 6：347–351, 1985.
74) Kaneda K, Wake K：Ultrastructural study of in vivo tumor cell lysis by liver-associated natural killer cells. Biomed Res 11：137–143, 1990.
75) KishieT, Kaneda K, Yamamoto H et al：Cinematographic analysis of in vitro movements of liver-associated large granular lymphocytes of the rat. Biomed Res 14：81–92, 1993.
76) Kaneda K, Nagamuta M Kurioka M et al：Ultrastructural characteristics of lymphokine activated killer cells of the rat in comparison with natural killer cells. Arch Histol Cytol **54**：119–132, 1991.
77) Abo T, Watanabe H, Iiai T et al：Extra-thymic pathways of T cell differetiation in the liver and other organs. Int Rev Immunol **11**：61–102, 1994.
78) 谷口 克, 田中祐二郎：リンパ球亜群とその機能調節；NK 細胞と NKT 細胞. 生体防御, 免疫と感染, 谷口 克, 谷口維紹 (編), 共立出版, 東京, 2001.
79) Steinman RM, Cohn ZA：Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med 137：1142–1162, 1973.
80) Yamamoto H, Kaneko M, Sato T et al：Ultrastructure and distribution of the I-a positive cells in the normal rat liver. Cells of the Hepatic Sinusoid, ed by Wisse E, Knook DL, Wake K, Kupffer Cell Foundation, Leiden, p292–294, 1995.
81) Matsuno K, Ezaki T：Dendritic cell dynamics in the liver, and hepatic lymph. Int Rev Cytol **197**：83–136, 2000.
82) Sumpter TL, Abe M, Tokita D et al: Dendritic cells, the liver, and transplantation. Hepatology **46**：2021–2031, 2007.
83) Sato T, Yamamoto H, Sasaki C et al：Maturation of rat dendritic cells during intrahepatic translocation evaluated using monoclonal antibodies and electron microscopy. Cell Tissue Res **294**：503–514, 1998.

An introduction of sinusoidal cells in the liver

Kenjiro Wake

Professor Emeritus Tokyo Medical and Dental University,
Department of Anatomy and Histology,
Faculty of Dentistry, Tsurumi University
Liver Research Unit, Minophagen Pharmaceutical Co. Ltd.

Summary
The original stellate cells in the liver described first by Carl von Kupffer (1876) has resurrected through the modern morphological studies. The hepatic stellate cells are unique perisinusoidal cells which store vitamin A and produce collagens. The reticulo-endothelial system (RES) by Aschoff (1924) was re-evaluated by the careful re-examination of Kiyono's lithium-carmine vital staining. The sinusoidal endothelial cells, which were excluded from the RES by van Furth's mononuclear phagocyte system (MPS,1970s), have been an important player of RES which clear waste products of large molecules in the body. These studies have ushered in an exciting era of sinusoidal cell research in understanding that these cells play pivotal roles in physiology and pathology of the liver. The sinusoidal cells are consisted of hepatic stellate cells, sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, pit cells (NK cells) and dendritic cells. In this mini-review, topics of each cell types explored mainly in our laboratory are introduced.

Key words：liver, sinusoidal cells, hepatic stellate cells, sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, pit cells, NK cells, dendritic cells, cell biology, medical history

血管外科の過去・現在・未来

岩 井 武 尚　　慶友会つくば血管センター
NPO 法人バージャー病研究所

要旨:著者の 65 歳定年退職の前後，血管外科は大きく変化して，今や血管内治療の時代を迎えようとしている．主として過ごした open surgery の時代 35 年を振り返りながら，すでに始まっている endovascular surgery への問題点は何か，何を伝えるべきなのかなどを述べた．新治療法がすべて生き残るとは思えないが，カテーテルだから安全，傷が小さいから安心，レーザーだから最新，時間がかからないからうれしいといった素人的発想が，この台頭してきた血管内治療には満ちていることも確かである．かつて私が手術し，20 ～ 30 年もの間，問題なく非常にうまくいっている患者を診るたびに，長期の視点で病気を治すという哲学を決して忘れてはならないと思う．

Key words：血管内治療，内頸動脈再建，腎動脈再建，腹腔動脈・上腸間膜動脈再建，高位大動脈再建，腹部大動脈瘤再建，ステントグラフト，腸骨動脈再建，PTA ステント，下肢静脈瘤

Ⅰ．はじめに

65 歳で定年退職して 5 年目になるが，退職と前後して，これほど専門臨床の世界が大きく動いた分野は少ないと思われる．自分自身でいえば，過去のみを十分堪能して大学を去った男といえる．2000 年のはじめ頃から，血管内治療がじわじわと広まり，大動脈瘤などをステント挿入・グラフト置換で治療するステントグラフト内挿術が保険適応となるや，バルーンによる血管拡張術などと組んで“血管内治療(endovascular)”は一つの独立した分野になった．デバイスの発達も，進歩・発展に拍車をかけることになった．今や，血管内治療は，かつての血管外科治療の 60%を超える時代となり，さらに 70，80%という数字も見え隠れする．

Ⅱ．血管外科の過去

どの分野でも教科書というものがある．特に英文のものが尊ばれるが，ご多分にもれず血管外科も「Vascular Surgery」という名著がある．「Harrison 内科学」が学生時代有名であった，あの手の本が上下巻 2 冊からなっていて結構重い．要するに，ぶ厚い 2 冊分の内容があるわけで，血管外科のスタンダードとなっている「Rutherford 版」は第 7 版を数える．内容構成は，大動脈，中小動脈，大静脈，静脈，門脈，動静脈奇形，リンパ管などで，疾患は動脈瘤，動脈炎，変性動脈閉塞症（アテローム血栓症），動脈圧迫症候群，Raynaud 病，外膜嚢腫，静脈瘤，深部静脈閉塞，Budd-Chiari 症候群，肺塞栓症などに及び，病態は解剖，生理，流体力学から解説し，臨床は，破裂・解離・塞栓などの急性症状と跛行，潰瘍などの慢性症状を解説している．余談になるが，この最新版に，筆者らが研究してきた Buerger 病の病因として口腔内細菌（歯周病）説がはじめて掲載された．

頭～趾先の先まである血管病変を過去 30 年間，どのように治療してきたかを簡単に振り返る．代表的な 10 病変で論じてみたい．

1．内頸動脈膨大部のアテローム血栓

内頸動脈膨大部のアテローム血栓処理は，過去 10 年くらいから現在も，多分，今後も大きなテーマになると思われる．1940 年代には，頭蓋外の頸動脈分岐

連絡先：岩井　武尚　iwai@keiyu.or.jp

前 目次へ 次

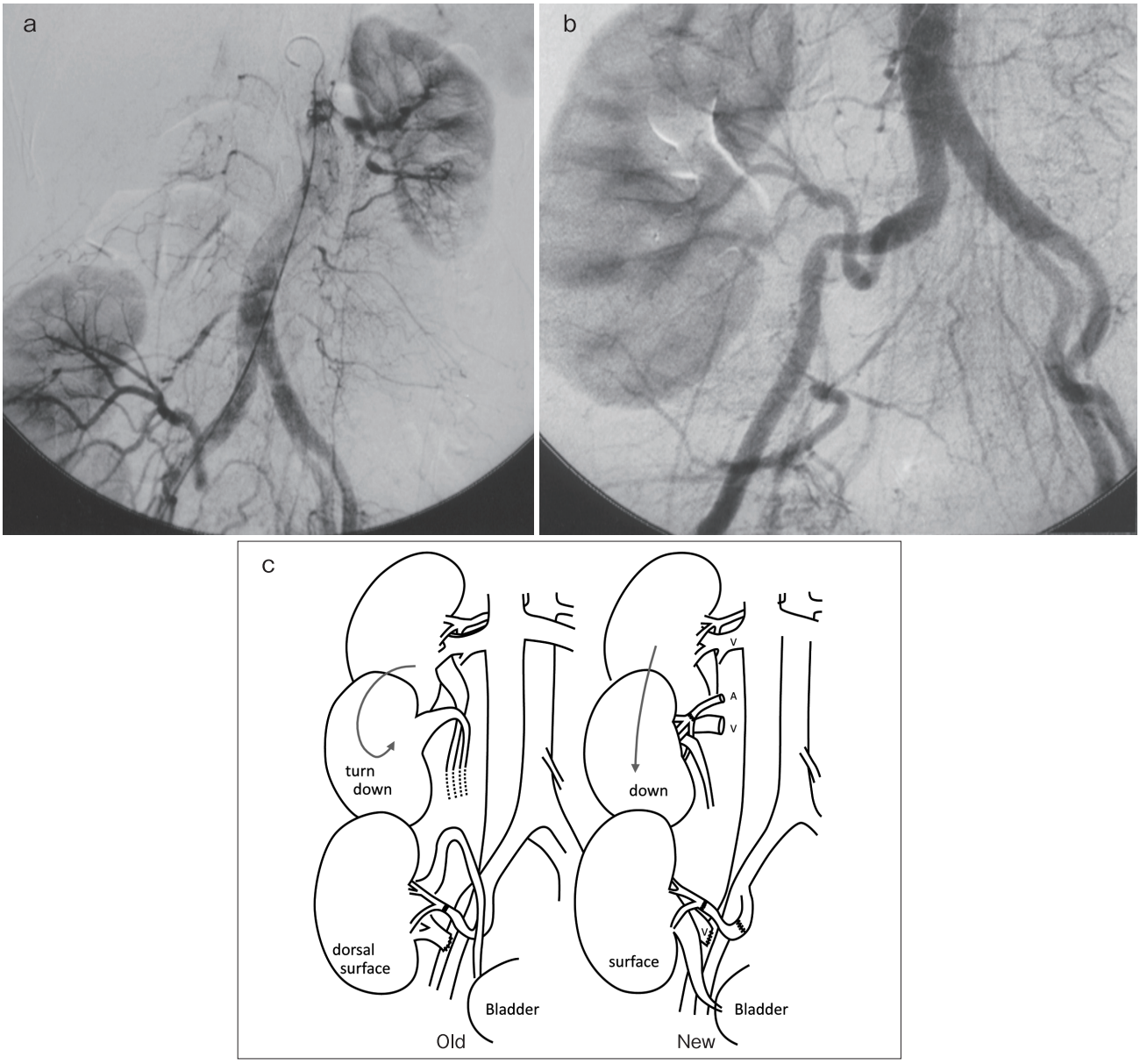


図1．腎動脈瘤、腎動脈狭窄に対する自家腎移植の工夫
古い術式（Old）を新しい術式（New）にかえて尿管の上へ突出するのを防ぐ
a. 腎動脈瘤（血管造影像）
b. 腎動脈狭窄（血管造影像）
c. 自家腎移植

部のアテローム血栓が，まさか脳に飛ぶとはだれも思っていなかった．1950年代に入り，やっと血管外科医が治療を始めて以降，世界中に認識された．米国では，何人もの歴代大統領がこの病気で倒れ，麻痺を残している．筆者は1977年2月にわが国ではじめて手術を行ったが．きわめて早いほうである．後述するが，当時は脳外科医はだれも手術はしていなかった．同じ年に内頸動脈瘤の手術にも成功している．日本では，これらの臨床治療が一般化したのは1990年に入ってからで，内膜摘除術（CEA）が行われてきた．

2．鎖骨下動脈閉塞

多くはアテローム血栓症であるが，鑑別診断が大切である．高齢者の鎖骨下動脈起始部に限局して閉塞が起こるのはアテローム血栓症，女性で頚動脈閉塞を伴って閉塞があれば高安病，第1肋骨と接する付近なら胸郭出口症候群，さらに末梢なら小胸筋による圧迫閉塞であり，野球の投手にしばしばみられる．アテローム血栓症では通常，血行再建は行わない．左右の血圧差が30mmHg以上長く続き，症状（脱力感，めまい，drop attackなど）があれば，腋窩–腋窩動脈交差バイパスなどによりドラマチックに症状は改善する．

前 目次へ 次

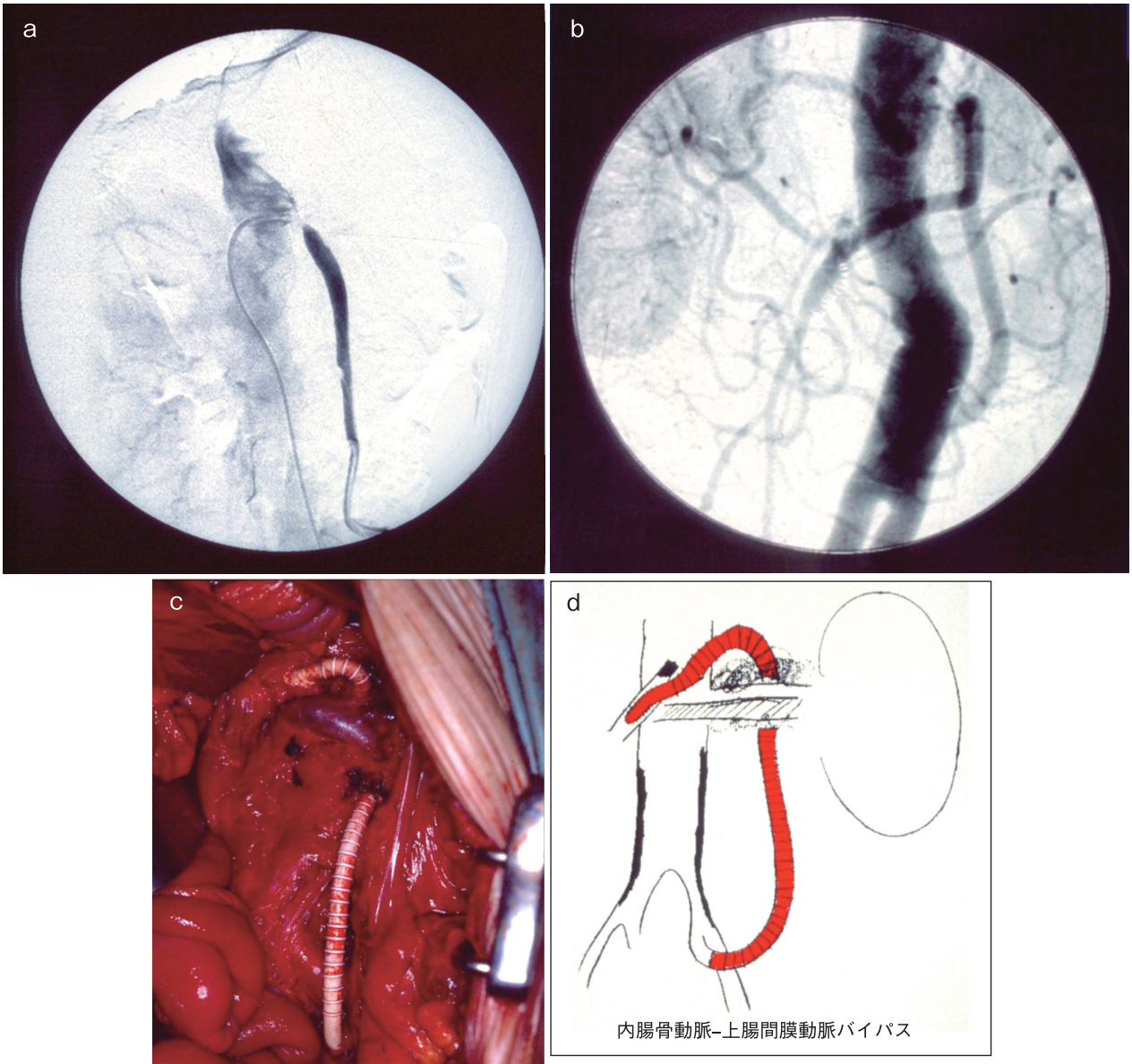


図２．上腸間膜動脈再建術（バイパス手術）
６例を経験した（文献２により引用）．

３．腎動脈再建

これは，いろいろ苦心した領域で，もっとも大切なことは視野の展開である．若年者の腎血管性高血圧はFMD（線維筋性形成異常）という病変がほとんどで，初期は腎臓を一時体外に取り出して再び戻す *ex vivo* 再建を行った（図 1）．アテローム血栓症では，血栓内膜切除でパッチ，人工血管や大動脈からのバイパス（内腸骨動脈を用いた）を行ったし，成績もよかった．腎動脈瘤ではその発生学的理論から，腫瘤から分枝が出ることはないとの信念で，瘤壁切除・側壁縫合を行ったが合併症はなかった．腎への到達経路は最終的には腹壁横切開，開腹してから後腹膜を切開して腎に到達する経路は視野が広く，腎門部までの血管処理が安全・確実にできることがわかり汎用した．*Ex vivo* 再建も，手術がいらないような視野が得られる．

４．腹腔動脈・上腸間膜動脈狭窄

症例数はそれほど多くはないが，工夫と安全をこらす部位である．腹部アンギーナという，食後の痛みを訴え，腹腔動脈や上腸間膜動脈に閉塞性病変があれば治療せざるを得ず，最小リスクで最大効果を上げるには上腸間膜動脈へどうバイパスするかである．そこでわれわれは，ルートはリング付き人工血管を使って下

図３．小さな創でＹ型人工血管移植に成功

部腹部大動脈から腎静動脈ペディクルを後から回って上腸間膜動脈に順行性に吻合できる術式を考案した（図 2）．6 例を経験し，きわめてよい成績をあげたが，その後米国からとてもよく似た術式が紹介されて驚いた．腹腔内臓器動脈瘤は，これもチャレンジャブルである．側副路をよく調べあげて，さらに検討を加え，切除するか再建するか，コイルで詰めるかを決定してきた．

５．高位大動脈閉塞

これは，腹部大動脈が腎動脈付近（なぜか高位と呼ぶ）まで閉塞してしまった状態で，殿筋・下肢跛行と ED（勃起不全）を訴える．また，英文誌によくまとめた症例の多かった疾患である．筆者は 92 例経験したが，さまざまな工夫が必要であった．そのうちの一つは腎保護であり，ほかには大動脈を横切る左腎静脈の処理で，さらに当時は，内腸骨動脈の再建により血行性 ED を完治させることをテーマにしていたので積極的に対応した．小切開，腹腔鏡による治療も試みた．腹部に 6cm ほど，下腹に 5cm の計三つの切開のみで 15 例ほど治療した（図 3）．一方，高齢者・高リスク患者では，腋窩動脈–両大腿動脈バイパスにせざるを得なかった．

６．腹部大動脈瘤（分枝再建を含む）

30 年で 600 例以上の開腹手術を行ったが，当たり前のことだが，簡単なものは簡単であり，難しいものは難しい．中枢側吻合部は十二指腸と接するので，将来ここに人工血管–腸管瘻を作ることがないように綿密な工夫を行ったことと，術後の腸管虚血を予防・予知することに努めてきた．後者には直腸ドプラ計を考

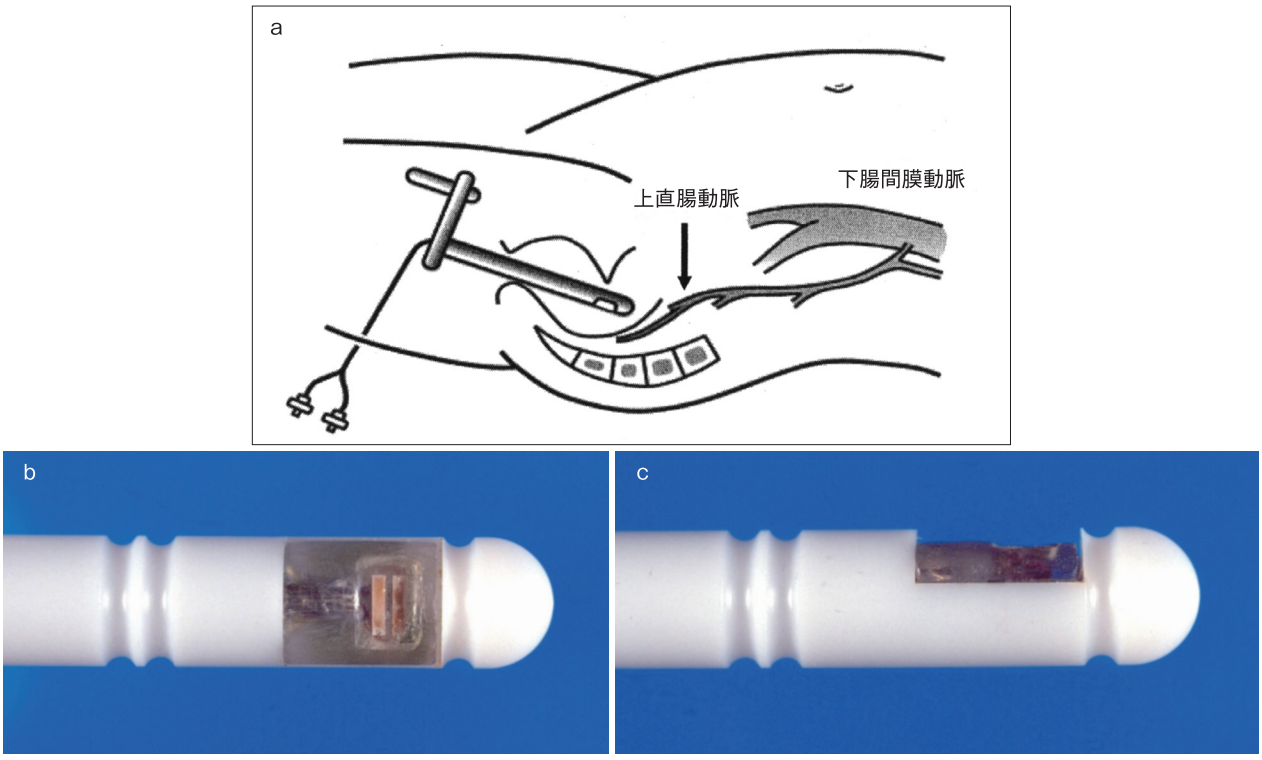


図４．経肛門的直腸ドプラ法
1988 年以降使用し，腸管虚血の予知・予防に活躍している．
（文献２より引用）

前 目次へ 次

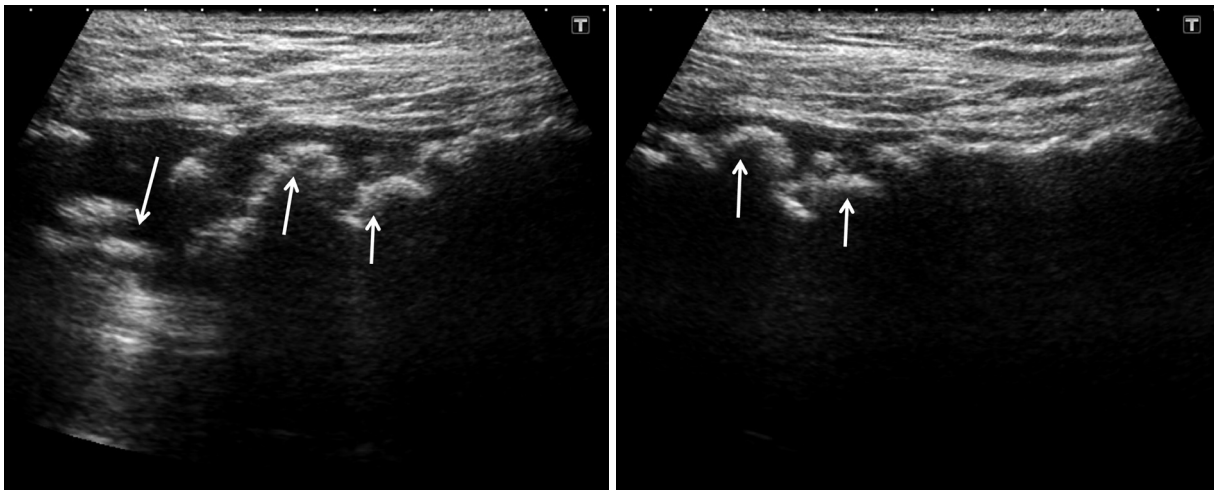


図５．コーラルリーフ（珊瑚礁）様と呼ばれる総大腿動脈の硬い血栓（矢印）（超音波像）

案し，実践に用いて意義ある結果を得た．このドプラ計でわかったことは，上腸間膜動脈からの血流がかなり腸管を潤していることで（図 4），現在の病院でも，まだ使用している．

７．腸骨動脈閉塞

腸骨動脈では左右両側が閉塞することは少なく，片方の閉塞では大腿–大腿動脈交差バイパス（FF バイパス）手術を行うが，これらの症例は多数経験した．この交差バイパスには 3 種類の方法があるが，さらに皮下ルートと腹直筋後方を通す Retzius 腔経路もあり，このルートは恥丘部が突出せず目立たなくてよいという利点があった．外径 8～10mm の人工血管を用いる．

８．総大腿動脈・浅大腿動脈閉塞

外腸骨動脈は鼠径部を出ると，総大腿動脈となり，4～5cm で浅大腿動脈と大腿深動脈に分かれる．浅大腿動脈は導管動脈で，下腿への血液を運び，大腿深動脈は大腿の栄養をつかさどる栄養動脈である．総大腿動脈が閉塞性変化を始めると，下肢全体の血液量が極端に減ることになり，間欠性跛行などの臨床症状が非常に強くなる．皮肉なことに，ここにできるアテローム血栓は通常，石のように硬い．ハサミで切れないくらいで，俗にコーラルリーフ（珊瑚礁）といわれる．いかにバルーンが進歩しても，広げることはできないと思われ（図 5），開腹手術が絶対に必要である．次に非常に多い浅大腿動脈閉塞であるが，大腿深動脈がよく開存していれば，浅大腿動脈閉塞は，治療する必要はないくらいに血液は流れ，300m*l*/分以上も流れることが少なくない．したがって大腿深動脈の起始部のみに狭窄を認めるならば，それを治療すればよいことになる（大腿深動脈形成術）．鼠径部，膝窩付近は関節があり，思わぬ方向に曲がったり，ねじれたりするのでステントは適さない．下肢血行再建の中でもっとも多い大腿動脈–膝窩動脈バイパスでは，吻合法の工夫やバイパスの長さ・曲がり具合に余裕をもたせる必要がある．人工血管を用いても，５年開存率 80～85％が得られるようになった．末梢側吻合部を十分コブラヘッドにすることが開存性向上につながったと自負している．

９．膝窩動脈・下腿動脈閉塞

膝窩動脈の閉塞では，膝窩動脈捕捉症候群と膝窩動脈外膜嚢腫を常に鑑別する必要がある．ともに圧迫による動脈閉塞であり，症状が強ければ血行再建の適応である．自家静脈を使用する膝下へのバイパスは，20 ～ 30 年前まではあまり多くはなかったが，糖尿病や血液透析（HD）の増加で適応や患者数が増加した．しかし，形態的に手術が容易そうな患者は少なく，膝下バイパス手術は時間がかかり，重症虚血治療は長期入院となり，油断すると急速に進行するので大変な手術でもある．30 年前，自前の弁破壊装置を作ったりしたが，筆者の大学勤務の最後の頃には，弁を expandable に破壊して，自家静脈を順行性に利用できる *in situ* 手術が中心となった．

１０．下肢静脈瘤

20 年くらい前までは，足部の内果鼠径部までの大伏在静脈全長のストリッピング手術（静脈抜去術）が主流であった．その後，無侵襲検査の普及などにより，逆流部位を狙って抜きとれるようになり，抜きとる距離が短くなった．1990 年頃から硬化療法も加わり，患者への侵襲も少なくなった．2000 年からはフォーム硬化療法が導入され，患者の選択肢は格段に広まり，

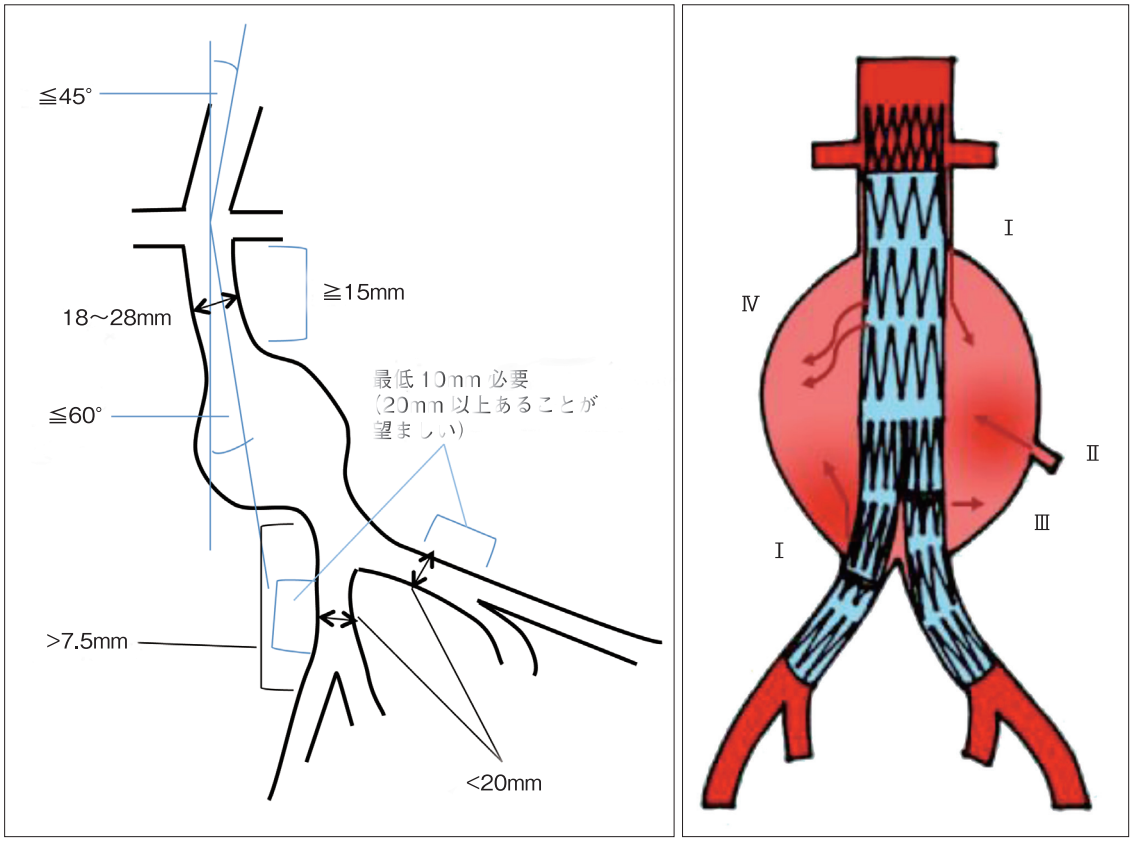


図6．腹部大動脈瘤のステントグラフト治療
a．解剖学的適応
b．エンドリーク（動脈瘤内への血液漏出）の種類．Ⅰ～Ⅳまである．

静脈瘤専門クリニックも出現するようになった．

Ⅲ．現在何が残ったのか，何が変わったのか，その現状

2010年を境にして，何が変化したかを振り返ってみたい．それには前述の10項目について，その変化の実態を述べればだれもが実感できると思う．

①内頸動脈膨大部のアテローム血栓では血管内治療が当然試みられ，新技術が開発されてきた．欧米で治験を繰り返したステントがわが国でも導入されたが（頸動脈ステント留置術：CAS），さまざま問題がある．拡張時の脳へ飛ぶ微小塞栓への対応，拡張時の低血圧や除脈，時に心停止などが問題となっている．脳外科医，循環器内科医，血管外科医などが別々にCASに取り組んでいる．

②鎖骨下動脈閉塞症に対しても，血管内治療が始まった．前述したように必要がないのに狭窄や閉塞を目の敵にする一部の医師が競うように行っているが，人間のもつの力を知れば，必要ないものも多い．自然治癒．先日は56歳男性が，血管内治療（経皮的血管形成術：PTA）をすすめられて来院した．2ヵ月の観察で左右血圧差20mmHg，握力はほぼ左右差なし，脈拍出現2+となって，まったく普通の生活を行えるようになった．正常の血管から正常の血管にバイパスする血管外科と，詰まった血管を治療する血管内治療とは危険度が大きく異なる．動脈閉塞とその自然経過を十分理解すべきであろう．

③腎動脈狭窄部再建は，今では古い手術となってしまった．現在の主流は，アテローム血栓であろうがFMDであろうが，バルーン拡張，ステント挿入である．ただし片腎に問題がある場合は外科手術の適応となる．また，腎動脈瘤も通常の形のものではコイル塞栓などは難しく，外科適応となり，手術も比較的簡単である．横切開の利点を感じる．

④腹腔動脈・上腸間膜動脈の狭窄は，腸の色や腸梗塞を見過ごすことから，開腹・血行再建が主流となっている．動脈瘤ではコイル塞栓が適応となることが少なくない．

⑤高位大動脈閉塞は，残された血管外科の牙城の一つである．もちろんカテーテル治療を第一とする医師はいる．腎保護を考える人もいるが，血管内治療の限界部分であり，カテーテル治療で万一死亡した場合，医師の責任が問われると思う．内腸骨動脈の再建は，大切な仕事であったが，閉塞で起こるEDがシルデナフィル（バイアグラ）などが出現し，有効性・安全性

前 目次へ 次

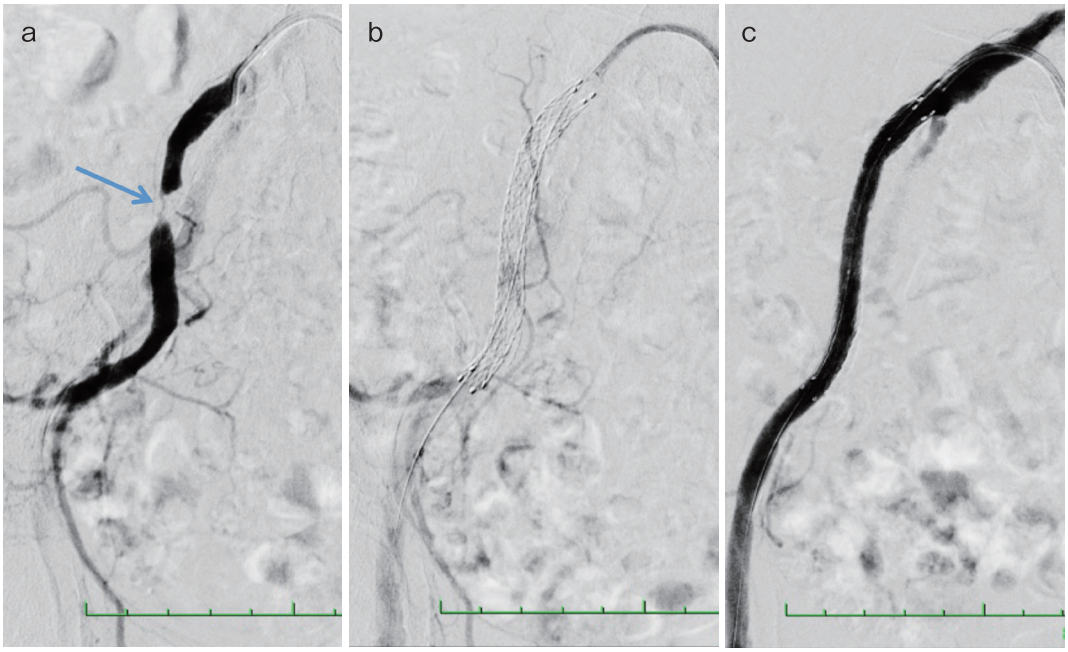


図 7．右外腸骨動脈狭窄のバルーン拡張・ステント挿入治療
a．右外腸骨動脈狭窄（矢印）
b．バルーン拡張．ステント挿入
c．術後．よく拡張している

の評価が定まったことにより，血行性 ED の多くがこれらので処方・治療されることになった．

⑥腹部大動脈瘤は大問題である．腹部大動脈瘤のステントグラフト治療は 1991 年 Parodi らの小発表に端を発する[1]．外腸骨動脈などからカテーテルを挿入し，ガイドワイヤーを通して丸めたステントグラフト（人工血管：SG）を入れ，血管を広げて治療するもので，人間の知恵を最大限に発揮してようやく役立つものができるようになった（図 6）．年間何千もの SG が植め込まれるようになっている．

⑦腸骨動脈の閉塞性疾患であるが，疾患そのものが多い．バルーンで膨らませ，金属製のステントを入れることがほぼ常識となった（図 7）．ただし，慢性的に閉塞した部位を長距離にわたり広げるのは依然困難であり，外科手術が選択される．片側はバルーン・ステントで，片側へはバイパスといった組み合わせを“ハイブリット型再建”と呼ぶようになった．

⑧総大腿動脈・浅大腿動脈閉塞の血管内治療は現在，じわじわと浸透しつつある．総大腿動脈のコーラルリーフ（珊瑚礁）様変化部位には外科的適応が依然としてある．浅大腿動脈の Hunter 管付近は好発部位であるが，ここにバルーンを入れ，さらにステントを置くことには依然異論があるが，重症虚血肢を一時救うためなら許されるかもしれない．下肢という運動器官にステントを入れると，ステントが折れたり，変形したりして完全なものは今もないと思われる．むしろ大腿深動脈の流れに注意すべきである．

⑨膝窩動脈閉塞は，血管内治療の踏み込むべき領域でないことが多いので注意すべきで，まして膝窩動脈捕捉症候群，膝窩動脈外膜嚢腫では禁忌といってよい．それでも，チャレンジと称して，良くない結果を招く人が後を絶たない．血管外科医，脈管専門医などの意見を聞くべきであろう．

⑩下肢静脈瘤に対しても，血管内治療がかなり優勢となり，多分これに置き換わるであろう．その一つが，フォーム硬化療法と呼ばれる，静脈硬化薬をフォーム化して超音波ガイド下に伏在静脈などの本幹を固め，圧迫する治療法である．高齢者ではきわめて有効で，外来ですべて施行できる．もう一つは手術室を使うレーザ治療である．これは血管内にカテーテルを通し，レーザ光線で静脈を固めるものである．両者とも傷ができない．

Ⅳ．未来へ引き継がれるもの

カテーテルだから安全，傷が小さいから安心，レーザーだから最新，時間がかからないからうれしい，といった素人的発想が，現代の血管外科治療とくに血管内治療には満ちていることも確かである．21 世紀に入って始まった上述したような新治療法が，すべて生き残るとは思っていない．昔の治療は 20，30 年先を目標に治療をしてきたのである．新治療法の結果は 5

～6年の結果で判断できない．現在，大学で手術した患者を，外来で診ているが，20，30年前に手術した患者も多い．彼は，いまだに問題なく経過している．検査に追いまくられた，ビクビクした人生（血管内治療）がいいのか，検査もなくすっきりした人生（血管外科治療）がいいのか，長く病気と向き合った人にしか本当のことはわからない．

文　献

1）Parodi JC，Palmaz HD，Barone HD et al：Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysm．Ann Vasc Surg 5：491–449，1991.
2）Inoue Y，Sugano N，Iwai T：Long-term results of aorta-superior mesenteric artery bypass using a new route．Surg Today 34：658–661，2004.
3）Iwai T，Sato S，Sakurazawa K et al：Use of transanal intubation in Doppler ultrasonic assessment of blood flow of the rectal wall．Surg Gynecol Obstet 169：263–264，1989.
4）岩井武尚（監），井上芳徳，菅野範英（編）：血管外科段階式マスター症例100選，医歯薬出版，東京2007.
5）岩井武尚：踊る血管—12775日の出会い，キタメディア，東京，2007.
6）岩井武尚，折井正博，大橋重信ほか（編）：最新血管外科手術100選，医歯薬出版，東京，1991.
7）岩井武尚：こうして治す下肢静脈瘤—日常生活のケアから最新情報まで，保健同人社，東京，2008.
8）岩井武尚：バージャー病—手足の血管が詰まる・タバコで悪化する，保健同人社，東京，2011.

Vascular surgery: The past, present, and future

Takehisa Iwai

Tsukuba Vascular Center
NPO Buerger Disease Research Institute

Summary

Around the time I retired at the age of 65, open vascular surgery shifted greatly toward endovascular surgery. As a surgeon who has performed over 4000 aortic, arterial, and vena caval open surgeries in my 35 year-career, I would like to discuss the clinical problems of endovascular surgery and offer my advice to young surgeons. I wonder if the new technique will prove to be safe and reliable over the patient's lifetime. The new method is promoted as superior: the catheter technique is safe, the small incision is reliable, laser therapy is new, and short surgery is more pleasant. Yet, we see patients today who had the tried-and-true open vascular method surgery 20 or 30 years ago and are doing very well with no post-operative trouble. We shouldn't rush to them and throw out the old ones, then use this instead. It is this long term outcome that should be of primary consideration to vascular surgeons.The vascular disease should be cured a viewpoint of so long time recovery.

Key words：open vascular surgery，endovascular surgery

アレルギー病はなぜ増えたか
—きれい好きの功罪検証

藤田紘一郎　東京医科歯科大学名誉教授
人間総合科学大学教授

要旨：花粉症，アトピーや喘息などのアレルギー性疾患は 50 年前の日本にはほとんどみられなかった病気である．このようなアレルギー性疾患が最近になって急増した原因の一つに，私たちがよかれと思って作ってきた便利で快適で清潔な“現代の文明社会”があると思う．本稿では，寄生虫のアレルギー反応抑制機構を中心に“キレイ社会の落とし穴”について考察してみたい．

Key words：寄生虫，Ⅰ型アレルギー，IgE 抗体，キレイ社会

Ⅰ．はじめに

日本人は古来より寄生虫と上手に共生することによりアレルギー病などの発症を抑え，健康のバランスを保ってきたものと思われる．しかし，近代になって文明がもたらした快適な生活や過剰ともいえる清潔志向は，共生していたウイルスや細菌類，寄生虫を排除することになった．そのことが私たちの免疫力を低下させ，アレルギー病などに苦しむようになったのではないだろうか．本稿では，現代病といわれているアレルギーを軸に，寄生虫が果たしている役割について考えてみたい．

Ⅱ．腸内寄生虫感染が花粉症を抑制している

日本人は昔から寄生虫に感染していた．回虫の感染率は江戸時代～第 2 次世界大戦後 10 年くらいまでは，少なくとも 50% 以上の値で推移してきた．顕微鏡で回虫卵が観察できるようになった 1922 ～ 1929 年までの回虫感染率の全国平均は 52.7% で，その後，次第に減少して第 2 次世界大戦の初期に 30% になったが，大戦末期以降は増加し，1949 年には 63% を示した．しかし，1950 ～ 1975 年の 25 年間に急速にその率を減じ，さらに，その後は近年にいたるまで 0.02 ～ 0.01% 台で推移している．

一方，1960 年頃から日本ではアトピー性皮膚炎，気管支喘息，花粉症などのⅠ型アレルギー疾患が出現し始め，現在では実に国民の 3 人に 1 人がなんらかのアレルギー症状で悩んでいる．4 歳以下の子どもでは，実に 42.3% がアレルギー患者であるという報告もある．しかし，考えてみると，現在と同じ延長 37km，約 13,000 本のスギが日光市に植えられたのは 17 世紀前半であった．昔の日本人は，スギ花粉が飛んでいても花粉症にならなかったようである．1963 年，日本ではじめてスギ花粉症患者が日光市でみつかったのは，日本人の回虫感染率が 5% を切ったときである（図 1）．後藤ら[1]は，全国 52 ヵ所の野猿公苑のニホンザルについてスギ花粉症を経年的に観察した．その結果，ニホンザルのスギ花粉特異的 IgE 抗体の保有率は 1970 ～ 1988 年の約 20 年間ほぼ一定の 8 ～ 12% で，この間の増加はまったくみられなかった．しかし，ヒトでは，スギ特異的 IgE 抗体の保有率が 1973 ～ 1984 年の約 10 年間で約 4 倍に増加していた．ニホンザルの花粉症はこの 20 年間にまったく変化していないのに，なぜ，ヒトの花粉症は最近急増しているのだろうか．スギ花粉飛散量や大気汚染の影響はヒトもサルも同じである．後藤らは，同時に寄生虫感染の推移に注目している．その結果，ニホンザルの寄生虫感染率は 1950 年～現在まで常に 80% 以上で，変わっていない．しかし，ヒトの寄生虫感染率は前述のように 63% から 0.02% に急激に減少している．このことにより，サ

連絡先：藤田　紘一郎　kofujita@galaxy.ocn.ne.jp

前　目次へ　次

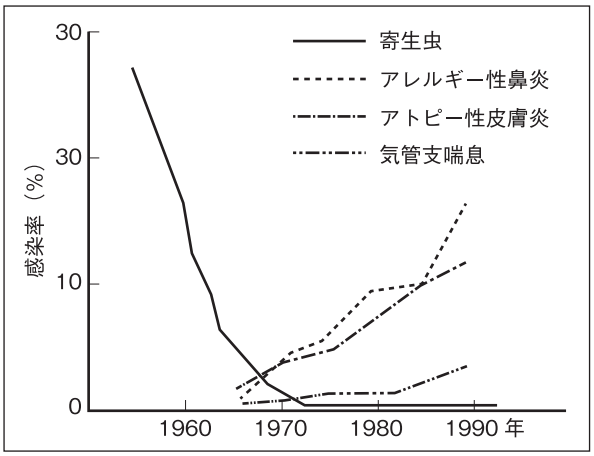


図 1．寄生虫感染率とⅠ型アレルギーの推移

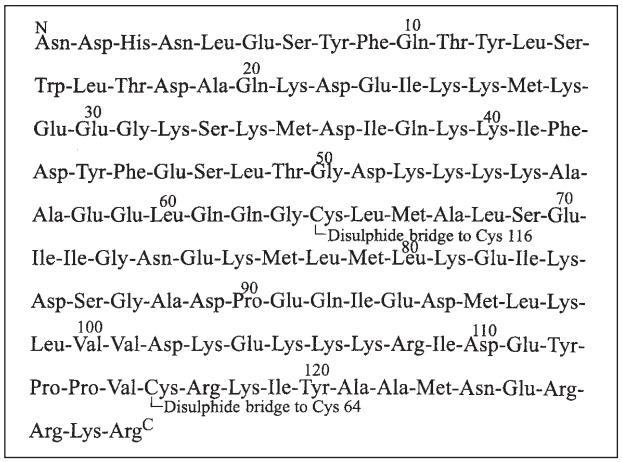


図 2．IgE 産生誘導抗原の遺伝子組成

ルの寄生虫感染がサル・スギ花粉症の増加を抑制したものと推定された．

ところで，現在のドイツという国は旧西ドイツと旧東ドイツが一緒になった国である．おもしろいことに，旧西ドイツに住んでいた人が，旧東ドイツに住んでいた人よりアレルギー病にかかる割合が非常に高いのである．たとえば，旧西ドイツ人と旧東ドイツ人の 9～11 歳の子ども約 7,800 人の花粉症の罹患率では，旧西ドイツ人で 8.6%，旧東ドイツ人で 2.6% の割合で花粉症患者が認められ，旧西ドイツ人の方が約 3 倍も多く花粉症に罹患していた[2]．アトピー性皮膚炎にかかっている子ども，気管支喘息にかかっている子どもすべて，旧西ドイツの子どもに罹患率が高かったのである．同じドイツ国民であるのになぜ，旧西ドイツの子どもにアレルギー病の罹患率が高いのであろうか．今までアレルギー病の原因と考えられた大気汚染や自動車の排気ガスの曝露量，農薬の摂取量などすべて旧東ドイツの子どもに多かった．しかし，彼らはアレルギー病にはあまりかかっていなかった．

ハンブルグ大学の研究者は，旧西ドイツ，旧東ドイツの子どもたちの血清 IgE 値を比べた結果，旧東ドイツの子どもたちが高いことがわかった．旧東ドイツは旧西ドイツに比べ近代化が遅れ，まだ回虫や鞭虫に感染している子どもがみられ，これらの寄生虫がアレルギー反応を抑えていたことが判明したのである．

このような疫学的事実から，筆者は最近の日本人の花粉症などアレルギー病の異常な増加は，日本人の体内から寄生虫を追い出した体内事情が原因ではないかと考えている．

Ⅲ．宿主に IgE を誘導する寄生虫体内の活性物質

寄生虫感染が細菌やウイルスなどの病原微生物感染と決定的に異なる点は，寄生虫感染だけが宿主に IgE 抗体を産生することである．この場合，寄生虫に特異的な IgE のみならず，寄生虫には無関係な非特異的多数の抗原に対する IgE 抗体も同時に産生する．

われわれはイヌ糸状虫（*Dirofilaria immitis*）の分泌・排泄液中の抗原を用いて IgE 抗体誘導能について調べた．その結果，分子量約 20,000 の糖蛋白質（ESC）が特異的 IgE 抗体を誘導していることがわかった（図 2）[3]．ESC はスギ花粉やダニなど自然界に存在しているアレルゲンと性質がきわめて類似していた．つまり，低分子量の糖蛋白質で，自然界ではいつまでも抗原性を失わない，きわめて安定な物質であった．また，ESC は，Owhashi ら[4]が好中球遊走因子としてイヌ糸状虫から分離したポリプロテインと一致することが明らかとなった．次いで，ESC のリコンビナント体（rDiAg）を用いて，種々の生理学的・薬理学的特性について検討した．その結果，寄生虫由来の rDiAg はサイトカイン様の多彩な作用をもっていることがわかった．

Ⅳ．寄生虫由来の非特異的 IgE はアレルギーを抑制する

寄生蠕虫類では，IgE 抗体の産生が特異的のみならず非特異的にも増強され，結果として血清総 IgE 値の著しい上昇をきたす．このため寄生蠕虫感染症では，熱発作，全身浮腫，喘息様発作などⅠ型アレルギーに起因する症状が多くみられる．また，寄生蠕虫感染が IgE 抗体産生の非特異的増強をもたらすことから，寄

前　目次へ　次

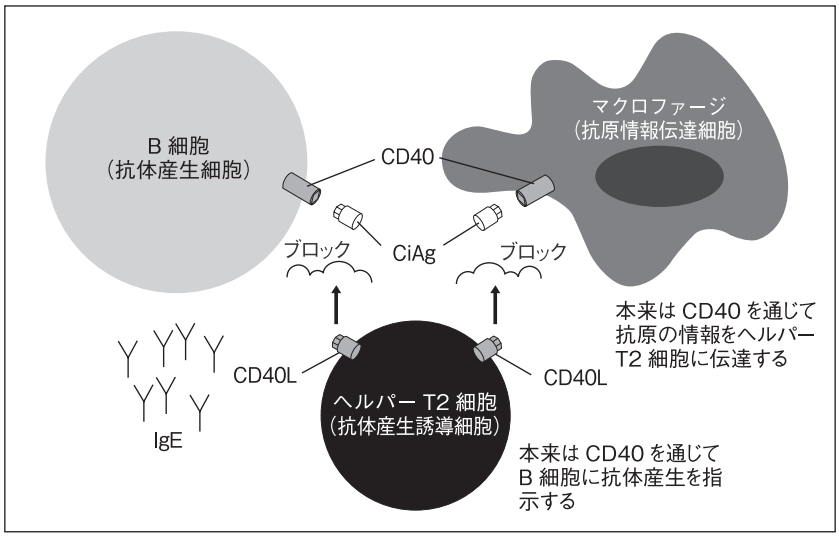


図 3. CD40 のブロックによるアレルギー反応を抑制

蠕生虫と無関係な抗原に対するアレルギー疾患を併発する可能性が示唆され，事実，以前は消化管内寄生虫感染者の間に気管支喘息が多いとの報告がいくつかみられた[5]．しかし，その後の検討で，寄生虫の高度浸淫地域では喘息や花粉症などのアレルギー疾患はまれで，寄生蠕虫感染はむしろ他のアレルギー疾患の発現を抑制していることがわかった[2, 7]．松下[7]は，アフリカから輸入されたチンパンジーをスギ花粉で感作してもなかなか鼻アレルギーは発症しないが，駆虫薬を投与して腸管寄生虫を駆虫すると発症するようになると述べている．

つまり，寄生蠕虫感染によってもたらされた多量の非特異的 IgE 抗体が互いに競合し合い，肥満細胞や好塩基球上の高親和性 IgE レセプター（FcεR-Ⅰ）をすべておおいつくし，結果として個々のアレルギーに関与する特異的な IgE 抗体のレセプターへの結合を阻害し，肥満細胞からヒスタミンなどの遊離を起こさせないようにしているのである．実験的にも，あらかじめ高レベルの IgE 血清で処理された肥満細胞では，その後の特定のアレルギー疾患に関与する IgE 抗体との結合能が著しく劣っていることが示されている[8]．また，最近，IgE 抗体の産生が IgE 自身によって調節されているという新しい機構が解明された．IgE mediated antigen/allergen presentation（IgE-MAP）という機構で，その中心的役割を果たすのが低親和性 IgE レセプター（FcεR-Ⅱ）である．FcεR-Ⅱは CD23 とも呼ばれ，B 細胞，T 細胞，好酸球，マクロファージに分布している．筆者らは，寄生虫の分泌排泄液中のアレルゲン（ESC）が T・B 両細胞上の CD23 を発現し，それを増強していることを認めている[9, 10]．つまり，寄生虫は持続的に ESC を放出し，ヒトは特異的 IgE 抗体を産生する．この特異的 IgE 抗体は B 細胞上の CD23 に付着する．さらに，持続的に分泌された ESC が，この CD23 と IgE 抗体結合物に結合する．すると，この B 細胞は活性化され，CD23/anti-ESC IgE/ESC の複合体は B 細胞内に取り込まれる．次いで，ESC はペプチドに断片化され，MHC クラスⅡとともに T 細胞に提示される．このとき，IL-4 などによって Th-2 系が優勢であれば，免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチが起き，寄生虫抗原に対する特異的 IgE 抗体が産生される．いったん抗原特異的 IgE 抗体が産生されると，抗原刺激が続く限り IgE-MAP を介して抗原特異的 IgE 産生が増幅されるのである（図 3）．

しかし，寄生虫感染では，特異的 IgE 抗体の産生は少量で，非特異的 IgE 抗体の産生が圧倒的に主流である．前述のように，虫体から持続的に分泌される ESC が，B 細胞上の CD23 を増幅しながらそれに結合し続けるという過程で，大量の非特異的 IgE 抗体を産生するようになったためと思われる．つまり，寄生虫感染によって産生された大量の非特異的 IgE 抗体が，アレルゲン特異的 IgE と B 細胞上の CD23 を競合するため，量的に少ないアレルゲン特異的 IgE の B 細胞への結合がブロックされ，IgE-MAP の機構が抑制され，アレルゲンに対する IgE 抗体の産生が抑制されるのである．

寄生虫に感染していると，スギ花粉などのアレルゲンに対する IgE 抗体の産生が低下するのは，以上の機序によるものと思われる．

Ⅴ．寄生虫抗原による治療への可能性

寄生虫感染時に出現する多量の非特異的 IgE 抗体がⅠ型アレルギー反応を抑制することが判明したが，この機序から，治療への一つの可能性として抗 IgE 抗体の使用が考えられている．これまで述べてきたように，IgE を介するⅠ型アレルギー反応を始動させるのは FcεR-Ⅰであり，このレセプターに結合した抗原特異的 IgE に，対応する多価抗原が結合すると IgE が架橋され，レセプターの凝集が起こり，細胞内へのシグナル伝達が始まる．これによって，ヒスタミンなどの細胞内顆粒の放出，サイトカイン・脂質代謝産物などの合成・放出が引き起こされ，アレルギー反応が起こる．

これまでの治療法としては，放出されたヒスタミンなどの作用を抑制することに主眼がおかれていた．しかし，予防的観点からはⅠ型アレルギー反応をもとから遮断するために，IgE と FcεR-Ⅰの結合を特異的に阻害する方法が有効であると思われる．MacGlashman らは，ヒト抗体を組み合わせた抗ヒト IgE マウスモノクロナール抗体を用いて実験している．この抗体は，血中のフリーの IgE と特異的に，IgE の FceR-Ⅰレセプター結合部位に結合するため，この抗体が結合した IgE は FcεR-Ⅰ，FcεR-Ⅱともに結合できない[11]．また，同じように Corne らは，血清 IgE に対するキメラ抗 IgE 抗体の効果について報告している[12]．これらはちょうど，寄生虫感染が多量の非特異的 IgE 抗体を産生して，特異的 IgE 抗体が FceR-Ⅰと結合することを阻止しているのと同じ考えである．抗 IgE 抗体の治療への試みと同様，寄生虫抗原の抗アレルギー薬への可能性が示唆される．

Ⅵ．おわりに

寄生虫感染には，宿主に IgE 抗体を産生するというきわめて特異な現象が存在する．このことは一方では，宿主であるヒトに対して IgE-MAP という機構によって，花粉などのアレルゲンに対する特異的 IgE 抗体産生を抑制し，さらに，肥満細胞からのヒスタミンなどの化学伝達物質の遊離を抑え，結果的にⅠ型アレルギー反応に対して反応しないようにしているものと思われる．それは同時に，寄生虫が宿主の免疫を回避するための手段として，宿主側の防御機構である IgE 抗体産生を利用して，宿主への安定寄生を獲得したように思われる．

現在，アトピー性皮膚炎，気管支喘息，花粉症など IgE 抗体が関与するアレルギー病が急に増えてきた．たとえば，10 歳以下の子どもでは約 40％がアトピー性皮膚炎，そして日本人の 5 人に 1 人が花粉症にかかっている[13]．しかし，この病気は 45 年前にはほとんどなかった病気である．アレルギー病は，寄生虫や細菌，ウイルスなどの微生物とつき合っていると発症しにくくなることを私たちの研究で明らかにした．これらの微生物を排除した“キレイ社会”がアレルギー病の発症を促進していると思うのである．

文　献

1) 後藤俊二，橋本道子，横田　明ほか：ニホンザルを用いたスギ花粉アレルギーの実験モデル．アレルギー 40：981, 1991.
2) von Mutius E, Martinez FD, Fritzsch C et al：Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. Am J Respir Crit Care Med 149：358–364, 1994.
3) Fujita K, Tsukidate S：Preparation of a highly purified allergen from *Dirofilaria immitis*；reaginic antibody formation in mice. Immunology 42：363–370, 1981.
4) Owhashi M, Futaki S, Kitagawa K et al：Molecular cloning and characterization of a novel neutrophil chemotactic from a filarial parasite. Mol Immuno 30：1315–1320, 1993 .
5) van Dellen RG, Thompson Jr JH：Absence of intestinal parasites in asthma. N Engl J Med 285：146–148, 1971.
6) Godfrey RC：Asthma and IgE levels in rural and urban communities of the Gambia. Clin Allergy 5：201–207, 1975.
7) 松下　祥：アレルギー治療の将来―抗原特異的なアプローチ．アレルギー 47：6–10, 1998.
8) Godfrey RC, Gradidge CF：Allergic sensitisation of human lung fragments prevented by saturation of IgE binding sites. Nature 259：484–486, 1976.
9) Yamaoka KA, Tsukidate S, Higaki M et al：Induction of Fc epsilon R Ⅱ/CD23 on human T cells by excretory and secretory antigen of *Dirofilaria immitis*. Int Archs Allergy Appl Immunol 95：92–93, 1991.
10) Yamaoka KA, Kolb JP, Miyasaka N et al：Purified excretory-secretory component of filarial parasite enhances Fc epsilon RⅡ/CD23 expression on human splenic B and T cells and IgE synthesis while potentiating T-helper type 2-related cytokine generation from T cells. Immunology 81：507–512, 1994.
11) 木村輝明：アレルギーにおける抗 IgE 抗体治療の可能性 . Congress Report 呼吸器 13：1–3, 1997.
12) Corne J, Pjukanovic R, Thomas L et al：The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects；efficacy, safety, and phamacokinetics. J Clin Invest 99：879–887, 1997.
13) 斎藤博久：小児アレルギー疾患研究の最近の進歩．小児臨 58：969–976, 2005.

Why are allergic diseases increasing ; the perils of being too fastidious

Koichiro Fujita

Professor Emeritus Tokyo Medical and Dental University
University of Human Arts and Sciences
Professor, Faculty of Health Sciences

Summary

Allergic diseases, such as atopic dermatitis, bronchial asthma and pollen allergy, are all intractable, but their advent in Japan goes back only 45 years. The past five decades have been a time in which the Japanese have come to live in a "super-clean" environment-free from parasites, bacteria and various other microorganisms with which they had coexisted previously. Their rejection of parasites and even symbiotic bacteria in search of such an environment is a phenomenon that has emerged in only the past 30 to 40 years.

The high incidence of allergic ailments among Japanese, which began in the mid-1960s, has had a close relationship with Japan's evolution into a "bacteria-free" county. The postwar Japanese penchant for cleanliness has grown stronger over time. After years of heavy dependence on disinfections, antibiotics and antibacterial goods, people have begun to stamp out even symbiotic bacteria that are necessary for their existence.

