博士の学位の授与に係る論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

報告番号	学位	氏名	題目	授与日
甲第5042号	医学	伊藤　浩光	Dominant Expression of DCLK1 in Human Pancreatic Cancer Stem Cells Accelerates Tumor Invasion and Metastasis （ヒト膵癌における浸潤と転移は癌幹細胞に高発現しているDCLK1により促進される）	平成27年3月31日
甲第5043号	医学	大谷　賢志	Matrix metalloproteinase-14 mediates formation of bile ducts and hepatic maturation of fetal hepatic progenitor cells. （Matrix Metalloproteinase-14は、胎生期肝幹・前駆細胞の成熟化を調節する）	平成27年3月31日
甲第5044号	医学	増田　大機	Overexpression of the S100A2 protein as a prognostic marker for patients with stage II and III colorectal cancer （stage II、III大腸癌における予後予測因子としてのS100A2の過剰発現）	平成27年3月31日
甲第5045号	医学	伊藤　俊輔	Crucial Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Indoxyl Sulfate-Induced Vascular Inflammation （尿毒症毒素によって誘導される血管炎症におけるアリルハイドロカーボン受容体の役割）	平成27年3月31日
甲第5046号	医学	再努尓　阿布利米堤	Usefulness of the transfer function index (TFI) for diagnosing peripheral arterial disease in patients with arterial calcification （動脈石灰化症例での末梢動脈疾患診断における波形解析指標(TFI)の有用性）	平成27年3月31日
甲第5047号	医学	野﨑　賢吾	Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes （腸管上皮オルガノイドとの共培養による腸管上皮間リンパ球の効果的増殖と動的解析）	平成27年3月31日
甲第5048号	医学	谷口　未樹	Evaluation of interferon resistance in newly established genotype 1b hepatitis C virus cell culture system （新しく樹立されたC型肝炎genotype 1b細胞培養系の有用性）	平成27年3月31日
甲第5049号	医学	仁賀　建夫	Relationship between regional population and healthcare delivery in Japan （地域の人口と医療供給の関係に関する研究）	平成27年3月31日
甲第5050号	医学	大山　潤	Size of the intracranial optic nerve and optic tract in neonates at term-equivalent age at magnetic resonance imaging （Magnetic Resonance Imagingによるterm-equivalent ageの新生児の頭蓋内視神経径、視索径についての検討）	平成28年3月31日
甲第5051号	医学	神谷　綾子	Prognostic value of tropomyosin-related kinases A, B, and C in gastric cancer （胃癌におけるTrkA, B, C蛋白の予後的重要性）	平成28年3月31日
甲第5052号	医学	髙橋　健太郎	High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b （高脂肪食はmiR-27bを介した伝導障害により心房性不整脈の発症に関与する）	平成28年3月31日

甲第5053号	医学	加藤　陽子	Vessel Wall Inflammation of Takayasu Arteritis Detected by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging: Association with Disease Distribution and Activity （高安動脈炎の炎症の造影MRIによる評価：病変の広がりや疾患活動性との関連）	平成28年3月31日
甲第5054号	医学	佐藤　文哉	Semi-in-situ atomic force microscopy imaging of intracellular neurofilaments under physiological conditions through the ‘sandwich’ method （生理的条件下における細胞内ニューロフィラメントの「サンドイッチ」法によるsemi-in-situ原子間力顕微鏡観察）	平成28年3月31日
甲第5055号	医学	赤星　径一	Expression of connective tissue growth factor in the livers of non-viral hepatocellular carcinoma patients with metabolic risk factors （糖尿病肥満関連肝癌の背景肝におけるconnective tissue growth factor(CTGF)の発現に関する研究）	平成28年3月31日
甲第5056号	医学	近藤　伸平	Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates （自家滑膜幹細胞の移植は高齢サルの半月板再生を促進する）	平成28年3月31日
甲第5057号	医学	Michelle Loyola Nuylan	Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells （がんにおけるLAPTM5の発現抑制に関する研究）	平成28年3月31日
甲第5058号	医学	小宮　力	Ipragliflozin improves hepatic steatosis in obese mice and liver dysfunction in type 2 diabetic patients irrespective of body weight reduction （イプラグリフロジンは肥満マウスの脂肪肝及び2型糖尿病患者の肝機能を体重減少非依存的に改善させる）	平成28年3月31日
甲第5059号	医学	志村　治彦	Joint capsule attachment to the coronoid process of the ulna: an anatomic study with implications regarding the type 1 fractures of the coronoid process of the O’Driscoll classification （尺骨鉤状突起への関節包付着部に関する解剖学的検討—O’Driscoll分類1型骨折との関連）	平成28年3月31日
甲第5060号	医学	今田　安津子	A functional SNP in FLT1 increases risk of coronary artery disease in a Japanese population （FLT1の機能性SNPは冠動脈疾患のリスクを増加させる）	平成28年3月31日
甲第5061号	医学	宇土　美於	Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a doseand time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems （モノヨード酢酸は濃度依存性および時間依存性に関節炎、滑膜炎を生じさせる）	平成28年3月31日
甲第5062号	医学	熊谷　智彰	Loxoprofen sodium induces the production of complement C5a in human serum （ロキソプロフェンナトリウムはヒト血清中で補体C5aの産生を誘導する）	平成28年3月31日
甲第5063号	医学	川村　尚子	Recovery of renal function after radical nephrectomy and risk factors for postoperative severe renal impairment: A Japanese multicenter longitudinal study （根治的腎摘除後の腎機能回復、および重篤な腎機能低下の予測因子の検討：国内多施設共同縦断的研究）	平成28年3月31日
甲第5064号	医学	中川　潤	Women’s Preference for a Male Acquaintance Enhances Social Reward Processing of Material Goods in the Anterior Cingulate Cortex （女性の知人男性に対する選好は、前帯状回において物品の社会的報酬処理を促進させる）	平成29年3月23日
甲第5065号	医学	徐　成	Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice （概日時計システムは骨吸収を制御する）	平成28年7月31日

甲第5066号	歯学	BLIZNIUK　Anastasiya	Association of oral health literacy with oral health behaviour and oral health status in Belarus （ベラルーシにおけるオーラルヘルスリテラシーと歯科保健行動および口腔保健状況との関連について）	平成28年9月23日
甲第5067号	歯学	石上　貴之	Effects of Occlusal Supporting Area on Dynamic Posture against Disturbance by Electrical Stimulation （咬合支持域が電気的外乱刺激時の動的姿勢に及ぼす影響）	平成27年3月31日
甲第5068号	歯学	林　海里	The facilitatory effects of hyperbaric oxygen treatment on mem-brane bone wound healing in a rat calvarial defect model （ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた高気圧酸素療法の膜性骨創傷治癒促進効果）	平成27年3月31日
甲第5069号	歯学	大村　友理	Comparison of patient-reported outcomes between immediately and conventionally loaded mandibular two-implant overdentures: A preliminary study （下顎インプラントオーバーデンチャーの即時荷重・通常荷重における患者報告アウトカムの比較）	平成27年3月31日
甲第5070号	歯学	金　柔炅	Osteogenic Potential of Mouse Periosteum-Derived Cell Sorted for CD90 In Vitro and In Vivo （CD90で選別したマウス骨膜由来細胞のin vitroとin vivoにおける骨形成能力）	平成27年3月31日
甲第5071号	歯学	小倉　健司	Short-term intermittent administration of parathyroid hormone facilitates osteogenesis by different mechanisms in cancellous and cortical bone （短期間の副甲状腺ホルモン間欠的投与は海綿骨と皮質骨において異なるメカニズムにより骨形成を促進する）	平成27年3月31日
甲第5072号	歯学	ROMERO Maria Jacinta Rosario Hernandez	Casein: A Potential Salivary Phosphoprotein Homologue for Tooth Mineral Regulation Modeling （カゼイン：歯質石灰化制御モデルの唾液リンタンパク質の同族化合物としての可能性）	平成28年3月31日
甲第5073号	歯学	隈　陽一郎	Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats （成長期ラットにおける間欠的低酸素による鼻気道障害）	平成28年3月31日
甲第5074号	歯学	黒佐　通代	Differences between Computer-Based and Paper-Based Assessments of the Clinical Reasoning Competency of Dental Students （コンピュータ試験とペーパー試験における学生の臨床推論能力測定の相違について）	平成28年3月31日
甲第5075号	歯学	吉田　千紘	Property of human bone marrow stromal cells derived from bone fragments removed in sagittal split ramus osteotomy （下顎枝矢状分割術時に除去される骨片から採取される骨髄間質細胞の性質）	平成28年3月31日
甲第5076号	歯学	遠井　政行	Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts （ヒト胎盤間葉系幹細胞由来エクソソームは線維芽細胞に可塑性を与える）	平成28年3月31日
甲第5077号	歯学	佐々木　陽子	Correlation between body movements and salivary secretion during sedation （静脈内鎮静法における体動と唾液分泌量の関係）	平成28年3月31日
甲第5078号	歯学	上原　智己	Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2-Induced Maxillary Bone Regeneration （RANKL結合ペプチドOP3-4の送達は、BMP-2が誘導する上顎の骨再生を促進する）	平成28年3月31日

甲第5079号	歯学	大庭　祥子	Screening tests for predicting the prognosis of oral intake in elderly patients with acute pneumonia （急性期肺炎高齢者における介入後の経口摂取再開可否を予測するスクリーニングテスト）	平成28年3月31日
甲第5080号	歯学	尾田　誠一郎	Golgi-Resident GTPase Rab30 Promotes the Biogenesis of Pathogen-Containing Autophagosomes （ゴルジ体に局在するGTPase Rab30は病原体含有オートファゴソームの生合成を促進する）	平成28年3月31日
甲第5081号	歯学	始平堂　由佳	Porphyromonas gingivalis, a Periodontal Pathogen, Enhances Myocardial Vulnerability, thereby Promoting Post-infarct Cardiac Rupture （歯周病原細菌Porphyromonas gingivalisは心筋の脆弱性を強めることで心筋梗塞後の心破裂を誘発する）	平成28年3月31日
甲第5082号	歯学	佐藤　隆明	Morphological evaluation of the adhesive/enamel interfaces of two-step self-etching adhesives and multimode one-bottle self-etching adhesives. （2ステップセルフエッチング接着材及びマルチモードワンボトルセルフエッチング接着材を用いたエナメル質接着界面の形態学的評価）	平成28年3月31日
甲第5083号	歯学	品川　淳一	Dentin bonding performance and interface observation of an MMA-based restorative material （MMA系修復材料の象牙質接着性能と接着界面の評価）	平成28年3月31日
甲第5084号	保健学	宿谷　賢一	Novel round cells in urine sediment and their clinical implications （尿沈渣の新しい丸細胞とその臨床的意義）	平成28年3月31日
甲第5085号	医学	千葉　恭敬	MDCK cells expressing constitutively active Yes-associated protein (YAP) undergo apical extrusion depending on neighboring cell status （活性型YAP発現MDCK細胞は隣接細胞の状態に依存して頂端側に突出する）	平成28年3月31日
甲第5086号	医学	千葉　佐保子	Chronic Hypersensitivity Pneumonitis With a Usual Interstitial Pneumonia-Like Pattern Correlation Between Histopathologic and Clinical Findings （UIPパターンを呈する慢性過敏性肺炎における臨床病理学的検討）	平成28年3月31日
甲第5087号	医学	中村　輝子	Autophagy induced by intracellular infection of Propionibacterium acnes （Propionibacterium acnesの細胞内感染によって誘導されるAutophagyに関する研究）	平成28年3月31日
甲第5088号	医学	廣瀬　明日香	Subjective insomnia is associated with low sleep efficiency and fatigue in middle-aged women （ミドルエイジ女性の不眠に関する主観的評価は、睡眠効率と疲労度に関連する）	平成28年3月31日
甲第5089号	医学	毛　瑩	The hnRNP-Htt axis regulates necrotic cell death induced by transcriptional repression through impaired RNA splicing （RNAスプライシング不全を介した転写障害性ネクローシスに対するヘテロリボ核タンパク(hnRNP)-Htt axisの抑制的制御）	平成28年9月23日
甲第5090号	医学	祖力皮亚 艾比布拉	Xanthine oxidoreductase activation is implicated in the onset of metabolic arthritis （メタボリックOAにおけるキサンチンオキシダーゼの機能解析）	平成29年3月23日
甲第5091号	医学	加茂　実武	Kinking of the upper ureter in CT urography: anatomic and clinical significance （CT urography画像における上部尿管の「屈曲」：解剖学的および臨床学的意義の検討）	平成28年9月23日

甲第5092号	医学	植島　大輔	Popliteal Retrograde Approach is Effective and Safe for Superficial Femoral Artery Chronic Total Occlusion （浅大腿動脈完全閉塞治療における膝窩動脈穿刺逆行性アプローチの安全性と有効性）	平成28年9月23日
甲第5093号	医学	国分　貴徳	Effect of Changing the Joint Kinematics of Knees With a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a Rat Model （関節キネマティクスの変化がラット損傷膝前十字靭帯の分子生物学的反応と自然治癒に及ぼす影響）	平成28年9月23日
甲第5094号	医学	JAMAL Ripa	Anti-trypanosome effects of nutritional supplements and vitamin D3: in vitro and in vivo efficacy against Trypanosoma brucei brucei （補助栄養食品とビタミンD3の抗トリパノソーマ効果：Trypanosoma brucei bruceiに対するin vitroおよびin vivoでの効果）	平成28年9月23日
甲第5095号	医学	増尾　昌宏	Factors associated with positive inhalation provocation test results in subjects suspected of having chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis （慢性鳥関連過敏性肺炎の疑われる患者に対する吸入誘発試験の陽性予測因子に関する検討）	平成28年9月23日
甲第5096号	医学	齊藤　正徳	The Indispensable Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Skeletal Development （骨格形成においてCyclin-Dependent Kinase 1は必須である）	平成29年3月23日
甲第5097号	医学	鈴木　英嗣	Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis （Mohawkノックアウトラットでは腱分化機構が破綻し、アキレス腱での異所性骨化を呈する）	平成28年3月31日
甲第5098号	医学	齋藤　賢将	Is a Central Venous Catheter Necessary for the Perioperative Management of Esophagectomy? A Prospective Randomized Pilot Study Comparing Two Different Perioperative Regimens （胸部食道癌切除術後の周術期管理に中心静脈カテーテルは必要か）	平成28年3月31日
甲第5099号	歯学	近藤　雄太	Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma （3つの免疫チェックポイント分子（VISTA、CTLA-4、PD-1）の扁平上皮癌に対する抗腫瘍免疫応答への異なる関与）	平成28年3月31日
甲第5100号	歯学	会田　麻美	Effect of enamel margin configuration on color change of resin composite restoration （エナメルマージン形態がコンポジットレジン修復物の色調変化に及ぼす影響）	平成28年3月31日
甲第5101号	歯学	小黒　玲奈	The role of enamel thickness and refractive index on human tooth colour （エナメル質の厚さと屈折率が歯の色調に及ぼす影響）	平成28年3月31日
甲第5102号	歯学	岡村　武志	Disordered arrangements of basal cells as a prognostic factor for oral epithelial dysplasia: a morphometric study of 96 cases （基底層の配列の乱れは口腔異型上皮の予後を規定する因子である：96症例に対する形態計測学的研究）	平成28年3月31日
甲第5103号	歯学	浦羽　真太郎	Ability of cone-beam computed tomography to detect periapical lesions that were not detected by periapical radiography: A retrospective assessment according to tooth group （口内法X線撮影で検出できない根尖病変に対するコーンビームCTの検出能：歯種別検出能に関する後ろ向き調査）	平成28年3月31日
甲第5104号	歯学	佐藤　瑞希	Effect of strontium ions on calcification of preosteoblasts cultured on porous calcium- and phosphate-containing titanium oxide layers formed by micro-arc oxidation （マイクロアーク酸化によって形成されたカルシウム及びリン含有多孔質チタン酸化層上で培養した前骨芽細胞の石灰化におけるストロンチウムの影響）	平成28年3月31日

甲第5105号	歯学	新井　祐貴	Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model （ペプチドが引き起こす抜歯後の新生骨形成―マウスの抜歯モデルによる検証研究―）	平成28年3月31日
甲第5106号	歯学	Moe Htet	Decontamination of anodized implant surface with different modalities for peri-implantitis treatment: Lasers and mechanical debridement with citric acid （インプラント周囲炎治療のための、陽極酸化したインプラント表面の汚染除去：レーザーとクエン酸を用いた機械的汚染除去）	平成28年9月23日
甲第5107号	歯学	GUAN Rui	Dentin bonding performance using Weibull statistics and evaluation of acid-base resistant zone formation of recently introduced adhesives （新規接着材におけるワイブル分析を用いた象牙質接着性能解析ならびに酸塩基抵抗層の評価）	平成28年9月23日
甲第5108号	歯学	Abhishekhi SHRESTHA	Effects of mouthguards on electromyographic activity of masticatory muscles （マウスガードが咀嚼筋の筋電図活動に及ぼす影響）	平成28年9月23日
甲第5109号	歯学	MAJKUT Patrycja Zaklina	Validation of optical coherence tomography against microcomputed tomography for evaluation of remaining coronal dentin thickness （光干渉断層計による歯冠部残存象牙質厚さの計測:マイクロCTとの比較）	平成28年9月23日
甲第5110号	歯学	NGUYEN Thi Kim Chi	LAMC2 is a predictive marker for the malignant progression of leukoplakia （LAMC2は白板症の悪性化の予測因子である）	平成28年9月23日
甲第5111号	歯学	ELBASHTI Mahmoud Ellarousi	Application of Digital Technologies in Maxillofacial Prosthetic Rehabilitation （顎顔面補綴リハビリテーションにおけるデジタル技術の応用）	平成28年9月23日
甲第5112号	歯学	前川　祥吾	Bone metabolic microarray analysis of ligature-induced periodontitis in streptozotocin-induced diabetic mice （ストレプトゾトシン誘導糖尿病マウスにおける結紮誘導歯周炎の骨代謝マイクロアレイ解析）	平成28年9月23日
甲第5113号	学術	康　思雯	Unique B7-H1 expression on masticatory mucosae in the oral cavity and trans-coinhibition by B7-H1-expressing keratinocytes regulating CD4+ T-cell-mediated mucosal tissue inflammation （口腔咀嚼粘膜における特有のB7-H1発現とCD4+ T細胞介在性の粘膜組織炎症を制御するB7-H1発現角化上皮細胞によるトランス抑制性共刺激）	平成28年9月23日
甲第5114号	理学	Asiya　Hapaer	Investigating influential factors on the estimation of the origin of a recombinant virus using phylogeographic approach （系統地理的アプローチによる組換えウイルスの起源推定に影響する因子に関する研究）	平成28年9月23日
甲第5115号	理学	Dulal Hari Prasad	Recombinant expression of a C-type lectin-like receptor Dectin-1 and analysis of its interaction with β-glucans （C型レクチン様受容体Dectin-1の組み換え体の発現とβ-グルカンとの相互作用解析）	平成28年9月23日
甲第5116号	医学	吉井　紗織	Systemic Analysis of Atg5-Null Mice Rescued from Neonatal Lethality by Transgenic ATG5 Expression in Neurons （神経特異的ATG5発現によるAtg5欠損マウス新生仔致死のレスキュー：Atg5不全マウスの全身的解析）	平成28年3月31日
甲第5117号	医学	馬場　裕信	Identification of SATB1 as a Specific Biomarker for Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer （大腸癌リンパ節転移関連因子としてのSATB1遺伝子の同定）	平成28年3月31日

甲第5118号	医学	小谷野　岳	Comparison of Bone Remodeling Between an Anatomic Short Stem and a Straight Stem in 1-Stage Bilateral Total Hip Arthroplasty （両側一期的人工股関節全置換術におけるアナトミカル・ショートステムとストレート・ステムの骨リモデリングの比較）	平成28年3月31日
甲第5119号	医学	神田　敏博	Favorable outcome of intraoperative radiotherapy to the primary site in patients with metastatic prostate cancer （有転移前立腺癌に対する術中前立腺開窓照射の有用性の検討）	平成28年3月31日
甲第5120号	医学	池田　大輔	Study on Evaluation of Alanine Aminotransferase(ALT) as Surrogate Marker in Hepatitis Virus Test （肝炎ウィルス検査におけるsurrogate markerとしてのALTの評価に関する研究）	平成28年3月31日
甲第5121号	医学	萬野　智子	Factors Suggestive of Cardiac Complications in Takotsubo Cardiomyopathy:Multicenter Study （たこつぼ心筋症における心合併症予測因子についての多施設共同研究）	平成29年3月23日
甲第5122号	医学	池田　崇	Effects and feasibility of exercise therapy combined with branched-chain amino acid supplementation on muscle strengthening in frail and pre-frail elderly people requiring long-term care: a crossover trial （長期療養を要する虚弱高齢者に対する運動療法および分枝鎖アミノ酸投与の併用の効果と実現可能性に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5123号	医学	相澤　宏樹	Factors associated with 30-day readmission of patients with heart failure from a Japanese administrative database（日本の管理データベースを用いた心不全患者における30日以内の再入院関連因子に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5124号	医学	大滝　陽一	Dielectric permittivity change detects the process of blood coagulation: Comparative study of dielectric coagulometry with rotational thromboelastometry （誘電率変化は血液凝固の過程を検出する：誘電コアグロメトリーとトロンボエラストメトリー（ROTEM®）との比較研究）	平成29年3月23日
甲第5125号	医学	髙﨑　千尋	Expression of hypoxia-inducible factor-1α affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer （肺癌手術検体における低酸素誘導因子1αの発現と腫瘍増殖・アポトーシス抵抗性との関連）	平成29年3月23日
甲第5126号	医学	金子　俊	Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus （宿主-B型肝炎ウイルス間の相互作用解析の新規モデルとしてのヒト人工多能性幹細胞由来肝臓系細胞株の開発）	平成29年3月23日
甲第5127号	医学	伊藤　美帆	Presentation of Coping Strategies Associated with Physical and Mental Health during Health Check-ups （健診受診者のコーピングスタイルに基づく保健指導に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5128号	医学	岩﨑　優子	Differentiation/purification protocol for retinal pigment epithelium from mouse induced pluripotent stem cells as a research tool （マウス人工多能性幹細胞から網膜色素上皮細胞への分化誘導および純化プロトコル）	平成29年3月23日
甲第5129号	医学	篠原　宏成	Establishment of novel therapy to reduce progression of myopia in rats with experimental myopia by fibroblast transplantation on sclera（ラット実験近視モデルにおける強膜への線維芽細胞移植による近視進行抑制治療の確立）	平成28年3月31日
甲第5130号	医学	松本　太一	Retinol promotes in vitro growth of proximal colon organoids through a retinoic acid-independent mechanism （レチノールはレチノイン酸非依存性に近位大腸上皮細胞増殖を促進する）	平成28年3月31日

甲第5131号	医学	石津　暢隆	Impaired striatal dopamine release in homozygous Vps35 D620N knock-in mice （Vps35 D620N ホモ接合ノックインマウスでは線条体からのdopamine放出が障害される）	平成28年3月31日
甲第5132号	医学	武川（澤田）　麻紀	Exome Sequencing Identified CCER2 as a Novel Candidate Gene for Moyamoya Disease （エクソームシーケンスによりもやもや病新規候補遺伝子としてCCER2遺伝子を同定した）	平成28年3月31日
甲第5133号	医学	廣田　晋	Correlations between Cognitive Impairments and Employment Status in Patients with Diffuse Axonal Injury （び慢性軸索損傷症例における、認知機能障害と復職予後の相関について）	平成28年3月31日
甲第5134号	医学	SUJATA SAKHA	Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma （エクソソーム内包性miR-1246は、DENND2Dの制御を介して細胞の移動・浸潤を促進させる）	平成28年9月30日
甲第5135号	医学	荒木　智子	Incidence of floating toe and its association with the physique and foot morphology of Japanese children （日本人幼児における足部形態と浮き趾に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5136号	医学	佐藤　敦子	Scoliosis in osteogenesis imperfecta caused by COL1A1/COL1A2 mutations – genotype-phenotype correlations and effect of bisphosphonate treatment （COL1A1/COL1A2 mutationによる骨形成不全症における側弯症　―　臨床症状（phenotype）と遺伝子変異(genotype)の関係とビスホスホネート治療の効果）	平成29年3月23日
甲第5137号	医学	丸山　陽子	Neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as predictors of wound healing failure in head and neck reconstruction （頭頸部再建における術後創傷治癒遅延の血液学的リスク因子に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5138号	医学	永田　紘子	Serial measurement of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein is useful for predicting liver fibrosis and the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients treated with IFN-based and IFN-free therapy（IFN-basedまたはIFN-free治療を施行したC型慢性肝炎患者において経時的な血清WFA+Mac-2 binding protein測定は肝線維化、肝発癌予測に有用である）	平成29年3月23日
甲第5139号	医学	杉浦　真貴子	Polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion mainly helps to constrict peripheral blood vessels in treatment for septic shock （敗血症性ショックの治療において、ポリミキシンB固定化カラムによる血液灌流法はおもに末梢血管収縮に寄与する）	平成29年3月23日
甲第5140号	医学	木野　智幸	Effect of N-arachidonoyl-L-serine on human cerebromicrovascular endothelium （ヒト脳毛細血管内皮細胞におけるN-arachidonoyl-L-serineの効果）	平成28年3月31日
甲第5141号	医学	日比谷　秀爾	Long-term Inflammation Transforms Intestinal Epithelial Cells of Colonic Organoids （長期炎症による大腸上皮培養細胞形質変化）	平成28年3月31日
甲第5142号	医学	伊豆上　智子	Consumer Perception of Inpatient Medical Services （入院医療サービスに対する消費者の認識）	平成28年3月31日
甲第5143号	医学	後藤　文男	Bone morphogenetic protein-4 modulates proliferation and terminal differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells （Bone Morphogenetic Protein-4は胎生期マウス肝幹/前駆細胞の増殖と終末分化を制御する）	平成28年3月31日

甲第5144号	医学	山添　正博	Serum alkaline phosphatase as a predictor of worsening renal function in patients with acute decompensated heart failure （急性心不全患者における新たな腎機能増悪予測因子としての血清アルカリフォスファターゼに関する研究）	平成29年3月23日
甲第5145号	医学	月精　智子	A fiber-optic sorbitol biosensor based on NADH fluorescence detection toward rapid diagnosis of diabetic complications （糖尿病合併症の迅速評価を目的としたNADH蛍光検出に基づく光ファイバ式ソルビトール用バイオセンサ）	平成29年3月23日
甲第5146号	医学	小林　建太	Prognostic significance of PAK4 expression in gastric cancer （胃癌におけるPAK4発現と予後との相関について）	平成28年3月31日
甲第5147号	医学	冨井　翔平	Cortical Actin Alteration at the Matrix-Side Cytoplasm in Lung Adenocarcinoma Cells and Its Significance in Invasion （肺腺癌における間質側細胞膜下での皮質アクチン線維の集積と浸潤に関する研究）	平成28年3月31日
甲第5148号	医学	藤井　悟	PGE2 is a direct and robust mediator of anion/fluid secretion by human　intestinal epithelial cells （ヒト腸管上皮細胞の陰イオン/水分泌作用に対するプロスタグランジンE2の効果に関する研究）	平成28年3月31日
甲第5149号	医学	廣瀬　俊輔	Treatment of in-stent restenosis with excimer laser coronary angioplasty: benefits over scoring balloon angioplasty alone （ステント内再狭窄へのレーザー治療の有用性　Scoring balloon単独を超えた利益）	平成29年3月23日
甲第5150号	医学	村井　典史	The influence of elective percutaneous coronary intervention on microvascular resistance: a serial assessment using the index of microcirculatory resistance （待機的経皮的冠動脈形成術の冠微小循環への影響：Index of Microcirculatory Resistanceを用いた経時的な評価）	平成29年3月23日
甲第5151号	医学	菱刈　景一	ST-Segment Elevation on Intracoronary Electrocardiogram After Percutaneous Coronary Intervention is Associated With Worse Outcome in Patients With Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction （非ST上昇型心筋梗塞患者において、経皮的冠動脈形成術後の冠動脈内心電図のST上昇は予後の悪さと相関する）	平成29年3月23日
甲第5152号	医学	高田　亮平	Inhibitory Effect of Zirconium Coating to Bone Bonding of Titanium Implants in Rat Femur （ジルコニウムコーティングによるチタン製インプラントとラット大腿骨との骨癒合抑制効果）	平成29年3月23日
甲第5153号	医学	井上　牧子	Inflammatory cytokine levels in synovial fluid 3, 4 days postoperatively and its correlation with early-phase functional recovery after anterior cruciate ligament reconstruction: a cohort study（前十字靭帯損傷から前十字靭帯再建術までの期間が長期化するほど術後急性期の関節液中の炎症性サイトカイン濃度は上昇し、術後の回復が遅れる）	平成28年3月31日
甲第5154号	医学	樋口　京子	Cadherin 5 expression correlates with poor survival in human gastric cancer （カドヘリン5の高発現と予後不良胃癌との関連性について）	平成28年3月31日
甲第5155号	医学	小林　正典	The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development （ユビキチンコード遺伝子UBA52はリボソームのユビキチン化を制御し，胎生発達を維持させる）	平成28年3月31日
甲第5156号	医学	木原　まり	Use and effectiveness of tocilizumab among patients with rheumatoid arthritis: an observational study from the British Society for Rheumatology Biologics Register for rheumatoid arthritis （関節リウマチに対するtocilizumabの選択と有効性：British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritisを用いた観察研究）	平成28年3月31日

甲第5157号	医学	長谷川　久紀	Direct suppression of autoaggressive CD8+ T cells with CD80/86 blockade in CD8+ T cell-mediated polymyositis models of mice （CD8+T細胞依存性多発性筋炎モデルマウスにおけるCD80/86阻害による自己反応性CD8+T細胞の直接抑制）	平成28年3月31日
甲第5158号	医学	柳澤　克昭	Weekly injections of Hylan G-F 20 delay cartilage degeneration in partial meniscectomized rat knees （ラット内側半月板部分切除モデルに対してHylan G-F20関節内注射は軟骨の変性を抑制する）	平成28年3月31日
甲第5159号	医学	大原　敏之	Hypoxia enhances proliferation through increase of colony formation rate with chondrogenic potential in primary synovial mesenchymal stem cells （低酸素培養は初代ヒト滑膜幹細胞の軟骨分化能を維持してコロニー形成率を上昇させ増殖を促進する）	平成28年3月31日
甲第5160号	医学	中田　徹	Indispensable role of Notch ligand-dependent signaling in the proliferation and stem cell niche maintenance of APC-deficient intestinal tumor （Notchリガンド依存的なシグナル経路がマウス腸管腫瘍の幹細胞ニッチの形成および増殖において必須である）	平成28年3月31日
甲第5161号	医学	平野　史生	Achieving simplified disease activity index remission in patients with active rheumatoid arthritis is associated with subsequent good functional and structural outcomes in a real-world clinical setting under a treat-to-target strategy （実臨床における活動性関節リウマチ患者に対するtreat-to-target治療戦略下では、simplified disease activity index寛解の達成	平成28年3月31日
甲第5162号	医学	中山　菜央	Factors associated with posttraumatic growth among parents of children with cancer （小児がん患者の親の心的外傷後成長に関連する要因の検討）	平成28年3月31日
甲第5163号	医学	佐々木　真理	Sulforaphane promotes murine hair growth by accelerating the degradation of dihydrotestosterone （スルフォラファンは、ジヒドロテストステロンの分解を亢進し、マウスの毛髪の成長を促進する）	平成29年3月23日
甲第5164号	医学	壹岐　美紗子	Basophil tryptase mMCP-11 plays a crucial role in IgE-mediated, delayed-onset allergic inflammation in mice （好塩基球トリプターゼmMCP-11は、IgE依存的慢性アレルギー炎症の誘導に重要な役割を果たす）	平成29年3月23日
甲第5165号	医学	八木　洋輔	Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes （次世代シークエンサーによる脳脊髄液エクソソーム中スモールRNAの発現プロファイルに関する研究）	平成29年3月23日
甲第5166号	医学	古川　佑介	Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period （幼若期マウスにおけるベンゾジアゼピン系睡眠導入薬の投与による学習記憶機能の低下）	平成29年3月23日
甲第5167号	医学	金　小海	Prognostic Impact of Cancer Stem Cell-Like Phenotypes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma （膵臓癌における癌幹細胞マーカー表現型と予後との関係）	平成29年3月23日
甲第5168号	医学	安藤　史顕	Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway （Wnt5aは、calcineurin シグナルを介しAQP2を活性化する）	平成29年3月23日
甲第5169号	医学	劉　鏈	Genetic Variants Associated With Susceptibility to Atrial Fibrillation in a Japanese Population （日本人における心房細動感受性遺伝子の解析研究）	平成29年3月23日

甲第5170号	医学	増冨　裕文	Induction of Peptidylarginine Deiminase 2 and 3 by Dibutyryl cAMP via cAMP-PKA Signaling in Human Astrocytoma U-251MG cells （ヒトアストロサイトーマU-251MG細胞において、ジブチリルcAMPによるペプチジルアルギニンデイミナーゼ2と3の誘導は、cAMP-PKAシグナル伝達を介する）	平成29年3月23日
甲第5171号	医学	堀口　華代	Real-time imaging of mast cell degranulation in vitro and in vivo （in vitroおよびin vivoにおけるマスト細胞のリアルタイムイメージング）	平成29年3月23日
甲第5172号	医学	安藤　聡美	HTLV-1 Tax-Specific CTL Epitope-Pulsed Dendritic Cell Therapy Reduces Proviral Load in Infected Rats with Immune Tolerance against Tax （HTLV-1 Tax 特異的CTLエピトープパルス樹状細胞療法は、Taxに対する免疫寛容を示す感染ラットのプロウイルス量を下げる）	平成29年3月23日
甲第5173号	医学	筒井　英充	The Basophil-specific Protease mMCP-8 Provokes an Inflammatory Response in the Skin with Microvascular Hyperpermeability and Leukocyte Infiltration （好塩基球特異的プロテアーゼmMCP-8は血管透過性亢進と炎症性細胞浸潤を伴う皮膚炎症を引き起こす）	平成29年3月23日
甲第5174号	医学	森丘　千夏子	Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on periventricular leukomalacia-like brain injury in neonatal rats （脳室周囲白質軟化症に対するヒト臍帯由来間葉系幹細胞の神経保護効果）	平成28年3月31日
甲第5175号	医学	岩田　乃理子	Clinical Significance of Methylation and Reduced Expression of the Quaking Gene in Colorectal Cancer （大腸癌におけるQKI(RNA Binding Protein Quaking)の発現およびメチル化とその臨床病理学的特徴について）	平成28年3月31日
甲第5176号	医学	陳　悦	Physiological and functional changes in the stratum corneum restored by oestrogen in an ovariectomized mice model of climacterium （更年期モデルとしての卵巣摘出マウスにおける角質の構造的および機能的変化とエストロゲンによる回復）	平成28年3月31日
甲第5177号	医学	鈴木　一史	Antimyeloma activity of bromodomain inhibitors on the human myeloma cell line U266 by downregulation of MYCL （ヒト骨髄腫細胞株U266に対するMYCLの発現制御を介したブロモドメイン阻害薬の抗腫瘍効果）	平成28年3月31日
甲第5178号	医学	木原　淳	SLUG expression is an indicator of tumour recurrence in high-grade endometrial carcinomas （SLUGの発現は高悪性度子宮体癌の再発指標となる）	平成29年3月23日
甲第5179号	医学	戚　鈺	Perioperative Elevation in Cell-Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction （心臓手術患者における周術期血清二重鎖DNA濃度変化：好中球細胞外トラップ形成と急性腎障害の関連性）	平成29年3月23日
甲第5180号	医学	兵頭　甲子太郎	Hip, knee, and ankle kinematics during activities of daily living: a cross-sectional study （日常生活動作における股関節、膝関節、足関節の関節角度測定）	平成29年3月23日
甲第5181号	医学	木村　遥	Increased MFG-E8 expression and its implications in the vascular pathophysiology of cocaine abuse （コカイン曝露時の平滑筋細胞のMFG-E8の増加とその病態生理学的意義）	平成29年3月23日
甲第5182号	医学	山口　徹雄	Prognosis of super-elderly healthy Japanese patients after pacemaker implantation for bradycardia （健康な日本人超高齢者における徐脈に対するペースメーカー植込み後の予後に関する研究）	平成29年3月23日

甲第5183号	医学	山邊　将史	Novel synthetic compounds with endoperoxide structure damage juvenile stage of Schistosoma mansoni by targeting lysosome-like organelles （環状過酸化構造を有する新規合成化合物はリソソーム様オルガネラを標的とし、幼虫期のマンソン住血吸虫を傷害する）	平成29年3月23日
甲第5184号	医学	西川路　武人	Oncogenic roles of the SETDB2 histone methyltransferase in gastric cancer （胃がんにおけるヒストンメチル化酵素SETDB2 のがん促進的役割）	平成29年3月23日
甲第5185号	医学	孫　忠良	Inhibiting NADPH oxidase protects against long-term memory impairment induced by neonatal sevoflurane exposure in mice （幼若マウスのセボフルラン麻酔による長期記憶への影響に対するNADPH oxidase阻害薬の保護効果）	平成29年3月23日
甲第5186号	医学	藤原　立樹	Optical Dynamic Analysis of Thrombus Inside a Centrifugal Blood Pump During Extracorporeal Mechanical Circulatory Support in a Porcine Model （体外循環中の遠心血液ポンプ内血栓の光学的動態解析動物実験における検証）	平成29年3月23日
甲第5187号	医学	藤井　祐介	Hydrogen sulfide donor NaHS induces death of alveolar epithelial L2 cells that is associated with cellular shrinkage, transgelin expression and myosin phosphorylation （肺胞上皮由来L2細胞における硫化水素ドナーNaHSによる細胞収縮、トランスゲリン発現およびミオシンリン酸化を伴う細胞死誘導）	平成29年3月23日
甲第5188号	医学	KAUNG　SI　THU	Association of polymorphisms of the transporter associated with antigen processing (TAP2) gene with pulmonary tuberculosis in an elderly Japanese population （TAP2遺伝子多型と肺結核症の関連研究）	平成29年3月23日
甲第5189号	医学	飯塚　真	Is there a differential impact of parity on factors regulating maternal peripheral resistance? （妊娠中の末梢血管抵抗調節因子における妊娠経験の有無による差異について）	平成29年3月23日
甲第5190号	医学	田村　夏子	Profiles of serum cytokine levels in Takayasu arteritis patients: Potential utility as biomarkers for monitoring disease activity （高安動脈炎患者における血清サイトカインの動態：高安動脈炎の病勢を反映しうるバイオマーカーとしての検討）	平成29年3月23日
甲第5191号	医学	鈴木　雅仁	The Efficacy of Isochronal 3D Mapping-Based Ablation of Ventricular Arrhythmia Running head: isochronal mapping, ablation （心室性不整脈に対する等時線表示を用いた3次元マッピングによるアブレーションの有用性）	平成29年3月23日
甲第5192号	医学	柳下　敦彦	Improvement in the Quality of Life and Exercise Performance in Relation to the Plasma B-Type Natriuretic Peptide Level After Catheter Ablation in Patients With Asymptomatic Persistent Atrial Fibrillation （無症候性心房細動患者におけるカテーテルアブレーション後のBNP値と関連したQoLと運動耐容能の改善）	平成29年3月23日
甲第5193号	医学	髙畑　辰郎	Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase （HIV-1インテグラーゼの15番目のチロシンの逆転写酵素とインテグラーゼの前駆体を介した多量体形成促進と非酵素的機能における寄与）	平成29年3月23日
甲第5194号	医学	吉﨑　幸	Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3 （PKAとAktによるKLHL3リン酸化がWNK4との結合を制御する）	平成29年3月23日
甲第5195号	医学	三宅　健介	Trogocytosis of peptide-MHC class II complexes from dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils （好塩基球は樹状細胞よりペプチド・MHCクラスII複合体をトロゴサイトーシスにより獲得し、抗原提示能を発揮する）	平成29年3月23日

甲第5196号	医学	Khin Thet Thet Zaw	Association of ZFHX3 gene variation with atrial fibrillation, cerebral infarction, and lung thromboembolism: An autopsy study （ZFHX3遺伝子多型と心房細動、脳梗塞、肺塞栓との関連研究：高齢者連続剖検例による解析）	平成29年3月23日
甲第5197号	医学	福島　啓文	Indwelling Voice Prosthesis Insertion After Total Pharyngolaryngectomy With Free Jejunal Reconstruction （咽頭喉頭全摘後の遊離空腸再建症例に対する留置型ボイスプロテーゼによるシャント発声の研究）	平成29年3月23日
甲第5198号	医学	北澤　萌恵	Severe damage to the placental fetal capillary network causes mid- to late fetal lethality and reduction in placental size in Peg11/Rtl1 KO mice （Peg11/Rtl1 KOマウスにおける胎盤の胎仔毛細血管内皮細胞の深刻な損傷は胎生中期から後期致死と胎盤の重量低下を引き起こす）	平成29年3月23日
甲第5199号	医学	中村　玲奈	Life-Threatening Ventricular Arrhythmia and Brugada-Type ST-Segment Elevation Associated With Acute Ischemia of the Right Ventricular Outflow Tract （右室流出路の急性虚血によるBrugada型ST上昇と致死性心室性不整脈との関連性）	平成29年3月23日
甲第5200号	医学	王　文茜	Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation （5-アミノレブリン酸を用いたside population法で定義されるグリオーマ幹細胞の検出に対する鉄キレート剤による向上効果）	平成29年3月23日
甲第5201号	医学	宇都宮　雅子	Optimal regimens of sulfamethoxazole-trimethoprim for chemoprophylaxis of Pneumocystis pneumonia in patients with systemic rheumatic diseases: results from a non-blinded, randomized controlled trial （全身性のリウマチ性疾患患者におけるニューモシスチス肺炎の予防としてのスルファメトキサゾール・トリメトプリムの理想的な投与方法・投与量：非盲検ランダム化比較試験の結果より）	平成29年3月23日
甲第5202号	医学	外山　扇雅	Human eosinophils constitutively express a unique serine protease, PRSS33 （ヒト好酸球にPRSS33は恒常的に発現する）	平成29年3月23日
甲第5203号	医学	片桐　健太	Fibrous Synovium Releases Higher Numbers of Mesenchymal Stem Cells Than Adipose Synovium in a Suspended Synovium Culture Model （浮遊滑膜培養モデルにおいて、線維性滑膜は脂肪性滑膜と比較し、より多くの間葉系幹細胞を動員する）	平成29年3月23日
甲第5204号	医学	ARADHAN SARKAR	Domain analysis of Ras-association domain family member 6 upon interaction with MDM2 （腫瘍抑制分子RASSF6とMDM2の相互作用に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5205号	医学	中筋　貴史	Complementary Critical Functions of *Zfy1* and *Zfy2* in Mouse Spermatogenesis and Reproduction （*Zfy1*と*Zfy2*はマウス精子形成を相補的に制御する）	平成29年3月23日
甲第5206号	医学	董　暁書	LAPTM4B-35 is a novel prognostic factor for glioblastoma （LAPTM4B-35は膠芽腫の新規予後因子である）	平成29年3月23日
甲第5207号	歯学	喜田　壮馬	Computational fluid dynamic study of nasal respiratory function before and after bimaxillary orthognathic surgery with bone trimming at the inferior edge of the pyriform aperture （梨状孔下縁切削を併用した上下顎移動術前後における鼻呼吸機能の計算流体力学解析）	平成28年3月31日
甲第5208号	歯学	手塚　弘樹	Assessment of cervical demineralization induced by Streptococcus mutans using swept-source optical coherence tomography （Streptococcus mutansによって生じた歯頸部脱灰の走査型光干渉断層計観察）	平成28年3月31日

甲第5209号	歯学	森田　琢磨	Characterizing Genetic Transitions of Copy Number Alterations and Allelic Imbalances in Oral Tongue Carcinoma Metastasis （舌癌転移過程におけるゲノムコピー数変異およびアレル不均衡の変化に関する解析）	平成28年3月31日
甲第5210号	歯学	NGUYEN VO Ngoc Trang	Ligature induced peri-implantitis: tissue destruction and inflammatory progression in a murine model （結紮糸によるインプラント周囲炎モデル：マウスにおける炎症惹起と組織破壊）	平成29年3月23日
甲第5211号	歯学	髙篠　奈美	Effect of thermal cyclic stress on acid resistance of resin-infiltrated incipient enamel lesions in vitro （レジン浸透処理を行ったエナメル質初期齲蝕の耐酸性に及ぼす熱サイクル負荷の影響）	平成29年3月23日
甲第5212号	歯学	掘江　圭	Monitoring of cariogenic demineralization at the enamel-composite interface using swept-source optical coherence tomography （SS-OCTを用いたう蝕病原性細菌による修復物周囲の脱灰評価）	平成28年3月31日
甲第5213号	歯学	賴　威任	Development and modification of a device for three-dimensional measurement of orthodontic force system: The V-bend system re-visited （矯正歯科治療における力系を三次元的に計測する装置の開発と改良：Vベンドの再検討）	平成28年3月31日
甲第5214号	歯学	千葉　彩香	The influence of elastic moduli of core materials on shear stress distributions at the adhesive interface in resin built-up teeth. （コア材料の弾性率がレジン支台築造歯の接着界面におけるせん断応力分布に及ぼす影響）	平成28年3月31日
甲第5215号	歯学	小滝　真也	Diffusion tensor imaging of the inferior alveolar nerve using 3T MRI: a study for quantitative evaluation and fibre tracking （3テスラ MRIを用いた拡散テンソル画像による下歯槽神経の評価：定量評価とファイバートラッキング）	平成29年3月23日
甲第5216号	歯学	熊谷　勇人	Factors associated with mucosal pain in patients with partial removable dental prostheses （部分床義歯装着者における床下粘膜痛の関連因子について）	平成28年3月31日
甲第5217号	歯学	牧口　実央	Effects of increased occlusal vertical dimension on the jaw-opening reflex in adult rats （咬合高径増大が成熟ラットにおける開口反射に与える影響）	平成28年3月31日
甲第5218号	歯学	上野　智香	Optical analysis of enamel and dentin caries in relation to mineral density using swept-source optical coherence tomography （エナメル質ならびに象牙質う蝕のミネラル密度と波長走査型光干渉断層計を用いた光学的特性の評価）	平成28年3月31日
甲第5219号	歯学	小田　憲	Influence of implant number on the movement of mandibular implant overdentures （インプラントの本数が下顎インプラントオーバーデンチャーの動きに与える影響）	平成28年3月31日
甲第5220号	歯学	菅森　泰隆	Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling （ペプチド薬は、BMP-2誘導による頭蓋骨の骨再生を促進し、mTORC1シグナルを通して骨芽細胞分化を刺激する）	平成28年3月31日
甲第5221号	歯学	鬼塚　理	ZBTB16 as a Downstream Target Gene of Osterix Regulates Osteoblastogenesis of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells （Osterixの下流の標的遺伝子であるZBTB16はヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を制御する）	平成28年3月31日

甲第5222号	歯学	佐藤　茉莉恵	高齢者に対する甲状軟骨部皮膚牽引が嚥下動態に及ぼす影響	平成28年3月31日
甲第5223号	歯学	井川　泰葉	Effects of citalopram on jaw-closing muscle activity during sleep and wakefulness in mice （睡眠・覚醒中の閉口筋筋活動に対するシタロプラムの影響）	平成28年3月31日
甲第5224号	歯学	津田　優香	Effect of brushing timing after erosive challenge on enamel loss in situ: white light interferometer and nanoindentation study （酸蝕後の歯磨き開始時間がエナメル質歯ブラシ摩耗に及ぼす影響：白色干渉計および超微小押し込み硬さ試験機を用いたin situ研究）	平成29年3月23日
甲第5225号	歯学	大島　ふじの	A finite element analysis of stress distribution in roots with different types of post systems （種々の支台築造法における歯根象牙質の応力分布状態に関する有限要素解析）	平成28年3月31日
甲第5226号	歯学	三ッ山　晃弘	Effects of teeth clenching on the soleus H reflex during lower limb muscle fatigue （噛みしめが下肢筋疲労時のヒラメ筋H反射に及ぼす影響）	平成28年3月31日
甲第5227号	歯学	深沢　慎太郎	Application of addition-cured silicone denture relining materials to adjust mouthguards （マウスガード調整のための付加型シリコーン系義歯床用裏装材の応用）	平成28年3月31日
甲第5228号	歯学	赤澤　惠子	Double-layered cell transfer technology for bone regeneration （骨再生のための2層細胞転写技術）	平成28年3月31日
甲第5229号	歯学	野田　昌宏	High-frequency pulsed low-level diode laser therapy accelerates wound healing of tooth extraction socket: an in vivo study （高繰り返しパルス発振の低出力半導体レーザー治療は抜歯窩の創傷治癒を促進する：生体内研究）	平成28年3月31日
甲第5230号	歯学	増子　律子	Morphological evaluation of artificial caries-affected dentin after applying FCP-COMPLEX （FCP-COMPLEX塗布後の人工う蝕象牙質内層の形態的評価）	平成28年3月31日
甲第5231号	歯学	井上　卓俊	Drug delivery and transmission of lidocaine using iontophoresis in combination with direct and alternating currents （直流-交流を併用したイオントフォレーシスのリドカイン透過量の検討）	平成29年3月23日
甲第5232号	歯学	AKTAR Most Dilruba	Value of real-time tissue elastography for squamous cell carcinoma of the tongue （舌扁平上皮癌におけるリアルタイム組織弾性イメージング法の有用性）	平成28年3月31日
甲第5233号	歯学	荒井　昌海	Value of real-time tissue elastography for squamous cell carcinoma of the tongue （舌扁平上皮癌におけるリアルタイム組織弾性イメージング法の有用性）	平成28年3月31日
甲第5234号	歯学	佐藤　健人	Dentin Bonding Durability of Two-step Self-etch Adhesives with Improvement of Degree of Conversion of Adhesive Resins （接着性レジンの重合率を改良した2ステップセルフエッチング接着システムの長期耐久性）	平成28年3月31日

甲第5235号	歯学	松浦　毅士	Involvement of CX3CL1 in the Migration of Osteoclast Precursors Across Osteoblast Layer Stimulated by Interleukin-1ß （IL-1ßにより刺激された骨芽細胞層の下への破骨細胞前駆細胞の遊走におけるCX3CL1の関与）	平成28年3月31日
甲第5236号	歯学	幸田　直己	The transcription factor mohawk homeobox regulates homeostasis of the periodontal ligament （転写因子mohawk homeoboxは歯根膜の恒常性を制御する）	平成28年3月31日
甲第5237号	歯学	KULKARNI Tejaswini Vaman	DNA-based culture-independent analysis detects the presence of Group A Streptococcus in throat samples from healthy adults in Japan （DNAをベースとした非培養系解析によって検出された日本における健常成人由来の咽頭検体内のA群レンサ球菌の存在）	平成28年9月30日
甲第5238号	歯学	芝　多佳彦	Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms （共起ネットワーク内でコアとなる細菌群の相互作用の差異は類似した症状を呈する口腔複合感染症を区別しうる）	平成29年3月23日
甲第5239号	歯学	金崎　彩子	Effect of Chewing on Body Sway in Patients Wearing Dento-Maxillary Prosthesis after Head and Neck Tumor Resection （頭頸部腫瘍切除後の顎補綴装置装着患者において咀嚼運動が重心動揺に与える影響）	平成29年3月23日
甲第5240号	歯学	林　婉婷	Profilin Expression is Regulated by Bone Morphogenetic Protein (BMP) in Osteoblastic Cells. （骨芽細胞におけるProfilinの発現は骨形成タンパク質(BMP)により制御される）	平成29年3月23日
甲第5241号	歯学	松川　京司	The influence of the framework thickness on the surface strain of the 3-unit Zirconia Resin-bonded fixed dental prostheses under the functional loading （ジルコニア接着ブリッジのフレーム厚が機能時の表面歪みに及ぼす影響）	平成29年3月23日
甲第5242号	歯学	及川　悠	Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma （口腔扁平上皮癌における遠隔転移予測因子としてのチロシンキナーゼ受容体遺伝子増幅）	平成29年3月23日
甲第5243号	歯学	大出　貴資	PDMP, a ceramide analogue, acts as an inhibitor of mTORC1 by inducing its translocation from lysosome to endoplasmic reticulum （セラミドアナログPDMPはmTORC1の細胞内局在をリソソームから小胞体に変化させることによりmTORC1の阻害剤として作用する）	平成29年3月23日
甲第5244号	歯学	半田　和之	The ball-on-disk cyclic wear of CAD/CAM machinable dental composite and ceramic materials （CAD/CAM 切削加工用コンポジットとセラミックスのボールオンディスク摩耗特性の評価）	平成28年3月31日
甲第5245号	歯学	吉　志元	The Morphological Evaluation of Denture Space in Glossectomy Patients （舌欠損患者のデンチャースペースの形態的評価）	平成28年3月31日
甲第5246号	歯学	Tumurkhuu Tsasan	Association between maternal education and malocclusion in Mongolian adolescents: a cross-sectional study （モンゴル人思春期生徒にみられる不正咬合と母親の学歴との関連についての横断的調査）	平成28年3月31日
甲第5247号	歯学	山口　博之	New approach to transfect NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides into the periodontal tissue using ultrasound-microbubble method （超音波マイクロバブル法を用いたNF-κBデコイの歯周組織への新規導入法）	平成28年3月31日

甲第5248号	歯学	吉井　詠智	要介護高齢者の基礎代謝量算出方法としての生体電気インピーダンス法と予測式の比較	平成28年3月31日
甲第5249号	歯学	久保田　チエコ	Association between chewing-stimulated salivary flow under the effects of atropine and mixing ability assessed using a color-changeable chewing gum （硫酸アトロピン服用下での咀嚼刺激唾液量と色変わりガムを用いた混和能力評価との関連）	平成28年3月31日
甲第5250号	歯学	石山　裕之	Effect of jaw-opening exercise on prevention of temporomandibular disorders pain associated with oral appliance therapy in obstructive sleep apnea patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial （閉塞性睡眠時無呼吸症患者に対するOA療法における顎関節領域の痛みを予防する開口訓練の有効性について －二重盲検ランダム化比較試験－）	平成28年3月31日
甲第5251号	歯学	吉嵜　太朗	Hydrophilic nano-silica coating agents with platinum and diamond nanoparticles for denture base materials （義歯床用材料に対する親水性シリカコーティングへのプラチナおよびダイヤモンドナノ粒子の添加に関する研究）	平成28年3月31日
甲第5252号	歯学	秋本　悌助	Evaluation of corrosion resistance of implant-use Ti-Zr binary alloys with a range of compositions （インプラント材料としてのTi-Zr二元合金を組成変化させたときの耐食性の評価）	平成28年3月31日
甲第5253号	歯学	谷本　裕之	An objective estimation of the removability of three home reliners （3種類のホームリライナーの剥離性の客観的評価）	平成28年3月31日
甲第5254号	歯学	守田　剛	An in situ hybridization study of Hyaluronan synthase (Has) mRNA in developing mouse molar and incisor tooth germs （in situ hybridization法を用いたマウス臼歯および切歯歯胚形成過程におけるヒアルロン酸合成酵素(Has) mRNAの発現に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5255号	歯学	杉浦　美穂	White spot lesion remineralization by sugar-free chewing gum containing bio-available calcium and fluoride: A double-blind randomized controlled trial （カルシウムおよびフッ化物配合ガムの口腔内white spotに対する再石灰化効果：二重盲検ランダム化比較試験による検討）	平成29年3月23日
甲第5256号	歯学	藤川　芳織	An in situ hybridization study of perlecan, DMP1, and MEPE in developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible and limb bud cartilage. （胎生期マウス下顎頭軟骨と肢芽軟骨におけるperlecan、DMP1およびMEPE mRNA発現に関するin situ hybridization法による研究）	平成29年3月23日
甲第5257号	歯学	沈　東鶴	Synthesis and enhanced bone regeneration of carbonate substituted octacalcium phosphate （炭酸置換リン酸八カルシウムの合成とその骨再生促進効果に関する研究）	平成29年3月23日
甲第5258号	歯学	内間　コエクリン カリン　春美	Effect of unilateral nasal obstruction on the craniofacial muscles in growing rats （成長期ラットにおける片側鼻閉塞が頭蓋顔面筋に与える影響）	平成29年3月23日
甲第5259号	歯学	羅　思陽	Stress distribution in luting agents with different post and core systems （種々の築造法におけるセメント内応力分布）	平成29年3月23日
甲第5260号	歯学	周　媛	Non-invasive optical assessment of biofilm-induced demineralization on human teeth with and without resin-based material application （レジン系材料を作用させた人歯におけるバイオフイルム脱灰処理の非侵襲的光学評価）	平成29年3月23日

甲第5261号	歯学	勝村　早恵	Beta Adrenergic Receptor Stimulation Suppresses Cell Migration in Association with Cell Cycle Transition in Osteoblasts – Live Imaging Analyses Based on FUCCI System （βアドレナリン受容体刺激は骨芽細胞の細胞周期移行に伴う細胞遊走を抑制する-FUCCIシステムに基づくライブイメージング解析）	平成29年3月23日
甲第5262号	歯学	上窪　彩乃	Effect of antimicrobial photodynamic therapy using rose bengal and blue light-emitting diode on Porphyromonas gingivalis in vitro: Influence of oxygen during treatment （in vitroにおけるローズベンガルと青色LEDを用いた抗菌光線力学療法のPorphyromonas gingivalis に対する効果：処置中の酸素の影響）	平成29年3月23日
甲第5263号	歯学	八尋　浩平	Histone methyltransferase Setdb1 is indispensable for Meckel's cartilage development （ヒストンメチル化酵素Setdb1はメッケル軟骨の発生に必須である）	平成29年3月23日
甲第5264号	学術	RAKPRASIT　Jutarat	Healthcare use for communicable diseases among migrant workers in comparison with Thai workers （タイ王国における外国人労働者とタイ人労働者の感染症による受療率比）	平成28年9月30日
甲第5265号	学術	鈴木　亮一	Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model （ラット創傷モデルにおける660-nm半導体レーザーの創傷治癒効果）	平成28年3月31日
甲第5266号	学術	AL-SOBAIHI　Saber Abdullah　Hizam	Undernutrition among children under 5 years of age in Yemen: Role of adequate childcare provided by adults under conditions of food insecurity （イエメンにおける5歳未満児の低栄養：食糧確保が不安定な環境下の養育環境確保）	平成28年9月30日
甲第5267号	学術	齋藤　剛志	Deletion of conserved sequences in IG-DMR at *Dlk1-Gtl2* locus suggests their involvement in expression of paternally expressed genes in mice （*Dlk1-Gtl2*遺伝子座のIG-DMRに保存された配列は父性発現インプリント遺伝子の遺伝子発現に関与する）	平成29年3月23日
甲第5268号	看護学	高　紋子	認知症高齢者への効果的な入浴誘導の特徴；録画とインタビューによる質的研究	平成28年3月31日
甲第5269号	看護学	竹生　礼子	Development and evaluation of community residents participating in livelihood support system for community-dwelling cancer patients (CPL-CCP system) （在宅がん療養者に対する住民参加型生活支援システムの構築と評価）	平成28年3月31日
甲第5270号	看護学	村田　洋章	What prevents critically ill patients with respiratory failure from using noninvasive positive pressure ventilation: A mixed-methods study （急性呼吸不全患者の非侵襲的陽圧換気療法(NPPV)継続阻害要因の分析）	平成28年3月31日
甲第5271号	看護学	山中　源治	在宅療養に移行する植込型補助人工心臓患者および主介護者の体験と看護支援の検討	平成28年3月31日
甲第5272号	看護学	齋藤　真希	Use of Traditional Birth Practices by Chinese Women in the United States （アメリカ合衆国における中国系女性の出産に関する慣習への対応）	平成29年3月23日
甲第5273号	保健学	揃田　陽子	Pancreatic cysts in general population on ultrasonography: Prevalence and development of risk score （一般集団での腹部超音波検査における膵嚢胞性病変の有病率とリスクスコアの確立）	平成29年3月23日

甲第5274号	保健学	佐藤　恵美	Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein （SAAがHDLの構造と抗酸化能に及ぼす影響）	平成29年3月23日
甲第5275号	保健学	吉本　明	Paraoxonase 1 associated with high-density lipoprotein transfers to oxidized low-density lipoprotein depending on the degree of oxidation （高比重リポタンパク中 Paraoxonase1 は酸化低比重リポタンパクへ酸化度依存的に転移する）	平成29年3月23日
甲第5276号	保健学	矢野　哲也	Application of low-vacuum scanning electron microscopy in cytopathology: To what extent can adenocarcinoma be morphologically distinguished from squamous cell carcinoma in lung cancer? （低真空走査型電子顕微鏡による細胞診への応用：肺癌における腺癌と扁平上皮癌は形態学的にどの程度鑑別できるか？）	平成29年3月23日
甲第5277号	保健学	矢野　康次	Cholesterol Efflux Capacity of Apolipoprotein A-I Varies with the Extent of Differentiation and Foam Cell Formation of THP-1 Cells （THP-1細胞の分化・泡沫化の程度がapoA-Iコレステロール引き抜き能に及ぼす影響）	平成29年3月23日
甲第5278号	理学	前田　斉嘉	Studies on the effects of the long-term administration of melatonin on blood metabolites in aging mice （加齢マウスの血中の代謝産物に及ぼす長期メラトニン投与の影響）	平成28年3月31日
甲第5279号	理学	佐竹　紀彦	Investigation of pathway biomarkers of hepatocellular carcinoma based on gene regulatory networks （遺伝子制御ネットワークに基づく肝細胞癌のパスウェイ・バイオマーカーの探索）	平成28年3月31日
甲第5280号	理学	出来（有馬） 誉恵	Analysis of the function of stress-activated protein kinase MKK7 in adult nervous system （成体神経系におけるストレス応答性キナーゼMKK7 の機能解析）	平成29年3月23日
甲第5281号	理学	石原　えりか	Elucidation of the molecular mechanisms underlying active YAP-induced apical extrusion in mammalian cells （哺乳動物培養細胞を用いた活性型YAP誘導性細胞排除現象の分子機構の解明）	平成29年3月23日
甲第5282号	理学	深澤　亮	Development of C3-Exomethylene Sialic Acid Derivatives Toward Functional Analysis of Sialidase （シアリダーゼの機能解析を志向した3位エキソメチレン型シアル酸誘導体の開発）	平成29年3月23日
甲第5283号	理学	DILIHUMAER Ainiwaer	Development of novel modulators for transcriptional co-activator TAZ involved Hippo pathway （Hippoシグナル伝達系に関与する転写共役因子TAZの活性促進分子の開発）	平成29年3月23日
甲第5284号	理学	MEDZHIDOV　Nazim	Endosomal trafficking and persistence of the antigen-B cell receptor complex and their significance in B cell activation （B細胞活性化における抗原―B細胞受容体複合体のエンドソーム輸送とその重要性）	平成29年3月23日
甲第5285号	理学	平松　健一	Fluorination with Anionic Phase-Transfer Catalysts （アニオン性相間移動触媒を用いたフッ素化反応）	平成29年3月23日
甲第5286号	工学	小早川　拓也	Synthetic Studies on Chloroalkene Dipeptide Isosteres as Peptidomimetics （ペプチドミメティクスを指向したクロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究）	平成29年3月23日

甲第5287号	工学	高野　皓	Development of Chemical Probes Based on an 8-Azacoumarin Chromophore （8-Azacoumarin骨格を基軸とした化学プローブの開発）	平成29年3月23日
甲第5288号	工学	森田　隆太	アライン中間体を経由した縮環型複素環化合物の合成法の開発	平成29年3月23日