Key words：allergy, parasite, IgE antibody, bacteria-free

術中所見より虫垂原発腹膜偽粘液腫を疑った子宮粘液性平滑筋肉腫の１例

大井手志保[1)]，若菜　公雄[1)]，吉田　卓功[1)]，北野麻衣子[1)]，若林　　晶[1)]，尾林　　聡[1)]，
久保田俊郎[1)]，天野　与稔[2)]，河内　　洋[2)]，熊谷　二朗[2)]，江石　義信[2)]

東京医科歯科大学医学部附属病院　周産・女性診療科[1)]
病理部[2)]

要旨：手術中の肉眼的所見から虫垂原発腹膜偽粘液腫を疑ったが，病理組織所見から子宮粘液性平滑筋肉腫の診断がついた１例を経験した．症例は 48 歳，２経妊・２経産の女性である．５年前から断続的に続く不正性器出血と急激に増悪した腹部膨満感を主訴に来院した．骨盤 MRI で，径 18cm 大の多房性嚢胞部位を伴う分葉状充実性腫瘤，および腹膜播種を認めたため，子宮肉腫・腹膜播種の術前診断で手術を行った．手術所見では，腹腔内に多量の粘稠な腹水を伴って，子宮から連続する粘液状の腫瘍が虫垂を巻き込んで発育しており，腹膜に粘液状の多数の播種病変を認めたため，虫垂原発の腹膜偽粘液腫を疑い，腹式単純子宮全摘術および両側付属器摘出術，虫垂切除術を行った．病理組織診断は，子宮粘液性平滑筋肉腫であり，虫垂粘膜上皮には腫瘍を認めなかった．子宮粘液性平滑筋肉腫は非常にまれな疾患であり，また腹膜播種をきたすことは少ないとされるが，本例のように大量の粘液性腹水を合併した症例では，肉眼的に腹膜偽粘液腫と酷似するので，両者の鑑別には病理組織所見が必須である．

Key words：子宮粘液性平滑筋肉腫，腹膜偽粘液腫，粘液状物質，病理組織所見

Ⅰ．緒　　言

子宮粘液性平滑筋肉腫は，肉眼的および病理組織学的に類粘液様背景をもち，粘液産生を有する腹膜偽粘液腫と病態的に類似する点がある．今回われわれは，子宮肉腫の診断のもとで手術を行った症例で，術中所見から虫垂原発腹膜偽粘液腫を疑ったが，病理組織所見から子宮粘液性平滑筋肉腫の診断がついた１例を経験したので報告する．

連絡先：大井手　志保　shihooide@gmail.com

Ⅱ．臨 床 所 見

１．症　例

48 歳，２経妊・２経産女性．

２．主　訴

腹部膨満感，微熱，食思不振．

３．既往歴

４ヵ月間持続する不正性器出血を主訴に近医を受診し，子宮内膜生検により，単純型子宮内膜増殖症と診断された．しかし，その後もなお出血が持続するため，近医受診から７ヵ月後に当院を初診した．MRI で子宮体部前壁から突出する 100×72×86㎜，形状不整で内部がやや不均一な充実性腫瘤を認めた（図 1）．同時に子宮内膜生検を行ったが，単純型子宮内膜増殖症の病理診断であった．子宮全摘を勧めたものの患者が

前　目次へ　次

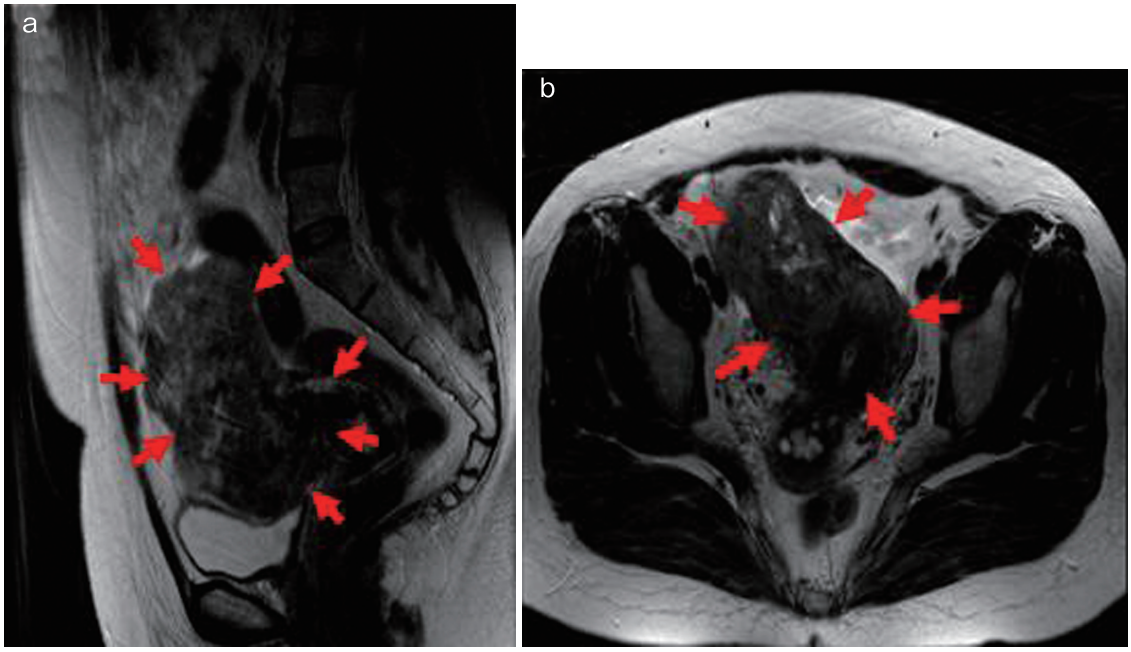


図 1．当科初診時の骨盤 MRI T2 強調画像．
子宮に約 8～10cm 大の充実性腫瘤（100×72×86mm）を認める．
a．矢状断像
b．水平断像

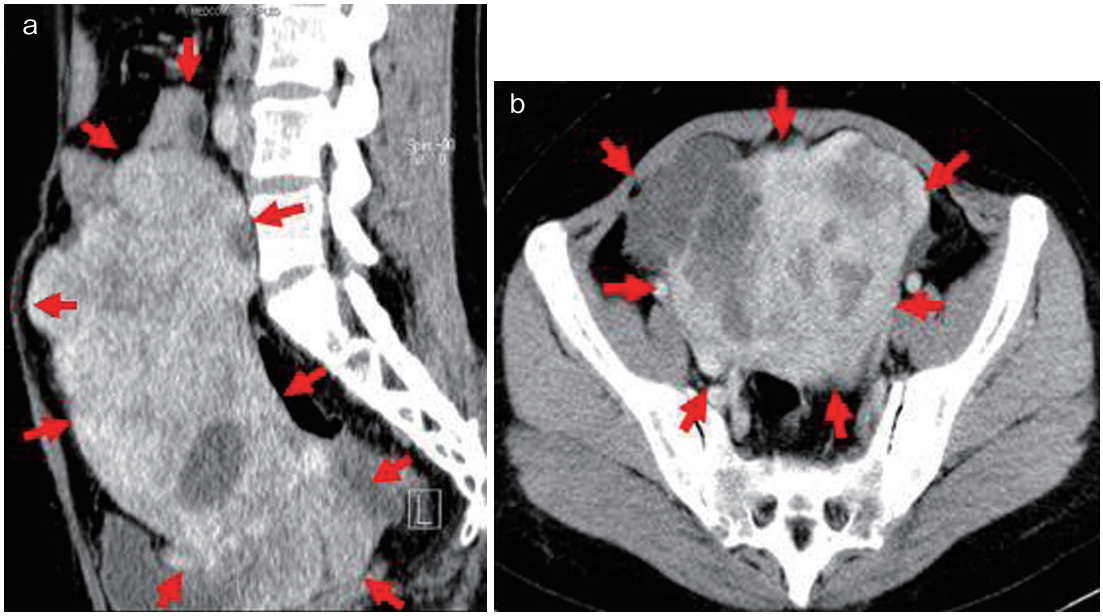


図２．当科初診後４年２ヵ月（他院内科受診時）の腹部骨盤造影 CT
a. 矢状断像
b. 水平断像
一部液状変性を伴い，増大した内部不均一な腫瘤（144×94×160mm）を認める．

手術を希望しなかったため経過観察としたが，その後長期にわたり来院しなかった．当院初診後２年５ヵ月経って再診した際に，経腟超音波断層法で腫瘤を観察したが，その大きさは不変であった．そのさらに約２年後（当院初診より４年４ヵ月後），下腹部痛のために他院内科を受診した際に腹部骨盤造影 CT が行われ，子宮体部に 144×94×160mm の液状変性を伴う充実性腫瘤があることを指摘されたが（図 2），その後当科を再診しなかった．その４ヵ月後（当院初診より４年８ヵ月後），急激に増悪した腹部膨満感，微熱持続，食思不振を主訴に当院を再診した．MRI では，子宮体部の腫瘤は 184×110×170㎜となっており，その内部は不均一で，一部，多房性嚢胞性病変を伴っていた．腫瘤の精査・治療のために緊急入院となった．

前 目次へ 次

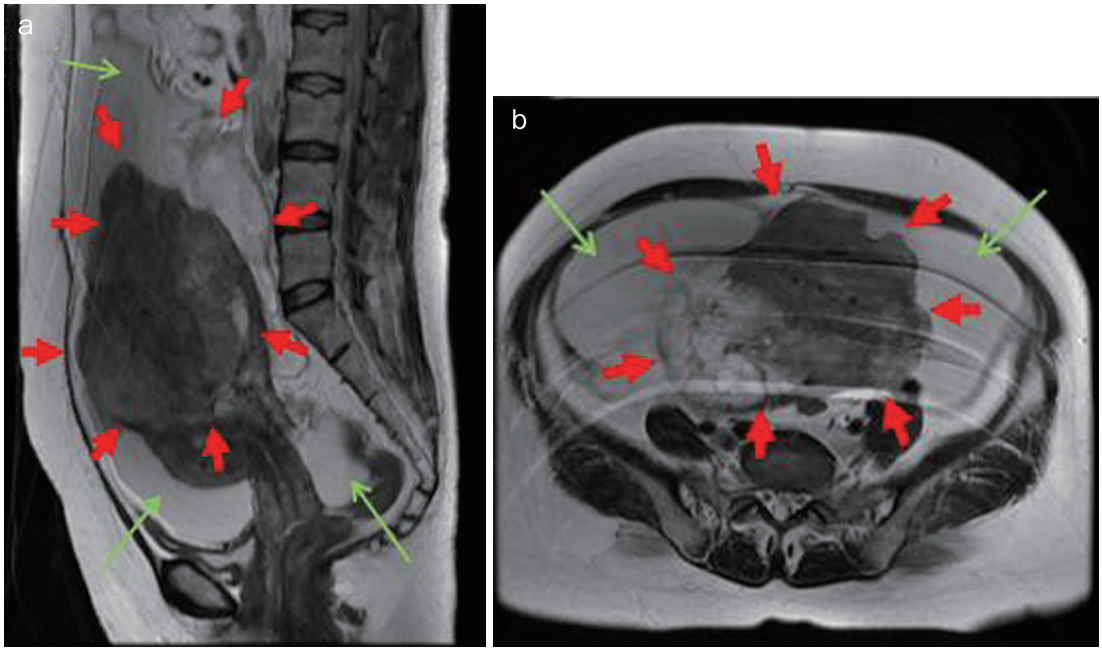


図３．術前の骨盤 MRI T2 強調画像
a. 矢状断像
b. 水平断像
腫瘤は 18cm 大に著明に増大（184×110×170mm）している．内部不均一で，一部，多房性嚢胞性病変を伴う充実性腫瘤で，中等量の腹水貯留がある．

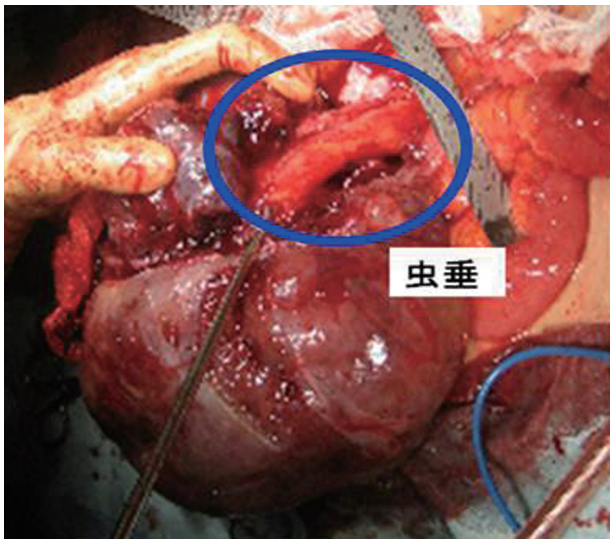


図４．手術所見
虫垂を巻き込み，子宮と一塊になった小児頭大の多房性粘液状腫瘍，および多量の粘液状腹水を認める．

４．入院時身体所見・術前診断

BMI 30.3kg/m^2 の肥満型であり，体温 37.2℃ の微熱を認める以外はバイタルサインに異常を認めなかった．腹部は軟で，著明に膨隆しており，正中やや右側に圧痛のある成人頭大の硬い腫瘤を認めた．腟分泌物は暗赤色少量で，内診および経腟超音波断層法で子宮は正中右側に臍高におよぶ可動性不良の硬い充実性腫瘤として認めた．両側付属器は左右とも異常を認めなかった．

血液検査所見では CA125 の上昇（219.1U/m*l*），CRP 高値（5.04mg/d*l*）および LDL 高値（180mg/d*l*）を認める以外は異常を認めなかった．また細胞診では腟部，頸管，体部ともに異常を認めなかった．

画像所見では，子宮体部から突出する 18cm 大の内部不均一，一部多房性嚢胞性病変を伴う充実性腫瘤，および中等量の腹水貯留も認めた（図 3）．

以上の所見から，子宮肉腫，腹膜播種の術前診断で手術を行った．

５．手術所見

開腹すると，腹腔内には粘稠な腹水が 2,000m*l* 貯留しており，子宮壁から突出する小児頭大の腫瘍を認めた．腫瘍は充実性部分と，著しく粘液腫様の様相を呈する部分とがみられた．虫垂が腫瘍に巻き込まれて認められた．また，腹膜，骨盤内，大網に粘液状の多数の播種を認めた（図 4）．

以上の術中所見から，腫瘍の原発は虫垂であり，これに続発した腹膜偽粘液腫であると考え，腹式単純子宮全摘術＋両側付属器摘出術＋虫垂切除術＋播種病変生検を行った．

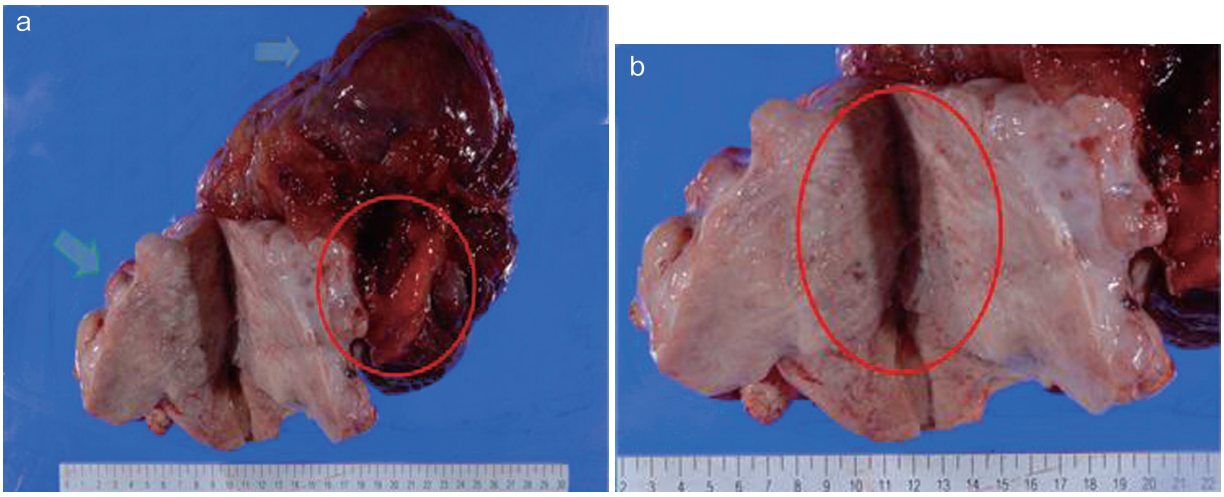


図５．摘出肉眼標本
a. 全体像：子宮外へ大きく突出する粘液腫様の部分（18×15×15cm 大）を伴う．子宮底部の腫瘤（矢印）は 13×10×10cm 大である．丸囲みは虫垂．
b. 子宮体部拡大像：子宮筋層に浸潤する充実性腫瘍（○で囲んだ部分）を認める．

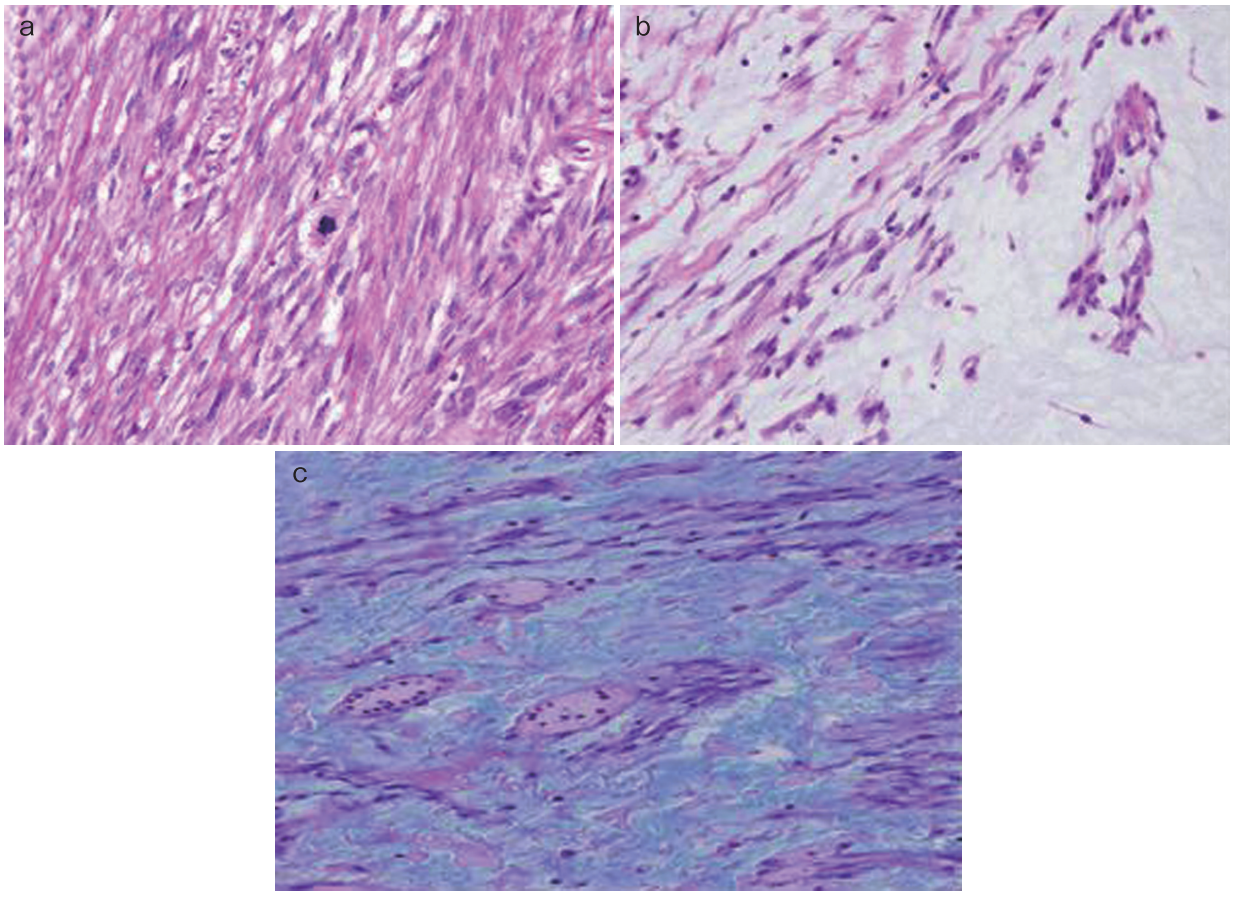


図６．腫瘍の病理組織像
a. 充実性部分（HE 染色 200 倍）
b，c. 粘液腫様部分（b：HE 染色，200 倍 c：PAS-alcian blue 染色，200 倍）．両者ともに紡錘形腫瘍細胞が束状に配列し増殖しており，粘液浮腫状の部位は著明な間質粘液を背景としている．

前 目次へ 次

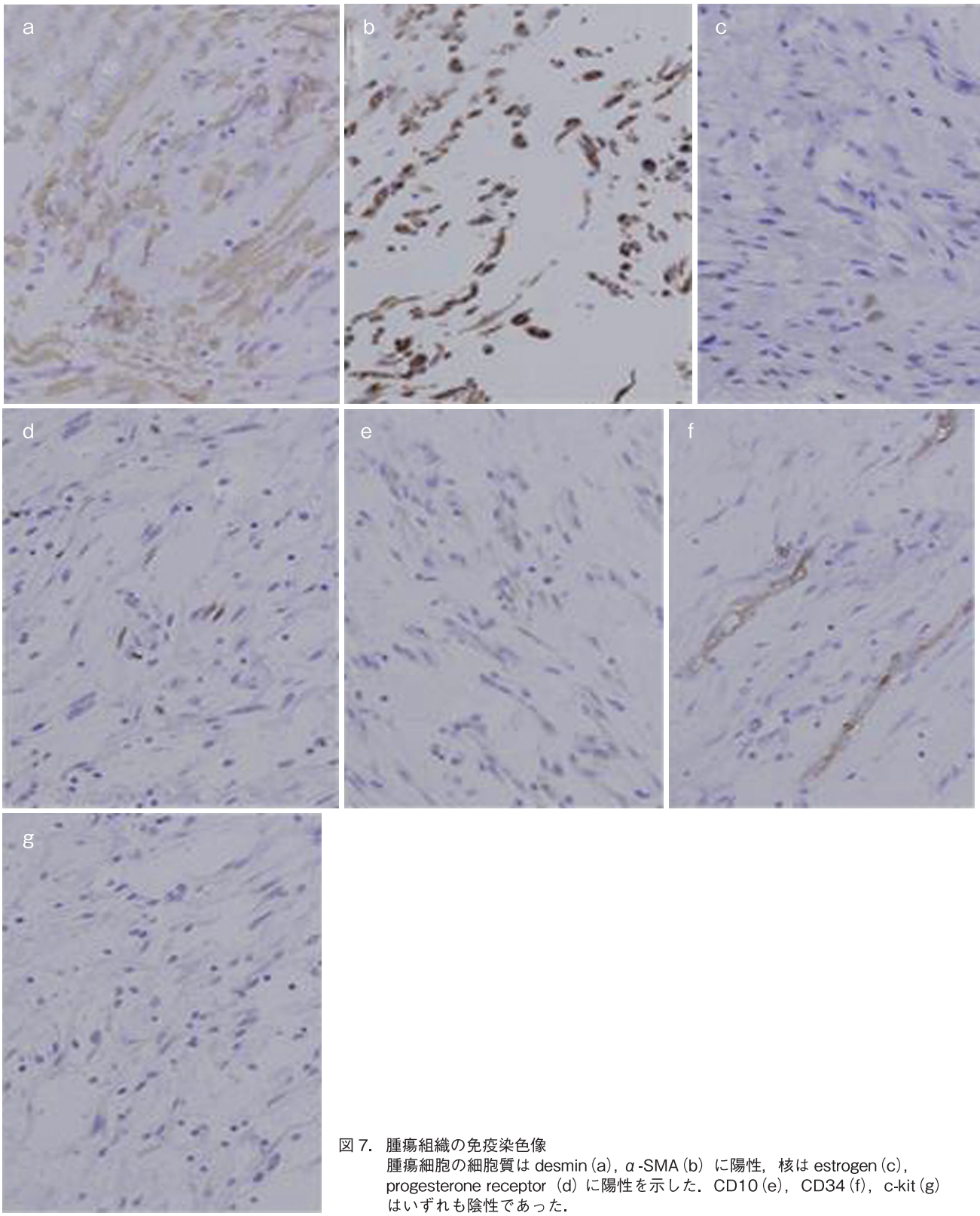


図 7. 腫瘍組織の免疫染色像
腫瘍細胞の細胞質は desmin（a），α-SMA（b）に陽性，核は estrogen（c），progesterone receptor（d）に陽性を示した．CD10（e），CD34（f），c-kit（g）はいずれも陰性であった．

前 目次へ 次

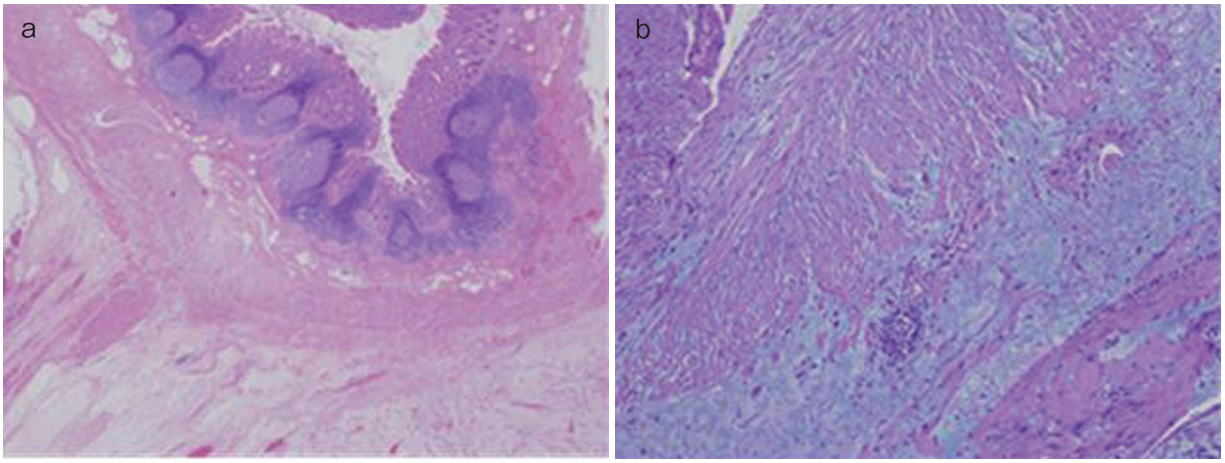


図 8. 虫垂筋層へ浸潤性増殖を示す部分の病理組織像
a. 弱拡大像（HE 染色，10 倍）
b. 強拡大像（PAS-alcian blue 染色，100 倍）

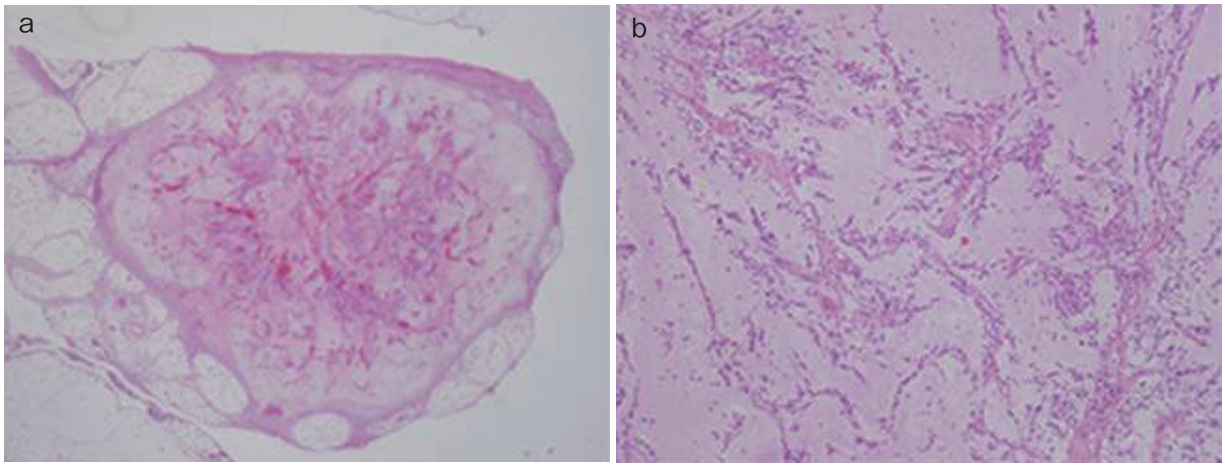


図 9. 播種巣の病理組織像
a. 上腹部播種巣（HE 染色，10 倍）
b. 骨盤内播種巣（HE 染色，100 倍）

Ⅲ. 摘出標本の病理所見

1. 肉眼所見

腫瘍は子宮筋層内では硬い白色調の充実性腫瘤（13×10×10cm）であり，子宮外へ突出した部分（18×15×15cm）では著しく粘液腫様を呈していた．虫垂は筋層の外層が腫瘍に巻き込まれるのみであり，粘膜には病変を認めなかった（図 5a）．子宮底部～体部筋層に腫瘍の主体があり，内膜には病変を認めなかった（図 5b）．

2. 病理組織所見

腫瘍組織は束状に配列してさまざまな方向に走行する紡錘形腫瘍細胞の増殖からなる．核異型は軽度～中等度で，核分裂像は高倍率 10 視野で 2 ～ 5 個程度と軽度の増加のみであった（図 6）．腫瘍組織中には明らかな壊死を認めなかった（図 7）．免疫染色では，腫瘍細胞は desmin および α-smooth muscle actin が陽性であり，estrogen receptor および progesterone receptor が弱陽性を示した．Ki-67 標識率は充実性部分では 10%，粘液腫様の部分では 5% であった．肉眼的に粘液腫様を示す部分では，充実性部分と同様の腫瘍細胞の増殖がみられるが，腫瘍細胞間に著しい粘液状物質の沈着および貯留を認めた．

腫瘍は巻き込んだ虫垂の固有筋層および周囲脂肪組織内に浸潤性に増殖し（図 8），また腹膜，骨盤内，大網から採取された播種巣は，組織学的に粘液状物質の貯留を伴う腫瘍組織であった（図 9）．以上の所見から，子宮筋層原発の粘液性平滑筋肉腫と病理診断した．

前 目次へ 次

Ⅳ．術後経過

術後は残存病変もあることから，一般的な子宮平滑筋肉腫の治療に準じて術後化学療法を勧めた．しかし，患者の希望によりセカンドオピニオンの結果，子宮粘液性平滑筋肉腫に対して化学療法は有効性が確立したものがないとのことで後療法を希望しなかった．その後，術後半年～１年の経過で再発し，現在緩和療法中である．

Ⅴ．考　　察

子宮壁に原発し，著明な粘液腫様を呈した子宮粘液性平滑筋肉腫と病理診断された症例を経験した．術中所見では虫垂原発の腹膜偽粘液腫との鑑別が必要になるなど，診断に困難な点もあったが，特徴的な病理所見が診断の決め手になったものである．

本例は，子宮壁に腫瘍が存在するとみられていたにもかかわらず，手術所見で，虫垂原発の腹膜偽粘液腫を疑うほどに特異的な腹水の所見がみられたことが診断を困難にさせた要因の一つであった．本例の最終的な診断は，病理学的検索による組織型の確認と，原発部位の検索を待ってはじめて可能であった．

子宮粘液性平滑筋肉腫は，子宮平滑筋肉腫の変異型であり，非常にまれである[1]．1984 年，King らが報告して以来，国内外で数十例の報告があるのみである[2～5]．肉眼的には境界明瞭で，内部には多量の粘液腫様基質を伴い，肉眼的および組織学的所見では，通常は著明に粘液腫様を呈する平滑筋肉腫の像を示す[4, 6]．まれな腫瘍であるために治療法はいまだに確立されておらず，手術で原発巣を取り除いた後に，通常の子宮平滑筋肉腫に準じた化学療法を行うべきという意見もあるが，その有効性は実証されていない[5]．

本例では，子宮外に突出した部分で，特に上記のような組織所見が典型的に認められた．また免疫染色の結果は，この腫瘍が平滑筋由来であることを示すものであった．Estrogen および progesteron receptor も陽性であり，子宮の平滑筋由来であることを示唆するものであるが，この腫瘍が子宮原発であることは，画像所見の経過および病理所見から，その主座が子宮体部であることから示された[7]．なお免疫染色は，このほかに CD10, CD34, c-kit に対しても行ったが，いずれも陰性であり，病理組織学的所見とも併わせ，子宮内膜間質肉腫，消化管間質腫瘍（GIST：gastrointestinal stromal tumor）は否定的であると考えた．

この腫瘍は悪性度は高いが，本例のように，腹腔内に播種して多量の粘液性腹水を生じる症例は非常にまれであるといわれている[4, 6]．一般に洗浄腹水に多量の粘液様物質が含まれる場合は，その原因のほとんどが腹膜偽粘液腫によるものであり，虫垂，卵巣，膵臓などの腫瘍に由来することが多い[6]．それに対して粘液性平滑筋肉腫など軟部組織腫瘍が腹腔内に浸潤した場合には，腹腔内の粘液量がより少量であることが多い[6]．本例では，粘液性平滑筋肉腫が腹腔内に播種して虫垂を巻き込み，さらに多量の粘液性腹水を伴ったために，虫垂原発の腹膜偽粘液腫との鑑別が必要であった．

子宮筋腫からの粘液性平滑筋肉腫への転化については，その可能性を指摘する研究があり，高い細胞増殖能を示す場合にはその可能性が高いとしている[8]．本例では，当科初診の時点では画像所見上，腫瘤内部の壊死所見や粘液腫様変化を認めていないが，内部がやや不均一で辺縁が不規則であるので，悪性の可能性も否定できないと考えた．しかしその後の経過が緩徐であったことを考慮すると，この病変は平滑筋腫が粘液性平滑筋肉腫に転化した可能性は否定できない．しかし患者都合による不診期間が長く，粘液性平滑筋肉腫としての経過がいつから始まったのかが不明である．また本例の初発症状は不正性器出血であったが，これと本病変との関係は不明である．当初行った子宮内膜生検において単純型子宮内膜増殖症と診断しており，むしろこれが出血の原因であったとも考えられる．

本例は，長い期間にわたって腫瘍のサイズに大きな変化がみられなかったにもかかわらず，術前半年ほどの間に急激に増大している．この理由として，当初の病変が子宮筋腫であったものが悪性に転化した可能性，また腫瘍の増殖能が低いためにしばらくは増大しなかったものが，腹膜播種を生じた後に急激な腹水増加とともに増大した可能性などが考えられる．

また本例では，血清中 CA125 の上昇がみられた．この腫瘍マーカーの意義については，追跡的に測定することで治療効果や再発の評価には有用であるが，１回の測定のみで良性の子宮筋腫と粘液性平滑筋肉腫の鑑別はできないとされている．本例においては，血清 CA125 の術後の変化については追跡しておらず，このマーカーは診断については有用な指標となりえなかった[9]．

粘液性平滑筋肉腫の病理組織所見の特徴の一つに，通常の平滑筋肉腫に比べて細胞密度が低く，細胞異型度が弱いことがあげられる．また単位面積あたりの核分裂像も少ないことも指摘されている[4, 10, 11]（表１）．したがって，通常の子宮平滑筋肉腫に用いられる悪性の組織学的基準を満たさないことがある．しか

前　目次へ　次

表1．平滑筋肉腫の組織診断基準（WHO 2003）［文献 10，11 による］

	通常の平滑筋性分化	類上皮分化	粘液性分化
組織像	・少量～多量までさまざまな量の好酸性胞体を有する葉巻型細胞の束状増殖	・中心核を有する類円形細胞 ・胞体は淡明から好酸性	・粘液腫状基質内に紡錘形細胞が存在
平滑筋肉腫診断の為の基準	・腫瘍細胞の凝固壊死像 ・壊死がない場合は，中等度～高度の細胞異型がびまん性に依存することに加えて，核分裂像が強拡大10視野中10個以上存在すること。核分裂像がそれ未満であれば再発の危険性は低く（2～3%未満），再発までの期間も長い。このような症例は“再発の危険性が低い異型平滑筋腫”とよばれる	・腫瘍細胞の凝固壊死像 ・壊死がない場合は，中等度～高度の細胞異型がびまん性に存在することに加えて，核分裂像が強拡大10視野中5 個以上存在すること	・腫瘍細胞の凝固壊死像 ・壊死がない場合は，中等度～高度の細胞異型がびまん性に存在することに加えて，核分裂像が強拡大10視野中5 個以上存在すること
コメント	・凝固壊死と強い細胞異型がなければ，核分裂像が多くても良性の経過をとる。核分裂像が強拡大 10視野中 15 個を超えるときには，“未だ少数の経験しかない、多数の核分裂像を伴う平滑筋腫”とする。この中には局所的に中等度以上の核異型を伴う平滑筋腫も含まれる	・部分的に上皮様の変化を示す場合には，通常の平滑筋束の輪切りの像に類似する	・しばしばみられる筋腫核周囲の水胞状変性は，このグループに含めない

し臨床的には高度な悪性の病態を特徴とし，再発や転移をきたすことが多く，予後はわるい[4]．したがって，この腫瘍に対する悪性の診断は，周囲組織への浸潤や転移という生物学的態度によって行うことが必要となる[2, 8, 12, 13]．本例においても，腫瘍内に明らかな凝固壊死を認めず，核分裂像が少なく，また Ki-67 標識率も低い値であったので，smooth muscle tumor of uncertain malignant potential（STUMP：悪性度不明な平滑筋腫瘍）との鑑別が問題となる．しかし浸潤性増殖を示し，播種巣も認めており，悪性腫瘍としての病態を示したことにより悪性と診断したものである．Ki-67 標識率については，これが高い場合には悪性の診断をくだすうえで参考になるとされているが，本例はこれにあてはまらなかった[9]．

粘液性平滑筋肉腫のこのような組織学的特徴は，粘液腫状変化を伴う平滑筋腫との鑑別が必要であり，平滑筋腫に粘液腫状変化をみた場合には注意深く経過観察する必要があることを指摘した研究もある[1), 8)]．

V．結　　語

腹膜偽粘液腫との鑑別を要した子宮粘液性平滑筋肉腫の 1 例を経験した．子宮粘液性平滑筋肉腫が腹膜播種をきたすことはまれであり，その場合には，肉眼的に腹膜偽粘液腫と酷似するので，診断および鑑別には病理組織学的所見が必須である．

文　献

1) Kasahara K, Nishida M, Iijima S et al：Uterine myxoid leiomyosarcoma. Obstet Gynecol 95：1004–1006, 2000.
2) King ME, Dickerson GR, Scully RE：Myxoid leiomyosarcoma of the uterus；a report of six cases. Am J Surg Pathol 6：589–598, 1982.
3) Kaleli S, Calay Z, Ceydeli N, et al：A huge abdominal mass mimicking ovarian cancer；p53-negative but aneuploid myxoid leiomyosarcoma of the uterus. Eur J Obste Gynecol Reprod Bio 100：96–99, 2001.
4) Malhotra M, Sharma JB, Wadhwa L et al：Disseminating myxoid leiomyosarcoma of the uterus. Arch Gynecol Obstet 271：166–167, 2005.
5) 近藤武史，北澤理子，前田　盛ほか：子宮粘液性平滑筋肉腫（myxoid leiomyosarcoma）の 1 例．診断病理 19：247–248, 2002.
6) WK Ng, Lui PC, Ma L：Peritoneal washing cytology findings of disseminated myxoid leiomyosarcoma of uterus；report of a case with emphasis on possible differential diagnosis. Diagn Cytopathol 27：47–52, 2002.
7) Kelley TW, Borden EC, Goldblum JR：Estrogen and progesterone receptor expression in uterine and extrauterine leiomyosarcomas；an immunohistochemical study. Appl Immuohistochem Mol Morphol. 12：338–341, 2004.
8) Mittal K, Popiolek D, Demopoulos RI：Uterine myxoid leiomyosarcoma within a leiomyoma. Hum Pathol 31：398–400, 2000.
9) Vigone A, Giana M, Surico D et al：Massive my-

xoid leiomyosarcoma of the uterus. Int J Gynecol Cancer 15：564–567，2005.
10) Hendrickson MR，Tavassoli FA，Kempson RL：Mesenchymal tumours and related lesions. Tumours of the Breast and Female Genital Organs，ed by Tavassoli FA，Devilee P，IARC Press，Lyon，p233–244，2003.
11) 森谷卓也：間葉系腫瘍と関連病変．向井清，真鍋俊明，深山正久（編），外科病理学，第 4 版，文光堂，東京，p1096–1104，2006.
12) Kugami S，Kashimura M，Toki N et al：Myxoid leiomyosarcoma of the uterus with subsequent pregnancy and delivery. Gynecol Oncol 85：538–542，2002.
13) Kindelberger D，Hollowell M，Otis C：Myxoid leiomyosarcomas；a clinicopathologic study of 10 cases. Mod Pathol 20［Suppl 2］：203A，2007.

A case of Myxoid leiomyosarcoma of the uterus, originally presumed to be pseudomyxoma peritonei

Shiho Oide[1)], Kimio Wakana[1)], Takanori Yoshida[1)], Maiko Kitano[1)], Akira Wakabayashi[1)], Satoru Obayashi[1)], Toshiro Kubota[1)] Tomonari Amano[2)], Hiroshi Kawachi[2)], Yoshinobu Eishi[2)]

1) Department of Comprehensive Reproductive Medicine, Tokyo Medical and Dental University Hospital, 2) Division of Surgical Pathology, Tokyo Medical and Dental University Hospital.

Summary

A 48-year-old female, gravid 2, para 2, presented with a 5-year history of intermittent, atypical genital bleeding and a suddenly exacerbated sense of abdominal distention. MRI revealed an 18 cm multilobular solid mass with multilocular cystic parts accompanied by peritoneal dissemination. She underwent surgery under a preoperative diagnosis of uterine sarcoma with peritoneal dissemination. The surgical findings revealed copious amounts of mucous ascites in the peritoneal cavity and a mucous tumor of the uterus involving the appendix, with a lot of disseminated peritoneal mucous. The surgical findings suggested pseudomyxoma peritonei originating from the appendix. Therefore, she underwent total hysterectomy in addition to both bilateral salpingoophorectomy and appendectomy. However, the postoperative pathological findings revealed a diagnosis of myxoid leiomyosarcoma, with an intact mucous membrane of the appendix. Myxoid leiomyosarcoma represents a rare neoplasm, and rarely causes peritoneal dissemination. However, myxoid leiomyosarcoma associate with a huge accumulation of mucous substances, as observe in this case, closely resembles pseudomyxoma peritonei. Therefore, the pathological findings are essential to differentiate the two.

Key words：myxoid leiomyosarcoma, pseudomyxoma peritonei, mucous substance, pathologic findings

イレウス管が原因と考えられた腸重積の１例

鈴木　道隆，里舘　　均，井上　晴洋，工藤　進英

昭和大学横浜市北部病院消化器センター

要旨：47歳，女性．3ヵ月前に胃癌に対して胃全摘，Roux-en-Y再建を行った．突然の腹痛を主訴に受診し，絞扼性イレウスの診断で緊急手術を行った．腸管の壊死はなく，捻転を解除し，スプリント目的でイレウス管を留置した．術後2日目にイレウス管を抜去したが，術後3日目に突然の下腹部痛を発症した．造影CTで小腸にtarget signを認め，イレウス管を再挿入し造影を行ったところ，先細り状の狭窄と口側腸管の拡張を認め，腸重積の診断で緊急手術を行った．Y脚から20cmの位置で，小腸が約10cm順行性に嵌入していた．重積が解除できず小腸部分切除術を行った．摘出標本では腫瘍性病変を認めなかったため，イレウス管が腸重積の誘因となった可能性が考えられた．成人腸重積の原因は腫瘍などの器質的病変によるものが9割を占め，イレウス管が原因と考えられた症例はまれであり，本邦では68例の報告がある．文献的考察を加えて報告する．

Key words：イレウス管，腸重積，腸閉塞

Ⅰ．はじめに

成人の腸重積症は比較的まれな疾患で，特発性が多い小児の腸重積症と異なり，なんらかの器質的原因が存在することが多い．さらに，よりまれな発症様式として，イレウス管が原因となる例も報告されている．今回われわれは，イレウス管抜去後に発症した腸重積症を経験したので報告する．

Ⅱ．症例提示

症　例：47歳，女性．

主　訴：腹痛．

既往歴：2009年2月，胃癌に対して腹腔鏡補助下胃全摘術，Roux-en-Y再建（結腸前経路）を施行した．病理検査ではtype 0–Ⅱc，por2>tub2，SM1，ly0，v0，n0，stageⅠAであった．

現病歴：胃癌術後で外来で経過観察中の2009年5月，食事と関係なく突然発症した腹痛を主訴に，救急搬送された．

身体所見：意識レベルは清明であった．血圧140/80mmHg，脈拍数72回/分，酸素飽和度100%，体温37.9℃であり，上腹部にびまん性に圧痛・反跳痛を認めた．

血液検査所見：WBC4，430/μl，AST72IU/l，ALT 101 IU/l，AMY 1，195 IU/l，CRP<0.04で，アミラーゼ高値を認めた．体温，血液検査所見などの推移は表1に示した．

画像所見：腹部CTで，輸入脚の拡張とY脚の空腸空腸吻合部におけるcaliber changeを認めた（図1）．

以上より，Y脚の捻転による絞扼性イレウスの診断で入院，緊急手術を行った．

初回手術所見：輸入脚の著明な拡張を認めたが，壊死の所見はなかった．挙上空腸の背側の間隙を，Y脚の肛門側の小腸が左側から右側にすり抜け，Y脚が捻転していた．捻転を解除し，スプリント目的でイレウス管を120cm挿入し，手術を終了した．イレウス管のバルーンは解除のままとした．

初回術後経過：術後2日目（入院4日目），イレウス管の排液は少量で，腹部症状もなかったためイレウス管を抜去した．術後3日目（入院5日目），依然と

連絡先：鈴木　道隆　suzuki-tmd@umin.ac.jp

前　目次へ　次

表1．入院後の経過

入院日数	1	234567						81	01	52	3
経　過	入院	初回手術		イレウス管抜去	下腹部痛再熱	イレウス管抜去	再手術			イレウス管抜去	退院
画像検査	CT				CT イレウス管再挿入・造影						
体　温（℃）	37.9	37.1	36.9	36.3	36.2	36	37.8	37.7	36.6	36.2	35.8
イレウス管排液（ml）			10	10	1,344	206	160	14	24	50	
WBC（/μl）	4,430	8,950	9,060	6,850	5,600	4,370	2,390	8,100	11,860	6,230	
Hb（/μl）	13	11.9	9.9	9.3	12.4	12.3	9.2	12.1	9.7	8.8	
Plt（万/μl）	19.7	19.9	16	15.3	21.3	23.9	17.8	26	33	40.5	
Alb（g/dl）	4.8	3.9	2.6	2.7	3.2	3.4	2.3				
Cre（mg/dl）	0.7	0.8	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.9	0.6	0.5	
T-Bil（mg/dl）	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6		0.3	0.5	0.5	0.3	
AST（U/l）	72	47	37	33	23	20	13	15	12	22	
ALT（U/l）	101	67	39	30	22	20	12	12	81	8	
CK（U/l）	118	72	120	92	33	23	35	45	18	37	
Amy（U/l）	1,195	1,279	756	267	209	206	158	212	119	251	
LDH（U/l）	253	205	169	152	163	169	115	139	171	156	
CRP（mg/dl）	<0.04	0.05	4.73	11.04	3.24	2.34		7.73	22.39	3.95	

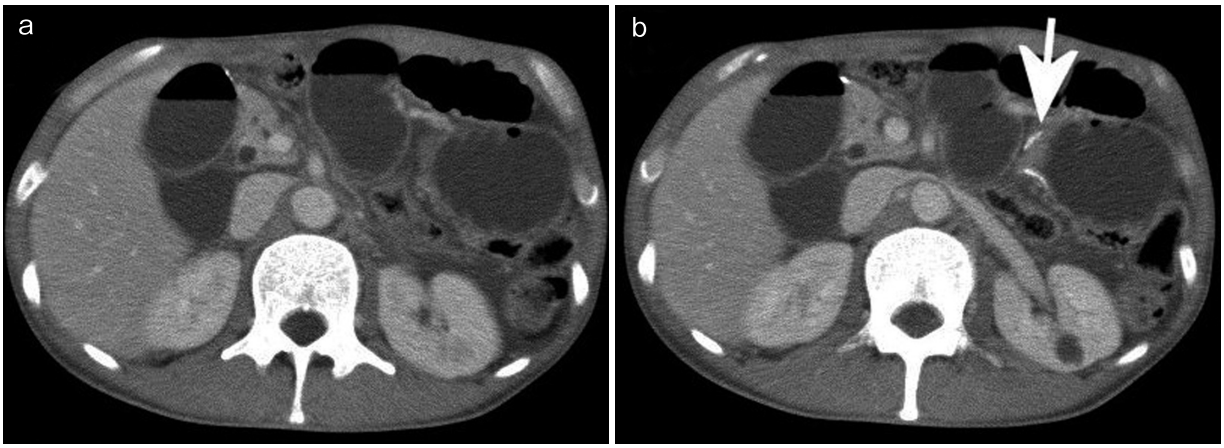


図1．初回手術前の腹部造影CT
輸入脚は十二指腸断端まで著明に拡張している．Y脚の空腸空腸吻合部（b，矢印）では，腸管壁の肥厚と拡張の途絶（caliber change）を認める．

して絶飲食であったが，誘因なく急激な強い腹痛が再燃した．下腹部にびまん性に圧痛を認め，右下腹部では反跳痛を認めた．腹部CTを行ったところ，小腸の拡張を認め，右下腹部では小腸のtarget signを認めた（図2a）．イレウス管を再挿入（130cm）して造影したところ，同部位の先細り状の狭窄と，口側腸管の拡張を認めた（図2b，c）．画像所見から腸重積，腸閉塞と診断した．イレウス管による減圧で一時症状が軽快したため，腸管減圧による重積の自然解除を期待して経過観察としたが，翌日に再度イレウス管造影を行っても狭窄は不変であり，腹痛も完全には消失しないことから，初回手術後5日目（入院7日目）に再手術を行った．

再手術所見：Y脚から20cmの位置で，小腸が約10cm順行性に嵌入していた（図3）．用手整復を試みたが浮腫が高度のため重積が解除できず，小腸部分切除術を行った．

病理所見：15×7cmの空腸切除摘出後肉眼標本では，先進部は用手整復を試みた際に損傷して1.5×2.5cmの穴が開いていた（図4）．病理組織像では，同部位では空腸壁全層にわたり血管はうっ血，拡張して一部で出血をきたしていた．また漿膜下層には異物型巨細胞の出現を伴う肉芽腫の形成がみられた（図5）．標本では明らかな悪性像はみられなかった．

再手術術後経過：術後は麻痺性イレウスが遷延したが，それ以外の全身合併症はなく，再手術後8日目（入院15日目）にイレウス管を抜去して経口摂取を開始した．再手術後16日目（入院23日目）に退院した．

前 目次へ 次

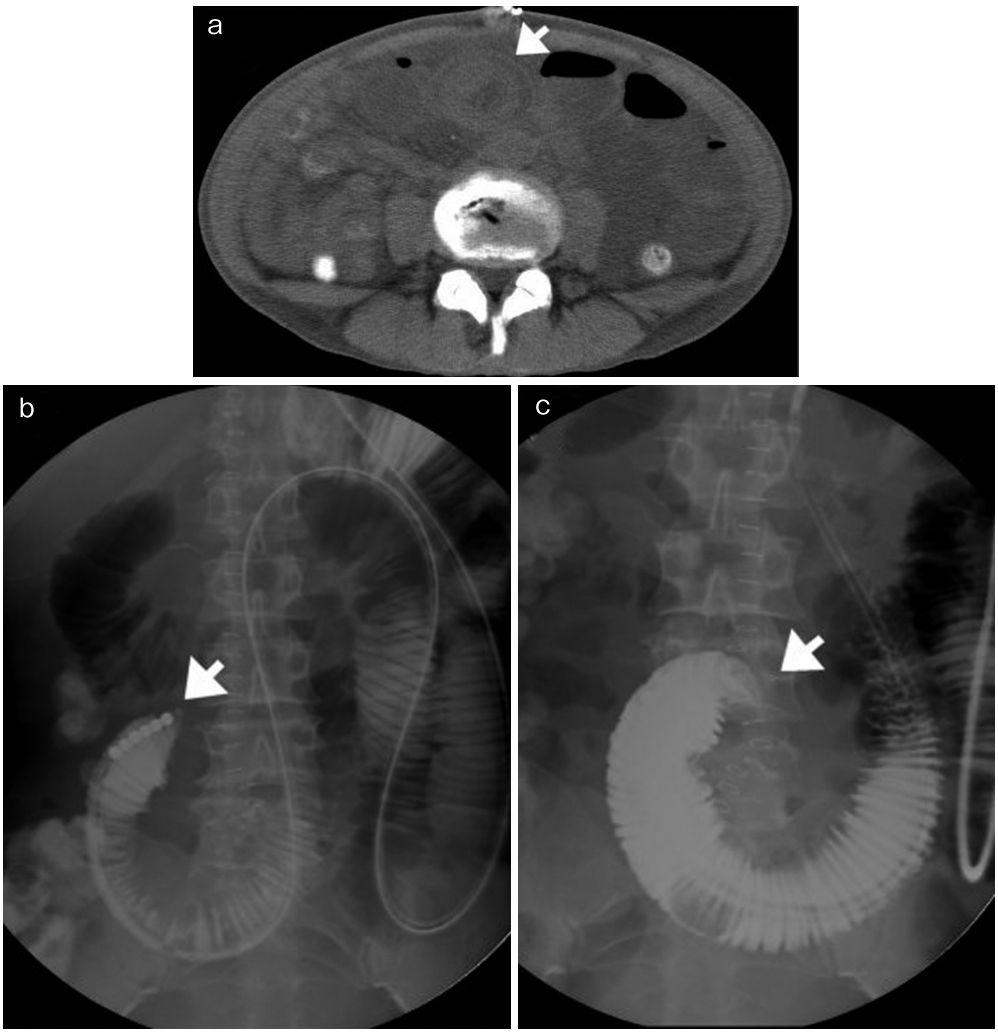


図2．初回手術後画像所見
a. 単純 CT．右下腹部の小腸に，重積した腸管が層構造として観察される“target sign”を認める（矢印）．
b，c. イレウス管造影．小腸の先細り状の狭窄・途絶を認める（矢印）．

図３．手術所見
腸管の浮腫が高度であったため徒手整復は不可能であり，小腸部分切除術を行った．

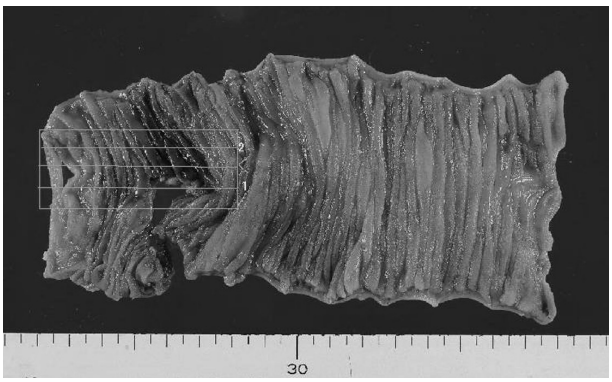


図４．摘出後肉眼標本
15×7cm の空腸切除摘出標本．先進部では用手整復を試みた際に損傷した 1.5×2.5cm の穴が開いている．

Ⅲ．考　　察

成人の腸重積症は全腸重積症の５～10％とされ，まれな疾患である[1]．小児では，多くは器質的原因を認めない特発性である一方，成人では腫瘍，Meckel 憩室など，なんらかの器質的原因が存在することが多い．志摩ら[2]は，成人の腸重積症では 92.7% に器質的原因を認めるとしている．

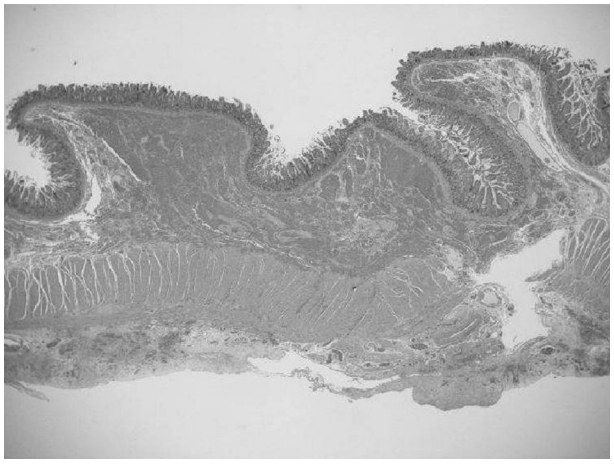


図５．病理組織像（HE 染色，40 倍）
先進部では空腸壁全層にわたり血管はうっ血，拡張し，一部で出血をきたしている．また漿膜下層には異物型巨細胞を伴う肉芽腫の形成がみられる．

このような器質的原因によらない腸重積症として，Sarr ら[3] は術後の腸重積症について考察しており，その原因として，腸管縫合部が先進部となる場合，術後腸管癒着，イレウス管の使用の三つをあげている．イレウス管が原因と考えられた本邦例は 68 例で，その機序については諸説があるが，文献によれば代表的な説は以下のとおりである．

① Telescoping 現象：イレウス管のバルーンが蠕動を刺激する一方で，チューブ自体が抵抗となるため，腸管がたぐり込まれる（McGoon ら[4]，1956）．

②狭窄部の口側と肛門側とで平滑筋の収縮速度に差が生じ，蠕動のアンバランスによる腸管の癒着やねじれが起こる（Fraser ら[5]，1981）．

③イレウス管の側孔に腸管粘膜が吸引されて先進部になる（遠藤ら[6]，1990）．

④バルーンそのものが先進部となる（合田ら[7]，1998）．

⑤イレウス管の刺激による腸管の痙性収縮と蠕動運動の不均衡（西川ら[8]，1995）．

⑥イレウス管抜去によって腸管壁にたぐれが生じ，これが起点となる（鈴木ら[9]，2007）．

本例はイレウス管のバルーンを使用していなかったため，①，④の機序は除外される．また，イレウス管の持続もしくは間欠的吸引は行っておらず，③の機序は考えにくい．イレウス管抜去後に腸重積症を発症したため，イレウス管挿入中に②，⑤のいずれかの機序で重積が起こり，抜去した翌日に症状が顕在化したのか，もしくは抜去時に⑥の機序が起こったかのいずれかと考えられた．鈴木ら[9] によれば，イレウス管留置中の腸重積の発症は留置から平均 5 日後，抜去後の発症は留置から平均 2.4 日後であった．②，⑤の機序は，イレウス管留置後数日が経過して，徐々に腸管の運動に不均衡が生じて起こるものと推測され，留置期間 2 日，抜去翌日と比較的早い時期で発症した本例は，⑥の抜去時の機序がもっとも可能性が高いと考えられた．

イレウス管抜去後の腸重積はまれな病態であるが，CT や超音波検査で特徴的な target sign を呈するため診断は比較的容易である．イレウス管抜去後に腹痛が再燃した場合には，腸重積も鑑別診断の一つにあげ，速やかに CT・超音波検査で原因を精査をする必要がある．

イレウスに対する癒着剥離術後に，スプリントとしてイレウス管を留置することが再発予防に有用との報告があり[10, 11]，習慣的に行っている施設は多いと思われる．しかし，本例のように急性発症の内ヘルニア・捻転による絞扼性イレウス例では，直ちに手術（ヘルニア門の閉鎖，捻転の解除，腸管の切除など）で原因を除去することで術後の再燃の可能性は低いと考えられるため，イレウス管の留置は必ずしも必要ではないと思われた．イレウス術後のイレウス管留置については，まれではあるが本例のような合併症を生じる危険性もあり，個々の症例ごとに必要性を十分に検討するべきである．

文　献

1) Brayton D，Noris WJ：Intussusception in adult. Am J Surg 88：32–43，1954.
2) 志摩泰生，上川康明，武田　晃ほか：回腸末端脂肪腫による成人腸重積症の 1 例—過去 10 年間の本邦報告例の集計．外科 58：913–917，1996.
3) Sarr MG，Nagorney DM，Mellratch DC：Postoperative intussusception. Arch Surg 116：144–148，1981.
4) McGoon DC：Intussusception；a hazard of intestinal intubation. Surgery40：515–519，1956.
5) Frazer ID，Condon R，Suhulte W et al：Bowel-motility after primary resection for colonic obstruction. Br J Surg 13：113–116，1981.
6) 遠藤俊吾，中田一也，石川信也ほか：イレウス管が誘引となったと考えられる成人型小腸腸重積症の 1 例—本邦報告例 4 例の検討．日臨外会誌 51：133–138，1990.
7) 合田文則，岡田節雄，林　秀樹ほか：イレウス管による小腸腸重積の 1 例．日腹部救急医会誌 18：893–896，1998.
8) 西川勝則，羽生信義，成瀬　勝ほか：イレウス管が原因となった腸重積症の 1 例．日臨外会誌 56：2633–2636，1995.
9) 鈴木俊二，多森靖洋，細瀧喜代志ほか：イレウス管が誘因となった術後腸重積症の 1 例—本邦報告例 64 例の検討．臨外 62：1265–1268，2007.
10) Sauer H，Menardi G：Results of postoperative treatment of ileus in infants and children by means of

gastrocecal tube splinting of the intestine. Surg Gynecol Obstet 156：341–344，1983.
11）溝手博義，掛川暉夫：イレウスの病態と治療―癒着防止のための術中操作．消外 10：1557–1562，1987.