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	伊藤　浩光
論文審査担当者	主査　稲澤　譲治 副査　河野　辰幸　　三木　義男
論　文　題　目	Dominant Expression of DCLK1 in Human Pancreatic Cancer Stem Cells Accelerates Tumor Invasion and Metastasis

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

膵癌は早期から浸潤や転移を生じる難治性の癌である。近年、癌細胞群が階層性の構造を有し、その頂点に位置する癌幹細胞は高い悪性度を示すとの研究が進んでいるが、浸潤や転移を生じる詳細なメカニズムは未だに明らかではない。我々は、プロテアソーム活性を指標とした膵癌幹細胞の可視化システムを構築し、この課題に取り組んでいる。本論文では、実験動物モデルを用いて膵癌幹細胞が高い遊走・浸潤能力を持つことを示し、肝転移腫瘍の辺縁に局在しているという新しい知見を示した。そして、網羅的遺伝子解析を行い、膵癌幹細胞に DCLK1 が高発現していることを同定した。DCLK1 を強制発現させた膵癌細胞はアメーバ様の特徴的な形態変化を生じ、遊走・浸潤能力が顕著に亢進した。一方、DCLK1 の発現が抑制された癌幹細胞の遊走・浸潤能力は著しく減弱し、転移能力は著しく消失した。臨牀検体においては DCLK1 が原発巣よりも転移巣で強く発現していることが確認された。すなわち、DCLK1 が膵癌の浸潤・転移に重要な役割を果たし、今後の膵癌治療の標的となる可能性が示された。

＜緒言＞

膵臓癌の 85%を占める浸潤性膵管癌は、早期発見が難しく治療抵抗性を示すことが多く、極めて予後不良の疾患である。早期に浸潤、転移するため、5 年生存率は約 6%程度と極めて低い。この難治癌を克服するために、1990 年代後半より癌幹細胞を標的とした研究がすすめられてきた。すなわち自己複能と多分化能を持つ癌幹細胞を頂点とする階層構造が癌組織の多様性を生じ、治療抵抗性の原因となっているという仮説である。しかし、膵癌幹細胞に関する様々な研究が行われてきたにも関わらず、最大の課題である浸潤・転移のメカニズは未だに解明されていない。癌幹細胞研究においては、分裂が進むにつれて階層構造が生じてしまうため、癌幹細胞のみを標的とした実験が困難であった。そのような問題を解決するため、我々は乳癌や神経膠腫における癌幹細胞が低プロテアソーム活性で維持されている点に注目し、ヒト膵癌細胞株で癌幹細胞の機能に基づいたモニタリングシステムを構築した。そして、この可視化システムと臨牀検体を用いて、膵癌の浸潤・転移のメカニズムの解明を試みた。

＜方法＞

非ユビキチン化プロテアソーム活性を反映するオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）デグロン配列と蛍光蛋白（ZsGreen）の融合遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いてヒト膵癌細胞株2種類（KLM1、BxPC3）に導入し安定株を作成（Gdeg-KLM1、Gdeg-BxPC3）、癌幹細胞をリアルタイムに可視化できるシステムを構築した。フローサイトメトリーにより光る細胞（Gdeg^{high}-KLM1、Gdeg^{high}-BxPC3）を選別し in vitro で sphere 形成能力や遊走・浸潤能力、in vivo で腫瘍造成能力や転移能力を評価した。次にマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析により、癌幹細胞（Gdeg^{high} 細胞）で高発現している遺伝子を同定した。この遺伝子を過剰に発現させた株と発現を抑制した株を作成し膵癌幹細胞における機能を明らかにしようと試みた。また、臨床検体の免疫組織学的染色も施行し、実臨床へ応用の可能性を模索した。

＜結果＞

2 種類のヒト膵癌細胞株に ODC デグロン配列と蛍光蛋白の融合遺伝子を導入した。安定した株が樹立され（Gdeg-KLM1、Gdeg-BxPC3）、双方とも全細胞数の約 1%に光る細胞を認めた。In vitro 実験では、Gdeg^{high} 細胞は Gdeg^{low} 細胞に比べて sphere 形成能が高く、Double Chamber Assay において遊走・浸潤能力が高いことが明らかとなった。In vivo 実験では、Gdeg^{high} 細胞は Gdeg^{low} 細胞より少ない細胞で皮下腫瘍を形成し、経脾臓肝転移モデルでは Gdeg^{high} 細胞で高い転移能力が示された。生体内でも蛍光モニタリング可能であることが示され、転移巣において Gdeg^{high} 細胞は中心部よりは腫瘍辺縁に局在していることが明瞭に観察された。Gdeg^{high} 細胞および Gdeg^{low} 細胞から、各々RNA を抽出して網羅的遺伝子発現解析を行った結果、Gdeg^{high} 細胞で発現が亢進している遺伝子（FC>2）は 483 個、発現が抑制されている遺伝子(FC<0.5)は 1138 個を同定した。発現が亢進している遺伝子群の中で、浸潤や転移に深く関わっていると考えられる DCLK1 に着目した。DCLK1 は、以前より神経細胞の遊走に関与していることが示されており、近年では消化管の癌幹細胞特異的マーカーとして報告されている。上記の結果をふまえ、免疫学的染色を行ったところ、Gdeg^{high} 細胞の細胞質に DCLK1 が強く発現していることが示された。そこで、DCLK1 を過剰発現させたヒト膵癌細胞株（KLM1-DCLK1-GFP）を作成し、細胞の形態変化や遊走・浸潤能力を調べた。この過剰発現させた株においても、神経細胞での報告と同様に DCLK1 は細胞骨格である微小管を形成する α tubulin と merge していた。タイムラプスによる経時的な観察で、KLM1-DCLK1-GFP は細胞表面に偽足を伸展させるなど、いわゆるアメーバ様の形態変化が認められ、遊走・浸潤能力が著しく亢進した。次に、Gdeg^{high} 細胞に対して RNA 干渉により DCLK1 の発現抑制を行ったところ、遊走・浸潤能力が著しく減弱した。さらに Gdeg-KLM1 細胞から DCLK1 ノックダウン安定株を作成した結果、DCLK1 が抑制された光る細胞（Gdeg^{high}-KLM1-shDCLK1）では肝転移が完全に抑制されることが示された。さらに、膵臓癌切除症例で遠隔転移巣が切除された 6 症例（同時切除 3 例、異時切除 3 例）について DCLK1 の免疫組織学的染色を行った。すると、原発巣でほとんど認められなかった DCLK1 陽性細胞が転移巣では増加していることが示され、特に異時性に切除された肺組織で顕著であった。

＜考察＞

DCLK1 は神経細胞の遊走を誘導する DCX と約 70%相同配列を N 末端側に有し、セリン・スレオニン（ST）キナーゼ配列を C 末端に結合した構造であり、微小管の結合・形成促進作用を持つ 2 機能性分子である。DCX は X 染色体短腕上に位置し、その遺伝子変異は神経細胞の遊走異常を生じ、女性では double cortex syndrome、男性では滑脳症という重篤な病態を引き起こす。しかし、DCX 単独のノックアウトマウスでは DCLK1 の補完作用によって、神経細胞の遊走低下が最小限に留められることが示されており、DCLK1 蛋白が細胞遊走を促進する機能を持つことが推察されている。我々の実験結果では、DCLK1 を過剰発現した膵癌細胞で遊走能の亢進を認め、発現抑制により遊走能、転移能の低下を呈し、癌細胞における浸潤・転移に密接に関わることが示された。では、なぜ DCLK1 の高発現がヒト膵癌細胞において遊走能を亢進させ、浸潤・転移を促進するのだろうか。DCLK1 は let-7 や mir200 を介して上皮間葉転換（EMT）を亢進させるとの報告もあるが、我々のマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析では EMT 関連の遺伝子に $Gdeg^{high}$ 細胞と $Gdeg^{low}$ 細胞の間で有意な差は認められず、網羅的マイクロ RNA 解析でも上記のマイクロ RNA に差はなかった（data not shown）。以前の報告に、臨床検体の癌先進部から採取し表面マーカーにより同定したヒト膵癌幹細胞（CD133+/CXCR4+）の転移能が高く CD133+/CXCR4-では転移が起きないという結果が示されているが、光る細胞の局在や DCLK-1 の RNA 干渉により転移が全く起きなかった我々の結果と合致している。しかし、我々の $Gdeg^{high}$ 細胞では CXCR4 の発現に明らかな差は認められず、別のメカニズムが働いているものと考えられる。腫瘍細胞の浸潤亢進の原因には、EMT やアメーバ状運動の亢進が報告されている。我々は DCLK1 を過剰発現させた細胞を解析し、$Gdeg^{high}$ 細胞の浸潤・転移にはアメーバ様細胞変化が関与する可能性を示した。また、癌細胞の接着・運動の亢進を制御する ROCK が DCX のリン酸化に関わっているとの報告もあり興味深い。DCLK-1 は神経領域での研究が進んでおり、特に神経膠腫において治療標的としての応用が期待されている。最近、消化器癌でも DCLK1 の阻害剤を使った研究の報告があり、ますます注目が高まっている。本論文では、臨床組織を使用して転移巣における DCLK1 の高発現を明らかにした。これは、臨床上でも浸潤転移に DCLK1 が一つの重要な鍵となっていることを示唆する所見である。

＜結論＞

DCLK1 は膵癌の浸潤と転移の促進因子であり、治療の標的となる可能性が示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5042　号	伊藤　浩光
論文審査担当者	主　査　稲澤譲治 副　査　河野辰幸　　三木義男	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

膵癌は早期に浸潤・転移などの悪性特性をもつ難治癌であることが知られている。申請者は、癌幹細胞が低プロテアソーム活性で維持されている点に注目し、ヒト膵癌細胞株で癌幹細胞の機能に基づいたモニタリングシステムを独自に構築し、この可視化システムとマウス移植転移膵癌モデルや臨牀検体などを用いて、膵癌の浸潤・転移のメカニズムの解明を試みた。その結果、膵癌幹細胞に高発現する DCLK1 遺伝子を同定し、DCLK1 が膵癌の浸潤・転移に重要な役割を果たすとともに、膵癌治療の標的分子となる可能性を示した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者の研究目的は、ヒト膵癌幹細胞特性の可視化による機能的スクリーニングシステムを構築して膵癌幹細胞を選別分取し、その詳細な機能解析を試みるものであり、先駆性、独創性ともに高いものである。

２）社会的意義

膵癌の 85%を占める浸潤性膵管癌は、早期発見が困難かつ治療抵抗性であり、極めて予後不良であることが知られている。効果的な分子標的治療薬も未だに開発されておらず、５年生存率も約６%程度と著しく低い。以上より難治膵癌の克服は喫緊の課題とされている。申請者は、今回の研究において膵癌幹細胞で高発現する DCLK1 を見出し、膵癌幹細胞バイオマーカーとしての意義に加え、膵癌治療の標的分子となる可能性を示した。それら成果の科学的ならびに社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

臨床検体、動物モデルなどを用いて実施された *in vitro, in vivo* 実験による今回の研究は倫理的にも適正で有り、また、得られた結果も矛盾なく妥当な解釈のもとで考察が展開されている。

４）考察・今後の発展性

今回の研究で同定された膵癌幹細胞関連分子の DCLK1 は、浸潤・転移の膵癌悪性特性に関与することが示された。DCLK1 は神経領域での研究が進んでおり、特に神経膠腫において治療標

的としての応用が期待され、また、最近では、消化器癌でも DCLK1 の阻害剤を使った研究の報告がなされ注目が高まっている。DCLK1 は難治膵癌の克服に向けた治療標的分子となる可能性が示され、今後の発展が大いに期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

申請者は、自身の言葉をもって研究の背景と目的、実験方法、結果の解釈、本研究の意義や今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の高度な研究能力とその基礎となる豊かな学識に基づき実践されたものということが確認された。

試問においては、本研究の意義、本解析において使用した実験手法の詳細、今後の研究の展開等の質問がなされた。申請者からはいずれにおいても的確な回答が得られた。副査の河野辰幸教授と三木義男教授と協議のうえ、申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大谷　賢志
論文審査担当者	主査　田中　雄二郎 副査　田中　真二、田賀　哲也
論　文　題　目	Matrix metalloproteinase-14 mediates formation of bile ducts and hepatic maturation of fetal hepatic progenitor cells.

（論文内容の要旨）

<要旨>

肝幹・前駆細胞(肝芽細胞)は肝細胞・胆管細胞への二方向性分化能を有する細胞で、肝臓の発生において中心的な役割を果たしている。しかし、その分化・増殖を制御する分子機構には未知の部分も多く残されている。Matrix Metalloproteinase-14 (MMP-14)は、膜型 MMP タンパク質の１つであり、I 型コラーゲンを含む細胞外基質のタンパク分解、分泌型 MMP の活性化、TGF-β の活性化に関与することが知られているが、MMP-14 と肝発生あるいは肝芽細胞の分化決定・成熟化との関連性は未知であった。本研究では、マウス初代肝芽細胞を in vitro で肝細胞、胆管細胞へと分化誘導する系、MMP-14 欠損マウスを用いた in vivo の系を用いて解析を行った。解析の結果、MMP-14 は血管内皮増殖因子の影響下に門脈周囲で強く発現し、肝芽細胞から肝細胞への成熟化を抑制する機能、肝芽細胞が胆管の管腔構造を形成する機構を促進する機能を有していた。また、MMP-14 が欠損すると、胆管の管腔形成遅延が起こり、EGFR-MAPK 経路の亢進を経て逆に肝細胞への成熟化が異常に亢進する事が示された。本研究は、MMP-14 と肝臓の臓器形成及び肝芽細胞の成熟化との関係性を証明し、肝幹・前駆細胞における機能を初めて示した研究である。

<背景>

肝幹・前駆細胞（胎生期では肝芽細胞）は自己複製能と、肝細胞・胆管細胞への二方向性分化能を有する細胞であり、肝臓の発生における中心的な役割を果たしている。我々及び他のグループのこれまでの研究で、肝芽細胞は CD13、EpCAM、NCAM、Dlk などの表面抗原を用いて濃縮できること、細胞外基質や oncostatin M により肝細胞への成熟化が誘導されること、Notch-Hes1 経路、TGF-β、Wnt-β-catenin の影響で胆管細胞へと分化誘導される事が報告されてきた。しかしながら、その分化・成熟化を制御する分子機構には未知の部分も多く残されている。

MMP-14 は現在 20 種類以上同定されている MMP 蛋白の１つであり、膜型 MMP (MT1-MMP) とも呼ばれている。その主な機能としては I 型コラーゲンの分解、分泌型 MMP である MMP-2 の活性化、TGF-β 結合タンパクの分解による TGF-β 放出促進作用が知られている。MMP family の中では MMP-14 欠損マウスが唯一致死的な形質を示し、軟骨・骨形成に極めて重要な働きをす

ると共に肺損傷時には VEGF 刺激を介して肺胞再生に必須の因子である事が知られている。また、線維化や癌細胞の浸潤とも密接な関係があると報告されている。器官発生・幹細胞制御の見地からは発生期における後腎の形成、G-CSF を介した血液幹細胞からの血球形成に関わる事が知られている。このように、MMP-14 は幹細胞や臓器形成にも関わるが、肝臓の器官発生、肝芽細胞の分化・成熟化における機能については全く報告がない。

本研究では、MMP-14 は門脈周囲、胆管細胞でより強く発現し、肝幹･前駆細胞における肝細胞成熟化、及び胆管の管腔形成の双方を調節している事を証明した。

＜方法＞

野生型マウスを用い、胎生期から成体までの肝臓と、成体肝臓由来の肝細胞、胆管細胞を分離し、MMP-14 の発現量、発現分布を RT-PCR、免疫組織染色を用いて評価した。次に、*in vitro* の系で、胎生 14.5 日（E14.5）のマウス肝臓より初代肝芽細胞を分離し、OSM、EHS gel を用いた高密度平面培養で肝細胞への分化培養を行った。同様に、I 型コラーゲン，EHS gel を用いた３次元培養系で胆管型コロニー（胆管様 Cyst）への分化培養を行った。これらの分化誘導系において、レンチウイルスベクターにより誘導性に MMP-14 及び MMP-2 を強制発現させる系、及び、MMP-14 欠損マウス肝芽細胞を用いた系における成熟化誘導能の変化を解析した。*In vivo* の系では、MMP-14 欠損マウスは出生後に致死的な表現型があるため、生後 1 日目のマウスの肝臓を用いてマイクロアレイ・定量的 PCR による発現解析と免疫組織染色による解析を行った。最後に、MMP-14 の発現を誘導する因子、MMP-14 により影響をうける下流因子を解析するため、VEGF による肝芽細胞の刺激と MMP-14 欠損マウスの肝臓を用い、Western blot によるリン酸化タンパクの解析を行った。

＜結果＞

マウス肝臓において、MMP-14 は胎生期から出生後にかけて徐々に発現量が上昇し、成体肝臓より分離した胆管細胞は、成体肝細胞の mRNA の発現量が 60 倍高かった。また、免疫染色でも、門脈周囲の胆管細胞で強い発現を認めた。

in vitro の解析では、野生型初代肝芽細胞培養における MMP-14 過剰発現系で、肝細胞成熟化マーカーの発現低下を認め、肝細胞への成熟化は遅延していた。反対に、初代肝芽細胞の３次元培養では胆管様 Cyst が誘導されるが、MMP-14 過剰発現により大型の胆管様 Cyst の個数の増大、及び胆管細胞マーカー（HNF1ß、Notch１、Hes１、Jagged1、C-myc）の発現上昇を認めた。これらの現象は、MMP-2 過剰発現では認めなかった事から、MMP-2 とは独立した MMP-14 の機能によると考えられた。

次に、MMP-14 欠損マウス由来の初代肝芽細胞培養系では、同腹の野生型肝芽細胞と比較して肝細胞成熟化マーカーの発現上昇を認め、肝細胞への成熟化の亢進を認めた。MMP-14 欠損マウス肝芽細胞は胆管様 Cyst 誘導系では、胆管型コロニーの著明な形成不全を認めた一方で、１細胞あたりの胆管分化マーカーの発現には差を認めなかった。

in vivo の解析では、生後 1 日目(P1)の MMP-14 欠損マウスで、野生型と比較し体重、肝重量には差は認めなかった。MMP-14 欠損マウス及び同腹の野生型マウスを用いて E14.5 肝芽細胞及

び P1 肝臓を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、E14.5 肝芽細胞では MMP-14 欠損マウスで EGFR 発現レベルの上昇、MMP-14 の発現レベル低下を認める他は、発現プロファイルには大きな変化を認めなかった。しかし P1 肝臓では、MMP-14 欠損マウスで肝細胞成熟化マーカーの亢進を認め、MMP-14 と胆管細胞マーカーの発現低下を認めた。肝細胞成熟化マーカーの亢進は定量的 PCR でも同様の結果が再現された。免疫組織染色での解析では、E16.5 の ductal plate（胆管に分化決定された細胞）の形成には差を認めなかったが、P1 肝臓では MMP-14 欠損マウスにおいて、末梢側門脈周囲の胆管原器の形成遅延が認められた。

これらの現象の分子機構を解明するため、肝細胞成熟化因子である HGF 受容体 Met と、マイクロアレイ解析で差を認めた EGFR について RT-PCR で検討を行うと、P1 肝臓において、EGFR が MMP-14 欠損マウスで野生型の 3 倍の発現量上昇を認め、下流シグナルである MAPK family(p38 MAPK、ERK、JNK)のリン酸化レベルの亢進を認めた。さらに、MMP-14 は門脈周囲で強く発現上昇している事から、肝芽細胞に対し VEGF による刺激を行ったところ、VEGF 刺激により肝芽細胞で MMP-14 の発現レベルが上昇することが示された。これらの結果から、MMP-14 が欠損すると、胆管の管腔形成遅延が起こり、EGFR-MAPK 経路の亢進を経て逆に肝細胞への成熟化が異常に亢進する分子機構が示された。

＜考察＞

本研究は、MMP-14 と肝幹・前駆細胞の関係について示した初めての研究である。我々は、門脈周囲微小環境において、MMP-14 は肝芽細胞から胆管細胞への分化決定には影響を及ぼさないが、胆管細胞へ分化決定した後の、管腔構造の形成に関与し、肝細胞分化については、MMP-14 の発現量が増える事で肝芽細胞から肝細胞への分化を抑制し、欠損すると成熟化が以上に亢進する事を in vitro 及び in vivo の系で示した。

平面培養による肝細胞分化の系では、MMP-14 過剰発現系で肝芽細胞から肝細胞への成熟化が抑制されており、MMP-14 欠損細胞では肝細胞への成熟化亢進を認めた。*in vivo* においても、欠損マウスでは成熟化マーカーの発現上昇を認め、EGFR-MAPK 経路の活性化を認めた。この事から、MMP-14 が肝細胞の成熟化を調節する 1 つの因子である事が示された。既報でも、MMP-14 が EGFR の transactivation を上昇させるとの報告がある。MMP-14 欠損マウスにおける現象は、MMP-14 が欠損する事によって、EGFR の transactivation が低下し、それを補うために EGFR の発現量が上昇し、MAPK 経路の活性化が引き起こされ、成熟化が異常に亢進していたことが示唆される。

次に、*in vivo* において MMP14 欠損マウスでは P1 肝臓で胆管管腔形成に遅延を認め、in vitro では肝芽細胞による胆管様 Cyst の著明な形成不全を認めた。胎仔期の ductal plate 形成は正常で、in vitro の系でも 1 細胞当たりの胆管分化マーカーに差を認めない事から、MMP-14 は胆管への分化決定には影響を与えないことが示唆され、この現象は分化決定後の管腔形成に必要な MMP-14 によるコラーゲン分解作用が阻害されて引き起こされた可能性が考えられる。また、*in vitro* では MMP-14 欠損肝芽細胞でほぼ完全に胆管型 Cyst 形成が阻害されるのに対し、*in vivo* では胆管腔は遅延を認めたことに相違点があった。その原因として、*in vitro* の実験系では細胞周囲のコラーゲン量が多く、コラゲナーゼとして中心的な働きをもつ MMP-14 の影響がより大き

かった事が考えられる。また、in vitro では VEGF 刺激によって肝芽細胞からの MMP-14 の発現が誘導されており、VEGF は MMP14 の発現を誘導する因子の 1 つである可能性が示唆された。以上の事から、肝臓発生期の VEGF を含む門脈周囲微小環境において、門脈周囲で MMP-14 発現が誘導され、胆管の管腔形成、増大が促されている可能性が考えられた。

本研究では、MMP-14 欠損マウスの致死的な形質のため、成体肝臓における MMP-14 の機能に関しては検討していない。MMP-14 は炎症性サイトカインによって発現誘導されると報告があり、この事は炎症により引き起こされる、細胆管反応や胆管周囲の線維化形成と MMP-14 が関わっている可能性を示している。また、慢性炎症では幹細胞に近い性質をもつ oval cell が出現するため、やはり MMP-14 の機能が oval cell を調節している因子の 1 つである可能性もある。近年、抗腫瘍薬、抗炎症薬として MMP-14 阻害剤が注目されているが、MMP-14 阻害剤の使用によって細胆管反応が障害され、肝障害後の正常な回復が障害される可能性もあり、今後の解析が必要であると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5043　号	大谷　賢志
論文審査担当者	主　査　田中　雄二郎 副　査　田中　真二　田賀　哲也	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、MMP-14 と肝芽細胞の成熟化および胆管形成との関係性を明らかにし、肝幹･前駆細胞における機能を初めて示した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究の先駆性・独創性については、MMP-14 が、門脈周囲、胆管細胞でより強く発現し、肝幹･前駆細胞における肝細胞成熟化および胆管の管腔形成の双方を調節している事を証明した点で評価できる。

２）社会的意義

MMP-14 が肝芽細胞の成熟化と胆管形成に関与することを明らかにし、今後の肝再生研究の進展への寄与が期待できるほか、抗腫瘍薬、抗炎症薬として注目されている MMP-14 阻害剤の使用によって細胆管反応が障害され、肝障害後の正常な回復が障害される可能性をも示した点で基礎的および臨床的意義は大きいと言える。

３）研究方法・倫理観

マウス初代肝芽細胞を in vitro で肝細胞、胆管細胞へと分化誘導する系、および MMP-14 欠損マウスを用いた in vivo の系を用いて、マイクロアレイ解析、免疫染色、RT-PCR、Western blot によるリン酸化の解析により MMP-14 の肝芽細胞の分化成熟過程への関与を分析した。

４）考察・今後の発展性

本研究で、申請者は MMP-14 の発現量が増える事で肝芽細胞から肝細胞への分化を抑制し、欠損すると成熟化が亢進する事を in vitro 及び in vivo の系で示した。また、MMP-14 は肝芽細胞から胆管細胞への分化決定には影響を及ぼさないが、胆管細胞へ分化が決定した後の、管腔構造の形成に正に関与することも明らかにした。臨床的には急性肝炎や慢性活動性肝炎において門脈域に偽胆管の増生（細胆管反応）が認められるが、炎症性サイトカインにより誘導される MMP-14 がそのメカニズムに関与している可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文はこれを以て博士（医学）の学位を申請するに値すると認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	増田　大機
論文審査担当者	主査　稲澤　譲治 副査　三木　義男、田中　真二
論　文　題　目	Overexpression of the S100A2 protein as a prognostic marker for patients with stage II and III colorectal cancer

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

（目的）網羅的遺伝子情報解析およびコピー数異常解析から、stage II、III 大腸癌の再発予測因子を同定する。（方法）125 例の stage II、III 大腸癌症例に対し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析とコピー数異常解析を行い、再発群で有意に高発現している遺伝子を再発関連因子の候補遺伝子として同定した。別の 161 例の大腸癌症例を用いて、候補遺伝子の蛋白発現と臨床病理学的因子との関連を調べた。（結果）網羅的遺伝子情報解析とコピー数解析の結果より S100 calcium binding protein A2（S100A2）遺伝子を再発関連因子の候補遺伝子として同定した。S100A2 の遺伝子発現は正常大腸組織と比して、癌組織で有意に高発現しており、S100A2 蛋白は、再発群において有意に高発現していた。（結論）S100A2 は stage II、III 大腸癌において、独立した再発予測因子であった。

＜諸言＞

大腸癌の罹患率は過去 20 年で倍増している。治療の第一選択は外科的切除であるが、根治切除を行っても一定の割合で再発する（stage II 大腸癌で約 15%、stage III 大腸癌で約 30%）。現在、TNM 進行度分類に基づいて治療方針を決定しているが、症例毎に最適な治療法（personalized medicine）を提供するためには、個々の症例が有する遺伝子変異および SNP あるいは染色体コピー数の多型などのゲノム多様性にもとづく疾患リスクとの関連を解明することが重要である。本研究では、SNP array を用いたコピー数解析と microarray 法を用いた網羅的遺伝子発現解析により、S100A2 遺伝子を stage II、III 大腸癌の再発関連因子の一つとして同定した。

＜方法＞

2002 年から 2009 年まで東京医科歯科大学病院で手術を受けた stage II、III 大腸癌 125 例（再発群；n = 32、非再発群；n = 93）に対して、コピー数異常解析（GeneChip®Human Mapping 250K Sty Array；Affymetrix 社）および遺伝子発現解析（GeneChip® Human Genome U133 Plus2.0 Array；Affymetrix 社）を行い、再発関連因子となり得る候補遺伝子を同定した。次に、別の大腸癌 161 例に対して Immunohistochemistry（IHC）を実施し、腫瘍組織内における候補遺伝子

の蛋白レベルでの発現と臨床病理学的因子との関連を調べた。

＜結果＞

コピー数異常解析と発現解析により、最終的に 9 つ（S100A2、PROX1、TCN1、PROM1、CHRM3、ZNF678、CREB5、PPARGC1A、ATF6）の候補遺伝子が同定された。この中の S100A2 は S100 family の一つであり、S100 family はしばしば各種癌組織での高発現が報告されており、予後や再発の予測因子としての報告もある。従って、S100A2 を stage II、III 大腸癌の再発関連遺伝子として同定した。

RT-PCR を実施し、S100A2 mRNA の発現が、大腸正常粘膜と比して癌組織内で有意（$P < 0.05$）に高発現していることを確認した。

次に S100A2 蛋白発現と臨床病理学的因子との関連性を調べた。IHC を実施し、腫瘍組織における S100A2 蛋白の発現を高発現群（n = 91）と低発現群（n = 70）に分けた。蛋白レベルにおいても S100A2 は再発群で有意に高発現していた。

全生存期間および無再発生存期間は、高発現群において有意に低く、多変量解析においても S100A2 発現は stage II、III 大腸癌における独立した再発・予後予測因子であった。

＜考察＞

この研究は、コピー数解析と遺伝子発現解析との統合解析から、大腸癌の再発と S100A2 遺伝子を結びつける初めての研究である。統合解析より再発関連遺伝子として S100A2 が挙げられ、さらに S100A2 蛋白の高発現群は、低発現群と比べて有意に再発率が高く、生存率が悪いことが証明された。この実験の結果から、S100A2 遺伝子は、StageII、III 大腸癌の再発に寄与している可能性が示唆された。

ヒト S100A2 は、S100 family の一つである。S100 family は、炎症や腫瘍形成といった多くの病理学的プロセスに関わっており、過去数年で大きな注目を集めた。S100 family は、細胞サイクルや運動性および浸潤の調整を行うことにより、腫瘍進行や転移を促進する機能を有している可能性が示されている。S100A2 は EF ハンド型カルシウム結合蛋白質であり、細胞内外で、タンパク質リン酸化や細胞骨格成分、カルシウム恒常性の制御活動を行っている。S100A2 蛋白は、食道や大腸などの上皮細胞の細胞質、核内に存在しており、TGF-β シグナル伝達に関与しているとも報告されている。p53 の cell cycle 制御に関与するともいわれており、S100A2 蛋白の過剰発現は肺、脳、膵臓、食道など、いくつかの消化器系癌で報告されている。また、S100A2 ノックダウンにより、TGF-β に誘導された細胞の遊走能が低下するとの報告もある。従って、大腸癌の転移再発に関与している可能性も十分に示唆される。

この研究では、stage II、III 大腸癌の再発群と無再発群を比べると、再発群で有意に S100A2 が高発現していることが示された。大腸癌の転移再発において、S100A2 が重要な役割を担っている可能性が示唆される。大腸癌における S100A2 の役割や機能は今後さらに調べる価値があると考えられる。

stage II 大腸癌に対する術後補助化学療法の有用性は確立しておらず、個々の症例の再発リスクに応じて補助化学療法の適応を決定することが望ましいとされている。欧米のガイドラインに

よれば、stage II 大腸癌の再発リスクとして、T4、郭清リンパ節個数 12 個未満、低分化腺癌・印環細胞癌・粘液癌、穿孔、脈管侵襲、リンパ管侵襲などがあり、それらを有す再発高リスク症例には術後補助化学療法を考慮するよう求められている。一方、stage III 大腸癌では、一律に術後化学療法の投与が推奨されている。しかし、TNM 分類第 7 版に従って IIIA、IIIB、IIIC に細分化すると、stage IIIA ではオキサリプラチンの上乗せ効果は期待できないという報告もみられ、stage III 大腸癌も stage II 大腸癌と同様に、再発リスクの層別化が重要と考えられている。今回の研究結果より、大腸癌組織での S100A2 高発現が、stage II、III 大腸癌の再発リスクとして考えることができるかもしれない。stage II、III 大腸癌の術後化学療法に関しては、再発リスク因子の同定と、リスクに応じた治療の有用性の検証が重要であり、今後も更なる臨床試験を行っていく必要がある。

＜結論＞

S100A2 は大腸癌再発群で有意に高発現を示していた。S100A2 蛋白が、大腸癌の再発予測因子や分子標的治療薬の target になる可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5044　号	増田　大機
論文審査担当者	主　査　稲澤譲治 副　査　田中真二　　三木義男	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

網羅的遺伝子発現解析およびコピー数異常解析から、stage II、III 大腸癌の再発予測因子の同定を試みた。125 例の stage II、III 大腸癌症例に対し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析とコピー数異常解析を行い、再発群で有意に高発現している遺伝子を再発関連因子の候補遺伝子として同定した。別の 161 例の大腸癌症例を用いて、候補遺伝子の蛋白発現と臨床病理学的因子との関連を調べた。その結果、S100 calcium binding protein A2（S100A2）遺伝子を再発関連因子の候補遺伝子として同定した。S100A2 の遺伝子発現は正常大腸組織と比して、癌組織で有意に高発現しており、S100A2 蛋白は、再発群において有意に高発現していた。これらより、S100A2 は stage II、III 大腸癌において、独立した再発予後予測因子であると結論した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者の研究は、網羅的遺伝子発現解析およびコピー数異常解析の情報に基づき、stage II、III 大腸癌の再発予測因子の同定を試みようとする先駆性かつ独創性ある目的のもとで実施された。

２）社会的意義

申請者の研究において、stage II、III 大腸癌の再発群と無再発群との比較から、再発群において有意に S100A2 の mRNA 高発現を検出し、S100A2 を stage II、III 大腸癌の再発関連遺伝子であることを示した。また、免疫組織化学により 100A2 蛋白発現と臨床病理学的因子との関連性を調べ、腫瘍組織における S100A2 蛋白の発現を高発現群（n = 91）と低発現群（n = 70）に分け、蛋白レベルにおいても S100A2 は再発群で有意に高発現していることを明らかにした。全生存期間および無再発生存期間は、高発現群において有意に低く、多変量解析においても S100A2 発現は stage II、III 大腸癌における独立した再発・予後予測因子であった。今回の研究から、S100A2 が進行性大腸癌のバイオマーカーになるばかりか治療標的分子となる可能性が示された点において、科学的のみならず社会的意義が認められる。

３）研究方法・倫理観

臨床検体やヒト癌細胞株を用いた今回の研究は倫理的にも適正で有り、また、得られた結果の解釈においても矛盾なく妥当な解釈のもとで考察が展開されている。

４）考察・今後の発展性

stage II、III 大腸癌の網羅的遺伝子発現、ゲノムコピー数解析により、大腸癌再発関連遺伝子として S100A2 を同定した。S100A2 蛋白は再発群で有意に高発現していることが確認された。以上より申請者は、S100A2 が stage II、III 大腸癌の再発予後予測因子となる可能性が示唆されると考察した。得られた成果の今後の臨床応用への発展が期待される。

３．その他

特になし

４．審査結果

試問においては、本研究の意義、本解析において使用した実験手法の詳細、今後の研究の展開等の質問がなされた。申請者からはいずれにおいても的確な回答が得られた。副査の田中真二教授と三木義男教授と協議のうえ、申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	伊藤　俊輔
論文審査担当者	主査　下門　顕太郎 副査　木村　彰方、賴　建光
論　文　題　目	Crucial Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Indoxyl Sulfate-Induced Vascular Inflammation

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

インドキシル硫酸（Indoxyl Sulfate : IS）は慢性腎臓病（CKD）患者において心血管疾患の発症・死亡と関連する。アリルハイドロカーボン受容体（Aryl hydrocarbon Receptor : AhR）はリガンド誘導性転写因子であり、IS の受容体であることが報告された。本研究では IS-AhR の血管炎症における役割を明らかにすることを目的として検討を行った。血管内皮特異的 AhR 欠損（eAhR KO）マウスを作製し、IS を投与した後、TNF-α を投与した。生体内顕微鏡を用いて大腿動脈における白血球接着を検討した結果、対照群では IS により著明な接着数の増加が見られたが、eAhR KO マウスにおいては IS による影響は観察されなかった。このメカニズムを明らかにするため、ヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells: HUVEC）に AhR に対する siRNA（siAhR）を導入し、IS、TNF-α で刺激して検討を行った。この結果、IS は AhR を介して白血球接着、および接着分子 E-selectin の発現を上昇させることが明らかとなった。一方で、AhR は IS による酸化ストレス産生、c-jun N-terminal domain kinase（JNK）のリン酸化、NF-κB の転写活性化には関与していなかった。Luciferase assay により、E-selectin の転写に与える影響を検討した結果、IS は AhR を介して AP-1 の転写活性を誘導し、E-selectin の発現を上昇させることが明らかとなった。以上の結果から IS は AhR を介して血管炎症を増強させ、CKD に関連した心血管疾患発症を引き起こす可能性が示唆された。

＜諸言＞

CKD は心血管疾患の独立した危険因子であり、冠動脈疾患の有病率は健常人と比較しはるかに高いことが知られている。この原因としては高血圧や糖尿病の有病率が高いのに加え、尿毒症毒素、酸化ストレスの上昇、貧血、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進など CKD 特有の危険因子の関与が考えられている。また、心血管系および腎は、一方に障害が起こると他方を巻き込んで悪循環を形成するため、心腎連関という概念が一般的となってきている。

動脈硬化の発症・進展には血管内皮機能傷害、特に白血球内皮相互作用が非常に重要な役割を果たしている。酸化ストレスや炎症性サイトカインによる内皮細胞の活性化により、接着分子である E-selectin などが誘導され、単球の内皮下への遊走が引き起こされる。血管内に浸潤した単

球はマクロファージに分化・泡沫化し、血管平滑筋の増殖、血管新生の誘導などによりプラークの形成を促進することが報告されている。

IS は尿毒症毒素の一種であり、食事由来のトリプトファンが腸内細菌によってインドールに代謝され、肝臓内で硫酸抱合を受けることによって産生される。通常、腎臓から排出されるため、CKD 患者においては、腎機能が低下するにつれ血中濃度が上昇し、透析患者においては健常人と比較し 50 倍を超える濃度となることが報告されている。さらに近年、IS は心血管疾患の発症率・致死率と関連することが報告され、心腎連関の原因の一つであることが示唆されている。実際に IS は血管平滑筋細胞の増殖、単球・マクロファージの活性化などを促進し、動脈硬化を憎悪させる可能性が高いことが示唆されていた。我々は以前、IS が血管内皮細胞において酸化ストレスを上昇させ、炎症性サイトカインによる JNK、 NF-κB の活性化を促進し、E-selectin 発現を上昇させ、白血球内皮相互作用を促進することを見出した。一方でアンジオテンシンⅡ、ないしは過酸化水素による酸化ストレスでは IS と同様の影響が観察されなかったため、IS による血管炎症の増強作用には他のメカニズムが関与することも示唆されていた。

2010 年、Schroeder らにより AhR が IS の受容体であることが報告された。AhR は basic helix-loop-helix Per-Arnt-Sim regulatory protein superfamily に属するリガンド誘導性転写因子であり、2、3、7、8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin（TCDD）などのダイオキシン類の受容体として知られている。AhR はリガンドの結合により細胞質から核内へ移行し、xenobiotic response element（XRE）に結合、cytochrome p450 (Cyp) 1A1 や Cyp1b1 などの薬物代謝酵素の発現を誘導する。 TCDD などのダイオキシン類は発がん性、催奇形性などの毒性があることが知られているだけでなく、apoE 欠損動脈硬化モデルマウスにおいてもプラークの形成を促進させることが報告されている。

本論文では IS による白血球内皮相互作用における AhR の役割を *in vivo* および *in vitro* で明らかにすることを目的に検討を行った。

＜方法＞

AhR-loxP（$AhR^{fx/fx}$）マウスと Tie2-cre トランスジェニックマウスを掛け合わせることにより eAhR KO マウスを作製した。陽性対照である $AhR^{fx/fx}$ および eAhR KO マウス皮下に IS を充填した浸透圧ポンプ（0。79 mmol/L）を 2 週間留置した。その後 100 μg/kg の組換えマウス TNF-α を腹腔内投与し、3 時間後に大腿動脈における白血球接着を生体内顕微鏡により検討した。

血管内皮細胞としては HUVEC を用い、siAhR ないしは non-targeting siRNA（siCont）を遺伝子導入した。0。2 ないしは 2。0 mmol/L の IS で 20 時間処理した後、組換えヒト TNF-α で刺激した。白血球としては HL-60 を用い、non static rotational assay にて流速条件下における接着数を検討した。mRNA 発現はリアルタイム PCR にて、タンパク質発現はウェスタンブロッティングにて検討した。 E-selectin promoter 領域（-166 ~ +107）は pGL3-basic luciferase vector に挿入し、NF-ELAM-1 vector として用いた。また、NF-ELAM-1 の配列をランダムに変異させ、機能を失わせた mNF-ELAM-1 vector、NF-ELAM-1 サイトを AP-1 配列に置換した NF-ELAM-AP-1 vector、CRE 配列に置換した NF-ELAM-CRE vector を同様に作製し、転写活性の検討には Luciferase assay を用いた。

＜結果＞

AhR$^{fl/fl}$、eAhR KO 共に IS の投与により血清脂質、腎機能に影響は見られず、血中 IS 濃度の上昇が観察された。生体内顕微鏡を用いた検討の結果、対照群である AhR$^{fl/fl}$ では IS により白血球接着数が有意に上昇した。一方、eAhR KO では IS による影響は観察されなかった。

HUVEC を用いた検討において IS は AhR の核移行、XRE 転写活性、Cyp1a1、 Cyp1b1 の mRNA 発現の上昇を誘導した。siAhR は IS によって増強した白血球接着、および接着分子 E-selectin 発現の上昇を抑制した。一方で、siAhR は IS によって誘導された酸化ストレス産生、c-jun N-terminal domain kinase（JNK）のリン酸化、NF-κB の転写活性化には影響を与えなかった。NF-ELAM-1 vector を用いた Luciferase assay の結果、IS は濃度依存的に転写活性を増大させたが、mNF-ELAM-1 vector においては IS の効果が抑制された。NF-ELAM-AP-1 vector においては IS による活性増強が観察されたが、NF-ELAM-CRE vector では IS の影響が抑制された。さらに、IS は AP-1 の転写活性を増強させ、siAhR はこれを抑制した。一方 IS は CRE の転写活性には影響を与えなかった。

＜考察＞

本研究により、IS によって活性化された AhR は、酸化ストレス、またはその下流にある JNK、NF-κB とは独立して、E-selectin 発現、白血球接着の亢進に関与することが示唆された。肝細胞において、AhR agonist は酸化ストレスを誘導することが報告されている。本検討では、HUVEC において AhR agonist は ROS 産生を誘導せず、AhR antagonist は IS による酸化ストレス産生を抑制しなかった。この結果から、AhR は細胞種により異なったシグナル伝達経路を有することが示唆された。IS は少なくとも酸化ストレス依存的経路、AhR 依存的経路の二つのシグナル伝達経路によって血管内皮細胞の炎症に関与する可能性が考えられた。実際に IS による酸化ストレスを NADPH oxidase の阻害剤である apocynin で抑制すると、NF-κB 活性化は抑制されたが（データ記載なし）、AhR の抑制は NF-κB 活性化に関与しなかった。

AP-1 は接着分子のみならず、炎症性サイトカイン、ケモカインなど血管炎症と関連した遺伝子発現に関与することが知られている。さらに、E-selectin の転写に重要な NF-ELAM-1 領域の調節には AP-1 の構成分子である ATF-2 が深く関与しており、CRE 結合蛋白（CREB）の関与は少ないことが報告されている。したがって、IS による E-selectin 発現の増強作用に AP-1 が関与することは、これらの結果と矛盾しない。一方で、AP-1 転写活性の誘導における AhR の役割に関してはほとんど報告がない。我々は、①IS による AhR の活性化により AP-1 構成分子の発現上昇が誘導される、②AhR と AP-1 構成分子が相互作用する、ことで AhR が AP-1 を活性化させるという仮説のもと、検討を行った。しかしながら、AP-1 構成因子である ATFa、ATF-2、ATF-3、c-jun、junB および junD については少なくとも siAhR の影響が観察されなかった。同様に免疫沈降法により ATF-2、 c-jun と AhR の結合を検討したが、相互作用は観察されなかった。更なる検討が必要ではあるが、AhR は間接的に AP-1 を活性化させる可能性が示唆される。

eAhR KO を用いた検討から IS は生体においても AhR を介して血管炎症を増強させることが示唆された。また、我々は CKD モデルにおいても IS が血管炎症を増強することを報告しており、CKD 患者でも同様の機序で血管炎症が増強されている可能性が示唆される。一方で IS が実際に

動脈硬化を促進するかどうかについては、長期的な影響を観察する必要があると考えられる。ただ、apoE 欠損動脈硬化モデルマウスへの AhR agonist の投与は P-selectin などの接着分子発現、白血球の内皮化への浸潤を増加させ、動脈硬化を促進することが報告されている。また、本モデルで観察された血中 IS 濃度（0。15~0。2 mmol/L）は CKD 患者でも観察される濃度である。したがって CKD 患者における血中 IS 濃度の上昇は AhR を活性化させ、動脈硬化の発症・進展が促進される可能性が高いと考えられる。

＜結論＞

IS は AhR を介した AP-1 の活性化により E-selectin 発現を誘導し、白血球内皮相互作用を増強させた。CKD に関連した心血管疾患の発症・進展に IS-AhR が関与する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5045　号	伊藤　俊輔

論文審査担当者	主　査　下門　顕太郎 副　査　木村　彰方、賴　建光

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本研究は、尿毒症毒素の主要成分であるインドキシル硫酸（IS）と IS と結合するアリルハイドロカーボン受容体（AhR）が慢性腎不全における心血管病変の発生にはたす役割に関する研究である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性、独創性

増加する慢性腎不全の進行や合併症の予防法の確立は高齢社会において急務である。本研究は慢性腎不全による動脈硬化促進の機序を解明しようとしたもので、社会的にも重要な先駆的な研究であるといえる。

２）社会的意義

本研究の主要な成果は以下のとおりである。

（１）　血管内皮特異的 AhR 欠損マウスでは、TNF により誘導される血管壁への白血球接着が低下することを明らかにした

（２）　ヒト臍帯静脈内皮細胞の AhR の発現を siRNA（siAhR）により阻止する実験により，　IS は AhR を介して白血球接着，および接着分子 E-selectin の発現を上昇させることが明らかとした.

（３）　Luciferase assay により IS は AhR を介して AP-1 の転写活性を誘導し，E-selectin の発現を上昇させることを明らかにした.

IS が動脈硬化を進展させるメカニズムの一部を明らかにしたもので、今後の腎不全治療法の開発に寄与する有益な研究である。

３．研究方法・倫理観

血管特異的 AhR 欠損マウスを作出し in vivo での役割を検討するとともに、培養細胞を用いて詳細なメカニズムを研究しており、研究目的遂行のための先端的な適切な方法が用いられている。　研究にともなう倫理的な配慮にも問題がない。

４．考察・今後の発展性

マウスおよび培養細胞を用いた研究であるが、申請者は投与した IS の濃度はヒト腎不全患者のものと同様であり、今回の研究はヒト腎不全患者の病態を適切に反映していると考察している。腎不全患者の心血管疾患予防法の確立に寄与することが期待される。

５．審査結果

以上のことより博士（医学）の学位授与に値する論文であると判断する。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	再努尔　阿布利米堤
論文審査担当者	主査　下門　顕太郎 副査　吉田　雅幸、平尾　見三
論　文　題　目	Usefulness of the transfer function index (TFI) for diagnosing peripheral arterial disease in patients with arterial calcification

（論文内容の要旨）

Abstract

Objective: The prevalence of patients with peripheral arterial disease (PAD) is increasing, and these subjects also often have diabetes mellitus (DM) and/or chronic renal failure treated with hemodialysis (HD). Measurements of the ankle brachial pressure index (ABI) are widely used to screen for peripheral artery disease (PAD). Because medical calcification frequently develops in patients with DM or HD, ankle brachial pressure index (ABI) may provide false-negative result in some patients with arterial calcification, resulting in a misdiagnosis of PAD. Therefore, It is very important to estimate the presence of PAD associated with calcification using noninvasive methods to reduce the risk, time and costs associated with invasive modalities, such as angiography. The aim of this study was to investigate which parameters among the ABI, toe brachial pressure index (TBI) and transfer function index (TFI) may be used to diagnose more accurately patients with/without arterial calcification in the ankle who undergo any type of diagnostic imaging examination.

Patients and Methods: A total of 67 patients with PAD, with a mean age of 72.5 ± 8.1 years, were enrolled in this study. The ABI and TBI were measured using peripheral vascular diagnostic equipment (VasoGuard™), The TFI was measured at the ankle (TFIankle) and at the calf (TFIcalf) using pulse volume recording. The area under the curve (AUC) was calculated according to the receiver operating characteristic curve, and the cutoff value was determined.

Results: There was a strong correlation between the ABI and TBI in the no calcification in the distal crural arteries ($r = 0.75$). However, no correlations were observed in the railroad track-type calcification ($r = -0.11$). When an ABI of ≤0.90 was defined as the criterion for diagnosing PAD, the sensitivity and specificity were 69.8%, and 100%, respectively, although the AUC was 87%. When the cutoff value for TFIankle was set at 1.025, the sensitivity was 83.7%, the specificity was 92.3%, whereas the AUC was 90%. The sensitivity and specificity of TFIcalf (cutoff value: 1.025) was 79.1% and 92.3%, respectively, whereas AUC was 89%.

Discussion

Arterial calcification is associated with obesity, hypertension, dyslipidemia, and diabetes. Diabetes and calcification were found to have a close relationship in the present study, however, patients with DM exhibited in all three groups. Because diabetic patients with medial calcification have a significantly higher incidence of lower extremity amputations, the early detection of calcification may provided information predicting critical limb ischemia in diabetic patients. Intimal and medial calcification cannot be differentiated using non-contrast MDCT images. Plain x-ray findings and/or the pathological diagnosis can be used to identify the classification of calcification and plain X-rays can be employed to assess the degree and type of calcification, which may be helpful to progression of calcification and arterial disease in diabetic patients.

PAD is highly prevalent in HD patients, although it is frequently underdiagnosed. In patients with HD, a high age, diabetes, hypercalcemia and hyperphosphatemia have been described to be associated with a higher risk of amputation, which may contribute to arterial calcification for the onset of PAD in this population. In the current study, there were statistically significant differences in the incidence of arterial calcification based on the use of HD. In particular, railroad track–type calcification was detected in 25%, 67% and 100% of the patients in the DM, HD, and DM with HD groups, respectively. The results also showed that all patients with HD had railroad track–type calcification in the ankle. The reliability of ABI measurements is considered to be very low in HD patients. The early detection of PAD is also highly important in order to prevent major amputation; therefore, plain X-rays should be obtained especially in HD patients.

The ABI is a useful objective parameter to document the presence of lower-extremity PAD. Usually, an ABI of less than 0.90 has been shown to have a sensitivity of 90% and specificity of 98% to detect significant arterial stenosis (luminal stenosis ≥ 75%). A high ABI value (≥ 1.30) reflects non-compressible arteries at the ankle, which may be related to distal arterial calcification. The TBI can be used and valuable to evaluate the presence or severity of PAD in the lower extremities because digital arteries are much less susceptible to medial calcification. Digital arterial pressures are normally lower than brachial pressures. In the present study, the correlations between the ABI and TBI in three different groups were evaluated which showed a significant strong correlation only in the no calcification group ($r = 0.75$), whereas no correlation was observed in the railroad track–type calcification group ($r = -0.11$). Because there was a significant strong correlation in the no calcification group, the TBI may be used to evaluate the actual lower limb blood flow. In addition, there was a weak correlation in the plaque-type calcification group, which possibly indicated that any type of calcification might result in false-negative ABI values. Therefore, the TBI should be measured in patients with neither DM nor HD, as one-third of the patients in this group had plaque-type calcification.

It is very important to estimate the presence of PAD associated with calcification using noninvasive methods to reduce the risk, time and costs associated with invasive modality. Therefore, we attempted to elucidate whether resting parameters are more useful for assessing the PAD in patients with calcification. Consequently, the sensitivity of an ABI ≤ 0.9, the standard cutoff value for diagnosing PAD, was only 68.9% in the present study, while the AUC remained relatively low (87%). Meanwhile, a cutoff value for TFIankle of ≤1.025 for detecting PAD showed sufficient sensitivity, specificity and AUC values, at 83.7%, 92.3%, and 90%, respectively. The AUC for the ABI may be poor because the ABI values often provide false-negative results for diagnosing PAD due to the presence of arterial calcification. Hence, the ABI is not useful for appraising the ischemic status in patients with arterial calcification. The TFI is a more sensitive and specific tool for detecting PAD, despite the fact that railroad-track type arterial calcification is observed in 90% of all patients with DM and/or HD.

The TFI is also an efficient parameter for executing infrainguinal vein graft surveillance because vein grafts remain compliant, similar to native arteries. Whereas Nakashima have reported that TFIcalf was more useful parameter than the ABI and TFIankle to diagnose claudicants (recovery ability index > 0.6) even in diabetic patients. The similar results were obtained that TFIankle was the best parameter to diagnose PAD even in patients with DM and/or HD. In contrast, the TFI decreased in the patients with prosthetic graft and/or stent placement at the proximal arteries, including the aortoiliac and femoropopliteal regions. Therefore, PAD patients, who have undergone bypass surgery using prosthetic grafts or stent placement were excluded from this study.

PVR was first introduced to be an accurate modality for documenting lower extremity PAD in the 1970s. Plethysmography is also an excellent modality for diagnosing PAD, even in patients with DM and/or HD; however, it was not used widely in the clinical settings. The pulsatile pressure and blood flow must be calculated to determine the impedance in the arterial segment, which is associated with theoretical and practical problems. In the current study, the multi-cuff unit recorded pulse volume waveforms at 10 sites simultaneously, which were subsequently analyzed using Fourier and Laplace transformation to produce the TFI automatically, without examiner dependency or technical demands. This is why the TFIs were more resistant to the effects of arterial calcification than the ABI. The PVR can evaluate the ischemic severity even in patients with arterial calcification, which can not be compressed by a cuff. TFI measurement using PVR is a promising method for appraising arterial disease due to its noninvasiveness as well as several features of being simple, painless and operator independent. Simple assessments of PAD using the TFI in patients with arterial calcification may play an important role in more accurately assessing the prevalence of PAD particularly in subjects with DM and HD.

Conclusions: A cutoff value of TFIankle ≤ 1.025 exhibits higher sensitivity for detecting the presence of PAD than the ABI and TFIcalf. Therefore, the TFIankle is useful for estimating the presence of PAD in patients with arterial calcification.