A case of adult intussusception caused by ileus tube

Michitaka Suzuki, Hitoshi Satodate, Haruhiro Inoue, Shin-ei Kudo

Digestive Disease Center, Showa University Northern Yokohama Hospital

Summary

A 47-year-old woman who underwent total gastrectomy 3 months ago came to our hospital because of acute abdominal pain. CT scan showed dilated afferent loop and caliber change of jejuno-jejunosotomy, so we diagnosed torsion of anastomosis and strangulation ileus. Emergency operation was performed. The torsion was released and an ileus tube was inserted with its balloon deflated. On POD 2nd, she was asymptomatic and the ileus tube was removed. On POD 3rd, abdominal pain suddenly recurred. CT scan showed target sign of jejunum and enterography by re-inserted ileus tube showed stenosis of jejunum, so we diagnosed intussusception. In operation, manual reduction was impossible because of jejunal edema, so partial jejunectomy was performed. No tumor was detected in the resected specimen, so we considered ileus tube had some relation to intussusception. According to references, more than 90% of adult intussusception is caused by definable lesions such as malignant tumors. Only 68 cases of adult intussusception caused by ileus tube has been reported until now.

Key words：long tube，intussusception，ileus

第25回研究奨励賞選考について

選考委員・同窓会学術担当理事
江石 義信（医26・昭53卒）

第25回研究奨励賞・第13回田中賞の選考委員会が平成24年1月23日に行われた。今回は新しい選考委員で審査が行われた。学内からは湯浅医学部長、喜多村教授、西川教授、学外からは別所学長、中山教授、同窓会からは佐藤副理事長、江石学術担当理事の計7名が担当した。各委員が事前に論文を熟読して5点満点の評価を行い、その採点結果を参照しながら、佐藤同窓会理事長の司会のもと議論が行われた。今回は5名の応募があり、例年に比べて応募数は少なかったが、内容や掲載論文のレベルは例年どおり高いレベルのものばかりであった。1名の論文では全員の意見が一致したが、2名の論文に関しては、研究における応募者の寄与度、研究内容の独創性、将来の発展性などに関して選考委員のあいだで議論となり、最終的には2名の受賞者が決定した。

宮本論文は、滑膜間葉幹細胞が椎間板再生の有用な細胞源となりうることをウサギ椎間板変性モデルを用いて検討した。移植した滑膜間葉幹細胞が髄核細胞に作用して2型コラーゲンの産生を促進し、軟骨基質分解関連遺伝子を抑制することで椎間板構造を維持していることを示した研究である。特に新しい選考委員から高い評価がなされたが、以前にも同様の滑膜間葉幹細胞を用いた膝関節軟骨の再生に関する論文が同研究室から受賞していることから、研究の独創性や応募者の寄与度などに関して選考委員全員で議論した結果、受賞に値する十分な独創性と発展性を有するものと最終的に判断された。

島田論文は、若齢者に多く予後不良な未分化型胃癌でその遺伝子変異が注目されている細胞接着因子E-カドヘリンと癌抑制遺伝子p53の両方を欠失させたマウスモデルを作成したところ、12か月齢で全例に未分化型胃癌が、67％に進行癌が認められ、40％にリンパ節転移が認められたとする研究論文である。両遺伝子ともによく知られたものであるが、これを胃粘膜壁細胞でコンディショナルにダブルノックアウトするというアイデアは独創的である。本研究は遺伝子改変により未分化型胃癌が生じる世界初のモデルであり、胃癌組織発生の機構解明や胃癌治療の動物実験等が可能となることから今後の応用が期待される。

第25回研究奨励賞受賞者

みやもと　たかし
宮本　崇
（医50・平14卒）
同愛記念病院
整形外科
医員

しま だ　しゅう
島田　周
（医53・平17卒）
本学
分子腫瘍医学分野
助教

●研究奨励賞選考委員名簿
平成23年度～平成24年度（第25～26回）

※選考委員は研究奨励賞選考と
田中道子がん研究奨励賞選考を兼務しています。

- 同窓会理事長
  佐藤　達夫（医11・本学名誉教授・東京有明医療大学学長）
- 医学部長
  湯浅　保仁（医21・分子腫瘍医学教授）
- 学　内
  喜多村　健（昭48卒・耳鼻咽喉科学教授）
- 学　内
  西川　　徹（医25・精神行動医科学教授）
- 学　外
  別所　正美（医25・埼玉医科大学学長）
- 学　外
  中山　啓子（医34・東北大附属創生応用医学研究センター・細胞増殖制御分野教授）
- 同窓会副理事長
  佐藤　千史（医23・保健衛生学研究科　健康情報分析学教授）
- 同窓会学術担当理事
  江石　義信（医26・人体病理学教授）

前　目次へ　次

滑膜間葉系幹細胞による椎間板再生

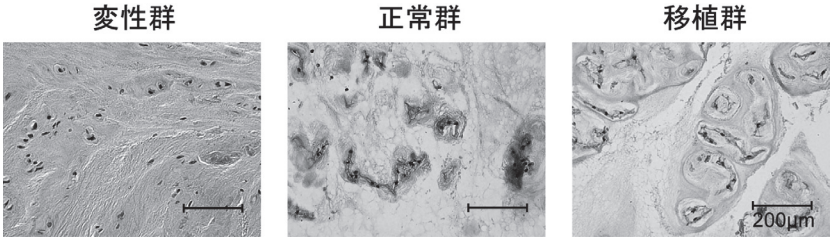
宮本　崇
（医50・平14卒）

この度は伝統あるお茶の水会医科同窓会研究奨励賞に選出して頂き、大変光栄に存じます。選考委員の先生方をはじめ、関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

私は平成14年に本学を卒業後、整形外科へ入局し、平成19年より大学院運動器外科学に入学し、滑膜間葉系幹細胞を用いた椎間板再生の研究に取り組みました。平成23年に大学院を修了した後、現在は再び臨床医として同愛記念病院整形外科に勤務しております。

研究奨励賞を頂いた本研究は、滑膜から採取した間葉系幹細胞が関節軟骨の再生に対して優れた細胞源となるということを基盤として、関節軟骨と構造的に類似した軟骨組織の一種である椎間板の再生にも、滑膜間葉系幹細胞が応用できるかを検討したものです。椎間板は人体で最大の無血管組織であり、栄養に乏しく、関節軟骨よりもさらに再生には不利な組織であると言わざるを得ませんが、その中で一定の椎間板再生効果を示すことができ、再生医療における滑膜間葉系幹細胞の可能性を強く感じました。

今後とも、臨床応用を目指して、医学研究の発展に微力ながらも貢献できるよう精進してまいりたいと思いますので、御指導御鞭撻のほど、よろしくお願い申し上げます。そして、直接御指導を頂いた宗田大教授、関矢一郎教授、貴重なご助言をいただいた四宮謙一前教授、大川淳教授をはじめ、研究にご協力頂いた皆様方に、この場を借りまして厚く御礼申し上げます。



移植後２週で変性群は線維化が進行しているのに対し、移植群では細胞外基質が保たれていた。

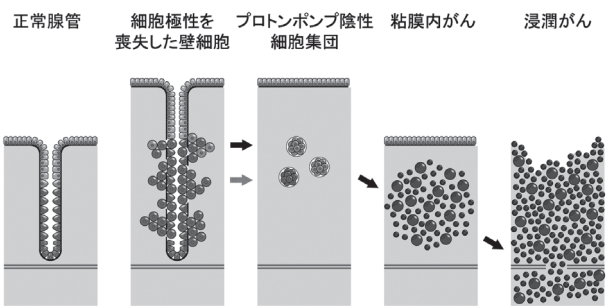
スキルス胃がんマウスモデルの作製

島田　周
（医53・平17卒）

この度は栄誉あるお茶の水会医科同窓会研究奨励賞に選出していただき、大変光栄に存じます。選考委員会の先生方と関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

私は平成17年に本学を卒業し、本学の医学部附属病院と総合病院国保旭中央病院で臨床研修をさせていただきました。その臨床研修中に、がんの診療に携わり、がんという疾患に対する無力感に苛まれる機会が多々ありました。そこで、在学中にがんの基礎研究の重要性を御教示して下さった湯浅保仁教授の御指導の下、平成19年より本学の分子腫瘍医学でがんの研究をさせていただくことになりました。研究室のテーマである胃がんは、依然死亡数が多く、特に悪性度が高いスキルス胃がんは、その発症機構の解明と新規治療方法の開発が期待されるがんのひとつです。私たちは、ヒトのスキルス胃がんに形態学的にも分子生物学的にも類似したマウスモデルを世界で最初に作製し、研究発展のための基盤を確立することができました。現在は、このモデルマウスを利用して、がんに対して特異的に作用する新規分子標的薬を探索しており、一日でも早く臨床応用可能な抗がん剤を開発することを目標として研究を進めています。

御指導して下さった湯浅保仁教授、江石義信教授、田中博教授、御協力して下さった多くの先生方、そして私を支えてくれた家族にこの場を借りて感謝の言葉を述べさせていただきたいと思います。今後とも御指導、御鞭撻の程をお願いいたします。



スキルス胃がんマウスモデルでは、細胞極性の喪失・脱分化・粘膜内がんの形成・浸潤がんへの進展の４段階を経て、がんが発症している。

第25回 お茶の水会医科同窓会研究奨励賞 受賞論文梗概

氏名	年齢	卒業年次	現職
宮本　崇	35歳	医50・平14卒	同愛記念病院　整形外科　医員

論文名：Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits

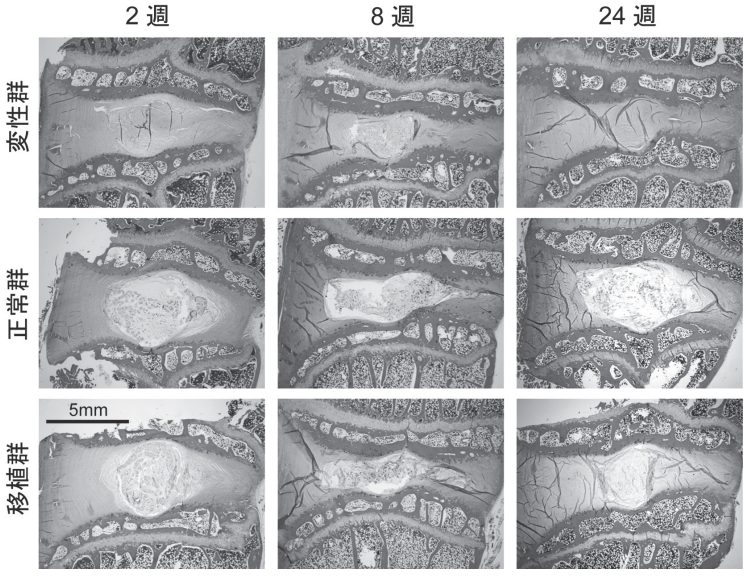
掲載誌：Arthritis Research & Therapy 12: R206, 2010.

論文名：椎間板移植した滑膜間葉幹細胞は髄核細胞のMMP関連遺伝子の抑制を介して椎間板変性を抑制する

梗　概：滑膜間葉系幹細胞は優れた増殖能と軟骨分化能を有しており、関節軟骨欠損部に移植すると豊富な細胞外基質を産生する。椎間板は関節軟骨と類似した軟骨組織であり、滑膜間葉幹細胞が椎間板再生の有用な細胞源となる可能性を秘めている。今回、滑膜間葉系幹細胞の椎間板移植による効果を、ウサギ椎間板変性モデルを用いて検討した。

ウサギ腰椎椎間板髄核を穿刺、吸引し、椎間板変性モデルを作製した。ウサギ膝滑膜由来の間葉系幹細胞を変性椎間板に注入した。移植細胞を追跡するため、DiIで標識した細胞、もしくは全身にGFPを発現する遺伝子組み換えウサギの滑膜から得られた細胞を使用した。髄核吸引を行わない正常群、髄核吸引の後、細胞移植を行わない変性群と比較した。移植後2･4･6･8･16･24週にXPおよびMRIによる画像評価と組織学的検討を行った。また移植細胞の効果の機序を明らかにするために、ヒト滑膜間葉系幹細胞とラット髄核細胞の共培養を行い、種特異的遺伝子プロファイリング解析を行った。

移植細胞は移植後1日目で十分に生着し、24週目まで残存していることを確認した。XPでは移植群と変性群の椎間板高に有意差を認め、24週まで移植群の椎間板高は正常群とほぼ同等に保たれた。MRIで移植群の髄核はT2強調画像で高輝度を保っていた。組織学的にも移植後2週で移植群は有意に髄核の線維化抑制効果を示した。2型コラーゲンの免疫染色では移植群の髄核が最も濃染した。また、共培養ではヒト滑膜間葉系幹細胞の遺伝子プロファイルに変化は少ない一方で、ラット髄核細胞には大きな変化がみられ、軟骨基質分解酵素や炎症性サイトカイン関連遺伝子が抑制されていた。これらのことから、移植した滑膜間葉系幹細胞は髄核細胞に作用して、2型コラーゲンの産生を促進し、軟骨基質分解関連遺伝子を抑制することで椎間板構造を維持していることが示唆された。



移植群の髄核は、変性群に比して有意に線維化が抑制されていた。

前　目次へ　次

第25回 お茶の水会医科同窓会研究奨励賞 受賞論文梗概

氏名	年齢	卒業年次	現職
島田　周	32歳	医53・平17卒	本学分子腫瘍医学分野　助教

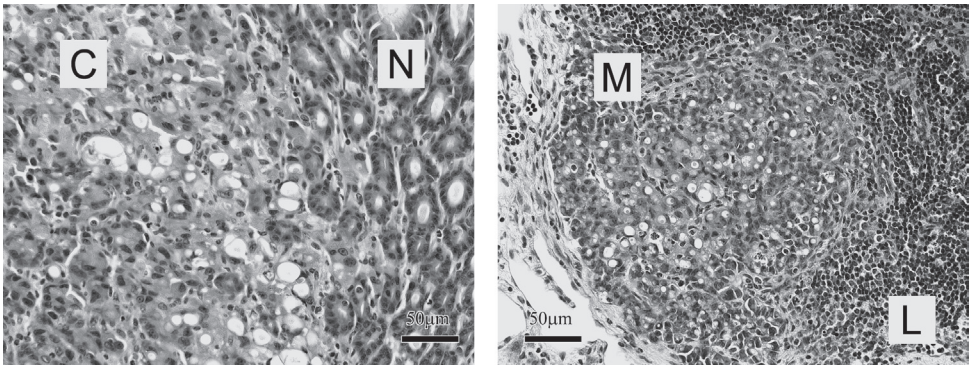
論文名：Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer
掲載誌：Gut 61: 344-353, 2012.

論文名：未分化型胃癌のモデルとしてのE-カドヘリン/p53コンディショナルノックアウトマウスに関する研究

梗　概：胃がんはがんによる死亡の中で世界的にも2番目に多く、特にスキルス胃がんに代表される未分化型胃がんは予後が悪い。遺伝性未分化型胃がんでは細胞接着分子E-カドヘリンの変異が検出されており、散発性未分化型胃がんでも変異、DNAメチル化が認められる。我々は胃の壁細胞で特異的にE-カドヘリンを欠損する（CKO）マウスモデルを作製したが、がんは認められなかったため、E-カドヘリンとがん抑制遺伝子p53の両方を欠損する（DCKO）マウスモデルを作製した。

3ヶ月齢以降のDCKOマウスでは、細胞極性を喪失した壁細胞が認められた。この細胞はCKOマウスでも認められ、その頻度はDCKOマウス、CKOマウス間で差はなかった。次に、壁細胞の分化マーカーであるプロトンポンプを発現していない、脱分化した細胞集団が認められた。この病変もCKOマウスで認められたが、DCKOマウスでは高頻度に認められ、細胞増殖能も高かった。CKOマウスの病変ではアポトーシスが誘導されており、p53陽性細胞も認められた。6ヶ月齢以降のDCKOマウスでは粘膜内に低分化細胞と印環細胞が認められた。12ヶ月齢では全例にがんが、67%に進行がんが認められ、50%が消化管出血、幽門部狭窄により死亡し、40%にリンパ節転移が認められた。そして、マウス未分化型胃がんの遺伝子発現パターンは、ヒト未分化型胃がんのそれと類似していた。

我々が作製したDCKOマウスは、世界初の未分化型胃がんのモデルである。DCKOマウスの病変の経過より、E-カドヘリンの異常により細胞極性の喪失が生じること、E-カドヘリンの異常により脱分化が惹起され、さらにp53の異常により細胞増殖抑制とアポトーシスが誘導され脱分化が促進されること、E-カドヘリンとp53の両方の異常によりがん化することが示唆された。



DCKOマウスの胃がん原発巣（左）とリンパ節転移巣。
C：がん原発巣、　N：正常胃粘膜、　M：がんリンパ節転移巣、　L：正常リンパ節。

お茶の水醫學雑誌　60:167-243（2012）

東京医科歯科大学医歯学総合研究科（医学系）の学位論文内容紹介

平成 24 年 1 月～ 3 月論文審査終了者

東京医科歯科大学医歯学総合研究科（医学系）では、毎年 120 名前後の医学博士論文の学位審査が行われています。学位審査請求がなされた論文に対しては、医歯学総合研究科医学系研究科運営委員会で主査 1 名、副査 2 名が決定され、3 名の審査委員によって学位論文審査が 1 時間程度行われます。20 分程度のパワーポイントを用いたプレゼンの後、各審査委員が論文内容や研究背景となる基礎知識に関していくつかの質問を行い、その質問に対する申請者の応答やコメント内容が論文内容とともに審査されています。審査が終了すると審査員 3 名による査定結果のすりあわせが行われ、審査委員会での審査結果が申請者本人に伝えられます。申請者の説明や理解度に疑問が生じるようなときには、その理解度を確認するためにレポート提出が要求される場合もあります。レポート提出を要求された場合には、後日提出されたレポート内容が満足するものであることが確認された場合にのみ審査委員会での合格が認められます。このような学位審査委員による審査を終えた論文は、その後は、医学系教授、生体材料工学研究所教授および難治疾患研究所教授で構成される医歯学総合研究科医学系研究科運営委員会による承認が必要です。学位論文の内容の要旨と 3 名の審査委員による最終試験の結果が主査の先生から説明されたあと 80 人前後の教授陣が学位授与を認めるか否かの投票を行って最終的な決定がなされています。学位審査申請の時に提出される４０００字程度の論文要旨と学位審査報告書は、最終的に本学と国会図書館に永久保存されており閲覧の希望があれば常時情報公開される運びになっていますが、実際はこれを能動的に閲覧するひとはほとんどいないのが現状です。

今回お茶の水医学雑誌では、本学大学院で研究された論文内容をひろく本学関係者に広報することを目的として、改訂版第 2 号から学位授与がなされた大学院生の論文要旨を毎号掲載することになりました。２０１２年１月以降に学位審査が終了した論文のなかで、お茶の水医学雑誌への論文要旨掲載に関して本人および指導教員からの承諾が得られた論文に関してはすべて本誌に公開予定です。印刷媒体による本誌の発行では、紙面の制限や費用の観点から論文要旨のなかでも要約部分のみが掲載され、図書館のホームページから閲覧できる本誌の PDF 版においては、論文要旨の全内容が掲載される運びとなります。

学位授与を受けた本学の大学院生の研究内容が、一目で把握できるようデザインにも工夫が凝らしてありますので、本学でどのような研究が進行しているのか、また知人の大学院生がどのような研究をして学位を授与したのかなど等、本誌読者のなかにも興味がある方々が少なくないのではと推測しています。学位審査論文のなかにはオンライン掲載の段階で審査が終了するものも多いのが実情ですが、掲載雑誌の巻・号・ページなどの情報も可能なかぎり掲載して、興味がある論文に関しては簡単にアクセスできるようにしました。毎年 1 月から 3 月は、審査期限の関係から学位審査が目白押しの状態になっており、今回の掲載論文数だけでも 1 年分の 3 分の 1 を超える数となっています。

（編集長　江石義信）

大場　岳彦　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1751 号
学位授与	／	平成 24 年 2 月 1 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）統合呼吸器病学専攻
学位論文題目	／	Cytokeratin expression profiling is useful for distinguishing between primarysquamous cell carcinoma of the lung and pulmonary metastases from tongue cancer.（肺原発の扁平上皮癌と舌癌肺転移の鑑別にサイトケラチン発現プロファイリングが有用である） Pathology International　第 60 巻第 8 号　575 頁～ 580 頁掲載　平成 22 年 7 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　江石　義信　　副査：教授　岸本　誠司　　副査：教授　大久保　憲一

論文要旨

＜要旨＞

舌扁平上皮癌の既往がある患者の肺に扁平上皮癌が発生したとき、第二癌か転移かを鑑別することは難しい。本論文では、抗サイトケラチン抗体を用いた免疫染色による鑑別の有用性について検討した。他癌の既往がない肺扁平上皮癌患者 26 例（definite primary group）、および舌扁平上皮癌の手術後に肺に扁平上皮癌を生じた 17 例（unknown group）から得られた手術検体を用いた。Definite primary group から、肺原発扁平上皮癌 26 検体を得た。Unknown group から、肺の扁平上皮癌 17 検体（うち転移性肺扁平上皮癌 11 検体）および舌扁平上皮癌の原発巣 15 検体を得た。免疫染色は、CK5/6、CK7、CAM5.2、CK19、および p63 を用いた。肺原発の扁平上皮癌における CAM5.2 と CK19 の発現頻度はそれぞれ、81％と 78％であった。これは、舌癌肺転移（9％、18％）や舌原発巣の扁平上皮癌（33％、13％）に比べて、それぞれ有意に高かった。CAM5.2 と CK19 は肺原発扁平上皮癌と舌癌肺転移の鑑別に有用である。

＜緒言＞

肺は他臓器癌からの転移の好発部位である。肺原発か転移かの鑑別は臨床的に非常に重要である。腺癌の場合、形態的特徴に関する知見や免疫組織化学による検討は多く報告されており、両者の鑑別は比較的容易であるが、扁平上皮癌のおける鑑別についての報告はほとんどない。

上皮細胞の細胞骨格を形成するサイトケラチン（CK）は、少なくとも 20 種類の異なる蛋白に分類される。CK の発現は上皮の種類によって特異性がある。大まかに言うと、比較的高分子量の CK は扁平上皮に、低分子量の CK は円柱上皮に発現している。肺の扁平上皮癌は、扁平上皮から生じる扁平上皮癌と比べると、円柱上皮系の CK を高頻度に発現するとの報告がある。しかしながら一般的には、扁平上皮癌は扁平上皮と同様の CK 発現パターンをとると認識されている。CK 発現パターンによる原発巣の鑑別について検討した報告もほとんどない。そこで今回、肺に生じた扁平上皮癌を CK 発現パターンにより肺原発または転移と鑑別できるかどうについて検討した。

＜方法＞

他癌の既往なしで肺扁平上皮癌を生じた 26 例を definite primary group と名づけた。Definite primary group より、肺腫瘍 26 検体を得た。舌扁平上皮癌の手術後に肺に扁平上皮癌を生じ、肺腫瘍の手術切除が行われた 17 症例を unknown group と名づけた。Unknown group より、肺腫瘍 17 検体、舌原発巣 15 検体を得た。

まず Unknown group の肺腫瘍 17 例を、転移・肺原発・分類不能に分類した。従来この鑑別は肺腫瘍の位置、数、病理所見の比較など、臨床病理学的になされてきたが、この方法では常に明確な鑑別ができるとは限らないため、我々は肺腫瘍切除後の臨床経過も加味した、以下に示す基準により分類を行った。

転移を示唆する所見

1) 肺病変が多発であること
2) 肺腫瘍切除後の生存が 6 ヶ月以内
3) 病理所見が転移を示唆すること（肺と舌腫瘍の細胞所見が似ていること、肺腫瘍に著名な中心壊死が見られることなど）

肺原発を示唆する所見

1) 舌癌の頸部リンパ節転移が病理学的に陰性であること
2) 肺腫瘍に in situ carcinoma の所見が認められること
3) 舌癌の再発が 2 年以上なくて肺腫瘍が出現した場合
4) 肺腫瘍切除後の生存が 3 年以上
5) 肺腫瘍が中枢（主気管支、葉気管支、区域気管支）発生であること

前　目次へ　次

通常、扁平上皮癌における転移または原発の鑑別はしばしば困難だが、今回は手術後の経過も含めて検討することが可能であり、17 例中 15 例において転移または肺原発（舌癌肺転移 11 例、肺原発 4 例）と確定することができた。残りの 2 例は鑑別困難であった。
各検体を CK5/6、CK7、CAM5.2、CK19、p63 にて免疫染色した。CK5/6 は扁平上皮に発現する CK5 と CK6 を認識する。CK7、CK19、CAM5.2 は円柱上皮に陽性となり、扁平上皮では通常陰性である。p63 は扁平上皮基底細胞に優位に発現する核転写因子であるが、今回 p63 も合わせて検討した。免疫反応性は、全腫瘍細胞の 10％以上が染色されたときに陽性と判定した。
カイ 2 乗検定により統計解析を行った。

＜結果＞
Unknown group の中で舌癌肺転移と診断された症例は、Definite primary group に比べて有意に若く、喫煙指数が低く、高分化扁平上皮癌の割合が高かった。Unknown group の中で肺原発扁平上皮癌と診断された症例の患者背景・病理所見は、definite primary group と有意に異なるものは認められなかった。
Definite primary group における CAM5.2 の陽性率は 81％であった。これは、舌癌原発巣における陽性率 33％、および肺転移における陽性率 11％と比べて、有意に高かった。Definite primary group における CK19 の陽性率は 78％であった。これもまた、舌癌原発巣における陽性率 13％、および肺転移における陽性率 18％と比べて、有意に高かった。

＜考察＞
舌扁平上皮癌既往のある患者の肺に扁平上皮癌が生じたとき、それを転移または肺原発と診断することはしばしば困難である。我々は、肺原発扁平上皮癌は、舌扁平上皮癌の肺転移と比べて CAM5.2 と CK19 を有意に高頻度に発現していることを見出した。我々の知る限り、肺原発扁平上皮癌と転移性肺扁平上皮癌の鑑別における CK 発現パターンの有用性に関する報告は、これが初めてである。
肺原発扁平上皮癌と舌癌肺転移を比較するため、unknown group の肺腫瘍を肺原発または転移に分類する必要があった。通常、扁平上皮癌における転移または原発の鑑別はしばしば困難だが、今回は手術後の経過も含めて検討することが可能であり、17 例中 15 例において転移または肺原発と確定することができた。その結果、転移性肺腫瘍と診断された患者群は、definite primary group と比べて有意に若く、喫煙指数が低かった。舌癌の好発年齢は肺癌よりもやや若く、またその危険因子は喫煙だけでなくアルコールその他の多様な危険因子が存在する。原発肺扁平上皮癌と転移性肺扁平上皮癌におけるこれらの臨床背景の相違は、舌癌と肺癌における臨床的特徴の相違と矛盾しないものであった。これらは、我々の診断基準がおおむね妥当であったことを示唆すると思われる。
CK は少なくとも 20 種類の亜型に分類され、その発現プロファイルは上皮の種類や分化の程度によって異なる。我々は、肺原発の扁平上皮癌における CAM5.2 と CK19 の発現が舌癌やその肺転移よりも高頻度に認められることを示した。この結果を支持する二つの報告がある。ひとつは、固有扁平上皮から成る臓器から発生する扁平上皮癌に比べて、肺や子宮頸部に発生する扁平上皮癌は、CK8、CK18、CK19 などの円柱上皮系の CK を高頻度に発現するというものである。もうひとつは、肺の扁平上皮癌は口腔の扁平上皮癌に比べて CK19 を高頻度にかつ強く発現するというものである。肺原発の扁平上皮癌は円柱上皮から扁平上皮化成を経て発生すると推測される。従って、肺原発の扁平上皮癌は悪性化後も円柱上皮系の CK を保持しているが、舌原発の扁平上皮癌は固有扁平上皮から発生するため円柱系の CK を発現していない可能性が示唆される。
CK 発現パターンによる鑑別は手術切除検体において特に有用と思われるが、解釈に注意すれば生検検体にも応用できると思われる。肺原発の扁平上皮癌は高頻度に CAM5.2 や CK19 を発現していたが、不均一にこれらの CK を発現している症例も見られた。したがって、生検のように少量の検体しか得られない場合、検体内にこれらの CK 発現が認められなくてもそれは必ずしも腫瘍全体に発現がないことを意味してはいない。このような場合には CK 発現パターンによる鑑別は困難と思われる。しかし、CAM5.2 か CK19 どちらかを発現していれば、肺原発を示唆する所見として考えてよいであろう。
最後に、肺原発の扁平上皮癌は舌癌肺転移に比べて CAM5.2 と CK19 を高頻度に発現する。CK 発現パターンは原発と転移の鑑別に有用である。

辻　尚子　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1779 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）心療・緩和医療学専攻
学位論文題目	／	Validation of the Japanese version of the pediatric quality of life inventory（PedsQL）cancer module（Pediatric Quality of Life Inventory (PedsQL) がんモジュール日本語版の有効性評価研究） Health and Quality of Life Outcomes　第 9 巻第 22 号掲載　平成 23 年 4 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　高瀬　浩造　　副査：教授　水谷　修紀　　副査：教授　松浦　雅人

論文要旨

＜要旨＞

自己評価と代理評価を用いた小児がん患児の国際的な QOL 評価尺度である PedsQL (Pediatric Quality of Life Inventory 3.0) Cancer module の日本語版 (PedsQL C-Module) を作成し、5-18 歳の患児 212 名、2-18 歳の患児の親 253 名を対象に、その信頼性と妥当性の検証を行った。その結果、5-7 歳の自己評価尺度「痛みについて」以外の全尺度・全年齢において、高い内的整合性（α 係数）が得られ、1 週間後の再テストでも、自己・代理評価尺度の相関係数は全年齢で 0.7 以上となり、信頼性が高いことが示された。また、全年齢群の自己・代理評価尺度において、尺度の成功率が 95% 以上となり、因子分析においても、十分な因子妥当性が示された。自己評価尺度と代理評価尺度は極めて強い相関を示し、PedsQL Generic Core Scales 日本語版の QOL 得点や抑うつ尺度とも強い相関を示し、基準関連妥当性も示された。治療中の患児と治療終了後の患児では、QOL 得点に有意な差が見られ、臨床的妥当性も示された。また、書式全体の項目欠損割合は患児 0.68%・親 0.98% と低く、十分な実行可能性が示された。

以上より、PedsQL Cancer module 日本語版の信頼性・妥当性が確認され、今後、QOL を主要アウトカムとする小児がん患児の臨床研究に使用できる有用なツールとなると考えられた。

＜緒言＞

近年、小児がん全体の長期生存率は約 70-80％と大きく改善しているが、進行期の固形腫瘍や再発腫瘍などでは未だ約 20-30% の生存率に留まっている。そのため、治癒可能な疾患に対しては、生存率を損なうことなく治療関連毒性を最小限に抑えることが患児の生活の質 (Quality of Life) の向上に必要であり、一方、根治が難しい疾患に対しては、残された時間をできる限り豊かなものとするために、やはり QOL の向上が不可欠である。

この目的を達成するためには、QOL を評価する尺度が必要であるが、これまで、日本人の小児がん患児に使用可能な評価尺度は存在しなかった。

そこで、PedsQL (Pediatric Quality of Life Inventory 3.0) Cancer module という、世界の多くの国々で使用されている、2-18 歳の小児がん患児の健康関連 QOL を評価する尺度の日本語版を開発することとした。

＜方法＞

現在 2 歳から 18 歳の小児で、小児がんと診断された児とその保護者のうち、研究協力について原則として本人からのアセントおよび保護者からの同意が得られた者を対象とした。調査用紙は、PedQL Cancer module 日本語版、PedsQL Generic core module 日本語版、DSRS-C 日本語版（8-15 歳用）、CES-D 日本語版（16-18 歳用、保護者用）の 4 種類を用いて、PedsQL C-Module の信頼性、妥当性、および実行可能性の検討を行った。

＜結果＞

①記述疫学的検討および内的整合性の検討

PedsQL C-Module の平均・標準偏差・範囲・α 係数を算出した。自己・代理評価とも、各尺度の α 係数は 0.7 を超え、高い内的整合性が示された。年齢群毎の書式においても、5-7 歳の「痛み」の評価尺度のみ α =0.53 で、その他は全て 0.6 以上となった。米国での原版と異なり、自己･代理評価得点は「コミュニケーションについて」で最も低く、「痛みについて」や「吐き気について」といった身体症状に関する項目で高い結果となった。「考えることについて」と「外見について」は、13-18 歳の思春期の児で最も低い点数となった。

②再現性の検討

本研究では、同意が得られた 40 組の親子に対し 1 週間後に再テストを行った。その結果、38 組の親子から回答が得られ、

前 目次へ 次

全年齢群において下位尺度全体の相関係数は 0.7 以上と高い信頼性が示された。しかし、自己評価での 5-7 歳と 13-18 歳の「治療に対する不安について」と、8 － 12 歳の「心配について」では級内相関は低く、この尺度に限っては再現性が低いと考えられた。代理評価に関しては、どの尺度においても高い再現性が示された。

③妥当性の検討

妥当性は、因子妥当性、収束的・弁別的妥当性、基準関連妥当性、そして臨床的妥当性を用いて検証した。

因子分析では、オリジナルの英語版で示された 8 因子構造と異なり、7 因子構造を示し、因子 - 項目間の相関は、自己評価尺度で 0.30-1.00、代理評価尺度で 0.44-1.00 であった。

収束的・弁別的妥当性は、多特性尺度化分析を用いて検討し、全年齢の全スケールにおいて、尺度の成功率は 95 ～ 100% と高い成功率が示された。

基準関連妥当性は、3 つの方法を用いて検討した。まず、自己評価尺度と代理評価尺度の相関を Spearman の相関係数を用いて検討した。同じ尺度同士の相関係数は 0.33-0.70 と高く、中でも身体症状に関する尺度の相関が最も強かった。同様に、PedsQL C-Module と PedsQL Generic Core Scales 日本語版との相関を検討したところ、自己・代理評価尺度とも、各々の合計得点は 0.70 以上と強い相関を示した。PedsQL C-Module 自己評価尺度の「痛みについて」・「吐き気について」は、PedsQL Generic Core Scales 日本語版の「身体的機能」と、PedsQL C-Module の自己評価尺度の「処置に対する不安について」・「心配について」は、PedsQL Generic Core Scales 日本語版の「身体的機能」・「感情の機能」と、PedsQL C-Module の自己評価尺度の「考えることについて」は、PedsQL Generic Core Scales 日本語版の「学校での機能」と、PedsQL C-Module の自己評価尺度の「外見について」・「コミュニケーションについて」は、PedsQL Generic Core Scales 日本語版の「社会的機能」と、各々強い相関を示した。代理評価尺度では、PedsQL C-Module の「痛みについて」・「吐き気について」は、PedsQL Generic Core Scales 日本語版の「身体的機能」と強い相関を示し、それ
以外の全ての尺度は、PedsQL Generic Core Scales 日本語版の「感情の機能」と強く相関していた。抑うつと考えられる児の抑うつ尺度（DSRS-C 日本語版（8-15 歳用）、CES-D 日本語版（16-18 歳用、保護者用））の得点は、PedsQL C-Module および PedsQL Generic Core Scales 日本語版の感情ドメイン・合計得点と強い相関を示した。また、抑うつ尺度の得点は、親子間で強い相関が見られた。

臨床的妥当性については、患児を治療中・治療終了後 12 か月以内・治療終了後 12 か月以降の 3 つのグループに分け、QOL 得点を比較した。その結果、治療終了後 12 か月以降のグループは治療中のグループに対して、身体症状や感情機能に関して有意に高い得点を示したが、「考えることについて」と「外見について」といった社会的機能・学校での機能に関する得点は治療終了後 12 か月以上たっても有意な改善は認めておらず、コミュニケーションに関する得点も、治療終了後 12 か月以内では改善されていなかった。

④実行可能性の検討

PedsQL C-Module の各書式における項目欠損割合は、自己評価尺度で 0.68%、代理評価尺度で 0.98% と低かった。質問紙記入に要する時間も自己評価で 5-10 分（中央値 8 分）、代理評価で 2-5 分（中央値 3 分）と、十分な実行可能性が示された。

＜結論＞

PedsQL (Pediatric Quality of Life Inventory 3.0) Cancer module の日本語版は、十分な信頼性・妥当性を持つツールであることが示された。

石橋　敦子　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1780 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）脳神経機能外科学専攻
学位論文題目	／	Lesion of the nucleus solitarius leads to impaired laryngeal sensation in bulbar palsy patients（孤束核病変が球麻痺患者の喉頭感覚障害をもたらす） Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases　第 21 巻第 3 号　174 頁～180 頁掲載　平成 24 年 4 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　喜多村　健　　副査：教授　杉原　泉　　副査：教授　水澤　英洋

論文要旨

＜要旨＞

内視鏡と探触子を用いた咽喉頭感覚テスト法によって、延髄外側梗塞（LMI）による球麻痺患者における、喉頭感覚の左右差についてと、病変部位について検討した。15 名の LMI による球麻痺嚥下障害患者を対象とし、喉頭感覚は 8 名で正常、 7 名で患側喉頭感覚低下していた。喉頭感覚低下群では全例、病変に孤束核が含まれていた。病変が孤束核を含む場合、有意に喉頭感覚低下していた（Fisher test P ＜ 0.026）。このことより、球麻痺嚥下障害患者は咽喉頭の運動障害だけでなく、患側の喉頭感覚低下をきたしうることが判明した。疑核と孤束核の両方が障害されると、嚥下障害と喉頭感覚低下を合併し、その場合病変は、延髄背側で比較的広範囲に広がり、中部の高さであることが分かった。

＜緒言＞

延髄病変により疑核が障害され球麻痺がおこることはよく知られている。その中で臨床的によく遭遇するのは延髄外側症候群で、嚥下障害の出現頻度は、おおむね 50-60% と言われている。疑核に病変が及ぶと片側の咽頭収縮不全や、カーテン徴候などを呈し、嚥下障害に繋がる。しかし、咽喉頭の感覚については、障害されているのか、また、健側と患側で差があるのかの検討はほとんどなされていない。咽喉頭の感覚は孤束核支配である。延髄外側症候群（LMI）による球麻痺患者の喉頭感覚について、患側、健側の差異と病変部位の範囲について検討した。

＜方法＞

対象は、2009 年 8 月から 2011 年 4 月まで当院に入院または外来通院している球麻痺患者 15 名（男女比 9:6、平均年齢 68.1 歳 (44-88)、右球麻痺：6 名、左：9 名）である。発症からの期間は、13 病日～ 10 年と急性期、慢性期を問わず対象とした。疾患は 15 名全て LMI だった。嚥下障害重症度（FOIS）はレベル 2-6(検査時点) だった。

病巣の確認は、急性期の MRI 水平断，T2 強調画像または DWI にて行った。嚥下造影検査 (VF)、嚥下内視鏡検査（VE）にて球麻痺であることを確認し、喉頭感覚テストを施行した。球麻痺所見としては、VF では、咽頭収縮不全、喉頭挙上不全、輪状咽頭部の開大不全を認め、VE では、片側の軟口蓋麻痺、咽頭収縮不全、声帯麻痺、泡沫状の唾液貯留を認めることとした。

喉頭感覚テストは、谷口らが開発した探触子を用いた内視鏡による方法で評価した。喉頭感覚テストは、先行研究でオリンパス社と共同開発された内視鏡（OLYMPUS ENF-Y0005®）と探触子を用いた。内視鏡は、探触子孔を有するが最大径 3.3mm と細く、操作性に優れている。探触子は、針金の先端にナイロン糸を装着し、内視鏡の中で絡まないようにシースで保護されている。ナイロン糸の径は、a：0.06、b：0.13、c：0.20、d：0.30mm の 4 種類である。テストの方法は以下のとおりである。内視鏡に探触子を挿入し、内視鏡を中咽頭まで挿入し、探触子を喉頭蓋喉頭面と披裂部に接触させ、自覚所見と喉頭内転筋反射 (LAR) の有無による他覚所見で判定した。自覚所見と他覚所見の一致をもって「陽性」と判断した。検査は 4 種類の探触子のうち、細い探触子から上行的に施行し、感知できる最も細い探触子を感覚閾値とした。谷口らは健常成人のデータより、探触子 a・b で感知できれば感覚正常、c・d で初めて感知されるか、感知できなければ感覚低下と判断し、我々もこれに従って判定した。

この方法は、当院の臨床審査委員会にて審査し承認され、十分の説明と同意の下に承諾を得た上で、施行した。

MRI 画像で病巣を同定し、Kim の分類に従って分類した。Kim は、延髄外側梗塞を水平方向に、typical、ventral、large、dorsal、lateral、unclassifiable type の 6 つに分類している。また、解剖学的図譜として、Olszewski と Baxtor の Cytoarchitecture of the Human Brain Stem を用い、病巣に孤束核、疑核が含まれるかどうか判定した。延髄の高位については、rostral part、middle-upper part、middle-lower part、caudal part に分類した。

＜結果＞

1、喉頭感覚閾値

前 目次へ 次

患側喉頭蓋・披裂部は 15 例中 8 例で正常、7 例で低下、健側披裂部、健側喉頭蓋では 2 例を除き感覚正常であった。患側喉頭蓋と披裂部の感覚は一致していた。

２、病変部位と嚥下障害、感覚障害
病巣高位は rostral 3 例、middle-upper 5 例、middle-lower 7 例に分けられ、caudal に該当する症例はなかった。水平断では Kim の分類により、typical 3 例、ventral 4 例、large 6 例、dorsal 1 例、unclassifiable 1 例に分けられた。解剖学図譜において疑核は 14 例で、孤束核は 10 例で病巣に含まれると判断された。孤束核を含む 10 例は、水平断で typical、large、dorsal type であった。そのうち、喉頭感覚の患側低下を認めた症例は、large、dorsal type であった。しかし、typical type の 3 例全例で患側喉頭感覚は正常であった。これらの結果より、延髄病変で孤束核を含む群では、有意に患側喉頭感覚は低下していた (Fisher test $P < 0.026$)。

＜考察＞
この研究は球麻痺による嚥下障害患者が患側喉頭感覚障害をきたすことを明らかにした最初の研究である。重要な点は、喉頭感覚低下患者の病変が孤束核を含んでいる点である。
咽喉頭粘膜の感覚は、多くの神経（Ⅸ咽頭枝・舌枝・扁桃枝、Ⅹ咽頭枝、上下喉頭神経）支配を受け、これらの嚥下中枢への入力が相互に働き嚥下反射を惹起する。喉頭粘膜は主に上喉頭神経（SLN）内枝に、咽頭粘膜は咽頭神経叢に支配を受け、喉頭内に存在する感覚受容体からの情報は主に SLN 内枝を介して孤束核に伝達される。孤束核は延髄の背内側に位置し吻尾方向に延びる細胞柱よりなる神経核で、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ神経からの特殊内臓求心性線維 SVA (味覚) とⅨ、Ⅹ神経からの一般内臓求心線維 GVA(咽頭、喉頭の感覚) が終末する。孤束核はいくつかの亜核に分類され、喉頭からの入力はそのうちの間質亜核や中間亜核に終末する。咽頭期嚥下は all-or-none に発現するので、孤束核へ入力される感覚量がある一定の閾値に達すると CPG が活動化され咽頭期嚥下が実行されるものと考えられる。よって咽頭期嚥下反射の惹起には咽喉頭粘膜からの感覚入力は必須であり、嚥下における感覚の関与は大きく、生体防御機構においても重要な役割を果たしていると思われる。
探触子を用いた喉頭感覚テストでは、GVA における触覚を評価していると考えられる。検査部位の喉頭蓋喉頭面両端、両側披裂部は、いずれも SLN 支配領域で感覚線維分布密度が高く、比較的接触しやすい部位である。両部位での感覚閾値はほぼ一致していた。
探触子を用いた咽喉頭感覚テストは、半定量的に検査できる方法として開発された。他に内視鏡で咽喉頭感覚を定量的に検査できる方法として、Aviv らの air puff 法が開発されている。これは、特殊な内孔を持つ内視鏡から air puff が噴出され、披裂喉頭蓋襞を刺激するもので、LAR の有無で感覚閾値を決定している。この方法では、air puff 圧で刺激の強さを変えることができ、定量的という点では優れているが、使用する内視鏡と Air puff 発生器は特別に作られた装置であり、検査は簡便とは言えないのが現状である。我々の方法では、探触子孔を有する内視鏡があれば、探触子は作成することも可能である。
我々の以前の研究では、仮性球麻痺嚥下障害患者で喉頭蓋喉頭面を触れる検査で、全例喉頭感覚低下しており、球麻痺患者では患側のみ喉頭感覚低下しているか正常であると分かった。従って我々は、球麻痺患者において孤束核が病変に含まれるかどうか判定するに至った。
喉頭感覚低下群では、病変に孤束核を含んだが、感覚正常群では含まれなかった。しかし孤束核が含まれるにも関わらず、typical の 3 例全例は喉頭感覚正常であった。これは rostral 部位に病変があり喉頭からの GVA が主に集約する間質亜核や中間亜核はこの部位にはないことによると考えられた。孤束核における神経細胞と収束線維は、味覚線維のような SVA が孤束核の吻側半に収束し、Ⅸ、Ⅹ神経からの GVA 線維は孤束核の尾側半に収束すると報告されている。従って、咽喉頭の GVA 線維の孤束核における収束は、延髄の中 ~ 尾部にあると考えられる。
球麻痺は疑核の障害により生じ、LMI で多く発症する。延髄高位と水平面での病巣の広がりは、延髄吻側で内側まで広がる梗塞が嚥下障害を生じやすいと言われている。我々の症例でも病変が延髄尾部のものは認めなかった。
この研究では、球麻痺嚥下障害患者の喉頭感覚を評価し、MRI 所見で病変に疑核と孤束核が含まれるかどうかを判定した。LMI14/15 例で疑核を病変に含み、孤束核を病変に含む症例では、有意に患側の喉頭感覚は低下していた。孤束核の尾側半に咽喉頭感覚が収束し、延髄の中 ~ 尾側部位での障害が咽喉頭感覚低下や消失を引き起こすと考えられた。

＜結論＞
今回、球麻痺の嚥下障害では、咽喉頭の運動障害に加えて患側の喉頭感覚障害も呈し得ることを明らかにした。球麻痺の主な原因部位は疑核で、咽喉頭の運動障害を引き起こす。嚥下障害の重症度と喉頭感覚との間に相関は認めなかった。従って、孤束核のみの障害では嚥下障害は生じず、孤束核と疑核の両方が障害されて嚥下障害と喉頭感覚低下を認めることとなる。この場合、病変は、比較的広範囲で、延髄背側の中部位であることが多い。

高田　英明　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1781 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）生命情報学専攻
学位論文題目	／	The current shortage and future surplus of doctors: a projection of the future growth of the Japanese medical workforce（現在の医師不足および将来の医師過剰：日本の医療労働力の将来予測） Human Resources for Health　第 9 巻第 14 号掲載　平成 23 年 5 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　高瀬　浩造　　副査：教授　河原　和夫　　副査：教授　伏見　清秀

論文要旨

＜要旨＞

医療費の抑制を目的として、１９８０年代後半より、日本政府は、医学部定員を削減する政策をとってきた。しかし、近年になって、社会問題化している深刻な医師不足が発生してきた。この問題を解決するため、政府は、２００７年より医学部定員の増員に踏み切った。さらに、２００９年の総選挙で政権与党となった民主党は、日本の医師数を、人口１０００人あたり３．０人以上まで増員させるため、医学部定員を２００７年の１．５倍まで増やすと公約した。しかし、この急激な医学部定員の増員は、日本の人口減少と相まって、将来、深刻な医師過剰を生み出す可能性がある。

本研究では、日本の医師数に関するモデルを作り、シミュレーションによって、２００８年から２０５０年までにわたる将来の日本の医師数を推定し、提案されている医学部定員増員が、医師過剰を引き起こすかどうかを検証した。

シミュレーションの結果、仮に、民主党が提案している追加の医学部定員増がなされなかったとしても、２００８年に１０００人当たり２．２５人であった医師数は、２０２４年には、３．０人に達し、２０３５年には３．７人、２０５０年には４．７人に達することが予想された。また、追加の医学部定員増がなされた場合、２０２５年には、３．３人、２０３５年には４．２人、２０５０年には５．７人に達することが予想された。

＜緒言＞

医療費の抑制を目的として、１９８０年代後半より、日本政府は、医学部定員を削減する政策をとってきた。１９８６年から２００６年の間に、医学部定員は７．８％削減された。この政策の結果として、近年、社会問題化している深刻な医師不足が発生した。

日本の人口あたりの医師数は、英、米など他の先進国と比較して、遥かに少ないものとなり、WHO の加盟国１９３カ国のうち５９位、OECD 加盟国中では、メキシコ、韓国、トルコなどと並び、最低水準となっている。その一方で、日本での医療需要は他国と比べても大きく、人口あたり受診回数は OECD 加盟国中最も大きい。

この医師不足の問題を解決するため、日本政府は、２００７年より、医学部定員増を行い、さらに、この増員した定員を当面の間維持すると発表した。しかし、その後、２００９年の総選挙で政権与党となった民主党は、さらに定員を５０％増員し、医師数を OECD 諸国の平均である人口１０００人あたり、３．０人まで引き上げることを約束した。

一方、日本の出生数は急激な低下を続けており、それに伴い、人口も減少傾向となっている。そのため、この急激な医学部定員増員は、将来、特にベビーブーマーの大部分がこの世をさった後、深刻な医師過剰を生み出す可能性もある。しかし、この医学部定員についての議論の中で、医師数の長期予測については、あまり検討されていない。

我々の仮説は、さらに追加の医学部定員増を行うと、将来、医師過剰を引き起こすのではないかというものである。この研究の目的は、将来の医師数を予測し、追加の医学部定員増を行うことが医師過剰を引き起こすかどうかを調べることである。我々は、簡単なモデルを作り、シミュレーションすることで、以下の２つのシナリオでの将来の医師数を予測することとした。

シナリオ１：現在の医学部定員（８８４８人）を維持する。

シナリオ２：２０１３年以降、医学部定員を１．５倍に増員する。

＜方法＞

医師数の変動要因をシミュレーションするため、政府や公的機関から公開されているデータを元にモデルを作成した。

１，２００８年をモデルのベースラインとし、同年の医師数を、医師調査に基づき決定した。

２，２０００年から２００９年の医師国家試験合格率の平均値を求め、それをモデル中の合格率として採用した。

３，医師国家試験受験者数を、６年前の医学部定員数と一致するものと仮定した。

４，医学部卒業生の男女比について、２０００～２００９年の平均値を求め、それを、採用した。

５，毎年の医師の死亡数は完全生命表に従うものとした。
６，２－５のステップを１年毎に繰り返した。
７，人口は、国立社会保障・人口問題研究所の推定に従うものとした。
以上の方法で、以下、２種類のシナリオについて、シミュレーションを行った。
シナリオ１：現在の医学部定員（８８４８人）を維持する。
シナリオ２：２０１３年以降、医学部定員を１．５倍に増員する。

＜結果＞
シナリオ１：現在の医学部定員（８８４８人）を維持する。
２００８年、２８．６万人（人口１０００あたり２．２５）であった日本の医師は、２０２４年には、人口１０００当たり３人を超え、３６．５万（３．０５）となると予想される。
その後、医師の増加率は落ちるものの、人口減少に伴い、人口あたり医師数はさらに増加する。その結果、２０３５年には４１．１万（３．７１）２０５０年には４４．６万（４．６９）となる。
シナリオ２：２０１３年以降、医学部定員を１．５倍に増員する。
医師数は、医学部定員が増員されない場合より２年早く、２０２２年には１０００人当たり３．０人を超え、３６．８万（３．０３）となると予想される。
２０２２年以降も医師数は伸び続け、また、２０３５年には４６．４万（４．２０）、２０５０年には５４．５万（５．７３）となる。

＜考察＞
適正な医師数の確保という問題に関して、日本政府はジレンマに直面している。たとえ、医学部定員を増やしたとしても、現在の深刻な医師不足は短期的には解消できない。一方、たとえ、医学部定員を増やさなかったとしても、日本の急激な人口減少は長期的には深刻な医師過剰を引き起こす。
また、さらなる急激な医学部定員増は、医学部入学者の深刻な学力低下を招く可能性もある。現在、医学部入学には、高校卒業時点での相当の高学力が必要となることが多い。しかし、今後、急速に出生数が低下していくことを考えると、医学部入学に必要な学力は、急速に低下していく可能性がある。こうした、医学部入学者の質の低下は医師や医療の質の低下を招く可能性もある。また、さらに、医学部定員の増員は、理工学へ進学する学生の人数や質の低下を招く可能性もある。
いくつかの国では、ナースプラクティショナーなど、医師以外の職種を活用することで医師の不足を補っている。これらの職種は、医師の仕事の一部を代替することができる。しかし、日本には、この種の職種は現時点では存在しない。また、今後、この種の職種を導入することも、政治的に困難なのではないかとも思われる。
海外からの医療従事者の流入なしに、このジレンマを解決することは困難なのではないかと思われる。一般に、一国の中で、ある専門家が不足、もしくは過剰となった場合、国際的な専門家の移動が発生する。専門家の不足が発生した場合、海外からの流入が起こり、専門家の余剰が発生した場合、海外への流出が発生する。これらの移動は、政府による政策よりも、各々の専門家自身が、より良い雇用を求める結果として発生する。
医療従事者の不足に直面した場合、多くの先進国が他国からの医療従事者の募集によって解決している。１９９０年代、英国は、医療従事者の不足に陥ったが、その際、NHS は、多数の医師や看護師を海外、特にサハラ以南のアフリカから募集することで不足を補った。この時の英国への医療専門家の移動は非常に大きかったため、一部の途上国に医療従事者の不足が発生した。これにたいする批判に応えて、コモンウェルスは医療従事者の海外からの募集に関するガイドラインを策定した。
しかし、日本では、他国で取得された医療関連の免許をほとんど認めておらず、また、海外の医学部卒業生が日本の医師免許を取得することを厳しく制限しているため、海外からの医療従事者の募集は非常に困難である。
我々は、将来の医師過剰を深刻化するという副作用を伴わない医師不足解決策として、これらの規制を緩和することを提案したい。

＜結論＞
医学部定員をさらに増員することは、短期的には、医師不足を解決するには不足であり、一方、長期的には、医師過剰をさらに深刻化すると考えられる。

鳥羽　三佳代 博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1783 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）生殖機能協関学専攻
学位論文題目	／	Diagnostic possibility of diffusion tensor imaging for the evaluation of myometrial Invasion in endometrial cancer: an ex vivo study（子宮体癌筋層浸潤評価における拡散テンソル画像の有用性について　摘出子宮における検討） Journal of Magnetic Resonance Imaging　第 34 巻第 3 号　616 頁～ 622 頁掲載　平成 23 年 6 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　渋谷　均　　副査：教授　北川　昌伸　　副査：教授　秋田　恵一

論文要旨

＜要旨＞

子宮体癌筋層浸潤の治療前評価は、その治療方法の選択において極めて重要である。水分子拡散異方性を画像化することができる MRI 拡散テンソル画像（DTI）の、子宮体癌筋層浸潤評価における有用性を明らかにすることを目的とした。子宮体癌の診断で摘出された子宮（n = 12）を 10% ホルマリンで 15 時間固定後、4.7T 動物実験用 MRI を用いて DTI を撮像し拡散異方性の指標である fractional anisotropy (FA) map を作成、同じスライスの病理組織標本と比較検討した。病理組織学的に癌の子宮筋層浸潤が認められた症例では、腫瘍と子宮筋層との境界に FA 値の高い領域が描出され（anisotropic zone）、浸潤部位と一致して anisotropic zone の断裂または消失が認められた。一方、筋層浸潤のない症例では anisotropic zone は描出されなかった。DTI による FA map を用いることで、子宮体癌の筋層浸潤をより正確に診断できる可能性が示唆された。

＜緒言＞

若年発症の子宮体癌は日本においても増加傾向にあり、子宮を摘出しない妊孕性温存療法を希望する症例が増えている。しかし妊孕性温存療法が許容されるのは、腫瘍が子宮内膜に限局している高分化腺癌のみであることから、治療開始前に腫瘍の筋層浸潤の有無を正確に鑑別診断することがきわめて重要となる。現在、子宮体癌筋層浸潤の評価には MRI T2 強調画像、造影 T1 強調画像、拡散強調画像が用いられているが、正診率は必ずしも満足できるものではなく、さらなる精度の向上が望まれている。MRI 拡散テンソル画像（diffusion tensor imaging, DTI）は水分子拡散をテンソルとして測定する手法で、そこから導かれるスカラー量の 1 つである fractional anisotropy (FA) を用いて作成された FA map は拡散の異方性を強調した画像となる。生体内において線維成分の豊富な組織では水分子拡散が強い異方性を示すことが知られており、脳神経領域では白質の描出などに DTI が用いられている。子宮は主に平滑筋線維で構成されていることから子宮筋層内の水分子も強い拡散異方性を示すことが予想される。さらに、癌の筋層浸潤は平滑筋線維の断裂を伴うため、DTI を用いて拡散異方性を評価することで、より正確に筋層浸潤の有無を診断できる可能性がある。そこで本研究では摘出子宮を用い、子宮体癌筋層浸潤診断における DTI の有用性を検討した。

＜方法＞

本研究は倫理委員会の承認を得て行った。対象は当院で手術を受けた子宮体癌症例のうち同意が得られた 12 例である。手術により摘出された子宮を 10％ホルマリンで 15 時間固定後、4.7T 動物実験用 MRI (Unity Inova; Varian, Palo Alto, CA) にて conventional multi-slice spine-echo imaging sequence を用い、互いに直交する 6 軸に motion probing gradient (b factor = 0, 1000 s/mm2) を印加して拡散強調画像を撮影し、得られた画像から FA map を作成した（MATLAB, The Math Works Inc. Natick, MA）。撮影した DTI のスライスとほぼ同じスライスの病理組織標本を作成し、FA map と病理組織所見を比較検討した。

＜結果＞

病理組織学的に癌が子宮内膜に限局するものを stage E、筋層 1/2 以下の浸潤を認めるものを stage S、筋層 1/2 以上の浸潤を認めるものを stage D とした（stage E: n=4, stage S: n=5, stage D: n=3）。筋層浸潤のある stage S, stage D では、腫瘍と接する子宮筋層の FA は 0.34 ± 0.02 であったのに対し、それより深層の FA は 0.26 ± 0.03 と有意差を認めた（n=8, $p < 0.001$）。すなわち腫瘍と正常筋層の境界に沿って FA 値の高い領域が描出され、我々はこれを anisotropic zone と名付けた。さらに病理組織学的に筋層浸潤部位を認めた部位は anisotropic zone が断裂もしくは消失していることが判明した。一方筋層浸潤のない stage E では anisotropic zone は存在しなかった。anisotropic zone は、病理組織学的に子

前 目次へ 次

宮平滑筋線維が他の部位と比較して密になって走行している領域と一致していた。

＜考察＞
本研究は DTI が子宮体癌筋層浸潤評価に有用かどうかを検討した初めての報告である。摘出子宮を用いた preliminary study であるが、筋層浸潤を有する子宮体癌では腫瘍と正常子宮筋層の境界に FA が高値を示す anisotropic zone を認め、かつこれが浸潤部位において断裂もしくは消失していること、一方癌が子宮内膜に限局し筋層浸潤していない場合は、anisotropic zone 自体が存在しないことが明らかになった。また anisotropic zone は病理組織学的に平滑筋細胞が密に存在している部位に相当していることも判明した。腫瘍の筋層浸潤が起こる前には、腫瘍から分泌される platelet derived growth factor (PDGF) などにより近接する組織の間質細胞が活性化されることが知られており、腫瘍浸潤直前の間質細細胞（平滑筋線維細胞など）の活性・集蔟が画像化されたものが anisotropic zone であるのではないかと推測された。
本研究における DTI はホルマリン固定後の摘出子宮で施行されているが、生体内での異方性はこの状態でも維持されることがラットの脳組織やヒトの前立腺組織で報告されている。一方、本研究の限界として、対象症例数が少ないこと、子宮サイズの個体差が大きいため画像ごとに解像度に差があることが上げられる。また様々なアーティファクトによる影響を除外する目的で撮像法に conventional spine-echo sequence を用いているため、撮像に要する時間が長く、臨床に応用するためにはこの点を克服する必要がある。

＜結論＞
DTI を用いることで、子宮体癌の筋層浸潤をより正確に診断できる可能性が示唆された。

野村　尚弘　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1784 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）腎臓内科学専攻
学位論文題目	／	Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse（R8L barttin ノックインマウスの作成と機能解析） American Journal Physiology Renal Physiology　第 301 巻第 2 号 F297 頁～ F307 頁掲載　平成 23 年 8 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　畑　裕　　副査：教授　仁科　博史　　副査：教授　田邊　勉

論文要旨

＜要旨＞

Barttin は BSND 遺伝子によってコードされており、これは 4 つある Bartter 症候群の原因遺伝子のひとつである。Barttin は ClC-K クロライドチャネルと共発現することで、ClC-K を細胞形質膜へ誘導し、クロライドの透過性を著しく亢進する。われわれは Batter 症候群をおこす変異である R8L barttin を安定発現させた MDCK 細胞を用いて、R8L 変異 barttin が ER 内に留まり細胞形質膜へ移動できないことを示した。一方で、R8L barttin を一過性に発現させた培養細胞内では、変異 barttin はその細胞内局在を変えることなく、クロライドチャネル機能が損なわれているという報告もある。今回の実験において、生体内での病態を解明するべく、Batter 症候群のモデルマウスである R8L barttin ノックインマウスを作製した。このマウスは食塩制限を行うと、低カリウム血症、代謝性アルカローシス、塩・水分喪失といった Batter 症候群の症状を示した。免疫蛍光染色、免疫電子顕微鏡において、R8L barttin と ClC-K チャネルの細胞形質膜上の発現の著しい低下が認められた。また、Henle の細い上行脚において経上皮クロライド拡散電位の低下を認めた。Henle の細い上行脚において、経上皮クロライド輸送はすべて ClC-K1/barttin に依存していることが知られており、このセグメントの経上皮クロライド電位の低下が、形質膜上の barttin の発現低下とよく相関していることから、R8L 変異 barttin による Batter 症候群の主因は変異 barttin の細胞内局在の異常であることが示唆された。

＜緒言＞

Bartter 症候群は多尿、低カリウム血症、代謝性アルカローシスを特徴とする遺伝性尿細管疾患である。Bartter 症候群は原因遺伝子によって分類されており、barttin タンパクをコードする BSND 遺伝子は IV 型 Bartter 症候群の原因遺伝子である。barttin は ClC-K クロライドチャネルと結合する β サブユニットである。ClC-K チャネルには高い相同性を持つ ClC-K1 と ClC-K2（ヒトでは ClC-Ka, ClC-Kb）があり、ClC-K1 は細いヘンレのループの管腔膜と基底膜上に発現し、ClC-K2 は太いヘンレの上行脚から集合管の介在細胞までの範囲の基底膜上に存在している。腎臓における barttin の局在は ClC-K1 と ClC-K2 の両範囲にわたっている。初め、barttin は ClC-K と結合し細胞膜へ誘導すると報告された。われわれも IV 型 Bartter 症候群を起こす変異の一つである R8L 変異 barttin を Madin-Darby Canine Kidney（MDCK）細胞に安定発現させ、R8L barttin が小胞体 (ER) 内に留まり、ClC-K を細胞膜へ輸送できないことを報告した。一方、変異 barttin は ClC-K チャネルの細胞内輸送だけではなく、チャネル自体の活性制御に関わるという報告もある。今回、in vivo において IV 型 Bartter 症候群の病態を明らかにするために、BsndR8L/R8L knockin マウスを作製した。

＜方法＞

R8L ノックインマウスの作成

Targetting vecter を作製した後、ES 細胞へ打ち込み、得られた ES 細胞をマウス胚へ入れキメラマウスを作製した。

RT-PCR

マウスの腎臓より得られた RNA を逆転写し cDNA とした。この cDNA を用いて SYBR Green 法にて barttin の定量 PCR を行った。

腎組織

蛍光顕微鏡、免疫蛍光染色、免疫電子顕微鏡用にマウスの腎臓をそれぞれ、ホルマリン、過ヨウ素酸リジン＋ PFA、4%PFA で固定を行った。免疫蛍光染色は、凍結切片を抗体にて染色し、コンフォーカル顕微鏡 (LSM510) にて観察した。

血液、尿検査、血圧測定

採血はマウスの眼窩よりおこなった。尿検体は代謝ケージを用いて蓄尿、もしくは膀胱マッサージによって採取した。血圧は tail cuff 法にて測定した。

In vitro 尿細管微小潅流

マウス腎臓より顕微鏡下に尿細管（細い Henle のループ、皮質太い Henle の上行脚）を単離し、ガラスピペットをカニュレーションし、クロライド経上皮電位を測定した。

前 目次へ 次

利尿剤負荷試験
Furosemide (5mg/kg) もしくは hydrochlorothiazide (25mg/kg) を腹腔内投与し、30 分ごとに採尿し尿量、Na, Cl 排泄量を測定した。

＜結果＞
目的の変異と 2 つの loxP サイトに挟まれた Neomycin 耐性遺伝子を持った targeting vector を ES 細胞内で homologous recombination を起こさせることで目的の allele を作成した。目的とする遺伝子組み換えを起こした ES 細胞 clone をマウスの胚細胞に移植し、キメラマウスを作成した。キメラマウスは C57BL/6 マウスと交配させ、BsndNeo(R8L)/+ マウスを作成した。Neomycin 耐性遺伝子は、全身に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウス（CAG Cre マウス）と交配することで除去し、BsndR8L/+ マウスを作成した。各ヘテロマウスを交配し、最終的に BsndNeo(R8L)/Neo(R8L) マウスと BsndR8L/R8L マウスを得た。
Real time PCR 法および Western blotting 法にて、マウスの腎臓における barttin の mRNA, とタンパクの発現量を調べたところ、BsndNeo(R8L)/Neo(R8L) マウスでは mRNA, タンパクともに著しい barttin の発現低下がみられた。BsndR8L/R8L マウスでは mRNA の発現低下は見られず、タンパク量はわずかに低下していた。BsndNeo(R8L)/Neo(R8L) マウスは著しい多尿（尿量 325 vs. 62 ml/g wt/day)、低カリウム血症（3.7 vs. 4.5 meq/l)、代謝性アルカローシス (HCO3- 29.5 vs. 21.1 meq/l) を呈した。一方、BsndR8L/R8L マウスは通常食で飼育した場合、野生型と比較して尿・血液データに異常は認められなかった。食塩制限をおこなったところ、軽度の多尿 (49 vs. 36 ml/g wt/day)、低カリウム血症 (4.4 vs. 4.8 mEq/l)、代謝性アルカローシス (26.3 vs. 22.6 mEq/l) を呈し、軽度の血圧低下（98 vs. 106 mmHg) も認めた。
次に、western blotting にて腎臓内のナトリウム、クロライド輸送体の発現を調べた。ClC-K チャネルの発現は、BsndNeo(R8L)/Neo(R8L) マウスで著しく低下しており、BsndR8L/R8L マウスではわずかに低下していた。塩分制限食摂取下において、BsndR8L/R8L マウスの NCC（Na-Cl 共輸送体)、ENaC（上皮性ナトリウムチャネル)、Pendrin（Cl-HCO3- 交換輸送体）の発現亢進が認められた。これらの輸送体は遠位尿細管、集合管においてナトリウムおよびクロライドの再吸収に関与しており、これらの輸送体の発現の亢進は尿細管における NaCl の喪失を代償していると考えられた。
免疫蛍光染色では、野生型マウスにおいて barttin は太いヘンレのループの上行脚、遠位尿細管、接合部尿細管、集合管の介在細胞の基底膜側に染まるが、BsndR8L/R8L マウスの腎臓では、尿細管の各セグメントにおいて基底膜側の barttin の発現の低下が認められた。さらに、barttin の局在を免疫電子顕微鏡で確認した。野生型では barttin を示す金粒子はほぼ基底膜側にのみ存在するのに対して、BsndR8L/R8L マウスでは金粒子は基底膜側だけではなく細胞質内にも散在していた。基底膜上の金粒子の数は、BsndR8L/R8L マウスでは野生型に比べて約半分に低下していた。ClC-K チャネルに対する抗体は感度が十分ではなく、集合管の介在細胞の免疫蛍光染色でのみ局在が確認できた。BsndR8L/R8L マウスにおける ClC-K の局在は barttin と同様に基底膜での発現が低下していた。
マウスの細いヘンレのループと太いヘンレのループ上行脚を単離して、尿細管の両端にガラスピペットを挿入し、尿細管内を灌流し、尿細管の内外の電位差を測定することでクロライドイオンの輸送能の評価を行った。細いヘンレのループにおいては、クロライドイオンの輸送はほぼすべて ClC-K1 に依存しており、尿細管外のクロライドイオン濃度を低下させたときのクロライド拡散電位とクロライドチャネル阻害剤である NPPB [5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate] を投与した時の拡散電位の変化量が ClC-K1 の機能評価に使用される。BsndR8L/R8L マウスでは、拡散電位と NPPB 感受性拡散電位のいずも野生型と比較し約 50% の低下を認めた。一方、太いヘンレのループの上行脚のクロライド輸送能は NPPB 投与時の経上皮電位の変化にて評価されるが、経上皮電位は ClC-K2 以外のクロライド輸送体の関与もあり、ClC-K2 の機能のみを反映するものではない。BsndR8L/R8L マウスの太いヘンレのループ上行脚における経上皮電位は定常状態および、NPPB 投与時いずれも野生型と比較し有意差は認められなかった。
遠位尿細管の灌流実験は技術的に難しいため、遠位尿細管の機能は Thiazide 利尿薬に対する反応性を調べることで評価することとした。また、Furosemide に対する反応を調べることで太いヘンレのループ上行脚の機能の評価も行った。Furosemide は TAL に存在する NKCC2（Na-K-2Cl 共輸送体）の阻害剤であり、Thiazide は DCT に存在する NCC の阻害剤である。まず、排尿を促すため 70 μ l/g wt の生理食塩水を腹腔内に投与し、その 1 時間後に利尿剤を投与した。BsndR8L/R8L マウスは、thiazide 投与後の Na 排泄量、Cl 排泄量、尿量いずれも野生型と比較し低下していた。一方、furosemide に対する反応は野生型と比較し有意差を認めなかった。この結果から、TAL の機能低下は認められず、DCT の機能は低下していることが明らかとなった。

＜考察＞
細いヘンレのループでは、クロライド拡散電位はほぼすべて ClC-K/barttin に寄与しており、拡散電位の低下が barttin の基底膜上の発現量の低下とほぼ等しいことから、BsndR8L/R8L マウスの機能障害は、R8L 変異 barttin が膜表面に移動できないことが病態の本質であると考えられた。TAL においても R8L 変異 barttin の基底膜の発現低下が認められているにもかかわらず、尿細管微小灌流法と furosemide 負荷試験共に機能障害が指摘されなかった原因としては、他のクロライド輸送体による代償が推測される。しかし、今のところその評価はできていない。

高山　聡　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1785 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）統合呼吸器病学専攻
学位論文題目	／	学位論文題目：Synthetic double-stranded RNA enhances airway inflammation and remodelling in a rat model of asthma（ラット喘息モデルにおいて合成二重鎖 RNA は気道炎症と気道リモデリングを増悪させる） Immunology　第 134 巻第 2 号　140 頁～ 150 頁掲載　平成 23 年 10 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　烏山　一　　副査：教授　横関　博雄　　副査：教授　三宅　修司

論文要旨

＜要旨＞

感染を契機とした喘息の悪化は臨床上しばしば経験されるが、その機序には不明な点が多い。RNA ウィルスの複製の際に産生され、ウィルス感染による喘息の増悪因子の一つと考えられている double-stranded RNA (dsRNA) がラット喘息モデルに与える影響を検討した。ovalbumin (OVA) 感作、反復吸入チャレンジにより作製したラット喘息モデルに合成 dsRNA である poly I:C を投与した。気道炎症とリモデリングを気管支肺胞洗浄液や組織所見で検討し、リアルタイム RT-PCR 法で肺組織中のサイトカイン、ケモカインの発現を検討した。poly I:C 投与により気管支肺胞洗浄液の総細胞数と好中球数は有意に増加し、気道周囲に著明な炎症細胞浸潤を認めた。また poly I:C 投与により杯細胞の過形成 , 気道平滑筋の肥厚、気道上皮および平滑筋細胞の分裂が有意に増強し、IL-12p35, IL-17, TGF-b1 の発現が有意に増強した。以上より poly I:C 投与により気道炎症、リモデリングの悪化が見られ、その機序において IL-12, IL-17, TGF-b1 が関与している可能性が示唆された。

＜緒言＞

喘息は気道過敏性の亢進、可逆的な気道狭窄を特徴とする慢性気道炎症疾患である。気道炎症に加えて、気道リモデリングと呼ばれる構造的な変化も認め、慢性炎症の結果生じると考えられている。もうひとつの喘息の特徴は喘息発作と呼ばれる急性増悪である。上気道へのウィルス感染が喘息発作と関係していることは疫学的に示されているが、その機序は不明な点が多く、またウィルス感染による喘息発作と気道リモデリングとの関連性についても詳細はわかっていない。

ウィルス感染による喘息発作において最も頻繁に分離されるのはライノウィルス、パラインフルエンザウィルス、RS ウィルスといった RNA ウィルスである。RNA ウィルスはウィルス複製の際に double-stranded RNA (dsRNA) を合成する。dsRNA は Toll-like receptor 3 (TLR3), melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA-5) などのレセプターを介して自然免疫を賦活する。その結果、dsRNA は炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を促進するため、ウィルス感染による喘息発作の増悪因子のひとつとして考えられている。

これまで dsRNA によりサイトカイン、ケモカインの産生が促進されることが多数報告されている。たとえば、マウスの静脈内への dsRNA 投与により type I IFN, IFNg, IL-12 の産生が増加することが報告されている。気道上皮細胞においても dsRNA により様々なサイトカイン、ケモカインが産生されることが報告されている。マウスやラットの喘息モデルでは dsRNA 投与により気道炎症が惹起され、気道抵抗が高まることが報告されているが、気道リモデリングに与える影響については報告されていない。

Brown Norway ラットでは抗原チャレンジを反復すると、気道平滑筋の肥厚、杯細胞の過形成といった喘息と一致した気道リモデリングを呈する。また、このモデルでは実際の気道感染のように気管内へ複数回 dsRNA を投与することが可能である。本研究の目的は、このモデルに合成 dsRNA である polyinosine-polycytidylic acid (poly I:C) を複数回投与し気道炎症およびリモデリングへの影響を検討することである。

＜方法＞

実験には 8 から 12 週齢の Brown Norway ラットを用いた。ovalbumin (OVA) 感作は day1 にアラムに吸着させた OVA を皮下注射した。day 8, 15, 20, 25 にラットを麻酔した後、気管内挿管し、挿管チューブより poly I:C または phosphate buffered saline (PBS) を投与した。day 15, 20, 25 では薬剤投与 30 分後に OVA または PBS をネブライザーで吸入させ吸入チャレンジを行った。最後の吸入チャレンジの 48 時間後にラットを安楽死させ、気管支肺胞洗浄を行った後、左肺は組織学的な検討に用い、右肺は RNA 抽出に用いた。

気管支肺胞洗浄液は総細胞数を数え、サイトスピンスライドを作製し白血球分画を求めた。

前　目次へ　次

左肺はホルマリン固定後にパラフィン包埋し薄切した後、以下の染色を行った。気道炎症の検討には hematoxylin and eosin(HE) 染色、杯細胞検討のために periodic acid-Schiff (PAS) 染色、気道平滑筋肥厚の検討には a-smooth muscle actin (a-SMA) の免疫染色、気道上皮および平滑筋細胞の分裂の評価には proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫染色を行った。定量化は PAS 陽性細胞数、a-SMA 陽性面積、PCNA 陽性細胞数をカウントし、基底膜長で補正し求めた。
右肺はホモジネートし RNA の抽出を行った。逆転写により cDNA を合成した後にリアルタイム RT-PCR 法で mRNA の発現を検討した。
結果は Kruskal-Wallis 検定を用いて評価した。有意差が認められた場合には Steel-Dwass 検定を用いて群間比較を行い、p 値が 0.05 未満を統計的に有意と判定した。

＜結果＞
poly I:C 投与により気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数は有意に増加した。
HE 染色では poly I:C 投与群では気道周囲に著明な炎症細胞浸潤を認めた。以上より poly I:C 投与により気道炎症の増悪が惹起されることが示された。
PAS 染色では poly I:C 投与群では著明な杯細胞の過形成を認めた。PAS 陽性細胞数を定量化すると PAS 陽性細胞は poly I:C 投与により有意に増加していた。
α -SMA の免疫染色では、poly I:C 投与群では著明な気道平滑筋の肥厚を認めた。α -SMA 陽性面積を定量化すると α -SMA 陽性面積は poly I:C 投与により有意に増加していた。
PCNA の免疫染色では、poly I:C 投与群では著明な PCNA 陽性気道上皮細胞および平滑筋細胞を認めた。PCNA 陽性細胞数を定量化すると PCNA 陽性気道上皮細胞および平滑筋細胞は poly I:C 投与により有意に増加していた。
以上より poly I:C 投与により喘息モデルの気道リモデリングが増悪することが示された。
リアルタイム RT-PCR 法を用いた肺組織における mRNA の発現検討では、poly I:C 投与により IL-12p35, IL-17, TGF-β 1 の発現が有意に増加しており、気道炎症およびリモデリングの増悪への関与が示唆された。

＜考察＞
今回我々は、TLR3 や MDA-5 のリガンドである polyI:C の気管内投与によりラット喘息モデルにおいて、好中球を主体とする気道炎症の増悪、気道リモデリングの増悪、IL-12, IL-17, TGF-b1 などのサイトカインの発現が惹起されることを示した。我々の結果は dsRNA が慢性喘息の病態へ影響していることを示唆する。過去の報告では dsRNA が気道炎症や気道過敏性に関与することが示されていたが、我々の結果から dsRNA は気道炎症のみではなく、気道リモデリングにも関与することが示された。
今回、dsRNA は杯細胞の過形成、気道平滑筋の肥厚、気道上皮細胞および平滑筋細胞の分裂などの気道リモデリングを増悪させることが示された。また、組織のリモデリングにおいて重要な役割を果たすと考えられている TGF-b1 の発現が dsRNA により増強することも示された。これらの結果から、ウィルス感染による喘息発作は dsRNA のレセプターや TGF-b1 を介して、気道リモデリングの増悪につながっていくことが考えられた。過去の報告では、線維芽細胞において dsRNA による TLR3 の活性化により、TGF-b1 の産生が増加し、その結果として a-SMA や細胞外マトリックスの産生が増強されることが示されており、今回の我々の結果と一致するものと考えられた。
もうひとつの我々の結果の特徴は、dsRNA 投与により IL-12, IL-17 の発現増強がみられたことである。近年、難治性喘息において Th1, Th17 の関与が示唆されている。特に Th17 は好中球性炎症を主体とする難治性喘息との関与が示されており、我々の結果でも dsRNA により好中球性炎症が惹起され、IL-17 の発現が増加していること、気道リモデリングの悪化がみられたことなどから、dsRNA により難治性喘息に近い病態が惹起されたと考えられた。

＜結論＞
dsRNA はラット喘息モデルにおいて、気道炎症、リモデリングを増悪させた。我々の結果はウィルス感染による喘息発作の機序のひとつを説明するとともに、気道リモデリングへ影響することも示唆する。dsRNA とそのレセプターはウィルス感染による喘息発作や気道リモデリングにおいて治療ターゲットになる可能性が示された。

多田　愛　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1786 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）心療・緩和医療学専攻
学位論文題目	／	Characteristics of neuropsychological functions in inpatients with poorly-controlled type 2 diabetes mellitus（血糖コントロール不良の入院中２型糖尿病患者の神経心理学的機能の特徴） Journal of Diabetes Investigation 掲載　平成 23 年 10 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　下門　顕太郎　　副査：教授　西川　徹　　副査：教授　松浦　雅人

論文要旨

＜要旨＞
２型糖尿病における認知機能障害については先行研究において指摘されてきた。本研究では、入院中の血糖コントロール不良の２型糖尿病患者における神経心理学的機能を調べ、臨床要因との関連を検討した。年齢・性別・教育歴をマッチングさせた 42 名の 2 型糖尿病患者と 32 名の非糖尿病対照者に対して、注意、作動記憶、言語記憶、視空間記憶、構成機能、処理スピード、遂行機能の課題を実施した。身体機能、飲酒・喫煙歴、高血圧、脂質異常症、心疾患の既往に関しては、面接と診療録より抽出した。糖尿病患者群は、注意、処理スピード、言語記憶、作動記憶、遂行機能に関して軽度の認知機能障害を呈した。認知機能の低下は、検査が処理スピードに関わる場合、さらに言語刺激が構造化されておらず認知容量を必要とする場合に、明らかになった。年齢の因子は、糖尿病患者群において大半の認知機能低下と関連が見られ、特に対照群ではその関連がないのにもかかわらず糖尿病患者群で年齢と関連が見られたのは、注意と遂行機能であった。罹病期間は WAIS-R の逆唱課題との相関が認められた。糖尿病患者群において加齢と認知機能との関連が大きいことが示唆されたが、注意・遂行機能・作動記憶の低下はより糖尿病特有の認知機能障害との関連の可能性が示される。

＜緒言＞
わが国では、2 型糖尿病を主に、糖尿病患者の数は増加の一途をたどっている。平成 19 年の国民健康・栄養調査では、糖尿病が強く疑われる人が 890 万人、糖尿病の可能性が否定できない人が 320 万人となっている。糖尿病では、網膜症や腎臓への合併症に加え、特に 2 型糖尿病患者において、認知機能障害がみられることが指摘されている。ケースコントロール研究では、スクリーニング認知機能検査や言語記憶、処理スピードの低下が指摘されている一方、非言語性の記憶や遂行機能は研究間で結果は一致していない。その一因として、高血圧や高脂血症、飲酒・喫煙歴など認知機能に影響を及ぼす臨床因子が統制されていないことがあげられる。加齢も重要な影響因子として近年注目されており、こうした交絡因子を考慮したうえでの神経心理学的検査プロフィールを検討することが求められる。多くの先行研究は、血糖コントロールが比較的良好な臨床群を対象にしているため、本研究では、教育入院となった血糖コントロール不良群を対象とした。

＜方法＞
教育入院中の 2 型糖尿病患者 42 名と年齢、性別、教育歴をマッチングさせた非糖尿病対照者 32 名に対して、神経心理学的検査のバッテリーを施行し、臨床要因との比較を行った。臨床要因としては罹病歴、心疾患の既往、治療法、飲酒･喫煙歴、高血圧、高脂血症、ＢＭＩについて面接もしくは診療録から情報収集した。神経心理学的検査は、注意、作動記憶、言語記憶、視空間記憶、視覚的構成、処理スピード、遂行機能に関して検討した。

＜結果＞
2 型糖尿病患者群は罹病歴が 11.5 年、HbA1c が 9.5％と血糖コントロールは不良であった。糖尿病患者群の 69％に高血圧と高脂血症があり、対照群と比較し、ＢＭＩとベックのうつ尺度評価が有意に高かった。
神経心理学的検査に関しては、順唱、レイの言語性記憶検査の遅延再生・再認、視空間記憶、視空間構成を除くほとんどの検査で、糖尿病患者群で軽度の認知機能低下が認められた。
低下が認められた検査と臨床要因との間で重回帰分析を行ったところ、言語性の単語の記憶、作動記憶、遂行機能、処理スピードで年齢との相関が認められた。また､罹病歴と逆唱との間にも関連が認められた。一方､非糖尿病対照群では、言語性の単語の記憶、処理スピードと年齢の間に関係が認められた。高血圧、高脂血症、心疾患の有無による神経心理学的検査の成績の差は認められなかった。また、ＢＭＩと喫煙歴による検査結果の差も見られなかった。

前　目次へ　次

＜考察＞
血糖コントロール不良の糖尿病患者群は、非糖尿病対照群と比較して、広範囲な軽度の認知機能障害を示し、視空間記憶や視覚構成機能は保たれていた。この特徴は、血糖コントロールの比較的良好な糖尿病患者群で認められる傾向と一致している。
神経心理学的検査について詳細に検討すると、第一に時間内にスピードを求められる検査での低下が認められた。精神運動の遅延が中年期の糖尿病患者にすでに認められ、本質的認知機能障害であると報告している先行研究もあるが、本研究では血糖コントロールとの関連は見られなかった。処理スピードが他の認知機能低下より先行して現れてくるのかどうかについては、より大きなサンプルでの縦断的研究が必要であろう。
第二に、再認や単語の遅延再生は保たれている一方、文章の再生と言語性の学習に低下が認められた。また逆唱での低下も認められた。低下が認められた検査に共通するのは認知的容量が求められるということである。特に文章の記銘では一回の提示で情報を保持することが求められる。言語性の単語の記憶検査では、一回目の提示では低下を示したにもかかわらず、2～5回目では非糖尿病対照群と差が認められなかったことから、糖尿病で報告されてきている言語性記憶の低下は言語情報が増え複雑になったときに現れる注意の容量や作動記憶の問題と関連していることが推察される。
他の臨床要因と低下している神経心理学的検査との間には関連が認められなかった。先行研究では、高血圧の患者では、血圧に問題がない群に比較して認知機能が低下していたことが示唆されている。この先行研究では我々の群と比較し、平均年齢が約20歳上であった。また本研究の対象者の高血圧は多くが降圧剤で治療がされていた。降圧剤は神経心理学的機能に影響を及ぼすことが言われており、高血圧と認知機能の問題に関しては、年齢、降圧剤などの影響も統制して再検討する必要があると考えられる。

＜結論＞
糖尿病患者群は、処理スピード、言語記憶、作動記憶、遂行機能に関して軽度の認知機能障害を呈した。認知機能の低下は、検査が処理スピードに関わる場合、さらに言語刺激が構造化されておらず認知容量を必要とする場合に、明らかになった。糖尿病患者群において加齢と認知機能との関連が大きいことが示唆されたが、注意・遂行機能・作動記憶の低下はより糖尿病特有の認知機能障害との関連の可能性が示される。

山岸　浩史　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1790 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）免疫アレルギー学専攻
学位論文題目	／	Basophil-derived mouse mast cell protease 11 induces microvascular leakage and tissue edema in a mast cell-independent manner（好塩基球に発現するトリプターゼ mMCP-11 は肥満細胞非依存的に血管透過性を亢進させ、浮腫を引き起こす） Biochemical and Biophysical Research Communications　第 415 巻第 4 号　709 頁～713 頁掲載　平成 23 年 12 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　横関　博雄　　副査：教授　東　みゆき　　副査：教授　太田　伸生

論文要旨

＜要旨＞

Mouse mast cell protease 11 (mMCP-11) は最も新しく同定されたマウストリプターゼである。mMCP-11 以外のトリプターゼは肥満細胞に発現する一方で好塩基球に発現しないが、mMCP-11 は主に好塩基球に発現する。血中を循環する好塩基球は長らく肥満細胞と機能を同じくする細胞集団と考えられてきた。しかし近年、生体内において好塩基球は肥満細胞とは異なる役割を演じていることが明らかになってきた。我々は mMCP-11 の生体内での機能を明らかにするために、野生型 mMCP-11 とその酵素活性を欠失させた変異型のリコンビナントタンパクを作成した。野生型の mMCP-11 を皮下投与すると、用量依存的に微小血管の透過性亢進を伴う、浮腫性の皮膚腫脹が起こった。一方、変異型の mMCP-11 を皮下投与した場合には、微小血管の透過性亢進も皮膚腫脹も認められなかった。また、mMCP-11 を投与した皮膚においては、好中球や好酸球などの炎症細胞の明らかな浸潤を認めなかった。シクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメタシンをマウスに前投与しておくと、mMCP-11 の皮下投与による皮膚腫脹は起こらなかった。このことは mMCP-11 の皮下投与による微小血管の透過性亢進には主にプロスタグランジンが関与することを示唆する。興味深いことに、肥満細胞を欠損しているマウスにおいても mMCP-11 を皮下投与すると皮膚腫脹が起こった。このことは mMCP-11 皮下投与による皮膚腫脹には、肥満細胞は必要ないことを示す。以上の結果から、好塩基球に発現する mMCP-11 は肥満細胞非依存的に、プロスタグランジンを介して血管透過性を亢進させることが示唆された。これによって mMCP-11 は好塩基球によって引き起こされる炎症の成立に関与すると考えられる。

＜緒言＞

好塩基球は最も少ない白血球集団で、末梢血の白血球のうち 1 % を占めるに過ぎない。肥満細胞と共通する特徴を多くもつこともあり、好塩基球は免疫学においては長らく注意を払われることのない存在であった。しかし、近年マウスモデルを用いた研究により、アレルギー反応や寄生虫に対する防御、さらには免疫系の制御において好塩基球は肥満細胞と異なる役割を果たしていることが明らかになってきた。

トリプターゼとキマーゼは肥満細胞の分泌顆粒に含まれる主要なタンパク質であり、生理的、また病理的条件においてさまざまな活性をもつ。マウスにおいては、4 種のトリプターゼ（mMCP-6, mMCP-7, mMCP-11, mTMT）と、6 種のキマーゼ（mMCP-1, mMCP-2, mMCP-4, mMCP-5, mMCP-9, mMCP-10）が同定されている。mMCP-11 は最も新しく同定されたトリプターゼである。mMCP-6 および mMCP-7 は肥満細胞に発現し、好塩基球には発現しない。一方で、mMCP-11 は好塩基球に多く発現している。また、キマーゼのうちで好塩基球に発現するものはない。

トリプターゼの中では、mMCP-6 と mMCP-7 の生体内での機能はよく調べられている mMCP-7 を腹腔内に投与すると好酸球が浸潤する。一方、腹腔内に mMCP-6 を投与すると好中球が浸潤する。さらに、mMCP-6 を欠損したマウスは、野生型のマウスに比べて細菌や寄生虫に対する感染防御が弱い。一方で、自己免疫性の関節炎モデルにおいては、mMCP-6 を欠損させると炎症の程度が弱くなる。一方で、好塩基球に発現する mMCP-11 の生体内の機能は不明だった。mMCP-11 は in vitro ではトリプターゼ活性をもつことは示されており、アミノ酸配列の比較によれば他のトリプターゼとの相同性が最も低い。したがって、mMCP-11 は他のトリプターゼと異なる機能をもつと予想される。

本論文では、mMCP-11 は酵素活性依存的に皮膚の微小血管の透過性を亢進させ、肥満細胞非依存的に浮腫を引き起こすことを明らかにした。これにより、mMCP-11 は好塩基球が引き起こす炎症の成立に関与する可能性が示唆された。

＜方法＞

バキュロウイルス－昆虫細胞発現系を用いて、野生型の mMCP-11 および求核基としてはたらく活性中心のセリンをアラニンに置換した変異型 mMCP-11 のリコンビナントタンパクを作成した。

前 目次へ 次

生体内での mMCP-11 の機能を調べる目的で、野生型または変異型の mMCP-11 をマウスの右側の耳介の皮下に投与した。左側の耳介には PBS を投与し、右耳の厚さから左耳の厚さを引くことにより、皮下投与の操作による影響をコントロールした。皮膚の微小血管の透過性を評価するために、皮下に野生型または変異型の mMCP-11 を投与した 2 時間後に 0.5% Evans Blue を静注し、さらに 2 時間後にマウスの耳介中の血管外に漏出した色素を抽出・定量した。
肥満細胞が関与する可能性を調べる目的で、肥満細胞を欠損している C57BL/6-KitW-sh/W-sh マウスまたは野生型 C57BL/6 マウスの耳介に野生型 mMCP-11 を投与した。mMCP-11 の皮下投与による血管透過性の亢進に既知のメディエーターが関与している可能性を調べるために、ヒスタミンまたはブラジキニンの受容体のアンタゴニスト、あるいはプロスタグランジン産生を阻害するインドメタシンを前投与したマウスに野生型 mMCP-11 を皮下投与した。

＜結果＞
野生型の mMCP-11 10 μg をマウスの耳介の皮下に投与すると、4 時間後をピークとし、24 時間以内に消退する耳介腫脹が起こった。一方、変異型の mMCP-11 では耳介の腫脹は起こらなかった。腫脹している耳の組織を調べると、真皮において膠原線維が不整になり、間隔が拡がっていることが明らかになった。これは真皮浮腫を示唆する所見である。実際に野生型の mMCP-11 を投与した皮膚では微小血管の透過性が亢進していたが、変異型の mMCP-11 を投与した皮膚では微小血管の透過性の亢進を認めなかった。しかし、好中球や好酸球など炎症細胞の明らかな浸潤は認めなかった。
次に血管透過性を亢進させるメディエーターが関与する可能性を調べた。その結果、ヒスタミンまたはブラジキニンの受容体のアンタゴニストを前投与したマウスでは、対照マウスと同等の耳介腫脹や血管透過性の亢進が起こったが、インドメタシンを前投与したマウスでは耳介腫脹が抑制された。また、血管透過性の亢進も認めなかった。
次に、肥満細胞が関与する可能性を調べるために、肥満細胞欠損マウス（C57BL/6-KitW-sh/W-sh）の耳介に野生型 mMCP-11 を投与した。その結果、肥満細胞欠損マウスでも野生型マウスと同等の耳介腫脹や血管透過性の亢進が起こった。

＜考察＞
今回、好塩基球に発現するトリプターゼである mMCP-11 の生体内における機能を調べるために野生型および変異型の mMCP-11 を作成した。そして、mMCP-11 はプロスタグランジンを介して肥満細胞非依存的に血管透過性を亢進させ、浮腫を引き起こすことを明らかにした。
肥満細胞に発現するトリプターゼである mMCP-6 および mMCP-7 はそれぞれ好中球および好酸球の浸潤を誘導するが、好塩基球に発現するトリプターゼである mMCP-11 は明らかな炎症細胞の浸潤を引き起こさなかった。しかし、mMCP-11 は血管透過性を亢進させ、浮腫を引き起こした。このことは、肥満細胞に発現するトリプターゼと好塩基球に発現するトリプターゼとで、機能が異なることを示唆している。
さらに、mMCP-11 による血管透過性の亢進はプロスタグランジンを介することが明らかになった。肥満細胞は真皮に存在し、活性化するとプロスタグランジンを産生するので、肥満細胞が関与する可能性を調べた。しかし、肥満細胞欠損マウスでも野生型マウスと同等に血管透過性が亢進したので、肥満細胞の関与はないことが示唆された。
以上のことから、mMCP-11 は血管透過性を亢進させることによって、好塩基球が引き起こす炎症の成立に関与するものと考えられる。

＜結論＞
mMCP-11 はプロスタグランジンを介して肥満細胞非依存的に血管透過性を亢進させ、浮腫を引き起こす。

大井　克征　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1792 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）腎臓内科学専攻
学位論文題目	／	A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo（In vivo での腎臓 NKCC2 と NCC 共輸送体のリン酸化制御における WNK3 の役割は小さい） Biology Open　第 1 巻　120 頁～ 127 頁掲載　平成 24 年 2 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　古川　哲史　　副査：教授　下門　顯太郎　　副査：教授　澁谷　浩司

論文要旨

＜要旨＞

遺伝性高血圧疾患の一つである偽性低アルドステロン症Ⅱ型 (PHA Ⅱ) の原因遺伝子として WNK(With No Lysine (K)) キナーゼ 1 と WNK4 が同定された。これまでに当研究室では腎臓における WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナルカスケードの存在、及びこのシグナルカスケードの恒常的活性化により PHA Ⅱが引き起こされることを明らかにした。一方、WNK3 は強制発現系で Na+-K+-2Cl- 共輸送体 (NKCC2) と Na+-Cl- 共輸送体 (NCC) の活性を亢進させることから、腎臓での Na 再吸収と血圧調節に関して重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、これらの輸送体の制御に関して、生体における WNK3 の役割は明らかでなく、WNK3 ノックアウトマウスを作製し、その解析を行った。

ノックアウトマウスでは尿量や尿中への Na と K の排泄量に変化はなく、血圧も同程度であった。しかし、低塩分食下ではノックアウトマウスにおいて軽度の血圧低下を認めた。次に腎臓における各輸送体とキナーゼの発現をウェスタンブロッティング (WB) にて評価した。NKCC2、NCC、OSR1 と SPAK の発現量やリン酸化の程度は低下していなかったが、WNK1 と 4 の発現量が軽度増加しており、WNK3 のノックアウトは WNK1 と WNK4 により代償されると考えられた。これらの結果より WNK3 は腎臓において WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC2 シグナルカスケードに関与するものの、生理的条件下ではその働きは軽度であることが示唆された。

＜緒言＞

PHA Ⅱは腎臓での Na 再吸収亢進による高血圧症、高 K 血症と代謝性アシドーシスを特徴とする常染色体優性遺伝疾患である。2001 年に WNK1 と WNK4 の遺伝子変異により PHA Ⅱが発症することが報告されて以降、様々な報告がなされている。当研究室では PHA Ⅱの疾患モデルマウスである WNK4D561A/+ ノックインマウスを作製し、腎臓において OSR1 と SPAK という 2 つのキナーゼと NCC のリン酸化が亢進していることを発見した。さらに in vitro で WNK1 と WNK4 が OSR1 と SPAK をリン酸化し、さらに OSR1 と SPAK が NCC をリン酸化することを報告した。そして、これらの結果に基づいて腎臓には WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナルカスケードが存在し、体内の Na 調節及び血圧調節に重要であることを明らかにした。しかし、WNK family の 4 つのアイソフォームうち、どの WNK が腎臓で最も重要なのか、尿細管の部位毎に主要な WNK が異なるのか、あるいは複数の WNK が同じ細胞に存在して複合体として機能しているかなどは明らかでない。一方、WNK3 は腎臓に発現していることや強制発現系にて他の WNK と同様に NKCC2 と NCC を制御すると報告されているが、これまでに PHA Ⅱの患者で WNK3 の遺伝子異常は報告されておらず、生体での役割は未だに明らかでない。

本論文では生体における WNK3 の役割を明らかにするために、ノックアウトマウスを作製し、その解析を行った。その結果 WNK1 と WNK4 とともにシグナルカスケードを構成していると考えられたが、生理的条件下における腎臓での働きは軽度であることが示された。

＜方法＞

WNK3 は 22 個の exon から構成され、触媒ドメインは exon 2 から 6 に存在する。Cre – lox P 系を用いて exon 2 を除去する strategy をたて、targeting vector を作製した。Targeting vector を ES 細胞に transfection し、相同組換えを起こしたクローンを PCR とサザンブロッティングにて選別し、これを胚盤胞期の受精卵に注入した。キメラマウスと C57BL/6 マウスの交配にて誕生した flox マウスを CAG-Cre recombinase transgenic マウスと交配し、ノックアウトマウスを得た。WNK3 のノックアウトは RT-PCR と WB にて確認した。

次に腎臓での WNK3 の局在を解析した。免疫染色で評価困難だったため、Laser capture microdissection 法 (LCM) を用いて尿細管を部位毎に採取し、そこから RNA を抽出して RT － PCR にて各部位での発現を評価した。次に野生型とノックアウトの尿量と尿中 Na/K 排泄量の評価、血液検査、血圧測定を行った。血圧測定は tail-cuff 法を用いた。

前 目次へ 次

腎臓に存在する各種輸送体および OSR1、SPAK、WNK1 と WNK4 の発現量とリン酸化の程度を WB で評価した。

＜結果＞
RT-PCR と WB にて WNK3 がノックアウトされていることを確認した。しかし、腎臓では RT-PCR で WNK3 の発現を確認できたが、WB では検出感度以下であり、腎臓での発現量は微量である可能性が考えられた。LCM の結果、WNK3 は近位尿細管、ヘンレの太い上行脚、遠位曲尿細管、集合管のいずれにおいても発現していた。野生型とノックアウトでは尿量、尿中 Na/K 排泄量に有意差はなく、食事中の Na 量を変化させても違いを認めなかった。また、通常食では血液データや血圧に差を認めなかったが、低塩分食下ではノックアウトマウスの血圧は軽度低下していた。Na+-H+ 交換輸送体 (NHE3)、NKCC2、NCC と上皮型 Na チャネル (ENaC) の発現量に差はなく、NKCC2 と NCC の上流に存在する OSR1 と SPAK のリン酸化に関しても差を認めなかった。低塩分食下でも結果は同様であった。しかし、通常食下では WNK4 の発現量が、低塩分食下では WNK1 と WNK4 の両方の発現量が軽度増加していた。

＜考察＞
WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナルカスケードは、食事中の塩分量やアンジオテンシンⅡ、バソプレッシン、インスリンなどのホルモンにより制御を受けることが報告されている。このことはこのシグナルカスケードは単に PHA Ⅱの病態として重要なだけでなく、様々な生理的条件下での Na、K、そして血圧の調節に重要であることを示唆する。一方、NKCC2 も NCC 同様に OSR1 や SPAK の制御を受けることが報告されている。
これまでに WNK3 は NKCC2 と NCC の活性を亢進させること、それは OSR1 と SPAK のリン酸化を介した働きであることが強制発現系の実験で示されてきた。しかし、今回作製した WNK3 ノックアウトマウスは野生型と比べて、NKCC2 や NCC の発現量だけでなく、他の Na 輸送体の発現や OSR1 と SPAK のリン酸化に関しても差を認めず、尿量や尿中 Na 排泄量、血液データ、血圧においても差を認めなかった。この結果から腎臓における WNK3 の役割は小さく、WNK 全体のキナーゼ活性には大きな影響を与えない可能性、及び他の WNK が WNK3 のノックアウトを代償している可能性が考えられた。この点については、OSR1 と SPAK のリン酸化に差がないにもかかわらず、WNK1 と WNK4 の発現がノックアウトマウスで増加していたことから、WNK3 のノックアウトを WNK1 と WNK4 が代償していると考えられた。
一方、低塩分食下で血圧が軽度低下した原因であるが、ノックアウトマウスは Na 喪失傾向にないため、他のメカニズムが関与しているものと考えられる。NKCC2 や NCC と同様に、OSR1 と SPAK の下流に存在する NKCC1 は血管平滑筋のトーヌスを調節していること、NKCC1 ノックアウトマウスでは低塩分食下で血圧低下を認めることが報告されており、WNK3 のノックアウトにより NKCC1 の活性が低下したために血圧が低下した可能性が考えられる。これらについては今後の更なる検討が必要である。

＜結論＞
WNK3 ノックアウトマウスを作製し、腎臓に関する表現型の解析を行った。WNK3 は腎臓にユビキタスに存在するが、その発現量は小さく、生理的条件下では WNK3 の NKCC2 と NCC の調節に関する役割は軽度であることが示された。

古力巴哈　塔拉提　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1793 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）腎臓内科学専攻
学位論文題目	／	Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and in vivo mouse kidney（mpkDCT 細胞とマウス腎臓におけるアンギオテンシン II の WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化刺激伝達系に対する効果） Biochemical and Biophysical Research Communications　第 393 巻第 4 号　844 頁～848 頁掲載　平成 22 年 2 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　小川　佳宏　　副査：教授　畑　裕　　副査：教授　金井　正美

論文要旨

Abstract:

In our recent study using Wnk4D561A/+ knockin mice, we determined that the WNK-OSR1/SPAK-NaCl cotransporter (NCC) phosphorylation cascade is important for regulating NCC function in vivo. Phosphorylation of NCC was necessary for its plasma membrane localization. Previously, angiotensin II infusion was shown to increase apical membrane expression of NCC in rats. Therefore, we investigated whether angiotensin II was an upstream regulator for the WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade in cultured cells and in vivo kidney. In mpkDCT cells, the phosphorylation of OSR1 and NCC was increased 30 min after the addition of angiotensin II(10-9-10-7M)but returned to baseline after 18 h. In mice, a 5-min infusion of angiotensin II (5 ng/g/min) increased NCC phosphorylation in the kidney at 30 min and 2 h after the injection. but returned to baseline 24 h later. This increase was inhibited by angiotensin II receptor blocker (valsartan) but not by aldosterone receptor blocker (eplerenone). Ten-day infusions of angiotensin II (720 ng/day) also increased phosphorylation of OSR1 and NCC in the mouse kidney, and both valsartan and eplerenone inhibited the increased phosphorylation. Although angiotensin II is identified as an upstream regulator for the WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade in vivo, aldosterone appears to be the major regulator of this signal cascade in the long-term regulation by angiotensin II.

Introduction

The NaCl cotransporter (NCC) in the kidney is a thiazide-sensi-tive apical transporter in the distal tubules that is responsible for the reabsorption of 5–10% of filtered NaCl. Recently, a novel regulatory mechanism of NCC by the WNK-OSR1/SPAK kinase cascade was identified through an analysis of the molecular pathogenesis of hereditary hypertensive disease, pseudohypoaldosteronism type II (PHAII).

We generated an ideal mouse model of PHAII, the Wnk4D561A/+ knockin mouse , and we found that the levels of phosphorylated OSR1/SPAK and NCC in these mice were greatly increased and that the phosphorylated NCC was concentrated on the apical plasma membranes of distal tubules in the kidney.

In the present study, we found that AngII transiently increased the phosphorylation of NCC in cultured cells and in in vivo kidney. The long-term effect of AngII in vivo was not a direct effect of AngII; rather, it was an effect of aldosterone secreted by AngII stimulation.

Materials and methods

Cell study, After overnight depletion of serum from the culturemedium, various concentrations of AngII were added to the cells for 30 min and 18 h. Phosphorylation of endogenous OSR1 and NCC was evaluated by performing western blots with anti-pOSR1 and pNCC (pSer71) antibodies, respectively.

Animal study, Studies were performed on 12-week-old-male C57BL6/J mice. Prior to implanting the infusion tube, we intraperitoneally anesthetized the mice with Inactin (Dai-nippon Sumitomo Pharma). Once a stable level of anesthesia was obtained, as judged by the heart rate and lack of toe reflex, the mice were place on a surgical table (37° C) under a microscope, and a polyethylene tube (SP10) was inserted into the jugular vein. Then, the tube was filled with heparin (30ul) to prevent occlusion by blood clotting, and the animals were allowed to recover for more than 120 min before infusion of drugs. For the experiments examining the acute effect of AngII, AngII dissolved in saline with 4% BSA was infused (5ng/g/min) for 5 min, and then the mice were sacrificed 30 min, 2 h, and 24 h after the start of the infusion. Control mice received vehicle. A single dose of valsartan (75ug) was administered with AngII, and eplerenone (10 mg) was given to mice with mouse chow. To examine the effects of long-term AngII infusion, we used osmotic minipumps (model 1002;

AlzetCorporation) to infuse mice with AngII (720 ng/day) for 5 or10 days. Osmotic minipumps were used to administer valsartan (3mg/kg/day) along with AngII, and eplerenone (10mg/day) was administered with mouse chow.

Results

In mpkDCT cells, the phosphorylation of OSR1 and NCC was increased 30 min after the addition of angiotensin II (10-9~10-7 M) but returned to baseline after 18 h. In mice, a 5-min infusion of angiotensin II (5 ng/g/min) increased NCC phosphorylation in the kidney at 30 min and 2 h after the injection but returned to baseline 24 h later. This increase was inhibited by angiotensin II receptor blocker (valsartan) but not by aldosterone receptor blocker (eplerenone). Ten-day infusions of angiotensin II (720 ng/day) also increased phosphorylation of OSR1 and NCC in the mouse kidney, and both val-sartan and eplerenone inhibited the increased phosphorylation.

Discussion

We first used the mouse DCT cell line endogenously expressing NCC to test the direct effect of AngII on NCC phosphorylation. Although a similar experiment using the same cell line was recently reported, how the cells were treated with AngII was not described. In the present study, we confirmed that AngII mediated short-term regulation of the WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade, but we found that the effect did not last long. This transient effect might be due to the down-regulation of AngII receptors. To further investigate whether the AngII regulated NCC phosphorylation had physiological relevance in the kidney, we performed in vivo studies.

In the short term study, we confirmed that AngII increased NCC phosphorylation in the kidney. This effect was partially inhibited by valsartan, suggesting that the acute increase in NCC phosphorylation might be mediated by a signal from AT1 receptor. Whether AngII directly acted on AT1 receptor in the distal tubules or indirectly stimulated NCC phosphorylation though secretion of other hormones could not be determined in this study.

However, based on the results with mpkDCT cells and the existence of AT1 receptor in distal tubules it is likely that AngII could directly regulate NCC in the distal tubule in the kidney. On the other hand, it may be unlikely that aldosterone is involved in the short-term regulation since we observed a similar level of increased NCC phosphorylation with or without eplerenone pretreatment In contrast to the short-term regulation, however, we found that eplerenone completely inhibited the induction of OSR1/SPAK and NCC phosphorylation caused by the long-term AngII infusion. This data clearly indicates that the long-term effect of AngII was not a direct effect of AngII through AT1 receptor but rather an effect of aldosterone induced by AngII. As shown in our in vitro experiments, the direct effect of AngII might also be rapidly down-regulated in invivo kidney.

Thus, aldosterone has a more important role than AngII itself in the long-term regulation of the WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade by AngII. The present study clearly establishes the role of AngII on the newly established kinase cascade in the kidney, and it also clarifies that both valsartan and eplerenone are effective drugs for the in vivo regulation of this kinase cascade.

Conclusion

Although angiotensinII is identified as an upstream regulator for the WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade in vivo, aldosterone appears to be the major regulator of this signal cascade in the long-term regulation by angiotensin II.

<要旨>

我々は偽性低アルドステロン症 II 型のモデルマウスである WNK4D561A/+ ノックインマウスを用いて、WNK-OSR1/SPAK-NaCl 共輸送体 (NCC) リン酸化刺激伝達系が、生体内において NCC の機能制御に重要であることを示した。NCC のリン酸化は細胞膜での局在に必須である。以前、アンギオテンシン II が NCC の apical における発現を増加することが示された。このため、我々はアンギオテンシン II が WNK-OSR1/SPAK-NCC 刺激伝達系の上流であるかどうかを培養細胞とマウス腎臓を用いて検討した。mpkDCT 細胞において、OSR1 と NCC のリン酸化はアンギオテンシン II の添加 30 分後に亢進したが、18 時間後にはベースラインに戻った。マウスにおいてはアンギオテンシン II を 5 分間投与した後に、30 分、2 時間後では腎臓における NCC のリン酸化は亢進したが 24 時間後にはベースラインに戻った。この亢進はアンギオテンシン II 受容体拮抗薬のバルサルタンにより阻害されたが、アルドステロン受容体拮抗薬のエプレレノンによっては阻害されなかった。アンギオテンシン II の 10 日間投与では、腎臓にて OSR1 と NCC のリン酸化は亢進し、バルサルタンとエプレレノンはこの亢進を阻害した。アンギオテンシン II は生体内において WNK-OSR1/SPAK-NCC 刺激伝達形の上流の制御因子であることがわかったが、アルドステロンはアンギオテンシン II によるこの刺激伝達系の長期制御の主要な制御因子であると考えられる。

平井　志伸　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1794 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）病態代謝解析学専攻
学位論文題目	／	RP58 controls neuron and astrocyte differentiation by downregulating the expression of Id1-4 genes in the developing cortex（転写抑制因子 RP58 は Id ファミリー遺伝子群の発現抑制を通じて、大脳皮質発生期における神経前駆細胞の分化を制御する） The EMBO Journal　第 31 巻第 5 号　1190 頁～ 1202 頁掲載　平成 24 年発行
論文審査委員	／	主査：教授　田　賀　哲　也　　副査：教授　寺　田　純　雄　　副査：教授　岡　澤　均

論文要旨

＜要旨＞

大脳皮質の発生期において、ニューロンとグリアは神経幹細胞から順次産生され、その過程は様々な外因性、および内因性の因子によって制御されている。Id (inhibitor of differentiation) もその内因性因子の一員であることが知られている。RP58 のノックアウト (KO) マウスの大脳皮質では 4 種類全ての Id mRNA が増加していることを明らかにした。次に、RP58 と Id との関係を調べる為に、ルシフェレースアッセイおよびクロマチン免疫沈降実験をおこない、RP58 は 4 種類全ての Id 遺伝子の発現を抑制していることを発見した。更に、RP58 KO では神経幹細胞とアストロサイトの増加も観察された。その形質は野生型（WT）マウスへの Id の強制発現によって再現することができ、また、KO マウスにおける Id のノックダウン（KD）実験によってレスキューすることができた。最後に、Id の下流エフェクター因子として p57 を同定し、RP58 KO マウスの表現系を p57 の過剰発現によってレスキューした。以上の結果から、我々は転写抑制因子 RP58 が Id の転写抑制による p57 の発現制御を通して神経幹細胞の運命を制御していることを明らかにした。

＜緒言＞

ニューロン及びグリアの発生には非常に複雑な転写因子のネットワークが関わっている。RP58 もその構成要因であることが徐々に解明されてきた。RP58 は POK ファミリーに属する転写抑制因子であり、発生期では大脳皮質、海馬、小脳等において発現が見られる。また、大脳皮質においては前駆細胞から弱い発現が認められ、その発現はニューロンの分化とともに強くなる。近年、我々は RP58 KO マウスを作製し、その解析をおこなってきた。そして、KO マウスの大脳皮質では神経幹細胞の数が増加し、細胞周期離脱も障害されていることが判明した。この結果より、RP58 が神経幹細胞の増殖と分化に非常に重要な役割を果たしていることが推察された。しかし、上記のような表現型を生じる分子メカニズムは不明であった。今回、我々は RP58 KO マウスと WT の比較解析を行うことで、RP58 の下流遺伝子を探索し、大脳皮質の発生過程において RP58 が果たす役割を究明した。その結果、RP58 が Id1 ― Id4 の発現を抑制する因子であることを新たに見いだし、その機構を通じて神経前駆細胞の増殖と分化のバランスを司っていることを証明した。

＜方法＞

当研究室で保有している RP58 の KO マウスを使用し、遺伝子発現マイクロアレイ、in situ hybridization、real-time-PCR 及び免疫組織染色を行い、KO マウスの表現型を解析した。その結果、4 種の Id mRNA が KO マウスで増加している知見を得た為、次に RP58 と Id との関係を調べた。ルシフェレースアッセイとクロマチン免疫沈降アッセイを用いて、4 種の Id 遺伝子が RP58 の直接的なターゲットであるかどうかを調べた。更に、Id mRNA の発現量の増減によって引き起こされる表現型を in vivo で解析する為に、子宮内電気穿孔法を用いた。また、子宮内電気穿孔法を使い Id の下流エフェクター因子として p57 を同定した。

＜結果＞

RP58 の KO マウスの脳切片を使用した免疫組織学的解析から、RP58 KO マウスではアストロサイトマーカーである GFAP 及び、前駆細胞マーカーである Sox2 の発現細胞が神経発生後期で増加していることが判明した。次に、E16.5 大脳皮質を用いた遺伝子発現マイクロアレイ解析の結果から、アストロサイトおよび前駆細胞の数の制御に関わることが知られている因子を探したところ、4 種の Id mRNA が WT に比べて RP58 KO で増加していることが分かった。そして、in situ hybridization 及び real-time-PCR を行い、KO では E18.5 の大脳皮質において 4 種の Id mRNA が増加していることを確認した。更に、Id 遺伝子が RP58 の直接的なターゲットであることを示す為に、各 Id 遺伝子の RP58 結合配列をルシフェレースにつないだプラスミドを用いたレポーターアッセイと RP58 抗体を用いたクロマチン免疫沈降

前 目次へ 次

アッセイを行った。この実験により、RP58 は各 Id 遺伝子の予想される RP58 結合配列に結合し、その転写を抑制していることを証明した。また、RP58 発現レンチウルスを感染させた E14.5 由来の神経細胞塊における各 Id の mRNA 量を定量したところ、RP58 の導入により全ての Id mRNA の発現が低下していた。また、神経細胞塊の直径を測定することにより RP58 導入による細胞増殖能の低下も観察された。最後に、RP58 KO で観察されたアストロサイトと前駆細胞の増加は Id の増加、及び Id により発現が抑制されると予想される p57 の減少によって引き起こされている現象か否かを調べた。子宮内電気穿孔法を用いて E15.5 の WT マウスの脳室帯細胞に Id を過剰発現させ E19.5 で観察したところ、RP58 KO マウスが呈するアストロサイトと分裂前駆細胞の増加という表現型が確認された。また、E14.5 の RP58 KO マウスを用いて、同様の方法で Id のノックダウン及び、p57 の過剰発現を行い E18.5 で観察したところ、RP58 KO マウスで観察された、アストロサイトと分裂前駆細胞の増加という表現型はレスキューされた。

＜考察＞

今回新たに RP58 が 4 種の Id の発現を抑えることで、大脳皮質における神経前駆細胞の分裂と分化の調節をしていることを発見した。Id は Helix-loop-helix (HLH) 因子群に属することが知られている。このタイプの因子の多くは、細胞の運命決定・分化に重要な役割を果たすことが分かっており、現在までに少なくとも 7 つのクラス（クラス 1 -7）が報告されている。発生期大脳皮質におけるニューロジェネシスやアストロサイトジェネシスにおいても重要な役割を果たしている。クラス 2 に属する Neurogenin や Mash1 等のニューラル basic HLH (bHLH) 型転写因子は、クラス 1 に属する E- タンパク質と主にヘテロダイマーを形成し、機能することが分かっている。これらの因子は発生期の前駆細胞の細胞周期離脱を促進させる。クラス 2 bHLH 因子を過剰に発現させた前駆細胞はニューロンへの分化が促進され、反対にグリアへの分化を抑制される。

Id はクラス 5 に属する因子として知られており、ほ乳類では Id1 から Id4 までの存在が確認されている。Id タンパク質は多くの bHLH 型の転写因子とは異なり DNA 結合領域をもたず、上記のクラス 1 及び 2 型の転写因子とヘテロダイマーを形成することで、それらの転写活性を阻害することが分かっている。神経細胞塊や神経前駆細胞への Id の過剰発現実験では、細胞分裂能が亢進し、ニューロン産生の抑制及び、アストロサイト産生の増加が認められたという報告がある。しかし、各 Id の KO マウスでは脳に大きな発生異常は認められないことなどから、4 種の Id の間には相補的な機能補完の関係が示唆されており、前駆細胞から離脱する為には、4 種全ての Id の発現が抑制される必要性が考えられる。今回、我々は RP58 が Id1 から Id4 までの転写を一様に抑制する因子であることを明らかにした。この結果は、RP58 が発生期大脳皮質における神経幹細胞の細胞周期離脱に重要な役割を担っている転写抑制因子であることを示唆している。

最近、レンチウイルスによって RP58 を発現させたヒトグリオーマ細胞株は、BrdU の取り込み率低下を指標とした分裂能の顕著な減衰を示し、また、同細胞をヌードマウスに移植したところ、グリオーマの成長が抑制されることが報告された。更に、Id1-Id3 タンパク質の発現量とグリオーマの悪性度には正の相関関係が存在することが知られていることから、上記の RP58 の過剰発現によるグリオーマの分裂能減衰には、RP58 による Id の発現抑制が関わっているという仮説が考えられる。この仮説の証明は今後の新しい癌の治療や診断の指針になり得る可能性がある。

一方、RP58 KO マウスは細胞周期離脱障害以外にも神経細胞移動の異常と神経細胞の成熟の障害も呈することから、RP58 はそれらの機構の制御に関しても重要な役割を担っていると考えられ、更なる研究の発展が予想される

＜結論＞

RP58 は 4 種の Id の発現を抑制し p57 の発現量を調節することで、神経前駆細胞の分裂と分化のバランスを保つ働きを司っている。

中村　智之　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1796 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）脳神経機能外科学専攻
学位論文題目	／	Usefulness of ice massage in triggering of the swallow reflex（嚥下反射惹起におけるアイスマッサージの有効性） Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases 掲載　平成 23 年 11 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　喜多村　健　　副査：教授　植松　宏　　副査：教授　水澤　英洋

論文要旨

<要旨>

日本でアイスマッサージは、食事前や嚥下訓練で空嚥下を惹起する手技として広く知られている。
今回、嚥下反射惹起におけるアイスマッサージの有効性を評価するために、クロスオーバー研究を行った。
嚥下障害を持つ 24 人の脳卒中患者にアイスマッサージ施行、非施行で嚥下反射が惹起されるまでの時間を測定した所、有意に施行後の方が短かった。また、嚥下が全部はできなかった人においては、嚥下反射が惹起できた回数を計測した所、施行後の方が嚥下反射が惹起されやすかった。アイスマッサージは嚥下反射の惹起に即時効果があると示された。
また、これは核上性の病変を持つ 15 人の患者において顕著であった。アイスマッサージは障害された核上性の経路もしくは正常な核・核下性の経路を刺激すると考えられた。
アイスマッサージは有効な嚥下訓練であると示された。

<緒言>

脳卒中は嚥下障害を来す事が知られている。嚥下反射の惹起は摂食嚥下に不可欠な要素であり、惹起の遅延や不能は咽頭期において誤嚥や食物残留の原因となる。
嚥下反射惹起の促進に関し、Pommerenke は前口蓋弓の感受性が高いと証明し、小島は偽性球麻痺患者では K ポイント刺激が有効であると報告している。
日本では、のどのアイスマッサージ、つまり、アイス棒で前口蓋弓、舌根部、咽頭後壁をマッサージする手技が、食事前の空嚥下や食事中の嚥下反射の惹起や、嚥下訓練に用いられている。ただ、アイスマッサージの有効性は広く認識されているものの、対照試験は今まで為されていない。
この研究において、嚥下反射惹起におけるアイスマッサージの有効性を評価し、臨床応用に関して検証する。