要旨

末梢動脈疾患（PAD）は増加しており多くの場合は糖尿病および/または慢性腎不全(血液透析を含む)に罹患いることが知られている。内膜石灰化が DM や HD の症例には発症しやすいので、足関節上腕血圧比(ABI)は偽性高値となり末梢動脈疾患と診断できない症例が散見される。今回、画像診断より下肢末梢動脈疾患(PAD)を確定診断した症例を対象として足関節領域の動脈石灰化の有無が関節-上腕血圧比(ABI), 足趾上腕血圧比(TBI), 波形解析指標（TFI）評価に与える影響を検討した。

対象と方法： 対象は PAD： 67 例 134 肢であり平均年齢 72.5±8.1 歳であった。末梢血管診断装置バソガード(VasoGuard™)により ABI, TBI を測定した。TFI は容積脈波記録を使用して足関節（TFIankle）と下腿(TFIcalf)で測定した。曲線下面積（AUC）を計算しカットオフ値は対角線と ROC カーブの交点とした。

結果：遠位下腿動脈に石灰化を決めない症例では ABI と TBI との間に強い相関関係を決めたが(r = 0.75)、管状石灰化群では相関関係を決めなかった(r = − 0.11)。ROC 解析では PAD の基準である ABI:0.9 以下では感度：69.8%、特異度：100%、AUC：87%であった。TFI カットオフ値を 1.025 とした場合、TFIankle は感度：83.7%, 特異度：92.3%、AUC：90 %であり、TFIcalf は感度：79.1%,特異度：92.3%,AUC：89%にあった。

結論： TFIankle≤1.025 は ABI や TFIcalf より PAD 診断に対して高い感度を示した。したがって, TFIankle は動脈石灰化有する症例における PAD 診断に有用である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5046　号	再努尓　阿布利米堤
論文審査担当者	主　査　下門顕太郎 副　査　吉田雅幸　平尾見三	

（論文審査の要旨）

１．　論文内容

本論文は石灰化を伴う抹消動脈疾患の診断に transfer function index (TFI) が有効であることを示したものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性、独創性

高齢者の増加にともない抹消動脈疾患（PAD）は増加しているが、十分に診断されているとは言えない。特に,特に血管石灰化を伴う糖尿病や人工透析患者の PAD は、従来の上下肢の血圧の比較による ankle brachial pressure index (ABI)では正確に診断できず、本研究の目的は先駆的であるといえる。

２）社会的意義

本研究の主要な成果は以下のとおりである。

画像検査で確認された 102 名の患者、192 肢について血管石灰化の有無で 2 群に分け ABI, toe brachial pressure index (TBI), TFI の検査結果を ROC 解析で検討した。その結果、非石灰化血管についてはこの 3 者の感度・特異度に差が無かったが、石灰化血管については、TFI が最も優れていた。

３）研究方法・倫理観

石灰化の有無を肉眼的に判定しているが、判断が十分な客観性をもって行われたか疑問が残る。研究倫理的な面では問題がない。

４）考察・今後の発展性

申請者は TFI が石灰を伴う PAD の診断に有用であると結論している。TFI 測定は優れて方法であるが、十分に普及しているとは言えない。今後の普及が期待され、本研究はその普及に貢献すると思われる。

３．審査結果

博士（医学）の学位授与に値する論文であると判断する。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	野﨑　賢吾
論文審査担当者	主査　樗木　俊聡 副査　烏山　一、中村　正孝
論　文　題　目	Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

腸上皮内リンパ球（Intraepithelial Lymphocyte; IEL）は、腸管上皮内で上皮細胞間に挟まれ存在するリンパ球である。IEL が生体での免疫調節に多彩な機能をもつことはさまざまな動物実験により明らかにされてきた。しかしながら、体外での維持が困難であることから、IEL の性質や挙動を in vitro で解析する研究はこれまで不十分であった。本研究では、近年著しく進歩した腸管上皮細胞（Intestinal Epithelial Cell; IEC）培養技術を応用し、三次元的に培養される IEC と共存しながら IEL を維持する新規の培養法を構築した。本法では、IEL は上皮オルガノイド構造の内外に分布し、TCRαβ、TCRγδ 陽性サブセットの割合を保ちつつ 2 週間で約 4 倍に増加した。ライブイメージング解析では、IEL がオルガノイドに接しながら、あるいはオルガノイド内外を活発に移動する様子が明らかとなった。細胞移動の定量解析では、αβT IELs と γδT IELs の移動に大きな差を認めない一方で、選択的 MEK1/MEK2 阻害剤の存在下ではこれら 2 群が異なる応答を示すことが明らかとなった。この新規共培養法は、αβT IEL、γδT IEL を含む IEL を広く増殖させることが可能で、かつ IEC と IEL とのダイナミックな相互作用を in vitro で研究する有効なツールになりうると考えた。

＜緒言＞

腸管組織の最内側に位置し管腔内容と接する上皮細胞層は、吸収・分泌など物質輸送の場であると同時に、さまざまな非自己物質に対する免疫応答の場としても重要であり、宿主生体防御や免疫恒常性維持の機能を担う。

腸管上皮は一層の細胞からなり、これらは陰窩底部の上皮幹細胞から分化する複数種の細胞から構成される。以前よりこの上皮層には、上皮-上皮細胞間に存在するリンパ球、すなわち IEL の存在が指摘されてきた。IEL は大腸よりも小腸により豊富に存在し、例えば固定した小腸組織の解析によれば、絨毛の上皮細胞 5－10 個あたりに 1 個の割合で存在する。IEL は異なる細胞集団を含み、TCRαβ 陽性細胞を中心とする Type aIEL と、TCRγδ 陽性細胞を中心とする Type b とに大きく分けられる。いずれの細胞集団も、生体防御や粘膜バリア機能、免疫恒常性の維持に寄与していることが示されてきたものの、その詳細はいまだに不明な点も多い。

IEL の性状や機能の解析が不十分であった理由の一つには、IEL が体外で容易にアポトーシスに陥りやすく、したがって in vitro 解析が難しかったことが挙げられる。このことは、生体内で IEL の生存・増殖に不可欠なニッチ因子を近接する腸管上皮が供給する可能性を示唆するものであり、実際に IEL の体外培養に上皮由来因子や上皮細胞自身が良好な効果をもつとの報告も散見される。しかしながら実際に体外で IEL を十分に維持する培養技術は存在しなかった。

近年 IEC の体外培養技術が大きく進み、単離した正常な IEC を嚢胞状構造体（オルガノイド）として三次元的に培養することが可能となった。さらに、例えば単離し培養した小腸上皮オルガノイドは、体外で培養した後再び個体に戻しても体内で正常小腸上皮を再構築しうることから、培養過程においても小腸上皮の性質を保持することも示された。

これらを背景とし、本研究ではオルガノイド培養技術を、新しく IEL の共培養システム構築に利用することを目的とした。また、IEL を培養するこの新技術を、IEL が 3 次元環境下で上皮オルガノイド構造をとる IEC とどのように相互作用するかの細胞動態解析に応用することを目的とした。

＜方法＞

IEC のオルガノイド培養および IEL の単離は既報にしたがった。IEL と IEC の共培養では、IEC を 2 日間培養し、これを単離直後の IEL と混合しマトリゲル内で培養する手法を開発した。上皮オルガノイド用培地に加え、いくつかのサイトカインを添加しその IEL 培養への作用を検討した。固定したサンプルを用いた IEL の性状解析には、マトリゲルのまま 3 次元的に免疫染色する技法を確立しこれを用いた。単離した IEL の表面抗原あるいは細胞内蛋白発現の解析は、フローサイトメトリーでおこなった。また IEL の可視化のために全細胞で EGFP 蛍光を発する EGFP-tg マウス、あるいは核のみで EGFP 蛍光を発するヒストン H2B-EGFP マウスから IEL を単離し共培養に用いた。全視野蛍光顕微鏡を用いた生細胞イメージングは、EGFP をもつ IEL をオルガノイドと共培養し、全細胞の核を Hoechst33342 で染色することで可視化しおこなった。細胞動態の定量解析は、上記で得られた生細胞イメージングデータをもとに、イメージ解析ソフト（Imaris）を用いておこなった。

＜結果＞

最初に、小腸上皮培養法として報告された手法において、ともに単離されてくる IEL が存在するのか、またこれら IEL が上皮とともに培養維持されるかを確認した。その結果、既法にしたがい培養したオルガノイドには、培養開始日（Day1）の時点で少数（0.21 ± 0.06 個／オルガノイド）の CD3 陽性細胞が含まれることがわかったが、これら IEL は Day3 ですべて消失することから、上皮培養法のみでは IEL の維持は困難であると考えた。次に、個別に単離する IEL と IEC を混ぜることで IEL の維持が可能となるかを検討した。異なる組合せの検討の結果、IEC を 2 日間培養しこれを単離直後の IEL と混合し 3 次元的に培養することで、IEL 培養効率が著明に改善（6.9 ± 0.8 個／オルガノイド、100%）することを見いだした。ここでオルガノイド上皮間に見られる GFP 陽性細胞はすべて CD3 陽性であることから、本法では IEL がその性状を維持したまま IEC と共存することが示された。しかしながら本法においても、Day7 において IEL が著減す

ることから、さらなる培養手法の改良を試みた。IEL 維持効果をもつ添加因子の検討の結果、上皮培養に用いる培地に IL-2,IL-7,IL-15 を加えて培養を行うと、Day7 において培養開始時の約 2 倍、さらにもう 1 週間の培養継続により計 2 週間でおよそ 4 倍まで IEL が増加することを明らかにした。ここで得られる IEL の性状を解析した結果、αβT IEL と γδT IEL が同等に見られることから、新しく確立した本 IEL 培養法が、特定の IEL サブセットではなく、広く全 IEL 集団を維持し増やす方法であることが示唆された。

この新しい IEL 培養法を応用し、IEL と IEC の相互作用や IEL の動態解析に用いることを試みた。EGFP-tg マウスより得た IEL をオルガノイドと共培養し、ライブイメージングで観察した結果、IEL がさかんに細胞形態を変えながら、オルガノイド内を活発に行き来する様子が観察された。中には、オルガノイドから外方へ離れる細胞や、外部からオルガノイド内へ入り込む細胞も観察され、まったく動かない IEC に対し IEL が本質的に動的な細胞であることが明瞭になった。これら IEL の動態を定量評価するために H2B-EGFP-tg マウス由来 IEL と WT マウス由来 IEC を共培養し、四次元蛍光イメージングを行った。得られたデータを用いて各々の細胞の軌跡解析を行った結果、本実験系における IEL の平均速度と平均最大速度はそれぞれ 5.07 ± 0.27、9.67 ± 0.60 μm/min であることが分かった。最近、in vivo 顕微鏡を用いて、生体小腸組織における αβT IEL の平均速度、平均最大速度（3.8 ± 0.1、7.7 μm/min）を求めた結果が報告されたが、本研究での in vitro における IEL の動態解析結果は、この in vivo におけるデータと近似することから、本 in vitro 実験系が IEL の動態解析にも有用であると考えられた。さらに、これまで解析されたことのない αβT IEL の平均速度や平均最大速度が、γδT IEL と明らかな差がないことも示された。一方、興味深いことに、MEK1/MEK2 阻害剤である PD184532 を培地に添加すると、αβT IEL の速度が 20%程度低下する一方、γδT IEL ではその速度は変化しないことから、αβT IEL と γδT IEL 間で、その動態に関わる細胞内分子機構には異なる調節がある可能性も示された。

＜考察＞

新規に構築したオルガノイドとの共培養系で、IEL が αβT IEL、γδT IEL の割合を変えずに増殖することが分かった。この結果は、立体構築を維持した三次元的なオルガノイドが *in vitro* において IEL に十分なニッチを提供している可能性を示唆するものと考えられ、これらを今後明らかにすることが重要であると思われた。また、αβT IEL と γδT IEL が一部異なる細胞内分子機構を介した移動の仕組み有することも、今後詳細に解析することは意義があるものと考えた。

＜結論＞

腸上皮内リンパ球と腸管上皮細胞からなる新規三次元共培養系を構築した。本培養系は、IEL がオルガノイド内を活発に動き回り動態解析にも有用であった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5047　号	野﨑　賢吾
論文審査担当者	主　査　樗木　俊聡 副　査　烏山　一、中村　正孝	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、小腸上皮オルガノイドと小腸上皮間リンパ球の共培養系モデルを構築し、腸管上皮間リンパ球の増殖効率や動態を解析した研究である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

腸上皮間リンパ球（以下、IEL）はTCRαβ型とTCRγδ型に大別され、生体防御や腸上皮バリア機能の維持に寄与していることが示唆されているが、*in vitro*での培養が困難なことから、詳細な解析が行われていない。このような背景の下、申請者は、近年確立された腸上皮オルガノイド培養技術を用いてIELとの共培養系を確立し、さらにIELの動態解析を行っており、その着想は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．腸上皮オルガノイドと腸上皮間リンパ球の共培養系にIL-2, IL-7, IL-15を添加することでIELの効率的増加・維持を可能にした。

２．確立された共培養系を用いてIELの動態解析を行った結果、平均速度5.07±0.27, 平均最大速度9.67±0.60□m/minであることが判明した。

2の結果は、既報*in vivo*での測定結果と近似しており、この共培養系が腸上皮とIECの相互作用を解析するツールとして有用なことを示唆する研究成果であるといえる。

３）研究方法・倫理観

さまざまな培養条件を検討し、最終的に２日間培養した腸上皮を単離直後のIELと混合してマトリゲルに封入・培養することで最適化した。また、ヒストンH2B-EGFPマウスからIELを単離して共培養に用いることでIELの可視化を可能にした。さらに全視野蛍光顕微鏡及び解析ソフトで動態の定量分析を行った。

４）考察・今後の発展性

申請者が確立した腸上皮とIECの共培養系は、IELのニッチ環境の分子基盤、腸上皮とIEC

の相互作用を明らかにするための有用なツールになると思われ、腸粘膜系の恒常性維持機構、さらには炎症性腸疾患や大腸がんを含む病態に関する理解と治療法の開発が進むことが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	谷口　未樹
論文審査担当者	主査　山岡　昇司 副査　田邉　稔　　田中　雄二郎
論　文　題　目	Evaluation of interferon resistance in newly established genotype 1b hepatitis C virus cell culture system

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

C 型肝炎ウイルス（HCV）genotype 1b (GT1b)感染症は、インターフェロン(IFN; interferon)治療抵抗性が知られ、コアアミノ酸 70/91 変異は、さらに IFN 治療抵抗性を示す事が臨床で知られている。新しく開発された HCV GT1b の細胞培養系（HCV cell culture system: HCV cc）TPF1-M170T を用い、コアアミノ酸 70/91 変異株を作製した。初めに遺伝子導入効率を免疫染色で確認し、次にウイルス蛋白質の継時的定量を行い、ウイルスの複製・蛋白質への翻訳を確認した。最後に、TPF1-M170T のコアアミノ酸 70/91 変異株と HCV GT2a の細胞培養系 JFH1 を用い、IFN 感受性をウイルス蛋白質の定量で調べたところ、コアアミノ酸 70/91 変異株で有意な治療抵抗性を認めなかったが、GT1b の系は JFH1 より IFN 治療抵抗性である事が分かり臨床での報告と一致した。この点につき、これまでの私達の研究成果を踏まえ考察した。

〈諸言〉

これまで HCV GT1 治療は Peg-IFNα+リバビリン 72 週間で、sustained virological response (SVR)率は約 50%だった。近年、直接作用型抗ウイルス薬（direct-acting antiviral agents：DAAs）の時代となり、2014 年には IFN フリーの経口内服薬 2 剤による治療が開始され、SVR 率は 80-90%と高い治療成績を収めた。これらの報告から DAAs のみによる治療で、高い治療効果が期待される一方で、高額な薬価、新たな DAAs 耐性ウイルスの出現、SVR 後の肝癌誘発性といった新たな問題も考慮しなくてはならない。したがって IFN 治療は DAAs 時代においても、費用対効果、薬剤相互作用が少ない点、耐性ウイルス出現率の低さ、そして癌抑制効果などの観点から未だ有用性が高いと考えられる。

これまで、in vitro 実験に用いるに適切な GT1b HCV cc は樹立されていなかった。そこで私達はこれまで、HCV GT2a HCV cc；JFH1 を用い、コアアミノ酸 70/91 変異株を作製し、ウイルスの感染や複製の分子機構を検討してきた。今回は新たに開発された GT1b HCV cc；TPF1-M170T を用い、コアアミノ酸 70/91 変異株を作製し、より臨床に即した系で IFN 治療抵抗性を評価した。

〈方法〉

供与された GT1b HCV cc ; TPF1-M170T を用い、コアアミノ酸 70/91 変異株を作製した。IFN 治療抵抗性である変異株、R70Q、L91M、R70QL91M、及び野生株 Core WT を、供与された Huh7-ALS32.50 細胞にエレクトロポレーションで遺伝子導入した。最初に遺伝子導入後 3 日目で固定、コア蛋白質を認識する抗体を用いて免疫染色し、コア陽性細胞数を目測し、ウイルス導入効率を測定した。次にこれらの細胞内コア蛋白質を継時的に定量するため、感染細胞の溶解液を作製し CLIA 法を用いてコア蛋白質を定量、株間の差を比較した。更にこれらの結果を、NS5A の抗体を用いたウエスタンブロットで再確認した。最後に先のウイルス蛋白質の定量方法を用いて、IFN 感受性を調査した。TPF1-M170T のコアアミノ酸 70/91 変異株と HCV GT2a の細胞培養系 JFH1 を用い、遺伝子導入後 4 日目に IFN-alpha 2a の各種濃度の培養液の中で 48 時間培養、細胞溶解液のコア蛋白質を定量し、effective concentration 50% (EC50)を算出、それぞれの IFN 感受性を統計学的に比較した。

〈結果〉

遺伝子導入効率は、TPF1-M170T のコアアミノ酸 70/91 変異株のコア陽性細胞率は概ね 50-60%であり、同時に行った JFH1 のコア陽性細胞率が 70%であり、JFH1 と比較しても導入効率は良好と考えた。次にウイルス量の継時的変化を知るために細胞内コア蛋白質を定量した。ネガティブコントロールとして TPF1-ΔGDD（NS5B ポリメラーゼのアクティブサイトの GDD モチーフを欠損させ、ウイルス複製出来なくさせた株）を用いた。コアアミノ酸 70/91 変異株すべてで、day1-5 にかけてコア蛋白質量が増加したが、TPF1-ΔGDD では徐々に低下した。TPF1-M170T のコアアミノ酸 70/91 変異株の間で一番高いコア蛋白質値を示したのは L91M だった。さらに確認としてコア以外のウイルス蛋白質である NS5A の抗体を用い、ウエスタンブロットを行ったが、コア蛋白質と同様の結果を得た。最後に TPF1-M170T のコアアミノ酸 70/91 変異株と HCV GT2a の JFH1 を用い、IFN 感受性をウイルス蛋白質の定量で調べたところ、JFH1 が最も IFN-alpha-2b に対し最も感受性がよく、EC50 は 1.41±1.29 IU/ml だった。Core WT, R70Q, R70QL91M はそれぞれ 5.10 ± 1.27 IU/ml, 3.23 ± 0.37 IU/ml, and 3.81 ± 1.05 IU/ml. L91M で、L91M では EC50 17.1 ± 6.86 IU/ml となった。GT1b の Core WT と JFH1 の比較では有意に GT1b の方が IFN 抵抗性であると評価でき、他の株でも GT1b の方が IFN 抵抗性の傾向を示し、臨床像と一致する結果が得られた。

〈考察〉

私達は新規の HCV cc を用いてコアアミノ酸 70/91 変異株を作製し、HCV GT1b の IFN 感受性につき検討した。初めにこの HCV cc における遺伝子導入効率を確認した。次にウイルス複製能を評価する目的で、RT-PCR を用いて HCV-RNA を定量したが、ネガティブコントロールの TPF1-ΔGDD と比較して、どのクローンも RNA 量が高いものの統計学的な有意性は認められなかった。理由のひとつとして、このクローン自体の複製能が低い可能性が挙げられる。増殖効率が高いことが知られる HCV cc である JFH1 においても、RT-PCR を用いた HCV-RNA の比較では、そのネガティブコントロールと比較して培養 10 日までは明らかな有意差は見られていない。

もう一つの可能性は、遺伝子導入に使用したウイルス RNA 量が、複製するウイルス RNA 量より多かったことが挙げられる。この問題を解消するために、私達は RNA 量に影響を受けない HCV コア蛋白質量を測定し、全ての作製クローンで、TPF1-ΔGDD よりも高レベルの細胞内 HCV コア蛋白質を測定する事ができた。さらに HCV の他の蛋白質である NS5A の抗体を用いたウエスタンブロットでも、同様の結果が得られた。これらの結果から、作製した RNA は効率よく遺伝子導入され、複製、翻訳されることが明らかとなった。これらを確認した後、この新たな GT1b HCV cc が IFN 抵抗性の評価に適するか検討する目的で、IFN 添加実験を行った。私たちの知る限り、GT 1b と 2a の HCV cc を用いた IFN 感受性の比較実験としては、最初の報告になる。

これまでの私達の結果を既報と比較すると、コアアミノ酸変異株の複製能が異なっていた。Funaoka らの報告では、野生株に比べ R70Q と L91M は複製能が高いとされ、Tasaka-Fujita らの報告では、野生株に比べ R70Q は複製能が低く、L91M は複製能が高いとされた。前者の報告は GT 2a を使用し、後者は GT 1b/1a キメラウイルスを用いている。どちらも NS 蛋白質部分が GT 2a 由来という点が共通しているが、NS 蛋白質はウイルス複製に不可欠な replication complex を構成しており、今回の我々の結果との乖離の一因と考えられる。

今回の報告では、GT 1b のコアアミノ酸 70/91 変異株における顕著な IFN 抵抗性は認められず、Funaoka らのレポート結果と矛盾した。一因として JFH1 HCV cc との複製能の違いが挙げられる。また他の可能性として、細胞外での要素が挙げられる。Tasaka-Fujita らは、今回のコアアミノ酸 70/91 変異株と同様、1b/1a キメラウイルスの実験でコアアミノ酸 70/91 変異株で IFN 反応性に差がないことを報告した。そして同時に HCV 感染細胞の MHC Class I の細胞表面における発現に差があることを見つけ、このことが臨床における IFN 抵抗性の理由になっているのかもしれないと考察している。細胞内 IFN における HCV 排除システムは JAK/STAT 系の活性化による自然免疫による事が知られているが、MHC class I は cytotoxic T cell に認識されることで感染細胞を排除する機構であり、この排除機構こそが臨床で見られる IFN 抵抗性に寄与しているのではないかとしている。また他の可能性として、この実験に用いた細胞の特徴が挙げられる。Huh7-AL32.50 細胞の IL28B SNPs は、全て治療抵抗性についてヘテロタイプのため、IFN 抵抗性の環境下でコアアミノ酸 70/91 変異株の IFN 反応性の差を見るのが難しかったのかもしれない。もし私達が IFN 感受性の高い IL28B がメジャーアリルの培養細胞を使用して実験したら、外部より与えられた IFN による自然免疫反応が順調にいき、IFN 感受性のクローンは排除され、私達は違った実験結果を得ていたかもしれない。臨床研究では、コアアミノ酸変異株と野生株にみられる IFN 抵抗性の差は、患者側の IL28B の SNPs（マイナーアリルで IFN 抵抗性）で観察されている。今回の報告に関しては、上記のように、多角的な更なる検討が必要である。

〈結論〉

私達は HCV 細胞培養系を用いてはじめて、GT 1b は GT 2a よりも IFN 治療抵抗性であることを示した。この差は、将来 IFN 治療抵抗性の解明の鍵となり、HCV 薬物療法の更なる発展につながる可能性を秘めている。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5048　号	谷口　未樹
論文審査担当者	主　査　山岡　昇司 副　査　田邉　稔　　田中　雄二郎	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、C 型肝炎ウイルス(HCV) Ib 株の培養細胞感染系の樹立とそれを用いたインターフェロン(IFN)感受性評価についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究の先駆性・独創性について、我が国で主流であり難治性とされる HCV genotype 1b 株を細胞培養系で増殖させることに成功したこと、同実験系で genotype 間での IFN 感受性の違いを確認したこと、などの点で評価できる。

２）社会的意義

我が国の HCV 感染者は２００万人以上とされ、直接作用性抗ウイルス薬が開発された現在も肝硬変、肝細胞癌への進展が懸念されている。薬剤耐性や治療費の観点から genotype 1b 株に対する IFN 治療について更なる研究の進展を目指した本研究が、genotype 間での IFN 感受性の違いを細胞培養系で再現し、IFN 感受性の評価系を確立した意義は大きいと言える。

３）研究方法・倫理観

C 型肝炎ウイルス genotype 1b 株 RNA をコードする plasmid pTPF1-M170T から作製した変異導入ウイルス RNA を培養細胞 Huh-7-ALS32.50 にトランスフェクションして、ウイルス複製をウイルスコアタンパク質の発現で、IFN 感受性をウイルス RNA 量およびウイルスコアタンパク質発現量で評価した。

４）考察・今後の発展性

培養細胞系において HCV genotype IIa と Ib 間の IFN に対する感受性の違いが臨床における差異を反映したものであったことには意義がある。しかし、IFN 抵抗性を誘導するとされるコアタンパク質変異を有する Ib 株の IFN への感受性結果が臨床上の感受性とは一致しなかった原因については、使用した HCV Ib 株自体の特徴、ウイルスに導入した適応変異と培養系等について再検討する必要があろう。今後、genotype Ib ウイルスの薬剤感受性試験だけでなく、コア領域を始めとする遺伝子変異のウイルス学的な意義の解明に資することが期待される。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文はこれを以て博士（医学）の学位を申請するに値すると認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	仁賀　建夫
論文審査担当者	主査　藍　真澄 副査　川渕　孝一、伏見　清秀
論　文　題　目	Relationship between regional population and healthcare delivery in Japan

（論文内容の要旨）

１.要旨

日本では、1985 年に全国的に医療圏が設定され医療供給の格差是正が図られてきたが、人口移動、高齢化などが進み、地域の医療供給のあり方が課題となっている。

そこで、本研究では、医療圏ごとの人口、医師数、病床数のデータを使って、地域の医療供給の状況を分析した。

その結果、医療圏毎の医療供給の格差は、未だに大きいことが明らかになった。また、人口変化率と医師数変化率は強い正の相関関係、人口変化率と病床数変化率は弱い正の相関関係があり、人口の変化と医療供給の変化の相関関係が認められた。そこで、人口変化率、人口当たり医師数、人口当たり病床数の 3 変数により主成分分析を行ったところ、合計で 90。1%の情報を持つ 2 つの主成分が算出された。医療圏ごとに第 1 主成分と第 2 主成分を得点化することにより医療圏の分布状況を分析すると、第 1 主成分は「病床規制の影響度」（寄与率 48。1%）、第 2 主成分は「医師確保力」（寄与率は 42。0%）であると考えられた。

医療供給の格差を解消するためには、主成分得点を考慮し、病床規制の撤廃や緩和とともに公的資金による医師配備が鍵になると考えられる。

２.背景と目的

日本では 1950 年以降、人口増加と経済成長が進む中で、全国に医療を供給するために医療施設の設置と医療者の育成を行ってきた。その結果、1980 年代には病床数は全国的には概ね充分な量が確保されたが、地域的な偏在のため、1985 年から都道府県が医療圏を設定、医療圏毎に医療計画を作り、医療圏の病床数を基準病床数に近づける制度が実施された。1990 年代に入ると人口の増加率は低減する中で都市部への人口移動は止まらず、過疎化の進展する地方では公立病院の経営悪化や医師数の減少が進み、地域の医療体制の再整備が求められた。他方、人口増加の進む地域では、医師や医療施設が不足するなど、医療供給体制の改善が求められた。また、2014 年には「地域における医療及び介護の総合的な確保の促進に関する法律」が改正され、地域医療構想が医療計画の一部として位置づけられた。そこで、今後、地域の医療供給の適正化を図るため、地域の人口と医療供給の関係を明らかにする。

３．方法

（１）医療供給の現状分析

医療供給の指標として、人口当たり医師数と人口当たり病床数を取り上げ、医療圏毎の数値を計算した。人口当たり医師数については 2010 年のデータを用い、人口当たり病床数については 2011 年の病床数と 2010 年の人口より算出した。医師数は、医師・歯科医師・薬剤師調査から医療施設で勤務している医師数、病床数は、医療施設調査から活動している病院及び一般診療所の一般病床数と療養病床数の合計値、人口は、国勢調査の市町村別人口を用いた。医療圏については、対象年の市町村別データを 2010 年の 349 医療圏と同じエリアとなるように補正を行った。統計計算は、IBM の SPSS Statistics23 を用いた。

（２）主成分分析

人口変化率と医療供給の関係を明らかにするために、医療圏ごとに、2000 年から 2010 年の人口変化率、2010 年の人口当たり医師数、2011 年の病床数を 2010 年の人口で除した値を変数として、相関係数行列を用いて主成分分析を行った。

４.結果

（１）医療供給の現状分析

2010 年の人口当たりの医師数の全国平均は、219。0 人であり、医療圏の分布は、全国平均値の 0。36 倍から 5。39 倍と広範な分布あった。2011 年の人口当たり病床数の全国平均は、1061。0 床であり、医療圏の分布は、全国平均値の 0。38 倍から 2。65 倍と広範な分布であった。

また、人口の変化と医師数の変化の関係については有意で高い正の相関関係（r=0。772, p<0。001)、人口の変化と病床数の変化の関係については有意で低い正の相関関係(r=0。308, p<0。001)が認められた。年齢別の分析では、双方とも、総人口の変化率が、年少人口、生産年齢人口、高齢人口に比べ、最も高い相関を示した。

（２）主成分分析

348 の医療圏を対象に、人口変化率、人口当たり医師数、人口当たり病床数で主成分分析をおこなったところ、寄与率 48。1%の第１主成分と寄与率 42。0%の第２主成分が確認され、2 つの主成分で 90。1%の寄与率となった。第１、第２主成分の主成分負荷量は、それぞれ（人口変化率, 人口当たり医師数, 人口当たり病床数）=(-0。662, 0。368, 0。932)、(0。681, 0。882, 0。135)であった。

i 医療圏の標準化したデータを（z_i1, z_i2, z_i3)とすると、第１主成分得点と第２主成分得点は次のとおり。

第１主成分得点

f_i1=-0。662z_i1+0。368z_i2+0。932z_i3

第２主成分得点

f_i2=0。681z_i1+0。882z_i3+0。135z_i3

第１主成分得点の高い医療圏は、九州地方、北海道、高知県、山口県の医療圏であり、人口の減少率が高いが人口当たりの病床数が多い。また、人口変化率が大きく減少しているが、病床数変化率が増加しているところがある。第１主成分得点の低い医療圏は、東京、名古屋、京都の周

辺にあり、人口の増加率が高いが人口当たりの医師数、病床数ともに少ない。第２主成分得点の高い医療圏は、人口当たりの医師数が多く、医師の増加率も高い。また、これら 10 医療圏はすべて医学部および附属病院を有する。医学部のある医療圏を除き、第 2 主成分得点の高い医療圏の特徴として、医師数の増加率の高い医療圏が多い。第２主成分得点の低い医療圏は、過疎地であり人口が少ないうえに、人口の減少率、医師数の減少率が大きい。

５.考察

（１）医療供給の分析

1985 年から医療圏の設定と病床管理が進められてきたが、医療圏ごとの医療供給の状況は、人口当たり医師数、人口当たり病床数の両方において、広範な分布であり医療供給の地域的な偏在は十分に解消されていない。さらに、人口の変化率と医師数の変化率に高い相関関係があるのは、人口の増減に伴う医療需要の変化に応じて医師が移動している可能性と、医師の移動に併せて人が移動している可能性があることを示している。また、人口の変化率と病床数の変化率の相関関係が低いのは、医師に比べ、病床は十分な供給があることから、実際の医療需要に応じた変化が少ないためと考えられる。

（２）主成分分析

二つの主成分で人口変化率、人口当たり医師数、人口当たり病床数の 3 変数の 90%以上の情報量を有していることから、これらの主成分を通じて、それぞれの変数の関係を検討する。まず、第１主成分では、人口の変化率が低く、人口当たりの医師数が多く、人口当たりの病床数が多い医療圏が高くなる。一方、第２主成分では、人口の変化率が高く、人口当たりの医師数が多く、人口当たりの病床数が多い医療圏が高くなる。

次に、それぞれの主成分得点の高い或いは低い医療圏に注目し、これらの主成分の示す内容を明らかにする。

第１主成分得点の高い医療圏は、人口当たりの病床数が多いうえに、人口の減少により医療需要も減少していると想定されるにもかかわらず、これまでどおり病床が維持されている医療圏である。病床規制により保有する病床に権利が発生し、病床に実態以上の付加価値が生じたために病床数の調整が進まなくなった。人口当たりの病床数が多すぎる地域は規制の影響の大きい地域であると考えられる。一方、第１主成分得点の低い医療圏は、人口流入が大きいが、人口増加に見合った医療供給ができていない。これらの医療圏を有する自治体の首長が、厚生労働大臣に対して、地域の医療供給がひっ迫していることから病床規制の弾力化の要請を行っている。以上を踏まえると、第１主成分は、医療圏の医療供給における「病床規制の影響度」であると考えられる。第１主成分得点の高い医療圏では、規制が医療供給体制の進歩を抑制していることの弊害が極めて大きいと考えられるため、既得権益を消滅させる規制撤廃などの対策が必要である。第１主成分得点の低い医療圏を持つ都府県は、必要病床数を確保するために医療機関の競争を促進する方向での規制の見直しが重要である。

第２主成分得点の高い医療圏は、人口当たりの医師数が多いばかりでなく医師数の増加率も高い。上位 14 位までが医学部および附属病院を有しており、需要に応じた医師の確保が容易である。第２主成分得点が高く医学部のない医療圏においても、医師数の増加率が高いところが多い。

これらの医療圏は人口当たりの医師数も少なくないので、医療需要の変化に対応するだけの医師を確保する能力を有するものと考えられる。一方、第２主成分得点の低い医療圏は、人口の減少が著しい過疎地であり、同時に医師数も減少しており、結果として人口 10 万人当たり医師数も 100 名前後と極めて少ない。医療圏の人口変化率と医師数変化率には高い相関関係があったことを踏まえると、これらの医療圏では、人口の減少が医師数の減少を招き、医師数の減少が人口の減少を招くという悪循環を断ち切ることができていない可能性が高い。以上を踏まえると第２主成分は「医師確保力」を表すものと考えられる。第２主成分得点の高い医療圏は、医学部や附属病院の力などにより、今後とも十分な医療供給が期待できる。第２主成分得点の低い医療圏は、過疎地であるため人口の流出が進むことが推計されており、人口の減少とともに医師、医療施設が一層減少することが想定される。このような医療圏では、独自で医師を確保する力が期待できないことから、医療圏の地域設定を見直すか、或いは、公的資金により医師を配置するなどの措置が不可欠である。

以上の考察を整理すると、二つの主成分得点の分布を考慮した対策を進めることにより、各地において適正規模の医療供給が実現できると考えられる。具体的には、第１主成分得点の高い医療圏は、既得権益を消滅させるための病床規制の撤廃、低い医療圏は、医療供給を増加させるための病床規制の緩和、第２主成分得点の高い医療圏は、産業振興のための研究開発投資などの促進、低い医療圏は、公的資金により医師を配置するなどの医療供給を維持する対策が必要である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5049　号	仁賀　建夫
論文審査担当者	主　査　藍　真澄 副　査　川渕　孝一、　伏見　清秀	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、地域の医療供給の状況を分析し、今後の医療供給の適正化に資する目的で地域人口の変化と医療供給体制の関係を検討した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

今後予想される高齢化と地方の人口減少に対して、地域医療確保は重要な政策課題となっており、地域人口と医療供給の関係を明らかにした点は評価される。本研究では、特に人口の変化に着目し、人口変化率、人口あたり医師数、人口あたり病床数の変化について、既存統計等から 2000 年から 2011 年のデータを取得し、主成分分析も含めた解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果として、各医療圏における人口変化率と医師数変化率は強い正相関、人口変化率と病床数変化率は弱い正相関があることが示された。また主成分分析により、負の人口変化率と正の人口あたり病床数を特徴とする第 1 主成分と正の人口変化率と正の人口あたり医師数を特徴とする第 2 主成分抽出された。これらの結果から、第 1 主成分の高低が人口減少による相対的病床過剰地域と人口急増に病床整備が対応できていない地域を、第 2 主成分の高低が医師確保能力の地域差を示した。このように申請者は医療提供に対する人口変化の影響を明確に示した。これは医療政策上極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、公開されている既存統計（医療施設調査、国勢調査、医師・歯科医師・薬剤師調査）が用いられ、その相関解析、主成分分析は周到な準備のもとで行われたことが窺われる。研究開始前には、本学医学部倫理審査委員会において実施の承認を得ており、研究倫理上も適切な手法がとられている。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果に基づき、病床規制の緩和や撤廃、医師配置への公的資金の利用

を含めた政策誘導が必要であると考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大山　潤
論文審査担当者	主査　大野　京子 副査　森尾　友宏・寺田純雄
論　文　題　目	Size of the intracranial optic nerve and optic tract in neonates at term-equivalent age at magnetic resonance imaging

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Term-equivalent age (postmenstrual age 37 週 0 日－41 週 6 日)における新生児の視神経のサイズの正常値はこれまで報告がない。本研究の目的は、term-equivalent age における頭蓋内視神経および視索径の reference value を求めることである。62 例の連続した頭蓋内に明らかな異常所見を認めない term-equivalent age の新生児頭部 MRI を評価し、頭蓋内視神経および視索の幅、高さを計測した。また、形状を楕円とみなし、断面積を計算した。頭蓋内視神経の幅、高さ、断面積の平均±標準偏差はそれぞれ 2.7±0.2 mm、1.7±0.2 mm、3.5±0.5 mm^2 であった。視索の幅、高さ、断面積の平均±標準偏差はそれぞれ 1.5±0.1mm、1.6±0.1mm、2.0±0.2mm^2 であった。単変量解析、多変量解析にて、postmenstrual age は頭蓋内視神経の幅および断面積に対して中等度の正の相関を認めた。頭蓋内視神経幅、断面積の 95%予測区間の下限はそれぞれ 0.07×(postmenstrual age in weeks) – 0.46 mm、0.17×(postmenstrual age in weeks) – 4.0 mm^2 と算出された。

＜緒言＞

視神経低形成は、非進行性の先天的異常で、視覚異常の原因となりうる。加えて、15-80%の頻度で下垂体機能低下を合併するとされる。視神経低形成は単独の異常としても認められるが、透明中隔欠損、下垂体異常、脳の神経細胞移動障害、胎内および新生児期の脳障害など様々な病態と合併して認められる。視神経低形成は視神経線維の減少が原因と考えられている。視神経低形成の診断の gold-standard は眼底鏡で視神経乳頭が小さいことを確認することであるが、MRI での頭蓋内視神経径の評価も過去の報告から有用と考えられている。画像診断学上、視神経低形成の画像所見は視神経径の減少であると報告されている。

一般的に新生児において何らかの神経学的異常が疑われた場合、頭部 MRI が施行されることが多い。多くの場合においてこの頭部 MRI は term-equivalent age 施行され、また周産期異常の評価目的では term-equivalent age に施行することが推奨されている。視神経低形成は小児の視機能低下の主な原因の 1 つであり、画像診断において早期に指摘ができれば患児のマネジメントにおいて有用な情報となる。新生児における頭蓋内視神経の正常径は過去の報告がなく、小児期

における視神経の正常径、発達に関する報告は限られている。

また、過去の報告において早産や低出生体重などの未熟性が視神経乳頭径に影響したとの報告が散見されるが、頭蓋内視神経径とこれらの因子の関連についての報告は過去に認められない。

本研究の主な目的は、新生児の頭蓋内視神経径、視索径の reference value を求め、また頭蓋内視神経径、視索径に影響を与える因子を明らかにすることである。これにより、新生児神経画像診断における視神経低形成の診断をより客観的に可能とすることを目的としている。

＜方法＞

本研究は土浦協同病院放射線科により施行され、施行施設の倫理委員会の承認を受けている。

【対象】

2013 年 1 月から 2014 年 9 月までの期間に同一の 1.5-Tesla MRI 装置で施行された 174 例の連続した 0 歳児の頭部画像を読影した。今回の研究に含める対象は、1) 検査が term-equivalent age に施行されている、2) MRI 上は脳に明らかな異常がない、3) 適切なシークエンスで撮像されている、4) 頭蓋内視神経、視索径の評価が可能な画質である、の 4 項目を満たす study とした。174 例中、90 例が term-equivalent age に施行され、66 例が正常所見と判断された。このうち 62 例が必要なシークエンスで撮像されかつ充分な画質であったため、評価対象とした。

62 例中、59 例は眼科医による眼底鏡検査を 1 度は施行され、38 例が正常所見と評価された。視神経低形成と診断された症例は認めなかった。対象となった症例の詳細は Table 1 に記載した。

【MRI シークエンスおよび計測、統計処理】

T2-weighted turbo spin echo image(TR: 5,400 ms, TE: 91 ms, NEX: 1, Echo Train Length: 17－29, slice thickness: 4 mm, intersection cap: 0 mm, Field of View: 210 mm, matrix: 256×256)のパラメータで撮像した画像を用いて計測を行った。頭蓋内視神経および視索の幅は axial 像を、高さは sagittal 像を用いて計測した。楕円の面積の公式を用いて断面積を計算した。計測は筆頭著者により 2 回行われ、左右の平均値を最終的な値として用いた。計測方法は Fig. 1 に例示している。

統計解析には R を用いた。

＜結果＞

計測値は Table 2 に示す結果となった。それぞれの計測値と性別、在胎週数、postmenstrual age、出生後週数、出生体重、検査時体重、新生児仮死の有無、眼底鏡異常所見有無との関連を調べたところ、Table 3 に示すように postmenstrual age のみが正の相関を示した。重回帰分析でも同様の結果であった。Fig.2 と Fig.3 に Linear regression model による解析結果およびその残差分析を示した。

＜考察＞

本研究では、頭蓋内に明らかな異常のない term-equivalent age の新生児の頭蓋内視神経径、視索径を提示した。これらのサイズは postmenstrual age と正の相関を示し、性別、在胎週数、出生後週数、出生体重、検査時体重、新生児仮死の有無、眼底鏡異常所見有無とは有意な相関を

認めなかった。

視神経低形成の診断の gold-standard は眼底鏡による評価であるが、新生児に眼底鏡を施行すること、およびその解釈は熟練を要する。眼底鏡以外の視神経評価方法として、超音波検査、CT、MRI が挙げられる。超音波検査は施行者による計測値の振れ幅が大きいことが過去の文献でも報告されているように評価が難しく、また頭蓋内の評価が困難である。CT は軟部組織コントラストが低く、また電離放射線被爆があるため小児のスクリーニング目的には適さない。MRI は検査時間が長く鎮静を必要とするが、軟部組織コントラスト、空間分解能が高い、電離放射線被爆がないなどの複数の利点がある。このため、特に小児の神経学的スクリーニングにおける標準的検査方法と考えられている。

視神経低形成と MRI における視神経径の関連を報告した過去の文献は散見されるが、quantitative な報告は少ない。Birkebaek らは 1 歳以上の小児において頭蓋内視神経断面積が<2.9 mm^2 の場合は視神経低形成が示唆されると報告し、Lenhart らは正常視頭蓋内神経幅の 95%予測区間の下限は 2.24+0.052×(age in years) mm で表されると報告した。これらは主に 1 歳以上の小児を対象とした研究であり、0 歳時における視神経径の正常値やその発達経過についての quantitative な報告は過去に認められず、これまでは不明であった。

我々のデータでは、postmenstrual age のみが頭蓋内視神経径と正の相関を認め、term-equivalent age における頭蓋内視神経幅および断面積の増大速度はそれぞれ 0.07 mm/week、0.17 mm^2/week と過去の報告で記載された値よりも大きいことが示唆された。人間の視神経の発達の大部分は 2 歳までに完了することが知られており、この期間のサイズの変化については将来の研究により明らかにされるべきと考える。

加えて、我々のデータでは性別、在胎週数、出生後週数、出生体重、検査時体重、新生児仮死の有無、眼底鏡異常所見有無は頭蓋内視神経のサイズと有意な相関を認めなかった。過去の眼底鏡を用いた研究では、児の未熟性が視神経乳頭径と有意に関連したという報告、関連しなかったという報告がいずれも認められる。今回我々の対象とした群の在胎週数は平均 32 週であり、より未熟性の高い児や正期産の児が多く含まれていないという性質がある。未熟性と頭蓋内視神経径との関連を明らかにするためには、より多くの未熟性の高い対象を健常児と比較する必要があると考える。

視神経低形成を小児期早期に診断することは重要と考えられる。視神経低形成は内分泌異常を伴う可能性が高く、すなわち発達遅滞のリスクと考えられる。早期に視神経低形成の可能性が指摘されることで、医療介入が必要な内分泌異常を発見することにつながる可能性があり、児の管理には有用と考えられる。また、現時点では視神経低形成およびそれにともなう視機能低下に対する根本的治療法はないが、早期からその可能性があることを指摘することは児の成長過程において有益な情報たると考える。

本研究には複数の制限がある。最も大きな制限は単施設の後方視的研究であるという事であり、紹介バイアスがありうる。さらに、本研究で評価された新生児は全員が未熟性など何らかの臨床的問題のために MRI を施行されており、健常者ではない。このため、本研究で提示された reference value は正常値とは言い切れない。また、全員が頭蓋内病変検索を目的として MRI を施行されているため、ルーチンの撮像プロトコルでの撮像となっている。即ち、スライス厚 4mm

は新生児頭部画像診断においてよく使用される条件であるが、頭蓋内視神経の評価には厚すぎる可能性があり、部分容積効果の影響を除外できない。もし我々が前方視的に今回の研究を施行できたとすれば、three-dimensional steady-state free precession などの撮像法を用いることでより詳細なデータを得ることができた可能性がある。この他の制限としては、比較的少数のサンプル数、一人での計測、剖検材料との対比がなされていない事などが挙げられる。

＜結論＞

本研究は明らかな頭蓋内病変がない term-equivalent age の新生児の頭蓋内視神経径、視索径を提示した。Postmenstrual age がこれらのサイズと正の相関を示し、性別、在胎週数、出生後週数、出生体重、検査時体重、新生児仮死の有無、眼底鏡異常所見有無は有意な相関を示さなかった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5050　号	大山　潤
論文審査担当者	主　査　大野　京子 副　査　森尾　友宏　　寺田　純雄	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、新生児の頭蓋内視神経径、視索径を MRI 画像から計測し、また頭蓋内視神経径、視索径に影響を与える因子を解析することにより、視神経低形成の客観的な診断を可能とすることを目的とした論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

視神経低形成は、非進行性の先天的異常で、単独の異常としても認められるが、胎内および新生児期の脳障害など様々な病態と合併して認められる。視神経低形成の診断の gold-standard は眼底検査であるが、客観的評価も困難である。MRI での頭蓋内視神経径の減少も、診断に有用であるが、小児期での検討に限られており、新生児における検討はなされていない。本研究は term-equivalent age における視神経サイズの正常値を明らかにし､それに関する因子を解析した点が独創的であり、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 62 例の連続した頭蓋内に明らかな異常所見を認めない term-equivalent age の新生児頭部 MRI を解析した結果、頭蓋内視神経の幅、高さ、断面積の平均±標準偏差はそれぞれ 2.7±0.2 mm、1.7±0.2 mm、3.5±0.5 mm^2 であった。視索の幅、高さ、断面積の平均±標準偏差はそれぞれ 1.5±0.1mm、1.6±0.1mm、2.0±0.2mm^2 であった。
2. これらのサイズは、postmenstrual age とのみ正の相関を示し、性別、在胎週数、出生後週数、出生体重、検査時体重、新生児仮死の有無、眼底鏡異常所見の有無とは有意な相関を認めなかった。

以上のように申請者は、term-equivalent age の新生児期の視神経径の正常値を明らかにし、視神経径と発達との関連を明らかにしている。本研究で得られた結果は、MRI 画像診断による視神経低形成の早期かつ定量的診断を可能にするものであり、患児のマネジメントにおいて臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、土浦協同病院で 2013 年から 2014 年までの一定期間に頭部 MRI を施行された 0 歳児の画像が用いられ、患者情報にマスクされた同一検者（申請者）が MRI 画像を後ろ向きに読影し、視神経径を計測した。本研究は申請者の十分な放射線診断医としての知識と技術の裏付け

のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示される。また、本研究は同病院の倫理審査委員会の承認のもと施行されており、極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果をもとに、MRI が小児の神経学的スクリーニングにおいて標準的検査方法となると考察している。また、postmenstrual age のみが視神経のサイズと相関がみられた点について、人間の視神経の発達の大部分は 2 歳までに完了していくことを引用し、今回の結果をもとにさらに 2 歳までのサイズの変化を解析していきたいと考察しており発展が期待される。在胎週数などが関連がなかった点については、今回の対象により未熟性の高い児が含まれていなかったことをあげており、今後この点についても検討していく必要があると述べている。以上、研究結果について極めて妥当な考察がきちんとなされており、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	神谷　綾子
論文審査担当者	主査　北川　昌伸 副査　田中　真二、石川　俊平
論　文　題　目	Prognostic value of tropomyosin-related kinases A, B, and C in gastric cancer

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Trk 受容体は腫瘍の成長において重要な役割を果たし、癌治療の重要なターゲットと考えられている。我々は胃癌における TrkA, B, C の発現と臨床病理学的特徴・予後との関連を調べた。2003-2007 年に胃切除術を受けた 221 人の患者から腫瘍検体を得た。TrkA, B, C の発現を免疫染色を使って分析し、臨床病理学的因子・予後との関連を評価した。TrkA, B, C 高発現は組織型と有意に関連していた(p=0.022, p<0.001, p<0.001)。TrkA 高発現はリンパ節転移(p=0.024)、遠隔転移や再発(p<0.001)といった腫瘍の成長に関わる因子と有意に関連していた。遠隔転移や再発は TrkC 高発現群で有意に多かった(p=0.036)。TrkA 高発現は単変量解析で無再発生存期間(RFS)が短いことに有意に関連していた(p=0.001)。TrkA・C 高発現は単変量解析で疾患特異別生存期間(DSS)が短いことに有意に関連していた(p<0.001, p=0.008)。多変量解析では TrkA は RFS(ハザード比 2.294; 95%信頼区間 1.309-4.032; p=0.004)と DSS (ハザード比 2.146; 95%信頼区間 1.195-3.861; p=0.011)の独立した予後因子であった。単変量解析で TrkB の発現は RFS・DSS と関連がなかった。TrkA の発現は腫瘍の成長と予後不良に関連し、胃癌患者において独立した予後不良因子であった。

＜緒言＞

胃癌はアジアの国々で最も多い悪性疾患であり、世界の癌死亡原因の 3 番目である。治癒切除された患者でさえ、再発や遠隔転移で亡くなることがある。非治癒切除や遠隔転移のある患者は化学療法を行っても全生存期間は 10-13 ヶ月である。胃癌が転移する可能性を評価する確実な診断方法が適切な治療方法を選ぶのに重要である。

多くのチロシンキナーゼ受容体が様々な癌で腫瘍の進行や患者の予後に関連していることが示され、治療ターゲットとして臨床で使われているものもあるが、効果は限られており、新たなバイオマーカーや治療ターゲットをみつける必要がある。

NT ファミリーとその受容体が増加している癌腫があるという報告がある。ニューロトロフィンは成長因子のグループで、神経系の成長において神経細胞の生存と分化に関与する。ニューロトロフィンに対する細胞の反応は 2 種類の細胞膜受容体（p75NT 受容体と Trk 受容体）を通じ

て誘発される。Trk 受容体は TrkA, B, C という 3 つの形があり、それぞれ異なるニューロトロフィンに特異的に示される。Trk 受容体とニューロトロフィンの結合は Trk キナーゼドメインを活性化し、様々な下流の Ras シグナル径路のトリガーとなる。主に神経モデルにおいて確立し、神経細胞の生存や神経突起の伸長へと導き、成長・転移、大部分は細胞死へと循環させる。Trk や p75NT 受容体によって支配された細胞内のシグナルが細胞の生存・増殖・分化にも重要とされている。

これまで胃癌における TrkA, B, C の役割は報告がほとんどない。この研究は胃癌における TrkA, B, C の発現を検討し、臨床病理学的特徴や患者の予後との関連を分析することによってこれらの蛋白の発現の臨床的重要性を評価することを目的とした。

＜方法＞

2003 年 3 月～2007 年 12 月に当院胃外科で原発性胃癌に対して手術を行った 221 名からの検体を分析した。全ての患者が 3-6 ヶ月おきの腫瘍マーカーと画像診断で再発の評価が行われた。遠隔転移のある患者や再発のある患者は化学療法を受けた。観察期間中央値は 61 ヶ月であった。

免疫染色はペルオキシダーゼ標識されたポリマーを二次抗体に接合させて行った。染色強度を 4 段階（0：なし、1：弱陽性、2：中等度陽性、3：強陽性）にスコア化した。染色範囲も染色された細胞の割合で 4 段階（0：25%以下、1：26-50%、2：51-75%、3：75%）にスコア化した。陽性は細胞の 10%以上染まっていることを定義とした。総合スコアは強度スコアと染色範囲スコアの和とし、統計学的解析ではスコア 4 以上を高発現、4 未満を低発現とした。

胃癌組織の小切片とそれに相当する隣接した非癌粘膜の一部を用いて RNA 抽出と cDNA の合成を行い、定量的 RT-PCR を行った。

統計学的解析は、Trk の発現と臨床病理学的因子の関連、各蛋白の発現の関連を調べるために χ^2 検定を使った。RFS と DSS における Trk 発現の影響を評価するためにカプランマイヤー曲線を描いた。RFS/DSS 曲線の差はログランク検定で比較した。RFS と DSS の Trk 発現との関連を示すために単変量解析を用いた。RFS/DSS と Trk の発現や他の因子との予後的重要性を示すためにコックスモデルを用いた。p 値 0.05 未満を有意差とした。Trk mRNA レベルの比較にはマンホイットニー検定を用いた。

＜結果＞

免疫染色において、TrkA, B, C の発現は主に癌細胞の細胞質でみられた。正常粘膜と間質組織の一部にも弱い発現がみられた。TrkA, B, C 高発現は他の 2 つの蛋白発現とそれぞれ有意に関連していた。

TrkA, B, C 高発現は組織型と有意に関連していた(分化：未分化; $p=0.022$, $p<0.001$, $p<0.001$)。TrkA 高発現はリンパ節転移(N0：N1-N3; $p=0.024$)、遠隔転移・再発(なし：あり; $p<0.001$)と有意に関連していた。遠隔転移・再発は TrkC 高発現群で低発現群よりも有意に多かった($p=0.036$)。TrkB の発現は単変量解析で RFS/DSS と関連がなかった。TrkA 高発現は単変量解析で RFS が短いことと有意に関連していた($p=0.001$)。TrkA, C 高発現は単変量解析で DSS が短いことと有意に関連していた($p<0.001$, $p=0.008$)。TrkA は以下の独立した臨床予後因子（組織型、深達度、

リンパ節転移）と調整した多変量解析で RFS（ハザード比 2.294; 95%信頼区間 1.309-4.032; p=0.004）・DSS（ハザード比 2.146; 95%信頼区間 1.195-3.861; p=0.011)の独立した予後規定因子であった。

TRK1 ,2 ,3mRNA レベルはそれぞれ TrkA, B, C 蛋白の発現と関連はなかった。

＜考察＞

今回の結果から TrkA, C は胃癌において腫瘍の増大、転移、予後に重要な役割を持つ可能性があることが示された。TrkA は胃癌の独立した予後因子であった。

膵癌において RT-PCR を用いた分析で TrkA の発現は悪性度のマーカーである。進行卵巣癌において免疫染色で TrkA の発現がみられた。口腔扁平上皮癌において免疫染色で TrkC の発現は Stage・リンパ節転移・微小脈管侵襲・予後不良と関連していた。大腸癌において免疫染色で TrkB, C の発現は肝転移・浸潤能に関連していた。しかし驚くことに、TrkA,B, C は形態が似ているにもかかわらず、神経膠腫・髄芽腫では全く異なるふるまいをしており、TrkA, C の発現は予後良好に関連している一方、TrkB は進行癌で発現していた。

調べた限りでは胃癌患者の予後と TrkA, C 発現の影響を示した研究はなく、TrkB は胃癌患者の予後不良に関連していたことを示す報告はあった。Zhang らは胃癌において免疫染色で TrkB 高発現の患者は遠隔転移・高分化・深達度・予後不良に有意に関連すると報告した。田中らは胃癌において免疫染色で腫瘍先進部 TrkB 発現は独立した予後因子と報告した。胃癌における TrkB 発現に関しては、今回の結果は過去の報告と違っていた。Zhang らは免疫染色の抗体と判定法が異なっていたが、TrkB の発現が高分化胃癌で有意に高いという今回の結果は彼らの結果と一致した。田中らは進行癌の TrkB 発現が早期癌よりも高かったと報告したが、この研究ではほとんどが早期癌で StageⅣは数名であったため、結果が異なったと推測される。今回の研究では各 Trk mRNA レベルは免疫染色の Trk 蛋白の発現レベルと異なっていた。これは遺伝子解析には腫瘍の辺縁部から得られた組織を用いたが、免疫染色には腫瘍の浸潤先進部で評価したためかもしれない。

Trk は癌遺伝子と考えられている。ほとんどの報告は浸潤・アノイキスへの耐性、VEGF 産生に関与する Trk-TK/PI3K/Akt 径路の重要性を指摘している。PI3K/Akt や ERK/p38MAPK を含むシグナル径路は TrkA の過剰発現を活性化し、さらなる細胞表現型の悪性化につながり、さらに免疫不全マウスの異種移植された乳癌細胞において TrkA の過剰発現は腫瘍の成長・血管新生・遠隔転移を増強していた。口腔癌において TrkC は基底膜の崩壊の原因となる MMP-2, MMP-9 の分泌を制御していた。ヒト大腸癌細胞の in vitro の分析で TrkB は VEGF-A と VEGF-C の遺伝子発現を促すように働いていた。大腸癌において PI3K-Akt シグナルを活性化する mTOR は TrkC によって制御されている。このように癌における Trk の役割は様々な報告がある。

＜結論＞

TrkA は胃癌患者の腫瘍の進行や臨床的な経過において重要な役割を持ちうる。TrkA は胃癌患者の治療ターゲットとして期待できる可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5051　号	神谷　綾子
論文審査担当者	主　査　北川　昌伸 副　査　田中　真二、石川　俊平	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は胃癌におけるTropomyosin-related kinase（Trk）A、B、C発現の臨床的意義についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

免疫組織化学的染色を用いた蛋白発現の検索により胃癌のTrk A、B、C発現解析と臨床病理学的因子との関連を検討することを目的とした解析を行った。申請者は免疫染色を用いた蛋白発現解析により、Trk A、B、C発現は組織型と有意に関連していること、Trk Aの発現は腫瘍の発育と患者予後の関連し、独立した予後不良因子であることが明らかとなった。これまで胃癌におけるこの分子の発現解析は進んでおらず、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.　Trk A、B、C発現は高分化型の胃癌で高く、組織型と有意に関連していた。

2.　Trk A高発現はリンパ節転移や再発と有意に関連していた。

3.　多変量解析ではTrk Aは疾患特異的生存期間、無再発生存期間の独立した予後因子であることが明らかとなった。

以上のように申請者は、胃癌におけるTrk高発現が独立した予後予測因子であることを明らかにしている。これは臨床的にも極めて意義のある研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では臨床検体に対して免疫組織化学的染色やRT-PCR法を用いた発現解析が行われ、Trk発現の検索がなされた。本手法は十分な分子生物学的技術と臨床病理学的知識との裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について、Trk Aが胃癌患者の治療ターゲットとして期待できる可能性があると考察している。これは本分子の機能に関する先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．審査結果

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

た。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	髙橋　健太郎
論文審査担当者	主査　小川　佳宏 副査　木村　彰方、淺原　弘嗣
論　文　題　目	High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

生活習慣病は心房細動とはじめとした心房性不整脈の重要なリスクファクターだと考えられている。しかし、生活習慣病と不整脈を結ぶメカニズムについてはいまだ解明されていない点も多く、今回我々は高脂肪食を用い肥満マウスモデルを作成し、心房性不整脈との関連および発症メカニズムを解明することを目的として研究を行った。

野生型マウスを高脂肪食（HFD）および通常食（NC）で 2 ヶ月間飼育し、体表心電図、電気生理的検査を行った。ランゲンドルフ灌流心を用いた optical mapping により、心房活動電位や伝導速度を測定した。心房を用いて組織学的評価や qRT-PCR による mRNA/microRNA 定量、Western blotting によるタンパク定量を行った。培養細胞を用いた Luciferase assay により microRNA と mRNA の相互作用を検討した。さらに培養心房筋細胞 HL-1 をパルミチン酸で刺激し、同様の解析を行った。

HFD マウスでは電気生理学的検査により心房頻拍が容易に誘発され、optical mapping で伝導速度が有意に低下していることが示された。HFD マウスの心房においては Cx40 の発現が有意に低下しており、それを制御する miR-27b の発現が亢進していた。Luciferase assay では miR-27b が Cx40 mRNA の 3'UTR に直接結合し、発現を制御していることが示された。パルミチン酸で刺激した HL-1 細胞では、miR-27b の発現が亢進し Cx40 の発現が低下していた。これに対して miR-27b inhibitor を投与すると、Cx40 の発現低下が抑制された。

HFD マウスにおいて、miR-27b の発現亢進が Cx40 の発現低下をきたし、心房伝導速度を低下させることで心房性不整脈の発症と関連していることが示された。

＜緒言＞

心房細動（atrial fibrillation: AF）は臨床において最も頻度の高い不整脈の一つであり、塞栓性脳梗塞や心不全のリスク、死亡率を上昇させることが知られており、生活習慣病が AF の発症と関与しているという報告もある。AF 発症の病態生理については、心房リモデリングの概念がある。心房リモデリングには、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の亢進により、心房の線維化や拡大が生じてリエントリーを形成しやすくする、構造的リモデリングと、イオンチャ

ネルの発現が変化することにより、活動電位（action potential duration: APD）や伝導速度が変化する電気的リモデリングに分けられ、それぞれ AF 発症に寄与することが知られている。
一方、microRNA は心臓の発生や様々な循環器疾患の病態メカニズムに関与していると考えられており、AF についてもイオンチャネルや細胞外マトリックスの発現を調節することで病態と関連しているといった報告がある。

しかし、生活習慣病と AF を結びつけるメカニズムについて詳細に検討した報告は少ない。このため我々は、高脂肪食マウスモデルを用いて生活習慣病と心房性不整脈の関連を microRNA を中心に解明することを研究の目的とした。

＜方法＞

オスの野生型マウス(C57BL/6)に HFD または NC を与え、2 ヶ月間飼育した。In vivo および ex vivo の電気生理学的実験を行った後、心房を摘出して組織学的・分子生物学的評価を行った。細胞は HEK293A 細胞、培養心房筋細胞 HL-1 を用いた。

イソフルレン麻酔下に四肢に電極を装着して体表心電図を測定した。電気生理学的検査（Electrophysiological study: EPS）では、1-French 電極カテーテルを右内頚静脈から挿入して、His束心電図の計測とプログラム刺激による心房性不整脈の誘発を行った。

また、マウスから心臓を摘出してランゲンドルフ灌流心モデルを作成し、電位感受性色素 di-4-ANEPPS を投与して CMOS カメラにより蛍光を観察し、心房の APD および伝導速度の測定を行った。

組織学的評価として Mallory-Azan 染色で線維化の割合を評価した。

microRNA を含む totalRNA を心房および HL-1 細胞から抽出し、逆転写して cDNA を合成した。mRNA は SYBR Green、microRNA は TaqMan probe を用いた定量 RT-PCR によって解析を行った。また、MicroRNA Array Cards システムを用いて約 750 種類の microRNA の網羅的な発現解析を行った。

心房および HL-1 細胞のタンパク定量は Western blotting 法を用いて行った。1 次抗体として、抗 Cx40 抗体 、および抗 GAPDH 抗体を使用し、HRP でラベルした 2 次抗体を作用させた後にバンドを観察した。

microRNA と mRNA 3’UTR の結合予測はデータベースである miRTarBase、および結合予測プログラムである TargetScan を使用して行った。Luciferase ベクターに組み込んだ 3'UTR 配列と、合成 microRNA を HEK293A 細胞に transfection して Luciferase assay を行い、直接の相互作用を解析した。

＜結果＞

体表心電図では P 波幅が NC 群に対し HFD 群で有意に延長しており、in vivo EPS では HFD 群においてプログラム刺激により持続性心房頻拍が容易に誘発された。

Optical mapping により心房の伝導速度を測定すると、HFD 群は NC 群に比べ有意に低下していたが、APD_{90} については両群間に明らかな差は見られなかった。

サイトカイン（IL-1β、IL-6、Tnf-α）の発現は HFD 群で有意に上昇していたが、線維化マーカー（Col1a3、Col3a1、Mmp2、Mmp9）の発現亢進は認めず、Mallory-Azan 染色による線維化の評価でも有意差は認めなかった。

一方で、心房特異的に発現しているギャップジャンクションである Cx40 の発現は mRNA レベル、タンパクレベルでも HFD 群で有意に低下していた。

MicroRNA Array Cards を用いた網羅的な microRNA の発現解析により、HFD 群において 14 個の microRNA の発現が亢進していた。その中で Cx40 の mRNA 3'UTR に結合することが予想された microRNA である miR-27b に着目してさらに検討を行った。

HEK293A 細胞に Cx40 3'UTR における miR-27b の結合予測配列を組み込んだ reporter vector と合成 miR-27b を cotransfection させて発光量を定量した。miR-27b はルシフェラーゼ発光量を有意に低下させ、Cx40 3'UTR と直接相互作用していることが示された。

最後に、高脂肪状態を模する目的で HL-1 細胞をパルミチン酸で刺激した。パルミチン酸刺激後、HL-1 細胞では miR-27b の発現が亢進し、Cx40 の発現が有意に低下していた。さらに miR-27b inhibitor を作用させることにより、Cx40 の発現低下は改善した。

＜考察＞

今回我々は、HFD マウスモデルを用い、AF をはじめとする心房性不整脈の発症機構として、miR-27b を介した Cx40 発現低下により心房内の伝導障害が関与していることを示した。

AF の発症メカニズムについては、心房の線維化や拡大による構造的リモデリング、およびイオンチャネルの発現や機能が変化する電気的リモデリングによるものが提唱されている。今回使用した HFD モデルにおいては、心房性不整脈の易誘発性や心房内伝導速度の低下が観察されたが、線維化や心房拡大は目立たず、Cx40 の発現が有意に低下していることから、電気的リモデリングが主な発症機構と考えられた。

HFD モデルにおける Cx40 発現低下に関して、microRNA に着目して網羅的な発現解析を行ったところ、HFD 群において 14 個の microRNA が有意に発現上昇を示し、予測プログラムでは miR-27b が唯一 Cx40 3'UTR との結合が予測された。

Luciferase assay により、miR-27b と Cx40 3'UTR は直接相互作用していることが示されたが、1 つの microRNA は複数の mRNA 3'UTR を標的として発現調節に関与しており、標的として予想されたその他の遺伝子（Ppar-γ、Dll4、Spry2）についても miR-27b との相互作用を検討した。Ppar-γ 以外は直接の相互作用を示すことはできず、Ppar-γ についても活性化薬である pioglitazone が AF の発症を予防するといった報告はあるものの、発現低下だけで伝導障害を説明できるという報告はなく、少なくとも本 HFD モデルにおいては病態メカニズムとの関与は低いと考えられた。

HFD モデルでは心房においてサイトカインの発現亢進が認められたが、パルミチン酸刺激後の HL-1 細胞ではサイトカインの発現に変化は認めなかった。以上から、心房においては心筋細胞以外の細胞（浸潤した炎症細胞など）からサイトカインが分泌されている可能性がある。しかし、心筋細胞における miR-27b を介した Cx40 低下のメカニズムはそのような炎症反応の亢進とは独立していると考えられ、miR-27b は電気的リモデリングに直接的に関わっていると考えられた。

＜結論＞

高脂肪食は miR-27b を介した Cx40 の発現低下による心房内伝導障害を引き起こすことで、心房性不整脈の発症に関与していた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5052　号	髙橋　健太郎
論文審査担当者	主　査　小川　佳宏 副　査　木村　彰方、淺原　弘嗣	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、ギャップジャンクションを形成する Cx40 の発現を抑制する miR-27b が高脂肪食負荷マウスにおける後天的な心房細動の原因となる可能性を示した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

心房細動などの心房性不整脈の遺伝的要因については多くの報告があるが、高血圧や脂質異常症などの生活習慣病に関連して発症する不整脈に関する詳細な検討は少ない。本研究はマイクロ RNA に着目し、後天的に発症する心房細動の分子機構を検討した独創的なものである。

２）社会的意義

心房細動は、最も罹患率の高い不整脈の一つであり、心原性脳梗塞や心不全の原因となる。本研究により、Cx40 の発現を抑制するマイクロ RNA の阻害剤による核酸治療やバイオマーカーとしての臨床応用の可能性が示唆された。

３）研究方法・倫理観

研究にはマウスと培養心房筋細胞が用いられ、体表心電図、心内心電図あるいは心房性不整脈の誘発とマウスの表現型の観察、遺伝子発現の検討、miR-27b の同定と機能解析などが行われた。いずれについても申請者の研究方法に対する知識と技術力の高さがうかがわれた。

４）考察・今後の発展性

高脂肪食マウスの心房では線維化などに先立って心房細動が認められ、マイクロ RNA の阻害剤を用いた核酸治療や早期診断のためのバイオマーカーとしての臨床応用の手掛かりになる可能性がある。

３．その他

特記すべきことなし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	加藤　陽子
論文審査担当者	主査　立石　宇貴秀 副査　下門　顕太郎、上阪　等
論　文　題　目	Vessel Wall Inflammation of Takayasu Arteritis Detected by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging: Association with Disease Distribution and Activity

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

造影 MRI の画像の一つである遅延造影像（Late Gadolinium Enhancement: LGE）の、高安動脈炎に対する有用性はまだ確立されていない。本研究は、高安動脈炎における血管炎の広がりや疾患活動性評価に対する LGE の有用性を調べることを目的とした。疾患活動性のある群（Active 群）とない群（Inactive 群）で LGE の定性評価と定量評価を行い、比較した。結果、LGE の定性評価では従来の血管造影法よりも病変の広がりを評価するのに有用であったが、定量評価では LGE の各 MRI parameters で有意差を認めず、疾患活動性を評価するには有用と言えなかった。

＜緒言＞

高安動脈炎の患者の血管炎の広がりや疾患活動性を評価することは臨床的に重要である。MRI は高安動脈炎患者にも使用されうる検査であるが、LGE の高安動脈炎に対する有用性はまだ確立されていない。本研究は、高安動脈炎における血管炎の広がりや疾患活動性評価に対する LGE の有用性を調べることを目的とした。

＜方法＞

対象患者：

2011 年 3 月から 2012 年 5 月までの間に 1.5TMRI（Achieva Dual,Phillips Healthcare）を用いて撮影をした高安動脈炎の患者 49 名を対象とした。患者は MRI 撮影前の 2 年間に症状増悪による薬剤変更を行ったものを Active とし、2 年間症状増悪がなく、薬剤変更のないものを Inactive とした。この定義は Inactive 群に疾患活動性のない患者を確実に群別するために用いた。ただし、活動性のない患者が Active 群に含まれる可能性を含むことから、初発の血管炎の患者を First-episode 群として選別し、それを Inactive 群と比較した。また、サブスタディとして、従来から高安動脈炎の疾患活動性評価に使用されている NIH criteria を用いて患者を Active/Inactive にグループ分けし、LGE の定量評価を行った。

MRI protocol：
造影剤は gadopentetate dimeglumine (Magnevist, Bayer)を 0.15mmol/kg の bolus 投与で用いた。LGE sequence による撮影を造影剤投与前および後に行った。造影後の画像は造影剤投与後約 30 分まで複数回行い、最も造影効果のよい画像を用いて定性評価および定量評価を行った。

定性評価：
従来の血管造影法に従った病変の広がりと、LGE 陽性の範囲を比較した。前者は血管内腔径評価に基づいた高安病の病型分類（Angiographic classification）に基づいて Type I から V に分類し、後者は Angiographic classification と同様に Type I から V に分類した（LGE classification）。