<対象と方法>

対象は、2010 年 10 月から 11 月に同意を得られた 24 人の嚥下障害を持つ脳卒中患者で、全ての患者が 3ml の水飲みテストと嚥下造影で咽頭期嚥下障害を認めた。従命が可能ならば軽度の意識障害（GCSE4V4-5M6）の患者は含めた。
アイスマッサージはリハビリテーション科医師が全例施行し、アイス棒（長さ 4 インチ・直径 0.5 インチの棒に濡れた綿を巻きつけ後凍らせた物）で前口蓋弓、軟口蓋、舌根部を 10 秒間なぜたり押したりしてマッサージをした。
嚥下反射を指示してから喉頭が最も高い位置に来るまでの時間を計測し、10 秒以上嚥下が起きなければ嚥下惹起困難と判断した。
クロスオーバー研究とし、アイスマッサージ施行（A）、アイスマッサージ非施行（B）で交互に 2 回ずつ、A－B－A－B、B－A－B－A の 2 パターンのいずれかで計測し、（A）（B）の平均時間を計測した。
4 回は嚥下反射惹起ができなかった場合、嚥下反射が惹起できた回数を計測した
統計は対応のある t 検定、もしくは Wilcoxon の順位和検定で行い $p<0.05$ を有意とした。

<結果>

対象は、男性 19 人女性 5 人、平均年齢 71.5 ± 10.3 歳、基礎疾患は延髄外側梗塞が 9 人、その他の脳梗塞が 10 人、脳出血が 3 人、クモ膜下出血が 2 人で、15 人が核上性病変を認めた。
14 人は 4 回とも嚥下反射惹起が可能であった。アイスマッサージ施行では 1.55 ± 0.42 秒であり、アイスマッサージ非施行では 2.17 ± 1.53 秒だったのに対し、有意に嚥下反射が惹起されるまでの時間が短かった。（$p=0.00366$）
10 人は 4 回は嚥下反射惹起ができなかった。嚥下反射が惹起できた回数は、アイスマッサージ施行では 1.30 ± 0.70 回となり、アイスマッサージ非施行の 0.50 ± 0.50 回より嚥下反射が有意に惹起されやすかった（$p=0.0267$）

特に核上性の病変を持つ 15 人においてより顕著であった。4 回とも嚥下反射惹起が可能であった 10 人では、アイスマッサージ施行で有意に嚥下反射が惹起されるまでの時間が短かった (1.66 ± 0.509 秒 vs 2.51 ± 1.65 秒 p=0.00354)。4 回は嚥下反射惹起ができなかった 5 人では、アイスマッサージ施行で嚥下反射が有意に惹起される回数が多かった (1.40 ± 0.72 回 vs 0.20 ± 0.32 回 p=0.0413)。核性の病変を持つ 9 人では、有意な結果は認めなった。

＜考察＞
今回の結果より、アイスマッサージは嚥下反射惹起の潜時の短縮という即時効果があると考えられる。また、嚥下反射が自発的にできない患者に対してもアイスマッサージは有効と考えられる。日本では、アイスマッサージは嚥下の基礎訓練だけでなく、食事中に嚥下が起きない場合も用いられる。
核上性の病変を持つ患者において効果が顕著であった事から、アイスマッサージは障害された核上性の経路もしくは正常な核・核下性の経路を刺激すると考えられる。
嚥下での大脳皮質や皮質延髄路の重要性は最近認識されてきており、Martin らは fMRI で嚥下で機能する大脳野を同定し、Daniel らは島皮質の役割を示し、Power は口蓋弓の電気刺激により皮質の興奮性が変化すると報告している。これらはアイスマッサージが核上性の経路を刺激する可能性を示している。
一方、アイスマッサージは正常な脳神経核や核下性の経路を次のように刺激しうる。つまり、咽喉頭の温度覚、触覚、圧覚の受容器への刺激が上喉頭神経や舌咽神経の咽頭枝を通して孤束核、そして延髄網様体にある嚥下中枢に到達すると考えられる。舌根部、咽頭後壁、前口蓋弓は感覚入力が得られやすく、この部位のアイスマッサージは嚥下反射惹起の強力な刺激となる。
嚥下を改善する方略として感覚入力の増加があり、air pulse、化学伝達物質とともに、温冷・機械的刺激による促通が知られている。
Logemann は嚥下反射を惹起させる手技として「tactile-thermal applicaton」を提唱している。これは前口蓋弓を冷却した喉頭鏡で触れる手技であり、Lazzara らは、神経疾患を持つ患者で嚥下反射の口腔期・咽頭期をそれぞれ短縮させることを示し、触覚や冷覚が口腔の感覚を研ぎ澄ませ、皮質や脳幹の感覚刺激を変化させる事で嚥下反射の惹起を改善するとしている。ただ、「tactile-thermal applicaton」は摂食嚥下訓練として広く利用されているが、自発的に開口し嚥下ができる患者に施行は限られる。
アイスマッサージの効果は他の手技と同じと考えられるが、次の点でより有用で有効である。
①アイスマッサージは大変単純で安価な手技である。アイス棒だけで、「tactile-thermal applicaton」での冷却した喉頭鏡や air pulse、化学伝達物質といった特別で高価な装置は不要である。
②アイスマッサージは大変簡単で安全な手技である。誰でもどんな患者に対しても簡単に施行できる。
③アイスマッサージは適応が広い。「tactile-thermal applicaton」が自発的な嚥下が必要なのに対し、アイスマッサージは自発的な嚥下ができなくても施行できる。

前田　真吾　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1801 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）循環制御内科学専攻
学位論文題目	／	Ambulatory Electrocardiogram-Based T-wave alternans and heart rate turbulence predict high risk of arrhythmic events in patients with old myocardial infarction（ホルター心電図記録に基づく T-wave alternance と Heart Rate Turbulence による、陳旧性心筋梗塞患者の不整脈イベントのリスク層別化に関する研究） Circulation Journal　第 73 巻　2223 頁～ 2228 頁掲載　平成 21 年 12 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　古川　哲史　　副査：教授　荒井　裕国　　副査：准教授　平尾　見三

論文要旨

＜要旨＞
虚血性心疾患患者において、modified moving average (MMA) 法による T-wave alternance（TWA）と Heart Rate Turbulence（HRT）を解析し、不整脈イベントのリスク層別化をした研究は少ない。MMA 法による TWA と HRT 解析をした、器質的心疾患のない 21 名のコントロール群（group-C）と、心筋梗塞の既往があり持続性心室頻拍（SVT）の既往のない 21 名（group-O）と、心筋梗塞の既往があり SVT を認め、埋込型除細動器（ICD）植込術を施行した 21 名（group-V）の計 63 名を後向きに分析した。3 群間で比較した結果、TWA 陽性（65 μ V 以上）と HRT の異常は group-V で明らかに多く認められた（P<0.05）。またロジスティック回帰分析を行った結果、72 ヵ月の追跡期間中に致死性心室性不整脈を起こす相対リスクは、TWA 陽性例で 4.9 であった。以上より、心筋梗塞の既往があり SVT を認める症例は、再分極異常と自律神経活動異常による心臓死のリスクが高いと考えられた。また虚血性心疾患患者において、MMA 法による TWA と HRT の解析は、不整脈イベントのハイリスクリスク群を予知するための検査として有用であった。

＜諸言＞
TWA と HRT は心臓突然死（SCD）の予知に有用な指標である。運動テストやペーシングによって測定されるマイクロボルト TWA は不整脈イベントや SCD の予知指標として知られている。TWA は心室の一拍一拍の再分極のばらつきやリエントリーの基質を示すものと考えられており、最近の ACC/AHA/ESC のガイドラインでは、心室性不整脈のリスク評価のクラス 1 の検査である。しかしながら、従来のスペクトル解析による TWA の測定は、特定の心拍数の維持が必要であることから臨床的に限界があり、近年 TWA の測定法としてホルター心電図を使った MMA 法によるタイムドメイン解析が開発され、有用性が報告されている。
一方、HRT は心室性期外収縮（PVC）が出現した直後の自律神経反応による心房圧の変動をみたものであり、圧受容体反射感受性と関係し、PVC 出現直後の 2 ～ 3 心拍の洞心拍が増加しその後の洞心拍が徐々に減少していく現象で、ホルター解析システムで簡単に計測ができる。HRT は turbulence oncet (TO) と turbulence slope (TS) の 2 つのパラメーターを用いて判定され、心筋梗塞患者のリスク層別化およびリスク予知に適しているとされている。本研究の目的は、MMA 法による TWA と HRT の測定により、心筋梗塞患者の不整脈イベントのリスク層別化をすることである。

＜方法＞
対象
横浜南共済病院において、2003 年 1 月から 2004 年 12 月の間ホルター心電図を施行した、器質的心疾患のない 21 名のコントロール群（group-C）と、心筋梗塞の既往があり SVT の既往のない 21 名（group-O）と、心筋梗塞の既往があり SVT を認め、ICD 植込術を施行した 21 名（group-V）の計 63 名を後向きに分析した。動悸を主訴にホルター心電図を施行し、心室性不整脈や器質的心疾患を除外された症例をコントロール群に割り付けた。ホルター心電図は、心筋梗塞発症 1 － 3 か月後に行い、左室駆出率（LVEF）は心筋梗塞発症 1 週後に経胸壁心エコーで測定した。心筋梗塞患者において、発作性心房細動の有無は死亡率や罹患率に影響を与えるため、登録時に洞調律である症例を登録し、心房細動の既往例は本研究から除外した。研究プロトコールは横浜南共済病院の倫理委員会で承認され、すべての症例で研究前にインフォームドコンセントを行った。ホルター心電図検査後、すべての症例は 1 － 2 か月ごとに外来を受診し病状および結果を調べた。平均追跡期間は 72 ± 16 か月であった。

TWA
TWA はホルター心電図の 2 チャンネル（NASA 誘導と CM5 誘導）記録から解析され、心拍数 120/ 分以上は自動的にカットするように設定した。TWA は GE Medical Systems 社製解析システム MARS PC を用い、T 波の形状（振幅）は奇数の心拍グループ（グループ A）と偶数の心拍グループ（グループ B）に分け、ABABAB パターンに変化する心電図波形を、タイムドメイン法によるコンピュータ処理で測定した。値は心電図を 15 秒ごとに自動解析しノイズ処理され、生データと平均テンプレートの差を 8 心拍から計算し、ノイズレベルが 20 μ以下の場合のみに表示するように設定した。更に、ノイズやアーチファクトが多い場合は手動で測定を行った。TWA の最大値はどちらかの誘導の高い値を採用し TWA 値が 65 μ V 以上を陽性とした。

HRT
HRT は TO と TS の 2 つのパラメーターを用いて判定される。TO は、1 発の PVC を基点とし、代償性休止期後の RR の短縮率（元の RR 間隔に対して、PVC 後の短縮 RR 間隔は何 % か）を計算したもので、TO = 100 * ((RR1 + RR2) – (RR-2 + RR-1)) / (RR-2 + RR-1) で計算される。TO 値はすべての PVC で測定され、その平均値を TO 値とし TO 値プラスは PVC 後の心拍数低下、マイナスは心拍数増加を示す。TS は PVC 直後の 15 拍のうちの 5 心拍から測定され、PVC 後の RR 延長の速度を計算したものである。TO 値 < 0%、TS 値 > 2.5ms/ 心周期を正常と定義した。また、HRT は TO 値、TS 値が共に正常なものを HRT category 0 とし、どちらかが異常であるものを HRT category 1、両方が異

前 目次へ 次

常であるものを HRT category 2 と分類し、検査中に PVC を認めず HRT が測定できない場合は HRT category 0 と分類した。

測定項目とエンドポイント
臨床背景、既往歴、服用薬、心拍数、血圧、血液検査所見、心臓超音波検査所見を 3 群間で比較した。心筋梗塞による梗塞巣や血行再建術に関しては、group-O と group-V で比較した。転帰として心室細動や心停止、SVT などによる不整脈イベントや SCD、心臓死の有無を調査した（ICD 植込み患者では ICD 記録を調査）。

統計学的解析
MMA 法による TWA と HRT の測定は GE Medical Systems 社製解析システム MARS PC を用いた（version 7.03）。統計は解析ソフト SPSS (version 10.0) を用いて行った。
$P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

＜結果＞
Table1 に示すよう 3 群間の臨床背景に差を認めなかったが、心臓超音波検査では group-C は group-O と group-V に比較し明らかに左室駆出率が高値で、左室拡張末期径は低値であった。また group-O と group-V では、心筋梗塞部位や血行再建術に差は認めなかった。

TWA と HRT の陽性結果
Group-V は TWA および HRT で明らかに陽性結果が多く、また TWA 値は有意に group-V で高値を認め、group-C で低値を認めた。

フォローアップ期間中のエンドポイント
平均 72 ヵ月の追跡期間中、6 例が死亡し（group-O：1 例、group-V：5 例）、心不全による心臓死は group-O で 1 例、group-V で 4 例認め、group-V の 1 例で突然死を認めた。全死亡率は group-O や group-C に比べ group-V で明らかに高く、また SVT は group-V で 10 例と最も多く、group-O で 6 例認めた（Table3）。Group-C では、フォローアップ期間中に SVT、死亡例は認められず、Group-C と group-O での比較では、全死亡率と SVT の発現率に有意差を認めた。ロジスティック回帰分析を行った結果、死亡に対する相対リスクは、TO 陽性例で 10.8、TS 陽性例で 7.9 であった。またフォローアップ期間中に致死性心室性不整脈を起こす相対リスクは、TWA 陽性例で 4.9 であり独立した因子であった（Table4, Figure3）。

＜考察＞
近年のガイドラインでは心臓突然死の予知として、心臓電気生理検査による誘発性と同様に TWA や加算平均心電図で検出する心室遅延電位、心拍変動解析指標、圧受容体反射感受性や HRT などの非侵襲的な致死性不整脈検出のための検査が推奨されている。MMA 法による TWA と HRT の測定は通常の 24 時間ホルター心電図解析に加え同時に計測されるため、我々は MMA 法による TWA と HRT が心筋梗塞の既往がある患者において不整脈イベントの予知指標となるかどうかを評価し、その結果 MMA 法による TWA と HRT は不整脈イベントの予知指標として有用であったことを示した。

MMA 法による TWA
過去 19 個の研究結果から、従来の運動負荷を利用して測定された TWA 陽性の死亡に対する相対リスクは 3.8 と報告されている。タイムドメイン法による MMA はホルター心電図で測定できるため運動負荷やペーシングができない患者にも適した検査である。MMA 法による 8 心拍から計測された TWA 値は、スペクトル法による 32 心拍から計測された TWA 値と近似値をもつ。また振幅の大きな TWA 値を得るためには、32 心拍や 64 心拍からの解析よりも 8 心拍からの解析の方が優れている。
　我々が計測した MMA 法による TWA のカットオフ値はいまだ基準値が定まっていない。TWA のカットオフ値を 46-47 μ V でとした場合、TWA ＞ 47 μ V は SCD のハイリスクとなり、観察期間中に心室性不整脈を起こす相対リスクは 2.9-5.5 との報告がある。Nieminen らは、陽性基準を 65 μ V とした場合に運動負荷による TWA 陽性患者が 4 年間の追跡期間中に突然死、もしくは蘇生されるリスクが高かったことを報告した。更に榊らは虚血性心疾患、非虚血性心疾患によらず、タイムドメイン法による TWA の陽性基準を 65 μ V とした場合に、SCD の予知指標となることを示した。

HRT
HRT の異常は致死性不整脈の最大の予測因子であると様々な研究で報告されており、HRT category 2 の患者の 2 年以内に死亡する確率は、HRT category 0 の患者の 4.4 - 11.3 倍であり、左室機能不全患者における死亡リスクと同様に高値であった。
本研究では、HRT category 2 の患者は group-V で最も見られたが、コントロール群の Group-C では HRT category 2 は見られず、多くが HRT category 0 であった。実際に、フォローアップ期間中に Group-V の患者は死亡や致死性不整脈のリスクが高く、更にこの研究から心筋梗塞の既往がある患者において HRT の解析は、死亡や致死性不整脈の予測因子として役立つ検査であることが示された。

Study Limitations
本研究は 1 施設による小規模の後向き研究であり、重大な心イベントや不整脈イベントの数が少なく、SCD の予測には、多施設参加型の前向き研究が必要であると考えられた。
致死性不整脈の正確な予測をするためには、MMA 法による TWA と HRT の測定に加え他の非侵襲的検査を加えた大規模前向き研究が必要であると考えられた。

＜結論＞
本研究から心筋梗塞の既往があり、更に SVT の既往がある症例では、再分極異常や圧受容体反射感受性の異常により、今後致死性心室性不整脈を起こすリスクが高いと考えられた。また MMA 法による TWA と HRT の併用は簡単でかつ致死性不整脈を予測する上で有用な検査であると考えられた。

鈴木　志保　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1804 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）包括病理学専攻
学位論文題目	／	Overexpression of MCM2 in myelodysplastic syndromes: Association with bone marrow cell apoptosis and peripheral cytopenia（骨髄異形成症候群骨髄における MCM2 高発現と、骨髄細胞のアポトーシスおよび血球減少との関連について） Experimental and Molecular Pathology　第 92 巻 160 頁～ 166 頁掲載　平成 24 年発行
論文審査委員	／	主査：教授　三　浦　修　　副査：教授　清　水　重　臣　　副査：教授　水　谷　修　紀

論文要旨

<要旨>

骨髄異形成症候群（MDS）は造血細胞の増殖とアポトーシスを特徴とする血液疾患である。一方 MCM2 は DNA 複製に必須の分子として知られ、様々な腫瘍で発現が高くなっていることが示されている。近年我々は MCM2 がアポトーシスを誘導する作用を有する事をマウスの実験系を用いて明らかにした。そこで本研究では高頻度のアポトーシスを特徴とするヒト MDS 骨髄において MCM2 の発現解析を施行した。RT-PCR および免疫染色の結果 MDS 骨髄の MCM2 発現は対照群や AML に比較して高いことが示された。また MDS 骨髄における MCM2 陽性細胞の比率は Ki67 陽性率と相関せず cleaved caspase 3 陽性率と有意に相関した。そこで MCM2 高発現による細胞への影響を見るために HL60 細胞株に MCM2 を過剰発現させたところ、アポトーシスが誘導されることが明らかになった。さらに MDS 骨髄では MCM2 と cleaved caspase 3 二重陽性細胞の比率が高く、その割合は患者末梢血の白血球減少の程度と相関していた。これらの結果から MCM2 の高発現が MDS 骨髄における造血細胞のアポトーシスに関与している可能性が示唆される。

<緒言>

骨髄異形成症候群（MDS）は骨髄造血細胞において増殖と同時にアポトーシスが起こることによる無効造血を特徴とする血液腫瘍である。このアポトーシスの機構については、炎症性サイトカイン等のさまざまな外的因子が関与していることが今までに報告されているが、これらは主に骨髄微小環境と造血細胞との相互関係によるものであり、アポトーシスに関わる造血細胞自体の内的因子についてはあまり知られていないのが現状である。一方、MCM2 は DNA 複製に必須の分子であり、MCM 複合体の一部として複製起点で複製前複合体を形成し DNA 複製を開始するとともに、DNA 鎖を解くヘリカーゼとしても作用することが知られている。MCM2 は細胞周期にある細胞で発現していることから増殖マーカーとしても用いられ、様々な悪性腫瘍（特に癌）においてその高発現が報告されているが、血液腫瘍の分野での研究は未だ乏しい。また MCM2 の機能について、近年我々はマウスの実験系において MCM2 が DNA 障害誘導性の骨髄細胞のアポトーシスを増強することを明らかにしており、MCM2 のアポトーシス誘導に関わる作用はヒト骨髄細胞の動態にも影響を与えている可能性があると思われた。

このような背景から、本研究ではアポトーシスを高頻度に起こす疾患として知られる MDS の骨髄において、MCM2 の発現解析を施行するとともに細胞増殖およびアポトーシスとの関連性を検討した。

<方法>

MDS および control、AML の凍結骨髄検体より cDNA を作成し、MCM2 および他の MCM family (MCM3, MCM7) の mRNA 発現量を RT-PCR を用いて定量した。また MDS および control、AML のホルマリン固定パラフィン包埋骨髄検体を用いて MCM2 の免疫染色を行い、陽性率の算出と比較を行った。MCM2 を発現する細胞を同定する為に MCM2 と各血球系マーカー (グリコフォリン A、MPO、CD61) の二重染色を行った。さらに MCM2 発現と増殖・アポトーシスの関連を調べるために Ki67、cleaved caspase 3 の免疫染色を施行してそれぞれの陽性率を計測し、MCM2 陽性率との相関性を検定した。次に in vitro で MCM2 高発現とアポトーシスの関係を調べるため、HL60 および K562、HeLa、HEK293T 細胞株に正常ヒト骨髄からクローニングした MCM2 を遺伝子導入して、FACS および Western blot を用いたアポトーシスの検出を行った。さらに骨髄検体で MCM2 と cleaved caspase 3 発現の関連を調べるため、これらの二重染色を施行して二重陽性細胞の割合を計測し、この割合と患者末梢血データとの関連を検討した。

<結果>

RT-PCR の結果、MDS 骨髄では control や AML に比べて MCM2 発現が高いことが判明した。一方 MCM3 および MCM7 については各疾患群間に有意な差は見られず、MDS 骨髄で特異的に MCM2 の発現が高い可能性が示唆された。

前 目次へ 次

骨髄検体を用いた免疫染色においても MDS で高い MCM2 陽性率が示され、MCM2 と各血球系マーカーの二重染色から MCM2 は主に異型のある未熟な骨髄球系に陽性であるほか、巨核球の一部に陽性であることが判明した。次に MCM2 陽性率と増殖・アポトーシスの関係を調べるため Ki67 および cleaved caspase 3 陽性率との相関を検定したところ、control および AML では MCM2 陽性率と Ki67 陽性率に相関があるのに対して MDS 骨髄では有意な相関が認められなかった。また MCM2 陽性率と cleaved caspase 3 陽性率の相関については、control および AML では両者に相関がないのに対し、MDS 骨髄では有意な相関が認められた。これらの結果から MDS 骨髄における MCM2 の高発現は単に高い増殖状態を反映しているのではなく、アポトーシスにも関与している可能性が考えられた。そこで in vitro で MCM2 高発現とアポトーシスの関連を検討したところ、MCM2 を過剰発現させた HL60 細胞株ではアポトーシスの増強が見られ、その効果は caspase 阻害薬 Z-VAD により低下した。また MDS 骨髄では MCM2 および cleaved caspase 3 二重陽性となる細胞の割合が control や AML に比べて高く、その割合は患者末梢血における白血球減少の程度と有意に相関した。

＜考察＞

MCM2 は DNA 複製に重要な分子として知られており、その発現は細胞増殖の程度を反映することから、現在までに様々な悪性腫瘍における高発現が報告されてきた。その一方、近年我々は MCM2 がマウス骨髄細胞の DNA 損傷後のアポトーシスを増強する作用を有することを明らかにした。従って MCM2 は細胞増殖のみならずアポトーシスを制御する重要な分子である可能性が考えられ、この両者を特徴とする MDS の病態を考える上で重要な意味を持っている可能性が示唆される。

MCM2 発現と細胞増殖との関連については、現在までに様々な腫瘍で MCM2 と Ki67 発現の相関が示されてきた。本研究においても control および AML 骨髄では両者に有意な相関が認められたが、MDS 骨髄においては相関性が認められなかった。一方、MDS 骨髄では MCM2 と cleaved caspase 3 発現に有意な相関が認められ、さらに MCM2 および cleaved caspase 3 二重陽性となる細胞の割合が高いことが明らかとなり、MCM2 高発現とアポトーシスの関連性が示唆された。また MDS 骨髄における MCM2 および cleaved caspase 3 二重陽性細胞の割合は、患者末梢血の白血球減少の程度と相関しており、この結果は MCM2 が主に骨髄球系に過剰発現していたことと合致する。もちろん今回の研究結果は現在までに報告されてきた MCM2 の細胞増殖と関連する作用を否定するものではないが、MCM2 の高発現は、高い細胞増殖能を反映するだけではなく、アポトーシスを起こしやすい状況をも引き起こしている可能性を示唆するものである。

なお in vitro の実験系で HL60 細胞株では MCM2 過剰発現により有意なアポトーシスの増強を認めたが、同時に行った K562、HeLa、HEK293T への MCM2 遺伝子導入では若干のアポトーシスの増加はあるものの有意差は認められなかった。これらの結果から MCM2 によるアポトーシス増強の感受性には細胞学的背景の違いが関与していると考えられ、この感受性を規定する因子を検討することが、MDS 病態を考える上でも重要になると思われる。

＜結語＞

今回の研究により、DNA 複製に重要な分子として知られてきた MCM2 が MDS 骨髄で高発現していることが明らかとなった。さらに MDS における MCM2 高発現は、細胞増殖と同時に起こる高頻度のアポトーシスという MDS に特徴的な細胞動態にも関与している可能性が示唆された。

Rotkrua Pichayanoot 博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1805 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）分子腫瘍医学専攻
学位論文題目	／	MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells（マイクロ RNA miR-9 は胃がん細胞において CDX2 発現を抑える） International Journal of Cancer 第 129 巻 11 号 2611 頁～2620 頁 平成 23 年 12 月発行
論文審査委員	／	主査：教授 稲澤 譲治 副査：教授 江石 義信 副査：教授 中村 正孝

論文要旨

＜要旨＞
ホメオボックスタンパク質の一つ CDX2 の発現変化は、胃がん発症に関係していることが報告されている。一部の胃がんでは、CDX2 はメチル化異常によって発現低下していることが認められたが、メチル化陰性でも発現が低い胃がんもあるため、胃がんにおける CDX2 発現調節メカニズムについては、まだ十分明らかとなってはいない。non-coding RNA の一つであるマイクロ RNA (miRNA) は標的遺伝子に結合して、その発現を調節している。miRNA は発生や分化だけでなく、がんの発生において重要な役割を持つことが知られている。我々は、胃がん細胞株で miRNA と CDX2 発現との関係を明らかにすることを目的とした。レポーター解析の結果、miR-9 は CDX2 の 3′ UTR に直接結合することが分かった。胃がん細胞株で miR-9 は、CDX2 や CDX2 の下流標的遺伝子 (p21, MUC2, TFF3) の発現を抑えた。anti-miR-9 の導入により、MKN45 胃がん細胞で miR-9 の発現を抑えた結果、細胞周期で G1 期の延長がみられ、細胞増殖も抑制された。この現象は、CDX2 の強制発現でも同様に見られた。胃がん細胞株及び胃がん組織を用いて miR-9 と CDX2 の発現量を調べた結果、両者の発現は逆相関していた。以上より miR-9 は、CDX2 の発現抑制を介して胃がんの発生に関係している可能性が示された。

＜ Introduction ＞
CDX2 is a caudal-related homeobox transcription factor, which is important for development, maintenance and proliferation of intestinal epithelial cells. Ectopic expression of CDX2 in the stomach may initially induce the development of intestinal metaplasia, which is associated with increased risk of development of a gastric cancer (GC), particularly in intestinal type. CDX2 expression gradually decreases during malignant transformation, and CDX2-positive GC tissues showed lower cell proliferation rates than CDX2-negative ones, suggesting a possible role of tumor suppressor gene. Methylation of CDX2 promoter was found to be partly responsible for CDX2 silencing and mutations of the CDX2 gene have been found in some cases of GCs. However, the mechanism underlying the reduction of CDX2 expression still remained obscure.
MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs, approximately 22 nucleotides in length. They function as post-transcriptional regulators, which inhibit gene expression through either cleavage of the target mRNA or translational repression. Several lines of evidence have demonstrated that deregulated miRNAs contribute to the development of various cancers. Therefore, we here hypothesized that miRNAs might be associated with the silence of CDX2 expression in gastric carcinogenesis. In this study, to clarify the role of miRNAs in CDX2 regulation, we examined the functions of computationally predicted miRNAs including miR-9 in gastric cancer cells.

＜ Materials and methods ＞
Nine GC cell lines (MKN45, NUGC-3, MKN74, TGBC11TKB, MKN7, AGS, GCIY, NUGC-4 and KATO-III), a human colorectal cancer cell line (Colo320-DM), and a human embryonic kidney cell line (HEK-293T) were used in this study. We also examined 27 GC tissues, which were collected according to a protocol approved by the Institutional Review Committee of Tokyo Medical and Dental University.
To determine whether or not both miR-9 and miR-204 can repress CDX2 expression by targeting their binding sites in the CDX2 3′ -UTR, the PCR product containing intact target sites or a deletion of miR-9 seed recognition sequence was inserted into the luciferase reporter vector. These plasmids were transfected into HEK-293T cells together with the negative control, miR-204 or miR-9 precursor.
To investigate the direct effect of miR-9 on CDX2 expression in GC cell lines, we performed both miR-9 overexpression and knockdown experiments. MKN45 and AGS cells were transfected with negative control, miR-204 or miR-9 precursor. Moreover, anti-miR-9 or negative control siRNA was transfected into MKN45 and NUGC-3 cells. By using cell proliferation assay and flow cytometry, the effect of miR-9 inhibitor and CDX2-expressing vector on cell growth was analyzed in MKN45 cells.
We examined the expression levels of CDX2 mRNA, CDX2 protein and miR-9 in nine GC cell lines by performing RT-

前 目次へ 次

PCR, Western blot and Taqman RT-PCR, respectively. By doing immunohistochemistry of CDX2, the relationship between miR-9 and CDX2 expression levels was further examined in 23 primary GC tissues.

＜ Results ＞

MiR-9 and miR-204 were computationally predicted for CDX2 regulation using three independent miRNA databases, i.e., MicroCosm Targets version 5, miRanda Human miRNA Targets and TargetScan.

The luciferase activity was significantly reduced in cells co-transfected with miR-9 ($p < 0.05$), but such reduction was not found on negative control or miR-204 transfection. On the other hand, the reporter vector lacking the miR-9 recognition site (mutant) fully rescued the miR-9 repression of luciferase activity, indicating that only miR-9 directly and specifically interacts with the target site in the CDX2 3′ -UTR. The CDX2 protein levels were inconsistent with the pattern observed at the mRNA levels in nine GC cell lines, indicating that CDX2 expression might be repressed through a certain post-transcriptional mechanism. The inverse correlation between endogenous miR-9 and CDX2 protein levels can be observed in those cell lines.

The CDX2 protein level was significantly decreased in miR-9-transfected cells compared to negative control-transfected cells, whereas no reduction was observed in miR-204-transfected cells. Nevertheless, no significant differences in the level of CDX2 mRNA were detected after miR-9 transfection into MKN45 cells. The expression level of CDX2 downstream target genes, p21, MUC2 and TFF3 was significantly downregulated in miR-9-transfected MKN45 and AGS cells. In contrast, the transfection of anti-miR-9 into two GC cell lines obviously increased CDX2 protein expression in comparison with negative control. No significant differences in the CDX2 mRNA level but concordant alterations of CDX2 target genes were repeatedly observed.

As a result of cell growth assay, anti-miR-9-transfected MKN45 cells proliferated at a significantly slower rate than negative control-transfected ones ($p < 0.05$). A significant reduction of cell growth was also observed for the CDX2-overexpressed MKN45 cells. Furthermore, cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Suppression of miR-9 and overexpression of CDX2 triggered the same phenomenon of G1 cell cycle arrest and corresponding decrease in S and G2/M populations.

Finally, the average miR-9 level in the CDX2 protein-negative GC tissues was significantly higher than that in the CDX2 protein-positive group ($p < 0.004$).

＜ Discussion ＞

In our study, we examined the role of miRNA in downregulation of CDX2 in GC cells. Our current evidence shows that miR-9 can directly target its binding site in the CDX2 3′ -UTR, whereby CDX2 protein translation is blocked. Alteration of the miR-9 level by means of miR-9 or anti-miR-9 transfection into GC cell lines also affected the levels of CDX2 downstream target genes such as p21, MUC2 and TFF3. The inverse correlation between the levels of miR-9 and CDX2 protein was demonstrated in most primary GC tissues. Our data indicate that down-regulation through miR-9 is one of the mechanisms underlying CDX2 silencing at the protein level in GCs. Furthermore, transfection of the miR-9 precursor down-regulated the CDX2 protein but not mRNA in a colorectal cancer cell line, Colo320-DM, suggesting that miR-9 might also function as a CDX2 regulator in colon carcinogenesis.

CDX2 is crucial for maintenance of the differentiated phenotype by mediating the transcription of intestine-specific genes such as MUC2 and TFF3. CDX2 is also related to cell cycle arrest via p21 induction. Several lines of evidence have indicated the role of CDX2 as a tumor-suppressor in gastric carcinogenesis. Here, we revealed that re-expression of CDX2 on knockdown of miR-9 was accompanied by accumulation of G1-arrested cells and reduction in S and G2/M populations as well as induction of p21 and MUC2. Taken together, our results suggest that the downregulation of CDX2 by miR-9 and the resultant alterations of CDX2 target genes might contribute to uncontrolled cell proliferation in GC.

Recent studies also support our findings by revealing that the repression of tumor suppressor FOXO1 upon aberrant expression of miRNAs including miR-9 resulted in the promotion of cell proliferation and anti-apoptosis in endometrial cancers. Moreover, miR-9 was supposed to be a pro-metastatic miRNA, because it suppressed E-cadherin and promoted cancer cell motility and invasiveness. The miR-9 levels in the metastasis-positive group (mean ± SE, 0.78 ± 0.21) were higher than those in the metastasis-negative group (mean ± SE, 0.59 ± 0.22); however, the difference was not statistically significant (data not shown). Thus, further studies are required to clarify the role of miR-9 in GC metastasis.

In this study, miR-9 downregulates CDX2 expression by blocking translation, not degrading mRNA. Induction of CDX2 through miR-9 repression may inhibit cell proliferation in gastric cancer. The identification of CDX2-preserving anti-miR-9 might be useful for developing a therapeutic agent for inducing terminal differentiation and for slowing down cancer hyperproliferation in gastric carcinogenesis.

＜ Conclusions ＞

MiR-9 might be involved in gastric carcinogenesis through CDX2 downregulation, resulting in the loss of maintenance of cell differentiation and the promotion of cell growth.

岩谷　胤生　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1806 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）心療・緩和医療学専攻
学位論文題目	／	Predictive factors for psychological distress related to diagnosis of breast cancer （乳癌診断過程に伴う心理的なつらさの予測因子の検討） Psycho-Oncology 掲載　平成 24 年発行
論文審査委員	／	主査：教授　杉原　健一　　副査：教授　松浦　雅人　　副査：准教授　車地　暁生

論文要旨

＜要旨＞

本研究の目的は、乳癌診断過程に伴う心理的ストレスを有する患者の割合を明らかにし、その予測因子を同定することである。研究デザインは、乳房の要精査患者を対象にした前向き縦断研究である。質問紙は初診時診察前 (Time1) に HADS、FACT-B、FACIT-Sp を調査し、この時点での心理的ストレスと QOL，Spirituality を評価した。さらに画像結果説明後（Time2）および病理結果説明後 (Time3) に HADS を調査し、この時点での心理的ストレスの評価を行った。統計解析は、各時点での HADS 総得点 10/11 点を cut-off として 2 群（高 HADS 群と低 HADS 群）に分類し、その割合を求めた。Time2 および 3 において、高 HADS 群の予測因子を患者属性および、Time1 での各調査結果の中から多変量解析にて検討した。適格条件に合致する患者 222 名を対象とした。
Time2（画像診断結果説明後）において異常なし群の 31 名（22.6%）、異常あり群の 39 名（45.9%）は高 HADS 群であった (p<0.001)。また Time3（病理診断説明後）において良性疾患群の 14 名（28.0%）、乳癌群の 24 名（68.6%）は高 HADS 群であった (p<0.001)。Time1 での HADS 総得点高値は、乳癌診断の全過程における心理的ストレスの予測因子となっていた。また初診時に局所進行癌であったことも、乳癌患者の心理的ストレスの予測因子となっていた（オッズ比 3.314、p=0.044）。以上より乳癌疑いの患者では、初診時診察前より HADS 得点の高い患者群は、進行乳癌患者と同様に集中的に心理的介入の必要がある可能性が示唆された。

＜緒言＞

乳癌は日本人女性が最も多く罹患する悪性腫瘍である。全女性癌患者の約 18% を占め、2005 年度で新たに診断される患者は約 50,000 人と報告されている。また世界的に見ても女性癌患者の一般的な発生母地であるだけではなく、死因となっている。
一般的に女性は「検査そのもの」よりも、「乳癌と診断される可能性」に恐怖を感じ、検診を避けると言われている。マンモグラフィ検診は「異常なし」と診断された患者において心理的 QOL に良好な影響を与える一方、偽陽性所見を認めた患者への心理的 QOL の悪影響も報告されている。また良性乳房疾患患者では、確定診断に至るまでに乳癌患者と同レベルの不安を経験すること、および乳癌患者の 20-40% は臨床的に重大な心理的ストレスに暴露されていたことが報告されている。

＜方法＞

2010 年 5 月から 2011 年 4 月に虎の門病院乳腺専門外来を受診し、適格条件 (20 歳以上 75 歳未満、乳癌検診異常にて受診、乳房に異常を自覚にて受診) を満たす患者を連続的にサンプリングした。本研究は虎の門病院倫理委員会の承認を得ており、患者から書面にて同意を得た。調査項目は HADS(Hospital Anxiety and Depression Score) を用いて心理的ストレスを、FACT-B(Functional Assessment of Cancer Therapy-Breast) を用いて QOL を、FACIT-Sp(Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Spiritual) を用いて spirituality を評価した。初診時診察前（Time1）に患者属性・心理的ストレス・QOL・spirituality の全項目を、画像診断結果説明後 (Time2) および病理診断結果説明後 (Time3) に HADS のみを調査した。最終的に必要な調査ができた患者 222 名を対象とした。
各時点の HADS の評価は、Kugaya らの先行研究 (JJCO1998;28(5)333-338) に従い cut-off を HADS 総得点 10 点以下と 11 点以上に設定した。それぞれを高 HADS 群と低 HADS 群と定義し、診断過程における各群の割合を調査した。また Time2 および 3 において、高 HADS 群の予測因子を患者属性および Time1 の HADS、FACT-B、FACIT-Sp の各結果の中から 2 項ロジスティック回帰分析にて統計学的に検討した。

＜結果＞

■患者属性

患者の平均年齢は 46.3 ± 11.7 歳であった。癌家族歴は乳癌家族歴ありが 37 名 (16.7%)、他癌家族歴ありが 25 名 (11.3%)、なしが 160 名（72.1%）であった。職業は有職者 130 名（58.6%）、主婦 37 名（16.7%）、無職 55 名（24.8%）であった。Time2 での画像診断結果は、異常なし（経過観察）群 137 名（61.7%）、異常あり（要生検）群 85 名（38.3%）であった。また生検を行った 85 名の Time3 での病理診断結果は乳房良性疾患 50 名（22.5%）、乳癌 35 名（15.8%）であった。
乳癌患者においては、取扱い規約での T 分類で T0（原発巣なし）6 名（17.1%）、T1（≤20㎜）16 名（45.7%）、T2（20<T≤50㎜）11 名（31.4%）、T3（>50㎜）1 名（2.9%）、T4（皮膚浸潤）1 名（2.9%）であった。

前　目次へ　次

■乳癌診断過程に伴う心理的ストレスの割合
各診断時点での高 HADS 群の割合は Time2（画像診断結果説明後）で異常所見なし（経過観察）群の 31 名（22.6%）、異常所見あり（要生検）群の 39 名（45.9%）であり、有意に有所見者で高 HADS 群が多かった（χ 2 test, 13.14; p<0.001）。
また Time3（病理診断結果説明後）で乳房良性疾患群の 14 名（28.0%）、乳癌群の 24 名（68.6%）が高 HADS 群であり、統計学的に有意差を認めた（χ 2 test, 13.71; p<0.001）。
■乳癌診断過程に伴う心理的ストレスの予測因子
① Time2（画像診断結果説明後）での高 HADS 群の予測因子
異常なし（経過観察）群では HADS 不安得点高値（OR=1.381, 95%CI=1.107-1.723; p=0.004）および HADS 抑うつ得点高値（OR=1.324, 95%CI=1.072-1.634; p=0.044）が高 HADS 群の予測因子と同定された。また異常あり（要生検）群でも同様に、HADS 不安得点高値（OR=1.880, 95%CI=1.350-2.617; p=<0.001）および HADS 抑うつ得点高値（OR=1.762, 95%CI=1.234-2.512; p=0.002）が高 HADS 群の予測因子と同定された。
② Time3（病理診断結果説明後）での高 HADS 群の予測因子
乳房良性疾患群では HADS 抑うつ得点高値（OR=2.450, 95%CI=1.316-4.453; p=0.005）が高 HADS 群の予測因子と示唆された。一方、FACT-B における機能尺度高値（OR=0.587, 95%CI=0.394-0.875, p=0.009）と患者属性で有職者（OR=0.352, 95%CI=0.132-0.935, p=0.036）は低リスクと同定された。
乳癌患者においては HADS 不安得点高値（OR=1.965, 95%CI=1.265-3.053; p=0.003）および腫瘍径（OR=3.314, 95%CI=1.033-9.509; p=0.044）が高 HADS 群の予測因子と同定された。

＜考察＞
本研究の目的は、乳癌診断過程に伴う心理的ストレスを有する患者の割合を明らかにし、その予測因子を同定することである。また本研究の特徴は、初診時診察前から病理学的確定診断までを時系列で追求し、各診断段階でその結果ごとに詳細に調査分析したことである。すなわち横断的研究に、縦断的要素を加えた研究デザインにて乳癌診断過程に伴う心理的ストレスを網羅的に検討した。
本研究では、患者は「生検が必要」または「癌治療が必要」などのネガティブな知らせに対してより高い HADS 総得点を示した。しかし、画像精査にて異常所見のない患者の 137 名中 31 名（22.6%）は高 HADS 群であった。これは乳癌画像スクリーニングにて偽陽性であった患者は心理的ストレスを受けることを報告した先行研究に一致する。これらの患者群は定期的な通院フォローもない為、心理的ストレスが見落とされる懸念があることを示唆した。
興味深いことに、本研究では画像精査の診断結果（異常所見の有無）に関わらず、心理的ストレスの予測因子は初診時診察前での HADS 不安得点高値と HADS 抑うつ得点高値であり、共通であった。先行研究では画像診断結果に関わらず、「乳癌を疑われた」こと自体が大きな不安要素であると指摘している。一方で心理的ストレスのオッズ比は、異常所見あり（要生検）群の方が高い傾向を示した。これは乳癌の可能性が高い結果の方がコーピングのために、より集中的に対処が必要であることを示唆しており、乳癌診断の次の精査段階である生検施行時のフォローが必要である。複数の先行研究でも癌疑いの患者の不安とストレスは、精査とその診断結果を待つ期間に強くなり、それは状況の不確実性に伴うものと報告されている。
また乳房良性疾患と診断された 50 名中 14 名（28.0%）が高 HADS 群であった。先行研究では組織生検そのものが不安と恐怖の原因になっていることを指摘している。加えて乳癌と診断された 35 名中 24 名（68%）は高 HADS 群であった。どのような患者群において集中的に心理的介入が必要かを探索するために、その予測因子を検討した。
Time3（病理診断結果説明後）では、HADS 不安得点高値または HADS 抑うつ得点高値は、診断結果に関わらず高 HADS 群の予測因子と同定された。これは確定診断前の予期不安が強い患者群は、乳癌または良性乳房疾患と診断が確定した後に強い心理的ストレスを受ける予測因子であるとの報告と一致する。しかし興味深いことに良性乳房疾患と確定診断された患者群において、有職者と FACT-B の機能的尺度高値の群では心理的ストレスを被るオッズ比が低いことが示された。これは疾患に対する患者のコーピングにこれらの因子が良好に作用していることを意味すると考えられる。しかし先行研究において「relief effect」が報告されており、注意が必要である。「relief effect」とは癌の診断過程において、精査前後の数日は不安・抑うつ得点が低下するものの、精査後 3 ケ月経過後の調査では増加する現象を言う。
また本研究では乳癌診断患者での高 HADS 群の予測因子として、腫瘍径（tumor stage）が示された。先行研究でも癌の臨床病期と心理的ストレスとの関連が示唆されている。これは診断時点で局所進行癌であることが患者のコーピングの妨げとなっていると考えられる。したがって診断時に局所進行癌である患者には不安を軽減し、コーピングを支持する心理的介入が必要であると考えられる。本研究では FACIT-Sp を用い、spirituality についても検討を行った。しかし高 HADS 群の予測因子として統計学的に有意差は認めなかった。先行研究では、乳癌患者において spirituality に関連するニーズは周術期であることが示唆されている。本研究のデザインは乳癌確定診断までの調査で終了しており、周術期のデータ収集を行っていないことが一要因と考えられる。

＜結論＞
本研究では、乳癌を疑われた患者において初診時診察前の段階で、HADS 不安得点・抑うつ得点が高い患者群では診断の全過程において強い心理的ストレスを被る予測因子となっていた。加えて乳癌患者においては、診断時に局所進行癌であった症例は強い心理的ストレスを被るリスク要因であることが示唆された。
この結果より初診時より HADS 得点の高い患者群は、局所進行乳癌患者と同様に、集中的に心理的介入の必要があることが示唆された。

Mullah Saad Habib-E-Rasul 博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1808 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）脳神経機能外科学専攻
学位論文題目	／	Optical analysis of developmental changes in synaptic potentiation in the neonatal rat corticostriatal projection（ラット皮質線条体投射におけるシナプス増強の発達過程の光学的解析） Neuroscience 第 201 巻 338 頁～ 348 頁掲載 平成 24 年 1 月発行
論文審査委員	／	主査：教授 杉原 泉 副査：教授 田邊 勉 副査：教授 田中 光一

論文要旨

＜要旨＞
皮質線条体投射は運動機能を制御する閉鎖回路の一部として知られており、そのなかで長期増強（LTP）と長期抑圧（LTD）という電気生理学的特徴が、運動発達や学習の基礎過程を示すことが示唆されている。我々は膜電位感受性色素を用いた光学的イメージング法を用いて、新生仔ラット（P1-21）皮質線条体投射におけるシナプス増強の発達過程を評価・検討した。
ラットの冠状断スライスを膜電位感受性色素により染色した後、皮質に高頻度反復電気刺激を与え、光学イメージング装置にて線条体における神経細胞の応答を計測した。この反応は早い spike 様のシグナルと遅いシグナルから構成され、それぞれ活動電位と興奮性シナプス後電位に相当するものと考えられた。遅いシグナルは個体発生過程において、P1 の発生段階よりすでに認められ、出生後早期より興奮性シナプス後電位が発現していることが示された。さらに、この遅いシグナルは高頻度反復電気刺激により増強し、その増強効果は 1 時間以上持続して観察され、LTP に相当すると結論した。この LTP は P9 以降の発生段階で認められ、その持続時間は 2 週より 3 週のラットの方が長かった。これらの結果は、皮質線条体投射におけるシナプス機能の研究に光学イメージング法が有用であること、ラット皮質線条体投射の生後発達に伴い、LTP の出現およびその効果の増強が起こっていること、を示している。

【Abstrract】
INTRODUCTION
The basal ganglia play an important role in voluntary motor behaviors, motor memory, and cognitive functions. They receive major inputs from the cerebral cortex and thalamus and send outputs to the cortex via the thalamus and the brainstem. The striatum is an entry point from the cerebral cortex. For motor memory, two kinds of long-lasting synaptic plasticity, viz., long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) can be induced by repeated stimulation. The voltage-sensitive dye imaging technique has advantage as it allows us to easily find the LTP induction positions and to record it for a long time because of less invasiveness. Here we focus on three fundamental topics: if the LTP in the corticostriatal projection is detectable by voltage-sensitive dye imaging, time point of the emergence of the LTP, developmental changes of the LTP.

EXPERIMENTAL PROCEDURES
Preparations
Brains from Neonatal Wistar rats at postnatal day 1–21 (P1–P21) were quickly removed and cooled in iced artificial cerebrospinal fluid (ACSF) (pH 7.4). Transverse slices (n=72) of the cerebral cortex and the striatum, 300 μm thick, were prepared using a Vibratome. Each slice was stained by voltage-sensitive oxonol dye NK3630 (RH482). After staining, the slices were maintained at room temperature for at least 1 h before use.
Electrical stimulation
The corticostriatal projection was stimulated at the cerebral white matter near the dorsolateral striatum using a bipolar electrode. A square current pulse (100–400 μA/250 ms) was delivered four times at 0.1 Hz. LTP was induced by tetanic stimulation using one shot of 100 pulses (100 Hz/1 s duration).
Optical recording
We used multiple-site optical recording of electrical activity. Light from a 300 W tungstenhalogen lamp was collimated, rendered quasimonochromatic with a heat filter and an interference filter with a transmission maximum at 703 ± 12 nm or 700 ± 25 nm, and focused onto the preparation. An objective and a photographic eyepiece projected a real image of the preparation onto a hexagonally arranged photodiodefiber optic camera with 464 photodiodes mounted on an upright microscope. The output of each detector was amplified individually, digitalized, and stored on a computer memory. The optical signals are presented as fractional changes. Absorption voltage-sensitive dye signals were analyzed with the

computer program NeuroPlex.

DiI labeling

The corticostriatal slice preparations dissected from P17 rats were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. A small crystal of DiI (a fluorescent neuronal tracer) was placed on the cerebrum in the preparation. The preparation was stored for 1–2 weeks at 37 ° C. The wet-mounted slice preparation was illuminated using a 250 W xenon lamp system and examined with an epifluorescence microscope equipped with a rhodamine filter set, and photographs were taken with a high-resolution microscope camera controlled by image processor software.

RESULTS

Optical detection of the LTP in the corticostriatal projection

Cortical stimulation elicited optical responses in the cerebrum and striatum. The optical signals consisted of two components, fast spike-like signals and slow long-lasting signals. The slow signals, that represent excitatory postsynaptic potentials (EPSPs), were potentiated by tetanic stimulation. Optical responses were detected prior to and at every 0.5 h after tetanus (0.5–3 h). With tetanic stimulation, in 3 week preparation, the intensity and spread area of the slow signal were potentiated and reached a maximum at 1–1.5 h after tetanus. The potentiation continued at least during the 3 h after tetanization. The distribution pattern of the DiI-labeled corticostriatal projection confirms that the detected optical signal reflects neuronal activity. Without tetanic stimulation, the intensity of the slow signal did not change during 3 h.

Onset of potentiation of the EPSP in the corticostriatal projection

At the P1 and P2 stages, slow signals were observed prior to tetanic stimulation (EPSP is already expressed in the corticostriatal projection), but were very small and they disappeared after tetanus. The slow signal detected prior to tetanus gradually became larger as the development proceeded from P1 to P9. With tetanic stimulation, the EPSP was potentiated from the P9 stage.

Developmental changes in potentiation of the EPSP in the corticostriatal projection

Depending on the amplitude and duration of the potentiation of the EPSP, preparations can be divided into two groups, the second (P9– P12) and the third (P16–P21) postnatal week. Characteristics of the LTP: (1) In both groups, LTP was induced with tetanic stimulation. (2) The potentiation was larger in the third postnatal week (3W) than in the second postnatal week (2W) ($P<0.005$ for 0.5–1 h after tetanus, $P<0.001$ for 1.5–3.0 h after tetanus). (3) In the 2W stage, the potentiation lasted about 0.5–1.0 h, followed by a gradual decline in the signal amplitude, and almost disappeared by 3 h after tetanus. (4) In the 3W stage, the potentiation lasted at least 3.0 h after tetanus.

DISCUSSION

Optical imaging of LTP in the corticostriatal projection

The LTP has been well investigated in the hippocampus. For behavioral memory, the LTP in the hippocampal CA1 region and in the dentate gyrus is divided into different stages: late LTP, lasting longer than 4 h, can be distinguished from early LTP, lasting minutes or several hours, using inhibitors of protein synthesis. It has been suggested that the late phase of LTP is dependent on de novo synthesis of mRNA. In the present study, the stimulation protocol induced LTP even in the P16–P21 stage preparations. Considering the stimulation protocol and the time courses, the LTP observed in this study is considered to be the early LTP.

Functional development of the corticostriatal projection and induction of early LTP

Previously, we recorded the EPSP-related slow signal in the P3 preparation. The present study further confirms that the excitatory synaptic function is already present at the P1 stage. According to previous morphological study the ipsilateral corticostriatal fibers have already reached the corticostriatal border at P0–P1 developmental stage. Our results suggest that synaptic function emerges almost at the same time that the fibers innervate into the striatum.

The EPSP-related slow signal disappeared after tetanic stimulation. Previous study from the embryonic chick and rat brainstem nuclei suggested that the disappearance of the EPSP is due to easy synaptic fatigue by high-frequency stimulation in the immature synapse.

Electrophysiologically LTP was observed at least in the P12 stage. The developmental stage that we observed in this study was earlier than that reported previously.

Developmental changes in characteristics of the LTP

In almost all previous reported studies about corticostriatal projection, early LTP was observed for less than 1.5 h after tetanization. In this study, we observed LTP for 3 h after tetanization, and found a difference in the time course of LTP between 2W and 3W stages. According to previous study the postnatal third week is an intense period of morphological and electrophysiological changes in the striatum. The morphological and electrophysiological changes of the striatal neurons during third postnatal week might be related to the change in the early LTP characteristics.