定量評価：
造影後の血管で最も高信号を呈した血管壁に Region of interest（ROI）をおいて Signal intensity(SI)の測定を行い、これを SI_{vessel} とした。造影前の血管壁の SI 測定は対応する場所で行った。ノイズの測定は、SI_{vessel} を測定した血管の中心に 3 個の ROI を置き、その平均の SI を SI_{noise} とした。またその Standard deviation（SD）の平均を SD_{noise} とし、これらも造影前後で測定した。造影前後の画像における Signal-to-noise ratio (SNR) (= SI_{vessel} / SD_{noise})と Contrast-to-noise ratio (CNR) (= (SI_{vessel} - SI_{noise}) / SD_{noise})を算出した（それぞれ pre-SNR, post-SNR, pre-CNR, post-CNR）。また、造影前後の SNR と CNR の変化を、SNR increment（= post-SNR – pre-SNR）および CNR increment(= post-CNR – pre-CNR) として算出した。これらの MRI parameters を Active 群と Inactive 群で比較した。

以上の研究方法は東京医科歯科大学の倫理委員会により承認された。

＜結果＞
Patient characteristics： 19 名の Active 群患者と 30 名の Inactive 群患者において比較を行った。年齢、罹患期間、CRP、Indian Takayasu’s Arteritis Activity Score (ITAS)2010 に有意差を認めた。First-episode 群は 6 名であった。
定量評価： いずれの MRI parameters も Active 群と Inactive 群で有意差を示さなかった（pre-SNR (14.6 vs. 18.7; U = 238; P = 0.34), pre-CNR (11.2 vs. 12.4; U = 250; P = 0.47), post-SNR (48.7 vs. 45.5; U = 284; P = 0.98), post-CNR (33.6 vs. 32.8; U = 252; P = 0.50), SNR increment (34.0 vs 24.6; U = 259; P = 0.59), or CNR increment (23.9 vs. 15.9; U = 221; P = 0.19) ）。
First episode と Inactive 群の比較：MRI parameters はいずれも Active 群と Inactive 群で有意差を示さなかった。
サブスタディ: NIH criteria に基づいた疾患活動性評価では、Active 群が 13 名、Inactive 群が 39 名であった。MRI parameters は Active 群と Inactive 群で有意差を示さなかった。

＜考察＞
高安動脈炎における LGE 画像は、従来の血管造影法では検出できなかった血管径変化のない血管

病変を検出するのに有用であった。これは、血管径の変化の有無にかかわらず血管壁の病理学的変化を検出できたためと考えられ、新規に診断された患者において、どの血管を注意深くモニタリングすべきかがわかるため、患者ならびに臨床医にとって有益な情報であると考えられた。

LGE の定量評価では血管炎の活動性を判断することは困難であった。その理由としては LGE が炎症性の浮腫および炎症後の線維化組織の両者で陽性になるためと考えられた。患者のグループ分け定義による影響を考慮して Sub-study では NIH criteria に基づいた比較も行ったが、MRI parameters に有意差を認めず、これも最初の結論を支持する結果であった。

今回用いた造影剤（gadopentetate dimeglumine）は広く臨床に用いられている造影剤であるが、今回と異なる造影剤（Gadofosveset trisodium（intravascular contrast agent））を用いた評価において、MRI parameter の疾患活動性による有意差を得たという報告もある（Papa ら、Reference number15）。本研究は Negative study であるが、高安動脈炎の活動性評価に用いる造影剤を選択する際にどの造影剤を選択すべきか、臨床医にとって有用な報告をした試験であったと考えられた。

＜結論＞

造影 MRI は高安動脈炎患者の血管径変化のない血管病変を検出し病変の広がりを評価するのに有用だが、疾患活動性を評価するには有用とは言えなかった。高安動脈炎の活動性は、マルチモダリティによる総合的な評価を行う必要がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5053　号	加藤　陽子
論文審査担当者	主　査　立石　宇貴秀 副　査　下門　顕太郎、上阪　等	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、高安動脈炎の病変の広がりや疾患活動性について造影 MRI 所見との関連性を検討した論文である。病変の広がりや疾患活動性については、造影 MRI の画像の一つである遅延造影像（Late Gadolinium Enhancement: LGE）の特徴に着目し定性評価と定量評価を行い、比較した。LGE の定性評価では従来の血管造影法よりも病変の広がりを評価するのに有用であったが、定量評価では LGE の各 MRI parameters で有意差を認めず、疾患活動性を評価するには有用と言えなかった。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

高安動脈炎における LGE の有用性に関しては以前より諸家の報告がなされてきているが、検査成績に一定性がなく有用性は確立されていない。高安動脈炎の治療はステロイド投与が基本であり、それのみでは十分な寛解は望めないため、再発の早期予測が診療上重要である。これまで高安動脈炎に特化して LGE を用いて非侵襲的に病変の活動性を評価したまとまった報告はなく、本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

高安動脈炎の治療はステロイド投与が基本であり、それのみでは十分な寛解は望めない。近年では免疫抑制剤の他、レミケードなどの分子標的薬剤の導入も行われ、良好な成績が示されるようになった。しかし依然として再発の早期予測が診療上重要である。このためには治療前にいかにより正確に病期診断を非侵襲的に評価するかが重要であり、LGE は治療の患者選択の一助になる可能性がある。

３）研究方法・倫理観

高安動脈炎の病変の広がりや疾患活動性について造影 MRI 所見との関連性を活動性群、非活動性群で比較した症例比較研究であり、全例臨床的評価にてリファレンスを実施している。比較的稀な疾患であるため、長期間にわたり患者をリクルートしサイトで検査してデータを抽出しているため、患者負担を軽減するために必要最小限の検査にとどめられるよう十分配慮されている。得られたデータをサイトで評価し再現性のある結果を導き出している。

４）考察・今後の発展性

再燃が予測される高安動脈炎患者においては LGE による病変の広がり診断を実施し、病変の活動性の強さについては F-18 FDG PET/CT など他のモダリティを有効に活用し総合的に評価することが重要である。今後は LGE 撮影の標準化、ROI 設定の明確化、検査データの解析手法について十分な初期データを取得後、前向き試験にて診断基準の明確化を行い、観察者間の再現性、偽陽性・偽陰性の具体的要因を調査し検討を追加する必要がある。LGE を成熟した検査として使用することで治療を実際に行う際の患者層別化のための一手段として活用できる可能性がある。

３．その他

特記事項なし。

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は本学博士の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐藤　文哉
論文審査担当者	主査　中田　隆夫 副査　田邊　勉　　西川　徹
論　文　題　目	Semi-in-situ atomic force microscopy imaging of intracellular neurofilaments under physiological conditions through the ‘sandwich’ method

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ニューロフィラメントたんぱく質は、神経特異的な中間径フィラメントたんぱく質要素であり、従来、主として精製や再重合を経た多量体を対象として電子顕微鏡や原子間力顕微鏡による形態学的研究がなされてきた。しかし、細胞内で発現・重合した線維の生理的超微細形態が明らかにされたとはまだ言い難く、ニューロフィラメント重合体の生理的条件を保ったその場観察の手法が求められていた。本研究では、内因性中間径フィラメントたんぱく質を欠く SW13vim(-)細胞に導入、発現させた neurofilament medium protein / α-internexin 共重合線維を、「サンドイッチ」法（細胞を二枚のカバーガラスに挟んで細胞膜を接着後、剥離し、細胞内部を露出させる方法）により露出させ、振幅変調型原子間力顕微鏡で直に液中観察することに成功した。観察された細い線維の方向に沿う約 50−60 nm の周期構造は、共発現させたニューロフィラメントたんぱく質の生理的重合体の特徴を反映していると考えられ、また、原子間力顕微鏡による細胞内中間径フィラメントの生理的構造の研究に今回の「サンドイッチ」法が有用たりうると示唆された。

＜緒言＞

ニューロフィラメント(NF)たんぱく質は、神経細胞特異的な中間径フィラメントたんぱく質に属し、主要な神経細胞骨格として形態の変化や維持に関与していると考えられている。NF-light (NF-L), NF-medium (NF-M), NF-heavy (NF-H)たんぱく質三者が obligate heteropolymer（生体内において同種多量体を正常には形成しない）として NF を構成し、その特徴として重合体の生化学的安定性が知られている。また、元は中間径フィラメント結合たんぱく質として報告された α-internexin (α-inx)も、神経特異的中間径フィラメントとして NF に組み込まれることから、現在は広義の NF たんぱく質に含められる。

他の細胞骨格要素であるアクチンやチュブリンと比べ、細胞内における NF たんぱく質の線維発達の分子基盤や、生理的 NF たんぱく質重合体の分子解像度に迫るような超微細形態についての知見は乏しいのが現状である。これまでの形態学的研究には、一方で電子顕微鏡を用いた Heins らによる精製 NF-L 再重合体の観察があり、約 21 nm の周期構造を報告しているが、*in vitro* の再構成系であることや、電顕試料調製時の影響の可能性という問題は閑却し得ない。他方、苛烈

な化学的処理を必ずしも要求しない原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、Mücke らはラット脊髄由来、Brown らはウシ脊髄由来の精製 NF 線維の観察を行い、それぞれ約 30-50 nm, 約 23 nm の周期構造を観察している。これらの所見を解釈するにも、NF 異種重合体の局所的組成や動態調節機構の定量的なデータは嘗てないため、細胞内において組成の明らかな NF 重合体について精製処理を経ないその場観察のデータを新たに蓄積し、そこに立脚する視座から鳥瞰する必要がある。

そこで本研究では、細胞内で生理的 NF 線維を発現・重合させて、二枚のカバーガラスに細胞を挟んで接着・剥離する「サンドイッチ」法により線維を露出させ、液中 AFM 観察を行った。本手法によって観察された線維状構造は、より生理的な状態を維持していると考えられ、かかる構造の分類と形態的特徴の解析とを先行する報告と比較しながらここに論ずる。

＜方法＞

内在性中間径フィラメントを欠く SW13vim(-)細胞に、アデノウイルスベクターで NF-M および α-inx を共発現させ、ø12 mm カバーガラス上に培養し、「サンドイッチ」法によって NF 重合体を露出させた。具体的には、氷上で細胞にポリエチレンイミン処理、タンニン酸処理、低張液処理を順に行った後、塩基性色素 Alcian Blue でコートした別のカバーガラスと培養しているカバーガラスとの間に細胞を挟んで、培地側にあった膜を色素コートしたガラスに十分接着させてから、緩衝液（100 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 3 mM EGTA, 10 mM PIPES, pH 6.8）中で剥離し、アルデヒド固定を施した。培養時の基質としていたカバーガラス側に残存する試料を用い、振幅変調型（AM）原子間力顕微鏡 NanoWizard®3 AFM system にシリコンカンチレバー OMCL-AC160TN-R3 を装着して、露出した NF 線維の液中 AFM イメージングを行った。取得したデータは解析用ソフトウェア Gwyddion を使用して解析し、観察された線維状構造について、背景からの高さと半値全幅とに加えて、線維方向に沿う周期構造があればその長さを求めた。

＜結果＞

「サンドイッチ」法により、NF 発現細胞の培地側にあった細胞膜を剥離できることが位相差顕微鏡観察によって確認された。さらに、EGFP 標識 NF-M を用いた蛍光顕微鏡観察によって、基質カバーガラス側に残存する試料表面に NF 線維が露出していることが見出された。このように調製した試料を AM-AFM で液中観察すると、次の三者に分類できる各種線維構造が捉えられた：(i)高さ約 3 nm、半値全幅約 56 nm、長さ方向に約 50-60 nm の周期的隆起構造を持ち、屢々並走する線維、(ii) 高さ約 17 nm、半値全幅約 220 nm で周期的特徴のない線維、(iii) 高さ約 1.7 nm、半値全幅約 28 nm、走行に沿う約 20-30 nm の周期を呈する線維。(i)と(ii)とは、NF 導入細胞でのみ観察され、(iii)は対照の非導入細胞にも共通に検出されたことから、前二者は NF 線維、後者はアクチン線維であると考えられた。

＜考察＞

「サンドイッチ」法を通じて生理的な条件を保つことによって、細胞内 NF 線維の *semi-in-situ* 液中 AFM 観察に成功した。NF 導入群と非導入群とを比較することで、NF 線維とアクチン線維

とを区別することができた。微小管は調製時の氷上処理によって脱重合し、露出した細胞膜上にはほとんど見られず、AFM 観察でも両群共通に検出されることはなかった。

AFM 観察に際しては、適切な試料を調製することが鍵となるが、そのためには、試料の純然性と自然性という対立する要求を調停しなければならない。細胞質の中間径フィラメントを留めるために強い洗浄を今回は避けたが、その分、夾雑物が探針や線維へ吸着したり、基板と線維との間に横たわったりして像を曇らせるおそれがあった。(ii)に分類される太い線維は、そうした影響か、あるいは NF 線維の束化による可能性が考えられる。それでもなお、より生理的と目しうる NF 線維の、これまでの精製試料と比肩しうる像(i)を得たことで、以下の計較が可能となった。

今回観察された細い NF 線維(i)の約 50-60 nm の周期は、Mücke らが報告した 30-50 nm の周期や、Heins ら、Brown らが NF 線維について、また Ando らが精製 vimentin 線維について報告した 21-23 nm の周期と比較してやや長い。Mücke らは、彼らが同時に計測した vimentin などの線維よりも NF 線維の方が長い周期を呈したことを、NF-M や NF-H が長大な尾部ドメインを持つことから説明している。Hisanaga & Hirokawa は、ロータリーシャドウイング電子顕微鏡法を用いて、再構成した NF 線維がその成分に応じて種々の長さの突出を線維本幹から伸ばしており、他方で NF-L のみの同種多量体では明らかな突出構造が見られなかったことを報告している。Mücke らの述べるように、そのような突出がより長い周期構造として AFM 像に反映していることが推察される。NF-L は生体内の NF 線維でもっとも多くの割合を占める要素であるが、本論文での NF 線維の構成要素は NF-M と α-inx とであり、かかる成分の違いが周期の差異として現れたと考えられる。なお、周期の長さの局所的な揺動は、あるいはその場所における NF の成分の違いや翻訳後修飾などとも関連している可能性がある。そうしたパラメータを制御しつつ可及的に生理的な NF 線維形態を研究するにあたっても、今回の SW13vim(-)細胞と「サンドイッチ」法とを用いた液中 *semi-in-situ* AFM 観察は有用な手法となりうることが示唆される。

＜結語＞

生理的条件下で細胞内 NF 線維を露出し、液中 AFM イメージングを行うことができた。観察された約 50-60 nm の周期構造は、NF たんぱく質の周縁ドメイン構造を反映していると考えられた。今回用いた「サンドイッチ」法は、細胞質の細胞骨格の形態研究を生理的条件を保って行うのに資するものであり、更なる高解像度計測によって、分子レベルの微細構造と、構成成分たるたんぱく質の存在比率や機能的修飾等との相関が解き明かされうるのではないかと期待される。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5054　号	佐藤　文哉
論文審査担当者	主　査　中田　隆夫 副　査　田邊　勉　　西川　徹	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、再構成されたニューロフィラメントを、新しい様々な顕微鏡法で観察したものである。ニューロフィラメントは、神経特異的な中間径フィラメントであり、3 つのサブユニットからヘテロポリマーが形成され、生化学的に大変安定である。にもかかわらず、他の細胞骨格要素であるアクチンやチュブリンと比べ細胞内での超微細形態についての知見は乏しい。申請者は、ニューロフィラメントの超微細形態に興味を持ち、生細胞内での構造を見るために、様々な試みを行った。その途中経過のものも含めて、現状を報告した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ニューロフィラメントは、神経特異的中間径フィラメントであり、他の細胞骨格であるアクチンや微小管に比べ、ヘテロポリマーからなり、骨格部分からとげ状の構造が出るなどの理由で高解像度の研究は遅れている。申請者はこのニューロフィラメントを様々な新しい顕微鏡法で観察し新しい知見を得ようと試みた。

２）社会的意義

本研究は、同じサンプルを様々な方法で観察し像を得ており、それぞれの比較を同じ申請者が行っているので、各顕微鏡の特質について申請者ほど身をもって体験している者はいない。

３）研究方法・倫理観

研究は主に原子間力顕微鏡 AF-AFM で行われ、別に蛍光偏光顕微鏡、全反射顕微鏡が用いられた。内在性の中間径フィラメントを欠く Sw13Vim (-) 細胞にアデノベクターで NF-M での α-inx を共発現させる。カバーグラス上の細胞を生理学的細胞内液条件下で上からカバーグラスをぴったりとつけて、はがすというサンドイッチ法により、細胞の一部の細胞膜の上部がカバーグラスと共にはがれる条件を設定した。その後固定し AM-AFM で観察を行った。

４）考察・今後の発展性

AM-AFM で観察すると 3 つのフィラメント様の構造が見られた。（ｉ）高さ約 3nm、半値全

幅約 56nm、長さ方向に約 50-60nm の周期的隆起構造を持ち、屢々並走する繊維、（ⅱ）高さ約 17nm、半値全幅約 220nm で周期的特徴のない繊維、（ⅲ）高さ約 1.7nm、半値全幅約 28nm、走行に沿う約 20-30nm の周期を呈する繊維。コントロール細胞との差から、（ⅰ）（ⅱ）が NF 線維と考えられた。これら周期構造はこれまでの報告と若干異なるが NF のタンパクの周縁ドメイン構造を反映していると考えられた。

新しい蛍光偏光顕微鏡及び全反射顕微鏡による観察も進んでおり、新しい画期的知見が出るのも近いと考えられる。

３．その他

特になし

４．審査結果

これは MDPhD コース（研究者養成コース）の 3 年間のコースであり、判定する範囲を提出された AFM の論文だけで行うかあるいは、発表された全体で行うべきかがまず議論され、全員一致で、全体で判定を行うことにした。これは試行錯誤の部分は論文にはなっていないがその比較の中にこそ、申請者の研究者としての資質が最もよく表れているからである。

発表はセミナー形式で行われ、質疑応答は 30 分以上行われた。様々な角度からの質問が行われたが、特にこれらの実験の目的、つまりは何をやりたかったのか、という点とそれにストレートにチャレンジしているかという点について、今後の研究者の心構えとして叱咤激励があった。研究の内容や、プレゼンテーションは、充分に水準を超えたものであり、学位授与に値すると全員一致で判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	赤星　径一
論文審査担当者	主査　渡邉　守 副査　北川　昌伸、小川　佳宏
論　文　題　目	Expression of connective tissue growth factor in the livers of non-viral hepatocellular carcinoma patients with metabolic risk factors

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年、糖尿病や肥満等の生活習慣病に関連した肝癌が増加している。しかしその分子生物学的発癌メカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では非ウイルス性肝癌手術症例の背景肝の網羅的遺伝子解析を行い、糖尿病・肥満と相関して上昇している遺伝子について分子細胞学的解析を行った。発現上昇していた遺伝子のうち connective tissue growth factor(CTGF)に注目した。肝癌細胞株を高糖・高インスリン下で培養すると CTGF の発現が誘導された。CTGF 高発現株はケモカイン関連遺伝子の発現が亢進しており、in vitro, in vivo 実験においてマクロファージの遊走や活性化を惹起した。非ウイルス性肝癌手術切除症例の背景肝組織の免疫染色において CTGF 発現は糖尿病・肥満、肝マクロファージの活性化と相関していることが確認された。また、CTGF 高発現症例は低発現症例に比べて有意に無再発生存期間が短く、多変量解析の結果、CTGF 発現と脈管浸潤の有無が再発の独立規定因子であった。CTGF は肝の炎症の誘導を通じて糖尿病・肥満関連肝癌の発癌に関与している可能性が示唆された。発癌・再発リスクを予測するバイオマーカーや治療標的としての応用が期待される。

＜諸言＞

肝細胞癌(HCC)の発癌リスクファクターとしてＢ型、Ｃ型肝炎ウイルス感染やアルコール多飲が有名であるが、約 30%の症例にはこれらのリスクファクターを認めていない。近年糖尿病や肥満といった生活習慣病も HCC 発癌のリスクファクターであるという疫学調査結果が多数報告され注目されている。ウイルス性肝炎は減少傾向にあるが、糖尿病・肥満は増加しており、今後 HCC のリスクファクターとしてより重要視されるようになると考えられ、その分子生物学的発癌メカニズムの解明が急務である。過去の報告では糖尿病による高インスリン状態が IGF-1 の合成を促進して発癌に寄与する可能性や肥満によって肥満細胞が変化し炎症性ケモカインの分泌が促進される可能性等が示唆されている。糖尿病肥満によって引き起こされる炎症は発癌メカニズムとして特に重要視されており、肥満マウスや DEN 投与マウスでは肝マクロファージの炎症性ケモカイン分泌が促進され発癌に寄与するとの報告がある。本研究ではヒト肝癌手術切除検体の背景肝組織の網羅的遺伝子解析を行い、connective tissue growth factor(CTGF)が糖尿病肥満状態

で高発現していることを見出した。CTGF は炎症や線維化・発癌への関与が報告されている CCN family に属する分泌蛋白である。我々の研究によって CTGF の糖尿病肥満関連肝癌発癌への関与が示唆された。

＜方法＞

① ヒト検体

2006 年から 2011 年に当科で手術切除を行った非ウイルス性肝癌症例 107 例について、背景肝組織を凍結保存した 25 例を網羅的遺伝子解析に用い、82 例を検証解析に用いた。

② 細胞株

肝癌細胞株 Hep3B, HLE, HuH7、ヒト単球細胞株(THP-1)株を用いた。

③ トランスフェクション

CTGF cDNA プラスミドベクター(ORIGENE 社)を用いてリポフェクション法で Hep3B 細胞に CTGF をトランスフェクションした。

④ マクロファージアッセイ

マクロファージ遊走能を確認する実験としてダブルチェンバーアッセイを行った。まず THP-1 株を PMA で 48 時間刺激してヒトマクロファージに分化させた。マクロファージをチェンバー上層に、Hep3B と CTGF 高発現 Hep3B(Hep3-CTGF)をチェンバー下層に置き培養した。4, 8, 12, 24 時間後の上のチェンパーの下面に移動したマクロファージの数をカウントした。

⑤ 蛍光免疫染色

THP-1 由来マクロファージをカバーガラス上で培養し Hep3B, Hep3B-CTGF の培養液に 6 時間さらした。そののちに 4%PFA で固定して、p65 NF-kB の蛍光免疫染色を行った。

⑥ マウス実験

5 週齢のメスヌードマウスを用いて Hep3B, Hep3B-CTGF 細胞を肝に注射して肝同所モデルを作成した。28 日後にサクリファイスし肝臓を摘出した。

⑦ 免疫染色

マウス肝組織やヒト肝組織はパラフィン包埋して 4μm 厚に薄切し、自動免疫染色機(DISCOVERY XT; Ventana)を用いて免疫染色を行った。

⑧ 統計解析

統計解析には SPSS 20.0 を用いた。

＜結果＞

① 非ウイルス性肝癌背景肝組織における遺伝子発現の特徴

非ウイルス性肝癌手術症例の背景肝組織の網羅的遺伝子解析を行った。糖尿病の有無・BMI 値と各プローベセットとの相関係数を算出すると、両者に相関して有意に発現上昇している 90 プローベセットが同定された。DAVID を用いた Gene ontology 解析の結果、これらの遺伝子は cell adhesion や regulation of cytoskeleton organization に属する遺伝子群であり、この中から特に相関率の高い SLAMF7, CTGF, ITGBL1, LIMA1 に着目した。

② ヒト肝癌細胞株において高糖・高インスリン下で CTGF 発現が誘導される。
肝細胞の高糖・高インスリン環境に対する反応を調べるための in vitro 実験としてヒト肝癌細胞株を高糖・高インスリン下で培養した。もともと CTGF 発現の少ない Hep3B, HLE 株では糖・インスリン負荷により CTGFmRNA, CTGF 蛋白の発現がともに有意に上昇することが確認された。もともと CTGF を発現している株である HuH7 では有意な発現増加は認めなかった。SLAMF7, ITGBL1, LIMA1 では糖・インスリン負荷による遺伝子発現の上昇は認めなかった。

③ CTGF 高発現株を用いた in vitro, in vivo 実験
CTGF 高発現 Hep3B(Hep3B-CTGF)株を作成した。Hep3B 株と比較して、In vitro での細胞増殖能に変化を認めなかった。Hep3B と Hep3B-CTGF を網羅的遺伝子解析で比較すると、inflammatory response や chemokine activity 関連の遺伝子群の有意な上昇を認めた。マクロファージに対する影響を検証するために Hep3B, Hep3B-CTGF と THP-1 由来マクロファージを用いたダブルチェンバーアッセイを行った。CTGF 高発現株の方が有意にマクロファージの遊走を認めた。また、Hep3B と Hep3B-CTGF の細胞培養液を用いて THP-1 由来マクロファージを培養する実験において CTGF 高発現株の方が有意にマクロファージの NF-kB を活性化していることが p65 の免疫染色にて示された
Hep3B, Hep3B-CTGF 株をヌードマウスの肝臓に注入し肝同所モデルを作成した。28 日後の検体では CTGF 高発現株の方が腫瘍体積は大きかった。また、CTGF 高発現株において腫瘍内へのマクロファージの浸潤が有意に多く認められた。腫瘍内の線維化の程度は両者とも同程度であった。

④ 臨床検体における CTGF 発現の意義の検証
非ウイルス性肝癌手術切除検体の背景肝組織の CTGF 免疫染色を行った。CTGF は肝細胞や星細胞に陽性となった。臨床病理学因子との関連を解析すると、CTGF 発現は糖尿病(p=0.012), 肥満(p=0.035)と相関していることが確認された。また、p65(NF-kB)の免疫染色を行ったところ、CTGF 陽性症例において肝マクロファージの NF-kB がより多く活性化されていた(p=0.01)。予後解析を行ったところ、CTGF 高発現症例は低発現症例に比べて有意に無再発生存期間(DFS)が短かった(p=0.002)。DFS に関する単変量解析では糖尿病、脈管浸潤、多発腫瘍、と CTGF 高発現が予後不良因子であり、これらを因子とした多変量解析の結果、脈管浸潤と CTGF 高発現が独立した DFS の規定因子であることが示された。

＜考察＞
本研究では非ウイルス性肝癌と糖尿病肥満と関連する遺伝子を検索するために臨床検体の背景肝組織を用いた網羅的遺伝子解析を行った。その結果、糖尿病肥満と相関して高発現する遺伝子として CTGF が同定された。In vitro, in vivo 実験において CTGF 高発現がケモカイン関連遺伝子の発現を上昇し、マクロファージの活性化に寄与することが示された。また、臨床検体背景肝組織の免疫染色の結果、CTGF 発現と肝の炎症との相関が示され、予後解析にて CTGF が非ウイルス性肝癌の再発に寄与していることが示された。

CTGF は細胞接着や線維化、創傷治癒、炎症、癌等さまざまな生体現象への関与が示唆されている蛋白である。CTGF が糖尿病状態で発現亢進する現象は、糖尿病性腎症や網膜症等の研究で示されており、本研究にて肝癌細胞株が高糖高インスリン下で CTGF 発現が亢進した結果はこれらの報告に矛盾しない。最近 CTGF の炎症調節因子としての働きが様々な疾患において報告されている。リウマチ滑膜細胞では CTGF を介して炎症性ケモカインが誘導されると報告されているし、腎疾患や皮膚線維化についても同様に炎症を調節していると報告されている。肝臓の炎症と CTGF 発現との関連はまだわかっていなかった。本研究では CTGF 高発現によって炎症性ケモカインの誘導を通じてマクロファージを活性化することが示され、肝においても CTGF が炎症調節因子として働くことを示した。

肝発癌においてマクロファージと肝細胞とのケモカインを介したクロストークが重要であるとの報告が注目されている。マクロファージから分泌される IL-6 や CCL5 が肝細胞に対して癌化作用をもつとの報告もあり、糖尿病肥満関連肝癌において炎症性発癌がもっとも重要視されている。

他の発現経路として肥満による腸内細菌の変化が注目されている。この報告では腸内細菌の変化によって 2 次胆汁酸の組成が変化して発癌に寄与するとされている。本研究では胆汁酸との関連については調べていないが、過去の気管上皮を用いた研究では胆汁酸と CTGF 産生の関連が報告されており、CTGF が発癌メカニズムにおいて様々な役割を担っている可能性が考えられた。

＜結論＞

本研究によって非ウイルス性肝癌症例の背景肝組織における CTGF 発現が糖尿病肥満関連肝癌に関与している可能性が示された。CTGF について今後さらに大規模な研究を行ってゆく価値があると考えられる。実際に抗 CTGF 療法は他疾患において臨床試験が行われており、CTGF は糖尿病肥満関連肝癌の発癌や再発を予測する新しいバイオマーカーや再発・発癌を抑制する治療標的となりうると期待される。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5055　号	赤星　径一
論文審査担当者	主　査　渡邉　守 副　査　北川　昌伸、小川　佳宏	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、非ウイルス性肝癌手術症例の背景肝の網羅的遺伝子解析を行うことによって糖尿病・肥満と相関して発現上昇している遺伝子の中で connective tissue growth factor （CTGF）に注目して詳細な解析を行った結果、CTGF 発現が肝癌の発癌・再発に関与している可能性を示した点であり、バイオマーカーや治療標的となりうる分子の存在を明らかにしたことは極めて有用な研究成果であると言える。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

近年、糖尿病や肥満等の生活習慣病に関連した肝癌が増加している。しかしその分子生物学的発癌メカニズムはまだ不明な点が多い。申請者は非ウイルス性肝癌手術症例の背景肝の網羅的遺伝子解析を行い、糖尿病・肥満と相関して上昇している遺伝子について分子細胞学的解析を行った。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.肝癌細胞株を高糖・高インスリン下で培養するとCTGFの発現が誘導された。2.CTGF高発現株はケモカイン関連遺伝子の発現が亢進しており、in vitro, in vivo実験においてマクロファージの遊走や活性化を惹起した。3.非ウイルス性肝癌手術切除症例の背景肝組織の免疫染色においてCTGF発現は糖尿病・肥満、肝マクロファージの活性化と相関していることが確認された。4.CTGF高発現症例は低発現症例に比べて有意に無再発生存期間が短く、多変量解析の結果、CTGF発現と脈管浸潤の有無が再発の独立規定因子であった。以上より、CTGFは肝の炎症の誘導を通じて糖尿病・肥満関連肝癌の発癌に関与している可能性が示唆された。発癌・再発リスクを予測するバイオマーカーや治療標的としての応用が期待される本研究は基礎的にも臨床的にも極めて有用な研究成果になりうると考えられる。

３）研究方法・倫理観

研究には申請者らの研究室の非ウイルス性肝癌手術症例の背景肝を用いた、臨床病理学的、遺伝子発現解析であり、申請者の研究に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、

本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

CTGF は肝の炎症の誘導を通じて糖尿病・肥満関連肝癌の発癌に関与している可能性が示唆された。発癌・再発リスクを予測するバイオマーカーや治療標的としての応用が期待される本研究は基礎的にも臨床的にも極めて有用な研究成果になりうると考えられる。

３．その他

特になし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	近藤　伸平
論文審査担当者	主査　淺原　弘嗣 副査　田賀　哲也、上阪　等
論　文　題　目	Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates

（論文内容の要旨）

<要旨>

滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜 MSC）の集合体の移植は、ラットの半月板再生を促進した。半月板の解剖と生物学的特徴は動物種により異なる。臨床応用に際し、ヒトに遺伝的に近い動物を使って調べることは重要である。我々は、自家滑膜 MSC の集合体の移植で、高齢サルの半月板再生が促進されるかどうか調べた。12 から 13 歳のカニクイザルを使用した。両膝の内側半月板の前方 1/2 を切除した後に、2.5×10^5 個の滑膜 MSC で作った集合体を、半月板欠損部に、平均 14 個移植した。対側の膝は、集合体を移植しない Control 側とした。半月板と関節軟骨は、移植後 8 週（n=3）と、16 週（n=4）で、肉眼、組織学、MRI の T1rho mapping で分析した。MSC 群は、Control 群に比べて、8、16 週それぞれのサルで、内側半月板は大きく、再生半月板の組織学的スコア（modified Pauli）は良好であった。大腿骨内顆部の軟骨の Mankin スコアは、16 週すべてのサルで、MSC 群が、Control 群に比べて良好であった。再生半月板と、それに接する関節軟骨の T1rho 値は、16 週すべてのサルで、MSC 群が、Control 群に比べて、正常組織の値に近かった。

自家滑膜 MSC の集合体の移植は、高齢サルの半月板再生を促進し、関節軟骨の変性進行を抑制した。本研究は、サルの半月板再生と滑膜 MSC 移植の効果を最初に報告したものである。

<緒言>

半月板は、膝の関節軟骨にかかる衝撃を和らげる。半月板損傷の場合、関節軟骨の変性進行を抑制するために、半月板をできるだけ温存することが望ましい。半月板切除や半月板変性に対して、半月板移植や人工半月板が試されているが、結果は未だ議論の余地がある。今後、新しい半月板再生の治療が望まれる。

滑膜組織は、半月板治癒の中心的役割を担い、高い軟骨分化を持つ幹細胞を含んでいる。我々は、以前に、滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜MSC）の関節内注射が、ラットやウサギの半月板切除後に半月板再生を促進することを報告している。また、滑膜MSCの集合体の移植でも、ラットの半月板再生を促進したことを示し、さらに、ブタのモデルでも、滑膜MSCを10分間静置することで、半月板切除や、半月板修復において、半月板再生や治癒を促進したことを報告している。

半月板の解剖と生物学的特徴は動物種で異なる。基礎研究で得た知見を臨床応用するために、より遺伝的にヒトに近い動物を使うことが重要である。本研究では、我々は、滑膜 MSC の移植が高齢サルの半月板を再生するかどうか調べた。これは、サルの半月板修復・再生を示した最初の報告である。

<方法>

それぞれのカニクイザルの両膝の滑膜を採取し、酵素処理後に有核細胞を培養した。2.5×10^5 の滑膜 MSC を 35μl の培養液に懸濁し、hanging drop 法で、3 日間培養し、集合体を形成させた。カニクイザルの両膝の内側半月板前方 2 分の 1 を切除した。片膝のみに自家滑膜 MSC の集合体を 7～20 個（ 平均 14 個 ）移植した。対側の膝は、細胞を移植しない Control 群とした。移植 8 週（n=3）、16 週（n=4）後 に、肉眼、組織学的に再生半月板、関節軟骨を左右の膝で比較した。また、16 週後には、MRI の T1rho mapping 像を用いて、左右の膝を比較した。

<結果>

$60cm^2$ の培養皿に 500 個の滑膜由来の有核細胞を 14 日間培養した後にコロニー形成を認めた。コロニー形成細胞は、Oil-Red O で染まる脂肪細胞や、alizarin red で染まるミネラル化した組織に分化した。コロニー形成した細胞のペレットは、トルイジンブルーに染まる軟骨組織に分化した。各サルの滑膜 MSC 数は、Passage0 で、7 匹中 6 匹で 1.0×10^6 個になった。Passage1 まで継代培養し、細胞数は、Passage1 で、2.0×10^6～25.5×10^6（平均 7.8×10^6）個になった。細胞数は、Passage0 から Passage1 で、4.2 ± 2.5（平均 ± 標準偏差）倍増加した。

サルの滑膜 MSC は、hanging drop 培養 3 日後に、2.5×10^5 個の細胞で作られた集合体は、約 1 mm 程度になった。集合体は、移植の際に、簡単に壊れることはなかった。

半月板切除後、集合体は、重力と表面張力によって、半月板欠損部に静置した。肉眼的に、半月板を切除した部分に、MSC 群も、Control 群も再生半月板を認めた。内側半月板は、8 週の 3 匹すべてにおいて、MSC 群は、Control 群に比べて大きかった。16 週の 4 匹すべてにおいても、MSC 群は、Control 群に比べて大きかった。

組織学的に、再生半月板は、8 週において、MSC 群では、Safranin-O の染色性をわずかに認めたが、Control 群では、ほとんど認めず、辺縁が不整であった。16 週においては、MSC 群では、Safranin-O の染色性を認めたが、一方、Control 群では、依然として、ほとんど認めなかった。modified Pauli 法による再生半月板の組織学的スコアは、8 週の 3 匹、16 週の 4 匹すべてで、MSC 群で、Control 群に比べて良好であった。

16 週の再生半月板の T1rho 値は、4 匹すべてで、MSC 群が、Control 群に比べて、正常半月板の値に近かった。

関節軟骨においては、組織学的に、16 週の 4 匹すべてで、両群ともに変性を認めた。Mankin スコアによる組織学的評価では、16 週の 4 匹すべてで、MSC 群が、Control 群に比べて良好であった。T 1 rho 値は、4 匹すべてで、MSC 群が、Control 群に比べて、正常軟骨の値に近かった。

<考察>

本研究では、カニクイザルの滑膜から由来したコロニー形成細胞は多分化能という幹細胞の性質を示した。サルにおいて、滑膜MSCの移植は、半月板再生を促進し、関節軟骨の変性進行を抑制した。これは、サルの半月板再生に対する滑膜MSC移植の有効性を示した最初の報告である。

我々は、過去に、ラット、ラビット、ミニブタで、内側半月板前方 1/2 切除後に、滑膜 MSC の移植が、半月板再生を促進することを報告している。半月板再生する期間は動物種によって異なる。サルは、遺伝的に、他の動物よりヒトに近いため、サルを用いた半月板再生の研究は価値がある。

カニクイザルは、ヒトと薬物代謝が近いために、薬理学の医学研究に広く使われている。カニクイザルは、主に後脚で立ったり、歩いたりする。この点から、他の動物よりも、カニクイザルの半月板再生は難しいと考えられる。

我々は、12 から 13 歳のカニクイザルを用いた。カニクイザルは、3 から 4 歳で、性成熟し、野生のカニクイザルの寿命は、15 年程度である。よって、12 から 13 歳は、高齢と考えらえる。

本研究では、自家滑膜 MSC を用いた。自家滑膜 MSC は、同種のものと比較して、免疫拒絶反応を避けられ、移植後関節内でより長く生存することができると考えられる。臨床応用に向けて、自家滑膜 MSC は、同種滑膜 MSC より安全で、より良好な結果を期待できる。

滑膜 MSC はサルの半月板再生を促進した。この背景には 3 つメカニズムが考えられる。1 つ目は、滑膜 MSC が直接半月板細胞に分化したことが考えられる。我々は、ラットの半月板切除モデルにおいて、LacZ 陽性の滑膜 MSC が、移植後 12 週で、半月板再生部分に観察されたことを報告している。2 つ目は、MSC から、多種のサイトカインや増殖因子を生み出したことが考えられる。我々は、ラットの OA モデルにおいて、滑膜 MSC を移植した後、マイクロアレイ分析で、PRG4, BMP2, TSG-6 を含む多数の表現型が増加したことを報告している。3 つ目は、滑膜 MSC は、半月板欠損部に滑膜組織を誘導したことが考えられる。我々は、ブタの研究で、半月板損傷部に滑膜組織が誘導されることを報告している。

関節軟骨は、16 週の 4 匹すべてで、MSC 群が、Control 群に比べて、変性が抑制されていた。この理由として、２点あげられる。1 つ目は、再生半月板が関節軟骨を保護したことが考えられる。なぜなら、8 週でも MSC 群のほうが、Control 群に比べて、半月板再生を認めたからである。２つ目は、滑膜 MSC の集合体が、関節軟骨の変性進行を抑制する因子を産出することが考えらえる。

T1rho mapping は、半月板と関節軟骨の評価に用いた。T1rho mapping を使うと、グリコサミノグリカン、軟骨組織のコラーゲンと水のような生化学的な構成物質の客観的な情報を与える。我々は、ブタにおいて、半月板の断裂部の T1rho 値と、組織学的スコアの間に、関連性を認めたことを報告している。T 1 rho mapping は、再生半月板と関節軟骨の質的評価法の一つになる可能性がある。

本研究には、3 つ制限がある。1 つ目は、サンプル数が少ないことである。高齢カニクイザルを十分な数確保できなかったため、8 週で 3 頭、16 週で 4 頭しかできなかった。そのため、統計学的分析ができず、それを補うために、我々は、すべてのサルの肉眼所見、組織所見を示した。2 つ目は、半月板切除の方法が、前方 1/2 切除するといった臨床的にはまれな損傷形態を採用した

ことである。この方法は、サルに低侵襲で、再現性のある手技であるため、我々はこの方法で行った。3 つ目は、再生半月板の生体力学的試験を行っておらず、再生半月板の力学的特性を調べていないことである。

<結語>

自家滑膜 MSC の集合体の移植は、高齢サルの半月板再生を促進し、関節軟骨の変性進行を抑制した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5056　号	近藤　伸平

論文審査担当者	主　査　淺原　弘嗣 副　査　田賀　哲也、上阪　等

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜 MSC）の集合体の移植による半月板再生を検討するうえで、半月板の解剖と生物学的特徴は動物種により異なることが問題となっている。臨床応用に際し、ヒトに遺伝的に近い動物を使って調べることは重要である。そこで、申請者は、自家滑膜 MSC の集合体の移植で、高齢サルの半月板再生が促進されるかどうか調べた結果、自家滑膜 MSC の集合体の移植は、高齢サルの半月板再生を促進し、関節軟骨の変性進行を抑制した。即ち、滑膜 MSC の集合体の移植による半月板再生効果を実証することができた。

2.　論文審査

1）　研究目的の先駆性・独創性

カニクイザルは、ヒトと薬物代謝が近いために、薬理学の医学研究に広く使われている。カニクイザルは、主に後脚で立ったり、歩いたりする。この点から、他の動物よりも、カニクイザルの半月板再生は難しいと考えられる。半月板再生の研究において、カニクイザルを用いた研究報告は他になく、先駆性の高い研究である。

2）　社会的意義

半月板は、膝の関節軟骨にかかる衝撃を和らげる。半月板損傷の場合、関節軟骨の変性進行を抑制するために、半月板をできるだけ温存することが望ましい。半月板切除や半月板変性に対して、半月板移植や人工半月板が試されているが、結果は未だ議論の余地がある。今後、新しい半月板再生の治療が望まれる。よって本研究は、ヒトの健康に寄与する重要な知見であると考えられる。

3）　研究方法・倫理観

半月板の解剖と生物学的特徴は動物種で異なる。基礎研究で得た知見を臨床応用するために、より遺伝的にヒトに近い動物を使うことが重要である。本研究では、滑膜 MSC の移植が高齢サルの半月板を再生するかどうか調べており、研究手法として挑戦的である。また動物倫理的にも十分な配慮がなされている。

3.　考察・今後の発展性

自家滑膜 MSC は、同種のものと比較して、免疫拒絶反応を避けられ、移植後関節内でより長

く生存することができると考えられる。臨床応用に向けて、自家滑膜 MSC は、同種滑膜 MSC より安全で、より良好な結果を期待できるという重要な知見を得た。

4.　その他

審査発表において、本研究の課題、問題点などについても議論された。

5.　審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Michelle Loyola Nuylan
論文審査担当者	主査　三木　義男 副査　北川　昌伸　　清水　重臣
論　文　題　目	Down-regulation of *LAPTM5* in human cancer cells

（論文内容の要旨）

LAPTM5 (Lysosomal-associated protein multispanning transmembrane 5) gene is a membrane protein on the intracellular vesicle that specifically regulates vesicle trafficking such as endocytosis. We previously found that this gene was transcriptionally down-regulated in cell lines and primary tumors of neuroblastoma (NB) by DNA methylation around its transcriptional start site. Interestingly, while LAPTM5 protein is constantly transported into lysosome for degradation, this protein is remarkably accumulated in NB cells occurring programmed cell death (PCD) within the tumors of favorable type, which frequently undergoes spontaneous regression. Furthermore, we have demonstrated that overexpression of LAPTM5 protein could induce lysosomal cell death due to lysosomal destabilization, as indicated by a leakage of cathepsin D from lysosomes into cytosol *via* lysosomal membrane permeabilization (LMP) and an impairment of autophagy degradation in NB cells. Additionally, the E3 ubiquitin ligase *ITCH* that is amplified in chromosome 20q of undifferentiated thyroid tumors, has oncogenic function, and could negatively regulate the expression level of LAPTM5 protein through proteasomal degradation *via* ubiquitination. The expression of ITCH protein also prevents LAPTM5-mediated cell death in NB cells. Thus, it has been suggested that the expression of *LAPTM5* gene and the accumulation of its product contribute to the induction of PCD during tumor regression of NB and that *LAPTM5* gene may function as a tumor suppressor in NB cells. However, the pathological expression and role of LAPTM5 in other types of human cancer are largely unknown.

Here, we report that expression of *LAPTM5* gene is frequently down-regulated at the transcriptional level in various types of human cancer cell lines and in tumor cases of non-small cell lung cancer (NSCLC) and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and its down-regulation is associated with poor prognosis of patients with ESCC and NSCLC. Importantly, we showed that overexpression of this protein could induce lysosomal cell death in KYSE170 cells, an ESCC cell line, as well as in NB cells. These findings suggest that inactivation of *LAPTM5* gene may contribute to tumorigenesis in a subset of human cancers.

【要旨】

Lysosomal-associated protein multispanning transmembrane 5 (*LAPTM5*)は、細胞内小胞の膜上に局在するタンパク質の１つである。これまで、我々は、*LAPTM5* の発現が、神経芽腫（Neuroblastoma; NB）において、発現低下していること、およびその遺伝子産物の過剰な蓄積がリソソーム性細胞死を惹起する事を示唆してきた。しかしながら、NB 以外の他の癌種における発現様式および役割については、明らかにされていなかった。

そこで、本研究では、様々な癌種由来細胞株および食道癌臨床検体を用いて、LAPTM5 mRNA レベルを qRT-PCR にて調べた。また、遺伝子発現アレイデータベースを検索することにより、肺小細胞癌臨床検体における、LAPTM5 mRNA レベルと変化を検索した。さらに、食道癌由来細胞株および肺小細胞癌由来細胞株において、LAPTM5 の強制発現が細胞増殖および細胞死誘導に与える影響を調べた。

全 338 細胞株および対応する各正常組織における LAPTM5 mRNA レベルを qRT-PCR により検討した結果、315 細胞株（93.2%）において、LAPTM5 mRNA 発現の発現低下が認められた。各癌種による頻度の差は、特に見られなかった。食道癌臨床検体 32 症例中 12 症例において、非癌部と比較して癌部において、LAPTM5 mRNA の発現低下が認められた。そして、その発現低下は、食道癌患者の予後不良と有意に相関していた。さらに、遺伝子発現データベース（Oncomine および PrognoScan）を用いた検索により、肺小細胞癌においても、正常肺組織と比較して癌部において、LAPTM5 mRNA の発現低下が認められ、その発現低下と予後不良との相関が認められた。

次に、食道癌由来細胞株（KYSE170 細胞と KYSE150 細胞）および肺小細胞癌由来細胞株（H460 細胞）において、アデノウイルス発現系を用いて LAPTM5 を強制発現させた。その結果、発現量に依存して、細胞増殖の顕著な抑制効果および細胞死の誘導が認められた。さらに、LAPTM5 強制発現による細胞死誘導の際、リソソームの不安定化の指標であるカテプシン D の細胞質分画への放出とオートファジー経路の遮断が観察された。

以上の結果より、LAPTM5 の不活性化は、様々な癌種における、癌の発生・または進展に深く関与する可能性を示唆している。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5057　号	Michelle Loyola Nuylan
論文審査担当者	主　査　三木　義男 副　査　北川　昌伸　　清水　重臣	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、様々ながん種において LAPTM5 が発現低下していることを示し、LAPTM5 はオートファジーの抑制とリソソーム膜の透過性亢進による細胞死を誘導する可能性を見出した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

LAPTM5 は神経芽腫(Neuroblastoma;NB)において発現が低下し、その遺伝子産物の過剰な蓄積がリソソーム性細胞死を惹起する事を、申請者の研究室が先行的に示している。しかし、他のがん種における発現状況や役割は明らかにされておらず、その点に着目したことは高く評価できる。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.18 種のがんに関し、各細胞株とそれぞれ対応する正常組織を用い、18 がん種において高頻度に LAPTM5 mRNA の発現が低下していること、また、LAPTM5mRNA の発現低下が食道がん、非小細胞肺がん患者の予後不良と有意に相関することを明らかにした。

2.LAPTM5 はオートファジーの抑制とリソソーム膜の透過性亢進による細胞死を誘導する可能性を見出した。

以上のように申請者は、LAPTM5 は細胞増殖の抑制、細胞死の誘導に機能し、その発現低下ががんの発生・進展に関連することを明らかにしている。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える

３）研究方法・倫理観

研究では、がん由来細胞株に加え、臨床検体による LAPTM5 発現量の検証を行っている。また、がん組織遺伝子発現のデータベースを有効に使用しているなど、本手法は十分な分子生物学およびゲノム科学的知識の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について LAPTM5 の不活性化は、様々ながん種において、がんの発生・進展に深く関与する可能性があると考察している。これは先行研究と照らし合わせ

ても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小宮　力
論文審査担当者	主査　下門　顕太郎 副査　内田　信一　吉田　雅幸
論　文　題　目	Ipragliflozin improves hepatic steatosis in obese mice and liver dysfunction in type 2 diabetic patients irrespective of body weight reduction

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

2 型糖尿病は、肥満、インスリン抵抗性に関連して高頻度に非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease）を合併するが、食事療法や運動療法による体重の減量以外に有効な治療が確立されていない。Sodium-glucose cotransporter 2（SGLT2）阻害薬は、腎臓の近位尿細管に発現する SGLT2 を阻害することで尿糖排泄を促進し、インスリン作用とは独立した血糖降下及び体重減少作用を有する。今回、高脂肪食誘導肥満マウス及び遺伝性肥満マウス（*ob/ob* マウス）に SGLT2 阻害薬イプラグリフロジンを投与し、イプラグリフロジンの体重減少非依存的な脂肪肝改善効果を明らかにした。肥満マウスでは、尿糖排泄に対する代償性の過食により体重減少を認めなかったが、脂肪肝が改善した。機序として、肝臓における新規脂肪酸合成の低下と β 酸化の亢進が考えられ、イプラグリフロジンによる高インスリン血症の改善と血漿グルカゴンの増加が寄与すると推察された。イプラグリフロジン投与により精巣周囲脂肪重量は増加したが、脂肪組織の炎症及びインスリン抵抗性は軽減しており、高血糖と高インスリン血症の是正が脂肪蓄積能を改善させ、肝臓への異所性脂肪蓄積を抑制する可能性が考えられた。また、2 型糖尿病患者にイプラグリフロジンを 24 週間投与し、ヒトにおいても体重減少非依存的な肝機能改善効果を認めることを明らかにした。NAFLD を合併する 2 型糖尿病に対して、SGLT2 阻害薬の投与が有望な治療手段となることが示唆された。

＜緒言＞

2 型糖尿病患者の死因として、肝癌や肝硬変などの肝疾患が占める割合は高い。非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease）は、肥満、インスリン抵抗性を背景に生じる脂肪肝で、その一部では非アルコール性脂肪性肝炎（NASH, non-alcoholic steatohepatitis）に進展し、肝硬変、肝細胞癌を発症する。2 型糖尿病に合併する肝疾患の多くを NAFLD が占めると考えられており、2 型糖尿病患者では NASH に進展しやすいとされているが、食事療法や運動療法による体重の減量以外に有効な治療が確立されていない。Sodium-glucose cotransporter 2（SGLT2）は、腎臓の近位尿細管に発現し、

糸球体で濾過されたブドウ糖の約 90%を再吸収するトランスポータである。SGLT2 阻害薬は、尿糖排泄を促進し、インスリン作用とは独立した血糖降下及び体重減少作用を有する。これまでに、ストレプトゾトシンによりインスリン分泌能を低下させた糖尿病モデルマウスで SGLT2 阻害薬の脂肪肝改善効果が報告されているが、その機序は十分に検討されておらず、またインスリン抵抗性の病態における脂肪肝の改善効果は明らかにされていない。最近、2 型糖尿病患者に対する SGLT2 阻害薬の投与時に、尿糖排泄を代償する過食が生じ、体重減少作用が減弱することが報告されている。今回、インスリン抵抗性肥満マウスで SGLT2 阻害薬の脂肪肝改善効果を検討し、その機序及び体重減少依存性を検討した。また、2 型糖尿病患者において、SGLT2 阻害薬の肝機能改善効果及びその体重減少依存性を検討した。

＜方法＞

8 週齢雄性 C57BL/6J マウスに 16 週間高脂肪食を給餌して肥満を誘導し、最後の 4 週間で SGLT2 阻害薬イプラグリフロジン 10mg/kg または vehicle を投与した。16 週間通常食を給餌し、最後の 4 週間で vehicle を投与したマウスを健常対照とした。体重、摂餌量、尿糖、血中代謝パラメータ、肝臓と精巣周囲脂肪の臓器重量、組織像及び遺伝子発現を検討し、インスリン標的臓器のインスリン感受性を経門脈的インスリン投与後の Akt のリン酸化で評価した。また、7 週齢雄性 C57BL/6J-*ob/ob* マウスに 4 週間イプラグリフロジン 10mg/kg または vehicle を投与し、高脂肪食誘導肥満マウスと同様の検討を行った。さらに、BMI 22kg/m^2 以上、HbA_{1c} 6.5%以上の成人 2 型糖尿病患者 55 名にイプラグリフロジン 50mg を投与し、24 週後の体重、空腹時血糖、HbA_{1c}、肝機能の変化を検討した。

＜結果＞

C57BL/6J マウスは 16 週間の高脂肪食により、肥満、インスリン抵抗性、高血糖、脂肪肝をきたした。イプラグリフロジン投与により、尿糖が著明に増加し高血糖は改善したが、摂餌量が増加し体重減少を認めなかった。しかし、イプラグリフロジン投与群では vehicle 群に比して肝重量が低下しており、脂肪肝の改善と血清 ALT の改善傾向を認めた。精巣周囲脂肪重量は、イプラグリフロジン投与群で vehicle 群に比して増加し、肝重量と逆相関した。遺伝性に肥満、インスリン抵抗性、高血糖、脂肪肝をきたす C57BL/6J-*ob/ob* マウスにおいても、イプラグリフロジン投与により、摂餌量が増加し体重減少を認めなかったが、肝重量の低下と脂肪肝の改善を認め、精巣周囲脂肪重量の増加傾向を認めた。

4 週間イプラグリフロジンを投与した高脂肪食誘導肥満マウスでは、血清インスリンが低下し、血漿グルカゴン、血清 3-ヒドロキシ酪酸が上昇した。肝臓の遺伝子発現では、イプラグリフロジン投与により、*Srebp1c* や *Fasn* などの新規脂肪酸合成酵素の遺伝子発現が低下した。イプラグリフロジン投与群では vehicle 群に比して精巣周囲脂肪の脂肪細胞径が増大していたが、F4/80 染色で crown-like structure の数が減少しており、*F4/80*、*Tnf* などの炎症関連遺伝子の発現が低下し、*Adipoq* の遺伝子発現は増加傾向を示した。Vehicle 群では、肝臓、精巣周囲脂肪、骨格筋におけるインスリン抵抗性を認めたが、イプラグリフロジン投与群では、肝臓と精巣周囲脂肪でインスリン抵抗性の改善を認め、骨格筋でも改善傾向を示

した。

イプラグリフロジンを投与した 2 型糖尿病患者 55 名のうち 48 名が 24 週後まで追跡可能だった。24 週間のイプラグリフロジン投与により、体重 75.4±2.1→73.0±2.1（kg）、空腹時血糖 151.3±6.1→125.5±3.8（mg/dl）、HbA_{1c} 7.7±0.2→7.3±0.1（%）と、体重の減少及び高血糖の改善を認めた。また、血清 ALT 41.8±4.5→28.3±2.0（IU/l）、血清 γ-GTP 48.2±5.9→39.3±5.1（IU/l）と肝機能が改善した。約 20%の患者で体重減少率は 1%に達しておらず、48 名を体重減少率の 3 分位を用いて 3 群に層別化すると、体重減少率最小 3 分位群では 24 週間での体重減少を認めなかった。しかし、血清 ALT は全ての 3 分位群で低下しており、体重減少率と血清 ALT の変化には相関を認めなかった。

＜考察＞

本検討により、肥満マウスにおけるイプラグリフロジンの体重減少非依存的な脂肪肝改善効果が明らかとなった。イプラグリフロジン投与により高脂肪食誘導肥満マウスの体重は変化しなかったが、高インスリン血症の改善と血漿グルカゴンの増加により、肝臓における新規脂肪酸合成の低下と β 酸化の亢進がもたらされ脂肪肝が改善する機序が推察された。高インスリン血症の改善は、インスリン作用を介して血糖降下をもたらす他の糖尿病治療薬とは異なり、尿糖排泄により血糖降下をもたらす SGLT2 阻害薬に特徴的な作用と考えられた。一方、2 型糖尿病患者ではグルカゴン過剰分泌による高グルカゴン血症が高血糖の改善に抑制的に作用することが報告されており、SGLT2 阻害薬による血漿グルカゴンの増加が長期的にどのような影響をもたらすかについてはさらなる検討が必要と考えられた。

肥満の過程で生じる慢性炎症や線維化による脂肪組織の機能不全は、異所性脂肪蓄積としての脂肪肝の形成に重要な役割を果たすと考えられている。高脂肪食誘導肥満マウスでは、高脂肪食給餌 12 週以降、精巣周囲脂肪の脂肪細胞は細胞死し、炎症や線維化による脂肪細胞の肥大化制限、即ち脂肪蓄積能の制限が脂肪肝の形成を促進すると提唱されている。本検討で、イプラグリフロジン投与を受けた高脂肪食誘導肥満マウスの精巣周囲脂肪では、マクロファージが細胞死した脂肪細胞を取り囲む構造である crown-like structure の数が減少しており、炎症が軽減し、脂肪細胞径は増大していた。高血糖は脂肪組織炎症に促進的に作用することが既に報告されている。また、脂肪細胞でインスリンシグナルを増加させた脂肪細胞特異的 phosphatase and tensin homologue （PTEN）欠損マウスでは、高脂肪食給餌による脂肪重量の増加が野生型マウスに比して増加するものの、脂肪組織炎症は軽減し、脂肪肝が改善することが報告されている。イプラグリフロジン投与による高血糖及び脂肪組織のインスリン抵抗性の改善が、脂肪組織の脂肪蓄積能を改善させ、肝臓への異所性脂肪蓄積を抑制した可能性が考えられた。

本検討により、2 型糖尿病患者に対するイプラグリフロジン投与で、体重減少の乏しい患者においても肝機能の改善効果を認めることが明らかとなった。NAFLD に対する有効な薬物治療が確立されていない現状において、SGLT2 阻害薬は有望な治療選択肢と考えられた。本検討の問題点として、イプラグリフロジン投与前後での脂肪肝の評価を画像検査等で行っておらず、今後の検討課題である。

＜結論＞

イプラグリフロジンの体重減少非依存的な脂肪肝改善作用が示唆され、NAFLD を合併する 2 型糖尿病において、SGLT2 阻害薬の投与が有望な治療手段と考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5058　号	小宮　力

論文審査担当者	主　査　下門　顕太郎 副　査　内田　信一、　吉田雅幸

（論文審査の要旨）

1. 論文内容

本論文は、糖尿病治療薬 ipragliflozin の脂肪肝改善効果に関するものである。

2. 論文審査

１）　研究目的の先駆性・独創性

Ipragliflozin は Na-glucose cotranspoter である SGLT-II を阻害することにより、尿糖排泄を増加させ血糖値を低下させる薬剤である。糖尿病に高率に合併する非アルコール性脂肪性肝疾患を改善する可能性が指摘されたため、ヒトよび動物を用いてその効果と作用機序を検討し予想されなかった新しい知見を得た。

２）　社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

① 糖尿病患者に本薬剤を投与したところ、糖尿病のコントロールは改善し、体重減少の有無にかかわらず肝機能異常が改善した。

② 遺伝性肥満マウス(ob/ob mouse)および野生型マウスに高脂肪食を投与したうえで本薬剤を投与したところ、体重減少は見られなかったが、糖代謝が改善し、腹腔脂肪が増加する一方で肝臓内脂肪量は低下し、脂肪肝が改善した。腹腔脂肪の増加にもかかわらず脂肪組織炎症は軽減した。

３）　研究方法・倫理観

糖尿病患者を対象とした臨床研究から出発しマウスを用いた研究で基礎的な検討を行ったもので研究方法は合理的かつ包括的である。倫理的問題はない。

４）　考察・今後の発展性

申請者は本薬剤が糖尿病患者に合併する非アルコール性脂肪性肝疾患を改善する薬剤として臨床的に使用できる可能性があると結論している。また研究を通じて、本薬剤が体重減少に無関係に脂肪肝を改善させる機序、脂肪肝という異所性脂肪蓄積を改善させる一方で脂肪細胞の正所性脂肪蓄積を促進する機序、本剤が食欲を更新させる機序、また食欲を更新させるにもかかわらず糖代謝や脂肪肝を改善する機序など将来の研究につながる多くの課題を見出しており、今後の発展が期待できる。

3. その他　特になし。

4. 審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	志村　治彦
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　星　　治、森田　定雄
論　文　題　目	Joint capsule attachment to the coronoid process of the ulna: an anatomic study with implications regarding the type 1 fractures of the coronoid process of the O'Driscoll classification

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

尺骨鉤状突起骨折 O'Driscoll 分類の先端骨折 Type1 は骨片が 2mm 以下の Subtype1 と 2mm より大きい Subtype2 に分けられている。Subtype1 では治療の必要性がないと言われているが、鉤状突起に付着する関節包との関連については正確に理解されていない。また関節包の付着は従来、線状な形態構造であると考えられており鉤状突起への関節包付着部の存在は検討されていなかった。本研究の目的は、鉤状突起と関節包の解剖学的関係を明らかにすることである。解剖実習体 17 肘を用いた。最初に 10 肘で肉眼解剖学的観察を行った。肘関節包を上腕骨側から遠位に反転し、付着部を同定した。鉤状突起への付着部を、肉眼解剖学的さらに組織学的に観察した。関節包の鉤状突起先端への付着様式を評価し、関節包付着部の長さを測定した。次に 5 肘でバンドソーを用いて矢状断面の観察を行った。関節包付着部より近位の骨成分と軟骨成分の長さを計測した。さらに組織標本 2 肘で関節包の厚さを測定した。鉤状突起の橈側での関節包付着部の長さ（11.9mm）は尺側での長さ（6.1mm）よりも長かった。関節包付着部の近位には 1.9mmの骨成分が、4.7mmの骨軟骨成分が存在した。鉤状突起の橈側の関節包の厚さは、近位付着部でそれぞれ 0.59mm, 0.34mm 鉤状突起先端上で 2.63mm, 1.69mm であった。肘関節前方関節包は橈側において、尺側より幅広く付着していた。O'Driscoll 分類の先端骨折 Subtype2 は関節包の付着部、骨軟骨を含んでいた。本研究から得られた解剖学的知識は鉤状突起骨折の治療や手術に貢献できると考えている。

＜緒言＞

尺骨鉤状突起骨折は一般的に肘関節後方脱臼に伴って生じることが多い。まれに単独骨折となることもあるが、多くは橈骨頭骨折や肘頭骨折または関節包靭帯の破綻を伴っており肘関節の不安定性につながっている。鉤状突起は肘関節の安定性において重要な構造であるといわれているが、鉤状突起に付着する軟部組織も同様に重要な役割を果たしている。Regan は単純 X 線側面像での骨片の前後高に基づいて鉤状突起骨折を分類した。しかし、剥離骨折の定義が明らかにされていないので Type1（剥離骨折）と Type2 の分類が正確には行うことができない。さらに、骨片