磯田　健志　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1809 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）発生発達病態学専攻
学位論文題目	／	Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring（BCR-ABL 陽性急性リンパ性白血病の子宮内母子間転移の証明と転移メカニズムの検討） Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 第 106 巻第 42 号　17882 頁～ 17885 頁掲載　平成 21 年 10 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　三浦　修　　副査：教授　木村　彰方　　副査：教授　高瀬　浩造

論文要旨

＜要旨＞

妊娠中に母体に発症した血液腫瘍は、胎児に転移し発症するのか？過去 100 年以上にわたり、母児間での腫瘍細胞転移を示唆する症例が 7 件報告されてきたが遺伝子レベルで両者に発生した腫瘍の同一性を証明できた例はない。我々は、生後 11 ヶ月時に発症したリンパ腫の症例において、腫瘍特異的な染色体転座点の塩基配列を利用し、母親が妊娠中に発症した BCR-ABL1（フィラデルフィア染色体）陽性の急性リンパ性白血病細胞が胎内で児に転移し、リンパ芽球性リンパ腫 (LBL) を発症したことを証明した。児側に転移した母親の腫瘍では、HLA 遺伝子座の片親性ダイソミーによる非遺伝性母アレル（NIMA）の欠損が認められ、転移した腫瘍が児の免疫監視機構から逃れたことがリンパ腫発症のメカニズムと考えられた。本発見から母子間で腫瘍の転移の可能性を考え、担がん妊婦の診療では児への定期的モニタリングなど特別な配慮を払う必要性が示された。さらに本研究は HLA 遺伝子座の NIMA 欠損により母子間で腫瘍細胞の転移が起こったことを確認した初めての例であり、腫瘍細胞の免疫学的排除機構において、重要なモデルを提供している。

＜緒言＞

我々の報告前に、母子間で血液腫瘍が転移した疑い例は、1900 年のリンパ腫のケースをはじめ 7 件報告されていたが、その検証方法は、形態診断、細胞表面抗原解析、核型異常の一致、性染色体の不一致を用いたものであった。男児に女性の性染色体が検出されたとする報告は 3 件あるが、血液系腫瘍で Y 染色体の欠失、あるいは X 染色体が増幅することがあるため、これだけでは転移した細胞が直接母親由来の腫瘍細胞であるとの証明にはならない。また染色体転座が核型解析、FISH 法、cDNA 合成による PCR 法で一致したとしても、遺伝子レベルの切断点が一致しないと、イントロン内の切断点が異なる可能性があり、これらの検証だけでは完全な同一クローン性の証明とはならない。これまで DNA レベルで正確に腫瘍細胞が同一クローンに由来することを確認した報告はなかった。異なる 2 者間で同一クローンを証明する方法として個人識別に利用される、DNA 指紋認証法 (フィンガープリンティング) 法やマイクロサテライト（short tandem repeat: STR）多型、一塩基多型 (SNPs)、ミトコンドリア DNA の塩基多型を利用する方法が挙げられるが、これらの方法は腫瘍細胞と正常細胞の識別はできないため間接的証明にしかならない。腫瘍細胞のクローンの同一性を証明する直接的な指標として、染色体転座のイントロンレベルでの切断点は、腫瘍発生の初期に生じ、特異的で安定的な指標となりうる。このことを利用した例として、一卵性双生児に生じた血液腫瘍で両者の切断点が一致することで、同一クローンに由来し、妊娠中に双方に転移が成立したことを証明した報告がある。我々は、児を出生後 1 か月時に母親が minor BCR-ABL1（フィラデルフィア染色体）陽性急性リンパ性白血病（ALL）を発症し、その児が 10 か月時に minor BCR-ABL1 陽性リンパ芽球性リンパ腫（LBL）ステージ 3（下顎部腫瘤、胸水貯留）を発症した例で、BCR-ABL1 腫瘍クローンが妊娠中の母子間で転移しリンパ腫として発症したのか、そうであればどのようなメカニズムで転移が成立したのか検討を行った。

＜方法＞

母子間転移による腫瘍クローン同一性を証明する方法として、患児胸水の腫瘍細胞 DNA を鋳型として、PCR 法を用いて、BCR-ABL1 融合遺伝子のイントロン内の転座点を同定した。患児由来の BCR-ABL1 配列特異的な PCR プライマーを作成して、母親の骨髄生検のパラフィン切片より抽出した DNA を用いて、FAM 標識プローブを用いた real-time PCR を実施した。母親と児の腫瘍細胞の BCR-ABL1 染色体転座点の塩基配列について PCR 産物を用いて比較した。また代謝異常スクリーニング用濾紙血から特異的 PCR 法で BCR-ABL1 クローンの検出を行った。

母親由来の腫瘍が児に転移したか、児由来の腫瘍が母親に転移したのか検証するため、患児の父親、患児の寛解期の血液、児の下顎部腫瘍、胸水細胞の DNA を用いて、マイクロサテライト領域のゲノム多型 short tandem repeat（STR）を PCR キャピラリーゲル電気泳動法を用いて比較を実施した。

前　目次へ　次

腫瘍細胞の転移成立メカニズムを検証するために、患児の父親、母親、患児、児の下顎部腫瘍の HLA 遺伝子解析を実施し比較を行った。利用可能であった児の腫瘍細胞の DNA を用いて SNP アレイ解析を実施しゲノムの変化を解析した。

＜結果＞
患児由来胸水腫瘍細胞の DNA から BCR-ABL1 融合遺伝子のイントロン上での転座点の塩基配列を同程し患児 BCR-ABL1 特異的プライマーをデザインし、母親の骨髄生検のパラフィン切片より抽出した DNA に対し、FAM 標識プローブを用いた特異的 real-time PCR を実施した。母親の検体でも特異的 PCR は陽性となり、また PCR 産物の遺伝子配列解析の結果から BCR-ABL1 転座点が児と一致することを確認した。これにより、両者の腫瘍が同一の BCR-ABL1 クローンに由来することが示された。また、出生直後の患児の代謝異常スクリーニング用ろ紙血でも同一の BCR-ABL1 融合遺伝子シグナルを検出し、出生直後に児の体内に BCR-ABL1 クローンが存在したことも確認した。この腫瘍が母親、患児のどちらから生じたのかを、マイクロサテライト領域のゲノム多型 short tandem repeat（STR）を PCR キャピラリーゲル電気泳動法で検索し児の腫瘍細胞のパターンは、父と不一致で児の STR パターンと片側が一致することが明らかとなり、母親に由来することが判明した。
さらに、父親、母親、患児の体細胞、患児の腫瘍細胞を用いた HLA 解析で、児の腫瘍細胞で母親の非遺伝性母性抗原（NIMA）である HLA 遺伝子を欠落していることが判明した。この原因を検索するために児の腫瘍細胞を用いて SNP アレイ解析を実施した。児に生じた腫瘍は 6 番染色体短腕の HLA 遺伝子領域に片親性ダイソミー（Uniparental disomy:UPD）を生じており、母親由来の非遺伝性 HLA 遺伝子領域のアレルの欠失が生じ、もう一方の児に遺伝した HLA 遺伝子領域のアレルの倍加が確認された。この HLA 領域の変化が母親由来の腫瘍に生じた結果、児の免疫監視機構は母由来の腫瘍を非自己と認識できず発症につながったと考えられた。

＜考察＞
近年、白血病の HLA ハプロ不一致移植後に、UPD により不一致側の HLA アレルが消失し、再発の原因となっている症例の報告があり、MHC 拘束性の免疫監視機構から逃れ、増殖に有利なクローンが分裂過程で生じることが知られてきている。UPD の機序は、mitotic recombination によるものが考えられているが、詳細なメカニズムはいまだ不明である。今回は母体の白血病細胞の十分量の保存検体がなかったため解析できなかったが、NIMA の欠落クローンが転移後胎児内で生じたのか、既に母体内に微小クローンとして存在していたのかは検証できていない。いずれの場合でも、NIMA 欠落クローンが児側の免疫学的選択圧をかいくぐって転移の成立に至ったと考えられる。
血液腫瘍の母子間転移疑い例は、7 件の報告があるが、急性骨髄性白血病（AML）の一例を除いて、いずれもリンパ系の腫瘍である。造血幹細胞移植後の移植片対白血病効果（GVL）反応が骨髄球系腫瘍に働きやすく、リンパ球系腫瘍に働きにくいこととあわせて考えると、免疫反応の影響を受けにくい腫瘍が、母子間転移、発症につながりやすい可能性を想起させる。報告のあった AML の一例は、母親の HLA がホモ接合性であったために、リンパ球混合試験でも反応が見られず、児の免疫機構から逃れやすくなり母子間転移、発症したことが考察されている。その他の、リンパ球系腫瘍で、HLA 遺伝子領域の変化を検討した報告は、自験例も含め 2 例にとどまっている。今後、母子間転移が考えられた症例においては、腫瘍細胞が免疫監視機構からどのようにのがれているかに注目して解析していく必要がある。また胎児の免疫監視機構と腫瘍発症の間には腫瘍細胞側の要素のみならず、児の免疫監視機構の強度や母親側での腫瘍発症のタイミングも重要と考えられる。症例が少なく、十分な検討はできないが、妊娠の 20 週までは児に侵入した母親の細胞は免疫寛容が働きやすく発症に直接つながる可能性がある。近年、胎児期骨髄由来の T 細胞は調節性 T 細胞に分化しやすく機能的に母由来抗原の寛容を許す報告がなされており、腫瘍細胞の母子間転移にどのように関与するか今後検討が必要である。
今回、母児間で白血病細胞が転移することが遺伝子レベルで確認され、母親に発症した腫瘍は、少ない頻度ではあるが児に転移することが示され、担がん妊娠にともなう児においては定期的に腫瘍発症のモニタリングをする必要が強く示唆された。リンパ系腫瘍の発症は、比較的早期、いずれも一年以内に児での発症が見られており、出生後一年間は十分な経過観察が必要と考えられる。母子間転移により発症した児の治療法は、母体腫瘍の分子遺伝学的特徴を踏まえた治療反応性、腫瘍に対する免疫学的反応性を考慮した適切な治療法の選択を行う必要があると考えられる。転移成立例では、母親側の腫瘍と児側の腫瘍を比較し、腫瘍の生物学的、免疫学的特性から転移成立のメカニズムについて系統だった検討を行う必要がある。このためには、母児双方の検体の保存体制の整備が不可欠と考える。

＜結論＞
① 母親の腫瘍は、頻度は少ないが妊娠中に胎児に転移することがある。
② 母由来腫瘍の片親性ダイソミー（UPD）による HLA 遺伝子領域の変化は、児側の免疫監視機構を回避させ、母子間腫瘍転移の成立に寄与する。

安井　牧人　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1810 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）統合呼吸器病学専攻
学位論文題目	／	Epithelial-mesenchymal transition in chronic hypersensitivity pneumonitis（慢性過敏性肺炎における上皮間葉転換（EMT）） Journal of Medical and Dental Sciences　第 59 巻第 1 号掲載　平成 24 年 3 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　横関　博雄　　副査：教授　烏山　一　　副査：教授　江石　義信

論文要旨

＜要旨＞

慢性過敏性肺炎 (chronic hypersensitivity pneumonitis, CHP) は特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) に認められるような進行性で不可逆性の肺線維化を生じる。過去の報告で、IPF における線維化の機序には myofibroblast が重要であるとされており、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) は、myofibroblast の起源の一つとされている。本研究は、CHP における EMT の役割を評価することを目的として行われ、CHP マウスモデルおよび CHP 患者の肺組織で検討された。免疫組織染色で肺胞上皮細胞における上皮および間葉系マーカーの共発現および western blotting による cadherin switching を EMT の指標として検討された。肺胞上皮細胞における EMT 陽性率は C57BL/6 (Th1 マウス) に比べ A/J (Th2 マウス) で有意に増加していた。A/J マウス Ⅱ 型肺胞上皮細胞における上皮および間葉系マーカーの検討では、PDE 投与群でコントロールと比較し、N-cadherin の発現が増加していた。A/J マウスにおける EMT 陽性率は IL-13 および TGF- β 1 発現（mRNA）、肺組織の fibrosis score、および collagen 量と相関していた。CHP 患者での検討では、中等度の線維化病変において UIP パターンにおける EMT 細胞数が NSIP パターンに比べ有意に増加していた。結論として、Th2 優位な状態を背景に、EMT が CHP における肺線維化のプロセスに重要な役割を果たすと考えられた。

＜緒言＞

慢性過敏性肺炎 (CHP) は鳥関連抗原、真菌、化学物質などの抗原を長期間吸入することにより発症する外因性アレルギー性胞隔炎である。進行すると肺線維化をきたし、特発性肺線維症 (IPF) と同様に予後不良であるが、肺線維化の機序については不明な点が多い。最近、我々は、CHP マウスモデルや CHP 患者において Th2 サイトカインが増加していたことから、Th2 優位な状態が肺線維化に関与していることを報告している。いっぽう、myofibroblast は肺線維化に重要な役割を果たすと考えられており、その起源については、①骨髄由来の fibrocyte、② resident fibroblast、③上皮細胞が間葉系細胞に転換する上皮間葉転換 (EMT) の 3 つが挙げられているが、完全には解明されていない。EMT に関して、腎線維化モデルではエビデンスがあるものの、肺線維化との関与を証明する報告は乏しいのが現状である。Th2 サイトカインの一種である TGF- β が、EMT を誘導することは in vitro の実験で証明されているが、in vivo での報告は少ない。そこで、我々は EMT に注目し、CHP における EMT の関与について、マウスモデルおよび CHP 患者の肺組織にて検討した。

＜方法＞

Th1 優位の C57BL/6(B6) および Th2 優位の A/J マウスに対し、Alum および鳩糞抽出物 (pigeon dropping extracts, PDE) で感作させ、PDE を週 3 回合計 12 週投与した CHP モデルマウス (各群 n=5)、および胸腔鏡下肺生検により得られた CHP 患者 (n=22) の肺組織で、上皮マーカー (thyroid transcription factor-1, TTF-1) および間葉系マーカー (α -smooth muscle actin, α -SMA) による免疫二重染色を行い、二重染色陽性細胞率 (EMT 陽性率) を比較した。また、マウスでは Ⅱ 型肺胞上皮細胞における上皮および間葉系マーカーの発現を western blotting にて評価し、real-time PCR 法によるマウス肺組織中のサイトカイン (IL-4, IL-13, TGF- β) の発現、線維化の指標である肺組織コラーゲン量や線維化スコアと EMT 陽性率の相関について検討した。CHP 患者では、肺病理組織パターンを UIP(usual interstitial pneumonia) パターン (n=11)、fibrotic NSIP(nonspecific interstitial pneumonia pattern) パターン (n=6)、cellular NSIP パターン (n=5) に分類、また、線維化の程度を 0 ～ 5 のグレードに分類し、各組織パターンおよび各グレード別の EMT 陽性率を比較した。

前 目次へ 次

＜結果＞
CHP マウスモデルでの検討では、PDE 投与マウスにおいて胞隔炎の所見を認め、A/J マウスでは B6 マウスに比べ肺胞構造の変化や胞隔の細胞浸潤が強く NSIP 様の所見であった。コントロール (生食投与) マウスでは胞隔炎の所見は認めなかった。免疫二重染色による EMT 細胞の検討では、PDE 投与マウスにおいてコントロールより有意に EMT 陽性率が高く、PDE12 週投与 A/J マウスの陽性率 (mean; 21.3%) は、B6 マウス (8.48%) に比べ有意に高かった。また、A/J マウス PDE12 週投与群における陽性率 (21.3%) は、6 週投与群の陽性率 (11.34%) に比べ有意に高かった。A/J マウスのⅡ型肺胞上皮細胞における上皮および間葉系マーカーの検討 (western blotting) では、PDE 投与群でコントロールと比較し、N-cadherin の発現が増加していた。A/J マウスにおける EMT 陽性率は、interleukin (IL)-13、TGF- β などのサイトカイン発現や、コラーゲン量、線維化スコアと相関していたが、B6 マウスでは相関がみられなかった。CHP 患者の検討では、EMT 陽性率は、fibroblastic foci を有する線維化グレード 3 において高く、UIP パターン、fibrotic NSIP パターンにおける線維化グレード 3 の陽性率は他のグレードに比べ有意に高値であった。線維化グレード別にみると、グレード 2 ～ 3 における陽性率は UIP パターンで fibrotic NSIP あるいは cellular NSIP パターンに比べ有意に高値であった。

＜考察＞
今回 CHP マウスモデルおよび CHP 患者の肺組織において検討を行い、マウスでは Th2 マウスで、ヒトでは UIP パターンでそれぞれ EMT 陽性率が高いという結果であった。
動物モデルにおける臓器線維化と EMT については、腎臓や胆管上皮細胞においてエビデンスがあるが、肺線維化においては、TGF- β により A549 cell が EMT を起こしたという in vitro の報告や、Kim らによるアデノウイルスベクターを用いた TGF- β 高発現トランスジェニックマウスにおいて上皮細胞が EMT を起こしたという in vivo の報告などがある。我々の検討では、Th2 マウスの EMT 陽性率は Th1 マウスに比べ有意に高く、Th2 マウスの EMT 陽性率は IL-13, TGF- β などのサイトカイン発現量やコラーゲン量、線維化スコアと強く相関しており、肺線維化に Th2 優位な状態が関与していることを示唆する所見であった。
ヒトでの検討では、UIP パターンにおける EMT 陽性率は NSIP パターンに比べ高かった。以前、我々は CHP 患者において UIP パターンにおける Th2 ケモカインが NSIP パターンと比べ有意に上昇していることや、UIP パターンの BAL 中の IL-13 は NSIP パターンに比べ高いことを報告している。IL-13 は、EMT 誘導因子である TGF- β を活性化することで肺線維化に関与することが知られており、Th2 優位な状態が EMT による肺線維化のプロセスに大きく関与する可能性が示唆された。もう一つの重要な点は、EMT は fibroblastic foci を覆う上皮細胞に多く認められたということである。Willis らは IPF 患者の肺組織において、fibroblastic foci を覆う上皮細胞での EMT が 80% 以上であったことを報告している。我々の検討では、UIP パターンの EMT 陽性率は fibroblastic foci を有する grade 3 において他の grade に比べ有意に高く、Willis らの報告と合致する結果であった。

＜結論＞
慢性過敏性肺炎における肺線維化のプロセスに EMT が重要な役割を果たすと考えられた。

白　樺　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1812 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）分子細胞遺伝学専攻
学位論文題目	／	A transcriptional variant of LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers（ヒト癌におけるオートファジー関連遺伝子 LC3Av1 遺伝子不活性の意義） Oncogene 掲載　平成 24 年 1 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　水島　昇　　副査：教授　清水　重臣　　副査：教授　三木　義男

論文要旨

<Abstract>
Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3; LC3) has an important role for autophagy pathway. Human LC3 gene family consists of five genes, LC3A (variant-1: v1 and -2: v2), LC3B, LC3B2, and LC3C. While the form modified by phosphatidylethanolamine (PE) (so-called as form-II) for LC3B is localized in autophagosome during the induced autophagy, it is not clear whether other LC3 proteins also function in the autophagy pathway. Here, we examined the association between autophagy and human LC3 proteins during starvation- or p53-induced autophagy in Saos-2 cells. In analysis of intracellular localization of each LC3 protein fused with GFP, GFP-LC3Av1 was frequently localized in autophagosome as the punctate pattern during the induced autophagy as well as GFP-LC3B. Further, endogenous LC3Av1 generated form-II and mostly localized in the LC3B-positive autophagosome during the induced autophagy. Interestingly, we found that LC3Av1, not LC3B, was frequently inactivated at the transcriptional level in various human cancer cell lines (111/244 cell lines, 45.5%) and its inactivation was due to aberrant DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines and primary tumors. These results suggest that LC3Av1, not only LC3B, among human LC3 proteins also functions in the autophagy and further LC3Av1 may be crucial in tumor suppression.

<Introduction>
Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is an intracellular trafficking pathway for bulk degradation of the portions of the cytosol and intracellular organelles in lysosomes. This process involves in the sequestration of cytoplasm and intracellular organelles into a autophagosome, and autophagosomes fuse to lysosomes to become autolysosomes, where sequestered cellular components are digested. Autophagy is important for a number of physiological processes, including adaptation to starvation, prevention of neurodegeneration, presentation of intracellular antigens and tumor suppression .
Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3; LC3) is closely associated with formation of autophagosome during induced autophagy. Human LC3 family consists of four genes, LC3A, LC3B, LC3B2, and LC3C. Among them, LC3A has two transcriptional variants, LC3Av1 and LC3Av2. Until now, differences of physiological function in autophagy or expression pattern in human cancers among these genes remain unknown.
In this study, we examined the association with autophagy for each LC3 protein during starvation- or p53-induced autophagy in Saos-2 cells. We found that LC3Av1 among human LC3 proteins also functions on the autophagy as well as LC3B during the induced autophagy, as indicating by the increase of form-II and the co-localization with LC3B-positive puncta. Interestingly, LC3A variant-1, not LC3B, was epigenetically inactivated by DNA methylation in various human cancer cell lines and primary tumors from ESCC.

<Methods>
We compared the amino acid sequence for human LC3 gene depending on NCBI database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).
In Saos-2 cells that stably transfected with GFP-ratLC3, -LC3Av1, -LC3Av2, -LC3B, -LC3B2 and –LC3C, we examined the localization and lipidation of LC3s during starvation- or infection with adenovirus p53- induced autophagy by immunofluorecence and western blotting.
For the expression data, we used RT-PCR to exam expression of LC3Av1 and LC3B in human cancer cell lines, and quantitive Real-time RT-PCR to exam expression of LC3Av1 in ESCC primary tumors.
DNA methylation was detected by COBRA (combined bisulfite restriction analysis) using HhaI, a restriction enzyme, and Bisulfite sequencing analysis.

<Results>
-Human microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3; LC3) gene family consists five proteins
NCBI database shows that LC3A has two transcriptional variants (variant-1: v1 and variant-2: v2) from the different start sites of transcription, and LC3B2 locates on the different locus from LC3B (LC3B: chromosome 16q24, and LC3B2: chromosome 12q24). LC3Av1 and LC3Av2 are different in N-terminal amino acid sequences. Among LC3B and LC3B2, one different nucleotide results in the different amino acid (Tyr: Y for LC3B and Cys: C for LC3B2 in the 113 amino acid). Further, we compared amino acid sequences for LC3 proteins among vertebrate animals and found as follows: 1) LC3a and LC3b were most of the same among the species, respectively, 2) LC3a (human LC3Av1) and LC3b (human LC3B) were slightly different in each species (in about 15% of amino acids), and 3) the homologues corresponding to human LC3Av2, LC3B2, and LC3C were not yet identified in other species. In addition, LC3Av1 and LC3B are ubiquitously expressed in almost tissues as previously reported, whereas the expression level of LC3Av2, LC3B2, and LC3C is extremely low and/or tissue-specific.
-Localization of human LC3 proteins during the induced autophagy in Saos-2 cells
When autophagy was induced in Saos-2 cells stably expressing each GFP-LC3 proteins, the number of GFP-LC3Av1-positive

前 目次へ 次

puncta was remarkably increased as well as that of GFP-rLC3b and -LC3B, whereas GFP-LC3Av2 and -LC3B2-positive puncta was only slightly increased. The localization of GFP-LC3C was shown as smaller punctate pattern even under normal condition, and the number of its puncta was not increased after the induced autophagy.
Under the condition that autophagy was induced, by additional treatment with lysosomal inhibitor bafilomycin A1 (Baf.A1), the increase of form-II level was shown in GFP-LC3Av1 as well as GFP-rLC3b and -LC3B, not in GFP-LC3Av2 and -LC3B2. GFP-LC3C was hard to detect in western blotting. Importantly, the form-II of endogenous LC3B was equally increased among each clone, indicating that there is no remarkable difference for the efficiency of autophagosome formation among each clone.
-Localization and modification of endogenous LC3Av1 during the induced autophagy
Using a specific antibody of LC3A which has no cross-reaction with other LC3 proteins as we confirmed, form-II of endogenous LC3Av1 was remarkably increased with treatment of Baf.A1 under the condition that autophagy was induced, and showed as punctate pattern as well as that of endogenous LC3B. Meanwhile the positive puncta were remarkably accumulated in the lysosome, as being showed co-localization with LC3Av1 and LAMP-2, a lysosomal marker, as well as that of endogenous LC3B. Furthermore, endogenous LC3B or LC3Av1 was mostly co-localized in the GFP-LC3Av1 or -LC3B-positive puncta, respectively.
-Epigenetic inactivation of LC3Av1 in human cancers
The transcriptional level for LC3Av1 was completely silenced in 111 of 244 cell lines (45.5%) from various tumors. In contrast, LC3B was ubiquitously expressed in all cell lines examined. The protein level of LC3Av1 was decreased as correlation with the transcriptional level in ESCC cell lines.
COBRA (Combined bisulfite restriction analysis) and bisulfite sequencing analysis showed that the CG sites around transcriptional start site of LC3Av1 was methylated only in cell lines and partially of primary tumors without LC3Av1 expression from ESSS, but not in LC3Av1-expressed samples. And the silenced expression of LC3Av1 was remarkably restored by treatment with 5-aza-dC, a demethylation reagent, in LC3Av1-silenced cell lines.
In ESCC primary tumors, we found that the expression level in 6 methylated cases was significantly decreased as compared with that of 32 unmethylated cases (p=0.000005).
-Effect of LC3Av1 expression for tumor growth
To investigate the significance of LC3Av1 inactivation for tumorigenesis, we first generated the clones stably expressing LC3Av1 from KYSE170 (an LC3Av1-silenced cell line) and confirmed a robust expression of LC3Av1 protein in stably LC3Av1-expressed clones, compared with that in vector clones (as the control), by western blotting and immunofluorecsence analyses. Significant difference of growth rate between vector clones and stably LC3Av1-expressed clones could not be detected in vitro growth assay. In contrast, for in vivo growth assay by subcutaneous transplantation with these clones into the flank of nude mice, we showed the significant decrease in both tumor volume and weight of the stably LC3Av1-expressed clone, compared with that in the vector clone (P.0.0204 for tumor volume at 17 days, P.0.0311 for tumor weight). Furthermore, immunohistochemical analysis showed LC3Av1 protein to be continuously expressed in tumors from the LC3Av1-expressed clone, although LC3B protein was similarly expressed in both tumors.. Taken together, these results suggest that LC3Av1 may inhibit the tumor growth in an environment marked by no anchorage and limited nutrients, and the epigenetic inactivation of this gene may contribute to tumorigenesis of ESCC.

<Discussion>
Based on previous reports and genome database, among human LC3 gene family it has been well known that LC3B is crucial for autophagosome formation. One of the key findings in this study is that LC3Av1, not only LC3B, is also associated with autophagy as being frequently localized in autophagosome and generating form-II, during starvation- and p53-induced autophagy in Saos-2 cells. As known, the C-terminal Gly120 is essential for the modification by PE and the localization in autophagosome for LC3B protein. The different amino acid sequence of LC3s together with our localization and ligation data suggest that not only C-terminal Gly120 residue, but also the N-terminus and Tyr113 residue may also contribute to the localization in autophagosome and the modification by PE of LC3 protein.
Recent evidences have suggested that autophagy deficiency may predispose to the initiation of tumor development. Thus, it is speculated the presence of gene aberrations for autophagy-related genes in human cancers. In this study, we found that LC3Av1 was frequently inactivated at the transcriptional level in various human cancer cell lines and at least in part of primary ESCC, and its inactivation was due to epigenetic change through aberrant DNA methylation. The epigenetic aberration being involved in LC3Av1, but not in LC3B, in human cancers strongly suggests that LC3Av1 may have a specific role for tumor suppression.

＜要旨＞
オートファジーは、タンパク質をリソソームで分解するための細胞内の小胞輸送経路の１つである。Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3; LC3) は、オートファジー関連分子として知られており、オートファジー小胞上に局在する。その際、lipidation により修飾されるため、ウエスタンブロットで移動度が大きいバンド（Form-II）が検出される。従って、細胞内での LC3 の点状局在パターンおよび Form-II 量の増加は、オートファジー小胞の存在マーカーとして頻用される。ヒト LC3 遺伝子ファミリーには、LC3A (variant-1, -2)、LC3B、LC3B2、LC3C の５種類のタンパク質が含まれる。これらのうち、マーカーとして頻用されるのは LC3B であり、その他の LC3 におけるオートファジーへの関与については、よく分かっていない。
そこで、我々は、GFP を融合した各 LC3 タンパク質を安定発現する Saos-2 細胞を樹立し、栄養飢餓あるいは p53 活性化により、オートファジーを誘導した際の局在の変化を調べた。その結果、５種類のヒト LC3 タンパク質のうち、既知の LC3B と同様に LC3Av1 もまた、オートファジー誘導時において、点状局在パターンおよび Form-II 量の増加が認められた。また、２重蛍光染色法により、LC3Av1 と LC3B は、同一のオートファジー小胞上に局在することが明らかになった。さらに、興味深い事に、LC3Av1 の発現は、様々な癌細胞株および食道癌臨床検体において、エピジェネティックな異常により、高頻度に不活性化していた。
今回の研究により、ヒト LC3 遺伝子ファミリーのうち、既知の LC3B に加えて LC3Av1 もまた、オートファジーに深く関与する事が示唆された。また、癌において、LC3Av1 のみが高頻度に不活性化しているという所見は、LC3Av1 に特異的な機能が存在し、その機能消失が癌化に寄与する可能性が推測される。

髙橋　真　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1814 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）脳神経病態学専攻
学位論文題目	／	Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum.（SCA6 小脳における BDNF mRNA 発現量の減少と BDNF 抗体陽性顆粒の存在）Neuropathology 掲載　平成 24 年 3 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　田邊　勉　　副査：教授　岡澤　均　　副査：教授　田中　光一

論文要旨

＜要旨＞

脊髄小脳変性症 6 型（spinocerebellar ataxia type 6: SCA6）は、電位依存性 α 1A カルシウムチャネル (Cav2.1) の C 末端にある polyQ 鎖のわずかな伸長によって起こるポリグルタミン病 (polyQ 病) の一つである。病理学的にはプルキンエ細胞の脱落が見られ、また Cav2.1 の C 末端に対する抗体により染色される凝集体が、残存するプルキンエ細胞の主に細胞質に認められる。

他のポリグルタミン病において、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現量の減少が病態にかかわる可能性が示唆されている。そこでわれわれは SCA6 患者小脳における BDNF の mRNA 発現量を quantitative real-time PCR (qRT-PCR) により、また BDNF のたんぱく発現を免疫染色により調べた。SCA6 患者小脳 3 検体と、正常コントロール 6 検体の比較において、BDNF mRNA の発現量は SCA6 小脳において優位に低下していた。また BDNF 抗体による免疫染色では、SCA6 小脳で特異的にプルキンエ細胞の樹状突起に沿って多数の顆粒状の構造物が認められた。1C2 抗体と BDNF 抗体との 2 重免疫染色では、BDNF 抗体陽性顆粒のより近位に 1C2 抗体陽性の凝集体が認められたことから、樹状突起内での BDNF たんぱく輸送に異常が引き起こされている可能性が考えられた。以上より BDNF の mRNA の発現量の低下ならびに BDNF タンパクの異常な細胞内局在が SCA6 の病態に関わっている可能性が示唆された。

＜緒言＞

SCA6 は平均 45.5 歳と高齢で発症し、進行性の小脳失調を特徴とする常染色体優性の神経変性疾患である。現在まで知られている 9 種類の polyQ 病の一つであり、Cav2.1 の C 末端にある polyQ 鎖のわずかな伸長により引き起こされる。病理学的には小脳皮質のプルキンエ細胞の脱落を認める。polyQ 鎖の伸長がどのように病態に関わるのかはまだ不明であるが、残存するプルキンエ細胞内に認められる Cav2.1 抗体陽性の凝集体が病態にかかわっている可能性がある。

SCA6 は他の polyQ 病とは異なる二つの大きな特徴を有している。一つに他の polyQ disease では正常長の範囲にある程 polyQ 鎖長の伸長が短いこと（正常人：4-19 リピート、SCA6：20-33 リピート）、もう一つは、他の polyQ 病においては polyQ を持つ原因タンパクによる凝集体が主に核内に認められるが、SCA6 では Cav2.1 の C 末端の凝集体が主に細胞質に認められることである。これらの特徴は、SCA6 の病態が他の polyQ 病の病態とは異なる可能性を示唆する。

BDNF は多くの神経細胞が発現する多機能の栄養因子であるが、アルツハイマー病、パーキンソン病などの変性疾患や他の polyQ 病において BDNF 発現量の減少が報告されている。ハンチントン病患者脳においては被核、淡蒼球での BDNF 遺伝子発現量の低下が報告され、またハンチントン病モデルマウスの線状体に BDNF を過剰発現させることにより症状を改善させることが報告されており、BDNF の減少は polyQ 病の病態に関与するとともに治療のターゲットとなりうる可能性がある。

以上の背景から、我々は SCA6 の病態に BDNF が関与しているかを調べるため、SCA6 小脳における BDNF mRNA の発現量を qRT-PCR により、また BDNF タンパクの発現を免疫染色により調べた。

＜方法＞

SCA6 患者 3 名、ならびにコントロールとして神経疾患でない患者 6 名の小脳半球より total RNA を抽出し、qRT-PCR により BDNF mRNA の発現量をしらべた。BDNF mRNA の発現量は GAPDH mRNA を internal control として⊿⊿CT 法により調べた。統計学的優位差は Mann-Whitney U テストを用いて解析した。

BDNF タンパクの発現量、局在について調べるため、SCA6 患者 5 名の小脳切片と、コントロールとしてハンチントン病患者 3 名、SCA2 患者 1 名、SCA3/MJD 患者 1 名、DRPLA 患者 1 名、パーキンソン病患者 1 名、SCA31 患者 2 名の小脳切片を、抗 BDNF 抗体（sc-546 (N20)）を用いて免疫染色を行った。また SCA6 の Cav2.1C 末端の凝集体と BDNF 抗体陽性顆粒との関連を調べるため、SCA6 患者小脳切片を用いて、1C2 抗体と抗 BDNF 抗体による蛍光 2 重

免疫染色を行った。

＜結果＞
SCA6 患者小脳での BDNF mRNA 発現量はコントロール患者小脳に比して優位に減少していた（SCA6: 0.4294 ± 0.1458, control: 0.8212 ± 0.2460; p=0.0201）。
また BDNF 蛋白発現を抗 BDNF 抗体による免疫染色にて調べたところ、5 例の SCA6 患者小脳すべてにおいて、染色性の強弱はあったものの BDNF 抗体陽性の顆粒状物質がプルキンエ細胞の樹状突起に沿って認められた。コントロール小脳では同様の所見は認めず、プルキンエ細胞と顆粒細胞に非常に弱い染色性を認めるのみであった。
SCA6 小脳で抗 BDNF 抗体と 1C2 抗体での 2 重免疫染色を行ったところ、BDNF 抗体陽性顆粒を認める樹状突起の、その近位側に 1C2 陽性の凝集体を認めた。また BDNF 陽性抗体顆粒は樹状突起の内部だけでなく、外側にも存在しているような所見が得られた。

＜考察＞
今回の実験で二つの結果を得た。一つは SCA6 小脳において BDNF mRNA 発現量が低下していたことである。BDNF は神経栄養因子の一つで、神経再生、分化、生存、神経可塑性など多種の働きに関わる。中枢神経で広範囲に発現しており、プルキンエ細胞を含め小脳皮質においても発現している。他のポリグルタミン病において BDNF 異常の関与が示唆されており、特にハンチントン病においては、培養細胞モデル、動物実験モデル、ならびにヒト組織において BDNF の発現量の低下が多数報告されている。またハンチントンモデルマウスにおいては線状体での BDNF の過剰発現による症状を改善も報告されている。変異型 atrophin-1 を発現する DRPLA 培養細胞モデルや、SCA1 モデルマウスにおいても BDNF の発現量低下が認められ、後者においては 3, 4-diaminopyridine 投与により症状の改善とともに BDNF の発現量が上昇することが報告されている。またアルツハイマー病やパーキンソン病など他の変性疾患においても BDNF の発現量の低下が報告されており、多種の神経変性疾患において、その病態に関与する可能性が示唆されている。SCA6 においても BDNF の発現量の低下を認めたことは上記の変性疾患同様、SCA6 の病態に関与している可能性が示唆された。
今回の実験では SCA6 における BDNF の発現量低下のメカニズムについては調べていないが、ハンチントン病においては、正常ハンチンチンタンパクがもつ BDNF 転写活性が、polyQ の伸長により阻害されることや、異常ハンチンチンが核内で cyclic-AMP responsive element binding protein (CREB)-binding protein (CBP) と凝集することにより、CREB の転写を阻害することが想定されている。SCA6 においてプルキンエ細胞には核内凝集体はほとんど認められず、上記のメカニズムとは異なる可能性も考えられるが、我々が最近作成した SCA6 培養細胞モデルでの実験により細胞質の Cav2.1 の凝集体が CREB、リン酸化 CREB と凝集することにより、核内の CREB、リン酸化 CREB の減少を引き起こし、CREB の転写を抑制する可能性が示唆された (論文投稿中；現在 revise 作成中)。SCA6 においても CREB の転写抑制が BDNF の発現低下に関与している可能性も考えられ、今後のさらなる研究が必要と思われる。
今回の実験で得られたもう一つの結果は、SCA6 小脳の残存プルキンエ細胞の樹状突起に沿って異常な BDNF 抗体陽性顆粒が認められたことである。他疾患の小脳では同様の所見は認めず、SCA6 に特異的な所見であると考えられた。なお光学顕微鏡下において BDNF 抗体陽性顆粒は樹状突起の内部だけでなく、外部にも存在するような所見も認めた。この所見は変性した樹状突起の sprouts を見ている可能性や、樹状突起より分泌された BDNF をみている可能性も考えられたが、電子顕微鏡によるさらなる詳細な観察が必要と思われた。
今回みられた BDNF 抗体陽性顆粒が形成されるメカニズムは不明であるが、プルキンエ細胞の primary shaft など、1C2 抗体陽性の凝集体が BDNF 抗体陽性顆粒のより近位部に認められたこと、Cav2.1 凝集体がプルキンエ細胞の樹状突起内にも認められること、BDNF は樹状突起内を両方向性に輸送される事実などから、凝集体による BDNF の細胞内輸送の障害をそのメカニズムと想定した。しかし、SCA6 と同様にプルキンエ細胞の細胞質内に凝集体を形成する SCA2 では BDNF 抗体陽性顆粒は認めず、SCA6 においては他の要因が関与している可能性も示唆され、今後さらなる研究が必要と考えられた。

＜結論＞
SCA6 患者小脳において BDNF　mRNA 発現の低下と、異常な BDNF 抗体陽性顆粒の存在を認めた。今後これらの異常を来す正確なメカニズムを調べることにより、SCA6 治療法に結び付く可能性があると思われた。

小野　宏晃　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1815 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）腫瘍外科学専攻
学位論文題目	／	SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation（SIX1 は大腸癌において ZEB1 を介して上皮間葉転換を誘導する） Oncogene 掲載　平成 24 年 1 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　三木　義男　　副査：教授　江石　義信　　副査：講師　深町　博史

論文要旨

＜要旨＞

上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) は胎生期における臓器形成や、臓器線維化・創傷治癒といった病態に関わるだけではなく、現在、悪性腫瘍における癌細胞の発展に深く関与することが知られている。今回、我々は大腸癌における EMT に着目し、遺伝子発現アレイを用いた網羅的な遺伝子解析を施行した。大腸癌細胞株を用いて上皮系細胞株と間葉系細胞株のゲノムワイドな網羅的な発現プロファイルを作成し、それらの発現レベルを比較、さらに遺伝子オントロジーを用いた機能的解析を統合することで、EMT 関連遺伝子として機能する遺伝子の同定を試み、最終的に候補遺伝子として 11 遺伝子を抽出した。これら遺伝子の中で、我々は機能的重要性に着目し、大腸癌における EMT 誘導因子として、SIX1 遺伝子を同定した。大腸癌細胞株 SW480 に SIX1 を遺伝子導入すると、紡錘形への間葉系形質への細胞形態の変化、癌細胞の遊走・浸潤能の亢進が認められ、かつ EMT における重要な制御因子である E-cadherin の mRNA およびタンパクレベルでの発現低下が誘導されることを明らかにした。さらに大腸癌臨床検体を用いた免疫組織化学染色においても、大腸癌の腫瘍先進部では SIX1 と ZEB1 が相関し、E-cadherin では相反する染色発現パターンが示し、進行大腸癌における生存解析では SIX1 発現と予後との関連性が示唆された。さらに、E-cadherin の発現低下は miR-200 family の発現低下および ZEB1 発現上昇を介した経路による発現変化することを示し、SIX1 は大腸癌において、一部 ZEB1 を介した経路により、E-cadherin の発現低下を伴うことで EMT に深く関与することを明らかにした。

＜諸言＞

本邦における死因として、悪性新生物は現在主たる疾患となり、その中で大腸癌は増加傾向にある。診断および治療技術が発展した現在においても、進行大腸癌はリンパ節や肝臓をはじめとした多臓器転移をきたし、その予後は不良である。現在、浸潤や転移に関わる重要な現象として上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition:EMT) が注目されている。EMT は臓器形成や創傷治癒など様々な病態に関わるだけではなく、癌の浸潤や転移に深く関与することがすでに知られている。EMT を生じた癌細胞は、上皮性から間葉系への形態変化することで、細胞の遊走・浸潤能が亢進し、癌細胞がより悪性度の高い形質を獲得する結果、多臓器への転移をきたすことで生命予後への深い関連性が示唆されている。SIX1 遺伝子は肝癌や卵巣癌といった様々な癌種において、発現が増幅しかつ予後と相関するが知られている。最近の知見では、乳癌における SIX1 遺伝子の EMT への関与が示唆されているが、大腸癌においては SIX1 遺伝子の機能に関しては未だ明らかになっていない。

本研究では、SIX1 遺伝子は大腸癌において腫瘍特異的に発現することを明らかにしただけではなく、SIX1 遺伝子が ZEB1 を介し EMT を誘導することを明らかにした。

＜方法＞

大腸癌細胞株における間葉系細胞株である SW620 と、上皮系細胞株である DLD-1、HCT15 および HT29 を Agilent 社 4 × 44k 遺伝子発現アレイを用いて、網羅的発現解析を施行した。さらに遺伝子オントロジー (GO) 解析を行うことで、運動能に関連する遺伝子を選出した。real-time RT-PCR による mRNA 発現解析で、間葉系細胞株で特異的に発現亢進する EMT 関連候補 11 遺伝子を選出した。その中で、SIX1 遺伝子に着目し、Flag タグ付き発現コンストラクトを作成、遺伝子導入し大腸癌細胞株 SW480 の SIX1 安定発現株を樹立した。その後 SW480 における Empty vector と SIX1 安定発現株、および Empty vector/siRNA-ZEB1 transfection 後、各遺伝子発現変化の解析は real-time RT-PCR を用いた mRNA レベル、およびウエスタンブロッティング法や蛍光免疫染色法によるタンパクレベルでの解析を施行した。また同様に Wound healing assay 法や Boyden chamber を用いた migration/invasion assay 法にて癌細胞の遊走・浸潤能の変化を解析した。東京医科歯科大学医学部付属病院における手術標本での、SIX1 遺伝子の免疫組織化学染色を施行しヒ

前　目次へ　次

ト大腸癌における SIX1 発現解析と、E-cadherin や ZEB1 との染色パターンの発現、および SIX1 発現と予後との関連を解析した。

＜結果＞
大腸癌細胞株において、間葉系形質である SW620 と上皮系形質である DLD-1、HCT15、および HT29 を用いた網羅的遺伝子発現解析を施行した。そこで間葉系形質で特異的に発現上昇する遺伝子に着目し、遺伝子オントロジーを用いた機能的解析を統合することで細胞遊走能に関連する遺伝子で、かつ既知の EMT 関連遺伝子を除いた大腸癌における新規 EMT 関連 11 候補遺伝子を選出した。
それら遺伝子の中で、①転写因子である、②肝臓癌や卵巣癌など種々の癌において発現亢進が報告されている、③乳癌において TGF- β を介して EMT 誘導することが報告されている、④大腸癌においてはその発現や機能はわかっていない　ホメオボックス遺伝子 SIX1 に着目した。
18 大腸癌細胞株における SIX1 の mRNA 発現解析では 8 細胞株 (44%) が発現陽性だった。またウエスタンブロッティング法では SIX1 は、E-cadherin と相反する発現パターンを示し間葉系マーカーとしての可能性を示唆した。
Flag タグ付き発現コンストラクトを作成し、遺伝子導入し大腸癌細胞株 SW480 の SIX1 安定発現株を樹立した。位相差顕微鏡において癌細胞が紡錘形への形態変化をきたし、蛍光免疫染色法では核内で転写因子 SIX1 が過剰発現する安定発現株では、細胞膜に局在する上皮マーカー E-cadherin の発現低下をきたしていることが分かった。ウエスタンブロッティング法を用いたタンパク発現解析では、E-cadherin 発現亢進および Vimentin 発現低下を認めたが、real-time RT-PCR 法による mRNA 発現解析では、E-cadherin 発現低下が確認された。Wound healing assay 法では SW480 Empty vector に対し、SIX1 安定発現株では遊走能の亢進が認められ、migration/invasion assay 法では有意差を持って SW480 Empty vector に対し、SIX1 安定発現株では遊走・浸潤能の亢進が認められた。これら実験結果から SW480 において SIX1 の発現により EMT を誘導することが示された。次に大腸癌臨床検体を用いて SIX1 タンパク発現解析を行った。同一検体内においても正常大腸粘膜では SIX1 の発現は認められず、癌部では SIX1 の発現が認められた。また、大腸癌臨床検体における正常大腸粘膜と癌組織それぞれの mRNA 発現解析では、SIX1 は正常粘膜に対し癌組織において有意差を持って発現亢進していた。大腸癌における SIX1 免疫反応性は腫瘍にわたり認められ、特に E-cadherin の発現低下を認める腫瘍先進部では SIX1 と相反する発現パターンを示していた。Stage Ⅲ + Ⅳの進行大腸癌における生存解析では、SIX1 発現と予後との関連性が示唆され、SIX1 が大腸癌における予後因子としての可能性が示唆された。
次に E-cadherin を転写レベルで発現制御する ZEB1 および SNAI1 の発現解析を行った。ZEB1 は SIX1 安定発現株では、mRNA の発現上昇は認められなかったが、タンパクレベルでの発現上昇が認められた。一方、SNAI1 は mRNA およびタンパクレベルにおいても発現変化は認められなかった。SIX1 安定発現株に siRNA を用いた ZEB1 発現抑制実験では CDH1 の発現回復が認められ、その発現回復も SIX1 安定発現株が Empty vector と比し発現回復がより明らかであった。SIX1 発現により亢進した遊走・浸潤能が、siRNA による ZEB1 発現抑制により運動能が抑制された。大腸癌臨床検体では未分化傾向を示す病変部位で、SIX1 と ZEB1 は発現パターンが一致し、CDH1 は相反する発現パターンを示した。ZEB1 発現解析から、タンパクレベルの発現亢進を示すことから miRNA の関与を考え、miR200-family の発現解析を施行したところ、miR141、200a、200b、200c いずれにおいても SIX1 安定発現株において発現低下していた。これら miR-200 family の発現低下が転写レベルであるかを luciferase assay を用いて調べた。miR-200b/200c/429 のプロモーター活性は SIX1 安定発現株で有意に低下している事を示し、SIX1 は miR-200 family を転写レベルで発現抑制している事を明らかにした。次に ectopic に miR200-family をそれぞれ transfection し過剰発現させると、SIX1 安定発現株では Empty vector と比較すると ZEB1 発現低下は同様であったにもかかわらず、E-cadherin のより著名な発現回復を mRNA レベルと、ウエスタンブロッティング法および蛍光免疫染色によるタンパクレベルにおいて認め、SIX1 安定発現株におけるより clear な MET を確認した。

高　培　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1816 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）創薬化学 I 専攻
学位論文題目	／	Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of Ganoderma lucidum (reishi mushroom)（霊芝胞子の抗腫瘍活性を示す炭素数 19 脂肪酸類の単離と同定） Fitoterapia 掲載　平成 23 年 12 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　安原　眞人　　副査：教授　玉村　啓和　　副査：教授　細谷　孝充

論文要旨

<Summary>
Ethanolic extracts of spores of Ganoderma lucidum showed inhibitory effect on tumor cell proliferation and induction effect of apoptosis to HL-60 cells. Spectrometric data indicated that several long chain fatty acids were contained in the spores, particularly carbon-19 (C-19) fatty acids were predicted to effectively contribute to these biological activities. Two of these C-19 fatty acids were identified as their 2-naphthyl esters after esterification of a mixture of fatty acids obtained from the spores. From 250g of Ganoderma lucidum spores, 1.8 mg of nonadecanoic acid 2-naphthyl ester and 2.8 mg of cis-9-nonadecenoic acid 2-naphthyl ester were isolated and characterized by means of spectroscopic and chemical comparison with authentic samples. The location of the double bond of cis-9-nonadecenoic acid was determined by GC-MS analysis, based on the fragmentation pattern of the adduct prepared from the fatty acid and dimethyl disulfide.

＜ Introduction ＞

Though the fruiting body of Ganoderma lucidum (G. lucidum) had been utilized as medicine for several thousand years in China, the spores of G. lucidum were realized and utilized only in the 20th century owing to the difficulty of collecting wild spores. Clinically beneficial effects of G. lucidum for treatment of various kinds of diseases have been confirmed in pharmacological studies in recent years. The major bioactive components in fruiting body are reported to be polysaccharides and oxygenated triterpene. The spores contained amounts of bioactive substances like the fruiting body.

We have reported that the mixtures of long-chain fatty acids in the spores of G. lucidum inhibit proliferation of various human cancer cells. Mass and NMR data indicated that the mixture mainly contained fatty acids with carbon numbers of 16 to 20. Using several authentic long chain fatty acids, we showed that C19:0 fatty acid had the highest inhibitory activity on HL-60 cell proliferation and that C19:1 fatty acid potently induced apoptosis of HL-60 cells. Fatty acids in spores of G. lucidum have already been studied by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry, which identified 16- and 18-carbon fatty acids as major constituents, but 19-carbon fatty acid was not detected. Therefore, the aim of the present study is to ascertain whether or not the C19 fatty acids actually have anti-tumor activity and to determine the position of the double bond in the C19:1 fatty acid.

＜ Methods ＞

The isolation of C-19 fatty acids was carried out in a series of several steps as follows; ethanol extraction, multiple fractionations using column chromatography, 2-naphthyl ester derivatization, and isolation by preparative HPLC.

The dried spores of G. lucidum were extracted with EtOH. To obtain fatty acids fraction, the extract was purified by repeated column chromatography on silica gel with hexane/CHCl3, CHCl3 and CHCl3/MeOH gradients. A mixture of fatty acids was collected from CHCl3 and 10% MeOH-CHCl3 solution. The fatty acids were derivatized to 2-naphthyl ester with 2-naphthol and trifluoroacetic acid anhydride, and then separated by reverse-phase HPLC. Ten commercially available fatty acids (C14:0-C20:0, C18:1, C18:2, C19:1) were esterified with 2-naphthol in the same manner and HPLC conditions were determined with these authentic samples. The separation of 2-naphthyl esters were performed with octadecylsilyl silica (C18: m-Bondasphere and L-column2) and triacontylsilyl silica (C30: Develosil) based columns. Mobile phase used was a two-component solvent system of acetonitrile-0.1% TFA water with successive linear gradients (0-15 min: 85% CH3CN-0.1% TFA-H2O, 15-25 min: 95% CH3CN-0.1% TFA-H2O, 25-30 min: 100% CH3CN). Using the C30 column, this system could separate all the standard esterified fatty acids in 70 min. A mixture of fatty acids obtained from ethanolic extracts of G. lucidum spores was analyzed according to the procedures mentioned above. The result indicated that the major fatty acids were C18:1 and C16:0,

前　目次へ　次

followed by C18:2, C18:0, C14:0 and C15:0. On the other hand, C19:0, C19:1and C17:0 were present as minor components.
To isolate C-19 fatty acids, further purification of the minor components was repeated by a combination of two HPLC systems with C30 and C18 columns. Finally, 1.8 mg of C19:0 fatty acid 2-naphthyl ester and 2.8 mg of C19:1 fatty acid 2-naphthyl ester were obtained from 250 g of G. lucidum spores.

<Results >
C-19 fatty acids 2-naphthyl ester isolated from extracts of spores were analyzed by NMR, HPLC and MS spectrum by comparison with 2-naphthyl derivatives of standard fatty acids. The location of the double bond of C19:1 was determined by GC-MS analysis, based on the fragmentation pattern of the adduct prepared from the fatty acid and dimethyl disulfide. As a result, the one of the C-19 fatty acids in the mushroom was identified as nonadecanoic acid, and another C-19 fatty acid was identified as cis-9-nonadecenoic acid.
Two C-19 fatty acids, C19:0, C19:1(Δ 9), obtained from the spores and a commercially available cis-10-nonadecenoic acid were assayed for induction of apoptosis by annexin-V FITC/PI double staining assay. The measurement was carried out by flow cytometry of FITC-labeled HL-60 cells which were visualized with a confocal laser scanning microscope. The results indicated that all of the tested fatty acids induced apoptosis of HL-60 cells in a dose-dependent manner, and the activity was consistent with the previous data: C19:0 < C19:1(Δ 9) = C19:1(Δ 10).

<Discussion >
Fatty acids are usually considered as essential nutrients in both human and animal diets, but they are also reported to possess numerous health benefits and to be useful for diagnosis of certain diseases. As a traditional medicine, G. lucidum has received considerable attention, and a large variety of biological activities has been described. However, due to the difficulties of isolation and purification, as well as low extraction yields, little is known about the nature of bioactive C-19 fatty acids. In our previous study, C19:0 and C19:1 fatty acids were predicted to be responsible for the anti-tumor cell proliferation activity, based on fractionation and activity assay of ethanolic extracts of the spores of G. lucidum. The results of GC-MS analysis indicated that 16- and 18-carbon fatty acids were major constituents of G. lucidum spore lipid samples, and 19-carbon fatty acids were not found. Therefore, in this work, we examined in detail the presence and activity of C-19 fatty acids in the ethanol extract of G. lucidum spores.
In this research, the isolation of C-19 fatty acids as active compounds was carried out using ethanol extraction, multiple column-chromatographic fractionations, 2-naphthyl ester derivatization, and isolation by preparative HPLC. The structure of the separated compounds was identified on the basis of 1H-, 13C- NMR and MS spectral data. This is the first in-depth study of the carbon-19 fatty acids from spores of G. lucidum.

<Conclusion>
The present study is the first report to present evidence that nonadecanoic acid and cis-9-nonadecenoic acid from spores of G. lucidum have anti-tumor activity.

＜要旨＞
MTT 法によるヒト血液癌細胞に対する細胞毒性作用と HL-60 に対するアポトーシス誘導活性を指標として、霊芝胞子中の抗腫瘍活性成分を探索した結果、長鎖脂肪酸分画に活性が見出された。脂肪酸分画中には炭素数 16 から 20、二重結合数 0 から 3 までの脂肪酸の存在が確認され、特に炭素数 19（C19）の脂肪酸類が活性に強く関与していることが示唆された。霊芝胞子中にはこれまで C19 脂肪酸類の存在は報告されていないため、私は霊芝胞子中から C19 脂肪酸類を単離して、構造を決定し、抗腫瘍活性との関連を検討した。
霊芝胞子をエタノールで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで脂肪酸の混合物を分画した。物性のよく似た脂肪酸混合物中から C19 脂肪酸類を単離するためには HPLC が最適であると考え、脂肪酸類を UV 検出が可能な 2- ナフチルエステルに誘導した後、HPLC により単離・精製した。HPLC の測定条件は 10 種類の市販脂肪酸を標品として詳細に検討し、精製の進行状況に応じてカラムや溶出溶媒系の組み合わせを変えて最適化した。250g の胞子から、最終的に、1.8 mg の nonadecanoic acid（C19:0）と 2.8 mg の cis-9-nonadecenoic acid（C19:1D9) をそれぞれ 2- ナフチルエステル体として単離し、1H-、13C-NMR、HR-FAB-MS により構造を決定した。C19:1 の二重結合の位置は、脂肪酸にジメチルジスルフィドを付加し、GC-MS のフラグメントパターンにより決定した。こうして霊芝胞子中から初めて C19 脂肪酸類を単離･同定することに成功し、さらに 2 つの C19 脂肪酸の HL-60 に対するアポトーシス誘導活性を調べ、その作用を確認した。

藤田　浩二　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1817 号
学位授与	／	平成 23 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）整形外科学専攻
学位論文題目	／	Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion（ビタミン E は破骨細胞融合を刺激し骨粗鬆症を引き起こす） Nature Medicine　平成 24 年 2 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　野田　政樹　　副査：教授　久保田　俊郎　　副査：准教授　森田　定雄

論文要旨

＜要旨＞

ビタミン E 輸送タンパクである α TTP を欠損したマウスの解析を通して、骨代謝におけるビタミン E の意義を明らかにするために本研究を行った。その結果、α TTP 欠損マウスが骨吸収低下に伴う骨量増加を示すこと、破骨細胞培養系にビタミン E を添加すると破骨細胞の融合、多核化が促進すること、野生型マウスにビタミン E 添加食を投与すると骨吸収が増加し骨量が減少することを明らかにした。この研究により、ビタミン E は生体内で破骨細胞融合を促進し、骨量減少を引き起こすことを明らかにし、ビタミン E 摂取が骨粗鬆症を惹起する可能性を示唆した。

＜緒言＞

高齢化社会の到来につれ、骨粗鬆症患者数は激増している。骨代謝調節作用に関して、ビタミン D や K の研究の進展は著しく、また骨粗鬆症治療薬として臨床的に広く用いられている。同じ脂溶性ビタミンのビタミン E は抗酸化作用を示すと考えられており、薬剤、サプリメントとして広く摂取されているが、骨代謝に対する影響は明らかにされておらず、ビタミン E 作用の分子機構自体にも未だ不明な点も多い。ビタミン E の 8 つの異性体のうち、生体内では α -tocopherol が主に活性を持つ。小腸から吸収された α -tocopherol は肝臓で α -TTP(tocopherol transfer protein) と結合し末梢組織へ供給される。我々はビタミン E 欠乏のモデルマウスで、不妊や歩容障害（ataxia）の表現系が知られる α TTP 欠損マウスの解析を通して、ビタミン E の骨代謝における意義を分子生物学的、組織学的、生化学的に解明することを目的として本研究を行った。

＜方法＞

野生型マウス、α -TTP 欠損マウス、DC-STAMP 欠損マウス、DC-STAMP 過剰発現マウスについて、骨量計測、骨形態学的な計測、食餌による骨量変化を計測した。食餌は日本クレアの CE-2 を通常食とし、これに α -tocopherol（600mg/kg）を添加したものとビタミン E 添加食とした。

in vtro での α -tocopherol の破骨細胞に対する影響の検討は、マウス大腿骨から採取した骨髄由来マクロファージを M-CSF 添加培地で 2 日間培養し、その後 M-CSF，RANKL 添加培地で 3 から 4 日間培養することで破骨細胞培養を行い、この系に α -tocopherol を添加することで行った。骨芽細胞は生後 2 日のマウス頭蓋骨から分離培養して、実験に用いた。dentin を用いた破骨細胞による骨吸収能の計測、siRNA を用いた破骨細胞での遺伝子の特異的ノックダウン、レトロウイルスを用いた破骨細胞での遺伝子の過剰発現は過去の報告に従った。

＜結果＞

α -TTP 欠損マウスでは輸送タンパクの欠損により血中の α -tocopherol 濃度が著しく低下していた。このマウスを骨形態学的に計測したところ、骨吸収減少に伴う骨量増加を示した。一方、骨形成には変化がなかった。続いて α -TTP 欠損マウスにビタミン E 添加食を 8 週間投与すると、血中 α -tocopherol 濃度は改善し、同時に骨量も正常化した。

野生型マウスから採取した破骨細胞前駆細胞に M-CSF、RANKL を添加し、破骨細胞分化を誘導する際、同時に α -tocopherol を添加すると、α -tocopherol 非添加群と比べ破骨細胞の多核化が促進し、同時に骨吸収能が亢進した。この α -tocopherol による多核化促進効果は、破骨細胞成熟期である RANKL 刺激後 2 ～ 3 日目にのみ α -tocopherol を添加しても認められた。一方、α -tocopherol は破骨細胞前駆細胞の増殖や破骨細胞のアポトーシスには影響せず、骨芽細胞培養系に添加しても変化は認められなかった。α -tocopherol の異性体やその他の抗酸化剤を同様に破骨細胞培養系に添加する実験を行ったが、破骨細胞多核化促進作用は α -tocopherol に特異的であった。

同培養系で、α -tocopherol の添加により破骨細胞多核化に必須である DC-STAMP の遺伝子発現が特異的に亢進した。また、破骨細胞前駆細胞で DC-STAMP をノックダウンすると α -tocopherol による多核化の促進は認められず、同様に、

前 目次へ 次

DC-STAMP 欠損マウスから採取した破骨細胞前駆細胞を用いた場合、α -tocopherol の添加による多核化の促進は認められなかった。さらに、α -TTP 欠損マウスの骨では DC-STAMP の発現が低下しており、α -TTP 欠損マウスに DC-STAMP 過剰発現マウスを交配したところ、α -TTP 欠損マウスの高骨量の表現型は消失した。
α -tocopherol による破骨細胞多核化作用の機序を明らかにするため、Western blot 法により破骨細胞内のタンパク発現を調べたところ、MAPK のひとつである p38 α のリン酸化が、α -tocopherol 刺激後 60 分で亢進していた。恒常的活性型 p38 α をレトロウイルスを用いて破骨細胞に過剰発現させたところ、α -tocopherol の刺激なしでも破骨細胞は多核化した。一方破骨細胞前駆細胞で p38 α をノックダウンすると、破骨細胞には分化せず、α -tocopherol による多核化作用も消失した。
p38 の下流遺伝子である mitf に flag タグをつけ、HEK293 細胞で過剰発現し、α -tocopherol を添加した細胞からタンパクを採取し、flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、α -tocopherol 添加により、p38 のリン酸化が亢進するとともに、mitf のリン酸化が亢進していることが確認できた。
続いて、食餌中のビタミン E が骨代謝に及ぼす影響を検討するため、野生型マウスにビタミン E 添加食を 8 週間投与し解析を行った。すると、骨形成には変化がなかったが、骨吸収が亢進し、骨量の減少が認められた。

＜考察＞
α TTP 欠損マウスでは血中 α -tocopherol 濃度が低下し、同時に骨吸収低下により骨量が増加していた。ビタミン E 添加食投与により血中 α -tocopherol 濃度が改善するとともに、骨量が減少した。このことから血中の α -tocopherol 濃度が骨量と密接に関連していることが示唆された。In vitro で破骨細胞成熟期の 24 時間のみに α -tocopherol を添加しても、破骨細胞が融合、多核化することから、破骨細胞の融合多核化に必須の遺伝子である DC-STAMP に着目し、実際に遺伝子発現の亢進を確認した。α TTP 欠損マウスの骨で DC-STAMP の発現が低下しており、一方 α -TTP 欠損マウスと DC-STAMP 過剰発現マウスを交配すると骨吸収が亢進し骨量が減少することから、α -tocopherol が破骨細胞の DC-STAMP を介して骨量を調整していることを証明した。
一般的にビタミン E は抗酸化作用を有すると考えられているが、生体内での作用機序は明らかになっていない。本研究では、より強い抗酸化作用をもつ α -tocopherol の異性体を破骨細胞培養系に添加しても、破骨細胞融合作用は認められなかったことから、破骨細胞における α -tocopherol の作用には抗酸化作用以外の機序が存在することが示唆された。
α -tocopherol の破骨細胞内でのシグナル伝達を検討したところ、α -tocopherol は p38 α のリン酸化を促進していることが明らかになった。p38 α の過剰発現では破骨細胞が多核化し、p38 α のノックダウンでは α -tocopherol 破骨細胞の多核化作用が消失した。
mitf は p38 の下流にあり、破骨細胞分化に必要と考えられている遺伝子である。mitf を過剰発現させた細胞に α -tocopherol を添加したところ、p38 のリン酸化が促進するとともに、mitf のリン酸化も促進していた。破骨細胞で mitf をノックダウンすると α -tocopherol の多核化作用が消失したことから、α -tocopherol が p38 α のリン酸化を介して mitf のリン酸化を調整することを証明した。mitf は DC-STAMP のプロモーター領域につき遺伝子発現を調整することが過去に報告されており、破骨細胞内での α -tocopherol のシグナル伝達を明らかにすることができた。
野生型マウスにビタミン E 添加食を投与すると骨吸収が亢進し骨量が減少することから、ビタミン E 摂取が骨量減少を引き起こすことを証明した。

＜結論＞
ビタミン E は破骨細胞の細胞融合を促進し骨吸収を調節することが明らかになった。ビタミン E の摂取過剰が骨粗鬆症を惹起する可能性が示唆された。

松倉　寛　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1819 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）分子疫学専攻
学位論文題目	／	Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells（ゲニステインは子宮内膜細胞において steroidogenic factor 1 遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化を促進する） Biochemical and Biophysical Research Communications　第 412 巻第 2 号　366 頁～372 頁掲載　平成 23 年 8 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　久保田　俊郎　　副査：教授　石野　史敏　　副査：教授　浅原　弘嗣

論文要旨

＜要旨＞

ゲニステイン（GEN）は大豆製品に多く含まれる植物性エストロゲンであり、近年、エピジェネティックモジュレーターとして認められつつある。卵巣摘出（OVX）マウスに GEN を 1 週間経口投与したところ、子宮内膜組織の肥厚増殖が見られ、steroidogenic factor 1（SF-1）遺伝子の発現が誘導された。同時に GEN は SF-1 遺伝子のプロモーター領域内 CpG の脱メチル化を誘導した。正常子宮内膜組織では、通常それらの CpG は高度にメチル化されており、SF-1 遺伝子発現の抑制が維持されている。GEN 投与後の脱メチル化の割合は、子宮内膜組織の中でも筋層側より管腔側で高かったことから、SF-1 のエピゲノム変化は主に再生増殖した細胞で見られたと考えられた。そこで増殖能を有する細胞として、子宮内膜ストローマからコロニー形成細胞クローンを初代培養し、それらのクローンを in vitro で GEN 処理し、SF-1 遺伝子のメチル化状態変化を高解像度融解曲線解析法（high-resolution melting assay=HRM）を用いてスクリーニングした。20 個のクローンのうち 1 つのクローンで、SF-1 遺伝子プロモーターの GEN による脱メチル化誘導が観察された。このクローンは高い増殖能を示した。本研究により、子宮内膜組織におけるごく一部の細胞は GEN に感受性を示しエピジェネティックな変化を示すことが明らかになった。

＜緒言＞

健康維持や疾患発症に食物や栄養の摂取が重要な役割を果たすこと、さらにその影響は遺伝子のエピゲノム変化を介して現れることが明らかになってきた。しかしその組織特異性や変化の可塑性については未解明のことが多い。GEN は大豆を多く含む伝統的なアジア食に多く含有される。疫学的研究では GEN 摂取と乳がん・前立腺がんのリスク軽減に関連が示唆される。しかし in vitro では逆に乳がん細胞の増殖を促進しうることが知られており、その効果や作用機序の詳細は判っていない。

GEN はエストロゲン受容体（ER）リガンドであり、特に ER β に対して強い親和性を示すことから植物性 selective estrogen receptor modulator（SERM）として知られる。GEN の多面的な生理作用が報告されるが、それらは内因性エストロゲンとの相互作用によっても変化する。GEN は各種細胞の DNA メチル化状態を変化させうることが報告されている。しかし、これらは主にがん細胞株を用いた報告であり、正常な細胞を用いた研究や in vivo での研究は少ない。

子宮内膜組織はエストロゲン感受性を持ち、また高い再生増殖能を有する組織であるため、卵巣摘出（OVX）したげっ歯動物にエストロゲン様物質を投与した効果は子宮肥大試験でアッセイされる。合成エストロゲンをはじめ、GEN やビスフェノール A などのエストロゲン様物質によっても子宮肥大が誘導されるが、その時に内膜細胞に誘導される遺伝子発現変化パターンは必ずしも同一でない。またエピジェネティック変化については明らかにされていない。