の内外幅は考慮されず、側面像での高さのみで分類されているため正確な評価ができない。O'Driscoll は CT 画像を用いて骨片の解剖学的な位置に基づいた新しい鉤状突起骨折の分類を提案した。この中で鉤状突起骨折は、「先端骨折」、「前内側関節骨折」、「基部骨折」の 3 型に分類され、先端骨折はさらに、2mm以下の Subtype1、2mmより大きい Subtype2 に分類されている。この分類の中で Subtype 1 は治療の必要性がないとされており、肘関節の安定性の中で鉤状突起の役割は骨片の大きさに関連していると考えられている。しかし、鉤状突起に付着する軟部組織の解剖学的詳細については今までの研究の中で明らかにされていないため、さらなる研究が必要である。われわれは、Subtype1 と 2 では鉤状突起に付着する軟部組織に相違があるのではないかという仮説を立てた。本研究の目的は鉤状突起と軟部組織、とくに関節包との解剖学的関連性を明らかにすることである。

＜対象と方法＞

東京医科歯科大学解剖実習体 17 肘（男性 8 肘、女性 9 肘、平均年齢 77 歳）を用いた。この中には鉤状突起の明らかな外傷後変形、関節病変、関節包の異常などを認めなかった。まず 10 肘で鉤状突起と関節包付着部の関連性について肉眼解剖学的観察を行った。皮膚、皮下組織を切除した後上腕筋・円回内筋尺骨頭以外の筋肉を除去した。肘前方関節包は上腕骨側から遠位に剥離し、橈骨外側から尺骨内側へ剥離して鉤状突起の関節包付着部を同定した。鉤状突起先端から関節包付着部までの距離をノギスで計測した。また上腕筋付着部の橈側縁と尺側縁を基準として、関節包付着部の長さを測定した。

次に 5 肘で、バンドソーを用いて矢状面でスライスした標本を作製した。関節包近位付着部で鉤状突起斜面に垂直な線を引き、関節包より近位の骨成分、骨軟骨成分の厚さを計測した。さらに 2 肘を用いて、矢状断で 5μm切片組織標本を作製し、マッソントリクローム染色した。この組織標本 2 肘で、顕微鏡下にデジタルスケールを用いて上腕筋付着部の橈側縁と尺側縁における関節包の厚さを測定した。測定値の信頼性を評価するため計測は異なる日に 2 回行い、級内相関を計算した。

＜結果＞

鉤状突起に付着する筋腱組織の肉眼的所見

上腕筋は上腕骨前面の幅広い面から起始し、尺骨鉤状突起尺側よりに停止していた（図 1A)。関節包を露出するために上腕筋は上腕骨と関節包から剥離し遠位に反転させた。円回内筋尺骨頭は鉤状結節遠位に付着していた（図 1B)。関節包は損傷することなく、上腕筋から分離して温存できた。

上腕筋と関節包の尺骨鉤状突起付着部

肘関節前方関節包を近位付着部(上腕骨)から遠位に剥離していき、遠位付着部(前腕)では橈骨外側から尺骨内側へ剥離していった。鉤状突起先端には関節包は付着していなかった（図 2A)。次に関節包の付着幅を測定するために、上腕筋や円回内筋尺骨頭、関節包を剥離しその付着部をマーキングした（図 2B)。鉤状突起先端から関節包付着部までの距離は平均 5.8mmであった。

関節包付着部の長さは上腕筋付着部の橈側縁と尺側縁を基準として測定した。鉤状突起尺側では関節包付着部の長さは平均 6.1ｍｍ、橈側では 11.9ｍｍであった。関節包と上腕筋の層構造を観察し、さらに関節包の厚みを測定するため矢状断標本を作製した（図 3)。鉤状突起の橈側では、尺側に比べて関節包の付着部が長いことが確認できた。2 肘での関節包の厚みは近位付着部でそれぞれ 0.59mm、0.34mm、鉤状突起上で 2.63mm、1.69mm であった。また尺側での関節包付着部の厚みは近位付着部でそれぞれ 0.48mm、0.27mm、鉤状突起上で 1.33mm、1.76mm であった。

O'Driscoll 分類 Type1 骨折と関連した解剖学的所見

O'Driscoll 分類 Type1 の Subtype1 と 2 の臨床的意義を見出すために鉤状突起の関節包付着部、骨成分、軟骨成分を特に観察した。鉤状突起の関節包付着部より近位の骨軟骨の厚さは平均 4.7ｍｍであった（図 4)。骨成分のみの厚さは平均 1.9mm であった。級内相関はすべて 0.8 以上（0.86－0.98）であった。

＜考察＞

Cage らは肉眼解剖学研究で鉤状突起先端から関節包までは平均 6.4mm であったと報告している。この報告に基づくと、Regan 分類の Type 1 骨折は関節包を含まないと考えられている。本研究では鉤状突起先端から関節包付着部近位端までの距離は平均 5.8ｍｍであり、Cage らの報告と近似していた。一方、Ablove らは組織学的研究で関節包付着部は鉤状突起先端から 2.36ｍｍ遠位に付着すると報告し、Regan 分類 Type 1 骨折は関節包断裂を含むと報告している。これらの異なる見解は、次のような解釈で説明が可能である。Ablove らは組織学的検討のみで関節包付着部の解析を行っているが、実際には組織標本のみで関節包の付着部を同定することは、関節包が鉤状突起先端に触れているだけなのか、付着しているのかを組織標本では判定できないため困難である。本研究では、矢状断にスライスした肉眼的解剖で関節包を反転することで付着部を同定し、肉眼的解剖と組織学的検討を組み合わせることにより関節包付着部を確認できた。

関節包の付着は従来、線状な形態であると考えられており鉤状突起への関節包付着部の存在は検討されていなかった。近年、関節包の付着は一様ではなく、その付着部位により異なることが肩関節で報告されている。本研究では、鉤状突起の関節包付着部の長さは尺側より橈側が長いことが判明し、さらに関節包の厚みも場所により一様でないことが明らかにされた。肩関節では関節包の付着部が長い部分は関節安定性の重要な構造になっていることが報告されており、これを考慮に入れると肘関節でも鉤状突起において関節包付着部の広い部分が関節安定性に寄与していると推測される。

O'Driscoll 分類では、鉤状突起先端を横断する骨折は Type1 とされている。Subtype1 は 2mm 以下の骨片であり、Subtype2 は 2mm より大きな骨片を有する骨折である。Subtype1 では骨折を修復する必要はないと述べられているが、Subtype 1 と 2 で鉤状突起先端に付着する軟部組織についての解剖学的相違については記載されていない。本研究では、鉤状突起上で関節包付着部の近位の骨成分は矢状面で平均 1.9ｍｍであることが分かった。この約 2ｍｍというのは O'Driscoll 分類で、Type1 骨折を Subtype 1 と 2 に分類する境界に相当する。この結果から

O'Driscoll 分類の Subtype1 と 2 の分類は、関節包の付着部を含むかそれとも含まないかという点で解剖学的に意義のある可能性が示唆された。

また O'Driscoll は鉤状突起の高さの 50%以上を含む骨折を基部骨折と定義しており、基部骨折では先端骨折と比べて軟部組織の損傷が少ないと述べている。それゆえ、骨折が適切に固定されれば治療結果は良好であると報告している。本研究の結果から、関節包の付着部は線状ではなく場所によって付着幅が異なっていることがわかっている。基部骨折は関節包付着部のほぼすべてを含んでいると考えられ、骨折が適切に修復されれば良好な治療結果が得られるという見解を支持している。

本研究の限界としては、純粋な解剖学的研究であること、解剖検体の数が少ないこと、生体力学的な検証はおこなえていないことである。本研究から得られた解剖学的知識は鉤状突起骨折の治療や手術に貢献できると考えている。

＜結語＞

鉤状突起上での関節包付着部の長さは尺側より橈側で長かった。関節包の付着部より近位の骨成分は 1.9ｍｍであり、O'Driscoll 分類の先端骨折 Subype2 骨折は関節包の付着部を含む骨折であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5059　号	志村　治彦
論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　星　　治、森田　定雄	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

尺骨鉤状突起骨折で頻用されているO'Driscoll分類の先端骨折Type1の解剖学的意義を明らかにして、その分類と手術適応の妥当性について組織学的所見を加えて明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

尺骨鉤状突起骨折 O'Driscoll 分類の先端骨折 Type1 は骨片が 2mm 以下の Subtype1 と 2mm より大きい Subtype2 に分けられ、Subtype1 では治療の必要性がないと言われているが、鉤状突起に付着する関節包との関連については正確に理解されていない。また関節包の付着は従来、線状な形態構造であると考えられており鉤状突起への関節包付着部の存在は検討されていなかった。本研究の目的は、これまで明らかにされていない鉤状突起骨折の O'Driscoll 分類の妥当性を解剖学的に明らかにすることである。

２）社会的意義

骨折治療の適応を本研究により正しく理解でき、適切な適応のもとに治療法を選択できる。

３）研究方法・倫理観

解剖実習体 17 肘を用い、はじめに 10 肘で肉眼解剖学的観察を行った。方法は肘関節包を上腕骨側から遠位に反転して付着部を同定した。鉤状突起への関節包付着部を、肉眼解剖学的さらに組織学的に観察し関節包の鉤状突起先端への付着様式を評価し、関節包付着部の長さを測定した。5 肘でバンドソーを用いた矢状断面の観察し関節包付着部より近位の骨成分と軟骨成分の長さを計測した。さらに組織標本 2 肘で関節包の厚さを測定した。

系統解剖学を目的として提供された屍体を用いた本研究は、生前の提供者の理解と承諾に基づいており、広く認められた系統解剖学の倫理に基づいている。

４）考察・今後の発展性

鉤状突起の橈側関節包付着部の長さ平均は 11.9ｍｍで、尺側の 6.1ｍｍより長かった。関節包付着部の近位には 1.9ｍｍの骨成分が、4.7ｍｍの骨軟骨成分が存在した。肘関節前方関節包は橈側において、尺側より幅広く付着していた。O'Driscoll 分類の先端骨折 Subtype2 は関節包の付着部、骨軟骨を含んでいた。

今後矢状断のみならず関節包付着に沿った面での関節包付着部の解析を加えることにより、肘関節の機能と解剖学的構造との関係がより詳細に解明される可能性がある。

３．その他

特になし

４．審査結果

本学位研究テーマは明瞭で、研究法、研究結果は研究目的を十分に果たしており、解剖学的にも、社会的にも意義深いものである。本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	今田　安津子
論文審査担当者	主査　石川　俊平 副査　磯部　光章、村松　正明
論　文　題　目	A functional SNP in *FLT1* increases risk of coronary artery disease in a Japanese population

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

冠動脈疾患(Coronary artery disease: CAD)は多くの国で主要な死因の一つである。CAD は遺伝学的要因及び環境要因の複雑な相互作用により引き起こされると考えられている。最近、ゲノムワイド関連解析(GWAS)により CAD に関係する新たな 15 個の SNP が発見された。今回これらの SNP と CAD の関連を日本人において再検証したところ Fms 様チロシンキナーゼ 1 をコードする *FLT1* (rs9319428)に強い関連が見出された(P=5.98×10^{-8})。さらに、*FLT1* の tag SNPs を用いたファインマッピングにより CAD とより強い関連を示す SNP（rs74412485）を発見した。この SNP は *FLT1* のイントロン 1 に存在し、*FLT1* の転写を促進した。RNAi を用いた実験により、*FLT1* のノックダウンは炎症性接着分子群の発現を抑制することが判明した。免疫染色ではヒトの冠動脈血管内皮に FLT1 タンパクの発現が認められた。これらの結果から SNP による *FLT1* の発現上昇が CAD の発症、進展に関係する炎症性カスケードの活性化を引き起こす可能性が示された。

＜諸言＞

CAD は多くの国で主要な死因の一つであり、遺伝学的要因と環境要因の複雑な相互作用により引き起こされると考えられている。これまでに CAD の遺伝率は 40-50%を占めることが家系解析により示されており、遺伝的な危険因子を解明することは CAD の根本的な原因の解明につながると考えられる。今日までに、多数のゲノム関連解析により多くの CAD 関連遺伝子座が同定されている。これらの遺伝子座がどのように CAD の病因に関わるか大部分は不明であるが、GWAS による CAD 感受性遺伝子の同定から疾患の病因を理解することは革新的な予防、治療法を開発する手がかりとなる可能性がある。

この論文では、最近の欧米人における GWAS によって同定された新規 CAD 感受性 SNP の再検証を日本人で施行し、CAD のリスクとなる *FLT1* の機能的 SNP を新たに同定した。また、*FLT1* の発現促進が CAD の病因に関わることを in vitro で示した。

＜方法＞

日本人 7,990 名の CAD 患者および 6,582 名のコントロールから DNA サンプルを得た。Illumina OmniExpress BeadChip と PCR invader assay を用いジェノタイピングを行った。

15 個の SNP の関連はコクラン・アーミテージ検定で評価した。ハーディーワインベルグ平衡は自由度 1 のカイ二乗検定で評価し、0.0033 (0.05/15)未満を基準値とした。Genetic Power Calculator で本再検証解析の検出力を評価した(有病率を 0.2、偽陽性を 0.0033(0.05/15)とした)。臨床病歴と遺伝子情報との関連は一元配置分散解析およびカイ二乗検定で評価した。SNP-SNP エピスタシスは PLINK 1.07 ソフトウェアを用い評価した。

FLT1 遺伝子領域のファインマッピングを行うために、0.05 以上のマイナーアレル頻度をもつ 74 個の tag SNP を、Haploview software を使い東アジア人由来の 1000 ゲノムデータから選択した。このうち 10 個の SNP　座位については PCR 増幅するためのプライマー設計が繰り返し配列のためにできなかった。2,861 名の CAD 患者と 2,066 名のコントロールを用いた関連解析を行ったところ、51 個の SNP についてデータを得ることができた(10 個の SNP はシグナルが得られず、3 個は SNP アレルの検出ができなかった)。これらの中で rs9319428 よりも低い P 値を示す 15 個の SNP を選び、すべての DNA サンプルをジェノタイピングし、CAD との関連を評価した。

ルシフェラーゼアッセイは、pGL3 basic vector に *FLT1* 遺伝子領域のエンハンサーマーカーである H3K27Ac 配列をクローニングした後、3'側に SNP (rs74412485)を含む 25 塩基のオリゴを挿入した。

RNAi 実験では、*FLT1* の二本鎖 short interference (si) RNA をヒトの動脈血管内皮細胞にトランスフェクションし、トータル RNA を抽出、cDNA に合成し *SELE, ICAM, VCAM* の mRNA を定量した。

免疫染色では、ヒト冠動脈の凍結切片を材料とし FLT1 および CD31 抗体(血管内皮マーカー)を使用し単染色、二重染色を行った。

＜結果＞

再検証解析では、*FLT1* 遺伝子領域に CAD と強い関連を示す SNP (rs9319427,　$P=5.98\times10^{-8}$)を発見した。また、*EDNRA* 遺伝子領域の SNP (rs6842241, P=0.000207)と *FURIN* 遺伝子領域の SNP (rs17514846, P=0.00311)にもボンフェロ―二補正後、統計学的に CAD との関連が認められた。一元配置分散解析およびカイ二乗検定を施行し、年齢、性別や他の CAD の危険因子と genotype との間に関連はみられないことを確認した (P>0.05)。SNP-SNP 相互作用は見られなかった。

FLT1 のファインマッピングでは SNP (rs9319428)よりも CAD と強い関連を示す 15 個の SNP を発見した。これらの 15 個の SNP をさらに解析したところ SNP (rs74412485, $P=2.85\times10^{-12}$)に CAD と最も強い関連が認められた。SNP (rs74412485)と完全な連鎖不平衡にある SNP は認められなかった。コンディショナル解析を行ったところ、FLT1 遺伝子領域と CAD の関連は rs74412485、rs9319428、rs2387632 を代表とする 3 群に分けられ、互いに独立していることが判明した。

ルシフェラーゼアッセイにより、SNP リスクアレルは非リスクアレルに比べて約 1.7 倍転写活性が高いことが判明した。

RNAi 実験では、*FLT1* に対する siRNA によって *FLT1* の発現を抑制すると、*SELE*、*ICAM1*、*VCAM* の発現が低下することが判明した。

免疫染色では、冠動脈血管内皮特異的に FLT1 の発現がみられた。二重染色では、FLT1 と CD31 の共局在が認められた。

＜考察＞

FLT1 遺伝子と CAD は日本人集団において強い関連を示すことが判明した。最近韓国における関連解析においても同様の関連が示されており、人種を超えて *FLT1* 遺伝子は CAD のリスクファクターであることが判明した。*FLT1* は vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) family の一種をコードする。VEGF は血管内皮に発現し、様々な機能をもつサイトカインであり、その受容体である FLT1 や FLK1 の活性化を介して動脈硬化、血管新生、endothelial regression や炎症に関わる。本研究では、ヒト冠動脈血管内皮に FLT1 の発現を確認し、*FLT1* のノックダウンは炎症性接着分子である selectin-E, ICAM1, VCAM の発現を抑制することを示した。これまでの研究により動脈プラークには接着分子の発現がみられ、動脈硬化症や CAD においては、循環する接着分子が増加していることが示されている。従って、*FLT1* の発現上昇による Selectin-E、ICAM1、VCAM の発現促進が CAD の病因に関わっている可能性が考えられる。

また、統計学的に CAD との関連がみられた *EDNRA* 遺伝子は endothelin-1 をコードし、このペプチドは血管収縮や炎症を促進する作用をもつ。Endothelin-1 は血管平滑筋細胞を活性化し、動脈硬化性病変で増加していることがわかっており、動脈硬化に関連する慢性炎症の病因に関わっていると考えられる。

同様に CAD との関連がみられた *FURIN* 遺伝子は proprotein convertase subtilisin/kexin (PCSK)の酵素ファミリーに属する、カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼをコードする。FURIN と同じファミリーに属するセリンプロテアーゼをコードする *PCSK9* は、CAD と強い関連を示すことが報告されており、PCSK9 タンパクは肝臓の LDL コレステロール受容体と相互作用し受容体を不活性化する。最近の第 1 相臨床試験では PCSK9 に対するモノクローナル抗体は LDL コレステロールを減少させることが示されている。これらの結果より FURIN も CAD の治療標的分子となる可能性が考えられる。

＜結論＞

近年欧米諸国により同定された CAD 関連 SNP の再検証解析を日本人で行うと共に、CAD と強い関連を示す *FLT1* 遺伝子の機能的 SNP を新たに同定した。SNP による FLT1 の発現促進が CAD の発症、進展に関与する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5060　号	今田　安津子
論文審査担当者	主　査　石川　俊平 副　査　磯部　光章、村松　正明	

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

本論文は *FLT1* 遺伝子の機能性 SNP が冠動脈疾患に及ぼす影響についての論文である。

2.　論文審査

1）研究目的の先駆性・独創性

申請者は欧米の GWAS で発見された SNP と冠動脈疾患との関連を日本人集団において検証し、さらにファインマッピングと機能解析を行うことにより日本人集団でリスクと相関する *FLT1* の機能性 SNP 候補を特定した。その着眼点は評価に値する。

2）社会的意義

本研究で得られた主な結果は、冠動脈疾患において血管内皮の FLT1 やその下流の接着因子が関与している可能性を示したことである。また同定された *FLT1* の機能性リスクアレルは冠動脈疾患のリスク評価や層別化に資するものと考えられる。

3）研究方法・倫理観

申請者は欧米の GWAS で報告された冠動脈疾患と関連する 15 個の SNP について、日本人集団の冠動脈疾患患者:7,990 名　対照：6,582 名でタイピングを行った。その結果関連が再現された *FLT1* について、領域内の 64 個の tag SNP を用いてファインマッピングを行い最も相関の強い rs74412485 を同定した。申請者はルシフェラーゼアッセイにより rs74412485 が *FLT1* の転写に影響する機能性 SNP であることを示し、さらに FLT1 が冠動脈の血管内皮に発現し接着因子の発現に影響を及ぼすことを実験的に検証した。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されたと考えられる。また本研究は十分な倫理的配慮に基づくものであった。

4）考察・今後の発展性

本研究結果は、冠動脈疾患における FLT1 を軸とした本態解明や治療法の開発に、さらに同定されたリスクアレルは冠動脈疾患患者の層別化やリスク評価に発展可能と考えられる。

3.　審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	宇土　美於
論文審査担当者	主査　大川　淳 副査　上阪　等、金井　正美
論　文　題　目	Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a doseand time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

モノヨード酢酸（monoiodoacetic acid : MIA）は関節炎モデルに用いられるが、従来の用量（1～3 ㎎）では軟骨変化に留まらず、骨破壊をも生じ、軟骨の解析に適さない。今回 Wistar ラットを用いて、MIA ラット関節炎モデルを作成し、用量を振り分け、関節内変化を継時的に検討した。組織学的所見は OARSI　score で、肉眼所見は MIA モデルに特徴的な所見で構成したオリジナル・スコアを作成し定量的に評価した。また滑膜炎の推移についてオリジナル・スコアを作成し、定量的に評価した。肉眼的所見では低用量群では早期では変化は見られず、4～6 週で軟骨表面の不整がみられるものの、骨破壊は認めなかった。高用量群では 4 週以降で強い骨破壊と認めた。組織学的所見では 0.1mg 群と 0.2mg 群では 2 週から軟骨層の染色性の低下を認め、徐々に深層に拡大した。0.2mg 群では 12 週で軟骨下骨が一部露出した。どちらの群でも骨破壊は認めなかった。0.5mg 群と 1mg 群では 4 週以降で強い骨破壊を認めた。膝蓋下脂肪体の炎症は低用量群では注射後 5 日をピークとして、減衰したが、高用量群では注射後 14 日まで増強した。MIA によるラット関節炎モデルを疼痛モデルとして用いられている文献が散見されるが、従来の使用量では骨破壊が強く、不可逆的な変化となるため、治療効果などを検討するには有用ではない。低用量 MIA は骨破壊のない軟骨変性を生じることができ、よりヒト変形性関節症に近い関節変性を得られる。低用量 MIA によるラット関節炎モデルは、変形性関節症の病態や疼痛機序、治療効果の評価において有用である。モノヨード酢酸は濃度依存性および時間依存性に関節炎、滑膜炎を引き起こすことがわかった。

＜諸言＞

変形性関節症（OA）は女性に多く、罹患者の多い疾患である。OA の病態、機序を解明するためには疾患動物モデルの作成が不可欠である。OA の機序としてメカニカルストレスだけでなく、炎症も重要であると考えられておる。モノヨード酢酸（monoiodoacetic acid : MIA）は関節炎モデルに用いられるが、従来の用量（1～3 ㎎）では軟骨変化に留まらず、骨破壊をも生じ、軟骨の解析に適さない。我々は使用する MIA を低用量にすることで軟骨変化を軽減することができるのではないかと考え、様々な用量の MIA によりラット関節炎モデルを作成し、その変化を観察した。

これまで動物モデルにおける軟骨変性や関節炎の評価には様々はスコアが用いられてきたが、MIA ラット関節炎モデルの低用量モデルや初期における変化には適しておらず、本研究において我々は MIA ラット関節炎モデルの評価に適してスコアを作成した。

滑膜炎は関節炎や OA の評価において重要な病態である。これまでの関節炎の評価では滑膜の評価が主であったが、膝蓋下脂肪体（IFP）の線維化も関節炎の程度を評価する上で重要な病態であり、我々は MIA ラット関節炎モデルにおける IFP の表面と内部」の変化を評価するスコアを作成した。

＜方法＞

Wistar ラット（オス、8 週齢）に対し、右膝に MIA(0.1mg、0.2mg、0.5mg、1mg/50μl)、左膝に PBS を 50μl ずつ膝関節内注射した（n = 4）。注射後 2、4、6、8、12 週で膝関節を摘出した。肉眼所見は MIA モデルに特徴的な所見で構成したオリジナル・スコアを作成し定量的に評価した。組織学的所見は摘出した膝関節でパラフィン標本を作成し、サフラニン O 染色を行い、OARSI　score で評価した。また関節炎を評価するため、Wistar Rat（オス、8 週齢）に対し、右膝に MIA(0.2mg、1mg/50μl)、左膝に PBS を 50μl ずつ膝関節内注射した（n = 4）。注射後 1、3、5、7、14 日で膝関節を摘出した。パラフィン標本をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、滑膜の炎症、膝蓋下脂肪体(IFP)の変化の含むオリジナル・スコアを作成し、定量的に評価した。

＜結果＞

肉眼的所見では 0.1mg 群では 4 週まで変化が見られず、4～8 週で点状陥凹を認めるものの軟骨表面の光沢は保たれていた。12 週では点状陥凹の数が増加した。0.2mg 群では 4 週までで一部に点状陥凹を認め、4～6 週で点状陥凹の数が増加した。8 週～12 週では軟骨表面に一部潰瘍を認めた。骨破壊は認めなかった。0.5mg 群では 2 週で潰瘍を認め、4 週でほぼ関節面全体が潰瘍となり、骨破壊へと進行した。1mg 群では 2 週で関節面全体が潰瘍となり、4 週以降で強い骨破壊と認めた。肉眼的スコアは、0.1mg 群では 4 週では 0.75±0.43 点で、徐々に増加した。0.2mg 群では 2 週で 1.25±0.43 点で徐々に増加し、8 週以降は増加しなかった。0.5mg 群、1mg 群では早期から高いスコアで、4 週では満点に達した。

組織学的所見では 0.1mg 群と 0.2mg 群では 2 週から軟骨層の染色性の低下を認め、徐々に深層に拡大した。0.2mg 群では 12 週で軟骨下骨が一部露出した。どちらの群でも骨破壊は認めなかった。0.5mg 群と 1mg 群では 4 週以降で強い骨破壊を認めた。OARSI　score で評価すると、0.1mg 群では 4 週では 3.5±2.9 点で、徐々に増加した。0.2mg 群では 2 週で 5.5±3.2 点で徐々に増加し、8 週以降は増加しなかった。0.5mg 群では 2 週で 19±1.7 点、1mg 群では 2 週で 20±2.8 点、と早期から高いスコアで、4 週では満点に達した。Mankin スコアでも評価したが、同様の推移であった。

IFP の炎症は 0.2mg 群では注射後 3 日で滑膜増生が見られ、注射後 5 日、7 日で IFP の線維化が見られた。その後滑膜増生、IFP の線維化は減衰した。1mg 群では注射後 3 日、5 日では 0.2mg 群と同様の変化であったが、その後滑膜がさらに増生し、IFP の線維化も注射後 14 日まで増強

した。本研究で作成したスコアでは 0.2mg 群では 5 日をピークとしたが、1mg 群では 14 日まで増加した。

＜考察＞

本研究では低用量群では早期では変化は見られず、4～6 週で軟骨表面の不整がみられるものの、骨破壊は認めなかった。高用量群では 4 週以降で強い骨破壊と認めた。MIA ラット関節モデルは用量依存性、時間依存性に軟骨変性が生じることは MIA による関節炎を評価していく上で重要である。

MIA による軟骨変性を生じる機序として、プロテオグリカンの減少や軟骨細胞増殖の抑制、軟骨細胞死の誘導、が挙げられる。本研究においても 0.1mg 群の早期からサフラニン O の染色性の低下が見られたが、コラーゲンⅡ抗体免疫染色で変化はみられなかった。

Wistar ラットにおける MIA 関節炎モデルを使用した報告では Mohan ら、Thote らが低用量 MIA も使用し、我々と同様の結果を得ている。また Guingamp ら、Ferreira-Gomes ら、Bove らは低用量 MIA では我々と同様だが、高用量 MIA で骨破壊が見られていないが、これら結果の違いは本研究より若齢のラットを用いていることによるものと考えられる。またラットの種により MIA による軟骨変性が違うことも報告されており、Sprague-Dawley ラットの MIA 関節炎モデルの報告では Wistar ラットと比べ軟骨変性が軽度である。

MIA の用量は軟骨変性や関節炎の程度を規定するのに重要であると考えられるが、MIA の作用時間など未だ解明されていない点もあり、今後さらに低用量の MIA の使用や長期間の観察が必要である。これまで MIA 関節炎モデルの肉眼的所見の評価として Guingamp ら報告しているスコアが用いられてきたが、点状陥凹などの早期の所見が含まれておらず、低用量かつ早期の評価には適していない。我々は軟骨表面に見られる 0.1mm 程度の軟骨表面の陥凹を MIA 関節炎モデルにおける特異的な所見と捉え、スコアに取り入れた。

滑膜炎、IFP の炎症は OA による関節炎を評価するために重要は病態である。我々が作成したスコアでは 0.2mg 群では 5 日をピークとしたが、1mg 群では 14 日まで増加した。このことから 0.2mgMIA による炎症は可逆的変化であり、1mgMIA による炎症は不可逆的変化であると考えらえる。これまでの滑膜炎を評価するスコアでは IFP の線維化の評価はされていなかったため、今回我々は IFP の線維化を含めたスコアを作成した。

本研究で MIA による軟骨変性や骨破壊は用量依存性、時間依存性に変化し、低用量 MIA は骨破壊のない軟骨変性を生じることができ、よりヒト変形性関節症に近い関節変を得られる。また MIA ラット関節炎における炎症は 0.2mg では可逆的であり、1mg では不可逆的であると考えられた。今後さらなる用量や観察期間を加えた研究が必要であるが、低用量 MIA によるラット関節炎モデルは、変形性関節症の病態や疼痛機序、治療効果の評価において有用である。

＜結論＞

モノヨード酢酸は濃度依存性および時間依存性に関節炎、滑膜炎を引き起こす。低用量 MIA によるラット関節炎モデルは、変形性関節症の病態や疼痛機序、治療効果の評価において有用である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5061　号	宇土　美於
論文審査担当者	主　査　大川　淳 副　査　上阪　等、金井　正美	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

ラット関節炎モデルを応用して、変形性関節症モデル作成を試みた論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

動物を用いた変形性関節症モデルは薬剤性モデル、手術モデル、走行負荷モデルなどがあるものの確立されたものはない。筆者らは、これまで関節炎モデルとして用いられてきたモノヨード酢酸の膝関節内投与ラットにおいて、投与量を減じることで関節破壊を抑え、炎症なしに軽度の軟骨変性を誘発できるモデルを作成した。ヒト変形性膝関節症により近い病理像を安定的に得られることで有用性の高い動物モデルといえる。

２）社会的意義

変形性膝関節症は、超高齢社会を迎えた我が国において 7-800 万人が罹患する普遍的な疾患であるが、本質的な病態、発生機序の研究を深化させるには疾患動物モデルの作成が不可欠である。その点で、ラットの動物モデル確立は今後の病態研究、治療法発展に大きな意義がある。

３）研究方法・倫理観

Wistar ラットを用いて、モノヨード酢酸の用量を振り分けて、ラット膝関節内に投与し、膝関節内の肉眼的および組織学的変化を継時的に検討した。従来の関節炎誘発モデル作成時の 1/5～1/10 の投与量で、骨破壊を伴わず、滑膜炎症も軽微な病理像が得られた。また、これまで研究が不十分であった膝蓋下脂肪体の炎症と線維化もオリジナルスコアを用いて評価を行い、変形性膝関節症に近い状態が得られたことを確認した。

本研究は従来の研究の問題点を十分に検討したうえで遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、周到な準備の上に行われてきたことが窺われた。

４）考察・今後の発展性

変形性膝関節症の病態の研究、治療法の開発に極めて有用なモデルと考えられる。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に十分価値があると判断された。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	熊谷　智彰
論文審査担当者	主査　烏山　一 副査　吉田　雅幸　横関　博雄
論　文　題　目	Loxoprofen sodium induces the production of complement C5a in human serum

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

好塩基球活性化試験（BAT）は、アレルゲンによる好塩基球の活性化を指標として IgE 依存型アレルギーのアレルゲンを同定する検査である。我々は予備実験で、シクロオキシゲナーゼ（COX）阻害薬の非ステロイド型抗炎症薬（NSAID）の一種であるロキソプロフェン製剤に対し過敏症既往歴を持つ患者検体の BAT 測定をおこなった。通常アッセイの 15～30 分間の反応では好塩基球の活性化例はなかったが、反応時間を 24 時間に延長するとほとんどの検体で好塩基球の活性化が認められた。また、健常人検体においても、高濃度のロキソプロフェン製剤を添加し 24 時間反応すると好塩基球活性化が見られた。

この結果から、ロキソプロフェン添加 24 時間反応により、好塩基球活性化作用を持った何らかの因子が生じたと考えられた。本研究では好塩基球活性因子の同定を試みた。血液とロキソプロフェンの 24 時間培養液中に好塩基球活性化因子が存在することを確認し、活性化因子は細胞からではなく血清から生じることを突き止めた。プロテオミクスと薬理学手法により、活性化因子がアナフィラトキシンとして知られる C5a であることを明らかにした。

本研究結果は、*in vitro* でロキソプロフェンが健常人血清から C5a を生じさせ、好塩基球を活性化させることを示している。健常人血清からの C5a 産生には、高濃度のロキソプロフェン（300 μg/mL）が必要で、ロキソプロフェンの Cmax が 5.04 μg/mL であることを考えると、生体中で起こる可能性は低いと推測されるが、今後、患者検体を用いた解析を行ない薬物アレルギーとの関係を調べることが重要と考える。

＜緒言＞

BAT は IgE 依存型アレルギーのアレルゲン同定検査で、被験者全血に被験物質を反応させて、アレルゲン特異的 IgE 受容体シグナルによる好塩基球表面の活性化マーカー（CD203c または CD63）の発現増加を解析するもので、食物・環境因子・薬剤などを対象とした数々の実施報告がある。

ロキソプロフェン製剤は、我が国で開発された NSAID の一種で、それまでの薬剤と比べて胃に対する障害が少ないため我が国では広く服用されており、2011 年からは一般用医薬品に分類さ

れ薬局での購入も可能になっている。薬物アレルギーを含む副作用例も多数報告されている。

我々は、ロキソプロフェン製剤による過敏症既往歴を持つ患者全血について、ロキソプロフェン製剤を抗原としたBATを予備的に実施した。反応時間30分では全て陰性であったが、反応時間を 24 時間まで延長した場合、ほとんどの患者検体で好塩基球の活性化がおこることを見出した。同時に、健常人全血でも高濃度ロキソプロフェンとの 24 時間反応で同様の活性化が認められた。好塩基球はアレルギーにおいて重要な働きを担っているため、この活性化のメカニズムが薬物アレルギーと関係している可能性が考えられた。

そこで我々は、ロキソプロフェン製剤と健常人血の 24 時間培養において好塩基球が活性化する原因を明らかにするために本研究を行った。

＜方法＞

ヒト由来全血並びに血清は、書面でインフォームドコンセントを得た健常人ボランティアより採取した。

BATは、Allergenecity kit (Beckman coulter) を用いて行なった。方法を簡単に説明すると、全血50μLに対し、被験物質溶液50 μL、PC7標識抗CD3・FITC標識抗CD294・PE標識抗CD203c各抗体の混合カクテル10 μLと反応させ、37℃で指定時間インキュベートした後フローサイトメトリーで好塩基球のCD203cの蛍光強度を測定した。1時間以上反応する場合、抗体の添加は最後の30分とした。

ロキソプロフェン製剤のロキソニン（第一三共）1錠を80 mLのPBSに溶解後、不溶物除去と滅菌のために濾過し、水溶性画分とヒト血清を1:4で混合した溶液を37℃ 24時間インキュベートしてロキソプロフェン処理血清とした。BATでの好塩基球活性化を指標に、ロキソプロフェン処理血清に含まれる好塩基球活性化因子をプロテインAカラムおよびイオン交換体カラムで分画精製した。分画サンプルを2次元電気泳動し、ロキソプロフェン製剤を含まないPBSで処理した血清のサンプルと比較して差のあるスポットを分離し、質量分析解析でタンパク質因子の同定を行った。

薬剤血清中のC5aはELISAキット（Hycult Biotech）を用いて定量し、C5a受容体（CD88）を介したシグナルの確認にはC5a受容体拮抗阻害剤W54011 (Merck Millipore) を用いた。

＜結果＞

健常人全血を用いたBATでロキソプロフェンの反応を調べると、30分の反応時間では好塩基球の活性化は見られなかったが、24時間反応ではCD203cの発現増強が認められ、好塩基球の活性化が認められた。ロキソプロフェンとの24時間反応液の上清を新鮮血に添加すると、30分の反応で好塩基球の活性化が見られた。このため、ロキソプロフェンの24時間BAT反応における好塩基球活性化は、薬物の好塩基球への直接の作用ではなく、何らかの活性化因子が生じ、その因子を介して好塩基球の活性化がおこっていると考えられた。

次にその活性化因子の産生源を調べるため、全血を赤血球・末梢血単核球・血清に分け、それぞれにロキソプロフェンを 24 時間作用させたところ、活性化因子の産生はほとんど血清への作用で起こっていることを見出した。このことより、活性化因子は細胞由来ではなく、血清成分の

変化によるものと推測された。活性化因子の産生は 20 時間以上の反応でプラトーに達していた。

活性化因子の同定をするために、ロキソプロフェン処理血清をプロテイン A カラムおよびイオン交換カラムを用いて分画・精製した。分画サンプルを 2 次元電気泳動で展開し、PBS 処理血清(コントロール）との比較で、ロキソプロフェン処理特異的なスポットを質量分析解析することにより補体成分 C5a を同定した。血清の薬剤処理反応における C5a 量の経時変化は、好塩基球活性化経過と相似していた。さらに、好塩基球に C5a 受容体阻害剤を作用させると、ロキソプロフェン処理血清による活性化は見られなくなった。これらの結果は、ロキソプロフェンと血清を 24 時間反応で生じた好塩基球活性化因子が C5a であることを支持している。

＜考察＞

我々は、ロキソプロフェン製剤と血液の 24 時間培養において血中の好塩基球が活性化状態になる現象を予備的に発見していた。本研究によって、その現象はロキソプロフェンが血清成分に作用して生じた補体因子 C5a の好塩基球への作用であることが明らかになった。同じ COX 阻害薬のアセチルサリチル酸（アスピリン）にも、血清中の補体経路を活性化する作用が報告されているが、そのメカニズムは明らかになっていない。COX は細胞内に局在する酵素であり、細胞を含まない血清で、ロキソプロフェンの COX 阻害作用が働いて C5a が産生される可能性は考えにくい。また一方で、他の補体因子 C3a の産生も確認されたことから、少なくともこの補体活性化は、経路のより上流から段階的に進行している事が示唆される。今後、他の COX 阻害薬の C5a 産生能を調べるとともに、C5a 産生に至るメカニズムを解明する必要がある。

C5a は、アナフィラトキシンとして知られ、細胞集積など局所の炎症に関係している。このため、薬物アレルギーでの関与が考えられるが、血清とのインキュベーションで C5a を産生させるロキソプロフェン濃度は、ロキソプロフェン服用による血中最大濃度より 2 オーダー高いため、生体では起こらない現象と考えられる。しかし、本研究は健常人の血液を用いた結果であり、産生には個人差があることを確認しているため、薬物アレルギー患者での確認は必要である。また、臨床症状と全く関係のない非特異的現象であった場合であっても、C5a 産生または産生した C5a の作用を阻害することにより､同様の作用を持った薬の BAT 検査での偽陽性を排除できる可能性がある。今後、臨床サンプルの測定において、これらの点を明らかにしていきたい。

＜結論＞

ロキソプロフェン製剤と血清の長時間反応によって血清中に C5a が産生される現象を発見した。C5a は好塩基球を活性化するため、細胞生物学的検査での配慮が必要である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5062　号	熊谷　智彰
論文審査担当者	主　査　烏山　一 副　査　吉田　雅幸　横関　博雄	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、アレルギー検査として頻用されている好塩基球活性化試験（BAT）に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

BAT は IgE 依存型アレルギーにおける原因アレルゲンの同定に頻用されている検査であるが、非ステロイド性抗炎症薬のひとつであるロキソプロフェンに対してアレルギーを呈する患者の BAT の解析についてはこれまで詳細な研究はなされていなかった。

２）社会的意義

本研究で得られた主たる研究結果は

１．ロキソプロフェンがアレルギー患者のみならず健常者の検体でも好塩基球を活性化することを見いだした。

２．高濃度のロキソプロフェンと２４時間反応させた正常血清の生化学的解析から、血清中に生成された補体成分 C5a が好塩基球活性化分子として機能していることが明らかとなった。

本研究成果はアレルギー検査として頻用されている BAT の検査結果の解釈に注意を要することを示唆したものであり、臨床的にも意義深い。

３）研究方法・倫理観

非ステロイド性抗炎症薬のひとつであるロキソプロフェンに対してアレルギーを呈する患者ならびに健常者の末梢血をロキソプロフェンとともに培養し、好塩基球の活性化の程度を比較した。長期（２４時間）培養では、アレルギー患者のみならず健常者の好塩基球も活性化されることが明らかとなった。倫理上の問題はない。

４）考察・今後の発展性

本研究は試験管内での実験に基づくものなので、生体内で同様のことが起こっているかは不明であるが、BAT の検査結果の解釈・判定に注意を要することを示唆したものであり、臨床的にも意義深い。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	川村　尚子
論文審査担当者	主査　内田　信一 副査　植竹　宏之、明石　巧
論　文　題　目	Recovery of renal function after radical nephrectomy and risk factors for postoperative severe renal impairment: A Japanese multicenter longitudinal study

（論文内容の要旨）

背景

この約 10 年で、根治的腎摘除は腎部分切除と比較して術後の慢性腎臓病発症のリスクを有意に上昇させることが、欧米や東アジアから複数報告されている。根治的腎摘除と比較して腫瘍学的成績は同等であり、機能温存に優れるため、近年、腎部分切除が小径腎腫瘍の標準治療となった。しかし、外科的手術後に発症した慢性腎臓病は、内科的疾患を原因とする慢性腎臓病と異なり、全生存率に影響しないという報告もあり、根治的腎摘除後の腎機能低下の影響に関してはまだ不明な点が多い。

根治的腎摘除後の経時的な推移についての報告は世界的にも少なく、日本人における比較的短期間の観察や、欧州における比較的長期間の観察では有意な回復が報告されているが、日本人の長期的な推移はこれまで報告されていない。

また、根治的腎摘除後に徐々に腎機能が低下し、最終的に透析にいたる症例も 1-2%程度存在するが、重篤な腎機能低下がどのような患者に生じるのかはまだ十分に解明されていない。

目的

今回の多施設共同研究では、根治的腎摘除後の 10 年にわたる長期的な腎機能の推移を調べ、さらに、術後の重篤な腎機能低下に関する予測因子を検討した。

対象と方法

東京医科歯科大学、東部地域病院、JA とりで総合医療センター、さいたま赤十字病院、土浦協同病院において 1994 年から 2011 年までに、1033 人が腎癌と診断され根治的腎摘除を施行された。そのうち、術前から転移を有する症例(58 例)、透析症例(60 例)、両側腎癌症例(3 例)、観察期間が 1 年未満の症例(211 例)を除外した 701 人を解析対象とした。423 例にはガスレス・シングルポート根治的腎摘除が、残りの 278 例には開放根治的腎摘除が行われた。術前の年齢、性別、肥満指数、合併症、腫瘍径などの臨床的背景因子を、カルテから抽出し記録した。本研究の主要評価項目である腎機能推移を調べるため、各患者の毎年の血清クレアチニン値を術後 10 年まで記録した。経過観察中に再発を来した症例、透析を導入された症例はその時点で観察打ち切りと

した。

まず血清クレアチニンから推定糸球体濾過量を算出し、その平均値の推移を 10 年までプロットした。推定糸球体濾過量の年次変化量を、線形混合モデルを用いて算出した。また、患者をリスクとなりえる術前の要素（65 歳以上の高齢、推定糸球体濾過量 60 mL/min/1.73 m^2 未満と定義される慢性腎臓病、高血圧、糖尿病、心血管疾患の有無）で分け、グループごとに推定糸球体濾過量の年次変化量を算出した。推定糸球体濾過量の計算は、日本腎臓学会の次の計算式を用いた。

推定糸球体濾過量（mL/min/1.73 m^2）= 194 × 血清クレアチニン（mg/dl)$^{-1.094}$ × 年齢$^{-0.287}$ × 0.739 (女性の場合).

次に、二次評価項目として、重篤な腎機能低下を検討した。重篤な腎機能低下の指標には 50%以上の推定糸球体濾過量の低下を用いた。理論的には、50%の推定糸球体濾過量の低下は、慢性腎臓病ステージの 1 段階の進行に相当し、また腎摘除によるネフロンの半分の損失を上回る内因的な腎機能の低下が含まれることを意味している。非 50%以上推定糸球体濾過量低下生存率はカプランマイヤー法で計算した。また、上述のリスクとなりえる要素と 50%以上の推定糸球体濾過量の低下との関連を、コックス比例ハザードモデルで検討し、そこで得られた独立予測因子を用いてリスク分類モデルを作成した。

結果

701 人の患者のうち男性は 469 人であった。手術時年齢、肥満指数、術前推定糸球体濾過量、腫瘍径の中央値はそれぞれ、64 歳、23.4kg/m^2、69.6mL/分/1.78m^2、4.1cm であった。慢性腎臓病、高血圧、糖尿病、心血管疾患を有する患者の割合はそれぞれ、25.4%、42.8%、15.2%、15.8%であった。観察期間（中央値 62 か月）中に末期腎不全となり透析を導入された患者は 9 人（1.3%）で、再発は 76 人に認められた。また、20 人が他因死した。

根治的腎摘除後一年目の平均推定糸球体濾過量は 45.7 mL/min/1.73 m^2 であり、10 年目には 51.3 mL/min/1.73 m^2 まで回復していた。線形混合モデルを用いて算出した推定糸球体濾過量の年次変化量は、0.34 mL/min/1.73 m^2 (95% 信頼区間: 0.17 – 0.50)であり、根治的腎摘除後の腎機能は有意に回復していた。リスクとなりえる術前の要素の有無で分けたグループごとに推定糸球体濾過量の年次変化量を算出すると、慢性腎臓病、高血圧、糖尿病、心血管疾患を有する患者においては、増加傾向は認められなかった。一方、65 歳以上の高齢者も若年者と同様に術後腎機能の回復が認められた。

根治的腎摘除後、50%以上の推定糸球体濾過量の低下は 58 人で認められた。単変量解析では、高齢、高血圧、糖尿病、心血管疾患が術後 50%以上の推定糸球体濾過量低下に関連していたが、一方で術前の慢性腎臓病は、有意な関連を認めなかった。多変量解析では、高齢と糖尿病が、術後 50%以上の推定糸球体濾過量低下に関する独立予測因子であった。予測因子を有さない群、一つ有する群、二つ有する群にわけてカプランマイヤー法で非 50%以上推定糸球体濾過量低下生存率を求めると、5 年生存率はそれぞれ 96.5%、90.4%、75.6%であり、有意差が認められた。

考察

この多施設共同研究では、根治的腎摘除を施行された患者では、術後腎機能は一旦低下するものの、長期的に回復傾向にあることが示された。この回復傾向は高齢者でも若年者でも同様に認められた。しかし術前から慢性腎臓病、高血圧、糖尿病、心血管疾患を有する患者では腎機能の回復傾向は有意ではなかった。また、高齢と糖尿病は術後の 50%以上推定糸球体濾過量低下に関連する独立予測因子であった。

腎癌に対して根治的腎摘除を施行しても、内科的疾患を原因とする慢性腎臓病と異なり、いったん低下した術後の腎機能は長期的には回復傾向にあるため、多くの患者では厳格な食事制限や透析といった重篤な腎機能低下に伴うような問題を来すことはない。しかし、根治的腎摘除後に末期腎不全にいたりついには透析導入となる患者は一定の割合で存在する。よって、患者ごとに術前に根治的腎摘除の適応を十分に検討する必要がある。本研究では、慢性腎臓病、高血圧、心血管疾患、糖尿病を有する患者、および高齢者においては、術後腎機能の維持が不利であることが示された。そのような患者においては特に、術後の腎機能をできるだけ正確に予測することがより重要になると考えられる。

多変量解析では、高齢と糖尿病は術後 50%以上推定糸球体濾過量低下の独立した予測因子であることが示された。

高齢者では、全体としては術後の腎機能が有意に回復するが、高齢者において重篤な腎機能低下は若年者に比べ有意に多く発生する（ハザード比 2.67）。この傾向は、年齢のカットオフを変えても、あるいは年齢を連続変数として扱っても同様であった。糖尿病患者においては、回復傾向にない術後腎機能の推移が、重篤な腎機能低下につながるものと考えられる。50%以上の推定糸球体濾過量低下を来した 58 人のうち、34.5%が糖尿病を有し、70.7%が 65 歳以上であった。術後 50%以上推定糸球体濾過量低下を来したのは、65 歳以下で糖尿病を有さない 304 人中では 11 人（3.6%）であったのに対し、65 歳以上で糖尿病を有する 59 人中では 14 人（23.7%）に上った。高血圧を有する患者では推定糸球体濾過量の年次変化量は有意な増加傾向になかった。また、多変量解析でも、高血圧は術後 50%以上推定糸球体濾過量低下に関連する傾向にあり、高血圧は術後腎機能低下をもたらしえると考えられた。したがって、術後の腎機能低下をもたらしえるリスクを有する患者に対して根治的腎摘除を行うには、その適応を十分考慮する必要がある。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、後ろ向きの多施設共同研究であり、蛋白尿、高尿酸血症、脂質異常症、喫煙歴、腎疾患など腎機能に関連する重要な因子を集計できなかった。また、高血圧や糖尿病などの合併症の治療歴や重症度なども腎機能に関連する重要な因子であるが、今回は評価が不可能であった。しかし本研究で検討された年齢、慢性腎臓病、高血圧、糖尿病、心血管疾患はもっとも基本的な、確立された腎機能に関連するリスク因子であり、これらの因子が根治的腎摘除後の長期的な腎機能の低下に関連することが明らかにされたことは非常に重要と考える。第二に、本研究では腎機能の指標として日本腎臓学会の推定糸球体濾過量計算式を用いたことが挙げられる。この計算式は主に慢性腎臓病患者のデータをもとに作られているため、正常な腎機能患者に用いるのは問題がある可能性がある。推定糸球体濾過量の計算式には様々なものがあり、どの計算式を用いるかでその値は異なる。複数の論文で、推定糸球体濾過量が 60 mL/min/1.73 m^2 と定義される慢性腎臓病の新規発症をエンドポイントとしているが、用いる式

によってその結果は揺らいでしまう。

本研究では推定糸球体濾過量の比をエンドポイントとして用いることで、それらの影響を最小限に抑えたと考えられる。

結論

日本人において、根治的腎摘除直後に低下した腎機能は、長期的には回復傾向にある。しかしながら、慢性腎臓病、高血圧、糖尿病、心血管疾患を有する患者では術後腎機能の回復傾向は認められなかった。高齢と糖尿病は、術後 50%以上の推定糸球体濾過量低下の独立予測因子であった。術後腎機能低下にリスクを有するこれらの患者においては、腎癌の治療と術後の経過観察に充分注意を払う必要がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5063　号	川村　尚子
論文審査担当者	主　査　内田　信一 副　査　植竹　宏之、明石　巧	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、腎がんに対する腎摘後の長期の腎機能の推移について、その増悪因子についてレトロスペクティブに検討した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

腎摘後の腎機能の予後に関する報告は、すでにいくつかあるが、本研究のように 10 年という長期の予後を本邦で検討した研究は無かった。また予後悪化要因に対する解析は、術前の医師および患者双方に重要な情報をもたらすことになる。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1.　腎摘後の長期の腎機能の変化は、進行性に増悪するものは少なく、術後一過性に低下した糸球体濾過量は 10 年を経て改善傾向に向かう。

2.　全体としては改善傾向に向かう中にも、一部糸球体濾過量が半減する症例もおり、そのリスク要因としては、65 才以上の高齢、術前の糖尿病の有無、が解析の結果明らかとなった。

３）研究方法・倫理観

研究は、多施設の腎摘症例を、各施設の倫理委員会の承認を得て、レトロスペクティブに解析することで行われた。申請者は、統計学的な解析法に精通しており、研究手法や倫理観について問題無いと思われた。

４）考察・今後の発展性

今後増加すると思われる高齢者の腎摘手術に対して、術後の腎機能低下のリスクを予測し、適切に患者に IC するための有用な情報を本研究は提供している。さらに、摘出標本の非癌部の腎組織をみなおすことで、腎機能低下例の病態やその予測をさらに精度良くできる事になる可能性もあり、今後その方面への研究の発展が期待された。

３．その他　　特になし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	中川　潤
論文審査担当者	主査　泰羅　雅登 副査　豊福　明、成相　直
論　文　題　目	Women's Preference for a Male Acquaintance Enhances Social Reward Processing of Material Goods in the Anterior Cingulate Cortex

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ギフトの受け渡しは世界中で普遍的に見られる、感情・認知・意思決定を含む高度な対人コミュニケーションの一形態である。特に異性間では交際関係の促進などを目的として、男性はしばしば女性にギフトを贈る。このとき受け手の女性がギフトに込められた暗黙の意味を正しく判断することは、円滑な対人関係の確立のために極めて重要である。このように、物品に込められた社会的意味を判断する神経基盤の理解は、高度に発達した対人コミュニケーションの脳内機序の基礎を明らかにする上でも重要であるが、これまでに得られている知見はほとんどない。そこで、本研究ではギフトに込められた意味の判断を通して、高度な対人コミュニケーションを支える神経基盤の一部を明らかにすることを目的とした。具体的には女性被験者が実在する知人男性から受け取ったギフトの価値判断をするという設定のもと、機能的磁気共鳴画像法（functional magnetic resonance imaging: fMRI）を用いて脳活動を計測した。実験は（i）女性被験者の知人男性に対する態度（好意のある異性、または興味のない異性の 2 人）、および（ii）ギフトのタイプ（ブーケ、イヤリング、香水などロマンティックな物品、または鉛筆、メモ帳、貯金箱などロマンティックでない物品の 2 種類）を因子とし、それぞれの異性からそれぞれのタイプのギフトをもらったときにその価値を評価する際の脳活動を検討した。その結果、（1）好意のある異性からギフトを受け取った場合は、そのタイプに関わらず報酬系の尾状核が活性化した。また（2）好意のある異性からロマンティックなギフトを受け取った時は、そうでないギフトを受け取った時よりも前帯状回が選択的に活性化することが分かった。一方、興味のない異性の時ではそのような活動の違いはなかった。さらに（3）好意のある異性からロマンティックなギフトを受け取った場合に限り、（2）で活性化した前帯状回は補足運動野・背側前帯状回と機能的に結合することがわかった。この結合領域は背内側前頭皮質に位置し、他者の行動を観察したり、意思決定において感情・認知を統合したりする機能を持つ。これらの結果は物品の社会的意味判断において以下の 3 つの情報処理の可能性を示唆する。すなわち、女性が男性からギフトを受け取った時、(1) 贈り手に対する選好が高いほどそのギフトの報酬価は高く評価される。(2) 贈り手への選好が高い場合に限り、ギフトに込められた社会的意味に対する報酬価の判断が前帯状回によって計算される。(3) 選好の高い贈り手から受け取った社会的報酬価の高いギフトに対する総合的な価値判断には、前帯状回と補足運動野・背側前帯状回の協調的な活動が関与しており、これらの活動が

高度な対人コミュニケーションを可能にしている。

＜緒言＞

対人関係のうち、異性間で見られるコミュニケーションは、哺乳類の異性選択から進化した社会的相互作用と考えられる [1)]。このなかで男性は女性にギフトを贈ることがある。物品（オブジェクト）に暗黙の意味（異性間では多くは情緒的で甘美な、ロマンティックな意味）を込めることで贈り手の意図や期待を潜在的に伝えることは、人間に固有の高度なコミュニケーション様式である [2)]。ギフトの受け手が物品に込められた暗黙の意味を正しく判断する神経基盤の理解は、対人コミュニケーションの脳内機序を明らかにする上でも重要であるが、これまでに得られている知見はほとんどない。そこで、本研究では異性間のギフトの授受を通して、高度な対人コミュニケーションを支える神経基盤の一部を明らかにすることを目的とした。実験ではギフトを受け取った女性がその価値判断をする際の脳活動を fMRI を用いて検討した。

本研究の重要な概念として、感情を用いた社会的判断がある。我々は他者に対する感情を優先的に用いて、多くの判断を行う。一例としては、広告に出るモデルの魅力度が消費者の購買に影響する現象があげられる [3,4)]。これをもとに本研究では次の仮説を立てた。すなわち、女性が男性から受け取ったギフトの価値を評価する際に、（i）誰がギフトの贈り手であるか、および（ii）ギフトが何を意味するか、の 2 点を判断すると考えた。このとき、ギフトの贈り手への選好がギフトの社会的意味の判断に大きな影響を及ぼすと考えた。

＜方法＞

研究は東京医科歯科大学医学部の倫理審査委員会（番号: 1705）、および玉川大学の倫理審査委員会（番号: N24-4）より承諾を得た後、ヘルシンキ宣言の原則を遵守して行われた。被験者及び後述する評定者全てから書面でインフォームドコンセントを行い、同意書を得た。27 名の健康な右利きの女子大生（19.81 ± 1.14 歳）が fMRI 実験に参加した。被験者に 2 人の知人男性（好意のある男性、興味のない男性）をあげてもらい、似顔絵を描いてもらった。被験者にカバーストーリーを呈示し、知人男性から誕生日にロマンティックなギフト（ブーケ、イヤリング、香水など）をもらったときと、そうでないギフト（鉛筆、メモ帳、貯金箱など）をもらったときの、ギフトの魅力を 9 段階で答えてもらった。この価値判断の際の脳活動を fMRI で撮像した。被験者のうち著しい体動、睡眠、理解不足のあった 7 名を除外し、20 名のデータを解析した。なお、ギフトがロマンティックであるかどうかは、前もって 31 名の女子大生の評定者（19.90 ± 1.33 歳）に判断してもらい、それぞれ 30 個ずつを実験に用いた。このため、実験のギフトは同世代で同じ経済水準を持つ女性の価値観を反映していると考えられる。また、ギフトという社会的意味が付与される前の、物品自体の魅力度を評定者に評価してもらい、平均的な魅力度の物品（9 段階中 5 点前後）をギフトとして用いた。

刺激条件は 2 × 2 要因デザインからなる 4 条件を用いた。要因とレベルは、（i）知人男性への態度（好意のある、興味のない）、及び（ii）ギフトのタイプ（ロマンティックである、ない）である。コントロール条件では、相手の顔を見たらボタンを押すよう教示した。刺激条件とコントロール条件の差分により、ギフトの価値判断に特異的な脳活動が求められる。以上から得られ

た行動データを統計解析用ソフトウエア SPSS で、脳活動データを MRI データ解析用ソフトウエア SPM8 で解析した。脳画像のコントラスト解析の閾値はボクセルレベルで $p < 0.001$ (uncorrected)、クラスターレベルで $p < 0.05$ (FWE corrected)とした。また、特定の認知機能が領域間の機能的結合に与える影響を評価する psycho-physiological interaction (PPI) 解析を行った。この閾値はボクセルレベルで $p < 0.001$ (uncorrected)、クラスターレベルで連続する 80 ボクセル以上とした。

＜結果＞

結果は 3 点にまとめられる。（1）相手が好意のある異性であると、ギフトの報酬価が上がった ($F_{(1, 38)} = 458.50, p < 0.001$)。このとき、両側尾状核が活性化した。（2）相手が好意のある異性の時、ロマンティックなギフトの報酬価は、そうでないギフトの報酬価よりも高かった (Bonferroni corrected $p < 0.001$)。このとき、左前帯状回が選択的に活性化した。一方、相手が興味のない異性の時、ギフトのタイプの違いで報酬価に有意差はなく、左前帯状回も活性化しなかった。（3）好意のある異性からロマンティックなギフトを受け取る場合に限り、左前帯状回と相関して左補足運動野・背側前帯状回が機能的に結合することを見いだした。

＜考察＞

異性間のギフトの授受において、受け手の女性が物品に込められた社会的意味を判断する際の脳活動を検討したところ、以下の 3 点が示唆された。

（1）相手への選好が高いほどそのギフトの報酬価は高く評価される。このとき活性化した尾状核は報酬系に属し、ギフトの価値判断への動機を提供していることが考えられる。先行研究でも選好の高い異性の顔を見ることで尾状核が活性化すると報告されている [5,6]。

（2）相手への選好が高い場合に限り、ギフトに込められた社会的意味に対する報酬価の判断が前帯状回によって計算される。前帯状回は動機に基づいて対象の社会的報酬価を計算すると考えられる [7]。これは、他者への感情を用いた社会的判断の仮説を支持する。

（3）相手への選好が高く、かつ社会的報酬価の高いギフトの時の価値判断は、前帯状回と補足運動野・背側前帯状回の相関した活動によって行われる。この機能的結合は、背内側前頭皮質に位置し、意思決定に必要な情報を統合する機能を持つ [8]。感情と認知を合わせた高次の価値判断には、上記の脳領域の協調的活動が重要と考えられる。

本研究は、誰もが経験する異性間のギフトの授受をもとに、知見の少なかった高度な対人コミュニケーションの脳内機序の一部を明らかにした。この研究の応用として、精神疾患の理解が期待される。なかでも統合失調症患者は、異性間の密なコミュニケーションでつまずきやすい [9]ことから、潜在的な社会的意味判断が不得手である可能性がある。本研究の発展によって統合失調症における対人コミュニケーションの偏倚を明らかにすることが出来るかもしれない。

＜結論＞　本研究は、ギフトの授受において受け手である女性の知人男性への選好が、前帯状回でギフトに込められた社会的意味に対する報酬価の処理を促進させることを示した。これは高度な対人コミュニケーションを支える神経基盤の一部を明らかにするものである。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5064　号	中川　潤
論文審査担当者	主　査　泰羅　雅登 副　査　豊福　明、成相　直	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

ギフトの受け渡しは世界中で普遍的に見られる、感情・認知・意思決定を含む高度な対人コミュニケーションの一形態である。その際、受け手がギフトに込められた暗黙の意味を正しく判断することは、円滑な対人関係の確立のために極めて重要である。本論文は、機能的磁気共鳴画像法（functional magnetic resonance imaging: fMRI）を用いて脳活動を計測することで、ギフトに込められた社会的意味を判断する神経基盤を明らかにし、高度に発達した対人コミュニケーションの脳内機序の基礎を明らかにすることを目的としている。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

広告に出るモデルの魅力度が消費者の購買に影響するといったように、我々の判断は他者に対する感情に大きく影響される。しかし、その神経メカニズムはまだ解明されていない。本研究では、女性に、好ましく思っている男性、あるいは、そうは思わない男性からのギフトの価値判断をさせるという、感情が判断に影響をおよぼすことを仮定した実験課題を設定し、行動学的にその影響を確かめた後、脳機能イメージングの一手法である fMRI によって神経機構の解析を行ったものである。その先駆性、独創性は評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は以下のとおりである。

(1) 相手が好ましい異性であるとギフトの価値が上がり、その際、両側尾状核が活性化した。

(2) 相手が好ましい異性であると、ロマンティックなギフトは、そうでないギフトより高く評価され、その際、左前帯状回が選択的に活性化した。

(3) 相手が興味のない異性である時はこのような効果はみられなかった。

(4) 好意のある異性からロマンティックなギフトを受け取る場合、左前帯状回と相関して左補足運動野・背側前帯状回が機能的に結合して活動した。

以上の結果は、我々の判断は他者に対する感情に大きく影響されることを示しており、尾状核においてギフトの送り手が好みであるかどうかが判断された後に、好みの相手であった場合そのギフトに込められた社会的意味の価値判断が前帯状回によって計算され、最終的に、前帯状回と補足運動野・背側前帯状回の協調的な活動によって総合的な価値判断がなされることを明らかに

している。この結果は認知神経生理学的研究として重要な研究であると同時に、４）に述べるように精神疾患の新たな神経科学的理解にも応用のできうる有用な研究成果であるといえる。

３）研究方法・倫理観

本研究は十分な社会心理学、心理物理学、認知神経生理学、さらには神経解剖学的知識の裏付けと脳機能イメージングに対する深い造詣のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術が十分に高いことを示すと同時に、本研究が周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

本研究は、申請者が考察するように、対人コミュニケーションから捉えた精神疾患の神経基盤の理解という新たな観点を提供する可能性がある。例えば、統合失調症患者は、異性間の密なコミュニケーションでつまずきやすいことから、潜在的な社会的意味判断が不得手である可能性がある。本研究の発展によって、統合失調症における対人コミュニケーションの偏倚が明らかになるとともに、統合失調症の神経基盤の解明・バイオマーカーの開発につながることが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	徐　成
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　関矢一郎、平山　順
論　文　題　目	Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice

（論文内容の要旨）

Abstract

The circadian clock controls many behavioral and physiological processes beyond daily rhythms. Circadian dysfunction increases the risk of cancer, obesity, and cardiovascular and metabolic diseases. Although clinical studies have shown that bone resorption is controlled by circadian rhythm, as indicated by diurnal variations in bone resorption, the molecular mechanism of circadian clock–dependent bone resorption remains unknown. To clarify the role of circadian rhythm in bone resorption, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (*Bmal1*), a prototype circadian gene, was knocked out specifically in osteoclasts. Osteoclast-specific *Bmal1*-knockout mice showed a high bone mass phenotype due to reduced osteoclast differentiation. A cell-based assay revealed that BMAL1 upregulated nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (*Nfatc1*) transcription through its binding to an E-box element located on the *Nfatc1* promoter in cooperation with circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK), a heterodimer partner of BMAL1. Moreover, steroid receptor coactivator (SRC) family members were shown to interact with and upregulate BMAL1:CLOCK transcriptional activity. Collectively, these data suggest that bone resorption is controlled by osteoclastic BMAL1 through interactions with the SRC family and binding to the *Nfatc1* promoter.

Introduction

Bone remodeling, which is affected in most bone metabolic disorders, such as osteoporosis, mainly comprises two phases: bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts. Bone resorption and bone formation occur in a balanced manner to maintain constant bone mass.

The circadian clock controls daily rhythms to adapt to a 24-hour day-night periodicity and thereby controls many behavioral and physiological processes. Indeed, disruptions to the circadian clock cause abnormal daily rhythms, which leads to various metabolic diseases,

including obesity, hypertension, and osteoporosis.

In mammals, the central clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the brain, whereas the peripheral clock is located in most other tissues. The central clock has long been considered to synchronize and control the peripheral clock through neuronal and hormonal pathways. In contrast, the peripheral clock has been viewed as a dependent mechanism, simply working to maintain whole-body daily rhythm in cooperation with the central clock. However, this belief was challenged when the tissue-specific function of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (*Bmal1*) was discovered, suggesting that the peripheral clock, especially peripheral BMAL1 may have its own role in peripheral tissues independent of the central clock.

The central clock and the peripheral clock share a common molecular mechanism and comprise an autoregulatory transcriptional-translational feedback loop. The classical clock machinery comprises two positive elements, BMAL1 and circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK), and two negative elements, period circadian clock (PER1, PER2, and PER3) and cryptochrome (photolyase-like) (CRY1 and CRY2). Generally, the heterodimeric transcription factor BMAL1:CLOCK activates the transcription of circadian-related genes, such as *Per* and *Cry*, by binding to the CACGTG-type (or CACGTT-type-like) E-box elements in their promoters. In turn, PER and CRY form a multimeric complex and then inhibit the transcriptional activity of BMAL1:CLOCK. These positive and negative feedback loops have been shown to be involved in many processes, such as aging, adipogenesis, cancer, energy homeostasis, and endochondral ossification. Although the circadian clock mediates the action of leptin in bone formation, its function in bone resorption has not been clearly elucidated.

In this study, we generated osteoclast-specific Bmal1-knockout mice to investigate the involvement of the circadianclock in the mechanisms underlying the regulation of bone resorption and in the interaction between SRCs and the BMAL1:CLOCK heterodimer.

Subjects and Methods

Transgenic mice expressing *Cre*-recombinase under the control of the *cathepsin K* promoter (*Ctsk-Cre* mice) and *nestin* promoter (*Nes-Cre* mice) were mated with floxed *Bmal1* mice ($Bmal1^{f/f}$) mice to obtain the conditional knockout mice. We constructed reporter plasmids and did dual-luciferase reporter assay. We did southern blot analysis to assess the efficiency of recombination using osteoclast and brain genomic DNA.

We injected mice with calcein i.p. 5 days and 2 days prior to euthanasia and stained the undecalcified sections of the third and fourth lumbar vertebrae using Von Kossa and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. We performed static and dynamic histomorphometric analysis using the OsteoMeasure Analysis System. We obtained two-dimensional images of the distal femurs by micro–computed tomography analysis.

We cultured osteoclast from bone marrow cells in α-MEM supplemented with 10% FBS in

the presence of human macrophage colony-stimulating factor and human RANKL. RNAs and proteins were harvested and analyzed by quantitative RT-PCR analysis and Western blot.

Results

Bmal1$^{osc-/-}$ mice show high bone mass through the reduction of the osteoclast number. The absence of *Bmal1* in osteoclasts leads to high bone mass in *Bmal1*$^{osc-/-}$ mice without overtly affecting calcium metabolism and the RANKL/OPG system. BMAL1 regulates bone remodeling independent of the central clock. osteoclast markers, acid phosphatase 5, tartrate resistant (*Acp5*) and *Nfatc1*, their rhythmic expression in bone was dampened in the *Bmal1*$^{osc-/-}$ mice. BMAL1 regulates *Nfatc1* expression in the osteoclast in corporation of CLOCK. BMAL1:CLOCK heterodimeric complex binds to the E-box element in the *Nfatc1* promoter to activate *Nfatc1* expression. SRCs interacted with the BMAL1:CLOCK complex to synergistically activate *Nfatc1* transcription.

Discussion

Studies have shown that the peripheral clock is not strictly controlled by the central clock. Some investigations indicate that the peripheral clock regulates the rhythmic expression of genes in local tissues independent of central clock control. Recently, BMAL1 has been shown to possess tissue-specific functions. In this study, we showed that osteoclast-specific *Bmal1*-knockout mice displayed higher bone mass, whereas neuron-specific *Bmal1*-knockout mice displayed normal bone mass.

The global *Bmal1*-knockout mice showed lower bone mass due to increased bone formation and bone resorption. Furthermore, they showed a bone phenotype similar to the osteoblast-specific *Bmal1*-knockout mice. We believed that BMAL1 inhibited bone resorption through the repression of *Rankl* expression in osteoblasts. In this study, we showed that bone resorption was repressed in osteoclast-specific *Bmal1*-knockout mice. These results demonstrate that *Bmal1* regulates bone resorption through two different mechanisms: indirect inhibition by osteoblasts and direct stimulation by osteoclasts.

Apart from regulating circadian rhythm, the BMAL1:CLOCK heterodimer regulates genes expression as a transcription factor. In the present study, osteoclast-specific *Bmal1*-knockout mice demonstrated abnormal rhythms and decreased expression of *Nfatc1* without overt alterations in the expression of circadian genes. Thus, independent of its effect on circadian regulation, BMAL1 likely regulates bone resorption as a transcription factor; ie, BMAL1 alone increases bone resorption via *Nfatc1* induction in osteoclasts or decreases resorption via the inhibition of RANKL in osteoclasts as a transcription factor.

Bone resorption has a diurnal rhythm. In this work, we demonstrated that BMAL1:CLOCK directly activates *Nfatc1* transcription by binding to the E-box in its promoter. NFATC1 directly and indirectly regulates the expression of bone resorption-related genes, as *Ctsk*,

carbonic anhydrase 2 (*Car2*), interleukin-2 (*IL-2*), demonstrating rhythmic expression patterns. Together, these results indicate that BMAL1:CLOCK may regulate rhythmic bone resorption through the activation of *Nfatc1*. Moreover, it has been demonstrated that SRC-2 expression displays rhythmicity and interacts with BMAL1:CLOCK in the liver. In this study, *SRC* expression levels decreased in the bones of osteoclast-specific *Bmal1*-knockout mice. Moreover, SRCs, as coactivators of BMAL1:CLOCK, amplified *Nfatc1* transcription. These results clearly demonstrate that SRCs are regulated by BMAL1, and BMAL1 and SRCs synergistically affect bone resorption.

Conclusion

BMAL1 in osteoclasts regulated bone resorption through the regulation of *Nfact1* transcription in cooperation with SRCs.

＜論文内容の要旨＞

概日時計システムは、毎日のリズム及び日常行動など様々な生理活動に制御する役割を有する。概日機能障害は癌、肥満、心血管および代謝性疾患のリスクを増大させる。概日時計システムは、レプチン調節を介して、骨形成および成長板と軟骨内骨化における遺伝子発現に影響することが知られているが、骨吸収の調節における概日時計システムのメカニズムがまだ解明されていなかった。

我々は本研究で、骨吸収における概日時計システムの役割を明確にするために、破骨細胞特異性*Bmal1*ノックアウトマウスを作製し、解析した。破骨細胞特異性*Bmal1*ノックアウトマウスは、破骨細胞の数が著しく減少した同時に、高骨量を示した。さらに、転写因子BMAL1:CLOCK heterodimerは*Nfatc1*プロモーターのE-box(-5281bp)との相互作用を介して*Nfatc1*の発現量を調節していた。最終的に、P160ステロイドレセプターコアクチベーター(SRCs)はBMAL1の転写活性をアップレギュレートすることが実証された。つまり、概日時計遺伝子はSRCsファミリーと相互作用により*Nfatc1*プロモーターと結合することを介して、破骨細胞の分化を制御していることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5065　号	徐　成

論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　関矢一郎、平山　順

【論文審査の要旨】

１．論文内容

生物学的営みの概日リズムの影響はいまだ十分に検討されていない。骨吸収における中枢性と末梢性の概日リズムを検討した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

骨吸収における中枢性の概日リズムが知られているが、詳細、特に末梢性の概日リズムについては不明である。骨吸収における概日リズムをマウスの選択的ノックアウトマウスと培養細胞系を用いて明らかにしたことは独創性があり、骨粗鬆症の理解や治療において先駆的な研究である。

２）社会的意義

骨粗鬆症は超高齢化社会において多発する骨折に関連した大きな社会問題の基盤をなす。骨粗鬆症に関する理解の進展は新たな治療法の開発や治療法の適正化に重要である。

３）研究方法・倫理観

本研究では概日リズムに関連する代表的なタンパクの影響を確認して、Bmal1 の影響の大きいことを見出した。Bmal1 の破骨細胞特異的なノックアウトマウスを作成して骨構造を分析し、その骨形成関連因子の変化から Nfatc1 の重要性を確認した。Bmal1 と CLOCK の２量体が Nfatc1 を増加させることを示し、そのエンハンサー領域を詳細に解析した。これらの破骨細胞に対するメカニズムは、RANKL 系と異なるメカニズムであることが示唆された。

選択的ノックアウトの作成は改変動物の倫理指針に基づいて、ライセンスのある会社から購入したマウスを用いた。他の解析に用いた細胞も確立した細胞系であり、方法的にはポピュラーな安全な手法を用いている。ヒトの細胞を使う研究手法は用いていない。

４）考察・今後の発展性

統計学的手法の問題は残るが、超高齢化社会における重大な問題である骨粗鬆症の治療の解決に向けた１つの大切な側面を検討している本研究の意義は小さくない。今後、骨代謝における概日リズムの問題を骨細胞や骨芽細胞においても進めていく可能性があり、今後の研究課題として挙げられている。

３．その他

大学院を２年延長し６年間を費やした本研究の実験のボリュームは非常に大きく、学位申請者の努力は大きいと評価される。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	BLIZNIUK Anastasiya
論文審査担当者	主　査　森尾　郁子 副　査　俣木　志朗、豊福　明
論　文　題　目	Association of oral health literacy with oral health behaviour and oral health status in Belarus

（論文内容の要旨）

Introduction

Oral health literacy is “the degree to which individuals have the capacity to obtain, process, and understand basic oral health information and services needed to make appropriate health decisions”. High oral health literacy is essential to improve people’s awareness of oral disease, knowledge about methods of disease prevention and health maintenance, and to eventually lead people to desirable attitudes and behaviours.

Previous findings demonstrated that low oral health literacy was widespread and could explain certain inequalities in oral health. A number of studies showed that limited oral health literacy contributes to poor oral health status. People with lower oral health literacy are more likely to neglect prevention measures and seek emergency treatment. No study on oral health literacy and behaviour has been conducted in Belarus before.

We hypothesized that oral health literacy level among adult Belarusian population was low and it could negatively affect health behaviours and oral health status. Thus, the objectives of this study were to explore oral health literacy level among adults in Belarus, and to analyze the associations between oral health literacy, socio-demographic status, health behaviours and oral health status.

Methods

The study was conducted using a convenience sample of adult patients who visited the dental division of the district hospital in Belarus during July and August of 2013. Adult patients aged 18-60 years, and without physical or mental disabilities, were asked to participate in this study. The research protocol was approved by the Tokyo Medical and Dental University Ethics Committee (Approval No 901), and a written informed consent was obtained from each participant.

Participants filled out a self-administered questionnaire collecting information about socio-demographics (gender, age, and education), health behaviours (smoking, regularity of dental visits, and tooth brushing frequency) and completed the oral health literacy test.

In this study, the R-OHLI, a Russian language version of the Oral Health Literacy Instrument (OHLI),

was used. This Russian version was created by the research team, and its reliability and validity were described in the previous study. The R-OHLI has a reading comprehension section to assess individual's oral health literacy level and a numeracy section which evaluates an individual's ability to perform basic mathematic operations necessary to understand medication prescriptions and postoperative instructions. The total R-OHLI score therefore ranges from 0 to 100. To categorize participants into three oral health literacy levels, following cutoff-points were used: inadequate (0-59), marginal (60-74) and adequate (75-100).

Oral examination was performed according to WHO recommendations and included tooth status (numbers of decayed, missing and filled teeth), oral hygiene, pocket depth, and gingival bleeding on probing. Third molars were excluded from the examination.

Results

In total, 281 patients with the mean age 33.1 ± 12.2 years participated in the study. The majority of participants (64.1%) were women; mean ages of male and female participants were 28.0 ± 10.3 and 35.9 ± 12.3 years, respectively. As for education, 21.8% of males and 26.1% of females had higher education (university graduate and above); the distribution of male and female participants by education level was not significantly different. The mean ages of participants with and without university degree were also not significantly different: 35.3 ± 11.3 and 32.3 ± 12.4 years, respectively.

The mean R-OHLI score was 77.2 ± 14.5 in total. The mean R-OHLI scores for male and female participants were 73.6 ± 16.4 and 79.3 ± 13.6, respectively, and significantly different ($p<0.01$). For education, the mean R-OHLI score for participants with university degree (83.5 ± 10.0) was significantly higher than that for those without (75.2 ± 15.1) ($p<0.001$). For smoking behaviour, no significant difference in the mean R-OHLI scores between smokers (78.1 ± 14.0) and non-smokers (74.5 ± 15.7) was observed. Participants who visited a dentist regularly had a significantly higher mean R-OHLI score (79.3 ± 14.0) than those who did not (75.1 ± 14.8) ($p<0.05$). The R-OHLI scores were higher among participants who brushed their teeth twice a day or more (77.9 ± 14.7) comparing to those who did not (75.9 ± 14.1), but the difference was not significant.

The majority of participants (68.7%) had adequate oral health literacy level, while 18.9% and 12.4% belonged to marginal and inadequate oral health literacy levels. There was a significant difference in distribution of oral health literacy levels by gender and education. The proportion of participants with adequate oral health literacy level was significantly higher among females (74.4%, $p<0.05$) and those with university education (89.9%, $p<0.001$). For oral health literacy level by health behaviours such as smoking, regularity of dental visits and tooth brushing frequency, there were no significant distributional differences found.

In bivariate analyses, participants with adequate oral health literacy level had significantly lower number of missing teeth (2.4 ± 3.2) comparing to their counterparts (marginal: 2.6 ± 4.1, $p<0.05$; inadequate: 4.8 ± 5.5, $p<0.01$). Moreover, participants with adequate oral health literacy level had significantly higher number of filled teeth (6.8 ± 4.8) than those with inadequate (3.9 ± 3.4, $p<0.01$). The same tendency was

observed for PLI; oral hygiene condition was significantly better among participants with adequate oral health literacy level than their counterparts ($p<0.05$ and $p<0.01$). No significant relationship was observed for number of decayed teeth, number of teeth with deep pockets or gingival bleeding on probing.

After adjusting for socio-economic and behavioural characteristics, plaque index was no longer significantly associated with oral health literacy level. Numbers of missing and filled teeth were still significantly different between participants with adequate literacy level (missing teeth: 2.4 ± 2.9; filled teeth: 6.6 ± 4.2) and those with marginal (missing teeth: 2.8 ± 2.9, $p<0.01$; filled teeth: 6.2 ± 4.2, $p<0.05$) and inadequate (missing teeth: 4.3 ± 2.9, $p<0.01$; filled teeth: 4.5 ± 4.2, $p<0.05$).

Discussion

In this study we examined oral health literacy and its associations with socio-demographics, health behaviours and oral health status in Belarus. About 70% of participants had adequate oral health literacy. Oral health literacy was significantly related with socio-demographics and oral health status, while no significant association with health behaviours was established.

Most of the studies conducted in the USA revealed that about one quarter to half of participants had limited oral health literacy. However, the data from Hong Kong and Japan showed only a small proportion of individuals with low oral health literacy. These contradictions demonstrate that regional differences have a significant impact on oral health literacy, therefore, direct comparison of oral health literacy levels among different countries is difficult.

In this study, oral health literacy level was significantly higher in females comparing to males, which is in accordance with previous findings. Generally, women in Belarus are more likely to have an exposure to health information, especially during pregnancy and child-rearing. More frequent visits to medical institutions may heighten their oral health literacy level.

Oral health literacy significantly differed by education level. It is possible that individuals with higher education could have better abilities to find and understand health related information, as well as to make decisions based on this information. Effect of education on oral health literacy was established in numerous studies. Our findings are in line with those in other countries, because participants with a university degree had significantly higher R-OHLI scores, and the proportion of those with inadequate oral health literacy was very small.

In the present study, no significant association was observed between oral health literacy and health behaviours. Previous research findings regarding the relationship between oral health literacy and oral health behaviour are controversial and dependable on the study settings. It appears that the relationship between oral health literacy and oral health behaviours is not direct; health behaviour may be highly affected by the sample's socio-demographic characteristics.

Oral health status was significantly related to oral health literacy level. Participants with higher oral health literacy levels had lower number of missing teeth and higher number of filled teeth. Dental treatment patterns of participants may play a role in the relationship between better oral health literacy and better oral health status in this study. Previous findings demonstrated that individuals with inadequate oral

health literacy had higher dental anxiety and failed dental appointments. Therefore, participants with lower oral health literacy may be reluctant to visit a dentist until they have a pain, which leads to aggravation of cases, and ends up with the increased risk of tooth extractions. On the other hand, participants with high oral health literacy may be more likely to complete dental treatment even if it requires several visits, which results in higher number of teeth with restorations and lower tooth loss. These data suggest there is an association between individuals' oral health literacy and their dental treatment patterns.

This study showed that adequate oral health literacy was strongly related with better oral health outcomes. These findings indicate that improvement of oral health literacy can contribute to the advancement of population oral health. Therefore, it is important that enhancement of oral health literacy is addressed when developing community oral health promotion activities in Belarus.

和文による要約

本研究では、ベラルーシにおけるオーラルヘルスリテラシーの評価およびオーラルヘルスリテラシーと歯科保健行動および口腔保健状況との関連について検討した。対象は 2013 年 7－8 月にベラルーシの公立病院の歯科を受診した 18～60 歳の成人患者 281 名である。性別、年齢、学歴、歯科保健行動（喫煙状況、定期的歯科検診の受診の頻度、歯磨き回数）に関する質問票とロシア語版オーラルヘルスリテラシー指標（R-OHLI）を実施した。また、歯科医師による口腔内診査（第 3 大臼歯を除外）を行い、未処置歯数、喪失歯数、処置歯数、プロービング後の歯肉出血歯数、歯周ポケット 4 ㎜以上の歯数、口腔清掃状態を評価した。平均 R-OHLI は 77.2 であり、R-OHLI をレベル別にみると高レベルが 193 名（68.7%）、中レベルが 53 名（18.9%）、低レベルが 35 名（12.4%）であった。R-OHLI と歯科保健行動との間には有意な関連はみられなかった。一方、口腔保健状況との間には有意な関連が認められ、R-OHLI が高くなるにしたがい喪失歯数は有意に少なく、逆に処置歯数は有意に多くなった。交絡因子調整後のオーラルヘルスリテラシーのレベル別の喪失歯数は、高レベルが 2.4 歯、中レベルが 2.8 歯、低レベルが 4.3 歯（$p<0.01$）、処置歯数はそれぞれ 6.6 歯、6.2 歯、4.5 歯（$p<0.01$）であった。

本研究により、オーラルヘルスリテラシーの違いにより口腔保健状況が異なることが明らかになり、オーラルヘルスリテラシーが高い者ほど口腔保健状況が良好であった。したがって、ベラルーシにおいて健康教育等により歯科に関する適切な情報を提供し、オーラルヘルスリテラシーを高めることが歯科保健の向上に重要と考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5066　号	BLIZNIUK Anastasiya
論文審査担当者	主　査　森尾　郁子 副　査　俣木　志朗、豊福　明	
論 文 題 目	Association of oral health literacy with oral health behaviour and oral health status in Belarus	

（論文審査の要旨）

ヘルスリテラシーは、2010 年に米国の「Healthy People」で初めて取り上げられた概念で、健康の社会的決定要因の一つとして近年注目を集めている。歯科に関するオーラルヘルスリテラシーは歯科保健に関して必要な情報を獲得、処理、理解する能力と定義されている。先行研究ではオーラルヘルスリテラシーと口腔保健状況との間に関連があることがいくつか報告されている。オーラルヘルスリテラシーの高い者は適切な保健行動がとれ、良好な健康状態を保つことができると考えられている。一方、オーラルヘルスリテラシーの低い者は、歯科保健に関する知識に乏しく、予防処置や定期健診を受ける割合が低いため、口腔保健状況も悪いとされている。ヘルスリテラシーには国や地域により差があることが報告されているが、ベラルーシにおいて、これまでヘルスリテラシーに関する報告はほとんどない。

そこで、Blizniuk Anastasiya は、母国であるベラルーシにおいて成人を対象にオーラルヘルスリテラシーを評価し、オーラルヘルスリテラシーと歯科保健行動および口腔保健状況との関連を検討するために本研究を実施した。事前に、ロシア語を使用しているベラルーシ人が理解できるように、オーラルヘルスリテラシーの評価指標の作成を行った。国際的に妥当性が確認されているオーラルヘルスリテラシー指標（OHLI）をロシア語に翻訳し、さらに、ベラルーシの歯科事情に合わせて改定を加え、ロシア語版オーラルヘルスリテラシー指標（R-OHLI）を新しく開発した。そして、検証作業を行って指標の信頼性・妥当性が高いことを確認し、公表している。本研究では、その指標 R-OHLI を使用して疫学調査を実施している。

対象は 2013 年 7～8 月にベラルーシにある某公立病院の歯科を受診した 18～60 歳の成人患者 281 名(男性 101 名、女性 180 名)である。質問票調査の内容は、人口統計学的情報と歯科保健行動およびロシア語版オーラルヘルスリテラシー指標（R-OHLI）である。また、口腔内診査により、未処置歯数、喪失歯数、処置歯数、プロービング後の歯肉出血歯数、歯周ポケット 4 ㎜以上の歯数、口腔清掃状態等を評価した。

信頼性・妥当性が確認されたロシア語版国際指標によるオーラルヘルスリテラシー調査をベラルーシで初めて実施したことは新規性があり、高く評価できる。また、分析は科学的な統計解析が行われており、得られた結果に対する考察も適切に行われている。

本研究の結果、以下のことが明らかになった。

1. R-OHLI スコアは男性 73.6 ± 16.4、女性 79.3± 13.6、計 77.2 ± 14.5 であった。R-OHLI スコアは女性、高学歴の者、定期歯科健診受診者で有意に高かった。喫煙状況や歯磨き回数の

違いによる有意差は認められなかった。

2. R-OHLI のレベル別の割合は、低レベル（0-59）が 12.4%、中レベル（60-74）が 18.9%、高レベル（75-100）が 68.7%であり、女性は男性より高レベルの者の割合が有意に高かった。学歴による比較では、高学歴の者ほどオーラルヘルスリテラシーの高レベルの者の割合が有意に高かった。
3. 口腔保健状況との関連をみると、R-OHLI は喪失歯数および処置歯数と有意な関連が認められ、R-OHLI のレベルが高くなるにしたがい喪失歯は有意に少なくなり、反対に処置歯は有意に多くなっていた。
4. 年齢、性別、学歴、喫煙状況、定期的歯科健診の受診、歯磨き回数等の交絡因子を調整した喪失歯数および処置歯数と R-OHLI との間にも同様に有意な関連が認められた。

本研究により、対象者の約 9 割の者のオーラルヘルスリテラシーレベルが中レベルまたは高レベルであり、ベラルーシにおけるオーラルヘルスリテラシーレベルは高いこと、またオーラルヘルスリテラシーの高低により口腔保健状況に差が認められ、オーラルヘルスリテラシーの高い者ほど口腔保健状況が良好であることが明らかになった。オーラルヘルスリテラシーは、社会経済状況や文化的背景など様々な要因により変化するが、ベラルーシにおいてもこれまで他国で行われた研究と同様な結果が得られたことは大変興味深い。

本研究により、オーラルヘルスリテラシーが口腔の健康と深く関わっていることが確認された。したがって、健康教育等により定期的歯科健診、予防処置、歯科疾患の早期発見と早期処置の重要性等について適切な情報を提供し、人々のオーラルヘルスリテラシーを高めることが歯科保健の向上に不可欠であることが示唆された。また、本研究はベラルーシで実施されたが、開発されたこの R-OHLI を使用することで、他国への普及拡大が期待でき、ヘルスリテラシーの国際比較の際に有効に活用できると考えられた。したがって、今後の歯科医学・歯科医療の発展に大きく貢献するものと考えられた。

以上より、本論文は、博士（歯学）の学位を申請するにあたって十分に価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	石上　貴之
論文審査担当者	主　査　　三浦　宏之 副　査　　水口　俊介、杉本　久美子
論　文　題　目	Effects of Occlusal Supporting Area on Dynamic Posture against Disturbance by Electrical Stimulation

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

健常成人 10 名（27.2 ± 3.6 歳）を対象に、スプリント装着により咬合支持域を仮想喪失させた場合の姿勢外乱からの立ち直り動作反応を記録し、咬合支持域と姿勢調節機能の関連性を検証した。フォースプレート上に閉眼閉足状態で直立させ、右側総腓骨神経に最大上電気刺激を与えることにより外乱を誘発した。咬合条件は下顎安静状態（Control）、前歯接触型スプリント装着時の随意性最大噛みしめ（MVC-Sp-A）、前歯・小臼歯接触型スプリント装着時の随意性最大噛みしめ（MVC-Sp-AP）、全歯接触型スプリント装着時の随意性最大噛みしめ（MVC-Sp-FULL）の 4 条件とし、外乱後 3 秒間の重心動揺総軌跡長、前後および左右方向の床反力最大振幅値について比較分析を行った。その結果、MVC-Sp-FULL の重心動揺総軌跡長は Control と MVC-Sp-A に比べて有意に減少した。MVC-Sp-FULL の前後方向の床反力最大振幅値は Control に比べて有意に減少した。咬合支持域の減少に伴って重心動揺が増加する傾向が認められたことから、咬合支持域は噛みしめによる姿勢立ち直り調節機能と密接に関係していることが示唆された。

＜緒言＞

これまで咬合機能と全身の運動機能に関して数多くの研究が報告されている。我々の研究室においても、H 反射を用いた神経生理学的研究によって、噛みしめに伴うヒラメ筋運動ニューロンの興奮性の上昇を客観的に実証してきた。さらに運動力学的研究から噛みしめによる四肢筋パワーの増強効果も実証されている。一方、咬合状態の変化と身体運動機能との関連性についても多くの運動課題を用いた実験が行われている。例えば咬合支持域の減少により筋力や筋持久力が減少したという報告や義歯非装着により咬合支持を喪失させると俊敏性が有意に低下したとする報告などが散見される。これらの研究結果から、咬合支持域の有無および多寡は咬合と身体運動機能の関連性に影響を及ぼし得る要因の一つであると考えられる。しかし咬合支持域が平衡機能に影響を及ぼす因子であるか否かについては未だ不明な点も多い。そこで本研究では、咬合支持域を仮想喪失した状況下で噛みしめを行わせた場合に、外乱からの立ち直り動作時の姿勢安定性がどのような影響を受けるのか調べることにより、咬合支持域と姿勢安定性の関連性を考察した。

＜方法＞

・被験者

顎口腔系に異常を認めず、全身性疾患および傷害等の既往のない健常成人 10 名（平均 27.2±3.6 歳）を対象とした。本研究は東京医科歯科大学歯学系倫理審査委員会の承認を得て行われた（第 695 号）。

・オクルーザルスプリント

改良型吸引成形器を用いて熱可塑性レジンを上顎模型上に軟化圧接成形し、前歯接触型スプリント（Sp-A)、前歯･小臼歯接触型スプリント（Sp-AP)、全歯接触型スプリント（Sp-FULL）の 3 種類スプリントを作製した。いずれも均等な咬合接触が得られるまで咬合調整を行った。実験前にデンタルプレスケールにて最大咬合力を計測した。

・実験手順

被験者にはフォースプレート上に閉眼直立姿勢を取らせ、右側下肢の膝蓋骨上皮膚に陽極（35 ㎜×45 ㎜）を、腓骨頭 2-4cm 上部皮膚に陰極（直径 8 ㎜）を装着し、総腓骨神経に最大上矩形波電気刺激（持続時間 1ms）を与えることで姿勢を外乱した。咬合条件は下顎安静状態（Control)、Sp-A 装着状態での随意性最大噛みしめ（MVC-Sp-A)、Sp-AP 装着状態での随意性最大噛みしめ（MVC-Sp-AP）および Sp-FULL 装着状態での随意性最大噛みしめ（MVC-Sp-FULL）の 4 条件とし、課題遂行中の右側長腓骨筋および両側咬筋の筋電図活動（EMG）を記録した。

・データ解析

外乱刺激直後 3 秒間の重心動揺総軌跡長、前後および左右方向の床反力最大振幅値を算出し、一元配置分散分析および Bonferroni correction 法にて統計解析を行った（有意水準 5%)。

＜結果＞

・咬合力

咬合支持域の減少に伴って最大咬合力および咬筋 EMG はともに減少した。

・重心動揺

Control、MVC-Sp-A、MVC-Sp-AP および MVC-Sp-FULL 時の重心動揺総軌跡長はそれぞれ 6.57±1.20 cm（平均±SD）、6.60±1.19cm、6.33±1.09cm および 6.01±0.92cm であった。前後方向の床反力最大振幅値はそれぞれ 0.84±0.27cm、0.74±0.19cm、0.70±0.15cm および 0.63±0.11cm であった。また左右方向の床反力最大振幅値はそれぞれ 1.83±0.44cm、1.64±0.45cm、1.66±0.46cm および 1.59±0.35cm であった。MVC-Sp-FULL において、重心動揺総軌跡長は Control と MVC-Sp-A 時に比べて有意に減少し（$p<0.01$)、前後方向の床反力最大振幅値は Control に比べて有意に減少した（$p<0.05$)。

＜考察＞

本研究では、咬合支持域の減少に伴って随意性最大噛みしめ時の咬合力および咬筋 EMG の減少が確認された。咬合支持の主体は臼歯部であり、臼歯部における支持域の減少により咬合力および筋活動が減少することがすでに報告されており、本研究でも同様の結果が得られた。これは臼歯部に比べて、前歯部には低閾値の歯根膜感覚受容器が数多く分布しており、過度な負荷から歯および顎関節を保護するための抑制性フィードバック機構が閉口筋に作動したことによるものと考えられた。

MVC-Sp-FULL の重心動揺総軌跡長は Control と MVC-Sp-A に比べて有意に減少した。また MVC-Sp-FULL の前後方向の床反力最大振幅値は Control に比べて有意に減少した。咬合と全身の運動機能の相関に関する神経筋調節メカニズムについては、ヒラメ筋 H 反射が随意性噛みしめに伴って著しく促通されること、またその促通量と噛みしめ強度には正の相関があることが報告されている。ヒラメ筋の拮抗筋である前脛骨筋 H 反射についても同様の結果が報告されている。また前脛骨筋からヒラメ筋への相反性 Ia 抑制が噛みしめに伴って有意に減弱することも明らかにされている。これらの報告は噛みしめがヒトの姿勢保持に寄与することを強く示唆するものであり、本研究結果もこれを強く支持する。

随意性噛みしめに伴う H 反射の促通は中枢神経系からの運動指令だけでなく、歯根膜機械受容器や筋紡錘からの求心性情報も関与していることが報告されている。三叉神経への求心性感覚情報と姿勢制御との関連性に関する報告によれば、下顎神経片側麻酔による求心性感覚情報の遮断実験を行った結果、足圧中心の非麻酔側（対側）への偏位と重心動揺面積の増大を認めたことから、三叉神経の求心性感覚情報は姿勢制御に一定の役割を果たしており、同情報が障害されれば、身体のバランス保持に影響が生じることが示唆されている。本研究では、咬合支持域の減少に伴って咬筋 EMG が減少し、重心動揺総軌跡長および前後方向の床反力最大振幅値が増加した。したがって過去研究成果と本研究結果を考え合わせると、閉口筋筋紡錘や歯根膜機械受容器からの求心性感覚情報が噛みしめによる姿勢制御に影響を及ぼす要因の一つとして考えられる。

左右方向の床反力最大振幅値には有意差が見られなかった。身体動揺は関節可動性と関連しており、静止立位では足関節および膝関節の動揺がより直接的に反映する。また一般に前後方向や屈曲／伸展方向への可動性は高く、左右方向・外転／内転方向の可動性は低いため、左右方向の動揺性は前後方向に比べて制限される。こうした身体構造上の制限が影響して、左右方向への効果が得られなかったのではないかと考えられる。

＜結論＞

本研究結果より、スプリント装着により咬合支持域を変化させた状態で噛みしめを行わせた場合、咬合支持域の減少に伴い、姿勢外乱からの立ち直り反応動作時の重心動揺総軌跡長および床反力最大振幅値が増加することが示された。したがって咬合支持域の変化が姿勢調節機能に影響すると考えられ、適正な咬合関係の維持は咀嚼機能のみならず運動機能にも影響を及ぼし得ることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5067　号	石上　貴之
論文審査担当者	主　査　　三浦　宏之 副　査　　水口　俊介、杉本　久美子	
論 文 題 目	Effects of Occlusal Supporting Area on Dynamic Posture against Disturbance by Electrical Stimulation	

（論文審査の要旨）

口腔と全身の関連は歯科医学的見地からみても極めて重要な課題である。とりわけ運動機能に及ぼす影響については、筋力やバランスへの影響が注目されている。すでに咬合の遠隔筋促通効果は検証されており、Hoffman 反射経路を用いた神経生理学的研究から噛みしめに伴う脊髄運動ニューロンの興奮性の上昇が確認され、実際四肢筋パワーの増強効果も実証されている。最近経皮電気刺激にて立位姿勢を外乱した場合の立ち直り反応動作を解析した結果、噛みしめが外乱に抗する姿勢保持に有効であることが示唆されている。そうした中、石上貴之は咬合支持域と運動機能との関わり、特に姿勢バランスに及ぼす影響については検索されておらず、未だ不明であることに注目し、本研究を着想した。

実験では、前歯被覆型、前歯小臼歯被覆型および全歯列被覆型の 3 種スプリントを用意し、咬合支持域を可逆的に変化させる手法を採用している。スプリントの作成手順は、改良型吸引成形器を用いて熱可塑性レジンを上顎模型上に軟化圧接し、冷却後、咬合器にリマウントして、形態修正および咬合調整を行い、最終的には口腔内で均等な咬合接触が得られるまで調整した。咬合挙上量は右側第一大臼歯間 2 mm に統一した。姿勢外乱は、被験者をフォースプレート上に閉眼裸足閉足状態で直立姿勢を取らせた上で、右膝外側部から総腓骨神経に最大上電気刺激（持続時間 1msec の矩形波、刺激強度：最大 M 波誘発の 120% 相当強度）を与え、長腓骨筋を不随意収縮させることで誘発した。咬合条件は下顎安静状態（コントロール）のほか, 3 種スプリント装着位での随意性最大噛みしめ状態の 4 種類である。データとして左右側咬筋筋電図 RMS 値、咬合接触面積、咬合力、重心動揺総軌跡長、前後方向および左右方向の最大振幅値を計測し、多角的分析を行っている。これら一連の実験手技ならびにデータ分析の手法は、いずれも適切かつ妥当であり、周到な準備の下に本研究が遂行されたものと評価された。

本研究の結果から、以下の知見を得ている。

1. 咬筋筋電図 RMS と咬合力は、スプリントの咬合支持域が前歯から小臼歯、大臼歯と増加するにつれて高値を示した。

2. 咬合支持域と咬筋筋電図 RMS の間、また咬合接触面積と咬合力の間には、正の相関が認められた。

3. 姿勢外乱後の重心動揺総軌跡長と前後方向の最大振幅値は、スプリントの咬合支持域を増

加に伴い有意に減少した。
4. 一方、左右方向の最大振幅値には有意な変化は認められなかった。

得られた知見と過去の文献に基づき、咬合支持域が姿勢バランスに影響を及ぼす機序について、閉口筋筋紡錘や歯根膜機械受容器からの求心性感覚情報が強く関与していることや、さらには頸部筋収縮による頭部固定を通じて咬合が姿勢制御に寄与していることを論理的かつ合理的に考察しており、咬合支持域、特に臼歯部の保持は咀嚼機能のみならず運動機能にも重要であると結論付けている。また重心動揺の最大振幅値について、前後方向と左右方向で異なった傾向を示した理由についても、関節可動性や身体構造上の制限といった解剖学的視点から適切に論考されており、十分評価できる。

以上のことから、臼歯部の咬合支持域は咀嚼機能のみならず立位姿勢バランスにも有意な影響を及ぼしうることを明らかにし、咬合と運動機能の関わりの新たな一面を見出した本研究は、スポーツ歯学に有益な情報を提供するものであり、今後の歯科医学の進歩と発展に大いに寄与すると考えられる。従って本論文は、博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	林　海里
論文審査担当者	主　査　　和泉　雄一 副　査　　春日井　昇平　　鈴木　聖一
論　文　題　目	The facilitatory effects of hyperbaric oxygen treatment on mem-brane bone wound healing in a rat calvarial defect model

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

高気圧酸素治療は医科において減圧症、ガス中毒、コンパートメント症候群など様々な病状に適応があるが、顎顔面領域の外傷などへの治療法としては一般的ではない。そこで本研究では顎顔面骨の大部分を占める膜性骨欠損に対して高気圧酸素療法がどのような影響を与えるかラットを用いた動物実験で検証した。方法は膜性骨であるラット頭蓋骨に大きさを規定した円形の欠損を作製し、2 週間にわたり、高気圧酸素処置（HBO）および対照群として他 3 条件（高気圧空気処置：HBA、常圧酸素処置：HBA、無処置：Control）の処置を行い、組織学的評価およびマイクロ CT を用いた評価によってそれぞれの結果の比較検討を行うという手法で行った。その結果、組織学的評価およびマイクロ CT を用いた評価において新生骨面積及び体積の比較で、高気圧酸素処置群の値が他の 3 群の値に対して有意に大きい値を示した。よって今回の結果から高気圧酸素治療は、膜性骨における骨創傷治癒を促進する作用があるということが示された。

＜緒言＞

高気圧酸素治療（Hyperbaric Oxygen Treatment：HBO）は、大気圧よりも高い気圧環境の中に患者を収容し、この患者に高濃度の酸素を吸入させることによって血液中の溶解型酸素の量を増やし、低酸素状態にある組織や損傷箇所の病態の改善を図る治療法である。実際の治療では 2~2.8 絶対気圧（atmosphere absolute at sea level：ATA）で 1 時間以上 100%O_2 を呼吸させるのが国際的にも一般的で、その適応疾患は減圧症（潜水病）、ガス中毒（一酸化炭素中毒）、コンパートメント症候群、糖尿病性足壊疽、遅発性放射線障害など多岐にわたる。

近年では肉離れや靭帯損傷などの軟部外傷での治癒促進効果が報告され、トップアスリートを中心に治療がなされており、スポーツ医学領域でも大きな注目を集めている。硬組織傷害への HBO の効果の有無は賛否のわかれるところだが、四肢骨などへの HBO 介入研究などから効果が証明されつつあり、四肢等の骨折においても適用が見られるようになってきている。しかし、HBO は歯科領域での治療法としてはあまり一般的とは言えず、顎骨骨髄炎治療での併用の報告がいくつかある程度で、特に顎骨骨折などの歯科外傷治療に対する HBO の応用報告は未だなされていないのが現状である。

そこで本研究では、顎顔面骨と同じ膜性骨化の様式で骨化するラット頭蓋骨を用いて、骨欠損モデルを作製し、他条件と比較しながら、その治癒を観察することで HBO の治癒促進効果を検証したので報告する。

＜方法＞

実験動物には 7 週齢の Wistar 系雄性ラット（n=32）を用いた。7%抱水クロラール（280ml/kg）を腹腔内注射し、全身麻酔をした後、頭頂部の剃毛、皮膚および骨膜を切開剥離、頭蓋骨の露出、という手順を経て、トレフィンバー（直径 3.8mm，デンテック）を用いて硬膜を損傷しないように円筒形欠損を右側頭骨に作製した。欠損を作製した後は、皮膚および骨膜を縫合して創を閉じた。

骨欠損モデル作製後、高圧負荷に耐える専用チャンバーを用いて、高圧高酸素暴露群（HBO 群）、高圧空気曝露群（Hyperbaric Air：HBA 群）、常圧酸素曝露群（Normobaric Oxygen：NBO 群）、無処置群（Control 群）の 4 群に分けて処置を施した。HBO 群、HBA 群はそれぞれ酸素および空気で加減圧操作に 15 分以上かけながら、2.5ATA までチャンバー内を加圧した後、酸素および空気の循環がとぎれないように、一回 2 時間の処置を行った。NBO 群は加圧せずに一回 2 時間の酸素吸入処置を行った。処置は欠損作製日を一日目として、5 日／週で計 2 週間行った。Control 群はとくに何も処置を行わなかった。

欠損作製から 2 週間後に屠殺処理ならびに試料採取を行い、組織学的評価およびマイクロ CT（inspeXio SMX-100CT，島津製作所）を用いた評価を行った。組織学的評価では骨欠損中央部、中央から遠位 300μm および 600μm の 3 部位前頭断につき組織切片標本を作製し、H.E 染色を行い、ImageJ ソフトウェアにて欠損面積に対する新生骨組織面積の割合と、骨の成熟度を比較するために新生骨における単位面積あたりの有核細胞数を算出した。またマイクロ CT では欠損あたりの新生骨体積（BV/TV）および骨密度（BMD）を算出した。BV/TV および BMD は同撮影条件下で骨密度既知のファントムを撮影し、その画像をもとに専用ソフトウェア（Tri/3D-BON、RATOC 社）を用いて解析を行った。統計学的分析は one-way ANOVA および Tukey post hoc test で行い、有意水準は 1%とした。なお本研究は本学動物実験委員会の承認を得て行われた（No.0130371A）。

＜結果＞

H.E 染色標本における欠損面積における新生骨面積の値は HBO 群で 38.5±12.1%、HBA 群で 16.8±7.6%、NBO 群で 16.3±11.0%、Control 群で 17.5±8.9%となり、HBO 群での値が他群の値と比較して有意に大きな値となった(p<0.01)。新生骨中の単位面積当たりの有核細胞数は HBO 群で 1002.1±151.5/mm^2、 HBA 群で 1597.0±245.1/mm^2、NBO 群で 1358.6±151.6/mm^2 、Control 群で 1547.6±440.0/mm^2 となった。各群間で有意差はみられなかった。

マイクロ CT を用いた解析では、BV/TV の値が HBO 群で 33.7±5.5%、HBA 群で 15.1±3.2%、NBO 群で 14.4±5.8%、Control 群で 18.3±4.9%となり、HBO 群での値が他群での値と比較して有意に大きな値となった(p<0.01)。BMD 値は HBO 群で 694.1±116.5mg/cm^2、HBA 群で 602.9±36.9mg/cm^2、NBO 群で 591.1±16.0mg/cm^2、Control 群で 771.5±128.8mg/cm^2 となり、各群間で有意差はなかった。

＜考察＞

今回の研究では、組織学的評価およびマイクロ CT を用いた評価において、HBO が他の 3 条件よりも新生骨量の割合で高値を示した。また高気圧負荷だけを与えた HBA 群、高酸素吸入のみを行った NBO 群よりも高値を示したことから、新生骨量の増加には高気圧環境と高酸素吸入の両方の因子が必要だということが示唆された。また今まで長管骨を用いた研究では効果を確認できなかっ

た報告もあるなかで、今回の研究では効果を明確に確認することが出来たことから、膜性骨化に対して HBO はより効果的に働く可能性が示された。

今回、高気圧酸素処置時の組織酸素分圧の測定は行っていないが、ラットを専用のチャンバー内に入れ、純酸素で加圧する手法で高気圧酸素処置を行い、組織酸素濃度を測定した研究において組織酸素分圧は 563mmHg を計測したという報告がなされている。本研究でも同様の方法で高気圧酸素環境を作り HBO を行っているため、他の 3 条件に比較して十分な組織酸素濃度を得ることが出来ていたと考えられ、その効果により新生骨量の増加に至ったと考えられる。加圧に関しては、これまでにもラットを用いた研究で様々な加圧条件が行われている。それらによると、2.0ATA でも十分な組織酸素濃度を得ているが、実際の臨床では 2.5~2.8ATA に加圧し処置を行うことが一般的であるという報告がある事から、今回の研究では加圧条件は 2.5ATA とした。

新生骨量を増加させたメカニズムについては今回の研究では追求できない。しかし、これまでの報告から幾つかの仮説が立てられる。まず幾つかの研究で HBO は血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の増加を促すという報告がされている。VEGF は血管造成のファクターとして知られているが、膜性骨化の過程において間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進することも報告されている。これらの報告から HBO によって増加した VEGF によって骨芽細胞の分化が促進され、骨創傷治癒の促進が起きたのではないかと推察される。またヒト骨芽細胞を用いた研究でも高気圧酸素環境下において骨芽細胞の分化や石灰化が促進されたという報告がある。このことから骨芽細胞自体への HBO の働きかけによって骨創傷治癒の促進が起こった可能性も考えられる。

今後さらに長期の観察や治癒促進のメカニズム解明などについて研究が必要ではあるが、今回の研究で HBO は膜性骨創傷治癒の初期段階において効果的に作用することが示されたことから、今後の顎骨骨折など顎顔面領域の外傷治療への応用に十分期待が持てる結果となった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5068　号	林　海里
論文審査担当者	主　査　　和泉　雄一 副　査　　春日井　昇平　　鈴木　聖一	
論 文 題 目	The facilitatory effects of hyperbaric oxygen treatment on mem-brane bone wound healing in a rat calvarial defect model	

（論文審査の要旨）

高気圧酸素治療（HBO）は 2 絶対気圧以上の高気圧環境に患者を収容し、100%O_2 を 1 時間以上吸入させることによって病態改善を図るもので、医学領域ではすでに減圧症、ガス中毒、糖尿病性足壊疽、遅発性放射線障害など、様々な疾患に保険適用されている。また最近では、肉離れや靭帯損傷などのスポーツ外傷治療にも応用され、オリンピックといった国際大会ではメディカルサポートの一環として提供され、注目を浴びている。ところが歯科疾患への適用はなく、顎顔面領域の外傷や障害等に対する応用も一般的とは言いがたい状況で、基礎データも臨床報告も少ない。このような背景に基づき、林　海里は歯科領域への HBO 応用を目標に、膜性骨に対する HBO の治療効果を検証する本研究を着想するに至った。

実験では、7 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いて、頭蓋骨欠損モデルを作成し、専用チャンバーを使用して、HBO 処置（2.5ATA／100%O_2）を 1 日 2 時間、週 5 日間を 2 週間連続で行い、骨欠損部の創傷治癒に対する効果を検証している。HBO の効果因子を検討するため、コントロールとは別に、高圧空気曝露群と常圧酸素曝露群の 2 種対照群が設定しており、綿密に実験計画を練ったことが窺える。組織学的評価についても採取試料を 10%パラフォルムアルデヒド 1 週固定、10%EDTA 脱灰、パラフィン包埋を経て、前頭断 5μm 厚切片を作成し、H.E 染色を行った。これに加えて、欠損面積に対する新生骨面積の割合を算出し、また幼若度の指標として単位面積当たり有核細胞数についても検討を加えている。さらにマイクロ CT および専用解析ソフトを用いて、欠損体積に占める欠損内総骨量値（BV/TV）と骨密度（BMD）を算出している。このように周到な計画下で、適切な手技に基づいて実験を遂行し、多面的な分析評価を加える姿勢は高く評価できる。

本研究の結果、以下の知見を得ている。

1. HBO 群の新生骨面積割合は平均 38.5%増であり、他群より有意に高値を示した（$p<0.01$）。
2. 新生骨中の有核細胞数については有意差を認めなかった。
3. HBO 群の BV/TV は平均 33.7%増であり、他群より有意に高値であった（$p<0.01$）。
4. BMD に有意差はなかった。

本研究結果より、膜性骨化に対して HBO はより効果的に作用する可能性が初めて示唆されると同時に、この治癒促進効果には高気圧環境と高酸素環境の両条件が必要不可欠であることが明確に示された。考察では HBO の加圧条件 2.5ATA に関する根拠や、骨欠損モデル作製し

HBO 処置を行って 14 日後に効果比較を行った理由などが適切に論証されている点は評価できる。さらに HBO の治癒促進効果に関する分子生物学的メカニズムに関して、過去文献を参考にして、血管内皮細胞増殖因子を重要なファクターとして論考している。また今後の課題や将来展望についても触れており、HBO 曝露時間や加圧条件変更による影響や、膜性骨化促進メカニズムの解明を挙げている。

以上のように、本研究は膜性骨欠損モデルの創傷治癒に対して HBO が促進的作用を有することを初めて明らかにしたものであり、併せてこの効果発現に高気圧環境と高酸素環境の双方条件が必要であることも明確に示した研究である。本研究成果は HBO の歯科領域への応用に向けた基盤的資料となりうることから、スポーツ歯学のみならず歯科医学全般の発展に大きく貢献するものである。よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大村　友理
論文審査担当者	主　査　若林　則幸 副　査　鈴木　哲也　　立川　敬子
論　文　題　目	Comparison of patient-reported outcomes between immediately and conventionally loaded mandibular two-implant overdenture: A preliminary study

〈緒言〉

インプラントオーバーデンチャー（IOD）の登場により，全部床義歯装着患者の苦痛は軽減したとの報告がある. 2002 年の McGill consensus では, 2 本インプラント維持オーバーデンチャー（2–IOD）は下顎無歯顎患者の治療法の第一選択であると述べられている.

ブローネマルクのプロトコールでは，オッセオインテグレーションを得るためにインプラント埋入後, 3-6 カ月の治癒期間を設けることが推奨されている. 長い治癒期間は無歯顎患者にとって機能的，心理的にも苦痛であると予想される．また，インプラント埋入の際に外科的侵襲が加わるため，術後は腫脹・疼痛が伴う．これらの問題点の解決策として，外科的侵襲を減少させるフラップレス術式と，インプラント埋入同日より義歯の使用を行う即時荷重が実施されている.

より早期に義歯使用を開始するために早期荷重や即時荷重での IOD 治療が試みられてきた．近年では，連結型，非連結型アタッチメントともに 2-IOD の即時荷重で良好な結果が報告されている．2-IOD 即時荷重に対して，生存率，骨吸収，および周囲組織評価に関する報告は見られたが，通常荷重をコントロールとして患者報告アウトカム（patient-reported outcomes; PRO）を評価したものは報告されていなかった．本研究の目的は，無作為化比較臨床試験により，フラップレス術式を用いた磁性アタッチメント維持 2-IOD の即時荷重および通常荷重に対する PRO を比較することである.

〈方法〉

各参加者に研究概要について説明し，インフォームドコンセントを得た．本研究のプロトコールは東京医科歯科大学歯学部附属病院内倫理審査委員会の承認を受けている．また，大学病院医療情報ネットワーク研究センター（UMIN）への登録を行った．参加者の採択基準は 1）下顎無歯顎，2）下顎前歯部にインプラント埋入に十分な骨量を有する，3）骨増生不要，4）抜歯後 4 カ月以上経過，5）口腔衛生状態良好，6）日本語の質問票への回答が可能，とした．除外基準は 1）コントロール不良な全身疾患を有する，2）頭頸部に対する化学療法，放射線療法の既往がある，3）喫煙者，4）ビスフォスフォネート製剤の服薬歴がある，とした．最小化法を適用し，患者をランダムかつ均等に即時荷重群と通常荷重群に割り付けた．割付因子は年齢，性別，ACP 分類とした．先行研究となるデザインの研究はないため，必要サンプル数を各群 10 名と設定した.

術前診査として，パノラマ X 線撮影を行った．インプラント埋入前に，下顎全部床義歯の新製，あるいは使用中義歯のリラインを行った．その後 CT 撮影，埋入プランニング，サージカルガイド作製を行った．静脈内鎮静法，局所麻酔下にて，フラップレス術式を用いオトガイ孔間にインプラント（Nobel Speedy Groovy RP φ4×10-18mm, Nobel Biocare）を 2 本埋入した．東京医科歯科大学歯学部附属病院所属のインプラント専門医 1 名がすべて施術した.

即時荷重群は，埋入同日にキーパー（マグフィットφ4.7×3，4，5.5mm；愛知製鋼）を各インプラントに装着した．その後，口腔内にて磁石構造体（マグフィットφ4.0×1.3mm；愛知製鋼）を義歯粘膜面に取り込んだ．腫脹を最小限に抑え，義歯が不適合になることを防ぐために，術後 24 時間の義歯装着，および術後 1 週間は食後の清掃時以外義歯の着脱は行わないよう指示した．

通常荷重群は，術後，ヒーリングアバットメントを各インプラントに装着した．ヒーリングアバットメント周囲の義歯粘膜面はリリーフした．埋入 3 カ月後，キーパーと交換し，同様にして磁石構造体を口腔内にて義歯粘膜面に取り込んだ．

埋入 1 週間後，キーパーあるいはヒーリングアバットメント周囲のブラッシング指導を行い，毎食後の清掃を指示した．なお術後の食事制限は設けなかった．

PRO は，日本語版 OHIP-EDENT（OHIP-EDENT-J）と患者による義歯評価（patient’s denture assessment; PDA）および患者満足度の 3 種類の質問票を用いた．OHIP はスコアが低いほど高い QoL を示し，PDA および満足度はスコアが高いほど評価が高いことを示す．すべての評価項目はインプラント埋入前をベースラインとし，埋入後 1，2，3，4，5，6 および 12 カ月に測定した．また外科的，補綴的偶発症を記録した．インプラントが脱落した患者は解析から除外した．データの収集はすべて義歯外来所属の歯科医師 1 名が行った．各評価項目に対して中央値と 95%信頼区間を算出した．ベースラインと各評価時期の中央値の差を Mann-Whitney の U 検定を用いて群間比較した．ベースライン患者特性は Non-paired t-test およびカイ 2 乗検定を用いた．すべての統計解析は SPSS ver.22 にて行った．有意水準は 5%とした．

〈結果〉

23 名が研究参加に応募したが，4 名が採択基準を満たさなかった．よって 19 名が本研究に登録された．平均年齢は 68.4±9.9 歳であった．割付因子である年齢，性別，ACP 分類において，2 群間に有意差は認められなかった．埋入 1 カ月後，通常荷重群の参加者 1 名のインプラントが 2 本とも脱落した．即時荷重群でインプラントの脱落はなかった．最終解析には即時荷重群 10 名と通常荷重群 8 名のデータを用いた．

術後 1 カ月と 3 カ月の OHIP-EDENT-J 総合スコアにおいて，即時荷重群は通常荷重群よりも低い傾向がみられた（$P < 0.1$）．また術後 1 カ月の PDA 下顎義歯のスコアにおいて即時荷重群は通常荷重群よりも高い傾向がみられ（$P < 0.1$），術後 3 カ月では統計学的に有意に高いことが認められた（$P = 0.04$）．PDA の他の項目では 2 群間に有意差は認められなかった．患者満足度は術後 1 カ月から 12 カ月のすべての評価時期において，2 群間に有意差は認められなかった．

〈考察〉

OHIP-EDENT-J 総合スコアにおけるベースラインと各評価時期との変化量は, 2 群間に有意な差は認められなかった．しかし，術後 3 カ月までの間，即時荷重群のスコアは減少，通常荷重群では増加を示した．すなわち QoL が即時荷重群では向上し，通常荷重群では低下したことを表している．

術後 3 カ月の下顎義歯評価で 2 群間に有意な差が認められたのは，即時荷重群がアタッチメントを装着した維持・安定の得られた義歯を使用できたのに対して，通常荷重群はアタッチメントが装着されていないことに加えて，ヒーリングアバットメントの緩みおよび義歯正中破折の偶発症が発生したことに起因するのではないかと考えられる．

術後 4 カ月以降，通常荷重群の QoL および義歯の評価が改善を示した．これは通常荷重群もアタッチメントを装着し，義歯の維持・安定性が向上したためであろう．

即時荷重群の満足度は，術後に向上を示しているが，通常荷重群との有意差は認められなかった．下顎 IOD に対する評価が良好でも，上顎義歯の評価が低かった症例もあり，即時荷重群の満足度が当初予想していたほど向上しなかったことが理由ではないかと考えられる．満足度は多くの要因が複雑に影響し合い，安定性の増した下顎義歯と比較すると上顎義歯に対する概念が変わる可能性があるという報告もある．また，磁性アタッチメントは維持力が小さいことから，バーやボールなど他のアタッチメントと比較すると満足度がやや劣るという報告もあり，これも一因として考えられる．

OHIP 総合スコアはベースラインにおいてすでに低く，床効果が現れていると考えられる．OHIP は否定的な影響を測るデザインであり，ベースラインで否定的な影響のない患者の肯定的な変化の検出は困難であるという報告もある．PDA 機能のスコアおよび患者満足度もベースラインにおいて 2 群ともすでに高く，天井効果の影響により有意差が認められなかったのではないかと考えられる．

本研究においては，サンプルサイズが小さかったこと，OHIP の床効果，および PDA・患者満足度の天井効果が結果に影響を与えてしまった可能性がある．しかし，今までに報告のなかった即時荷重および通常荷重に対する PRO について，比較し報告することができた．今後はインプラントの生存分析，周囲骨の変化，偶発症および費用対効果に関しても報告し，さらに，より大きいサンプルサイズでの長期研究を遂行する必要がある．

〈結論〉

本研究において，フラップレス術式を用いた磁性アタッチメント下顎 2-IOD 即時荷重は，無歯顎治療に有効な方法であると考えられる．即時荷重術式は，より早期に QoL および義歯の評価を向上させる傾向があることが示唆された．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲第　5069　号	大村　友理
論文審査担当者	主　査　若林　則幸 副　査　鈴木　哲也　　立川　敬子	
論文題目	Comparison of patient-reported outcomes between immediately and conventionally loaded mandibular two-implant overdentures: A preliminary study	

（論文審査の要旨）

従来の下顎無歯顎治療である全部床義歯に加え，インプラントに維持・安定を求めるインプラントオーバーデンチャー（IOD）が欧米では主流となりつつある．IOD の通法では，インプラント埋入後，一定の治癒期間を設けることや，インプラント埋入時の外科的侵襲により，義歯使用者にとっては機能的，心理的にも苦痛が伴うと考えられる．これらの解決策として，外科的侵襲を減少させるフラップレス術式と，インプラント埋入同日より義歯を使用する即時荷重が実施されている．

過去の研究では，2 本のインプラントを維持源としたインプラントオーバーデンチャー（2-IOD）の即時荷重を行った症例に対して，生存率，骨吸収，および周囲組織評価に関する報告は見られたが，通常荷重をコントロールとして患者報告アウトカム（patient-reported outcomes; PRO）を評価したものは報告されていなかった．

こうした状況を背景に，大村友理はフラップレス術式を用いた磁性アタッチメント維持 2-IOD の即時荷重および通常荷重に対する PRO を比較・検証した．即時荷重と通常荷重を比較した無作為化比較臨床試験自体も数少なく，過去の研究ではアウトカムがインプラント周囲骨吸収量であったため，患者主体評価に焦点を当てた本研究はいままでに例を見ない。

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され，適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を導いており，研究計画から考察に至るまで高く評価できる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 即時荷重群の方が通常荷重群よりも早期に口腔関連 QoL が改善する傾向が見られたが，2 群間に有意差は認められなかった．
2. 下顎義歯の評価では，即時荷重群の方が通常荷重群よりも有意に高い時期があることを認めた．
3. 患者満足度では 2 群間に有意差は認められなかった．

以上の結果より，フラップレス術式を用いた磁性アタッチメント下顎 2-IOD 即時荷重は，無歯顎治療に有効な治療法であり，早期に口腔関連 QoL および義歯評価を向上させる傾向があることが示唆された．本研究は，患者報告アウトカムに焦点を当てて即時荷重と通常荷重の術式を比較した唯一の無作為化比較臨床試験であり，補綴治療における治療方法選択の判断基

準の一助となるであろう．よって本論文は，博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値のあるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	金　柔炅
論文審査担当者	主 査　　和泉　雄一 副 査　　原田　浩之、　中島　友紀
論　文　題　目	Osteogenic Potential of Mouse Periosteum-Derived Cell Sorted for CD90 *In Vitro* and *In Vivo*

＜Introduction＞

The treatment of bone defects still presents complex problems, although various techniques have been developed. Although many studies have used osteoblasts or bone marrow stromal cells (BMSCs) for bone regeneration and tissue engineering, the osteogenic potential of periosteum-derived cells has not been defined. The skull, clavicle and part of the mandible are formed by intramembranous ossification, which begins upon ossification of the periosteum during fetal development. This fact supports the hypothesis that the periosteum may be related to bone growth and regeneration. Periosteum-derived cells can be acquired more easily and safely than BMSCs, and by a less invasive method. Thus, we hypothesize that periosteum-derived cells could emerge as a new source for bone tissue engineering. The periosteum-derived cells contain a number of stem-cell-related antigens such as SH2 (+), SH3 (+), SH4 (+), CD9 (+), CD90 (+), and CD105 (+). CD90 (+) is expressed in osteoblast lineage cells, and is believed to be involved in ossification. However, the role of CD90 (+) in periosteum-derived cells remains unclear.

In this study, the structure and characteristics of the murine periosteum were observed by histology, and the osteogenic potential of CD90 (+) periosteum-derived cells was investigated by transplantation into murine femoral medullae. We also demonstrated a three-dimensional culture method for periosteum-derived cells.