SF-1 はオーファン核内受容体であり、StAR、Cyp11a1（p450scc）、Cyp17a1（p450c17）、Cyp19a1（aromatase）等のエストロゲン生合成系遺伝子群の転写を活性化することが知られる。SF-1 は正常な子宮内膜組織では発現していない。しかしヒトの異所性子宮内膜症組織において、メカニズムは不明であるがプロモーター領域の異常な脱メチル化によって異常に発現することが報告されている。SF-1 活性化の結果生じる局所的エストロゲン合成が子宮内膜症の疾患発症に関与することが示唆されている。

本研究では OVX マウスにおける GEN 誘導子宮肥大の実験モデルを用いて、まず in vivo で GEN により子宮内膜細胞の SF-1 遺伝子プロモーターに脱メチル化が誘導されることを示した。さらに in vitro でも初代培養子宮内膜ストローマ細胞において SF-1 遺伝子プロモーターが GEN によって脱メチル化されることを示した。

＜方法＞

8 週齢の OVX マウス (C57BL/6JJms) に 1 週間 GEN（低用量：60 mg/kg/d、高用量：200 mg/kg/d）を経口投与した

前 目次へ 次

のち安楽死させ、子宮を摘出し重量を測定した。双角子宮の片方から RNA を回収し、エストロゲン生合成系遺伝子群の mRNA レベルを GeneChip で解析した。mRNA 発現は Percellome 法によって 1 細胞あたりの copy number として評価した。双角子宮のもう片方からは DNA を回収し、bisulfite sequencing 法により SF-1 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を検討した。
８週齢の正常マウス (C57BL/6JJms) 子宮内膜細胞の初代培養を行い、コロニー形成細胞クローンを得た。それらクローンを in vitro で 1 週間、生理的濃度の上限値である 10 μ M の GEN で処理したのち、SF-1 プロモーターの DNA メチル化状態を HRM でスクリーニングし、bisulfite sequencing 法で確認した。

＜結果＞
OVX マウスへの GEN 投与の結果、高用量で子宮重量増加と共に子宮組織における SF-1 および SF-1 下流遺伝子群の mRNA 発現上昇が認められた。同時に SF-1 遺伝子プロモーター領域の脱メチル化が認められた。解析した領域には -272 位から +199 位にかけて 15 個の CpG が存在する。それら CpG の総計メチル化状態はそれぞれ control で 78.3％、低用量群で 73.9%、高用量群で 54.4% であり、GEN 用量依存性の脱メチル化誘導が示された。高用量群では 15 個の CpG のうちほぼ全ての CpG に脱メチル化が誘導されたが、特に +45 ～ +89 位の 5 つの CpG を中心に強い脱メチル化が認められた。
次に子宮内膜組織を管腔側と筋層側とに物理的に分け、GEN 投与後の部位別総計メチル化状態を検討した。低用量群では管腔側で 84.8%、筋層側で 65.0% であったのに対し、高用量群では管腔側で 42.1%、筋層側で 66.7% であり、管腔側に顕著な脱メチル化が起きていることがわかった。
正常マウス子宮内膜組織からコロニー形成能のある細胞クローンを初代培養により樹立した。20 個のクローンを選択し in vitro における GEN 処理による SF-1 の DNA メチル化状態の変化を解析した。+19 ～ +89 位の 7 つの CpG を解析対象とした HRM の結果、1 つのクローンで脱メチル化が検出された。また bisulfite sequencing 法によって -272 位から +199 位にわたって脱メチル化が起こっていることも確認できた。このクローンは調べたクローンのうち最も高い増殖能を示した。またこのクローンは 1 次コロニーより得た細胞を 10 cells/cm2 で播き直して培養したときに 2 次コロニーを形成した。

＜考察＞
本研究では OVX マウスへの GEN 経口投与によって子宮内膜細胞の SF-1 遺伝子プロモーター領域の脱メチル化が誘導されることを見いだした。さらに GEN によって SF-1 及び下流遺伝子群の mRNA 発現上昇が見られた。bisulfite sequencing 法で解析した DNA クローンのうち 20 ～ 30% のクローンで SF-1 領域全体の脱メチル化が認められたのに対し、各遺伝子の mRNA 発現誘導レベルは 1 細胞あたり 1 copy 以下と非常に低かった。このことから組織内の一部の細胞に GEN による脱メチル化が誘導され、さらにその一部で SF-1 遺伝子発現上昇が誘導された可能性が考えられた。
SF-1 遺伝子の DNA 脱メチル化は子宮組織に一様におこったのではなく、管腔側の脱メチル化頻度が筋層側に比べて高かった。一般に子宮組織の肥厚は筋層側から管腔側への細胞増殖によっておこると考えられる。従って、GEN による脱メチル化を受けた細胞は再生増殖した細胞である可能性が高いと考えられた。
そこで増殖能の高い細胞として、マウス子宮内膜からコロニー形成能を有する細胞を単離、初代培養を行った。それらを用いて in vitro で GEN 処理を行ったところ、1 つのクローンで SF-1 の脱メチル化が誘導された。そのクローンは筋層側から由来し最も高い増殖活性を示した。これらの in vivo 実験及び in vitro 実験から、子宮内膜組織における増殖活性の高い細胞では、生理学的な濃度の GEN によって SF-1 遺伝子の DNA 脱メチル化がおこる可能性があることが示唆された。
異所性子宮内膜症では、SF-1 遺伝子をはじめ複数の遺伝子の DNA メチル化状態の変化があることが報告されている。しかし、このようなエピゲノム変化の誘因が何であるか、またエピゲノム変化を受ける細胞に特異性があるかどうかは現在のところ不明である。今後 GEN のような環境因子に感受性を示す細胞の特性や子宮内膜症の病態との関連については、さらに解析を進めていく必要がある。

＜結論＞
GEN はマウス子宮内膜細胞において SF-1 遺伝子プロモーターの脱メチル化を誘導した。植物性イソフラボンによる成体子宮でのエピゲノム変化誘導は本研究が初めての報告であり、この知見は栄養学、公衆衛生の観点から重要である。

菅原　江美子　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1821 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）包括病理学専攻
学位論文題目	／	Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer（腎癌における ALK 融合遺伝子の同定） Cancer　平成 24 年 1 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　木原　和徳　　副査：教授　稲瀬　直彦　　副査：准教授　明石　巧

論文要旨

＜要旨＞

355 例の腎腫瘍に対し、intercalated antibody-enhanced polymer(iAEP) 法を用いた抗 ALK 免疫染色を施行した結果、2 例の陽性例が同定された。それぞれ TPM3-ALK、EML4-ALK 融合遺伝子を発現していた。組織型は乳頭状腎細胞癌と分類不能型（乳頭状、管状、篩状、充実性の特徴が混在した腫瘍) であり、陽性率は非淡明細胞型腎細胞癌の 2.3% (2/88)、非淡明細胞型および非嫌色素性腎細胞癌に限れば 3.7% (2/54) であった。本検討により、腎癌に ALK 融合遺伝子が存在することが確認され、そのような腎癌に対し ALK 阻害剤が有効であると考えられた。

＜緒言＞

腎癌は罹患数および死亡数の多い癌の一つである。病変が限局している初期の腎癌であれば予後は比較的良好だが、進行腎癌は予後不良であり、近年では進行腎癌の治療に数種類の分子標的薬が使用されている。しかしそれらの薬剤は、腎癌特異的な分子や癌化に必須な分子をターゲットにしていない。

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) の融合遺伝子はリンパ腫や肉腫、癌腫などの多くの種類の悪性腫瘍において重要な役割を担っている。ALK 阻害剤であるクリゾチニブは、肺癌や inflammatory myofibroblastic tumor (IMT)、anaplastic large cell lymphoma (ALCL) の患者に対し劇的な効果を示している。このため、ALK 融合遺伝子は癌治療における現在最も有効なターゲットの１つであると考えられている。

ALK 阻害剤による治療を行うためには、ALK 融合遺伝子の有無を正確かつ迅速にスクリーニングする必要があるが、EML4-ALK は ALCL や IMT で行われていたような従来法による抗 ALK 免疫染色では検出できないことがわかっている。この問題を解決するために、より感度の高い免疫染色法 intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法が開発された結果、EML4-ALK を免疫染色でも検出することが可能となった。1994 年の NPM-ALK の発見以来、多数の ALK 融合遺伝子がリンパ腫や肉腫において抗 ALK 免疫染色を発端とし発見されてきたが、肺癌における ALK 融合遺伝子が報告されたのはごく最近の 2007 年であった。これは、従来法の抗 ALK 免疫染色では EML4-ALK が検出されなかったためであるともいえる。逆に考えれば、従来法の抗 ALK 免疫染色で陰性であり iAEP 法による抗 ALK 免疫染色で陽性である腫瘍は、新規の ALK 融合遺伝子を持っている可能性があるといえよう。事実、従来法の抗 ALK 免疫染色では陰性だった IMT に対して、iAEP 抗 ALK 免疫染色を施行して再検討した結果、新たな ALK 融合遺伝子 PPFIBP1-ALK が同定された。本論文においては腎癌を対象に iAEP 抗 ALK 免疫染色を用い検討した結果、TPM3-ALK と EML4-ALK を同定したことを報告する。

＜方法＞

1994 年から 2010 年までにがん研究会有明病院で外科的に切除された 355 例の腎腫瘍を用いて検索を行った。症例の内訳は、淡明細胞型腎細胞癌 255 例、乳頭状腎細胞癌 32 例、嫌色素性腎細胞癌 34 例、集合管癌 6 例、分類不能型 10 例、肉腫様腎細胞癌 6 例、その他 12 例 (オンコサイトーマ 4 例、血管筋脂肪腫 3 例、solitary fibrous tumor 1 例、紡錘形細胞肉腫 2 例、desmoplastic sarcoma 1 例、anaplastic carcinoma 1 例) からなる。外科的に切除された検体はすべて 20％緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋された。免疫組織学的スクリーニングは tissue microarray を作成し効率的に行った。染色法としては広く行われているポリマー法と、ALK に対しては iAEP 法をも施行した。

iAEP 抗 ALK 免疫染色陽性の 2 例については、保存されていた凍結検体から total RNA を抽出し cDNA を合成、5'-RACE PCR を行った。さらに、2 例それぞれの融合ポイントを含む cDNA に対する逆転写 PCR、genomic DNA に対する PCR、および FISH を施行した。

前　目次へ　次

＜結果＞
iAEP 抗 ALK 免疫染色にて得られた 2 例の陽性例に対し 5'-RACE PCR を行った結果、Case1 では TPM3 のエクソン 8 と ALK のエクソン 20、Case2 では EML4 のエクソン 2 と ALK のエクソン 20 で融合遺伝子が形成されていることが確認された。融合点に対する逆転写 PCR にて mRNA レベル、genomic PCR および FISH にてゲノムレベル確認を行い、RACE 法による結果を支持する結果を得た。
Case1：36 歳女性。腎盂腎炎を疑わせる症状にて受診。画像的に 4.0 × 4.0 × 3.5cm 大の腫瘤が左腎に認められた。経腰的左腎摘出術を施行後、2 年間再発なく経過し、現在も生存している。腫瘍の組織学的特徴は、立方状の細胞が乳頭状、管状、篩状構造を呈しながら増生する腫瘍で、一部では充実性増殖やラブドイドな部分が見られた。核異型は軽度で、核分裂像はほとんど見られない。間質は Alcian-blue 陽性のムチンが豊富で、砂粒体や泡沫マクロファージの出現が一部で見られた。さまざまな組織型が混在しており、分類不能型腎細胞癌に分類された。iAEP 抗 ALK 免疫染色ではびまん性に強陽性を示し、さらに細胞膜が強調される染色パターンであった。
Case2：53 歳女性。検診にて顕微鏡的血尿を指摘され受診。画像的に左腎に病変が疑われたが、診断には至らず経過観察となった。1 年後、尿細胞診にて癌が検出され、画像的に 2.5 × 2.5 × 2.3cm 大の腫瘤が左腎に認められた。経腰的左腎摘出術施行後、7 年間再発なく生存している。組織学的には、立方状または低円柱状細胞が乳頭状構造を呈する腫瘍。核異型や核分裂像は目立たない。多数の砂粒体と泡沫マクロファージの出現あり。組織学的には乳頭状腎細胞癌に分類された。iAEP 抗 ALK 免疫染色では、細胞質にびまん性に強陽性像を示した。

＜考察＞
2011 年初頭、VCL-ALK 融合遺伝子を有する腎癌 2 例が、それぞれ異なる 2 グループから報告された。それら 2 例はともに、若年発症 (6 歳と 16 歳)、鎌状赤血球症の既往、稀な組織型 (髄様癌と、髄様癌・嫌色素性腎細胞癌・移行上皮型の混在型) といった非典型的な特徴を有していた。一方、今回の検討で同定した 2 例は、成人発症で鎌状赤血球症の既往もなかった。ALK 融合遺伝子が特殊な背景のない腎癌においても存在することを示したといえる。
腎癌においては、TFE3 遺伝子転座や MET 遺伝子の変異が既に報告されている。今回同定した ALK 陽性腎癌 2 例においては、TFE3、MET いずれにも変異がないことを確認しており、これらとは相互排他的である可能性が高い。また、他の ALK 陽性腫瘍と同様に、抗 ALK 免疫染色では全ての腫瘍細胞が陽性像を呈しており、腎癌における ALK 変異も癌発生の極めて初期の段階で起こる driver mutation であると考えられる。さらに、TPM3-ALK は ALCL や IMT、EML4-ALK は肺癌や乳癌および大腸癌で報告されており、これらの造腫瘍能や阻害剤による機能抑制は既に検証されている。したがって、腎癌においても ALK 融合遺伝子が分子標的となる可能性は十分にあると考えられる。
今回の 2 症例の予後は良好で再発も見られなかった。したがって、ALK 阻害剤の効果を検証するためには、より多くの症例、とくに進行癌や再発癌において ALK 陽性例を同定し、その臨床病理学的検討や治療研究を行うことが必要である。ALK 陽性肺癌の組織学的特徴として、粘液産生を伴う篩状構造や印環細胞などが報告されているが、今回の 2 症例のうち 1 症例も粘液産生を伴う篩状構造を呈しており、ALK 陽性腫瘍の特徴的所見である可能性がある。なお、今回の ALK 陽性腎癌は形態学的にも免疫組織化学的にも腎原発であり、ALK 陽性肺癌などの転移でないことは確認してある。症例収集のためのスクリーニング法として免疫染色は有効な方法の 1 つと思われるが、今回の 2 例のうち 1 例は従来法の抗 ALK 免疫染色では染まらない EML4-ALK であった。このため、ALK 陽性腎癌のスクリーニングには iAEP 抗 ALK 免疫染色などの高感度法が必須である。

＜結語＞
癌特異的な分子や癌化に必須な分子をターゲットにした療法が存在しない腎癌領域において、現在最も有効な治療標的の 1 つとされる ALK 融合遺伝子を、特殊な背景のない症例において新規同定した。

田中　智子　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1824 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）精神行動医科学専攻
学位論文題目	／	lUp-regulation of dopamine D1 receptor in the hippocampus after establishment of conditioned place preference by cocaine（コカイン誘発場所嗜好性形成後の海馬におけるドパミン D1 受容体の関与） Neuropharmacology　第 61 巻第 4 号　842 頁～ 848 頁　平成 23 年 9 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　田邊　勉　　副査：教授　田中　光一　　副査：教授　上村　公一

論文要旨

＜要旨＞

海馬におけるドパミン神経伝達は、依存性薬物の報酬効果と環境刺激の連合学習形成において重要な因子の一つであると考えられている。本研究の実施により、条件付け場所嗜好性を指標とし、コカインの報酬効果と環境刺激の連合学習を形成したラットの海馬において、ドパミン D1 受容体のタンパクレベルならびに mRNA レベルが増加していることを明らかとした。この増加はコカインの報酬効果のみにより引き起こされる現象ではなく、コカインの報酬効果と環境刺激の連合学習が形成されたことにより引き起こされる現象であると考えられる。さらに、増加したドパミン D1 受容体 mRNA が海馬歯状回顆粒細胞層に多く発現していることを確認した。本研究の結果から、海馬におけるドパミン D1 受容体の変化が、コカインによる連合学習の形成に関与していることが示唆された。

＜緒言＞

薬物依存の重要な問題点として、依存性薬物に関連する環境や物体などの外部刺激の提示による依存症状の再燃が挙げられる。このように再燃を引き起こす依存性薬物の報酬効果と外部刺激の連合学習形成の神経メカニズムを解明することは、臨床的に重要であると考えられる。

海馬のネットワークは気分の変化など内的要因が深く関わる文脈依存記憶に重要である。文脈依存記憶に分類される依存性薬物の報酬効果と環境刺激の連合学習形成過程においては、連合学習の形成に伴い、海馬の神経活動が変化することなどが報告されている。また、海馬は中脳ドパミン神経系と解剖学的ならびに機能的に連結しており、腹側被蓋野からドパミン神経の投射を受けていることが明らかとされている。

依存性薬物と海馬の関係を立証する研究は、すでに実施されており、海馬において protein kinase AII や CREB などのドパミン神経シグナルに関わる分子がコカインによる連合学習の形成後に増加していることなどが報告されている。これらの研究は、コカインによる連合学習の形成過程における海馬のドパミン受容体の関与を示唆しているが、直接的にドパミン受容体レベルを測定した研究は実施されていない。そこで、本研究では、コカインによる連合学習の形成における海馬のドパミン D1 受容体の関与を直接的に検討することを目的とした。

＜方法＞

動物は Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した。コカインによる連合学習の形成は、薬物依存の研究で一般的に使用されている条件付け場所嗜好性 (Conditioned place preference：CPP) を指標として評価した。CPP は条件付け前試験 (pre-test session)、条件付け (conditioning session)、条件付け後試験 (post-test session) の三つから構成されており、pre-test session と post-test session の変化から、依存性薬物の場所嗜好性を評価することができる。本研究で実施した行動実験は、この方法を用いた二つの実験デザインから構成されている。一つは、コカイン誘発場所嗜好性の形成には何回の conditioning session が必要かを検討するため、conditioning session の回数の異なる群を作成し、CPP を実施した。もう一つは、海馬におけるドパミン D1 受容体がコカインの報酬効果と環境刺激の連合学習の形成に関連しているかを検討するため、コカインの報酬効果と環境刺激の連合学習を経験した群 (paired 群) と連合学習を経験しない群 (unpaired control 群) を作成し、CPP を実施した。ドパミン D1 受容体のタンパクレベルは western blot 法を用いて定量した。また、ドパミン D1 受容体 mRNA レベルは real-time PCR 法を用いて定量した。さらに、ドパミン D1 受容体 mRNA の局在は in situ hybridization 法と免疫組織学的染色法の二重染色法を用いて検討した。

＜結果＞

始めに、コカイン誘発場所嗜好性の形成に必要な conditioning session の回数を検討したところ、二回の conditioning session を経験した群において、コカイン誘発場所嗜好性が形成された。認められた場所嗜好性は、conditioning session

前　目次へ　次

を三回経験した群とほぼ同程度であることが確認されたことから、以降の実験では、conditioning session を二回実施した。次に、コカインの報酬効果と環境刺激との連合学習を経験した paired 群と経験していない unpaired control 群を用いて CPP を実施したところ、paired 群でのみ、コカイン誘発場所嗜好性の形成が認められた。さらに、両群においてドパミン D1 受容体のタンパクレベルを測定したところ、unpaired control 群と比較して、コカイン誘発場所嗜好性を形成した paired 群の海馬の細胞膜分画において有意なタンパクレベルの増加が認められた。また、同様に、unpaired 群と比較して、paired 群の海馬において、ドパミン D1 受容体の mRNA レベルの増加が認められた。この mRNA レベルでのドパミン D1 受容体の増加は、海馬歯状回顆粒細胞層に多く認められた。

＜考察＞

本研究において、コカイン誘発場所嗜好性の形成はコカインの報酬効果と環境刺激の連合学習の形成によって引き起こされ、コカイン誘発場所嗜好性を形成した動物の海馬において、ドパミン D1 受容体タンパク量ならびに mRNA 量の増加が認められた。今回、コカインの投与回数や環境刺激は paired 群と同じだが、コカインの投与と環境刺激との連合学習を経験しない unpaired control 群を作成したことにより、ドパミン D1 受容体の変化は単にコカインを複数回投与したことによる生理的な反応ではなく、学習に起因すると結論づける結果が得られた。

近年、ラットを用いた実験において、海馬のドパミン神経伝達により調節されるシグナルは長期増強に必要であることが報告されている。また、コカイン自己投与行動の消去時においても、ラットの海馬において長期増強が増強されるという報告もあることから、海馬における長期増強は、ドパミン神経伝達に深く関連する薬物依存の形成に重要であると考えられる。さらに、長期増強の維持には遺伝子発現、新規タンパク合成や新規シナプス結合の形成が関与していると考えられている。コカインに関連した記憶の形成と維持は、海馬における遺伝子の転写、タンパク合成、ユビキチン依存性タンパク分解や細胞骨格構成などを変化させると考えられている。このような過程が、本研究において認められた海馬におけるドパミン D1 受容体のタンパクならびに mRNA レベルの増加に関連する可能性も考えられる。また、ドパミン D1 受容体拮抗薬を用いた研究において、精神刺激薬により誘導される場所嗜好性形成に対する海馬におけるドパミン D1 受容体の関与が報告されている。さらに、ドパミン受容体とその下流に存在するシグナル伝達が海馬のシナプス可塑性を変化させることも報告されており、本研究の結果も合わせ、海馬のドパミン D1 受容体が精神刺激薬の報酬効果に関連する記憶の形成に重要であると考えられる。

海馬は解剖学的かつ組織学的に分類されており、各領域がそれぞれ異なる機能を担っている。本研究で確認されたドパミン D1 受容体の変化が、海馬のどの領域で引き起こされているかを検討したところ、海馬歯状回顆粒細胞層において有意な変化が認められた。歯状回は海馬内の情報処理過程において、感覚入力側に位置し、その神経細胞は、報酬ならびに嫌悪条件下において、行動と動機付け関連刺激の関連性の形成に必要なシナプス調節の一部を担っている。それゆへ、歯状回のドパミン D1 受容体がコカインによる連合学習の形成に関与しているという本研究の結果は、この過程において歯状回でのシナプス調節が引き起こされたことを示し、依存性薬物により形成される文脈依存記憶における海馬歯状回の重要性を示唆するものである。

＜結論＞

海馬におけるドパミン D1 受容体の変化がコカインの報酬効果と環境刺激の連合学習の形成により誘導されたことから、文脈依存記憶に関わる海馬ならびにそれに関連する回路が依存性薬物の影響を受けることが示唆された。本研究の結果から、ドパミンによって調節されるシナプスメカニズムが報酬記憶の形成を引き起こす長期的変化に関連していると考えられる。

Velikkakath Anoop Kumar Gopi 博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1825 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）細胞生理学専攻
学位論文題目	／	Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets（哺乳類の Atg2 タンパク質はオートファゴソーム形成に必須で、脂肪滴の形態および分布の調節にも重要である） Molecular Biology of the Cell 第 23 巻掲載 平成 24 年 3 月発行
論文審査委員	／	主査：教授 清水 重臣 副査：教授 畑 裕 副査：教授 中田 隆夫

論文要旨

Background

Macroautophagy is an intracellular degradation system, by which cytoplasmic materials are enclosed by the autophagosome and delivered to the lysosome. Autophagosome formation is considered to take place on the endoplasmic reticulum and involves functions of autophagy-related (Atg) proteins.

Method

Atg2A antibody preparation

A cDNA fragment of Atg2A (amino acid residues 700–1400) was subcloned into pET28a vector (Novagen). The bacterially expressed protein was recovered into insoluble inclusions, extracted from SDS-PAGE gel, and used to immunize rabbits. Antisera were affinity purified.

Atg2A stable cell line preparation

cDNA encoding human Atg2A (KIAA0404) was obtained from Kazusa DNA Research Institute. PCR amplified Atg2A were cloned into pMXs-IP vector.

A siRNA-resistant Atg2A silent mutant was created by substituting four nucleotides in the Atg2A siRNA-targeting region (G3267A, T3268C, G3270T, and G3273A).

HEK293T cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagent with pMXs-IP-GFP-Atg2A or pMXs-IP-GFP-Atg2AD1723–1829 together with pCG-VSV-G and pCG-gag-pol to render retroviruses infectious to human cells.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized using 50 mg/ml digitonin, stained with specific antibodies.Images were acquired using MetaMorph image analysis software, and the size and number of lipid droplets were quantified using the Top Hat program (Molecular Device).

Lipid droplet staining and quantification of clustering

For co-staining experiments, live cells were cultured with either 1 mg/ml (in regular medium containing 10% serum) or 0.01 mg/ml (in starvation medium) BODIPY® 558/568 C12 (Molecular Probes) for 1 h. To stain lipid droplets in fixed samples, SUDAN III Cerasin Red (Sigma) prepared in 70% ethanol was directly added to paraformaldehyde-fixed cells at 2 mg/ml for 20 min.

Statistical analysis

Differences were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni/Dunn posttest.

Result

Mammalian Atg2A and Atg2B are required for autophagy

Humans have two Atg2 homologs, Atg2A (KIAA0404) and Atg2B (FLJ10242). Atg2A and Atg2B are similar to each other (44.5% of Atg2A residues are identical to those of Atg2B), and Saccharomyces cerevisiae Atg2 shows 15.5% and 15.8% identity to human Atg2A and Atg2B, respectively. To examine the function of Atg2 in autophagy, we knockdown Atg2. Western blotting showed that LC3 II form accumulated in control RNAi cells following lysosomal protease inhibition, indicating normal autophagic flux. This accumulation was not observed in Atg2 knockdown cells indicating that autophagic flux is affected. Moreover p62 significantly accumulated.

Accumulation of unclosed autophagosome-related membranes in Atg2-depleted cells

Punctate structures of Atg proteins such as Atg9, ULK1, WIPI, Atg5 were rarely observed in control siRNA-treated cells under nutrient-rich conditions. However, all these Atg proteins formed several punctate structures in siAtg2A/B cells without starvation treatment, and they colocalized with LC3. Because these accumulated Atg proteins are representatives of major Atg functional complexes, these results suggest that Atg2A/B play an essential role probably at a late step of autophagosome formation.

Using biochemical analysis we found that the autophagic structures which accumulate in Atg2 depeleted cells are unclosed structures as p62 enclosed in autophagsomes were not resistant to Proteinase K treatment.

Atg2A localizes to the isolation membrane and lipid droplet

Immunofluorescence with endogenous Atg2A antibody as well as GFP-Atg2A showed that Atg2A localized with Lipid droplets. A small population of Atg2A also localized with Atg5. Atg2A colocalized with ULK1, an upstream Atg protein, in Atg5 KO MEFs under starvation conditions. Inhibition of PtdIns 3-kinase with wortmannin inhibited recruitment of Atg2A to the ULK1 structures. This results show that recruitment of Atg2A to the autophagosome formation depends on PtdIns 3-kinase.

前 目次へ 次

In contrast, localization of Atg2A to lipid droplets was not affected by wortmannin treatment, and did not depend on other Atg proteins such as focal adhesion kinase interacting protein of 200 kD (FIP200) and Atg5. These results suggest that Atg2A itself has ability to localize to lipid droplets.
Amino acids 1723–1829 of Atg2A are essential for localization to both lipid droplets and autophagosomes, and required for autophagy Atg2A mutant lacking the region (GFP-Atg2AD(1723–1829)) was able to colocalize with neither lipid droplets nor LC3 structures. Furthermore this mutant could not rescue the inhibition of LC3 flux induced by Atg2A/B knockdown, when the wildtype Atg2A could rescue autophagy.
Depletion of Atg2A/B causes aggregation of enlarged lipid droplets
Because mammalian Atg2 was detected on lipid droplets, we analyzed the role of Atg2 in lipid droplet formation and turnover. In control siRNA-treated cells, small lipid droplets were observed. On the other hand, in siAtg2A/B-treated cells, the size and number of lipid droplets increased (total pixel area of lipid droplets was approximately 2-fold higher than that of control cells). Both total volume and number of lipid droplets further increased following oleic acid treatment. Lipid droplets are usually dispersed in control cells, but they tended to stick to each other and formed clusters.

Discussion
We have shown that mammalian Atg2A and Atg2B have redundant functions and both are required for autophagosome formation. Aberrant or intermediate autophagic structures, which are not completely closed, accumulate in Atg2A/B-silencing cells under growing conditions. Atg9A, ULK1, Atg14, WIPI1, Atg5, and LC3 localize to these structures. Similar accumulations were observed in VMP1-knockdown cells.
Phenotypic similarity between Atg2 and VMP1 mutants are also observed in Caenorhabditis elegans; accumulation of large puncta of LGG-1 (an Atg8/LC3 homolog) is observed in both epg-3/VMP1 and atg-2 mutants, Atg2 and VMP1 may function at a similar step; for example, assembly of different membrane sources, maturation of the omegasome, or completion of isolation membrane closure, but not at initial steps to recruit other Atg proteins.
The hierarchical position of Atg2 is exactly the same as that of WIPI1, confirming with the previous reports that Atg2 interacts with the Atg18/WIPI family proteins in
S. cerevisiae, C. elegans and mammals. One novel aspect of the present study is the finding that mammalian Atg2 proteins are present on lipid droplets, which are lipid storage organelles present in essentially all cell types. Although several proteins such as PAT proteins (e.g. perlipin, adipose differentiation-related protein (ADRP) and TIP47) and Rab18 localize on the surface of lipid droplets, no autophagy-related proteins have been thus far identified on the surface. We identified the Atg2 region required for lipid droplet targeting, but it does not show any homology with known lipid droplet proteins. It is therefore unknown whether Atg2 proteins directly associate with lipid droplets or indirectly through other molecules or structures. In contrast to targeting to the autophagic structures, Atg2 localization to lipid droplets seems to be independent of other Atg proteins.
Although we found clear change in lipid droplet morphology and dispersion in Atg2-silencing cells, the precise function of Atg2 in this process is unknown, particularly in relationship to autophagosome formation. As knockdown of Atg5 does not cause clustering of enlarged lipid droplet under the same conditions, it is not simply due to a defect in lipophagy. Apart from the degradation step, the lipid droplet phenotype could be explained at the formation step. Mutant cells defective in phospholipid metabolism and COPI vesicle formation exhibit larger lipid droplets. Although these do not have exactly the same phenotype as observed in Atg2-deficient cells, the data suggest that defects in the ER and/or Golgi apparatus could affect lipid droplet morphology. Considering that the ER is involved in formation of both the autophagosome and lipid droplet, it is reasonable to hypothesize that a common Atg2 function is shared by the two pathways.

Conclusion
Here we report the identification and characterization of human Atg2 homologs, Atg2A and Atg2B. These Atg2 proteins are essential for autophagosome formation, presumably at a late stage. Atg2A is present on not only autophagic membranes, but also on lipid droplets. Silencing of both Atg2A and Atg2B increases the size and number of lipid droplets and causes their clustering. These changes are not observed in Atg5-depleted cells. These data suggest that mammalian Atg2A and Atg2B function both in autophagosome formation and regulation of lipid droplet volume and distribution.

<要旨>
オートファジーは細胞内分解機構であり、細胞質成分はオートファゴソーム膜によって囲まれた後、リソソームへ運ばれる。オートファゴソーム膜の形成は小胞体膜上で起こると想定されており、その形成過程においては、オートファジー関連分子 (Atg 分子) が重要な役割を果たしている。本研究では、哺乳類の Atg2 相同分子、Atg2A と Atg2B の同定および機能解析を行った。まず、動物細胞において、Atg2A/B 発現抑制による影響を調べたところ、オートファジーの活性が阻害されていることが分かった。生化学的解析から、Atg2A/B 発現抑制条件下ではオートファゴソームが閉じていない膜構造であり、また免疫染色による解析では、一部の Atg 分子が蓄積した異常な構造体が観察された。これらの結果から、Atg2A/B 発現抑制条件下では、不完全なオートファゴソーム膜が細胞内に蓄積していることが示唆された。
次に、Atg2A 細胞内局在を調べたところ、Atg2A はオートファゴソーム膜だけでなく、脂肪滴近傍にも局在した。ドメイン解析の結果から、これらの両方の局在には Atg2A (1723-1829) の共通の部位が必要であることが分かった。また、この部位は他の生物種にも保存されている部位であり、オートファジーにも必須であることが明らかになった。最後に、脂肪滴動態の解析を行ったところ、Atg2A/B 発現抑制条件下では、大きな脂肪滴が塊を形成していることが分かった。これらの解析から、哺乳類の Atg2 分子はオートファゴソーム形成とともに、脂肪滴形態および分布の調節にも必要なことが明らかになった。

宮口　健　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1826 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）生命情報学専攻
学位論文題目	／	Loss of NKX3-1 as a potential marker for an increased risk of occult lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma（口腔扁平上皮癌における後発リンパ節転移および予後不良の高リスクマーカーとしての NKX3-1 loss） International Journal of Oncology　平成 24 年 2 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　稲澤　譲治　　副査：教授　岸本　誠司　　副査：教授　三浦　雅彦

論文要旨

＜要旨＞

口腔扁平上皮癌（以下 口腔癌）の予後は頸部リンパ節転移の有無によって大きく左右され、全生存率はリンパ節転移のある患者において著しく低下する。リンパ節転移の主な原因および分子機構は未だはっきりと分かってはいない。ゲノムワイドに DNA コピー数異常を解析することで、癌の発達や予後に関わる因子を解明できると期待し、Affymetrix 社の Mapping 250K Array を用いて口腔癌 60 症例のゲノム DNA を解析した。更に、口腔癌の後発リンパ節転移のマーカーを探索するために、後発リンパ節転移と有意に相関する遺伝子のコピー数異常を統計解析により求めた。いくつかの遺伝子においてコピー数異常と後発リンパ節転移との間に有意な相関がみられ、それらの遺伝子を後発リンパ節転移マーカーの候補遺伝子として同定した。文献検索により、それらの候補遺伝子群よりホメオドメインを持つ転写因子である NKX3-1 のコピー数 loss に注目した。NKX3-1 は前立腺癌における癌抑制遺伝子として知られているが、口腔癌に関連する報告はされていない。NKX3-1 のコピー数異常に伴う mRNA とタンパク質発現をそれぞれ定量 RT-PCR と免疫組織化学染色により確認し、両解析とも NKX3-1 が後発リンパ節転移症例において有意に低発現している結果を示した。また、独立症例群における免疫組織化学染色においても、同様の結果を得た。更に、NKX3-1 が loss している症例では無病生存率および全生存率の両方が著しく減少することも分かった。これは NKX3-1 の loss が口腔癌の後発リンパ節転移マーカーとなる可能性を示唆しており、本研究は口腔癌における後発リンパ節転移と NKX3-1 の loss との関連を報告した最初の論文である。

＜緒言＞

頭頸部癌の一つである口腔扁平上皮癌（以下 口腔癌）は日本国内でも増加傾向にあり、それに伴い死亡者数も年々増加している。口腔癌治療において技術的には進歩しているものの、過去 20 年間治療成績の劇的な向上は見られていない。また、口腔癌における最も重要な予後因子は頸部リンパ節転移（以下 リンパ節転移）の有無であり、リンパ節転移のある患者は転移のない患者よりも 25％ほど生存率が低いことが報告されている。原発巣を制御することだけでなく、リンパ節転移の制御が口腔癌の治療成績向上には極めて重要である。特に、初診時にリンパ節転移が認められず、原発巣治療後に発見されるリンパ節転移（後発頸部リンパ節転移）は治療成績を低下させる重要な臨床的因子の一つである。この後発リンパ節転移を予測して予防的に頸部郭清を行うべきか、原発巣のみを治療して経過観察を行い、リンパ節転移が認められた時点で頸部郭清を行うべきかについては現在でも議論が分かれる。原発巣の部位、サイズ、組織学的または遺伝的特徴などにより後発的に転移を起こすリスクは異なるため、現状では後発リンパ節転移を正確に予測することは容易ではない。更に、口腔癌が頸部リンパ節へ転移する分子機構もはっきりとは分かっていないため、それらを解明すると同時に後発リンパ節転移予測の精度を向上させるマーカー探索も極めて重要である。そこで、癌細胞においてゲノム異常が高頻度に起こることに注目し、口腔癌における後発リンパ節転移に関わる DNA コピー数異常をマイクロアレイを用いてゲノムワイドに解析することにした。

＜方法＞

口腔癌 60 症例からのゲノム DNA を Affymetrix Human Mapping 250K Sty Array を用いて遺伝子ごとのコピー数を網羅的に解析した。フィッシャー正確確率検定にて後発リンパ節転移と有意に相関するコピー数異常を示す遺伝子群を同定した。公的データベースを用いた文献検索により癌および転移に関わる報告のある候補遺伝子群に絞り込み、更に口腔癌以外の癌においてリンパ節転移との報告がされている遺伝子一つに絞り込んだ。この遺伝子に関して、real-time RT-PCR と免疫組織化学染色（免疫染色）により mRNA 発現量とタンパク質レベルでの発現量を解析した。また、マイクロアレイ解析とは独立の症例群を用いて免疫染色を行い、タンパク質発現のバリデーションを行った。同定した遺伝子のコピー数異常による無病生存率と全生存率への影響も生存時間解析により調べた。

前 目次へ 次

＜結果＞
後発リンパ節転移と有意 ($p<0.05$) なコピー数異常を示す遺伝子であり、癌や転移で最も多く報告のあった NKX3-1 を同定した。NKX3-1 のコピー数 loss がある症例では、後発リンパ節転移を起こす傾向が見られることから、後発リンパ節転移に関わる遺伝子であると仮定した。また、マイクロアレイで解析した症例群を用いた遺伝子発現解析でも後発リンパ節転移症例群において有意に発現量が低下し、免疫染色によっても同タンパク質を発現する細胞数が有意に減少している結果が確認された。更にマイクロアレイ解析群とは別の独立症例群における免疫染色の結果、同様に NKX3-1 を発現する細胞数が後発リンパ節転移症例において有意に低下していることが確認された。Kaplan-Meier 法による生存時間解析により、NKX3-1 の loss を持つ症例群は再発・転移までの無病生存期間が著しく低下し、全生存率の著しい低下も見られた。Cox-hazard model による生存時間と臨床病理学的因子との相関解析では、NKX3-1 loss が最も有意に生存期間に影響するリスクファクターであった。

＜考察＞
NKX3-1 はホメオボックス遺伝子であり、ターゲット遺伝子のプロモーター領域に結合して転写抑制を行う転写因子である。癌研究においては 1996 年に前立腺癌との関係が報告されてからは、前立腺特異的な発現を示す遺伝子として知られ、前立腺癌の癌化、悪性化との関係が研究されてきた。その中で、NKX3-1 のコピー数 loss または低発現が前立腺癌を進行させ、更にはリンパ節転移にも関わるがん抑制遺伝子であると報告された。2008 年の報告では、NKX3-1 はリンパ管新生促進因子である VEGF-C のプロモーター領域に対する結合ドメインを持ち、通常、体細胞における発現では VEGF-C の発現を抑制していることが示された。この報告により、NKX3-1 の発現が低下することで VEGF-C の発現が十分に抑制されなくなり、発現が増加しリンパ管新生が亢進されてしまうことが示された。その結果、前立腺癌がリンパ節転移を起こしやすくなるという興味深い結果が報告された。これまで癌研究においては前立腺癌のみで NKX3-1 の関連が研究されてきたが、近年では乳癌との報告がされた。しかし、口腔癌のリンパ節転移との関連を示す研究は今のところ報告されていない。口腔癌においても前立腺癌と同様に、NKX3-1 のコピー数が減少することで本来 NKX3-1 が抑制すべき VEGF-C の発現上昇を招き、リンパ管新生が進行しやすくなったのではないか、その結果、頸部リンパ節への転移が起こりやすくなるのではないかと推測する。NKX3-1 がコードされている染色体 8 番長腕の loss は他の癌でも高頻度に見つかっており、他の癌においても NKX3-1 の loss が癌の悪性化に関与している可能性も考えられる。本研究ではコピー数異常が発端となり、mRNA およびタンパク質レベルにおいても、後発リンパ節転移症例において NKX3-1 の発現低下がみられた。必ずしもゲノム異常が直接的な原因でない場合もあるかもしれないが、口腔癌において NKX3-1 の低発現とリンパ節転移との間に高い相関があることは本研究において示されており、口腔癌のリンパ管新生を促進させる要因の一つであるという可能性が考えられる。この仮説の正否については今後 NKX3-1 の機能解析によって実証していく必要がある。論文本編でもデータを図示していないが、NKX3-1 が抑制している VEGF-C との発現差を検証するために NKX3-1 と同一症例において VEGF-C の mRNA 発現も定量し相関関係を解析した。一部の症例においては両遺伝子とも低発現していたが、残りの症例においては負相関を示す傾向がみられた。口腔癌においても NKX3-1 が VEGF-C の発現を抑制しているという仮説を裏付ける結果となるのではと考えているが、負相関を示さなかった一部の症例については再度検証する必要がある。リンパ節転移が起こると死亡率が高くなるので、生存時間解析において NKX3-1 の loss が見られる患者の生存率が顕著に低下することからも、NKX3-1 の loss は口腔癌において後発リンパ節転移のマーカーだけでなく生存率低下に関わる予後マーカーとなる可能性も示唆された。

＜結論＞
口腔癌外科手術における頸部予防郭清の予測診断の精度向上のためのマーカー探索を目的とし、後発リンパ節転移に関わる DNA コピー数異常を網羅的に解析し、NKX3-1 の loss が高い相関を示すことを発見した。NKX3-1 の loss は後発リンパ節転移と全生存時間に有意に関連しており、NKX3-1 の loss およびその低発現が口腔癌における後発リンパ節転移マーカーおよび予後マーカーとなる可能性が示唆された。

清水　恵　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1827 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）眼科学専攻
学位論文題目	／	Glucose hypermetabolism in the thalamus of patients with hemifacial spasm（片側顔面痙攣患者の脳糖代謝について） Movement Disorders 掲載　平成 24 年 2 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　水　澤　英　洋　　副査：教授　渋　谷　均　　副査：教授　杉　原　泉

論文要旨

<要旨>

ポジトロン断層法（PET）を用いて、片側顔面痙攣患者の脳内の機能的変化を調べることが目的である。私たちは、PET と 18F - フルオロデオキシグルコース（FDG）を用いて、右）片側顔面痙攣 13 例と左）片側顔面痙攣 13 例の脳糖代謝を測定した。全患者は、ボツリヌス毒素治療前（活性状態）とボツリヌス毒素治療後（抑制状態）の 2 回、PET 撮影を行った。Jankovic score を用いて痙攣の重症度の判定を行い、MRI を用いて顔面神経の圧迫を 3 段階で判定した。健常人 52 例を正常対象群とした。右）片側顔面痙攣患者群と左）片側顔面痙攣群において、活性状態と抑制状態のどちらにおいても両側視床の糖代謝亢進がみられた。しかし、抑制状態では、活性状態に比べ視床の糖代謝が有意に低下していた。また、活性状態における痙攣の重症度と顔面神経の圧迫との間に有意な相関がみられた。視床の糖代謝亢進は、皮膚や筋紡錘からの入力や顔面神経の逆行性伝導、中枢神経系の 2 次的な変化を含む複数の要因によると推測される。

<緒言>

片側顔面痙攣は、通常、顔面神経支配領域の顔面筋の片側の不随意な発作性の収縮と表現される。片側顔面痙攣の病因は顔面神経が後小脳動脈などによって圧迫されるために起こるとされており、中枢には病因が存在しないと考えられている。片側顔面痙攣の鑑別疾患には、眼瞼痙攣、眼輪筋ミオキミア、遅発性ジスキネジアなどが挙げられる。眼瞼痙攣は、眼輪筋の不随意収縮によっておこる局所ジストニアである。PET や fMRI を用いた過去の研究では、眼瞼痙攣患者の視床、基底核、小脳の活動性亢進が報告されている。過去に私たちが行った FDG － PET を用いた眼瞼痙攣の研究では、ボツリヌス毒素治療によって眼瞼痙攣を完全に抑制した状態において、両側視床の糖代謝亢進のみが観察されたが、眼瞼痙攣が残存した状態においては、両側視床に加え小脳の糖代謝亢進もみられた。私たちは、片側顔面痙攣患者では、筋肉の異常収縮による二次的な変化の結果、視床と小脳の糖代謝亢進が存在するとの仮説をたてた。無治療時およびボツリヌス毒素治療により痙攣を抑制した状態において、片側顔面痙攣患者の脳糖代謝を PET を用いて測定した。

<方法>

右）片側顔面痙攣患者 13 名（男性 9 名、女性 4 名、平均年齢 62.2 ± 11.5 歳）、左）片側顔面痙攣患者 13 名（男性 4 名、女性 9 名、平均年齢 64.2 ± 7.0 歳）、正常人 52 名（男性 26 名、女性 26 名、平均年齢 61.8 ± 6.3 歳）を対象とした。頭部 MRI や神経学的検査によって、脳の器質的な異常や他の精神神経学的疾患を除外した。この研究プロトコールは東京都健康長寿医療センターの倫理委員会の承認を得ており、全ての手続きはヘルシンキ宣言に基づいている。全ての患者が眼輪筋へのボツリヌス毒素注射を施行されている。痙攣がボツリヌス毒素治療によって十分抑制されている状態（抑制状態）とボツリヌス毒素治療の効果が消失した状態（活性状態）の 2 回にわたって全患者の PET 撮影を行った。ジストニアなどの他疾患を除外し、片側顔面痙攣であることを確認するために顔面筋の表面筋電図を記録した。各患者の痙攣の強さが脳糖代謝に与える影響を考慮するために、強度の判定を Jankovic score を用いて 1 － 5 の 5 段階で行った。活性状態における痙攣強度の平均は、右片側顔面痙攣群 2.23、左片側顔面痙攣群 2.31、抑制状態における痙攣強度の平均は、右片側顔面痙攣群 1.23、左片側顔面痙攣群 1.00 であった。脳の器質的疾患を除外し、顔面神経への圧迫を確認するために 3DSPGR 法、T2 強調法、CISS 法にて頭部 MRI（1.5 テスラ）を撮影した。頭部 MRI（CISS 法）を用いて、顔面神経の中小脳動脈による圧迫を grade1 から 3 の 3 段階に分類した。全例に対し、FDG を用いて、PET を撮影し、安静閉眼時脳糖代謝を測定した。PET 画像は、画像解析ソフト（SPM2）を用いて統計解析を行った。左右の患者群の痙攣出現時と痙攣抑制時それぞれの糖代謝を正常群と比較した。また、SPM 解析でみられた糖代謝亢進または低下部位に関心領域（ROI）を設定し、Wilcoxon の符号付き順位和検定を用いて、痙攣出現時と痙攣抑制時の糖代謝を比較した。さらに、痙攣の強さと顔面神経圧迫との相関および、痙攣の強さと糖代謝との相関を Spearman の順位相関を用いて調べた。

前 目次へ 次

＜結果＞
SPM 解析では、左右の片側顔面痙攣群の痙攣出現時および痙攣抑制時において、正常群と比較して両側視床の有意な脳糖代謝亢進がみられた。正常群と比較した視床の糖代謝は、右の片側顔面痙攣患者群において、痙攣出現時には、右 8.0%、左 7.1%、痙攣抑制時には、右 5.0%、左 4.2% 亢進していた。左の片側顔面痙攣患者群においては、痙攣出現時には、右 8.1%、左 7.9%、痙攣抑制時には、右 5.5%、左 5.4% 亢進していた。ROI 解析において、左右どちらの片側顔面痙攣群においても、痙攣出現時は痙攣抑制時と比べ両側視床の糖代謝が有意に亢進していた。
右）片側顔面痙攣患者及び左）片側顔面痙攣患者の全 26 名のうち、閉所恐怖症で MRI 撮影できなかった 1 名を除く 25 名の顔面神経に対する圧迫は、grade1：7 例（28%）、grade2：13 例（52%）、grade3：5 例（20％）であった。痙攣の強さと顔面神経の圧迫との間に有意な正の相関がみられた（相関係数（rs）= 0.65, P = 0.0014）が、痙攣の強さと視床の糖代謝との間には有意な相関はみられなかった。

＜考察＞
片側顔面痙攣の病因は、ほとんどの場合、血管による顔面神経の慢性的な圧迫によるとされており、視床の糖代謝亢進は片側顔面痙攣の病因によるものではなく、中枢の二次的な変化によるものと推測される。視床の糖代謝亢進を説明する機序として、以下の 4 つが考えられる。第 1 に、圧迫された顔面神経の興奮が逆行性に中枢を活性化させる可能性。第 2 に、顔面皮膚からの刺激が一次体性感覚野を介して基底核 - 視床 - 皮質回路を活性化させる可能性。第 3 に、眼輪筋の筋紡錘からの入力により視床が活性化される可能性。第 4 に、片側顔面痙攣では、眼瞼痙攣と同様に中枢の機能的変化が起こっている可能性である。
また、片側性の痙攣であるにもかかわらず、片側顔面痙攣患者の視床の糖代謝亢進は両側にみられた。Peller らは、fMRI を用いた研究において、指への刺激中に書痙患者の基底核や視床の活性化が両側性にみられたと報告している。ジストニアにおいては、片側の刺激によっても、基底核－視床－大脳皮質回路が両側性に活性化されるのかもしれない。もし、片側顔面痙攣とジストニアが病態生理のメカニズムを共有しているなら、片側性の片側顔面痙攣における両側視床の活性化を説明できるかもしれない。
視床の糖代謝は、活性状態と比較して、抑制状態では約 30％低下していた。これは、皮膚や筋紡錘から中枢への入力が減弱したためと推測される。ボツリヌス毒素は、シナプス前の遮断によって神経筋の伝導を抑制するため、私たちは、片側顔面痙攣の中心的な原因となるメカニズムにはほとんど影響を与えないと考えた。私たちは、ボツリヌス毒素治療は、皮膚からの体性感覚入力や筋紡錘からのニューロン投射を弱めることによって視床の活性を抑制すると提唱した。顔面神経からの逆行性伝導と中枢神経系の 2 次的な機能変化は、ボツリヌス毒素治療時においても存在する視床の活性化の要因である。
片側顔面痙攣発症のメカニズムについてはいくつかの仮説が提唱されている。古典的な仮説は、血管の圧迫を受けた部位における顔面神経の異所性興奮とその伝達によるものである。顔面神経はミエリンに覆われているが、血管と接する部位のミエリンがはがれむき出しの軸索が個々の神経線維間の直接的な連絡を促進する。それに対立する仮説は、過剰な入力活動や逆行性の刺激により顔面運動ニューロンの過剰な興奮がおこるというものである。片側顔面痙攣の重症度と顔面神経の圧迫の程度との相関について調べた報告はあまりないが、Tan らは、左側の痙攣が強い 2 例の両側性片側顔面痙攣患者について調べ、両患者で顔面神経の圧迫も左側のほうが強かったと報告している。
他方、視床の糖代謝は痙攣の重症度や顔面神経の圧迫の程度との相関がみられなかった。この研究において、正常群の視床の糖代謝の標準偏差は、患者群のものよりも大きかった。さらに、ほとんどの患者で痙攣の重症度が 1 であるにもかかわらず、患者群の抑制状態における視床の糖代謝は個人差が大きかった。これらのことから、私たちは、もともとの視床の糖代謝は個人によるばらつきが大きいために、痙攣の重症度や顔面神経の圧迫の程度との相関がみられなかったと考えた。片側顔面痙攣において視床の活性化が起こるメカニズムを解明するには、さらなる研究が必要である。

＜結論＞
片側顔面痙攣において、視床の糖代謝亢進が認められ、それは末梢からの入力や中枢の機能的変化による二次的なものであると考えられた。

油井　史郎　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1829 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）消化器病態学専攻
学位論文題目	／	Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single Lgr5+stem cell(単一 Lgr5+ 幹細胞より in vitro で増幅した培養大腸上皮細胞移植による機能的大腸上皮再生) Nature Medicine 掲載　平成 24 年 3 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　西村　栄美　　副査：教授　仁科　博史　　副査：教授　杉原　健一

論文要旨

＜要旨＞

本研究では、マウス大腸上皮細胞を長期に培養可能とする独自の体外培養法を確立した。本法では幹細胞性を維持した Lgr5+ 大腸上皮細胞を増やすことが可能であった。培養した大腸上皮細胞は上皮傷害型急性腸炎を惹起した大腸への移植後、上皮欠損部位に生着し一定の治療効果を示した。さらにこれらドナー上皮が、機能的大腸上皮を再生し長期にわたりレシピエント体内で維持されることも明らかとした。重要なことに、1 個の Lgr5+ 大腸幹細胞から培養し増やした細胞群の移植によっても同様の上皮再生を確認できた。これらの結果は、大腸上皮幹細胞をその幹細胞性を維持したまま体外で増やすことが可能であること、および幹細胞移植治療が実現可能であることを示すものと考えられた。

＜緒言＞

腸管上皮幹細胞は自己複製能と分化多能性を有し、組織恒常性維持に重要な役割を担う。近年、上皮幹細胞の維持に Wnt･Notch･BMP シグナルが関与することや、Wnt 標的遺伝子のひとつである Lgr5 が腸管上皮幹細胞の特異的マーカーであることが明らかにされてきた。

これら研究の進歩に伴い、腸管上皮幹細胞を単離し体外で増やし再生医療に応用する技術への期待が高まっている。しかしながら本研究開始時において、多くのヒト疾患で傷害をうける大腸の上皮細胞を培養する技術が無かったのみならず、すべての腸管組織において培養細胞移植治療の試みが成功したとする例はなかった。本研究では正常大腸上皮細胞の体外培養技術を独自に確立し、得られた培養細胞の移植によって傷害大腸上皮が再生可能か否かを検証することとした。

＜方法＞

マウス

通常の大腸上皮培養には C57BL/6J マウスを用いた。Lgr5+ 細胞可視化には Lgr5 プロモーター下流に EGFP を発現する Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 マウスを用いた。移植のドナー細胞は EGFP トランスジェニック (EGFP-tg) マウスより単離し、またレシピエントには RAG2 ノックアウトマウスを用いた。単一 Lgr5+ 細胞からの大量培養と移植実験には Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2 と R26R-Confetti を交配したマウスを用いた。

大腸クリプト単離

コラゲナーゼ、ディスパーゼおよび DTT 処理と比重遠心を組み合わせ、正常な成体マウスの大腸組織からクリプトを単離した。

半定量的 PCR

total RNA から逆転写反応により cDNA を作成し、遺伝子特異的プライマーを用いて解析した。PCR 産物はアガロースゲルで分離後、エチヂウムブロマイドで染色し観察した。

透過型電子顕微鏡

培養オルガノイドを含む I 型コラーゲンゲルをグルタルアルデヒド･OsO4 で固定後エポンに包埋したのち切片を作成し、酢酸ウラニルおよび酢酸鉛で染色し観察した。

細胞・組織染色

培養オルガノイドを含む I 型コラーゲンゲルや移植片を固定後に凍結切片とした。オルガノイドの形態評価のためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った。杯細胞の同定はアルシアンブルー染色で行った。抗 E-cadherin 抗体・抗 Carbonic anhydrase II（以下 CAII）抗体・抗 Chromogranin A（以下 CgA）抗体・抗 COX1 抗体・抗 KI67 抗体・抗 GFP 抗体・抗 DsRed 抗体および特異的 2 次抗体を用いて各種の蛍光免疫染色を行った。核は DAPI ないしは Hoechst33432 で染色した。

リアルタイムイメージング

5%CO2 ガス還流下および 37℃の恒温条件下で大腸上皮細胞を培養しつつ全視野蛍光顕微鏡（Delta Vision）を用いて 20 分間隔で撮像した。

核型解析

培養細胞を単一細胞へ分散後 KCl 溶液で処理しカルノア液で固定した。スライドグラスに伸展し乾燥させた後、DAPI

前　目次へ　次

による核染色を行い解析した。
培養細胞移植実験
EGFP tg マウス由来大腸上皮細胞を 1 週間培養しドナー細胞とした。単一幹細胞を体外で増やし移植する実験では、Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2 / R26R-confetti マウスにタモキシフェン投与後大腸上皮を単離し、RFP+EGFP+ 分画、すなわち子孫が RFP で標識される Lgr5+ 大腸上皮幹細胞をフローサイトメトリーで単離し培養して用いた。レシピエントには、経口 DSS 投与により大腸上皮を傷害した RAG2 ノックアウトマウスを用いた。細胞は経肛門的に移入した。移入後レシピエント大腸を摘出し、蛍光顕微鏡でドナー細胞生着領域の有無を確認した。陽性移植片を固定後に凍結切片とし、組織学的に解析した。
大腸上皮透過性試験
移植片が上皮バリアー機能を保持するか否かを解析するため、経口投与した DSS-TRITC の血中移行を、移植成功群・偽移植群間で比較した。

＜結果＞
正常マウスの大腸上皮を長期に培養できる条件を見出した
多くの検討の結果、マウス大腸クリプトを I 型コラーゲンゲルに包埋し、Wnt 関連タンパク (Wnt3a および R-spondin1、以下 Rspo1)、BMP シグナル阻害タンパク (Noggin)、EGF、HGF および牛血清アルブミン (以下 BSA) を含む無血清培地で培養すると、球状オルガノイドとして培養可能であることを見出した。オルガノイドの回収・分散後に同一条件で培養すると球状オルガノイドの再形成が見られ、この継代操作により 1 年を超す長期培養が可能であった。添加因子のうち Wnt3a･Rspo1 および BSA が細胞維持に必須で、Noggin･EGF･HGF は必須ではないものの培養効率を向上させた。
培養細胞は正常大腸上皮の性質を維持していた
オルガノイドは単層の E-cadherin 陽性上皮細胞から形成され、アルシアンブルー陽性杯細胞･CgA 陽性神経内分泌細胞･CAII 陽性吸収上皮細胞、COX1 陽性タフト細胞、KI67 陽性未分化細胞を有していた。透過型電子顕微鏡では上皮細胞に特徴的な微絨毛・密着結合に加え、内腔に粘液顆粒を有する杯細胞、基底膜側に電子密度の高い分泌顆粒を有する神経内分泌細胞、および分裂期染色体を示す増殖細胞の存在が明らかになった。継代による長期培養後も性状に変化はなく、染色体数は正常であった。
生理的な Lgr5+ 上皮幹細胞が相対的に増加していた
RT-PCR により、幹細胞マーカー遺伝子 Lgr5 が培養開始 1 週間で著増し、以後維持されることが示された。Lgr5-EGFP マウス由来クリプトの培養過程をリアルタイムで観察すると、Lgr5+ 細胞数が著増することが示され、本法が上皮幹細胞を相対的に増加させることがわかった。Lgr5 遺伝子発現増加に Wnt・Notch・BMP シグナルが関与すること、およびγセクレターゼ阻害剤による Notch シグナル阻害で幹細胞から杯細胞への分化が促進されることの 2 点から、培養幹細胞が生体内と類似した機構を介して自己複製能と分化能を維持することが示された。
移植により in vivo で正常な大腸上皮が再生し、傷害上皮を修復した
多くの検討の結果、EGFP tg マウス由来培養大腸上皮細胞がレシピエントマウス大腸の上皮欠損部位に生着する移植条件を見いだした。その結果ドナー由来細胞が、移植 1 週間後には潰瘍部上皮を主に平坦な面として被覆し、移植 1 ヶ月後には全ての分化細胞と増殖細胞を本来の位置に有する正常なクリプト構造を持つ大腸上皮を構築することを明らかにした。この移植上皮がレシピエント上皮と同等のバリアー機能を保持することは、高分子化合物に対する透過性の検討より明らかとなった。
大腸上皮移植が臨床経過上でも有益であった
移植成功群（N=4）と偽移植群（N=6) の比較の結果、移植成功群では移植後の体重増加が速やかであることから、急性腸炎モデルマウスに対する培養細胞移植が臨床的有用性をもつ可能性が示唆された。
1 個の Lgr5+ 大腸上皮幹細胞に由来する細胞移植でも正常な大腸上皮が再生した
本培養法により、ただ 1 個の Lgr5+ 大腸上皮幹細胞から大腸上皮細胞を大量に増やしえた。単一 Lgr5+ 細胞由来の培養大腸上皮を用いた移植によっても、全ての分化細胞と増殖細胞を含む組織学的に正常な大腸上皮が再生した。さらに、移植半年経過後もドナー由来幹細胞が正常な幹細胞として移植片内で機能することが明らかとなった。

＜考察＞
第一に、本研究では生理的なマウス大腸上皮幹細胞を体外で増やす独自の方法を確立した。本研究開始後に、複数の大腸上皮培養法が報告されたが、本法はそれらのいずれとも異なるものである。正常大腸上皮を、無血清で、継代操作を経て、長期にわたり維持可能とし、かつ Lgr5+ 幹細胞を数の上で増やしうる本法は、今後の大腸上皮幹細胞研究にきわめて有用なツールとなるものと考えた。

第二に、本研究は培養大腸上皮細胞を用いた同種間上皮移植に世界で初めて成功し、移植上皮が別の個体内で機能的大腸上皮を再生すること、上皮移植が急性腸炎の回復に一定の治療効果を有すること、更にはただ一個の Lgr5+ 幹細胞であってもこれを体外で増やし移植することで同様の機能的大腸上皮の再生が可能であることを示した。これら一連の結果は、Lgr5+ 幹細胞の幹細胞性を移植により証明した初めての結果であると同時に、培養腸管上皮幹細胞を利用した再生医療の可能性を示した画期的な結果であり、今後の腸管上皮再生研究に重要な知見を供与するものと考える。

梅田　茂明　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1836 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）包括病理学専攻
学位論文題目	／	Prognostic significance of HOXB4 in de novo acute myeloid leukemia（急性骨髄性白血病における HOXB4 の予後因子としての意義） Hematology　第 17 巻掲載　平成 24 年発行
論文審査委員	／	主査：教授　三浦　修　　副査：教授　田賀　哲也　　副査：教授　水谷　修紀

論文要旨

＜要旨＞

近年、造血幹細胞の維持・複製に関して、Homeobox 群の遺伝子の機能が注目され、その中でも HOXB4 は詳細な解析がなされている。さらに、最近の網羅的解析では造血幹細胞の制御を司る因子として HOXB4 に匹敵する複数の因子が同定された。しかしながら、ヒトの急性骨髄性白血病 (AML) の骨髄における幹細胞因子の十分な検討はされていない。本研究では AML 症例の骨髄材料を用いて HOXB4 と新しく同定された幹細胞機能に関わる遺伝子の発現を解析した。AML 症例では、対照骨髄と比較して HOXB4 の mRNA 発現量が有意に上昇していた。SPI-1 は AML 症例において発現量の有意な低下が認められたが、TCFEC, HMGB-1, FOS では対照群と比較して有意な発現量の差は認められなかった。免疫組織化学的に HOXB4 の発現を解析したところその染色態度は mRNA 発現量と相関し、AML 症例は、HOXB4 の高発現群と低発現群の二群に分かれることが明らかとなった。単変量解析及び多変量解析によって HOXB4 高発現は、予後良好を示す独立した因子であることが明らかとなった。予後に影響を与える因子として、HOXB4 高発現を示す群では薬剤耐性や増殖作用、リンパ球分化に関わる遺伝子の発現低下が見られた。以上、造血幹細胞の機能制御を行う分子の一つである HOXB4 の発現を調べることで、AML 症例の予後を予測する上で有用な情報を得られることが明らかとなった。 その機序については今後さらに検討を加える必要がある。

＜緒言＞

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) はすべての血液細胞の起源になる細胞である。自己複製により造血活動を行うが、その複製方法には二種類あり、幹細胞と幹細胞に分かれる対称性自己複製と幹細胞からその一段階分化した前駆細胞に分かれる非対称性自己複製がある。生体内での骨髄の状況に応じて、胎生期や造血の活動が亢進するようなストレスのあるときには対称性の自己複製が、通常の恒常性を維持するときには非対称性の自己複製が行われる。幹細胞移植を視野に造血幹細胞を増やす因子について研究がされていて、Homeobox(HOX) 群の遺伝子が対称性の自己複製を促し、造血幹細胞を増加させることが判明している。HOX 群の遺伝子の中では、HOXB4 が最も強力な造血作用があり、広く研究されている。さらにマウスにおける網羅的解析では、Tcfec, Hmgb-1, Fos, Sfpi-1 が HOXB4 に匹敵する幹細胞の活性化作用があることが示されている。

急性骨髄性白血病 (AML) は様々な遺伝子異常をきたすクローナルな疾患である。細胞遺伝学に基づいた WHO 分類は、予後を反映する良い指標となっているが、同一の核型異常をきたすグループの中での臨床像の違いに関する分子機構は不明な点が多い。白血病細胞は単一の腫瘍細胞のクローナルな増殖からなると考えられてきたが、近年の研究では白血病細胞の中にも多様性があり、HSC に類似した白血病幹細胞 (leukemic stem cell: LSC) を頂点とした層構造があることが提唱されてきている。

これまでに、造血幹細胞の機能調節に関る遺伝子については、ヒトを対象とした研究はあまりなされていない。本研究では HSC の活動を促す遺伝子が白血化に関与するかどうかを検討する目的で、臨床検体を用いて AML 骨髄での発現を調べた。

＜検体および方法＞

AML26 例と対照群 19 例の骨髄凍結標本から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成した。 TaqMan リアルタイム PCR を用いて、HOXB4, TCFEC, HMGB-1, FOS, SPI-1 の mRNA 発現量を定量した。解析には、内在性コントロールとして GAPDH を測定し ΔΔ 法で評価した。AML62 例と対照群 12 例の骨髄パラフィン標本において、酵素抗体法を用いて HOXB4 の免疫染色を施行した。各症例で 300 細胞あたりの陽性細胞の比率を比較した。AML 症例の予後について、診断日から生死あるいは打ち切りまでの日数、すなわち、全生存率を調査した。上記の凍結検体のある AML 症例において、HGF, IKZF2, ABCB1 の mRNA の発現量を定量した。HGF の mRNA 発現測定には TaqMan リアルタイ

前　目次へ　次

ム PCR を、IKZF2 および ABCB1 の発現測定には Syber green 蛍光検出システムによるリアルタイム PCR を使用した。HGF, IKZF2, ABCB1 の補正には内在性コントロールとして β -actin を使用した。

＜結果＞
対照群と比較して AML では骨髄中の HOXB4 の有意な発現の上昇が見られた。SPI-1 は AML において、有意な発現の低下が見られた。HOXB4 の免疫染色では対照骨髄の一部に陽性像を認めた。AML では HOXB4 陽性細胞の多い症例と少ない症例が見られた。対照群と比較して AML 全体の骨髄中 HOXB4 陽性率は高く、また、mRNA の発現量と免疫染色の陽性細胞率は有意に相関していた。HOXB4 陽性率を 40% で区切り AML を高発現群と低発現群の二群に分けた。Kaplan-Meier 生存曲線を用いた全生存率の評価では、HOXB4 高発現群が HOXB4 低発現群と比較して、有意に予後良好であった。寛解導入療法を施行した AML 例について、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を施行し、HOXB4 が核型から独立した予後因子となることを示した。既存の AML のマイクロアレイデータベース (Metzeler et al, 2008, Blood, GSE12417) を使用し、HOXB4 発現の高低で AML をグループ化し、相関する遺伝子を検索した。HOXB4 高発現の群では Septin ファミリーの遺伝子の高発現が認められた。逆に、HGF, IKZF2, ABCB1 が HOXB4 の発現と負の相関を示した。これら遺伝子についてリアルタイム PCR で mRNA の発現量を測定した。HOXB4 高発現群では IKZF2, ABCB1 の発現の有意な低下が見られた。HGF も同様な傾向はあったが、有意差は確認できなかった。

＜考察＞
ヒトの AML 症例において、HSC の制御に関わる遺伝子の 1 つである HOXB4 に mRNA の発現上昇が認められ、この遺伝子が白血化の機序に重要な役割があると考え、さらに免疫染色を行って検討した。免疫染色では、HOXB4 高発現群はびまん性の陽性像を示し、これらの症例群では対称性の自己複製が亢進している可能性が示唆された。HOXB4 を発現する白血病細胞は CD34 ＋ CD38- の幹細胞のポピュレーションには限定されていないことが過去に報告されており、本研究とも併せると HOXB4 は LSC だけではなく、それよりも分化した腫瘍細胞にも発現があると推測される。
WHO 分類では、正常核型を示す AML の亜分類に C/EBP, NPM, FLT3 などの転写因子の遺伝子変異の有無が用いられている。日常的な診療においては、検査されていないことも多く、本研究でもそれらの遺伝子の変異についての臨床情報は得られなかった。NPM の遺伝子変異のある AML では HOXB4 を含めた HOX 群遺伝子の高発現が報告されているが、NPM 野生型でも同様の表現型を示すものがあるとされており、その遺伝子変異の有無に関わらず、HOXB4 が AML の亜型を規定する因子になると考える。
HOXB4 高発現の群で低下のあった HGF, IKZF2, ABCB1 はそれぞれ増殖作用、リンパ球の分化、薬剤耐性に関わる遺伝子である。AML においてこれらの遺伝子の発現が低下していたことは、増殖能の亢進や異常分化がないこと、薬剤耐性が相対的に起こりにくいことを示す可能性があると考えられ、HOXB4 高発現群の予後良好を説明する理由になりうると思われる。ただし、遺伝子相互間の発現調節の機序は不明であり、HOXB4 高発現が二次的である可能性も考えられ、直接的な相互作用を検討する必要がある。

佐藤　弘　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1837 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）食道・一般外科学専攻
学位論文題目	／	Correlation between the pretherapeutic neutrophil to lymphocyte ratio and the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced esophageal cancer（治療前好中球・リンパ球数比を用いた進行食道癌に対する術前化学療法の病理組織学的効果予測の検討） World Journal of Surgery　第 36 巻第 3 号　617 頁～ 622 頁掲載　平成 24 年発行
論文審査委員	／	主査：教授　岸本　誠司　　副査：教授　江石　義信　　副査：教授　安原　眞人

論文要旨

＜要旨＞

現在の切除可能進行胸部食道癌に対する本邦における標準治療は，術前化学療法 (NAC) ＋手術である．しかし，NAC の効果予測因子の検討は未だ十分になされていない．好中球数／リンパ球数比 (NLR) は，大腸癌などで予後予測因子として有用であると報告されているが，食道癌に対する見解は定まっていない．NLR が切除可能進行胸部食道癌に対する NAC の病理組織学的効果予測因子として，有用であるか検討した．臨床病期 II-IV（UICC-TNM 第 6 版）の切除可能胸部食道癌に対し，術前化学療法を施行した 83 例 (臨床病期 II/III/IV：27/30/26）を対象とし，性別，腫瘍の主占拠部位，病理組織型，臨床病期 (cT, cN, cStage)，ASA-PS，術前化学療法施行前の血液検査結果 [CRP 値，アルブミン値，白血球数，好中球数／リンパ球数比 (NLR)，Glasgow Prognostic Score (GPS)] を，病理組織学的効果 (G3,G2,G1b vs. G1a,G0) の効果予測因子と成り得るか retrospective に検討した．その結果は，単変量解析では，cStage，cN，NLR に有意差を認め ($p<0.05$)，多変量解析では cN，NLR ($<2.2/\geqq 2.2$) に有意差を認めた ($p<0.05$)．したがって，NLR が高いものでは NAC の病理組織学的効果が乏しいことが多く，臨床的にリンパ節転移があるものと同様に簡便な効果予測因子と成り得ることが明らかになった．

＜緒言＞

本邦では，食道癌の発生頻度は諸外国と比し高く，2009 年では年間で約 12000 人が死亡している．食道癌は，早期より容易にリンパ節に転移し，また隣接臓器である気管・気管支や大動脈に浸潤する悪性度の高い癌腫である．進行胸部食道癌に対する本邦における標準治療は，以前は手術＋術後補助化学療法であったが，2007 年の Japan Clinical Oncology Group (JCOG) 9907 の結果に基づき術前化学療法 (NAC) ＋手術となった．NAC は micrometastasis の制御を期待されるが，NAC 施行中に癌が進行し，その結果切除不可能となる症例も散見される．したがって NAC の効果予測因子の確立が急務である．JCOG9907 レジメが標準治療になって日が浅いため，未だ十分に検討されていないのが現状である．NAC の non-responders が治療前に把握できれば，不要な補助療法を回避でき，初回治療として手術を選択することや他のレジメの補助療法を施行できる可能性がある．

最近，様々な癌腫において予後や補助療法の感受性を予測するのに，血清 CRP 値とアルブミン値を用いた Glasgow Prognostic Score (GPS) が有用であると報告されている．胸部食道癌においても，術前化学放射線療法における有用性が報告されている．しかしながら GPS は NAC においては未だ報告はない．好中球数／リンパ球数比 (NLR) も GPS 同様，血液検査より簡便に求めることができ，食道癌，胃癌，大腸癌や転移性肝腫瘍などで有用な予後や化学療法の感受性予測因子として報告されている．しかしながら，食道癌においては有用でないとの報告もあり，見解の統一を未だみていない．現在の本邦で行われている NAC のレジメ (JCOG9907) による効果予測因子の検討の報告もない．本研究の目的は，切除可能進行胸部食道癌に対する術前化学療法における NLR の病理組織学的効果予測因子を明らかにすることである．

＜方法＞

臨床病期 II-IV（UICC-TNM 第 6 版）の切除可能進行胸部食道癌に対し，JCOG9907 レジメ（5FU+CDDP）による術前化学療法を施行した 2007 年 5 月から 2010 年 6 月までの 83 例 (臨床病期 II/III/IV：27/30/26）を対象とした．病理組織学的効果判定は (G3/G2/G1b/G1a/G0:2/10/19/35/15) であり，病理組織学的効果 (G3,G2,G1b vs. G1a,G0) を性別，腫瘍の主占拠部位，病理組織型，臨床病期 (cT, cN, cStage)，ASA-PS，術前化学療法施行前の血液検査結果 [CRP 値，アルブミン値，白血球数，好中球数／リンパ球数比 (NLR)，Glasgow Prognostic Score (GPS) の各々の因子が，予測因子と成り得るか retrospective に検討した．

前　目次へ　次

＜結果＞
83 症例のうち，79 症例が 2 コースの NAC を完遂できた．残りの 4 症例のうち，1 症例が腫瘍の進行により，3 症例が副作用により 1 コースのみの施行となった．83 症例のうち 2 症例が腫瘍の気管浸潤のため試験開胸となった．残りの 81 症例に対して根治手術を施行した．この 81 症例を pathological responders (G3/G2/G1b) と non responders (G1a/G0) に分けて，比較検討した．単変量解析では cStage (P=0.005), cN (P=0.0001) , NLR (P=0.005) に統計学的有意差を認めた．NLR について Receiver operating characteristics (ROC) 曲線を用いて，カットオフ値を検討すると，pathological responders (G3/G2/G1b) を予測するのに 2.2 が適切と判断した．NLR が 2.2 以下では pathological responders (G3/G2/G1b) が 56％であるのに対し，2.2 以上では 21％であり統計学的有意差を認めた（P=0.001）．多変量解析において，治療前の NLR (<2.2/≥2.2) (P=0.043) とリンパ節転移 (P=0.002) に統計学的有意差を認めた．

＜考察＞
切除可能進行胸部食道癌に対し, 本邦では NAC を施行することが標準治療であるが, その病理組織学的効果は高くなく, 47-60％と報告されている．NAC 施行中に癌がより進行してしまう症例もあり，効果予測因子の確立が急務であると言える．c-erbB2，p53，MIB-1，VEGF などの血清や分子マーカーが化学療法の効果予測因子として報告されているが, 日常臨床には煩雑であり，その低い正診率のため広く使用されているものではない．また NAC(5FU+CDDP) で用いられているレジメに対する検討ではない．NAC における 18F-FDG-PET における Standard Uptake Value (SUV) 値の変化が，病理組織学的効果予測因子として有用であるとの報告は多いが，NAC 前後で比較するものであり，治療前に予測できるものではない．NLR は胃癌，大腸癌，肝細胞癌，肺癌，転移性肝腫瘍などで，予後や化学療法の感受性を予測するのに有用であるとの報告もあるが, 食道癌に対しては検討が十分にはなされていない．本研究から治療前の NLR が, 病理組織学的効果予測因子として有用であることが明らかになった．NLR は，どこの施設でも繰り返し簡便に測定できることが大きな長所である．
全身の炎症反応と癌の予後の関係から血清 CRP 値とアルブミン値を用いた Glasgow Prognostic Score (GPS) が，予後や補助療法の感受性を予測するのに有用であるとの報告は多い．しかし本研究では統計学的有意差を認めなかった．進行食道癌では血清 CRP の高値やアルブミン値の低値となる症例では切除不可能なことが多く，切除可能病変では症例数も限られるため有用とならないことが推測された．
総リンパ球数 (TLC) が増えれば，NLR は小さくなる．したがって，TLC を増やすことが出来れば，NAC の治療効果を高めることが出来る可能性がある．TLC を増やす働きのある免疫増強栄養剤の治療前の積極的な活用により，NLR を小さくすることが可能か否か，さらに予後の改善ができるかの検討が今後必要である．NAC が本邦における標準治療となってまだ日が浅く，術後の観察期間が短いために，本研究では病理組織学的効果予測因子を検討した．pathological responders は予後が良好であると考えられるため，NLR が小さい症例ではよい予後が期待されるが，今後は NLR と生存率の関係も明らかにすべきと考える．

＜結論＞
治療前 NLR が, 進行胸部食道癌に対する術前化学療法の病理組織学的効果予測因子となることを, 我々は初めて示した．治療前 N 因子とともに，NLR は日常臨床で簡便に用いることができ，効果予測因子としてとても有用であると考えられる．

Khamas Ahmed Hameed 博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1838 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 （博士課程）腫瘍外科学専攻
学位論文題目	／	Screening for epigenetically masked genes in colorectal cancer using 5-aza-2’-deoxycytidine, microarray and gene expression profile（DNA メチル化阻害剤、マイクロアレイ、遺伝子発現プロファイルを使用した大腸癌における不活性化遺伝子のスクリーニングについて） Cancer Genomics and Proteomics 第 9 巻第 2 号 67 頁～ 75 頁掲載 平成 24 年 3 月発行
論文審査委員	／	主査：教授 稲澤 譲治 副査：教授 湯浅 保仁 副査：教授 渡辺 守

論文要旨

<要旨>

大腸癌抑制遺伝子の解明は重要である。我々は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法を用いて、5 つの大腸癌細胞株における網羅的な遺伝子発現変化を、DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycitidine の投与前後でそれぞれ解析した。発現に変化を示した遺伝子を、大腸組織検体のマイクロアレイ解析によって得られた遺伝子発現プロファイルとの統合解析で解析した。有意性のある候補遺伝子については、大腸癌細胞株と大腸癌患者から採取した腫瘍組織と正常粘膜組織のペアサンプルを使用した MSP、リアルタイム qRT-PCR 法を用いて検証を行った。

68 遺伝子が 5-aza-2'-deoxycitidine 投与後に再発現し、正常大腸粘膜組織において過剰発現を示し、それら遺伝子の中には、大腸癌でメチル化が起きていることが既に知られている遺伝子群も含まれていた。我々の選択基準に則り遺伝子の絞り込みを行い、16 遺伝子を抽出し、中でも有用と思われる 2 遺伝子（ASPP1、SCARA5）を候補遺伝子として選択した。

15 種の大腸癌細胞株においては、SCARA5 の 20% にメチル化が認められた。続いて、大腸癌と正常粘膜の 23 組の検体を用いて SCARA5 のメチル化を調べたところ、17% にメチル化が認められた。また、SCARA5 の mRNA 発現に関しては、正常組織に比べて、大腸癌細胞株及び腫瘍組織において有意な発現低下が認められた（p<0.001、p=0.001）。ゲノムワイドな手法を用いたスクリーニング法は、特定の候補遺伝子の検索に有用と思われ、今回抽出した SCARA5 遺伝子は大腸癌においてメチル化を認め、発現が低下していた。SCARA5 遺伝子は大腸癌の発癌に関係がある可能性がある。

<Aim>

Unearthing of silenced genes in colorectal cancer (CRC).

<Materials and Methods>

Oligonucleotide microarray used to find changes in gene expression in five CRC cell lines before and after 5-aza-2'-Deoxycitidine treatment. Upregulated genes were integrated with expression profile of matched colorectal tissue samples. Methylation-specific polymerase chain reaction and Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction were used to further analyze candidates using 15 CRC cell lines and 23 paired samples.

<Results>

After applying study selection criteria for 68 genes obtained from integrated arrays, we identified 16 genes; apoptosis-stimulating of p53 protein 1(ASPP1) and Scavenger receptor class A, member 5 (SCARA5) were selected for further analysis. Methylation was only identified for SCARA5 in 20% of cell lines and 17% of tumor samples. Down expression of SCARA5 was observed in CRC cell lines and tumor samples compared to normal (P<0.001 and P=0.001, respectively).

<Conclusion>

Genome-wide screening identifies genes potentially affected by methylation in CRC. SCARA5 may have a role in tumorigenesis in CRC.

大東　寛和　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1839 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）循環制御内科学専攻
学位論文題目	／	Improved prognosis of Takayasu arteritis over the past decade – comprehensive analysis of 106 patients –（近年の高安病における予後の改善：連続 106 症例についての包括的な研究） Circulation Journal　第 76 巻第 4 号　1004 頁～ 1011 頁掲載　平成 24 年 4 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　木村　彰方　　副査：教授　吉田　雅之　　副査：准教授　上阪　等

論文要旨

＜要旨＞

高安病は近年その画像診断法や治療法の進歩が報告されているが、予後の変化についての報告は少ない。本研究では当院に通院している高安病と診断された連続 106 症例について、発症時期が 1999 年以前か 2000 年以降か、発症年齢が 39 歳以前か 40 歳以降か、再発の有無、HLA-B52 の有無で 2 群に分類しその臨床的特徴について比較検討した。発症時期が 2000 年以降の群においては早期診断が可能となり、画像診断が血管造影から CT/MRI 中心に変化し、弓部分枝の閉塞病変の減少および中等度以上の大動脈閉鎖不全症の減少と重症度の軽減を認め、またプレドニゾロンや免疫抑制剤の使用量および使用頻度の増加を認めた。発症年齢が 40 歳以降の群において冠動脈病変および高血圧の合併の増加、中等度以上の大動脈閉鎖不全症の減少を認めた。再発を認めた群ではプレドニゾロンの最高投与量の増加および免疫抑制剤の使用率の増加、プレドニンの平均減量速度の増加を認めた。HLA-B52 の有無では 2 群間で有意な差を認めなかった。近年高安病は画像診断の進歩により早期診断が可能となり、また薬物療法の進歩と合わせてその重症度が軽減されていると示唆された。またプレドニンの減量速度と再発の関連が示唆され、ステロイド減量時は慎重に検討する必要がある。

＜緒言＞

高安動脈炎は稀な非特異的大型動脈炎であり、発症機序は未だ不明である。大動脈およびその主要分枝、肺動脈等を侵して動脈狭窄・閉塞・拡張を生じ、その病変部位や広がりにより多彩な臨床所見を示す。近年、非侵襲的な画像診断法や免疫抑制剤などの治療法の進歩が報告されているが、その予後の変化に関するデータは少ない。本研究では、日本における高安病の近年の変化や、高齢発症群における特徴、再発する群における特徴、また HLA-B52 の有無における特徴について検討した。

＜方法＞

2000 年から 2010 年の間で東京医科歯科大学循環器内科に通院した高安病患者連続 106 症例を対象とした。高安病を 1999 年までに発症した群と 2000 年以降に 2 群に分け、患者背景、症状、身体所見、血液検査所見、画像検査所見、治療法、予後について比較検討した。その他 40 才以前と以降発症群での比較および再発の有無、HLA-B52 の有無で同様の項目につき比較検討した。

＜結果＞

・患者背景

高安病患者の 3/4 が 10 ～ 20 代で発症したが、50 歳以上の高齢発症患者も 7% いた。発症時の最も多い主訴は発熱（53%）や易疲労感（39%）であり、次いで脈拍の減弱や欠損（38％）、血圧左右差（38％）、頚部血管雑音であった（30%）。90％以上の患者で大動脈弓部分枝に病変を認め、最も多い病型はⅤ型（43%）であった。また観察期間中に 3 名の死亡を認めた。

薬物療法としては 79％の患者でステロイド療法を行い、ステロイド抵抗性もしくは減量困難であった 19％の患者に免疫抑制剤を使用した。3 種以上の免疫抑制剤に抵抗性を示した 4 名の患者で生物製剤を使用した。手術療法を要した患者は 23% であった。

・近年における高安病の変化

2000 年以降の群に高安病を発症した群においては、以前と比較して発症から診断までの期間が短縮し（1.2 ± 2.3 年 vs. 5.2 ± 6.1 年、p=0.0005）、画像診断法が血管造影から CT/MRI 中心に変化していた。重症度に関しては弓部分枝の閉塞病変の減少（23% vs. 49%、p=0.005）および中等度以上の大動脈閉鎖不全症の減少（11% vs. 28%、p=0.04）と軽減を認め、

前　目次へ　次

またプレドニゾロンの最大使用量（38.9mg ± 14.6mg vs. 22.4 ± 14.4mg、p<0.0001）および使用頻度（97% vs. 70%、p=0.0007）、免疫抑制剤の使用頻度（43% vs. 7%、p<0.0001）の増加を認めた。
・高齢発症群における特徴
40 歳以上の高齢発症群は 13% であった。高齢発症群では冠動脈病変の増加（29% vs. 6%、p=0.02）や高血圧の合併症（77% vs. 40%、p=0.02）が増加し、中等度以上の大動脈弁閉鎖不全症の減少（0% vs. 27%、p=0.04）を認めたが、その他有意差は認めなかった。
・再発の有無による特徴
2000 年以降発症の 35 名において、ステロイド療法後に再発した患者は 69% であった。再発群ではプレドニン最高投与量の増加（42,2 ± 14.8mg vs. 29.5 ± 15,4mg、p=0.03）および免疫抑制剤の使用率の増加（63% vs. 0%、p=0.0005）、プレドニンの平均減量速度の高値（4.0 ± 3.5mg/ 月 vs. 1.1 ± 1.1mg/ 月、p=0.02）を認めた。多変量解析ではプレドニンの平均減量速度が唯一の独立した再発の規定因子であった。
・HLA による差
HLA typing を施行した 89 名中 52% の患者で HLA-B52 が陽性であったが、2 群間で臨床的特徴に有意差は認めなかった。

＜考察＞
本研究では病型としてⅤ型が最も多くⅣ型が少ないという結果であり、これは以前本邦から報告された結果と同様であったが、他国からは異なった病型の分布が報告されている。この原因は未だ不明ではあるが、高安病が欧米よりアジアや中東でより多いといったことと併せて人種や遺伝的要素が高安病において重要であることが示唆される。
高安病の重症度は最近 10 年間で軽減していることが本研究から示されており、これには非侵襲的画像診断法の進歩による早期診断や免疫抑制剤および生物製剤といった薬物療法の進歩が影響していると考えられる。画像診断法の進歩によって血管内腔のみならず血管壁の性状も評価できるようになり、内腔狭窄や拡張を生じる前に診断できるようになってきた。また PET などは炎症の局在および程度を診断することも可能であり、これにより CRP や ESR などの炎症マーカーの有意な上昇がなくとも、動脈硬化などとの鑑別が可能となってきた。免疫抑制剤や生物製剤の有効性も近年多く報告されており、また本研究でもこれらの使用により高安病の重症度が軽減していると思われることから、その使用が推奨されると考える。また手術前後はステロイドおよび免疫抑制剤を用いて炎症をしっかり抑えて施行した方が術後の成績が良好であると報告されており、手術時はより積極的な使用が推奨されている。
大型動脈炎には高安病と巨細胞性動脈炎があるが、病理組織学には判別できないといわれている。この 2 疾患の主な違いは発症年齢の違いと病変の分布であり、大型動脈炎を単純に発症年齢で分類することを提案する人もいる。それ故本研究では高安病と診断された患者において発症年齢で比較検討してみたが、高齢発症群と若年発症群でその臨床的特徴に大きな差は認めず、年齢だけで高安病と巨細胞性動脈炎を分類するのは難しいと考えた。
高安病において再発は大きな問題であり、プレドニンを 10mg 以下に減量すると 6 ヶ月以内に 72% の症例で再発を認めたと報告されている。本研究でも 2000 年以降に発症した患者で 70％に再発を認め、再発の独立した規定因子はプレドニンの平均減量速度のみであった。この結果より、プレドニンの減量においては慎重に検討する必要があると示唆された。
本研究では HLA-B52 の有無により臨床的特徴に明らかな差は認めなかったが、以前 HLA-B52 陽性群においてはより重症であり、またステロイド抵抗性の患者が多いと報告されている。これに関しては、高安病における近年の変化（重症度の軽減や積極的な免疫抑制剤の使用）が影響していると考えられた。

＜結語＞
近年高安病は画像診断の進歩により早期診断が可能となり、また薬物療法の進歩と合わせてその重症度が軽減されている。またプレドニンの減量速度と再発の関連が示唆され、ステロイド減量時は慎重に検討する必要がある。

上村　宗弘　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1840 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）循環制御内科学専攻
学位論文題目	／	Role of coronary CT angiography in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus（無症候な 2 型糖尿病患者における冠動脈造影 CT の役割） International Heart Journal　第 53 巻第 1 号　23 頁～ 28 頁掲載　平成 24 年 1 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　小川　佳宏　　副査：教授　下門　顕太郎　　副査：教授　吉田　雅幸

論文要旨

＜要旨＞

虚血性心疾患の症状を持たない糖尿病患者に対して、CT を用いて冠動脈の精査を行った。結果として、30.5％の患者に有意狭窄が認められた。また、急性冠症候群につながる可能性のある high-risk plaque を 17.1％の患者に認めた。糖尿病患者の冠動脈では、石灰化スコアが高値（平均 486.2）であることが確認されたが、石灰化スコアが 100 未満の患者でも 23.2％の患者に有意狭窄が認められ、石灰化スコアが 0 である場合でも、5％に有意狭窄が確認された。本研究によって、糖尿病患者では、症状が無い場合でも冠動脈疾患を保持する可能性があることが示された。単変量ロジスティック解析では、有意狭窄病変と関連するのは、脂質代謝異常（p=0.033）であり、high-risk plaque に関連するのは、喫煙（p=0.030）であった。本研究では、症状のない糖尿病患者における high-risk plaque の有病率を初めて報告した。

＜目的＞

糖尿病患者では虚血性心疾患の典型的な症状が出現しないことがしばしば経験される。それゆえ、糖尿病患者の冠動脈疾患を、どのような兆候を理由に、またどのような方法で診断していくのかは難しい問題である。本研究では、虚血性心疾患の症状を持たない糖尿病患者の冠動脈病変の有病率を明らかとするため、冠動脈 CT を行い、結果を検討した。

＜方法＞

平成 21 年 4 月から平成 22 年 8 月の期間で、2 型糖尿病の患者で虚血性心疾患の症状を持たない患者を対象として、冠動脈 CT を行った。また、年齢が 35 歳未満の患者、血清クレアチニン値が 1.5㎎ /dl 以上の患者は除外した。冠動脈 CT は 64 列 CT(Aquilion 64、東芝メディカルシステムズ、大田原市、日本) を使用した。冠動脈 CT と同時に、石灰化スコア（Agatston score）を算出し、そのスコアが 400 未満の患者のみを解析の対象とした。結果は患者の臨床情報の詳細を知らない循環器医と放射線科医の 2 名が判読した。この研究計画は事前に国立国際医療研究センター病院内の倫理委員会での承認を経て実行された。

＜結果＞

120 名の患者に冠動脈 CT が行われた。平均年齢は 65 ± 8.8 歳で、90 名が男性、30 名が女性で、平均の HbA1c 値は 7.2 ± 1.4％であった。石灰化スコアが 400 未満であった患者は 82 名であった。冠動脈内腔の 70％以上の狭窄を有意狭窄と定義したところ、30.5％の患者に有意狭窄が確認された。また、動脈硬化性プラークの内部に 30 Hounsfield Unit 未満の低い CT 値の部分があり、かつ、正常な部分の血管外径に比べて 10％以上の血管外径の拡大を呈するプラークを high-risk plaque として定義した。この high-risk plaque が 17.1％の患者に認められた。さらに、これらの high-risk plaque の 66.7％は有意狭窄病変ではなかった。患者単位で検討すると、有意狭窄病変を保持する患者は、high-risk plaque を保持する可能性が有意に高いことが分かった（カイ 2 乗検定　p=0.022）。石灰化スコアの低い患者群に関して検討すると、石灰化スコアが 100 未満の患者群（55 名）では、有意狭窄の有病率が 23.2％あり、石灰化スコアが 0 の群（20 名）においても、5％に有意狭窄を認めた。単変量ロジスティック解析では、有意狭窄病変と関連するのは、脂質代謝異常（p=0.033）であり、high-risk plaque に関連するのは、喫煙（p=0.030）であった。

＜考察＞

これまでにも糖尿病患者での冠動脈 CT 所見についての報告はあるが、high-risk plaque の有病率を報告したものは、本研究が最初である。有意狭窄の有病率に関しては、先行研究では、有症状の患者群では 33％から 42％であり、無症状の患者群では 15.2％から 29％と報告されている。本研究では、30.5％の患者に有意狭窄を認めたが、これは先行研究の結果よりもやや高いものであった。

前　目次へ　次

糖尿病患者では石灰化スコアが高値であることは、いくつかの研究で示されている。本研究でも全症例の平均の石灰化スコアは 486.2 と高値であった。しかし、比較的に低い石灰化スコアの患者群においても有意狭窄が存在することが今回の研究で判明した。石灰化スコアは冠動脈内のプラークの量と相関し、冠動脈疾患のリスクになると考えられるが、糖尿病患者においては、石灰化スコアが低い場合でも、注意が必要であると推察される。
糖尿病患者に虚血性心疾患が高率に合併することは異論のないところであろうが、特段の症状がない患者を、どのように評価してゆけばよいかは難しい問題である。薬剤負荷シンチグラムをスクリーニング検査として用いた検討があるが、その検査結果は患者の予後を改善しなかった。本研究の結果では、有意狭窄が 30.5％、心事故へ発展する可能性のある high-risk plaque が 17.1％の患者に確認された。冠動脈 CT がスクリーニング検査として有用であるかどうかは、前向き研究を行わなければ議論できないが、有意狭窄だけではなく、high-risk plaque の存在を指摘できる点で、冠動脈 CT には利点があると考えられる。high-risk plaque が心事故へとつながることを防ぐ治療法の確立が待たれるが、冠動脈 CT はその存在を同定する侵襲性の低い検査であると考えられる。

中港　秀一郎　博士（医学）

学位記番号	／	甲第 1842 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 31 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）腫瘍放射線医学専攻
学位論文題目	／	Prevalence of esophageal cancer during the pretreatment of hypopharyngeal cancer patients: routinely performed esophagogastroduodenoscopy and FDG-PET/CT findings（下咽頭癌患者に食道胃十二指腸内視鏡検査と FDG-PET/CT を施行した場合に重複する食道癌の有病率に関する研究） Acta Oncologica　平成 24 年 1 月 online 発表
論文審査委員	／	主査：教授　喜多村　健　　副査：教授　江石　義信　　副査：准教授　大橋　勇

論文要旨

＜要旨＞

下咽頭癌に重複する食道癌の有病率はアジアで高く、増加しているが最近の本邦における有病率は明らかではない。今回我々は下咽頭癌と診断された治療前の患者に食道胃十二指腸内視鏡検査（以下 EGD：esophagogastroduodenoscopy ）と FDG-PET/CT を施行することで、食道癌の有病率を求め各々の検査の果たす役割について検討した。下咽頭癌患者の 51.5% が食道癌と診断され既知の報告より高い有病率を示したが、大半 (82.8%) は食道表在癌であった。ヨード染色が行われたことと頭頸部癌の中でも下咽頭癌患者に限定されていたことが、高い有病率につながったと考えられる。このうち FDG-PET/CT で診断されたのは 20.7% に留まり、多くは (80%) 進行癌であったことから表在癌の検出に関しては EGD に及ばないが、FDG-PET/CT は予期せぬ多臓器重複癌の検出に有用な事がある。

＜緒言＞

下咽頭癌は早期発見が難しく、他の頭頸部癌に比べて予後が悪い。先進国においても進行癌で発見される事が多く、5 年生存率は 20-40% とされる。さらに重複癌の存在が予後に影響する。特に食道癌の合併が多い事が知られているが、近年の本邦における有病率は明らかではない。食道癌の標準的検査は EGD であることは広く知られているが、EGD は患者にある程度の侵襲を伴うことと、局所の評価しか得られない。近年登場した FDG-PET/CT は一回の検査で全身を評価できるが、仮に食道癌の検出に関して EGD と同程度の成績を示すことができれば、代替検査としての役割を果たす可能性がある。今回、EGD と FDG-PET/CT を施行することで、治療前の下咽頭癌患者における食道癌の有病率を求めるとともに、EGD と FDG-PET/CT の果たす役割について検討した。

＜方法＞

2005 年 9 月から 2010 年 9 月の間に新規の下咽頭癌と診断された 33 人 (男性 30 人、女性 3 人 . 平均年齢 65 歳、幅 40-79) に prospective に EGD と FDG-PET/CT を施行した。今回の研究の基準は次の通りである。

(1) 患者は新規発症の下咽頭癌患者であり、病理学的検査で証明されていること

(2) 患者は下咽頭癌の治療前に食道癌の治療歴がないこと

(3)FDG-PET/CT は下咽頭癌治療開始前に施行されていること

(4)EGD は下咽頭癌治療開始前に施行されていること

(5)FDG-PET/CT は EGD の前後 1 ヶ月以内に施行されていること

臨床病期分類は UICC（7 版）に従った

EGD では通常観察に加えてヨード染色が行われた。肉眼的に明らかな食道癌あるいはヨード不染帯がみられた場合には生検が施行され、病理学的に癌と診断された場合には病変の数と深達度を記録した。進行癌の場合には CT 所見も参考にして T 因子が決定された。

FDG-PET/CT では食道に異常集積がみられた場合に関心領域を設定して、maximum standardized uptake (SUVmax) を測定した。バックグラウンドより高い集積が視覚的に明らかな場合には異常集積と定義し、これが局所的に認められた場合には malignancy と診断した。

＜結果＞

33 例の下咽頭癌患者（全例で扁平上皮癌）全例に EGD と FDG-PET/CT が施行された。下咽頭癌の病期は stageI 4 例、stageII 6 例、stageIII 7 例、stage IVA 14 例、stageIVB 1 例、stage IVC 1 例であった。

EGD では 33 例中 17 例 (51.5%)、29 病変の食道癌が診断され全例で扁平上皮癌であった。T 因子の内訳は T1a 21 例、T1b 3 例、T3 5 例であった。17 例中 8 例（47.1%）は 2 病変以上の食道癌が診断され、最多で 4 病変であった。進行癌

前 目次へ 次

の 5 例中 4 例 (80.0%) は表在癌も合併していた。
FDG-PET/CT では 33 例中 6 例 (18.2%) が食道癌と診断された。6 例の SUVmax の幅は 4.4-33.2 であった。T 因子の内訳は 6 例中 5 例が T3、残りの 1 例は T1b であった。別の症例で食道に局所的というよりはむしろびまん性の軽度集積（SUVmax 3.8）を認めた症例が認められたが、逆流性食道炎など炎症性変化の可能性が考慮され両悪鑑別困難と診断された。実際は EGD で T1b の食道癌が診断された。FDG-PET/CT での T 因子ごとの感度は T1a 0%、T1b 33%、T3 100% であった。

＜考察＞
治療前の下咽頭癌患者の食道癌有病率は 51.5% であった。過去の通常観察のみの EGD での報告よりも高い有病率を示した。この理由として一つは全例にヨード染色が施行されたため食道表在癌の割合が高まったこと、２つ目は頭頸部癌の中でも下咽頭癌患者に限定されていたことなどが要因と考えられる。世界的にみると日本を含めたアジアでは、この傾向が強い。食道表在癌であれば EMR での治癒が期待できるため、ヨード染色を用いた EGD でのスクリーニングは有用である。近年は Narrow band imaging(NBI) を用いた拡大観察が普及してきており、ヨード染色と合わせて用いる事でさらに成績が向上するとの報告もある。一方で FDG-PET/CT では食道癌の検出は 20.7% に留まった。これは過去の報告 (14.3%) に近い結果であった。一般に食道癌の深達度と FDG 集積の程度には相関があり、原発巣のサイズと FDG 集積には強い相関があるが、T1a の食道癌に関しては感度 0% との報告もあり、我々の結果も同様であったことから、ある程度の大きさの病変でないと検出は難しい。一方で FDG-PET/CT は予期せぬ多臓器重複癌を検出することがある。食道癌以外では前立腺癌の 1 例のみであったが、follow-up 目的で施行された FDG-PET/CT では 2 例の肺癌を検出した。重複癌が見つかった場合には 80% の症例で治療方針に影響を与えたとする報告もあり予後に影響する可能性がある。

＜結論＞
治療前の下咽頭癌患者の食道癌有病率は 51.5% であった。これは過去の報告と比べて高い有病率であった。食道表在癌の割合が高い（82.8%）ことが主な要因と考えられる。この場合は EMR での治癒が期待できる。FDG-PET/CT は 20.7% の食道癌を検出するに留まったが、予期せぬ多臓器重複癌を検出することがあり治療方針や予後に影響を与える可能性がある。

横山　直幸　博士（学術）

学位記番号	／	甲第 135 号
学位授与	／	平成 24 年 3 月 22 日
研究科専攻	／	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　（博士課程）人工臓器工学専攻
学位論文題目	／	Alterations in red blood cell volume and hemoglobin concentration, viscoelastic properties, and mechanical fragility caused by continuous flow pumping in calves（連続流血液ポンプを装着した牛の赤血球における、体積・ヘモグロビン濃度・粘弾性・機械的脆弱性の変化に関する研究） Artificial Organs　第 35 巻第 8 号　791 頁～ 799 頁掲載　平成 23 年 8 月発行
論文審査委員	／	主査：教授　三林　浩二　　副査：教授　髙久田　和夫　　副査：教授　奈良　信雄

論文要旨

＜要旨＞

5 頭（95.6 ± 10.8kg）の仔牛（ホルスタイン種）に対して、対外設置型磁気浮上遠心血液ポンプ MedTech Dispo の植え込み手術を行い、血液ポンプによる補助循環開始前後の血液を採取して実験サンプルとした。採取したサンプルに対して、赤血球平均体積 MCV・血球内平均ヘモグロビン濃度 MCHC の計測と、赤血球の動的変形能と抗溶血特性の定量を行った。また、本研究では赤血球の変形能計測のために、赤血球懸濁液に対して周期的に変動するせん断流れを発生させ、そのときの赤血球の様子を記録するシステムを開発した。変形能の評価には、伸縮する赤血球の長手方向長さ L と垂直方向長さ W を用いて無次元の変形能評価指標 L/W を計算し、変動するせん断応力に対して赤血球が示す L/W の平均値を、各サンプルの変形能として定量した。また、採取した各時刻における血液サンプルを、二重円筒管からなる一様せん断負荷装置に設置し、30 分間のせん断負荷により生じた血漿中遊離ヘモグロビン濃度を計測することで、抗溶血特性の評価とした。

ポンプ開始 1 時間後の血液では、開始直後に比べて MCV は 1.064 ± 0.006 倍、MCHC は 0.906 ± 0.050 倍に変化した ($p<0.05$)。また、赤血球変形能の指標である L/W はポンプ開始 1 時間で有意に増加し、赤血球の総体的な弾性が向上した事を示した。さらに、補助循環開始後の血液サンプルでは、一様せん断負荷装置によるせん断の追負荷により遊離するヘモグロビン濃度が有意に低く、ポンプによるせん断負荷により、溶血に対する赤血球全体の機械的耐久性が見かけ上、向上したことが示唆された。

実験に示された結果は、「血球体積 MCV が小さく血球内ヘモグロビン濃度 MCHC が高く、低弾性で脆弱な高加齢度赤血球が、血液ポンプの機械的せん断により選択的に破壊され、または脾臓において代謝され、高変形能を有する若年赤血球の割合が相対的に増加したために」生じたと考えられた。また、赤血球の変形能と機械的せん断に対する脆弱性との間には、強い負の相関があることが示唆された。

連続流の血液ポンプによる機械的補助循環では、術後数時間の急性期において、脆弱な高加齢度赤血球が選択的に破壊され、高耐久で強靭な若年赤血球の割合が増加することが分かった。

＜諸言＞

連続流の人工心臓は比較的シンプルな構造であり、拍動流型に比べて 1) 小型化が可能、2) 人工弁が不要であるため安価で高耐久、3) 流量コントロールが容易、という特徴を有する。しかし、連続流人工心臓による高せん断流れは、赤血球の破壊（溶血）と血小板の活性化による血栓形成を引き起こす可能性がある。過度の溶血現象は、溶血性貧血や腎不全の原因となり、人工心臓開発における重要課題の一つである。

臨床例や動物実験における研究において、人工心臓を用いた補助循環開始の数時間後に溶血現象が起こる事が報告されており、また、同様の現象は人工心臓適用中に輸血を行った直後にも生じることが報告されている。2008 年、迫田らは、人工心臓を含む閉鎖回路により血液を環流する in Vitro 実験を行い、数時間の機械的補助循環により赤血球平均体積 MCV が増加し、赤血球内ヘモグロビン濃度 MCHC が減少する事を示した。著者らはこの結果を、「人工心臓の機械的せん断により高加齢赤血球が選択的に破壊され、若年赤血球の割合が増加した」と解釈し、臨床や動物実験においても同様の現象が起こっている可能性があると考えた。本研究では、迫田らの行った研究を in Vivo へと拡大するとともに、人工心臓により高加齢度赤血球が選択的に破壊されるメカニズムを明らかにすることを目的に、人工心臓を植え込む動物実験を行い、赤血球を機械力学的・形態学的に評価した。

＜方法＞

5 頭のホルスタイン (95.64 ± 10.76kg) に対して、左心房脱血・下降大動脈送血により、磁気浮上型遠心式血液ポンプ

MedTech Dispo の植え込み手術を行い、50mL/kg/min にて左心補助循環を行った。ポンプ駆動の直前・直後に左頸部動脈から血液サンプルの採取を行い、採取した血液サンプルに対して、自動血球分析装置による赤血球の平均体積 MCV [fL]・血球中ヘモグロビン濃度 MCHC[g/dL] の計測、周期的せん断負荷装置を用いた赤血球の変形能 L/W[-] の計測、そして、一様せん断負荷装置によるせん断の追負荷により血漿中に遊離したヘモグロビン濃度 freeHb[mg/dL] の計測を行った。一様せん断の追負荷により生じた freeHb は、採取した血液サンプルの機械的せん断に対する脆弱性として定義された。

＜結果＞
血液ポンプ植え込みは 4 ～ 5 時間の手術により順調に行われ、ポンプ回転数・バイパス流量・血圧・Hct・動物血液中の血漿中遊離ヘモグロビン濃度に、大きな変化はなく、5 回の植え込み手術は再現性よく行われたと判断された。
ポンプ駆動開始直前に比べてポンプ 1 時間後のサンプルでは、赤血球平均体積 MCV が 1.064 ± 0.006 倍に増加し、血球中ヘモグロビン濃度 MCHC が 0.906 ± 0.050 倍に減少した ($p<0.05$)。対して、ポンプ開始後 1 時間から 5 時間の間においては、有意な変化は認められなかった。
また、赤血球の変形能 L/W は、ポンプ開始直前のサンプルに比べて、ポンプ 1 時間～ 5 時間後の群において、有意に高い結果となった ($p<0.05$)。
一様せん断の追負荷により血漿中に遊離した freeHb は、ポンプ開始 1 時間後において有意に減少し ($p<0.05$)、ポンプ開始 1 時間から 5 時間の群においては有意な変化が認められなかった。

＜考察＞
赤血球は加齢を経ることにより、MCV が減少し MCHC が増加することが知られている。このことより、本研究において得られた MCV と MCHC の変化に関する結果は、「ポンプせん断により、若年性赤血球の割合が増加した」と解釈することが可能である。この仮説を裏付けるために、ポンプ開始直前の血液を赤血球の加齢度ごとに分離したサンプルを作成して MCV・MCHC を計測した結果、ポンプせん断後の血液は、若年性赤血球のサンプルに近い MCV・MCHC を示した。
ポンプせん断後の赤血球変形能 L/W は、ポンプ開始直前に比べて有意に向上していることが観測された。この原因を究明するために、ポンプ開始直前の血液を赤血球の加齢度ごとに分離したサンプルに対して血球変形能計測を行った結果、ポンプせん断後の血球は若年赤血球のサンプルに類似した L/W を示した。この結果は、MCV と MCHC の変化に関する解釈の裏付けとなるものであった。
一様せん断負荷装置を用いて計測した赤血球の機械的せん断に対する脆弱性は、ポンプ開始 1 時間で劇的に減少した。過去の研究によれば、高加齢度赤血球は機械的せん断に対して脆弱であると報告されており、脆弱性評価の観点においても、前述の仮説を裏付けるものとなった。また、血球変形能 L/W の平均値と一様せん断の追負荷により遊離した freeHb との間には、強い負の相関 ($R2=0.7499$) が観測された。このことより、「高加齢度赤血球は、変形能が低いために、せん断応力に対して脆弱である可能性」が示唆された。
実験の結果、「連続流血液ポンプの機械的せん断により、変形能が低く脆弱な高加齢度赤血球が破壊、あるいは、損傷して脾臓などで除去された結果、高い変形能と耐久性を有する若年赤血球の割合が増加し、血液全体としての抗溶血特性が向上する可能性」が示唆された。このメカニズムによれば、高加齢度の極めて脆弱な赤血球のみを破壊／除去する血液ポンプ、言い換えると、若年性の赤血球まで破壊しない低せん断のポンプにおいては、駆動後数時間において一過性の溶血現象が起こる可能性があり、また、高加齢度赤血球の割合が多い血液を輸血した場合にも、同様の現象が起こると予想される。また、同様の機序で機械的補助循環中に輸血を行うと、高加齢度赤血球の急激な溶血が生じる可能性が高い。これに対しては、遠心分離法により高変形能な若年赤血球のみを取り出し、輸血することにより、溶血のリスクを軽減できる可能性が示唆された。

＜結論＞
本研究において行った in Vivo 実験により、以下のことが示唆された。
「機械的補助循環では、変形能が低くせん断に対して脆弱な高加齢度赤血球が、血液ポンプの機械的せん断により破壊され、若年赤血球の割合が増加する。これにより、機械的補助循環では特異的に、急性期や輸血直後に一過性溶血現象が生じる。」

訂　正

本誌 60 巻 1 号（2012）佐藤健次論文「骨盤内臓器の自律神経支配」（19〜30 頁）におきまして，図 14 が脱落しておりました．お詫び申し上げるとともに訂正いたします．

26 頁 右段 18 行目〜27 頁 5 行目

以上、大内臓神経一副腎髄質という神経・内分泌系も精管内精子輸送に関与していることが考えられ，従来交感神経の中枢とされていた胸腰髄のうち，下部胸髄由来は大内臓神経･副腎髄質（内分泌）経路，腰髄由来は腰内臓神経・下腹神経経路という 2 経路の脊髄中枢が示された．なお，これらの制御様式は膀胱頚部（内尿道括約筋），前立腺，膣上部の平滑筋，内肛門括約筋においても同様に認められた（図 14）．

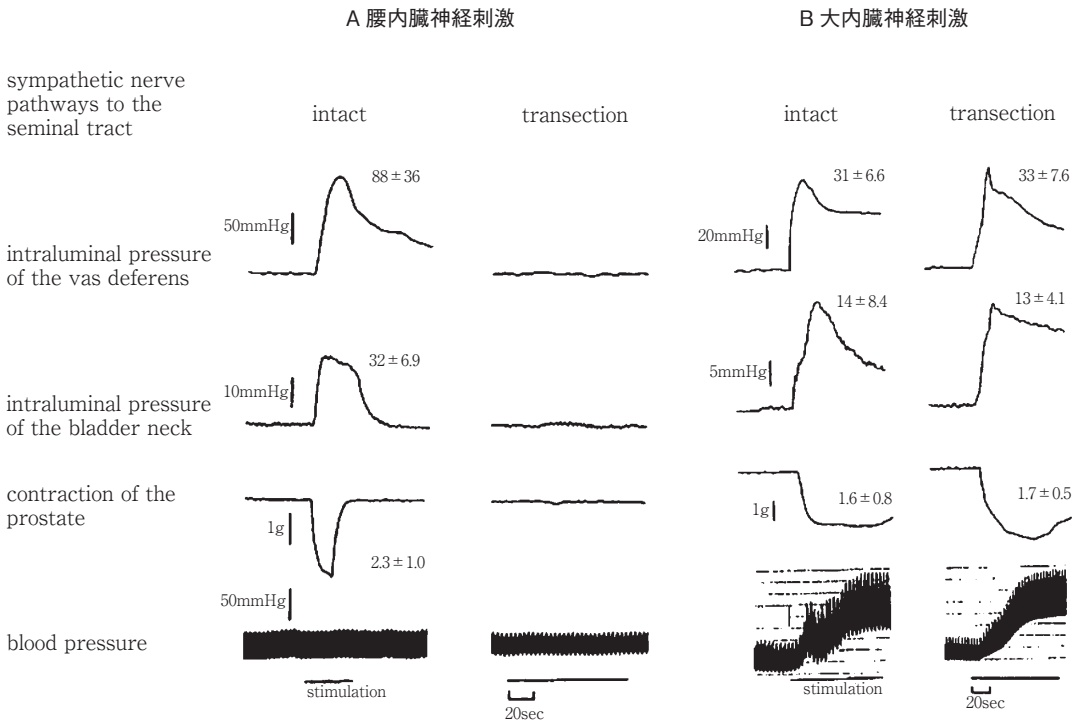


図 14．大内臓神経・副腎髄質路[26)]
A. は腰髄・腰内臓神経・下腹神経経路，B は胸髄・大内臓神経・副腎髄質経路の反応を示す。腰髄起始のすべての交感神経切断（Transection）後，大内臓神経刺激で反応が起こり，血圧の上昇を伴う。

『お茶の水醫學雑誌』編集委員会

前 目次へ 次

編集後記

季節の移ろいを冬から春へと感ずる中、新しくなりましたお茶の水醫學雑誌も、お陰様で第60巻2号を発行する運びとなりました。その間、前号の反響も多くいただきました。貴重なご意見は、これからの雑誌作りに反映させて行きたいと存じます。

さて、今回は総説が3論文、原著論文なし、症例報告が2論文という内容です。原著論文は保健衛生学科からの学位論文投稿の中に時期的な要因で掲載できる段階のものが無かったためですが、症例報告が少ないのは少し気になります。第1号の発行以来、症例報告などの論文投稿を熱心に呼びかけて来たのですが、3ヶ月に満たない期間でしたので、多くの先生方に新しくなった本誌のことを知って頂くには時間的に難しかったのかもしれません。まだ知名度が足りませんので、今後は、関連病院の先生方に本誌の有用性をもっとアピールしていく必要があるようです。総説に関しては、今回も3名の本学名誉教授の先生から玉稿をいただきました。在任中にお聞きしていた内容以外にも多くの新たな情報が満載されており、あらためてその内容のすばらしさに感銘しました。総説は毎回とても内容が充実していることから、今後はプレスリリースなどで最近話題となった研究テーマ等に関しても原稿執筆を依頼する予定でいます。

また、今回が初の企画となりましたが、学位論文の内容紹介はいかがでしたか？知っている人の名前を見つけて初めてその人の研究内容を知ったということもあるのではないでしょうか？また自分の研究テーマと近い内容を見つけて掲載論文をじっくり読んでいただく機会にもなれば編集者冥利に尽きます。1年間の学位審査論文を年4回の発行ですべて収録する予定でいますので、論文審査の済んだ方々には本誌への掲載を記念として保存してくださることをお勧めします。論文審査委員の先生方には自分が審査した論文の記録としてお役立ていただければ幸いです。

最後に前号でもお願いしましたが、本学の関連病院ならびに同窓会員の方々から今後多数の投稿をいただけますよう期待しております。また､読者からの本誌に関する様々なご意見を参考としながら本誌の内容も徐々に充実したものへ発展させていく所存でおりますので、皆様からの多数のご助言やご支援をお願い申し上げます。

末筆となりましたが、当雑誌の発行にご協力を頂いております方々、査読をして下さいました先生方、資金面でのご協力を下さいます和同会、雑誌の広報及び発送をして下さいます医科同窓会の皆様に心より御礼を申し上げます。

編集長　江石義信

お茶の水醫學雑誌投稿規程

1．投稿は原則としてお茶の水医学会会員に限る。
2．日本語で書かれた学位申請論文、および総説、原著論文、症例（事例）報告、資料、教室研究業績等を受け付ける。
3．論文の採否は編集委員会が決定する。掲載は採択順とする。特別掲載については別途考慮する。
4．原稿は、A 4 の用紙を用い、ワードプロセッサーを用いて作成する。原文と複写 2 部、計 3 部を投稿する。原稿の構成は表紙、要旨、本文、引用文献表、図の説明、表、図の順序とする。
　1）表紙：分類、論文題名、著者名、所属、連絡先、別冊希望部数を明記する。
　2）和文要旨：400 字以内で作成し（ダブルスペース）、下に 5 語以内の key word を日本語と英語で付記する。
　3）英文要旨：300 語以内で作成する（ダブルスペース）。これに英文題名、ローマ字による著者名および所属名を付記する。なお英文については、native speaker による校閲済の証明を必要とする。この証明が無い場合には編集委員会が校閲を依頼し、その費用を別途著者に請求する。
　4）本文：ダブルスペースで作成する。新かなづかい、横書で原稿サイズは A4 判、文字サイズは 12 ポイントとする。改行は 1 字下げ、大見出しはⅠ．Ⅱ．Ⅲ．‥‥ 、中見出しは 1. 2. 3. ‥‥ 、小見出しはⅰ．ⅱ．ⅲ．‥‥ 、細見出しは a.　b.　c. ‥‥とする。文中を欧文およびその仮名書きはできる限り避ける。
　なお省略語は初筆時に「正式名（省略語）」の形で記述することにより、それ以降用いても良い。
　5）文献表：引用文献は既刊あるいは掲載決定（要掲載証明）の著書、原著、総説に限る。本文中に引用順に 1)、2)、3）と番号を入れ、その順に整理する。
＊原著（雑誌名の省略は、医学中央雑誌および Index　Medicus に準ずる。）
例：1）鈴木太郎 , 山田花子：糖尿病性神経障害の発生機序について．糖尿病　29：975-982,1986.
　　2）Suzuki T, Yamada H: A study of mechanisms causing diabetic disorders of peripheral neurons.　Diabetes　29 : 975-982, 1986.
＊著書（分担執筆）
　引用文献の著者に関しては、3 名まで記述する。
　和文では、4 名以下の方は、他。
　英文では、4 名以下の方は、et al と表記する。
　6）図、写真、表
　①そのまま縮小して印刷できる大きさ・画質の原画または表を本文とは別に作成する。
　②図については、その上に図の番号を「図 1 」、「図 2 」のように記載する。なお図の説明は別紙にまとめて記載することとし、図番号、図の表題、図の説明文を和文で記載する。
　③写真については、縮小印刷にも耐える鮮明な写真（デジタル写真の場合は十分な解像度で撮影した写真）として作成する。なおカラー写真の場合は別途費用を請求する。
　④表については表番号、表題をまず記し、その下に表、表の下に表の説明を入れる。
5．費用
　①掲載料は 1 頁 12000 円とする。ただし編集委員会から依頼した原稿については徴収しない。
　②別刷代は実費を著者が負担する。
　③カラー図版がある場合はその印刷にかかる実費を著者が負担する。
　④英文要旨の校閲を編集委員会から依頼する場合には、その費用を別途著者が負担する。

6．症例における患者情報保護に関する指針
　社団法人日本病理学会より症例報告における患者情報保護に関する指針が、診断病理 vol.29 No.1 January 2012 に公表される。
　従って、以下の基準を順守のこと。

　①患者の氏名、イニシャル、雅号は記述しない。
　②患者の人種、国籍、出身地、現住所、職業歴、既往歴、家族歴、宗教歴、生活習慣・嗜好は、報告対象疾患との関連性が薄い場合は記述しない。
　③日付は、記述せず、第一病日、３年後、１０日前といった記述法とする。
　④診断科名は省略するか、おおまかな記述とする（たとえば、第一内科の代わりに内科）
　⑤既に診断・資料を受けている場合、他病名やその所在地は記述しない。
　⑥顔面写真を提示する際には目を隠す。　眼疾患の場合は、眼球のみの拡大写真とする。
　⑦症例を特定できる生検、剖検、画像情報の中に含まれる番号などは削除する。

東京医科歯科大学
お茶の水医学会

The Ochanomizu Medical Society

Tokyo Medical and Dental University, School of Medicine

Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo

Japan

編集委員会

委員長
江石 義信

委　員
河野 辰幸　　秋田 恵一
古川 哲史　　宮崎 泰成
明石　巧　　佐藤 千史
宮本 真巳

Editorial Committee

Editor in chief
Yoshinobu Eishi

Editors
Tatsuyuki Kawano
Keiichi Akita
Tetsushi Furukawa
Yasunari Miyazaki
Takumi Akashi
Chifumi Sato
Masami Miyamoto

お茶の水醫學雜誌　第 60 巻　第 2 号

発　行　　2012 年 5 月　20 日

編集権
発　行　　お茶の水医学会
会 長　湯浅 保仁
〒113-8519
東京都文京区湯島 1-5-45
人体病理研究室内
TEL:03-5803-5172
ochamed.aps@tmd.ac.jp

印　刷　　solve

前　目次へ