＜Materials and Methods＞

Periosteum were collected from 4-week-old female ICR mice, and divided into three groups. One group was digested using collagenase, and cultured in Dulbeccos' modified Eagle's medium (DMEM) medium. Another group was not digested, and cultured in collagen and gelatin medium. After 9 days, fluorescence measurement was performed to measure cell proliferation in three groups. Gene expression related to osteogenic capacity in periosteum-derived cell and osteoblasts were analyzed by PCR with RUNX2, type I collagen, and Osterix. To histological analysis, periosteum with the skull and periosteum was performed H-E staining. CD90 (+) cell sorted by fluorescence activated cell sorting(FACs), and cultured for 7, 14, and 21 days in normal DMEM medium; in osteogenic medium. Unsorted periosteum-derived cells were also cultured in the same way. One set of cells was performed to ALP staining. Another set was performed to mineralized-nodule staining. To measure cell proliferation, fluorescence measurement was performed at 1, 4, 7, 10, 13 and 16 days. The defect was created with 23G needle in the femur. Saline group was washed in normal saline. Collagen group was injected collagen medium after washing. Periosteum-derived cell group was injected collagen medium with unsorted periosteum-derived cell after washing. CD90 (+) cell group was injected collagen medium with CD90 (+) cell after washing.

＜Results＞

Periosteum-derived cells proliferated in the three-dimensional cell culture in both collagen and gelatin medium. Migration and spread of the daughter cells was observed in the gelatin medium by day 3 and proliferation began by 7 days. Three-dimensional culture in collagen or gelatin medium was more effective than conventional two-dimensional culture for periosteum-derived cells. Collagen and gelatin may serve as a scaffold to promote the proliferative activity of periosteum-derived cells. Periosteum-derived cells were compared to osteoblasts for their osteogenic potential. Collagen Type 1 and RUNX2 were expressed in periosteum-derived cells, although OSX was not detected. Therefore,

periosteum-derived cells are not mature osteoblasts, but may have the potential to differentiate into osteoblasts. ALP staining and Alizarin Red staining were performed to examine the differences in osteogenic potential between unsorted periosteum-derived cells and CD90 (+) cells. CD90 (+) cells have a higher osteogenic potential and proliferative capacity than unsorted periosteum-derived cells. Although the bone marrow and cortical bone of the head of the femur regenerated in the group in which the defect was washed with normal saline, the epiphyseal plate had not fully regenerated. In the group that received injected collagen medium after washing the defect in normal saline, the bone marrow and cortical bone of the head of the femur was regenerated, although the epiphyseal plate was not fully regenerated. In the group that was injected with collagen medium with unsorted periosteum-derived cells after washing the defect in normal saline, the epiphyseal plate was more fully regenerated than in the saline and collagen groups, but regeneration was not complete. In contrast, in the group injected with collagen medium and CD90 (+) cells after washing the defect in normal saline, the bone marrow and cortical bone of the head of the femur was regenerated completely, as was the epiphyseal plate. In summary, CD90 (+) cells have the ability for bone regeneration in vivo.

＜Discussion＞

Many studies have reported that the periosteum is a good source of osteogenic precursor cells for new bone formation. Furthermore, the murine skull periosteum does not adhere to muscle or skin, so the periosteum can be collected; it was thus possible to isolate cells without contamination of the cells from different origin. However, the murine skull periosteum has a poor cellular component, and growth is very slow. Therefore, a large number of mice were required for the experiment requiring a lot of cells. Thus, it is important to use a culture method that enhances cell growth. Three-dimensional cell culture was effective in collagen and gelatin medium, which became a scaffold for the periosteum-derived cells. Collagen is a component of extracellular matrices and is thought to aid in the growth and maturation of cells during culture. Collagen solidifies with increasing temperature, but gelatin melts as the temperature rises. These properties make three-dimensional cell culture possible at 37°C. Furthermore, collagen is expected to become a gel when injected into the body, and can thereby serve as a scaffold.

Our data suggest periosteum-derived cells also have osteogenic potential. For the bone regeneration, selection of a proper surface marker for osteogenesis is imperative. CD90 is a mesenchymal stem cell marker. It allows cells to become multipotent and facilitates osteogenesis. In this study, the CD90 (+) periosteum-derived cells showed strong osteogenic potential. And, ALP activity was increased in CD90 (+) cells. CD90 (+) periosteum-derived cells showed strong proliferation and osteogenesis, in vivo and in vitro and are expected to be a good source for bone regeneration.

＜Conclusion＞

Three-dimensional cell culture with collagen and gelatin medium was promoted cell growth. Collagen medium can serve as a scaffold. CD90 (+) periosteum-derived cells showed strong proliferative and osteogenesis capacity, in vivo and in vitro and are expected to be a good source for bone regeneration.

（和文要旨）

骨膜細胞には幹細胞関連抗原が存在する。CD90(+)は骨形成に関連すると予測されるが、骨膜細胞における CD90(+)の役割は明らかでない。本研究の目的は、CD90(+)骨膜細胞の骨再生能を明らかにすることである。

マウス頭蓋骨骨膜のコラーゲン 3 次元培養、およびコラゲナーゼ分離した骨膜細胞の通常培養を行い、蛍光測定による細胞増殖測定と、骨芽細胞分化における遺伝子発現の PCR 分析をした。FACS にて分取した CD90(+)骨膜細胞を骨芽細胞分化培地で培養し、ALP 染色、Alizarin red 染色、細胞増殖測定を行った。次に、大腿骨骨髄腔に、コラーゲンゲルをキャリアーに用いて CD90(+)骨膜細胞を注入した。

その結果、コラーゲン培地によって骨膜細胞は良好な 3 次元増殖を示し、I 型コラーゲンおよび Runx2 の遺伝子発現を示した。特に CD90(+)骨膜細胞では、骨芽細胞分化と石灰化結節の形成が亢進していた。また、CD90(+)骨膜細胞の注入によって骨再生が促進した。

骨膜は細胞成分が乏しく、増殖が活発でないため、細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲン培地を用いた 3 次元細胞培養をおこなうことで、細胞増殖を促進させることが可能となった。CD90(+) 細胞は骨形成を促進することが示唆されている。本研究においては、CD90(+)骨膜細胞が強力な増殖能および骨形成能を示し、骨再生に有効な細胞であることが示された。

以上のことから、コラーゲン 3 次元培養法は骨膜細胞の増殖を促進し、足場としても有効であることが示された。CD90(+)骨膜細胞は増殖能および骨形成能が高く、骨再生のための良い細胞源であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5070　号	金　柔炅
論文審査担当者	主 査　　和泉　雄一 副 査　　原田　浩之、中島　友紀	
論 文 題 目	Osteogenic Potential of Mouse Periosteum-Derived Cell Sorted for CD90 *In Vitro* and *In Vivo*	

（論文審査の要旨）

近年、骨再生のために様々な手法が開発され報告されている。自己の細胞を用いる骨再生の有効性は報告されているが、安全で効率の良い手法は確立されていない。骨膜は、骨の成長と維持そして骨再生に重要であると考えられているが、骨再生に骨膜細胞を用いた研究の報告は少ない。骨膜採取は容易であり、侵襲性も低いことが利点であり、骨膜は骨再生のための細胞源として期待できる。これらの点に着目し、本研究を計画したことは高く評価できる。

金柔炅は、マウス頭蓋骨骨膜から骨膜細胞を単離して、骨膜細胞の骨芽細胞分化能および骨再生能に関して細胞培養実験および動物実験を行った。マウス頭蓋骨骨膜は非常に薄い組織で細胞成分が乏しく、細胞増殖が遅いため、まず効率的な細胞培養方法を検討する必要があった。そこで、コラーゲンおよびゼラチン培地を用いて 3 次元培養をおこない、骨膜細胞の増殖が促進されることを明らかにした。コラーゲンは体温でゲル化するため、細胞移植における scaffold としての役割も期待できる。さらに、骨膜細胞から分取した CD90 陽性細胞は、培養において、高い増殖能と骨芽細胞分化能を示すことを明らかにした。マウスの大腿骨に骨欠損部を形成し、細胞の移植を行った骨再生実験においても、骨膜由来の CD90 陽性細胞は高い骨再生能を示すことを明らかにした。これら一連の実験に用いた手法は適切に選択されていたことと、実験結果が論文中に明確に示されていることを確認した。

一般に CD90 は間葉系幹細胞マーカーの一つであり、未分化な骨芽細胞様細胞に発現することから、CD90 陽性細胞は骨形成・骨再生に関与する可能性が考えられる。本研究において、金柔炅は骨膜由来の CD90 陽性細胞が、骨形成能および骨再生能に優れていることを明らかにした。これらの結果から、金柔炅は「骨膜由来の CD90 陽性細胞は骨再生のための細胞源として有効であることが示唆された。」と結論付けている。実験結果に基づいて結論に至るまでの考察が、論理的に適切におこなわれていることを確認した。

本研究において得られた結果は、骨再生に関連する臨床歯学の発展に大きく貢献すると考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小倉　健司
論文審査担当者	主査　小野 卓史 副査　野田 政樹　　青木 和広
論　文　題　目	Short-term intermittent administration of parathyroid hormone facilitates osteogenesis by different mechanisms in cancellous and cortical bone

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

副甲状腺ホルモンの間欠的投与は、骨において骨形成促進効果をもたらす。この作用機序を解明するため、本実験ではヒト PTH (1-34) (PTH) 投与初期の Osterix および Sclerostin の発現を蛍光免疫組織染色にて観察した。海綿骨においては、PTH 投与 1 日後に骨髄腔中の Osterix 陽性細胞数が著しく増加し、投与 3 日後から 5 日後にかけて緩やかに減少していた。また、PTH 投与による Sclerostin 陽性骨細胞の数に著明な変化は認められなかった。一方、皮質骨においては、PTH 投与による Osterix 陽性細胞数に著明な変化を認めなかったのに対して、Sclerostin 陽性骨細胞数の著しい減少が認められた。また PTH 投与 5 日後において、血清中の Sclerostin 濃度の低下と Osteocalcin 濃度の上昇が認められた。さらに骨形態計測の結果、PTH の連日投与により海綿骨の骨芽細胞面、類骨幅および類骨面の値が上昇したのに対し、皮質骨ではこれらの値の増大は認められなかった。以上の結果より、PTH 投与初期の骨形成促進効果において、海綿骨では Osterix 陽性骨原生細胞の増加が、また皮質骨では Sclerostin 陽性骨細胞の減少が、それぞれ重要な役割を担っている可能性が示唆された。

＜緒言＞

骨の恒常性の維持には様々なホルモンが関与しているが、副甲状腺ホルモンは骨形成と骨吸収という 2 つの相反する作用を持ち合わせている。多くの研究において、PTH を間欠的に投与した場合は骨形成が骨吸収を上回って骨量の増加が起こり、反対に持続的に投与した場合は骨吸収が骨形成を上回って骨量の減少が起こると報告されている。このような PTH の作用、特に投与初期における骨形成促進作用の詳細な機序はいまだ明らかになっていない。

骨芽細胞の分化は Runx2 や Osterix といった転写因子により制御されている。Osterix は骨芽細胞の分化の過程において、Runx2 と並び重要な働きを担う転写因子のひとつであることが明らかになっている。近年、Osterix がマウスの骨髄腔において骨芽細胞系統の細胞に特異的に発現することや、PTH の投与が骨芽細胞分化マーカーである CFU-F や CFU-ALP を増加することが報告されており、PTH が骨髄腔中の骨原生細胞の増殖、分化を調節している可能性が考えられる。以上の知見をふまえ、本研究は、PTH 投与初期における骨髄腔中の Osterix 陽性

細胞数の変化を解析することを目的とした。

BMP のアンタゴニストである Sclerostin は主に骨細胞から産生され、Wnt シグナルを抑制することで骨形成を阻害する。過去の報告では、マウスの腰椎において、PTH の持続的投与によって Sclerostin mRNA および Sclerostin タンパク質の発現が減少する一方、間欠的投与においては一過性に Sclerostin mRNA の抑制がおこるとされている。また、ラット大腿骨の皮質骨において、PTH の間欠的投与により Sclerostin mRNA が持続的に抑制されることも報告されている。一方、ラット大腿骨における Sclerostin および Osterix の発現を免疫蛍光染色により計測した研究の結果、皮質骨における Sclerostin 陽性骨細胞数が海綿骨と比較して著しく多いことが報告されているが、海綿骨と皮質骨における Osterix の発現分布の違いについて解析されていない。そこで本研究は、皮質骨および海綿骨における Osterix および Sclerostin の発現様相を免疫組織学的に探索することによって、海綿骨および皮質骨における PTH の作用機序を明らかにすることを目的とした。

＜方法＞

実験では、12 週齢雌性 SD ラットを Saline 投与群、PTH 連日投与群および PTH 単回投与群に分け、それぞれ 1 日後、3 日後および 5 日後に大腿骨の摘出を行った(各群 n=8)。Saline 投与群および PTH 連日投与群は、それぞれ Saline、PTH（30 μg/kg、旭化成ファーマより供与）を 1 日 1 回投与した。PTH 単回投与群は、初回のみ PTH を投与し、以降は Saline を 1 日 1 回投与した。薬剤はすべて皮下投与した。安楽死させたラットより大腿骨を摘出後、矢状断にて分割し、片側は固定、脱灰後、パラフィン包埋を行った。その後、長軸方向に 4 μm の切片を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色、および免疫蛍光染色を行った。もう一方は固定後、ビラヌエバ染色を行ったのち、MMA 樹脂包埋を行った。その後、長軸方向に 5 μm の切片を薄切し、骨形態計測に用いた。免疫蛍光染色では、1 次抗体として抗 Osterix ウサギポリクローナル抗体および抗 Sclerostin ヤギポリクローナル抗体を用い、Alexa Fluor 488 にて可視化し、Propidium Iodide にて核染色を行った。海綿骨の骨形態計測は、成長板から 2 mm 近位の部位を中心とした 3 mm^2 の領域を測定した。皮質骨の骨形態計測では、成長板から 10 mm 近位の部位を測定した。

ラット血清の生化学分析は、Osteocalcin 濃度および Sclerostin 濃度を ELISA 法にて、カルシウム濃度を MXB 法、リン濃度を PNP・XDH 法、Alkaline phosphatase（ALP）活性を Bessey-Lowry 法にて解析した。骨形態計測に関しては、海面骨では骨量、類骨幅、類骨面および骨芽細胞面の計測を、皮質骨では類骨幅および類骨面の計測を組織学的に行った。さらに免疫蛍光染色の結果から、海綿骨表面における骨芽細胞数の計測を行った。

データは平均値 ± 標準誤差にて示し、統計処理については 2 群間の比較には Student の t 検定を、3 群間の比較には Dunnett の多重比較検定を用いた。有意レベルはいずれも $p < 0.05$ とした。

＜結果および考察＞

ラット血清の生化学分析より、PTH 連日投与 5 日後の血清中 Sclerostin 濃度が有意に減少

した一方、骨形成マーカーのひとつである Osteocalcin の濃度は有意な増加を示し、骨形成が促進されている可能性が示された。血清中の ALP 活性およびカルシウム・リンの濃度に関しては、実験期間を通して PTH 投与による変動は認められなかった。

海綿骨の骨形態計測から、骨量に関しては PTH 投与による影響がなかったのに対し、類骨幅、類骨面、骨芽細胞数および骨芽細胞面は、PTH 連日投与により著明に増加していた。PTH 単回投与群では、類骨面の増加が認められた。一方、皮質骨においては、PTH 投与による類骨幅の減少が認められた。

次に、免疫蛍光染色にて PTH 投与後の海綿骨と皮質骨における Osterix 発現様相の変化を解析した。Saline 投与群においては、骨髄腔中の Osterix 陽性細胞は疎な分布を示した。PTH 投与 1 日後では、骨髄腔中の Osterix 陽性細胞数が顕著に増加し、海綿骨表面付近に集積してクラスターを形成しているものも存在した。PTH 投与 3 日後の Osterix 陽性細胞数は、投与 1 日後と比較すると減少していたものの、Saline 投与群と比較すると有意に増加していた。投与 5 日後の Osterix 陽性細胞数は、Saline 投与群と比較し有意な差は認められなかった。PTH 単回投与群では、投与 3 日後において Osterix 陽性細胞数は増加していたものの、連日投与群と比べるとその効果は小さく、投与 5 日後の Osterix 陽性細胞数は Saline 投与群との間で有意な差は認められなかった。海綿骨表面の Osterix 陽性細胞数を計測した結果、PTH 投与による著明な変化は認められなかった。以上の結果より、PTH の連日投与が骨髄中の骨原生細胞を増加させる可能性が示唆された。また、皮質骨における Osterix 陽性細胞の分布を調べたところ、外骨膜面よりも内骨膜面において、また前方皮質骨よりも後方皮質骨において Osterix 陽性細胞が多く分布していることが明らかとなった。前方・後方皮質骨の内骨膜面にて Osterix 陽性細胞数を計測したところ、いずれにおいても PTH 投与による著明な変化は認められなかった。以上の結果より、PTH 投与による骨形成促進効果に関して、皮質骨においては PTH の投与が Osterix 陽性細胞数に直接的に関与しているわけではない可能性が示唆された。

続いて、PTH 投与後の海綿骨と皮質骨における Sclerostin 発現様相の変化を解析した。海綿骨において、Sclerostin は骨細胞に限局して発現していたが、その陽性細胞率は低い値となった。また、PTH 連日投与群および単回投与群において、Sclerostin 陽性骨細胞数に PTH 投与による変化は認められなかった。したがって、PTH 投与による骨形成促進効果に関して、海綿骨においては PTH の投与が Sclerostin 陽性骨細胞数に直接的に関与しているわけではない可能性が示唆された。皮質骨においては、前方・後方皮質骨ともに多くの Sclerostin 陽性骨細胞の分布を認めた。外骨膜から内骨膜までの全幅において Sclerostin 陽性細胞数を計測したところ、PTH 連日投与群では投与 1 日後および 3 日後では Saline 投与群と比較して Sclerostin 陽性細胞率が有意に減少していたが、5 日後ではその差はなくなった。PTH 単回投与群では、投与 3 日後の後方皮質骨においてのみ有意な差が認められた。PTH 投与による Sclerostin 陽性細胞の減少が皮質骨中央よりも内骨膜・外骨膜側においてより顕著に確認されたため、内骨膜から 200 μm の範囲で Sclerostin 陽性細胞数の計測を行った。その結果、前方皮質骨の PTH 連日投与 3 日後を除くすべての実験群において、Sclerostin 陽性細胞数の有意な減少が認められた。以上の結果をまとめると、PTH 投与初期では海綿骨において Osterix 陽性細胞数が増加して骨形成が促進され、皮質骨では骨細胞による Sclerostin 発現が減少し、Wnt シグナル経路

の活性化が起こることで骨形成が促進されるという機序が示唆された。

＜結論＞

本研究において、PTH は海綿骨において骨髄腔中の Osterix 陽性骨原生細胞の増加により骨形成を促進し、皮質骨では骨細胞の Sclerostin 発現を抑制して骨形成を促進することが明らかとなった。本研究は、PTH の間欠的投与による骨形成促進効果が、海綿骨と皮質骨において異なるメカニズムによるものである可能性を初めて示唆するものであり、得られた研究結果は、PTH の詳細な作用機序を解明するための一助となり、今後の医学・歯学の発展に貢献するものと考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5071　号	小倉　健司
論文審査担当者	主　査　小野 卓史 副　査　野田 政樹　　青木 和広	
論 文 題 目	Short-term intermittent administration of parathyroid hormone facilitates osteogenesis by different mechanisms in cancellous and cortical bone	

(論文審査の要旨)

骨の恒常性の維持には様々なホルモンが関与しているが、副甲状腺ホルモンは骨形成と骨吸収という 2 つの相反する作用を持ち合わせている。多くの研究において、ヒト PTH (1-34) (PTH) を間欠的に投与した場合は骨形成が骨吸収を上回って骨量の増加が起こり、反対に持続的に投与した場合は骨吸収が骨形成を上回って骨量の減少が起こると報告されている。このような PTH の作用、特に投与初期における骨形成促進作用の詳細な機序はいまだ明らかになっていない。過去の報告において PTH の効果が骨の部位によって異なることから、申請者は海綿骨と皮質骨における PTH 投与初期の作用の違いを解析することを本研究の目的とした。その際、海綿骨の骨髄腔では間葉系幹細胞が豊富であることから、骨芽細胞の初期の分化マーカーである Osterix の発現を、また骨細胞が豊富である皮質骨においては BMP アンタゴニストとして知られる Sclerostin の発現を観察した。

実験では、12 週齢雌性 SD ラットを Saline 投与群、PTH 連日投与群および PTH 単回投与群に分け、それぞれ 1 日後、3 日後および 5 日後に大腿骨の摘出を行った(各群 n=8)。Saline 投与群および PTH 連日投与群は、それぞれ Saline、PTH (30 μg/kg、旭化成ファーマより供与) を 1 日 1 回投与した。PTH 単回投与群は、初回のみ PTH を投与し、以降は Saline を 1 日 1 回投与した。その後、摘出した大腿骨を矢状断にて分割し、片側はパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色および免疫蛍光染色を行った。もう一方はビラヌエバ染色を施したのち、MMA 樹脂包埋を行い、骨形態計測に用いた。海綿骨の形態計測は、成長板から 2 mm 近位の部位を中心とした 3 mm^2 の領域を測定した。皮質骨の形態計測は、成長板から 10 mm 近位の部位を測定した。

ラット血清の生化学分析は、Osteocalcin、Sclerostin、カルシウム、リンの濃度および Alkaline phosphatase (ALP) 活性を解析した。骨形態計測に関しては、海面骨では骨量、類骨幅、類骨面および骨芽細胞面の計測を、皮質骨では類骨幅および類骨面の計測を組織学的に行った。さらに免疫蛍光組織染色の結果から、海綿骨表面における骨芽細胞数の計測を行った。

これらの実験は、いずれも研究目的に対して適正に計画されたと考えられる。

以上の実験結果として、以下の 4 つの知見を得ている。

1) ラット血清の生化学分析より、PTH 連日投与 5 日後の血清中 Sclerostin 濃度が有意に減少した一方、骨形成マーカーのひとつである Osteocalcin は有意な増加を示し、骨形成が促進

されている可能性が示された。血清中の ALP 活性およびカルシウム・リンの濃度に関しては、実験期間を通して PTH 投与による変動は認められなかった。

2）海綿骨の骨形態計測から、骨量に関しては PTH 投与による影響が認められなかったのに対し、類骨幅、類骨面、骨芽細胞数および骨芽細胞面は、PTH 連日投与により著明に増加していた。PTH 単回投与群では、類骨面においてのみ有意な骨量の増加が認められた。皮質骨においては、PTH 投与による類骨幅の減少が認められた。

3）免疫蛍光組織染色にて PTH 投与後の Osterix 発現様相の変化を解析した。PTH 投与 1 日後では、骨髄腔中の Osterix 陽性細胞数の著明な増加を認めた。PTH 投与 3 日後の Osterix 陽性細胞数は投与 1 日後と比較して減少し、投与 5 日後においては Saline 投与群と有意な差は認められなかった。PTH 単回投与群では、投与 3 日後において Osterix 陽性細胞数は増加していたものの、連日投与群と比べるとその効果は小さく、投与 5 日後においては Saline 投与群と有意な差は認められなかった。したがって、PTH の投与初期において骨髄中の骨原生細胞が増加する可能性が示唆された。一方、皮質骨の内骨膜面にて Osterix 陽性細胞数を計測したところ、PTH 投与による著明な変化は認められなかった。

4）PTH 投与後の Sclerostin 発現様相の変化を解析した結果、海綿骨において Sclerostin は骨細胞に限局して発現していたが、その陽性細胞率は低い値となった。また PTH 連日投与群および単回投与群において、Sclerostin 陽性細胞数に PTH 投与による変化は認められなかった。皮質骨においては、PTH 連日投与群では投与 1 日後および 3 日後では Saline 投与群と比較して Sclerostin 陽性細胞率が有意に減少していたが、5 日後ではその差はなくなった。PTH 単回投与群では、投与 3 日後の後方皮質骨においてのみ、有意な差が認められた。PTH 投与による Sclerostin 陽性骨細胞の減少が皮質骨中央よりも内骨膜・外骨膜側においてより著明に確認されたため、内骨膜から 200 μm の範囲で Sclerostin 陽性細胞数の計測を行った。その結果、前方皮質骨の PTH 連日投与 3 日後を除くすべての実験群において、Sclerostin 陽性骨細胞数の有意な減少が認められた。

以上のように、申請者は、PTH 投与後の海綿骨と皮質骨における Osterix および Sclerostin 発現の変化を解析することで、PTH は海綿骨において骨髄中の Osterix 陽性骨原生細胞の増加により骨形成を促進し、皮質骨では骨細胞の Sclerostin 発現を抑制して骨形成を促進することを明らかとした。本研究は、PTH の間欠的投与による骨形成促進効果が、海綿骨と皮質骨で異なるメカニズムによるものである可能性を初めて示唆するものである。よって、本知見は、PTH の詳細な作用機序を解明するための一助となり、今後の医学・歯学の発展に貢献するものと考えられる。

本研究の着眼点と研究手法およびその成果は高く評価され、基礎および臨床医学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	ROMERO Maria Jacinta Rosario Hernandez
論文審査担当者	主査　川口陽子 副査　荒木孝二　横山三紀
論　文　題　目	Casein: A Potential Salivary Phosphoprotein Homologue for Tooth Mineral Regulation Modeling

緒言

唾液には、歯の形態を保つために石灰化物を形成するカルシウム（Ca^{2+}）や無機リン酸イオン（Pi）などのミネラルイオン、およびその形成を制御（あるいは抑制）するリンタンパク質が含まれている。このリンタンパク質は、アパタイトの形成に関して過飽和状態にある唾液中の Ca^{2+} と Pi をイオン状態で存在できるよう作用している。このリンタンパク質は、歯面に吸着し、膜形成してペリクルの一部として存在する。

これらのリンタンパク質は、インビトロのモデル実験でアパタイトの形成を抑制する作用のあることが報告されている。また唾液タンパク質は再石灰化そのものを抑制するが、フッ化物イオン（F^-）が存在すれば再石灰化は脱灰病変の内部まで起こることも実証されている。一方、F^-の存在下でヒト唾液タンパク質が存在しない場合、歯表面に不要な石灰化物が沈着して脱灰病変の内部まで再石灰化が進まないことも明らかにされている。ヒト唾液リンタンパク質の類似物質としてカゼインがある。カゼインはミルクに含まれるリンタンパク質の一種で、ヒト唾液リンタンパク質の特徴と類似した点を幾つか有している。

本研究ではカゼインに着目して研究を行った。第 1 論文の研究目的は、①カゼイン濃度とアパタイトの結晶成長の制御との関係、②カゼインのアパタイトへの化学吸着性のヒト唾液由来のリンタンパク質との類似性について明らかにすることである。第 2 論文の研究目的は、フッ化物存在の有無とカゼインの濃度が脱灰象牙質の再石灰化へ及ぼす影響について検討することである。

材料と方法および結果

研究 1（第 1 論文）

1. <u>アパタイト結晶成長に及ぼすカゼイン濃度の影響</u>

濃度の異なるカゼイン（0 - 100 ppm）を含む人工唾液（1 mM $CaCl_2$, 3 mM KH_2PO_4, 100 mM 酢酸 Na, 100 mM NaCl, 0.02% NaN_3, pH7.2) を調製した。これらの人工唾液に一定量のアパタイト粉末を加え、37℃にて撹拌してアパタイト結晶を成長させた。2 - 8 時間後に、アパタイト粉末を含む懸濁液をミリポアフィルターにてアパタイト粉末と人工唾液とに分離し、人工唾液に含まれる Ca^{2+}濃度の変化を原子吸光度計にて測定した。同様な実験をリン酸基を含まないカゼインについても行った。測定した Ca^{2+}濃度を反応時間軸に対してプロットし、アパタイトの結晶成長に消費された Ca^{2+}量を次の式（$y = Ae^{-\beta\sqrt{t}}$）に当てはめ、各カゼイン濃度における Ca^{2+}消費速度の比較を

行った（y：各時間における Ca^{2+}濃度、A：反応前の初期濃度、β：定数、t：反応時間）。この式を時間（t）について微分し、時間がゼロの時のβの値を比較値とした。各時間における繰り返しサンプル数を 3 とし、Repeated Measures ANOVA 法による統計解析を行った（有意水準; 0.05）。

2. エナメル質および象牙質表面での石灰化物の走査電子顕微鏡（SEM）観察

牛歯エナメル質と象牙質を包埋、鏡面研磨後、超音波洗浄して試料とした。試料は、上記の種々の濃度のカゼインを含む人工唾液に 1 および 2 週間静置後、試料表面を SEM 観察した。

3. 透過電子顕微鏡観察 (TEM)と電子回折法による解析

牛歯エナメル質と象牙質の試料表面に沈着した石灰化物がアパタイトであるかどうか、制限視野電子回折法（SAED）で確認した。試料はカゼイン（0, 10, 100 ppm）を含む人工唾液に静置後、通法に従って超薄切して作製した。

4. アパタイト表面へのカゼイン分子の吸着挙動の検討

100 ppm のカゼイン濃度の試験管に、アパタイト粉末（5 ～ 100 mg）を加え、37℃にて撹拌後、遠心分離機にてアパタイト粉末と溶液とに分離し、溶液中のカゼイン濃度（アパタイトへの吸着量）を改良 Lowry 法にて測定した。

5. アパタイト表面の電位（ゼータ電位）の測定

異なるカゼイン濃度（0 ～ 100 ppm）にアパタイト粉末を加え、37℃にて撹拌後、遠心分離機にてアパタイト粉末と溶液とに分離し、粉末を精製水で洗浄後、精製水に再度分散してゼータ電位を測定した。

これにより以下の結果を得た。

1. アパタイトの結晶成長に及ぼすカゼイン濃度の影響

① Ca^{2+}消費量を示す y の対数値は、時間の平方根との間で有意な相関性が認められ、強い直線性を示した（$r = -0.97$ ～ -0.99, $p < 0.05$, $R^2 = 0.94$ ～ 0.99）。

② y の値は、時間とカゼイン濃度の両方の影響を受けた（Repeated Measures ANOVA : $p < 0.001$）。

③ Ca^{2+}消費速度（β の値）は、カゼイン濃度がゼロの時に最大となり、濃度が高くなるに伴い小さくなった。また β の値とカゼイン濃度との間で有意な相関性が認められ、強い直線性を認めた（$r = -0.99$, $p < 0.005$, $R^2 = 0.98$）。

④ リン酸基を含むカゼインと含まないカゼインとを比較した場合、β の値に関して両者に有意差を認めたが（$p < 0.001$）、リン酸基を含むカゼイン（10 と 20 ppm）との間で有意差を認めなかった（$p > 0.05$）。

2. SEM 観察

カゼインを含まない場合、エナメル質および象牙質の試料面に、アパタイト結晶に特徴的な結晶が観察された。一方、カゼインを含む場合、1 週間後では結晶はほとんど観察されなかった。

3. TEM 観察と SAED による石灰化物の同定

カゼインを含まない場合、形成された結晶がアパタイトであることが確認された。カゼインを含む場合、アパタイト結晶の存在は確認されなかった。

4. アパタイト表面へのカゼイン分子の吸着挙動

カゼインの吸着強度は、唾液リンタンパク質と近い範囲内にあった。また最大吸着量の値も、唾液リンタンパク質の値の範囲内にあった。

5. アパタイト表面の電位（ゼータ電位）に及ぼすカゼインの影響

カゼインの吸着を受けていないアパタイト表面の電位は、-19 mV であった。一方、カゼインを含む人工唾液で処理したアパタイト表面の電位は大きく低下した（-42 mV）。

研究 2（第 2 論文）

6. 牛歯根面う蝕モデルの再石灰化の経時的変化

牛歯根部象牙質試料を脱灰液に浸漬して根面の初期う蝕モデルを作製後、エックス線分析法（TMR 法）にて試料の脱灰深さとミネラル喪失量を計測した。試料はフッ化物（0, 1 ppm）とカゼイン濃度（0. 10, 100 ppm）の異なる 6 種類の再石灰化液に浸漬し、4 週間の再石灰化の変化を TMR 法にて計測した。

7. コラーゲンに対する石灰化誘導能の検討

純粋なコラーゲン（スポンジ状ブロック）および EDTA で完全にアパタイトミネラルを脱灰した試料を作製し、10 ppm カゼインを含む再石灰化液に浸漬し、石灰化物の形成（誘導）をラマンスペクトル法にて検討した。

これにより以下の結果を得た

6. 牛歯根面う蝕モデルの TMR による計測

1) F^-が存在しない場合、再石灰化度はカゼイン濃度が 0 ppm＜100 ppm＜10 ppm の順に高くなった。
2) F^-が存在する場合、カゼイン濃度が 0 ppm の時、脱灰表面に多量の石灰化沈着物が観察された。一方、カゼイン濃度が 10, 100 ppm の時、脱灰表面に石灰化沈着物は形成されず、健全歯のミネラル密度の 90%以上に達した。特に 10 ppm で早期の再石灰化が認められた。

7. ラマンスペクトル法による検討

コラーゲン繊維に石灰化物の形成は検出されず、カゼインの石灰化誘導能は認められなかった。

考察

第 1 論文では、石灰化を制御する性質に関して、カゼインはヒト唾液リンタンパク質に近い性質を有し、またリン酸基を含まないカゼインでは、結晶成長の抑制作用が著しく低下することが示された。このことから、結晶成長の抑制作用はカゼイン分子に存在するエステルリン酸基が関与していると推察された。アパタイトへのカゼインの吸着現象は、カゼインのエステルリン酸基がアパタイト表面の Ca 原子に吸着することで生じると考えられた。またゼータ電位の顕著な低下は、電気的に陰性のカゼイン分子がアパタイト表面に多数吸着したことで起こったと推察される。以上より、カゼイン分子はヒト唾液リンタンパク質と類似したアパタイト結晶の成長抑制作用とアパタイトに対する吸着特性を有することが示唆された。

第 2 論文では、根面う蝕モデルの再石灰化への影響について検討した。F^-が存在しない場合、カゼイン濃度によって異なった再石灰化度を示し、第 1 論文の結果との間に矛盾が生じたが、ラマンスペクトル法の結果からは、カゼインによる石灰化誘導作用は認められなかった。一方、F^-が存在する場合、カゼインなしでは脱灰表面に多量の石灰化沈着物が観察されたが、これはインビボでは観察されない現象である。カゼインの人工唾液への添加は、よりインビボに近い環境を再現できる可能性を示した。さらに F^-とカゼインとが共存する場合、脱灰表面には石灰化沈着物は

観察されず、脱灰層内部に再石灰化の進行が確認された。すなわちカゼインは脱灰表面での石灰化物の沈着を抑制するが、脱灰病変内部での再石灰化に悪影響を与えないことを示している。

結論

カゼインは、アパタイトの結晶抑制作用およびアパタイト表面に対する吸着挙動において、ヒト唾液のリンタンパク質と類似していることが明らかになった。カゼインは、インビトロでの石灰化物の形成や抑制に関する研究において、唾液リンタンパク質のモデル物質としての可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5072　号	ROMERO Maria Jacinta Rosario Hernandez
論文審査担当者	主　査　川口陽子 副　査　荒木孝二　横山 三紀	
論　文　題　目	Casein: A Potential Salivary Phosphoprotein Homologue for Tooth Mineral Regulation Modeling	

（論文審査の要旨）

歯牙硬組織にかかわる変化は、脱灰や初期う蝕の再石灰化の他に歯石の形成や近年注目される酸蝕などが含まれる。特に、脱灰や初期う蝕の再石灰化に唾液リンタンパク質（以下 SP）が大きな影響を及ぼすことが示唆されている。具体的には、Proline Rich Proteins あるいは Statherin などが同定されており、インビトロの研究でアパタイトの結晶表面に強く化学吸着し、アパタイト結晶の成長を抑制することが知られている。

しかし、これまでの多くのインビトロ研究において初期う蝕の再石灰化研究で用いられてきた人工唾液は、ヒト唾液に溶解している Ca イオン（Ca^{2+}）と無機リン酸イオン（Pi）濃度および pH 値を模した単純な溶液を使用してきた。そのため、得られた知見が SP 存在下の口腔内での現象をどの程度忠実に反映しているかについては疑問である。

より口腔内環境に近い条件でモデル実験を行うためには、多量のヒト唾液が必要となる。しかし、多量の唾液の収集が必要であること、唾液成分において個人差が大きいこと、結果の再現性が乏しいこと、細菌による唾液タンパク質の変性が起こりやすいことなどの種々の困難から、これまで SP の影響下で行われたインビトロ研究はほとんどない。本実験は新規性が高く、口腔内における再石灰化のメカニズムを研究する上で非常に大きな意味がある。

本研究では、SP のモデルタンパク質としてその分子構造や等電点が類似しているカゼインに着目した。SP もカゼインもその分子中にエステル･リン酸基を複数保有する。本実験では、カゼインが石灰化に及ぼす影響をインビトロで評価し、モデルタンパク質としての可能性を考察した。このような研究は、全く新しい分野を拓くという意味で挑戦的な研究であるといえる。また SP のモデルタンパク質としてカゼインに着目した点も、その分子構造の化学的根拠として妥当であるといえる。さらにカゼインには、種々の精製物（α, β, γ）が入手可能であるが、いずれも高価で規模の大きい実験には制約がある。そこで、安価で誰でも入手でき、追試可能なカゼインとして、Hammartein のカゼインを選定した点も、第 3 者によって本研究に関連した新しい研究が広がっていく機会を与える点で評価できる。

本研究から得られた結果は以下の通りである。

1) カゼイン（検討濃度：10 ~ 100 ppm）は、濃度依存的にアパタイト粉末の結晶成長を抑制した。この濃度範囲は、ペリクル膜を形成する幾つかの SP（例えば、Proline Rich Proteins あるいは Statherin）の濃度範囲とほぼ同じであった。またエステルリン酸基を含まないカゼインの場合、アパタイトの結晶抑制作用は、顕著に低下した。

2) 人工唾液に牛エナメル質および象牙質試料を 1 週間浸漬し SEM 観察すると、試料表面にアパタイト様の結晶が多数沈着したが、最低濃度（10 ppm）のカゼインを含む人工唾液の場合、アパタイト様結晶はほとんど観察されなかった。

3) SAED にて、上記のアパタイト様結晶がハイドロキシアパタイトであることを確認した。

4) カゼイン分子に存在するエステルリン酸基がアパタイト表面に化学吸着することを上記の 1)の結果と合わせて、Langmuir 化学吸着モデルで立証した。カゼインの吸着力は、SP と同レベルであることを見出した。

5) アパタイト表面にカゼイン（100 ppm で処理）が吸着すると、アパタイト表面の電位（ゼータ電位）が顕著に低下した（処理前：-19 mV、処理後：-42 mV）。この低下は、負に帯電したカゼイン分子がアパタイト表面に吸着したことによるものと考えられる。

6) F^-が存在しない場合、カゼイン濃度によって再石灰化度は異なり、0 ppm＜100 ppm＜10 ppm の順で再石灰化度が高かった。

7) F^-が存在する場合（1 ppm）、カゼイン濃度 0 ppm の時、脱灰表面に多量の石灰化沈着物が観察された。一方、カゼイン濃度 10, 100 ppm の時、脱灰表面に石灰化沈着物は形成されず、脱灰層内部に再石灰化像が認められた。

8) ラマンスペクトル法にてコラーゲンスポンジに対するカゼインの石灰化物の誘導作用は検出されなかった。

本研究結果より申請者は説得力のある考察を展開し、カゼインの SP のモデルタンパク質としての可能性を示唆しており、象牙質の初期う蝕の再石灰化実験におけるカゼインの役割など、今後の研究の展開が期待される内容となっている。

本研究はいくつかの実験系から構成されており、これらを適切に遂行するためには、各実験についての高い専門性が要求されるが、申請者は実験方法や得られたデータの解釈においても周到に準備を行い、優れた研究遂行能力のもとに本研究が行われたことが伺われた。

以上のように本研究は、歯の石灰化に及ぼす唾液リンタンパクの影響を解明すべく、カゼインを用いた実験系を新たに考案し、カゼインの役割を検討したもので、本研究成果は臨床的に有益な情報であるばかりでなく、唾液のリンタンパク質の役割や再石灰化現象の基礎科学の発展に大いに寄与するものと考えられる。以上より本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	隈　陽一郎
論文審査担当者	主査　柴田　俊一 副査　深山　治久　　秀島　雅之
論　文　題　目	Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

閉塞性睡眠時無呼吸（Obstructive sleep apnea: OSA）は、高血圧や心筋梗塞、脳梗塞などの重篤な合併症を誘発する睡眠呼吸障害である。近年、成人のみならず、小児の OSA も報告され、小児 OSA 患者における成長障害が問題視されている。OSA 患者は就寝中の無呼吸と呼吸再開に伴う血中酸素濃度の急激な変動を繰り返す。最近の研究では、この間欠的低酸素（Intermittent hypoxia: IH）がさまざまな疾患の発症や増悪の原因として注目されている。本研究では、実験的に IH を再現できるチャンバーを用いて 7 週齢雄性ラットを 3 週間飼育し、呼吸に関与する鼻気道形態に対する IH の影響を解析した。形態評価には軟 X 線写真を用いた距離計測と、マイクロ CT を用いた断面積および容積を比較した。距離計測の結果、実験群において鼻腔の幅径が対照群に比べ有意に小さな値を示したが、高径および長径に関しては有意差が認められなかった。断面積および容積に関しては、実験群において前方部・中央部断面積および容積が対照群に比べ有意に小さな値を示したが、後方部断面積に関しては有意差が認められなかった。全身成長との比較のため、脛骨の長さで容積を補正したところ、補正値においても実験群は対照群に比べ有意に小さな値を示した。以上の結果から、成長期における IH 曝露は、ラット鼻気道の狭窄を生じることが明らかとなり、この上気道の狭窄は OSA の病態をさらに増悪させる可能性が示唆された。

＜緒言＞

閉塞性睡眠時無呼吸（Obstructive sleep apnea: OSA）は、睡眠中に上気道閉塞による呼吸停止または低呼吸状態が繰り返し生じる睡眠呼吸障害であり、低酸素血症や高二酸化炭素血症を呈する。成人の OSA は、高血圧、心筋梗塞および脳梗塞などの重篤な合併症を誘発することが多くの研究から示されている。一方、近年では成人のみならず、小児における OSA の報告がなされている。2005 年には、アメリカ睡眠医学会において小児 OSA の診断基準が定義され、小児 OSA に対する治療の重要性が提唱された。しかしながら、小児 OSA に関する臨床研究は少なく実験モデルが確立していないことから小児 OSA の病態機構は不明な点が多い。

OSA 患者は就寝中において、無呼吸状態における血中酸素濃度の低下と呼吸再開時の急激な酸素濃度の上昇を繰り返す。近年、OSA の主徴である間欠的低酸素（Intermittent hypoxia: IH）が、全身のさまざまな疾患の発症や増悪に関与することが注目されている。

IHは、交感神経系の活性化を介して呼吸器系および心血管系の機能異常を誘発するとともに、全身の骨代謝にも影響することが報告されている。一方、小児OSAは、成人のOSAと異なり、中枢神経の発達障害や内分泌代謝の異常を生じ、学習障害や全身成長の遅延が認められることが報告されている。顎顔面領域においては、扁桃肥大、歯列弓の狭窄および小顎症などを呈しており、小児OSAと中顔面部形態は非常に密接に関係していることが示唆されている。小児期における頭蓋顔面領域の成長障害は、成人のOSAへとつながる。しかしながら、小児OSAにおける顎顔面骨の劣成長の病態に関して不明な点が多く、その主徴の一つであるIHが成長期の中顔面部の成長に与える影響に関して検討した報告は見受けられない。

そこで、本研究では、IH曝露が呼吸に関与する鼻腔を含む中顔面領域の成長に影響を与えるとする仮説を立て、成長期ラットのIHモデルを作製し、IH曝露が鼻腔気道形態に与える影響について検討した。

〈方法〉

1. 成長期ラット間欠的低酸素曝露モデルの作製

動物モデルの作製は、動物実験実施施設のある東京大学動物委員会（実験承認番号 P12-149）の承認のもとで行った。健常6週齢雄性Sprague Dawleyラット10匹を1週間通常大気下で飼育した後、無作為に5匹ずつ実験群および対照群の2群に分け飼育を開始した。実験群においては、午前9時から午後5時までの8時間、20回/時間のサイクルで、内部の酸素濃度を4%ないし21%の間で反復的に変動することができる低酸素チャンバーを用いてIH環境を再現し、そのチャンバー内で3週間の飼育を行った。対照群は、低酸素ガスの代わりに、通常の大気を供給するチャンバー内で、3 週間飼育した。実験群および対照群の飼育チャンバーは隣接した場所に置き、酸素環境以外の条件は全て同じとなるようにした。3 週間の飼育期間の後、ラットをペントバルビタールナトリウム腹腔内注射による深麻酔下で屠殺し、断頭した後ホルマリン固定を行った。その後、頭部の形態解析のため、軟組織X線写真撮影およびマイクロCT撮影を行った。

2. ラット頭部および下肢の軟X線写真分析

ラット頭部を固定装置上で一定の方向から撮影できるように位置決めし、軟X線撮影によるラット頭部X線規格写真を軸方向と側面方向から撮影し、中顔面領域の形態分析を行った。鼻腔の大きさの指標として以下の点を設定し、距離計測を行った。

幅径M1-M1（M1：上顎第一臼歯）高径E-U（E：篩骨最前上方点と前頭骨の接点、U：第三臼歯最後方点と上顎骨の交点）前後径 ANS-PNS（ANS：上顎骨前鼻棘、PNS：上顎骨後鼻棘）また、頭部成長および全身成長に対するIH曝露の影響を比較するため、下肢のX線撮影を行い、脛骨の長さを測定した。

3. ラット鼻腔の3次元CT解析

ラット鼻腔気道の断面積および容積を算出するため、ラット頭部のマイクロ CT 撮影(SMX-100CT;島津製作所、京都)を行った。ラット頭部は、70kV管電圧・140mA管電流・0.044mm/voxelの条件にて撮影した。3次元CT解析には、CT画像解析ソフト（TRI/3D-BON；ラトックシステムエンジニアリング、東京）を用い、CT値が既知のファントムによってラット頭蓋顔面領域の組織全体から骨組織および軟組織を除いて鼻腔内部の画像を抽出した。ANS、EおよびPNSを指標として、それぞれ鼻腔前方部、中央部および後方部の気道断面積を測定し、鼻腔全体の容積を算出した。

4. 統計学的解析

計測した結果は、マン・ホイットニーのU検定およびスチューデントのt検定を用いて、有意水準を5%とした有意差検定を行った。

＜結果＞

1. ラット中顔面部の頭部X線写真分析

頭部軸位X線規格写真を分析した結果、実験群の上顎幅径（M1-M1）は、対照群に比べ有意に小さな値を示した。一方、頭部側面X線規格写真を分析した結果、中顔面部の高径（E-U）および前後径（ANS-PNS）は、実験群および対照群との間で、有意な差は認められなかった。

2. ラット鼻腔の3次元CT解析

ラット鼻腔の3次元CT解析により、ANS、EおよびPNSを指標として、鼻腔前方部、中央部および後方部の鼻腔断面積および容積を算出した結果、実験群の気道断面積は、鼻腔前方部・中央部において、対照群と比較して有意に小さな値を示し、鼻腔気道の容積も実験群において対照群に比べ有意に小さな値を示した。

＜考察＞

呼吸は、咀嚼や嚥下などの口腔周囲筋の機能と相互に影響し、頭蓋顔面複合体の正常な成長発育と密接に関わっている。鼻は呼吸機能における中心的な役割を担い、鼻腔の形態は、温度、湿度および高度などの環境に対して適応変化を示す。小顎症や歯列狭窄などの特徴的な顎顔面形態を有する小児OSA患者は、睡眠呼吸障害とともに、しばしば鼻呼吸障害を呈する。本研究は、小児OSAの主徴であるIH曝露を実験的に再現したラットIHモデルを作製し、成長期におけるIH曝露が鼻上顎複合体の形態に与える影響について検証した。

本研究において、ラット頭部の3次元CT解析から、成長期におけるIH曝露に伴い鼻腔断面積および気道容積が有意に減少することが明らかとなった。また、IH曝露による全身の骨成長に対する影響を検証したところ、下肢骨である脛骨の長さについて実験群と対照群の間に有意差が認められなかった。さらに、ラット鼻腔容積を脛骨の長さで補正した結果、実験群の鼻腔容積は、対照群と比較して有意に小さいことが明らかとなった。Padzysらは、動物モデルを用いて、鼻上顎複合体と頭蓋底の長さに成長期の鼻呼吸障害が関係することを示した。小児OSA患者を対象とした臨床研究や成長期動物を用いたIH曝露に関する基礎研究により、成長期の呼吸障害は、二酸化炭素に対する換気反応を減弱することが報告されている。鼻閉を伴うOSA患者は、睡眠障害と睡眠時酸素飽和度が、上顎洞手術により改善される。本研究で得られた結果を踏まえ、IH曝露に伴う上気道の成長障害が、成長期における呼吸障害を増悪させる可能性が考えられた。

IH曝露下においては、成長ホルモンの分泌減少や炎症性サイトカインの発現上昇などの成長および代謝に関わる影響が生じることが知られている。成人OSA患者を対象とした臨床研究により、患者の鼻中隔粘膜において誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の発現と一酸化窒素の産生が増加し、無呼吸低呼吸指数（Apnea hypopnea index: AHI）とiNOS発現レベルが相関することが示されている。また、小児OSA患者を対象とした血液生化学研究により、小児患者におけるNOS遺伝子多型が報告されている。NOSは、低酸素応答性タンパク質であり、炎症や成長に関する内因性因子の制御を担う。頭蓋顔面部形態の成長発育は、ホルモン・遺伝的要因・筋機能など複数の要因の影響を受けることから、IH曝露と頭蓋顔面部の成長発育の関係に関し成長ホルモンや炎症性

サイトカインに着目した研究が今後必要である。

＜結論＞

本研究から、成長期の IH 曝露に伴いラット鼻腔気道の狭窄が生じることが明らかとなった。この上気道の狭窄は、小児の呼吸障害の病態を増悪する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5073　号	隈　陽一郎
論文審査担当者	主 査　　柴田　俊一 副 査　　深山　治久　　秀島　雅之	
論 文 題 目	Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats	

（論文審査の要旨）

閉塞性睡眠時無呼吸（Obstructive sleep apnea: OSA）は、高血圧や心筋梗塞、脳梗塞などの重篤な合併症を誘発する睡眠呼吸障害である。近年、成人のみならず、小児の OSA も報告され、小児 OSA 患者における成長障害が問題とされている。顎顔面成長の劣成長を伴う小児 OSA 患者は、鼻呼吸障害を呈することが多い。OSA 患者は就寝中の無呼吸と呼吸再開に伴い、血中酸素濃度の急激な変動を繰り返す。近年、この間欠的低酸素（Intermittent hypoxia: IH）が、さまざまな疾患の発症や増悪に関与することが注目されている。しかし、小児 OSA の臨床病態に着目した顎顔面成長障害の研究は非常に少なく、上気道成長に対する IH 曝露の影響については解明されていない。このような背景のもと、隈陽一郎は、成長期における IH 曝露が中顔面部の成長を遅延し上気道形態の狭小化が生じるとする仮説を立て、IH 曝露を実験的に再現した成長期ラットモデルを作製し、呼吸に関連する鼻気道形態に対する IH 曝露の影響を、頭部エックス線規格写真およびマイクロ CT を用いて評価した。

研究方法としては、健常 6 週齢雄性 Sprague Dawley ラット 10 匹を 1 週間大気下で飼育した後、無作為に 5 匹ずつ実験群および対照群の 2 群に分け、各群を IH 曝露下および大気下で飼育した。実験群においては、午前 9 時から午後 5 時までの 8 時間、20 回/時間のサイクルで内部の酸素濃度を 4%ないし 21%の間で反復的に変動することができる低酸素チャンバーを用いて IH 環境を再現し、チャンバー内で 3 週間の飼育を行った。対照群は、低酸素ガスの代わりに、通常大気を供給するチャンバー内で、3 週間飼育した。実験モデルの作製のために使用した間欠的低酸素チャンバーは、エアーコンプレッサー、酸素および窒素発生装置、酸素ガスおよび窒素ガスを繰り返し混合する自動制御装置から構成され、混合ガスボンベから低酸素ガスを供給する、従来の低酸素飼育チャンバーと比較して、長期にわたり IH 曝露を簡便かつ確実に再現できる利点をもつ。隈の用いた実験モデルの作製方法については、複数の先行報告があり、確立された動物実験モデルであると言える。

3 週間の実験期間の後、両群ともペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射による深麻酔下で屠殺し、断頭した後ホルマリン固定を行った。その後、ラット頭部を固定装置上で位置決めし、軟 X 線撮影によるラット頭部 X 線規格写真を軸方向と側面方向から撮影した。幅径 M1-M1（M1：上顎第一臼歯）、高径 E-U（E：篩骨最前上方点と前頭骨の接点、U：第三臼歯最後方点と上顎骨の交点）および前後径 ANS-PNS（ANS：上顎骨前鼻棘、PNS：上顎骨後鼻棘）を測定し、全身成長の指標として、脛骨長を計測した。また、上気道の

3 次元形態を解析するため、頭部のマイクロ CT 撮影 (70kV 管電圧・140mA 管電流・0.044mm/voxel) を行い、鼻腔気道内部の画像を抽出して、鼻腔前方部、中央部および後方部の気道断面積ならびに鼻腔全体の容積を算出した。統計解析はマン・ホイットニーの U 検定およびスチューデントの t 検定を用いて、有意水準を 5% とした有意差検定を行った。これらの手法は、先行研究の結果を踏まえて十分に検討し、ラット顎顔面成長に関する非常に高い解剖学的知識のもとに適切に遂行されており、本研究に対する同人の熱意を感じさせるものである。

本研究で得られた結果の概要は、以下のようなものである。

1. 実験群の上顎幅径（M1-M1）は、対照群と比較して有意に小さな値を示した。
2. 中顔面部の高径（E-U）および前後径（ANS-PNS）に関しては、実験群および対照群との間に有意差は認められなかった。
3. 実験群の鼻腔前方部および中央部の断面積は、対照群と比較して有意に小さな値を示した。
4. 後方部の断面積に関しては、実験群および対照群との間に有意差は認められなかった。
5. 実験群の鼻腔全体の容積は、対照群と比較して有意に小さな値を示した。

これらの結果について、隈は、以下のように考察している。本研究で使用したラットの成長段階は、顎顔面領域の成長が活発な時期であり、上気道を構成する顔面骨が IH 曝露の影響を強く受け、上気道形態の狭小化が顕著に生じたと考えられる。また、鼻腔および顎骨の幅径が減少する一方で、その前後径に有意な差が認められなかった理由については、IH 環境における軟骨性成長および縫合性成長の影響の違いやラット頭蓋骨の解剖学的構造をもとに、考察している。先行研究において、小児 OSA 患者の鼻呼吸障害と炎症病態について報告されている。これらの報告に対し、隈は、低酸素に対する骨・軟骨の応答および炎症機構に関する基礎研究をもとに、成長期ラットにおける IH 曝露が、顎顔面骨の成長障害および気道粘膜の炎症の両面に対して作用して、呼吸障害を増悪させることを考察している。

本研究において、隈は、成長期の IH 曝露によりラット鼻腔気道の狭窄を生じることを示し、IH 曝露が顎顔面形態の成長発育を遅延し、上気道形態の狭小化を誘発することを明らかにした。上気道形態の不調和は、鼻呼吸障害の病態を憎悪する可能性が考えられるとともに、小児 OSA の早期の診断および治療の重要性を提唱している。以上より本研究は、顎顔面および上気道の成長に対する IH 曝露の影響を初めて報告したものであり、今後の基礎および臨床歯学の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	黒佐　通代
論文審査担当者	主査　森尾　郁子 副査　嶋田　昌彦　　鶴田　潤
論　文　題　目	Differences between Computer-Based and Paper-Based Assessments of the Clinical Reasoning Competency of Dental Students

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

臨床推論能力は、適切な歯科治療を実施するためには不可欠な要素である。この臨床推論能力を測定する方法としてコンピュータ試験（Computer-Based Test, CBT）が従来のペーパー試験（Paper-Based Test, PBT）より、有用であると考えられている。なぜならば、CBTの場合、教師は受験者に情報を与えるタイミングをコントロールすることができるからである。このことは受験者の思考過程に影響を及ぼす可能性があると考えられる。しかしながら、この２つの試験方法の間で成績の相違を調べた報告はほとんど行われていない。本研究において、黒佐らは臨床推論能力の評価法を開発し、受験者の成績を比較するためにCBTとPBTに応用し、相違を比較した。

対象は平成24年度東京医科歯科大学歯学部歯学科５年次学生60名であった。試験は４連問を25問、合計100問とした。試験問題内容はCBT、PBTともに同一とした。学生は男女比をほぼ均等に、CBT実施群（C群）30名、PBT実施群（P群）30 名に分けた。２群間の得点の相違については、単変量分散分析を用いて解析を行った。解答時間、総得点、問題毎の平均点に関しては２群間に有意差は認められなかった。４連問の全正解数はC群よりP群が高かったが、P群の学生の方が４連問中の先行した問題の情報にアクセス可能であったことが理由として考えられた。本研究結果からは、２つの試験法による受験者の成績の相違はほとんど認められなかった。

＜緒言＞

歯科学生の臨床能力には知識と技能が求められるのは言うまでもない。しかし臨床の現場では目の前に疾患を持った患者がいて、その患者の疾病を明らかにし、解決しようとする思考能力、すなわち臨床推論能力が備わっていないと、いかに歯科臨床技能を高めても、正しい歯科治療を実施することはできない。この臨床推論能力を育成する方法として、医学歯学教育の場で長く行われてきたのが学生あるいは研修医が実際の患者を診察し、指導医がこれを口頭試問や症例プレゼンテーションで評価するという方法である。現場の日常臨床業務から臨床推論能力を育成することは、知識だけではなく医師・歯科医師として患者に向き合う姿勢等、総合的に学ぶうえでも大変有用である。しかしこの方法の一番の欠点は、指導医も症例も異なるため、全部の臨床領域における臨床推論能力を万遍なく公平に育成・評価することが困難である点である。ところで、この臨床推論能力を育成・測定する方法の１つとして、CBT が有用であるといわれている。従来の

PBT は CBT とは異なる思考過程を取ると類推されるが、この両者の相違を調べた報告は渉猟しえた範囲では認めなかった。

本研究の目的は、同じ問題を使用した臨床推論試験における CBT と PBT という異なる媒体を用いた時の受験者の成績を比較することである。

＜方法＞

対象は事前に本研究の趣旨を説明、被験者になることを同意した東京医科歯科大学歯学部歯学科平成 24 年度５年次学生（平成 25 年度６年次学生）計 60 名で、内訳は男子学生 31 名、女子学生 29 名であった。試験実施期間は平成 25 年２月から６月までの４か月間とした。男女比、成績がほぼ均等となる CBT 群（以下 C 群）：30 名、PBT 群（以下 P 群）：30 名の２群に分けた。

試験問題は１問題につき連続した４設問とし、合計で 25 問、計 100 設問を作成した。原則として設問の作成内容は以下のようにした。

１設問目：医療面接内容、臨床所見等から次に必要な検査などを考えさせる。

２設問目：得られた医療面接や検査結果などを総合して、臨床的診断名を考えさせる。

３設問目：臨床診断名から適切な治療方法を考えさせる。

４設問目：３設問目以降に関連する術後の注意、予後経過等を考えさせる。

なお、前問が誤答でも次問の解答が可能なように前問の正解を次の問題文の中に示し、原則として４設問全てに異なる視覚素材を入れた。

試験は１日ひとりずつ行い、歯科総合診療部医局を会場とした。試験中は試験監督がつきそって不正の防止や試験環境の整備に努めた。解答時間は最大 100 分とし、試験終了後受験者は自由に退出できることとした。また退出時には解答にかかった時間（解答時間）を記録するようにした。C 群には臨床シミュレーションシステムを利用して問題が提示され、P 群は紙媒体で問題が提示された。回答は同一の紙媒体の用紙に記載された。試験後、受験者は、CBT と PBT でどちらが時間がかかるか、どちらが得点しやすいか印象を問う自記入式アンケートに回答した。

解答時間と得点は統計解析ソフトを用いて、単変量分散分析にて解析を行った（$P<0.05$）。

本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会より承認を受けている（平成 23 年 3 月 17 日、第 617 号）。

＜結果＞

得点と解答時間

各設問内容と設問順は得点に影響を与えたが C 群、P 群の総得点間に統計的有意差はなかった。正答率は１問目から４設問目へと進むに従い低下する傾向が認められた。１問題中の４設問の解答パターンでは、２群とも１設問目から連続して正解を選ぶ傾向を認めた。また、４設問全部が正解した問題数は C 群よりも P 群が有意に多くなった。解答時間は２群間に有意差を認めず、また、試験実施日と総得点にも相関は認めなかった。

アンケート結果

C 群、P 群の受験者ともに、解答時間は P 群が C 群より長くなること、得点は P 群が C 群より高いか同等になることを予想していた。また、数人の回答者は、前問の視覚素材が見られる点で、C

群よりもＰ群の受験者が有利であることを指摘していた。

〈考察〉

歯科医療の臨床現場では、歯科医師に高い臨床推論能力が求められるが、この臨床推論能力測定に用いられる試験法の１つとして多選択肢形式（multiple choice questions, MCQ）の客観試験がある。MCQ では、主に複数の診断仮説の中から正解を絞り込む能力を評価できる。本研究では、臨床推論能力を評価するための手段として、五肢択一式の MCQ４設問からなる問題 25 題より構成される試験を開発した。MCQ には様々な限界が指摘されている。例えば、診断仮説が選択肢として問題中に示されているため、診断仮説を思いつけるかどうかの能力は評価できない。また、問題作成に際しては、正解と共に正解と同じレベルの不正解選択肢を作成する必要があり、これが困難な作業となる。こうしたMCQの問題点を是正するためには記述式問題の利用が考えられるが、客観的な評価が難しくなる。本研究では、試験方法の比較のためにより客観的な評価法が望まれたため、出題形式に MCQ を採用した。

教育効果を考える上で、メディアの選択は大変重要である。コンピュータは紙媒体と比べプログラム可能性という点で優れている。臨床推論能力の評価には、情報提供のタイミングはプログラムされていることが望ましい。そのため、本研究では CBT を採用した。一方、メディアそのものがメッセージとして機能し、情報の送り手の意図しない効果を受け手に与える可能性があることも知られている。CBT では手段として用いたコンピュータが、教師が予想もしていない影響を試験者に与えているかもしれない。そのようなメディアによる想定外の影響を含めた CBT と PBT の差を検討するために、本研究ではメディア属性以外の試験条件は、両群間で可能な限り近似するように設定した。

その結果、２つの試験方法の間で解答時間、総得点、各問題の得点の間に有意な差は認めなかった。したがって、メディアの違いは試験者の全体的な成績に影響がないことが考えられた。C 群、P 群の総得点の平均は 100 点満点換算でそれぞれ 74.8 と 76.0 となり、共用試験 CBT とほぼ同様であった。本試験は数か月にわたって行われたが、期間中得点が上昇する傾向は認められなかった。臨床実習にて臨床推論を学習する機会が少ないことが懸念される。

既存の研究では、CBT と PBT の成績は比較可能であるという報告がある一方で、コンピュータはテストに影響するため同一性を確立するためには十分な配慮が必要とするレビューもある。本研究では、CBT と PBT の違いは MCQ の正解パターンに現れた。すなわち、４連問の全問正解数が CBT より PBT の方が高くなった。考えられる理由としては、PBT 受験者は前問に掲載されていた情報を戻ってみることができたのに対し、CBT ではできなかったことである。つまり、連問形式の MCQ の設定の違いが受験者の成績に影響を与えている可能性があるが、問題の構造と試験者の解答パターンの関係を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

受験者の推測と異なり、解答時間、得点共に CBT と PBT の間に差は認められなかった。CBT における受験者のコンピュータに対する不安は、実は試験に対する不安の１つの表現に過ぎないとする報告もある。受験者が事前に思うより「コンピュータ」は成績に影響しないのであろう。

本研究では、試験者は同時に試験を受けておらず、したがって本研究の結果を一斉に行う試験にあてはめることには限界があると思われる。また、それぞれの学生の媒体に対する親和性につ

いては検討されていない点も本研究の結果を利用するうえで考慮すべき点である。

＜結論＞

臨床推論試験を CBT と PBT にて行い、受験者の成績を比較したところ、解答時間、総合得点、問題毎の得点に差がなかったことから、媒体は受験者の全体としての成績に影響しないことが明らかになった。問題の構造と解答パターンについては今後さらなる研究が必要である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5074　号	黒佐　通代
論文審査担当者	主　査　森尾　郁子 副　査　嶋田　昌彦　　鶴田　潤	
論 文 題 目	Differences between Computer-Based and Paper-Based Assessments of the Clinical Reasoning Competency of Dental Students	

（論文審査の要旨）

近年の Information Technology の進歩をうけ、歯科医学教育においてもメディアとしてコンピュータを教育方略として利用することが多くなっている。特に、Computer-Based Test（CBT）は臨床実習に取り組む前の学生の質を担保するための全国歯学系共用試験等に採用されており、すでに 10 年の実績を有する。しかし、コンピュータを使用した場合と、従来の紙を使用した場合のメディアの違いがどう試験結果に影響するかについてはこれまでのところ十分検証されていない。本研究では、CBT と Paper-Based Test（PBT）の、メディアの違いが学生の試験結果に与える影響について研究を行っている。対象は平成 24 年度の本学歯学部歯学科５年次学生 60 名であるが、CBT と PBT の比較に際し、学生の学力、性別がほぼ均等になるよう群分けしている。試験問題は１つのテーマ（１題）に対し４つの連問から構成された 25 題、合計 100 問より構成され、CBT と PBT で同一のテキスト、画像を使用し、問題を提示するメディア以外の条件は可能な限り同一となるように配慮している。解答時間は最大 100 分とし、試験終了後受験者は自由に退出できるようにしている。また、退出時には解答にかかった時間（解答時間）を記録している。CBT 群（以下 C 群）には本学で開発した臨床シミュレーションシステムを利用して問題が提示され、PBT 群（以下 P 群）は紙媒体で問題が提示されている。回答は同一の紙媒体の用紙に記載している。

得られた解答時間と得点は多元配置分散分析等を用いて、交互作用を考慮の上検定されている。さらに、対象者に対し受験後アンケートを行い、それぞれのメディアを用いた場合の受験者のパフォーマンスについて主観的な印象を回答させることを行い、客観的評価と比較検討している。このように本研究は適切な解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1. C 群と P 群で、問題提示に用いたメディアの違いは総得点に影響をあたえなかった。また、解答時間にも差はなかった。
2. ４連問では２群とも１問目から連続して正解する傾向を認め、正答率は連問中１問目から４問目へと進むにしたがい低下した。
3. ４連問中全問正解した問題数は C 群よりも P 群のほうが多くなった。CBT では設問の提示がプログラム可能であり、問題を解くために必要な情報を一括でなく逐次提示・消去できることがその理由として考えられた。

4. アンケート調査では、被験者は解答時間、得点はＰ群のほうが高いか同等と予想しており、実際の結果と異なる印象を抱いていることが明らかとなった。
5. 結論として、メディアの違いは受験者の全体としての成績に影響しないことが明らかとなった。

以上のように、本研究によりCBTとPBT間のメディアの違いが受験者のパフォーマンスに与える影響について重要な知見を得られていることから、効果的な教育方略を検討するうえで高く評価できる。これらの研究成果は、歯科医学教育学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉田　千紘
論文審査担当者	主査　渡部　徹郎 副査　和泉　雄一、青木　和広
論　文　題　目	Property of human bone marrow stromal cells derived from bone fragments removed in sagittal split ramus osteotomy

（論文内容の要旨）

再生医療において細胞供給源は重要である。我々は骨再生医療の細胞供給源として下顎枝矢状分割術(SSRO; Sagittal Split Ramus Osteotomy)施行時に削除する皮質骨骨片に着目した。この骨片はこれまで術後に廃棄されていた。内骨膜領域である骨片の内側から骨髄間質細胞（BMSCs；Bone Marrow Stromal Cells）を採取、培養した。BMSCs は血清含有培地で容易に培養でき、かつ増殖能が活発であった。BMSCs は多分化能を有し、細胞表面マーカーの発現は間葉系幹細胞(MSCs; Mesenchymal Stem Cells）と同様であった。これらの結果から BMSCs 中に MSCs が含まれることが示唆された。また BMSCs は骨芽細胞分化誘導を行わなくとも高い ALP 活性能を有し、骨芽細胞マーカーを発現していた。そして移植実験において、BMSCs は骨芽細胞分化誘導を行わなくともハイドロキシアパタイト(HA; Hydroxyapatite)スキャフォールド内で異所性の骨形成を認めた。これらの結果から、SSRO 施行時に除去される下顎骨骨片は骨再生医療において有用な細胞供給源になりうることが示された。

＜緒言＞

骨再生医療は自家組織移植に代わる方法として精力的に研究されている。なかでも MSCs を用いた研究が盛んである。しかし、ヒトの MSCs は骨髄中または脂肪組織などに極少量しか存在せず、その選択培養の過程は煩雑である。また、骨髄穿刺や脂肪採取などは侵襲的である。我々は、骨再生医療における細胞供給源として、SSRO 施行時に除去される下顎骨骨片に着目した。SSRO は顎矯正手術の中でも最も一般的に行われる手術であり、定期的に骨片を入手することができる。本研究においては、骨片の内骨膜領域から細胞を採取し、得られた細胞の性質を検討した。

＜方法＞

SSRO 施行時に除去される骨片の内側から鋭匙を用いて細胞を採取し、維持培地（10%FBS 含有 α-MEM）にて培養した。実験には 2-3 継代目の細胞を用いた。ヒト歯肉から同様に培養した線維芽細胞を比較として用いた。増殖能の検討には Cell Counting Kit-8 を用いた。

多分化能は以下の通り検討した。

- 骨芽細胞分化誘導　維持培地に 0.2 mM アスコルビン酸、1 mM β グリセロフォスフェート、100 nM のデキサメタゾンを添加し、分化誘導培地とし、3 週間培養した。
- 脂肪細胞分化誘導　10%FBS 含有 DMEM 培地に 0.5 mM IBMX、1 μM デキサメタゾン、10 μM インスリン、200 μM インドメタシンを添加し、分化誘導培地とし、4 週間培養した。

・ 軟骨細胞分化誘導　high-glucose DMEM に 0.1 μM デキサメタゾン、50 μg/ml アスコルビン酸、100 μg/ml ピルビン酸、40 μg/ml プロリン、50 mg/ml ITS^{+} Premix、10 ng/ml TGF-β1 (transforming growth factor-β1) を添加し、分化誘導培地とし、3 週間ペレット培養を行った。
・ 平滑筋細胞分化誘導　10%FBS 含有 high-glucose DMEM に、10 ng/ml TGF-β1 を添加し、分化誘導培地とし、10 日間培養した。

RNA は TRIzol を用いて抽出し、Rever Tra Ace α を用いて cDNA を精製し、RT-PCR には TaKaRa LA Taq を用いた。サーマルサイクラーは Gene Amp PCR System 9700 を用いた。細胞表面マーカー(CD105、CD90、CD73、CD34、CD45)の発現をフローサイトメトリーを用いて検証した。解析には FACS Calibur を用いた。タンパク質は CelLytic™-M mammalian cell lysis/Extraction reagent を用いて培養細胞より抽出し、Bio-Rad Protein assay Kit を用いて検量した。ALP 活性は LabAssay™ALP を用い定量した。移植実験と組織学的検討を行った。スキャフォールドとして CELL YARD™HA scaffold を用いた。培養液に 30 分間浸水後、3 継代目の細胞（1.0×10^{6} 個/ml）を播種し、7 日間三次元培養を行った。その後に複合体を 5 週齢の免疫不全マウスの大腿筋内に移植した。コントロールとして細胞を播種していないスキャフォールドを反対側に移植した。移植体は 12 週後に取り出し、4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。ギ酸を用いて脱灰後、切片を作成した。ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、骨形成能を評価した。

＜結果＞

①細胞培養と増殖能

50 人の患者(年齢:18-44 歳)から骨片を採取し、全ての骨片からの初代培養に成功した。培養当初は球形の血球系細胞のみが観察されたが、徐々に紡錘形の骨髄間質細胞(BMSCs)が密になって増殖した。細胞は年齢、性別に関わらず高い増殖能を示した。7-8 継代目までは培養可能であった。

②Flow cytometery analysis

血球系細胞表面マーカーである CD34、CD45 は陰性、間葉系幹細胞(MSCs)マーカーである CD105、CD90、CD73 は陽性であった。この発現パターンは MSCs と同様であった。これより採取した BMSCs は MSCs を含んでいることが示唆された。

③多分化能

間葉系幹細胞の要件である多分化能について検討した。

1) 骨芽細胞分化誘導

Alizarin red S 染色にて分化誘導群は陽性であった。一方、コントロール群は陰性であった。RT-PCR を行った結果、BMSCs は分化誘導を行わなくとも骨芽細胞マーカーである PTHr (parathyroid hormone receptor)、OCN (osteocalcin)、BSP (bone sialoprotein)、Runx2 (Runt-related transcription factor 2)、type Ⅰ collagen を発現し、また、ALP 活性はヒトの線維芽細胞と比較して高い活性を持った。

2) 軟骨細胞分化誘導

トルイジンブルー染色の結果、分化誘導群はメタクロマジーを呈していた。また、分化誘導群は type Ⅱ collagen 陽性であるのに対し、コントロール群は陰性であった。

3) 脂肪細胞分化誘導

Oil red O 染色を行った結果、分化誘導群は核周囲に脂肪滴が染色されているのに対し、コントロール群は脂肪滴が見られなかった。

4) 平滑筋細胞分化誘導

α-SMA の免疫染色の結果、コントロール群は弱く発現していたのに対し、分化誘導群では強く発現していた。

④骨芽細胞分化誘導を行わなかった細胞の *in vivo* における骨形成能

BMSCs を播種しなかった HA スキャフォールド内には骨形成は認められなかった。一方、細胞を播種した HA スキャフォールド内には、異所性の骨形成が認められた。異所性の骨形成は 10 人の患者から採取した全ての細胞において認められた。

＜考察＞

SSRO 施行時に除去される骨片から BMSCs を採取し、容易に細胞培養を行うことができた。この細胞収集を行う過程においては、患者に対する侵襲性はない。今まで廃棄されていた骨片が、骨再生医療の細胞供給源と成りうる事は非常に有益である。

骨片の内側、すなわち内骨膜領域から細胞を採取した。内骨膜領域は血球系細胞のニッチであり、骨芽細胞や骨芽細胞前駆細胞の分化過程における様々な段階の細胞や間葉系幹細胞が存在すると考えられている。本研究においても、収集した細胞は骨芽細胞系統のマーカーを発現し、高い ALP 活性を示した。よってこれらの細胞は骨再生医療に適していると考えられる。さらに BMSCs は多分化能を有しており、細胞表面マーカーの発現パターンから間葉系幹細胞を含んでいることが示唆された。間葉系幹細胞の存在は、骨再生医療に有益である。これらの結果から、内骨膜領域から得られた細胞群は骨再生医療に適していると考えられた。

過去の骨再生医療の研究では様々な組織から MSCs が単離され、骨芽細胞への分化のため BMP(Bone Morphogenetic Protein)や Dex(Dexamethasone)などの分化誘導因子が使用されてきた。しかし臨床応用を考慮すると簡単で安全な方法が求められる。内骨膜領域から採取された BMSCs は、*in vivo* における MSCs の単離や、分化誘導因子を用いなくとも異所性の骨形成を認めた。これは高いコストや、副作用を避けることができる。また、MSCs の単離が必要ないのに加え、内骨膜領域に含まれる間葉系幹細胞、骨芽細胞、骨芽細胞前駆細胞のすべてを利用することができ、効率も良い。この手法であればシンプルで安全な骨再生医療を行うことができる。

しかし、臨床応用には依然問題がある。まずは血清の問題である。本研究においては牛胎児血清を使用しているが、BSE や未知の感染性物質などの問題があり臨床応用は難しい。安全を考慮し、自己血清や無血清培地での検討が必要と考えられる。次にスキャフォールドの問題である。本研究にて使用した HA は、強度はあるが脆く、また生体内で溶解しない。強度があり、生体内溶解性があるスキャフォールドの開発が必要である。

これまでの再生医療において自家細胞移植が主に考えられてきた。しかし、その利用に限界がある。我々は下顎骨骨片より得られる細胞により細胞バンクを構築し、その細胞を同種他家移植に利用することを考えている。そのためには細胞の凍結保存が必要となる。今後、長期凍結保存後の細胞の性質についても検討する必要がある。

＜結論＞

SSRO 施行時に除去される骨片から採取される細胞は、骨再生医療に有用であると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5075　号	吉田　千紘
論文審査担当者	主　査　渡部　徹郎 副　査　和泉　雄一　　青木　和広	
論 文 題 目	Property of human bone marrow stromal cells derived from bone fragments removed in sagittal split ramus osteotomy	

（論文審査の要旨）

＜要旨＞

再生医療において細胞供給源は重要である。吉田千紘は骨再生医療の細胞供給源として下顎枝矢状分割術(SSRO; Sagital Split ramus Osteotomy)施行時に削除する皮質骨骨片に着目した。この骨片は今まで廃棄されていた。内骨膜領域である骨片の内側から骨髄間質細胞（BMSCs ; Bone Marrow Stromal Cells）を採取、培養し、同細胞群の骨再生医療への適性について検討した。この着眼点は極めて優れたものであると評価された。

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. 50 人の患者(年齢:18-44 歳)から、SSRO 施行時に削除した骨片の内骨膜領域から細胞を採取し初代培養を行うと、すべての患者の細胞から BMSCs の形態を持つ細胞が採取、並びに継代培養が可能であった。
2. BMSCs の増殖能は年齢性別による違いはなかった。
3. BMSCs は、血球系細胞表面マーカーである CD34、CD45 は陰性、間葉系幹細胞(MSCs)マーカーである CD105、CD90、CD73 は陽性であった。この発現パターンは MSCs と同様であった。また、多分化能（骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞）を有した。
4. 分化誘導を行わずに培養した細胞群に RT-PCR を行ったところ、骨芽細胞マーカーである PTHr、OCN、BSP、Runx2、type I collagen を発現し、また ALP 活性はヒトの線維芽細胞と比較して高い活性を持った。
5. 分化誘導を行わずに培養した細胞を HA スキャフォールドに播種し、免疫不全マウスの大腿筋内に移植したところ、異所性の骨形成を認めた。

以上の結果から、吉田は本研究で、SSRO 施行時に除去される骨片から採取される細胞群は、年齢・性別によらず活発な増殖能を持ち、また細胞群の一部に間葉系幹細胞が含まれることが示唆され、分化誘導を行わなくとも骨再生に有用であることを発見した。

骨片の内骨膜領域は、血球系細胞のニッチと考えられている骨芽細胞が存在し、また骨芽細胞やその前駆細胞の分化過程における様々な段階の細胞や、間葉系幹細胞が存在すると考えられている。よって、同部位は骨再生医療の細胞供給源として非常に有用であると考えられる。

また過去の様々な研究では、様々な組織から MSCs が単離され、骨芽細胞分化のため BMP(Bone

Morphogenetic Protein)やDex(Dexamethasone)などの分化誘導因子が使用されてきた。しかし、臨床応用を考慮すると、簡単で安全な方法が求められる。本研究で得られた細胞群はMSCsの単離や分化誘導因子を用いなくとも異所性の骨形成を認めることを吉田は発見した。この方法を用いると、高いコストや副作用を避けることができ、また、MSCsの単離が必要ないのに加え、内骨膜領域に含まれる間葉系幹細胞、骨芽細胞、骨芽細胞前駆細胞のすべてを利用することができ、効率も良い。本結果は骨再生医療にとって重要な結果であると考えられ、臨床応用につながる結果であることも評価できる。今後臨床応用に向けてより一層研究が進められることを期待したい。

このように本研究は、骨再生医療における一つの細胞源を提供する観点から重要な発見をなしたことから、医学領域のみならず歯科医学における新規治療法の開発へと発展する可能性も示している。

以上により、本論文は博士(歯学)の学位を請求するにあたって十分価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	遠井 政行
論文審査担当者	主査　井関 祥子 副査　春日井 昇平、横山 三紀
論　文　題　目	Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

エクソソームは細胞が分泌する膜小胞であり、核酸、タンパク質等を内包し、細胞間情報伝達機能を有する。間葉系幹細胞（MSC）由来エクソソーム（MSC-exo）は、創傷治癒に効果を表すことが報告され、様々な組織由来の MSC-exo を用いて実験が行われてきたがその作用には未だ不明な点が多い。本研究においては、ヒト胎盤 MSC（PlaMSC）由来エクソソーム（PlaMSC-exo）の線維芽細胞に対する効果を in vitro で検討した。

PlaMSC の培養上清より超遠心法にてエクソソームを回収した。PlaMSC-exo は、成人ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF）に作用させて幹細胞関連遺伝子の発現量を検討し、Oct4-GFP マウス線維芽細胞に作用させて Oct4 の転写活性を調べた。PlaMSC-exo の NHDF における骨芽細胞・脂肪細胞分化に対する影響を各種染色法とリアルタイム PCR を用いて検討した。

PlaMSC-exo は、線維芽細胞の OCT4, NANOG 発現量を上昇させ、Oct4 転写活性を上昇させた。また、PlaMSC-exo は、骨芽細胞・脂肪細胞分化条件下における NHDF の骨芽細胞・脂肪細胞分化を促進した。これは MSC の新しい機能と MSC-exo の臨床応用の可能性を示している。

〈緒言〉

MSC が産生する種々のパラクライン因子は組織修復に関与することが報告されている。胎児付属器官である胎盤から得られる MSC は、他の組織由来 MSC と同様に多分化能と増殖能を維持し、その培養上清には抗炎症作用や神経保護作用があると報告されている。多分化能を維持する転写因子として OCT4 や NANOG が知られているが、これらの転写因子は相互作用して胚性幹細胞における自己複製の調整をしていることが知られており、ヒト骨髄由来 MSC（BMMSC）や PlaMSC においても OCT4, NANOG が発現していることが報告されている。

エクソソームは細胞から分泌される直径 40-120nm のリン脂質二重膜で覆われた小胞である。エクソソームは、細胞培養上清や血液などの体液中に存在し、表面に CD9, CD63 が局在している。エクソソームは、その由来する細胞の mRNA, microRNA (miRNA), タンパク質などを内包しており、エクソソームを受け取った細胞へ水平伝播して作用することが報告されている。近年、MSC-exo が、皮膚損傷モデルにおいて血管新生と瘢痕化抑制をすること、脳損傷モデルにおいて

抗炎症作用を示し血管や神経の新生を生じさせるなど、MSC-exo が創傷治癒に様々な効果を表すことが報告されてきている。しかし、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。また、癌細胞由来エクソソームは、作用した細胞の分化に影響を与えるとの報告があるが、MSC-exo の細胞分化への影響は十分に検討されていない。

よって本研究では、MSC の組織修復への関与にエクソソームがどのような機能を果たしているかを明らかにするため、線維芽細胞に MSC-exo を作用させ、線維芽細胞の分化段階への影響と分化誘導刺激に対する応答性の変化について検討した。

〈方法〉

PlaMSC は、ヒト胎盤から酵素処理法によって採取し、フローサイトメトリーを用いて MSC 関連の細胞表面マーカーの発現を検討した。骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞への分化は、Lonza 社の Osteogenic, Adipogenic, Chondrogenic 分化培地をそれぞれ用いた。

PlaMSC を 80%コンフルエントまで培養し、無血清 Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM) に置換し、48 時間培養後に培養上清を回収した。この培養上清を超遠心して沈殿物を回収し、タンパク質量を計り、Western blotting 法にてエクソソームマーカー（CD9, CD63）の発現確認を行った。

PlaMSC に pCT-CD63-GFP をトランスフェクションして、PlaMSC 中でのエクソソームの存在を確認するとともに、PlaMSC より分泌されたエクソソームの粒子の形状について透過型電子顕微鏡で観察し、粒径を動的光散乱法によって測定した。また、蛍光標識したエクソソームの、NHDF への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。

BMMSC 由来エクソソームと HeLa 細胞由来エクソソームを同様に回収し、PlaMSC-exo とこれら 2 種類のエクソソームをそれぞれ培養中の NHDF に作用させて 48 時間後、NHDF での幹細胞関連遺伝子の mRNA 量を調べた。

Oct4-EGFP レポーターマウス由来皮膚線維芽細胞に PlaMSC-exo, NHDF やヒト骨肉腫細胞株（Saos2）由来エクソソームをそれぞれ加え、24 時間培養後に Oct4 の転写活性を観察した。

分化誘導刺激に対する応答性では、NHDF にエクソソームを作用させた 48 時間後に BMP-2 にて骨芽細胞分化の誘導を開始した。3 日後にアルカリホスファターゼ（ALP） 染色を行い、骨芽細胞分化関連遺伝子の発現量を調べた。さらに、3 日後より Osteogenic 分化培地を用いて培養を行い、石灰化の評価を Alizarin red S 染色で行った。脂肪細胞分化については、NHDF にエクソソームを加えた 48 時間後に Adipogenic 分化培地を用いて培養を継続した。3 週間後、脂肪分化関連遺伝子の発現解析と Oil red O 染色を行った。

〈結果〉

ヒト胎盤由来細胞は線維芽細胞様の形態を呈し、コロニー形成能を示した。MSC マーカーである、CD73, CD140b, CD146, CD166 の発現は陽性であり、MSC 陰性マーカーである CD31, CD34, CD45 の発現は極めて低かった。また、分化誘導に反応して骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞へと分化した。これより PlaMSC の採取が確認された。

pCT-CD63-GFP をトランスフェクションした PlaMSC では、核周囲に CD63 陽性の蛍光像が

確認され、PlaMSC 培養上清より精製したエクソソームは、電子顕微鏡像にて球形の構造を示し、その粒径が直径 50-100nm であった。また、Western blotting にてエクソソームマーカーである CD9, CD63 の存在が確認され、PlaMSC がエクソソームを産生することを確認した。

蛍光標識された PlaMSC-exo は、培養下にある NHDF に添加して 2 時間後には細胞内への取り込みが認められ、その量は経時的に増加した。

NHDF に PlaMSC-exo を作用させた群では、OCT4 と NANOG の mRNA 量はコントロールと比較して有意に高かった。一方、BMMSC, HeLa 細胞由来エクソソームを添加した群では、OCT4 の mRNA 量の上昇は認められなかった。PlaMSC-exo および NHDF, Saos2 由来エクソソームを Oct4-EGFP レポーターマウス由来皮膚線維芽細胞に添加したところ、PlaMSC-exo を添加した群で Oct4 の転写活性が上昇した。

PlaMSC-exo を NHDF に作用させ、BMP-2 を用いて骨芽細胞分化誘導したところ、対照群ではほぼ認められたなかった ALP 陽性の染色像を認めた。また、骨芽細胞分化決定因子である OSX の遺伝子発現量が有意に上昇した。Osteogenic 分化培地による培養後の Alizarin red S 染色では、PlaMSC-exo 処理した群で染色面積が有意に増加し、石灰化が促進されたことが明らかとなった。また、PlaMSC-exo を培養下の NHDF に添加後、Adipogenic 分化培地にて培養したところ、Oil red O 陽性の細胞が有意に多く認められ、脂肪細胞分化関連遺伝子である aP2 の発現量も有意に上昇した。

〈考察〉

本研究では、PlaMSC-exo を取り込んだ NHDF の OCT4 の遺伝子発現が上昇したが、BMMSC や HeLa 細胞由来のエクソソームでは、発現量に変化は認められなかった。PlaMSC と BMMSC での OCT4 の遺伝子発現量に差は認められないため、この現象が PlaMSC-exo 特有のものかは今後検討する必要がある。エクソソームによる細胞間情報伝達のパターンはいくつか提唱されており、その一つに細胞中の mRNA がエクソソームに取り込まれ、水平伝播するというものがある。そのため、PlaMSC-exo 中での OCT4, NANOG の mRNA 量を調べたが、NANOG がごく僅かに検出されるだけであった。さらに、本研究の中で PlaMSC-exo を Oct4-EGFP レポーターマウス由来皮膚線維芽細胞に添加した際に Oct4 の転写活性が 2 時間後には認められるようになることから、作用機構として考えられるのは、エクソソーム膜に存在するタンパク質が細胞表面のレセプターと結合することで生じるシグナル伝達か、エクソソーム中の転写因子や miRNA に代表される non-coding RNA によって誘導される転写活性の上昇である。PlaMSC-exo に内包される miRNA が直接 Oct4 の転写を活性化させるかは今後検討すべき課題であり、non-coding RNA が直接転写調節に関与することも報告されており、今後の詳細なメカニズム解析が必要である。

PlaMSC-exo は NHDF における OCT4 発現量を、コントロールと比較して僅かに（約 2 倍）上昇させた。本実験において、PlaMSC-exo が NHDF の骨芽細胞・脂肪細胞分化誘導に対する応答性を向上させたが、この現象が PlaMSC-exo による OCT4 の発現量増加と直接関係あるのかは今後検討が必要である。ただし、多能性ネットワークに関与している癌抑制遺伝子の一つである Rb 遺伝子が、分化した細胞で不活性化されるとその細胞が多能性を獲得するとの報告があり、その際に Oct4 の発現が約 2 倍上昇することが報告されている。しかしながら、この上昇後の Oct4 発

現量は、ES 細胞における Oct4 発現量にはまったく及ばない。このように、分化応答性を強くするには、必ずしも ES 細胞のような高い OCT4 の発現量が必要でない可能性も示されている。現在、PlaMSC-exo の効果として Rb 遺伝子が不活性化するかを検討中である。

細胞培養上清中にはエクソソーム以外にもマイクロベジクルやアポトーシス小胞などの膜小胞が存在する。これらは、大きさや起源、単離法により区別されている。本研究で用いた手法によって得た小胞は、形態、大きさ、表面マーカーから、エクソソーム以外の小胞の混入は低いと思われるが、今後の詳細な解析のためには、より厳密な単離法と特徴付けが必要である。

＜結論＞

PlaMSC-exo は NHDF に取り込まれ OCT4 と NANOG の遺伝子発現を上昇させた。また、Oct4 の転写活性を上昇させた。さらに、PlaMSC-exo を取り込んだ NHDF の分化誘導刺激に対する応答性を変化させた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5076　号	遠井 政行
論文審査担当者	主　査　井関 祥子 副　査　春日井 昇平、横山 三紀	
論 文 題 目	Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts	

（論文審査の要旨）

エクソソームは細胞が分泌する膜小胞の一つであり、核酸、タンパク質等を内包し、様々な細胞間情報伝達機能を有することが報告されている。例えば、癌細胞由来エクソソームは作用した細胞の分化に影響を与えるとの報告があるが、その効果は十分に理解されていない。一方、間葉系幹細胞（MSC）には創傷治癒促進効果があることが報告されており、再生医療などへの応用が期待されているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。

遠井は、MSC-exo が移植された MSC 周囲のホスト細胞に作用して細胞分化などの調節に関与することで、MSC の創傷治癒促進効果に一翼を担っていると仮定し、ヒト胎盤 MSC 由来エクソソームを用いて細胞分化に対するエクソソームの作用を検討した。

本研究では、ヒト胎盤より、酵素処理法によって MSC を回収した。フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の発現解析によって MSC 陽性マーカーと陰性マーカーの発現を確認し、コロニー形成能、骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞への分化能を確認することで本細胞が MSC であることを確認した（PlaMSC）。次に PlaMSC を無血清培地にて培養し、培養上清から超遠心法を用いてエクソソーム（PlaMSC-exo）を回収し、PlaMSC-exo であることを確認した。さらに、緑色蛍光色素にて標識した PlaMSC-exo を用いて、成人ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）への PlaMSC-exo の取り込みを確認した。

上記の手順で回収された PlaMSC-exo を培養下にある NHDF へ添加し、48 時間後に total RNA を回収して幹細胞関連遺伝子（OCT4, NANOG）発現量について検討した。さらに、Oct4-EGFP reporter mice 由来皮膚線維芽細胞を用いて、PlaMSC-exo を作用させた時の Oct4 転写活性を調べた。NHDF の分化応答性に対する PlaMSC-exo の作用を検討するため、NHDF に PlaMSC-exo を作用させた後に骨芽細胞と脂肪細胞へ分化誘導させ、アルカリホスファターゼ（ALP）染色、Alizarin red S 染色、Oil red O 染色で分化状態を評価し、さらに、骨芽細胞分化関連遺伝子、脂肪細胞分化関連遺伝子の発現量についてそれぞれ検討した。

一連の実験より遠井は以下の結果を得た。

・　ヒト胎盤より間葉系幹細胞が採取され、本細胞の培養上清にエクソソーム（PlaMSC-exo）が分泌されている。

・　PlaMSC-exo は培養下にある NHDF に取り込まれ、NHDF の OCT4, NANOG の mRNA 量を上昇させた。また、Oct4-EGFP レポーターマウス 由来皮膚線維芽細胞の Oct4 転写を活性化した。

・　PlaMSC-exo は NHDF の骨芽細胞分化、脂肪細胞分化に対する刺激応答性を上昇させた。

これらの結果から遠井は以下のことを考察した。

・　PlaMSC-exo は NHDF の OCT4 の発現量を上昇させた。一方、ヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームはその効果を示さなかった。エクソソームが由来する細胞での OCT4 の発現量には差が認められなかったことから、この OCT4 発現調節が PlaMSC-exo 特有のものか否かは今後検討する必要がある。

・　PlaMSC-exo が NHDF の OCT4 発現を上昇させるメカニズムとして、PlaMSC-exo 中に含まれる OCT4 量が定量 PCR において検出限界未満であったこと、Oct4-EGFP reporter mice 由来線維芽細胞の実験において、PlaMSC-exo 添加後 2 時間で転写活性の上昇が認められたことから、エクソソームに局在するタンパク質によるシグナル伝達の結果、または non-coding RNA による直接的な転写活性の上昇と考えられる。

・　PlaMSC-exo は NHDF の OCT4 発現量を、コントロールと比較して僅かに（約 2 倍）上昇させた。癌抑制遺伝子の一つである Rb 遺伝子は多能性ネットワークに関与しており、Rb 遺伝子の不活性化は分化した細胞の多能性獲得を誘導するとの報告がある。その際の Oct4 の遺伝子発現はコントロールに比べて約 2 倍であり、ES 細胞における Oct4 発現量と比較してごく僅かな上昇である。本実験において PlaMSC-exo が NHDF の骨芽細胞・脂肪細胞分化誘導に対する応答性を向上させたが、Oct4 の発現量変化は分化能を上昇させるのに十分であった可能性が示唆される。

このように、遠井は、PlaMSC-exo が線維芽細胞に取り込まれ、幹細胞関連遺伝子である OCT4 の発現を上昇させ、さらに PlaMSC-exo を取り込んだ NHDF の分化誘導刺激に対する応答性を向上させることを明らかにした。

MSC-exo が細胞の刺激応答性を調節することは、これまでの幹細胞研究で知られていなかった機能であり、MSC を利用した治療の新たな可能性を示唆するものである。これらの結果は、再生医療研究の観点から極めて重要なものであり、本研究をさらに発展させることで、幹細胞を用いた医科および歯科分野での再生治療の進展に大きく貢献するものと考えられる。

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐々木　陽子
論文審査担当者	主査　泰羅　雅登 副査　嶋田　昌彦　　篠塚　修
論　文　題　目	Correlation between body movements and salivary secretion during sedation

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

静脈内鎮静法下の歯科治療では，咳反射を起こさないことが，安全面，効率面からきわめて重要である．唾液の咽頭部貯留は咳反射の誘因のひとつである．静脈内鎮静法下の歯科治療において，体動は唾液分泌量を増加させると考えられる．そこで本研究では，体動の有無によって唾液分泌量に差があるかを調べることを目的とした．

ミダゾラムとプロポフォールを用いた深鎮静下に歯科治療を行う，知的障害を有する患者 27 名を対象とした．それぞれの被験者に対し，歯科治療中に 1 分間の唾液の重量を 3 回ずつ測定した．観察項目は，体動，BIS (Bispectral Index)，プロポフォール予測効果部位濃度とし，測定中に体動を認めたものと体動を認めなかったもので比較した．その結果，唾液分泌量は，体動を認めなかったものが体動を認めたものと比較して有意に減少していた. また体動を認めたものでは，唾液の分泌量と BIS の間に有意な相関がみられた．これらの結果より，深鎮静によって唾液の分泌量が減少し，不動化はさらに唾液分泌量を減少させる可能性があると考えらえる．我々は，不動化は唾液分泌量を減少させ, 上気道管理において咳反射を防ぐために有益であると結論付けた．

＜緒言＞

知的障害を有する患者の静脈内鎮静法下の歯科治療においては，意識消失を伴う深鎮静が必要となることが多い．しかし，深鎮静下歯科治療では，上気道閉塞，気道防御反射（嚥下反射，咳反射）の対応に苦慮することが多い．

上気道の開通性は意識消失とともに著しく低下し，歯科治療のための強制的な開口も上気道を閉塞させる．その開通性を維持するために頭部後屈や頸部伸展位，下顎前方位がとられる．しかし，この体位は嚥下運動を著しく阻害する体位でもある．この体位で水や唾液が咽頭部に貯留すると，嚥下運動時に喉頭侵入がおき，咳反射が誘発される．この咳反射は，誤嚥を防ぐための重要な気道防御反射であるが, 治療の妨げになるうえ, 時に喉頭痙攣や SpO2 の低下をひきおこす．咳反射を誘発しないことは，安全上，また治療の効率上きわめて重要である．以上より，深鎮静下歯科治療においては，治療に伴う水の吸引だけでなく，唾液の分泌量のコントロールが咳反射の頻度を大きく左右すると考えられる．

体動は唾液分泌量を増加させると推測されるが，これまで深鎮静下歯科治療中の唾液分泌量を調べた報告はなく，また，治療中の体動と唾液分泌量の関係を調べた研究もない．本研究では，深鎮静下歯科治療中に体動の有無によって唾液分泌量に差があるかを調べることを目的として，注水を伴う歯科治療中の唾液分泌量を測定するために吸引方法を工夫し，深鎮静下歯科治療中に唾液重量の測定と体動の有無を観察した．

＜方法＞

本研究は，東京医科歯科大学（第 849 号，平成 24 年 9 月 24 日承認）と埼玉県総合リハビリテーションセンター（受付番号 H24-10，平成 24 年 8 月 6 日承認）の両倫理委員会の承認を得て行った．また，患者の両親，あるいは介護者などの保護者から書面による同意を得た．除外基準は年齢 16 歳未満または 50 歳以上，嚥下障害，呼吸器疾患，喘息，BMI30 以上，睡眠時無呼吸症候群，てんかん以外の合併症とし，その結果，知的障害を有する患者 22 名と，知的障害を伴う自閉症の患者 5 名の計 27 名が本研究に参加した．

鎮静法の導入は，ミダゾラム 0.06 mg/kg を静脈内投与したのち，プロポフォールを眼瞼下垂がみられるまでボーラスで投与した．その後，プロポフォールの持続投与(4.0 mg/kg/h)を開始し，叩いたりゆすったりしても開眼や体動などの反応がない時点を意識消失とした．意識消失を確認してから 5 分の間に，開口器の挿入や汎用吸引装置 Coolex® の設置をし，体動がみられた場合はプロポフォールの持続投与量を調節した．呼吸は自発呼吸とし，必要があれば頭部後屈や下顎前方移動によって気道を確保した．

唾液分泌量は，歯科治療開始直後の右側上顎歯列の歯石除去中に連続して 3 回測定した．歯石除去は超音波スケーラーを用いて行い，吸引は歯科用バキュームに加えて，右側上顎歯列に Coolex® を設置した．各回とも 2 枚のガーゼを口腔内に 1 分間留置し，その重量を唾液分泌量とした．1 枚のガーゼは舌下腺と顎下腺唾液を回収するために舌下部に留置し，他の 1 枚は左側耳下腺唾液を回収するために左側上顎臼歯部口腔前庭に留置した．ガーゼを 1 分間留置した後，直ちに口腔内から取り出し，電子天秤にて 2 枚のガーゼの重量を測定した．

唾液分泌量測定中の観察項目は，体動，BIS，プロポフォール予測効果部位濃度とした．体動は，首を振る，手足が動く，または舌が動くことと定義した．唾液分泌量を測定している 1 分間，麻酔医が体動の有無を観察した．首ふり，手足の動き，舌の動きのいずれかがみられた場合を体動あり，いずれの動きも認められなかった場合を体動なしと判定した．

体動を認めた場合と体動を認めなかった場合の間で唾液分泌量に差があるかの検定には Wilcoxon-Mann-Whitney 順位和検定を行い，BIS と唾液分泌量の間に相関があるかの検定にはスピアマン順位相関係数を求めた．統計ソフトは R を用い，$P<0.05$ を有意差ありとした．

＜結果＞

27 名の患者すべてに 3 回ずつ唾液分泌量の測定を行った．各測定項目の中央値(IQR [range])は，唾液分泌量 0.06 (0.03-0.13 [0.01–1.34]) g，BIS 59.2 (47.0-68.0 [24.2–83.2])，プロポフォール予測効果部位濃度 1.45 (1.11-1.76 [0.48–4.79]) μg/ml であった．体動の認められたのは 39 回，体動の認められなかったのは 42 回であった．

唾液分泌量を体動の有無によって比較したところ，体動を認めなかった場合は体動を認めた場合と比較して唾液分泌量が有意に少なかった{0.03（0.02-0.06［0.01–0.92]）g vs 0.11（0.05-0.25［0.01–1.34]）g, $p < 0.0001$}．また，BIS は体動を認めなかった場合の方が有意に低かった{53.0 (36.9-62.4 [24.2–82.1]) vs 64.2 (57.5-73.6 [41.5-83.2]), $p < 0.0001$}．一方，プロポフォール予測効果部位濃度は体動の有無で有意な差はなかった{1.67（1.16-1.78［0.48–4.79]）μg/ml vs 1.34 (1.03-1.57 [0.75–2.09]) μg/ml, $p = 0.12$}.

BIS と唾液分泌量の関係では，体動を認めなかったものでは有意な相関がなかったが($r = 0.11$)，体動を認めたものでは有意な中等度の相関があった（$r = 0.44$, $p = 0.004$).

<考察>

本研究で測定された 1 分間の唾液分泌量は，中央値で 0.06 (0.03-0.13 [0.01–1.34]) g であった．唾液の比重は 1.000–1.008 であり，重量（g）は，ほぼ流量（ml）と考えてよい．したがって，深鎮静では唾液分泌量は，通常の安静時唾液の 0.3–0.4 ml/min と比較して減少していた．唾液の分泌量は高位中枢，反射中枢，末梢の刺激入力の影響を受けるといわれているが，意識消失下では高位中枢は抑制されている．よって本研究における唾液分泌量の減少は，深鎮静によって安静時唾液を制御する高位中枢が抑制されたことに加え，唾液の反射中枢である脳幹反射が抑制されたためと考えられる．

体動を認めなかった場合は認めた場合と比較して唾液分泌量は有意に少なく，BIS 値も低かった．また，体動を認めた場合は，BIS と唾液分泌量に有意な正の相関が認められた．不動化によって唾液分泌量は減少し，BIS を麻酔深度の指標と考えるならば，唾液分泌量は麻酔深度と相関して減少する可能性が示唆される．われわれは体動として手足の動き，首ふり，舌の動きを評価したが，唾液は舌や顎の動きなどの機械的刺激によって分泌されることから，舌の動きの抑制が唾液分泌量減少の主たる要因と推測した．

本研究では客観的な麻酔深度の指標として BIS とプロポフォール予測効果部位濃度を用いた．体動のあるなしの条件で比較した場合，BIS の平均値は体動を認めなかった場合で有意に低かったが，両条件とも偏差はおおきかった．また，プロポフォール予測効果部位濃度においても，両条件に差がなかった．したがって，治療中にリアルタイムで測定される BIS 値や，薬剤予測効果部位濃度からは，体動が生じるかどうかを推測することは困難であり，不意の体動を生じ，その結果，唾液分泌による咳反射の危険性が高まる可能性がある．つまり， BIS や薬剤予測効果部位濃度にかかわらず，体動の全くない状態のほうが，唾液の咽頭部貯留による咳反射が起きにくいといえる．よって，深鎮静の場合には体動が全くない状態が鎮静度として最適であると考えらえる．

本研究では実験上の制約がある．本研究では，歯石除去中の唾液分泌量を測定したが，注水を伴うことから唾液分泌量の測定部位と処置部位とを完全に分離する必要があり，吸引装置 Coolex® を使用した．そのため，処置側である右側の耳下腺からの唾液分泌量は測定できなかった．すなわち，本研究における唾液分泌量とは左側の耳下腺，舌下腺と顎下腺の唾液分泌量を測定したもので，全唾液分泌量を計測していない．しかし，すべての被験者において同じ部位で同じ時間で測定しており，歯科処置に伴う水の混入もないことから，本研究の目的である体動の有

無による唾液分泌量に差があるかを調べることはできたと考えられる．

<結論>

知的障害者を対象とし，深鎮静下歯科治療中の体動の有無によって唾液分泌量に差があるかを調査した．その結果，体動があると唾液分泌量が有意に多いことが分かった．以上より，不動化は唾液分泌量を減少させ，上気道管理において咳反射を防ぐために有益であると結論付けた．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5077　号	佐々木　陽子
論文審査担当者	主　査　泰羅　雅登 副　査　嶋田　昌彦　　篠塚　修	
論 文 題 目	Correlation between body movements and salivary secretion during sedation	

（論文審査の要旨）

知的障害を有する患者の静脈内鎮静法下の歯科治療においては，意識消失を伴う深鎮静が必要となることが多い．深鎮静下の歯科治療では，咳反射を起こさないことが，安全面，効率面からきわめて重要である．唾液の咽頭部貯留は咳反射の誘因のひとつである．深鎮静下の歯科治療において，体動は唾液分泌量を増加させると考えられる．しかし，これまでの報告で深鎮静下歯科治療中に唾液分泌量を調べたものや，静脈内鎮静法中の体動と唾液分泌量の関係を調べたものはない．今回佐々木は，静脈内鎮静法中の体動が唾液分泌量に与える影響を明らかにすることを目的とし，深鎮静下歯科治療中に唾液分泌量，BIS(Bispectral Index)ならびにプロポフォール予測効果部位濃度を測定し，測定中の体動の有無によって比較検討を行った．

対象は，ミダゾラムとプロポフォールを用いた深鎮静下に歯科治療を行う患者 27 名（知的障害者 22 名，知的障害を有する自閉症 5 名）とした．それぞれの被験者に対し，歯科治療中に 1 分間の唾液の重量を 3 回ずつ測定した．観察項目は，体動，BIS，プロポフォール予測効果部位濃度とした．体動は手足の動き，首ふり，舌の動きと定義し，麻酔医が評価した．測定中にいずれかの体動を認めたものを体動あり，いずれの体動も認めなかったものを体動なしとした．

本研究で得られた結果は以下のとおりである．

１．81 回の測定で，体動ありは 39 回，体動なしは 42 回であった．

２．唾液分泌量は，体動なし，体動ありともに通常の安静時唾液 0.3-0.4ml/min と比較して減少していた．

３．唾液分泌量は，体動なしが体動ありと比較して有意に減少していた．

４．BIS は体動なしが体動ありと比較して有意に低かった．

５．BIS は体動なし，体動ありともに大きなばらつきがあった．

６．プロポフォール予測効果部位濃度には差がなかった．

７．体動を認めたものでは，唾液の分泌量と BIS の間に有意な相関がみられた．

これらの結果より，不動化によって唾液分泌量が減少し，唾液分泌量は麻酔深度と相関して減少する可能性が示唆された．これについて，佐々木は以下のように考察している．深鎮静では，高位中枢が抑制されるため，高位中枢による安静時唾液の分泌が抑制される．これに加えて，水分を制御する副交感神経の唾液中枢がある脳幹も様々な程度に抑制されることで，脳幹

反射による唾液分泌量が減少したと考えられる．一方で，体動は舌や顎の動きによる唾液腺への直接的な機械的刺激により唾液分泌量を増加すると考えられる．本研究の結果から，深鎮静下歯科治療中の体動は唾液分泌量を増加させ，咳反射の危険性を高めるが，リアルタイムに測定される BIS や薬剤予測効果部位濃度では治療中の体動を予測することが困難であることが示唆された．これより，佐々木は BIS や薬剤予測効果部位濃度にかかわらず，体動の全くない状態が，鎮静度として最適であると考察した．

本研究において佐々木は，深鎮静下歯科治療中の唾液分泌量は体動の有無に影響を受けることを明らかにし，不動化は唾液分泌量を減少させ，上気道管理において咳反射を防ぐために有益であると結論付けた．本研究は，深鎮静下歯科治療中の安全性向上に寄与し，今後の歯科麻酔，障害者歯科の発展に貢献できると考えられる．この成果は広く歯科医学・医療の進歩発展に寄与するものと判断できる．よって本論文は，博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	上原　智己
論文審査担当者	主査　俣木　志朗 副査　中島　友紀　　坂本　啓
論　文　題　目	Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2–Induced Maxillary Bone Regeneration

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

歯科臨床では顎骨の不足を伴う症例が多々ある。小児歯科臨床におけるその一例である口蓋裂では、先天的な顎骨の欠損により機能的、審美的な障害が生じる。また、無歯症の患児では、歯牙の欠損に加え、歯槽骨の高さも低いため、補綴治療を行うことが困難である。これらのような顎骨の不足を伴う歯科疾患に対し、顎骨を形成する治療は有用である。

従来、高用量の bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は骨形成作用を持つと言われているが、高用量使用時の歯肉の腫脹や発がんリスクの増加などが BMP-2 使用による有害作用として報告されている。そこで、骨形成に必要な BMP-2 の量を減らす薬剤候補として、fibroblast growth factor (FGF)-2、FGF-4、transforming growth factor (TGF)-β1、ペプチド製剤などが報告されてきた。中でもペプチド製剤は、製作費用の安さ、抗原抗体反応の可能性の低さ、ターゲットに適合させるための構造改変の容易さなどの利点を持つ。近年我々は osteoprotegerin (OPG) の模倣体であり、receptor activator of nuclear factor-□B ligand (RANKL) に結合するペプチドである OP3-4 ペプチド(OP3-4) を開発した。OP3-4 は骨芽細胞分化の促進作用と骨吸収抑制作用を持つことがすでに報告されている。

従来の骨形成に関する研究は、切開や縫合等の外科処置を要するものが主流であった。つまり、簡便で侵襲性の低い、注射のみによる方法を確立することには大きな価値がある。単回注射により、顎骨に十分な骨形成を誘導することは、いまだ実現されていない。本研究では、注射処置が可能な粒子状 gelatin hydrogel (GH) を担体として使用し、OP3-4 のマウス上顎への単回注射が、歯槽骨上での BMP-2 による骨形成作用を増強するか否かを検討した。

＜材料と方法＞

等電点 9.0 の粒子状 GH 担体に薬剤を室温で 4 時間浸透させ、8 週齢雄性 C57BL/6J マウス 24 匹の上顎の切歯と臼歯の間の歯隙に骨膜下注射を行った。GH に浸透させた薬剤により、1) 溶媒のみ、2) BMP-2、3) BMP-2 と OP3-4、4) BMP-2 とコントロールペプチド、の 4 群に分けた (n=6)。注射針は 24G で先端の角度が 15°のハミルトンシリンジを使用した。骨形成の経時的変化を観察するため、術後 12 日目にカルセイン、26 日目にデメクロサイクリンを皮下注射した。術後 28 日目にマウスを安楽死させ、摘出した頭蓋をホルマリン(pH 7.4)にて 2 日間 4℃で固定し、生理

食塩水で洗浄した後、X 線画像分析と組織形態計測を行った。

X 線画像分析では、microfocal computed tomography (μCT) により 3 次元画像を構築し、peripheral quantitative computed tomography (pQCT) により骨塩量と骨密度を測定した。組織形態計測では、非脱灰凍結切片（3 μm）を作成し、石灰化組織の分析のため von Kossa 染色と蛍光染色を行った。

さらに、骨形成の初期過程における、細胞増殖と messenger RNA (mRNA) の分析を行った。細胞増殖の分析実験では、上記同様の 4 群にマウスを分け、同様の手技にて上顎への骨膜下注射を行った。術後 7 日目、安楽死の 2 時間前に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を腹腔内に注射した。安楽死後は、上記同様の手技にて、非脱灰凍結切片を作成し、BrdU 免疫染色と alkaline phosphatase (ALP) 染色を行った。mRNA の分析実験は BMP-2、BMP-2 と OP3-4、 BMP-2 とコントロールペプチド、の 3 群とし、上顎の両側の歯隙に骨膜下注射を行った。術後 5 日目と 10 日目に、注射部位の組織を摘出し quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) を行った。qRT-PCR では、Runx2, Sox9, Col1a1, Col2a1, Col10a1 の遺伝子発現を調べた。

統計解析は、1-way analysis of variance (ANOVA) による分散分析の後、Fisher's protected least significant difference (PLSD) post hoc テスト により 4 群間の有意差を検定した。($p < 0.05$ を有意差有りとした)

なお、本実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。（承認番号 0140070C, 0150203C2, 0160182A）

＜結果＞

μCT を用いた X 線学的分析の結果、1) 溶媒のみ投与した群では、注射部位に X 線不透過像は認められなかった。2) BMP-2 群では、小規模な X 線不透過性の領域が認められ、4 群中で最も大規模な X 線不透過像が認められたのは、3) BMP-2 と OP3-4 の併用群であり、その不透過像の増大は、4) BMP-2 とコントロールペプチドの併用群よりも明らかであった。さらにその新生骨を pQCT により評価した所、3) BMP-2 と OP3-4 の併用群における新生骨は、骨密度 464 mg/cm3 以上の領域で囲まれ、内部は骨密度 395 mg/cm3 以下の海綿骨で満たされていた。対照的に、2) BMP-2 群や 4) BMP-2 とコントロールペプチドの併用群では、注射部位周囲に海綿骨が認められたのみであった。3) BMP-2 と OP3-4 の併用群における新生骨の骨塩量、骨密度は共に他の実験群と比較して有意に大きく、形成された骨は、より充実性の骨であることが示唆された。

組織学的分析では、von Kossa 染色により、3) BMP-2 と OP3-4 の併用群では、新生骨全体に石灰化が生じたことが分かった。同群の蛍光顕微鏡による所見により、術後 12 日目に投与したカルセインが新生骨の外側にラベルされ、術後 26 日目に投与したデメクロサイクリンが内側にラベルされたことが明らかとなった。つまり、石灰化は外側が先に、内側が後に生じたことが示唆された。一方、2) BMP-2 群、4) BMP-2 とコントロールペプチドの併用群では、透過光、蛍光いずれの組織所見においても、石灰化は新生骨の外側領域に認められたのみであった。画像解析装置を用いた定量解析により、デメクロサイクリンによりラベルされた面積は、3) BMP-2 と OP3-4 の併用群が、他の実験群と比較して有意に大きいことが明らかとなった。

術後 7 日目の細胞増殖に関しては、3) BMP-2 と OP3-4 の併用群における BrdU (+)の増殖細

胞数は、他の実験群と比較し有意に高かった。qRT-PCR の結果、同群の術後 5 日目の Runx2, Sox9, Col1a1 の発現は弱かったが、術後 10 日目では、BMP-2 のみの群と比べ増加していた。成熟した軟骨細胞のマーカーである Col2a1, Col10a1 は、術後 5 日目、10 日目共に検出されなかった。

＜考察＞

本研究で用いた GH 担体はペプチド製剤の徐放を可能とすることがすでに報告されている。本実験における石灰化も実験期間の終盤まで継続し、骨新生を誘導するのに十分な期間 OP3-4 を徐放できたと考えられる。GH 担体は、水素結合や疎水結合、クーロン力などの分子間相互作用により物質を保持し、イオン強度の上昇や GH の生分解により、保持した物質の徐放が可能になる。

本実験では、OP3-4 は BMP-2 による骨形成作用を増強し、その石灰化は外側が先に、内側が後に生じた。さらに、骨形成の初期過程において、OP3-4 は BMP-2 が誘導した細胞増殖を促進した。つまり、石灰化の開始時に、すでに新生骨の大きさは決められており、それは骨形成の初期に OP3-4 が骨形成性の細胞増殖を促進することに起因すると考えられる。

また、筋細胞の前駆体である間葉系幹細胞は、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) シグナルを通して細胞の増殖を促進することが示されている。筋細胞と骨芽細胞の源は同じ間葉系幹細胞であるため、本実験で認められた骨形成性の細胞も mTORC1 シグナルを通して増殖を促進する可能性がある。本実験において OP3-4 は骨形成マーカーである Runx2, Col1a1 の発現を増強した。そして、mTORC1 シグナルは Runx2 の活性化を促進することはすでに報告があり、OP3-4 が mTORC1 のエフェクターである S6K1 のリン酸化を刺激することは東京大との共同研究で明らかになってきている。これらの結果を総合すると、OP3-4 は骨芽細胞の初期の分化マーカーを増強し、mTORC1 シグナルに関与し、骨芽細胞を活性化するというメカニズムで骨形成を促進すると考えられる。

さらに、OP3-4 の併用群では、軟骨形成のマスター遺伝子である Sox9 の発現を上昇させたが、Col2a1, Col10a1 の発現は検出されず、組織学的所見においても成熟した軟骨細胞は認められなかった。つまり、本実験における骨形成の過程において、軟骨を誘導する可能性はあるものの、成熟には至らなかったということも示唆された。

＜結論＞

本研究は、OP3-4 が BMP-2 による骨形成作用を増強することを示した初めての報告である。OP3-4 と BMP-2 の併用療法は歯槽骨を増やす有望な方法であり、BMP-2 の高用量の使用による有害作用も軽減できる可能性がある。さらに、簡便で侵襲性が低い注射という方法である点も考慮すると、OP3-4 と BMP-2 の単回注射は歯科領域において革新的な方法となる可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5078　号	上原　智己
論文審査担当者	主　査　俣木　志朗 副　査　中島　友紀　　坂本　啓	
論 文 題 目	Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2–Induced Maxillary Bone Regeneration	

（論文審査の要旨）

歯科臨床では顎骨の不足を伴う症例が多々ある。上原智己は、顎骨の不足を伴う疾患に対し、臨床応用可能な、新規骨造成法の検討を行った。BMP-2 の骨形成作用は広く知られているが、BMP-2 の高用量使用による炎症発現や、発がん性等の有害作用もまた多く報告されている。そこで上原は、骨形成に必要な BMP-2 の量を減らす薬剤候補として、RANKL に結合するペプチドである OP3-4 に着目した。また、上原は、骨造成の手法に対しても、従来の方法が、切開や縫合等の侵襲性の大きい外科処置を要するものが主流であることにも着眼した。そこで、簡便であり、かつ低侵襲性である、注射による骨造成法を確立するため、注射処置が可能な粒子状ゼラチンハイドロゲルを担体として使用し、すでに骨芽細胞分化促進作用が明らかとなっている OP3-4 のマウス上顎への単回注射が、BMP-2 による骨形成作用を増強する可能性を想定し、その概念実証実験を行った。

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. BMP-2 と OP3-4 とを併用した注射投与により、マウスの上顎骨に骨を新生することができた。
2. BMP-2 と OP3-4 の併用群は、BMP-2 単独投与群や BMP-2 とコントロールペプチドとの併用群、担体のみの投与群のどの群と比べても、骨形成量は高値を示し、骨塩量・骨密度も有意に高い値を示した。
3. BMP-2 と OP3-4 の併用による新生骨の石灰化は外周だけでなく、新生骨の内部にまで及び、その石灰化は、外側が先に、内側が後に生じた。
4. OP3-4 は骨形成の初期過程に関与し、術後 7 日目において増殖活性のある細胞を増加させ、術後 10 日目において骨形成関連遺伝子である Runx2 と Col1a1 の発現を上昇させた。

以上の結果から、OP3-4 が BMP-2 により誘導される骨形成作用を促進すること、さらに、OP3-4 と BMP-2 の単回注射投与により、マウスの上顎骨に骨を新生できることを発見した。

本論文は、OP3-4 による BMP-2 の骨形成作用の増強を示したことにより、従来の骨形成において不可避とされていた、BMP-2 の高用量使用による有害作用の軽減を示唆する重要な結果を与えている。骨形成に必要な BMP-2 の量を減らす薬剤候補としては、これまでに FGF-2、

FGF-4、TGF-β などが報告されてきたが、ペプチド製剤は、製作費用の安さ、抗原抗体反応の可能性の低さ、ターゲットに適合させるための構造改変の容易さなどタンパク製剤に比べて多くの利点を持つ。さらに、OP3-4 は骨吸収抑制作用を持つことがすでに報告されており、今後の臨床応用に向けた橋渡し研究により、骨形成促進作用と骨吸収抑制作用を同時に兼ね備えた、理想的な薬剤として開発される可能性がある。

今回、造成した新生骨が長期的に維持されるか否かは、造成した部位に機械的力を加えるなど工夫をしない限り骨吸収を引き起こし、元に戻ることが考えられるが、今後臨床応用に向けて新規骨造成法の安全性も含めた骨量維持、造成された骨を維持する工夫も合わせた検討も望まれる。通常 BMP-2 を用いた骨形成では担体の形状以上に大きな骨を造成することは困難であったが、OP3-4 との併用により骨膜面より垂直的に造成した新生骨が認められたことは特記すべき実験結果である。

本研究では、切開や縫合等の侵襲性の高い外科処置を行わずに、単回注射によりマウスの顎骨に新生骨の造成が可能であることを示した。簡便かつ侵襲性の低い方法により、骨の欲しい場所に顎骨を造成することを示した実験結果は、歯科臨床上、骨が足りない箇所を補填する技術に発展する可能性を秘めている。具体的には、口蓋裂等、先天的に骨が不足し、機能・審美的に障害を持つ小児患者の症例、歯周病により低下した顎骨にインプラントを埋植する症例、歯牙が欠損し、補綴治療も困難となった成人患者の症例、あるいは矯正の固定源として用いるミニインプラントの埋植症例など、多くの臨床症例に応用可能と考えられる。以上のように、上原が行った一連の研究は、小児歯科学領域のみならず、歯科臨床全般における新規治療法の開発へと発展する可能性も示している。

以上のことから、本研究は新規骨形成促進法における重要な新発見をもたらしたため、歯科医学に寄与する所が極めて大きいと考えられる。よって、本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大庭　祥子
論文審査担当者	主査　深山　治久 副査　下山　和弘、古屋　純一
論　文　題　目	Screening tests for predicting the prognosis of oral intake in elderly patients with acute pneumonia

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

高齢者の肺炎の多くは誤嚥性肺炎である。よって入院後一時的に絶食の措置がとられるが、その時点で経口摂取再開の可否を予測することは難しい。しかし、退院時の栄養投与方法を考慮せずに漫然と治療を続けることは、入院期間の長期化を招き、医療費の増大にもつながる。近年脳血管障害患者の経口摂取の予後予測に関する報告は散見されるが、高齢肺炎患者についての報告はほとんどみられない。本研究では、簡便なスクリーニングテストを用い、高齢急性期肺炎患者の経口摂取の予後予測について検証した。対象は、2011 年 9 月から 2013 年 8 月までの間に、JCHO 東京新宿メディカルセンターに入院中の急性期肺炎患者で、誤嚥リスクのため絶食となり、摂食機能訓練を行った 77 名とした。スクリーニングテストは、意識レベルの評価としてグラスゴー コーマ スケール（GCS）、嚥下機能評価として反復唾液嚥下テスト（RSST）、 改訂水飲みテスト(MWST)、簡易嚥下誘発試験(SSPT)、咳テストを採用した。介入から 4 週間後、それ以前に退院となった者は退院時の経口摂取の状態を目的変数、各スクリーニングテストの結果を説明変数とし、受信者動作特性曲線(ROC)を描出した。次に ROC 曲線下面積(AUC)を比較し、各カットオフ値での感度、特異度を求めた。結果は, GCS≥ 14 が最も AUC が大きく、感度 0.71 特異度 0.80 であり、その次に RSST≥1 が、AUC（0.771)、感度 0.81 特異度 0.67 であった。これらにより GCS と RSST が高齢急性期肺炎患者の経口摂取可否に関する予後予測に有用なスクリーニングテストであることが示唆された。

＜緒言＞

近年、日本では高齢化の進行とともに肺炎が死因の上位を占めるようになり、急性期病院においても、誤嚥性肺炎を含む医療ケア関連肺炎を原疾患とする症例が増加している。当該患者の場合、入院後一時的に絶飲食となり、急性期を脱した後経口摂取の再開を試みるが、その時点で適切な評価ができれば、安全に治療を進めることが可能となる。しかし現状では、関連職種の経験

による試行錯誤に依存することが多く、経口摂取再開後に再度誤嚥性肺炎を惹起することも少なくない。

摂食・嚥下障害の精査としては、嚥下ビデオレントゲン造影（videofluoroscopic swallowing study：VFSS)および嚥下内視鏡検査（fiberoptic endoscopic evaluations of swallowing：FEES)が優れているが、設備や人員、費用などの点で、全ての患者にそれらを実施することは困難である。

そこで、肺炎急性期の高齢患者に対し、誰でもできる簡単なスクリーニングとして、意識レベルの評価と嚥下障害のスクリーニングテストで､経口摂取の予後予測が可能かどうかを検証した。

＜対象と方法＞

対象は、2011 年 9 月から 2013 年 8 月までの間に、JCHO 東京新宿メディカルセンターに入院中の患者で、肺炎で絶食中の 68 歳～105 歳の 77 名（男性 34 名、女性 43 名、平均年齢 86.0±7.7 歳）とした。

方法は、入院科主治医より嚥下機能評価と摂食機能訓練の依頼があった患者について、初回に歯科医師が意識レベルの評価と嚥下機能評価を行った。意識レベルの評価は GCS、嚥下機能評価は、ベッドサイドで簡単に行える RSST､MWST､SSPT、咳テストを採用した。

その後継続的に、歯科衛生士と看護師が口腔ケアと間接機能訓練を行い、必要に応じて言語聴覚士が間接・直接訓練を行った。介入 4 週間後の時点、それ以前に退院した者については退院時に、ペースト食(800kcal／日)以上を経口のみで摂取できていたものを経口摂取可能群とし、経管栄養など他の補助的栄養投与が必要であったものを経口摂取不可能群とした。

年齢、性別、入院から歯科介入までの期間、入院期間、各スクリーニングテストの結果を二群間で Mann-Whitney U検定とカイ二乗検定で比較し、次に経口摂取の可否を目的変数、各スクリーニングテストの結果を説明変数とし、ROC 曲線による解析で各スクリーニングテストの AUC を比較した。

ROC 曲線上の左上隅に最も近接する点をそれぞれのカットオフ値として検出し､各カットオフ値での、感度、特異度、有効度、陽正反応的中度、陰性反応的中度を求め、より有効度の高いスクリーニングテストについて検討した。

本研究は、JCHO 東京新宿メディカルセンター倫理委員会と東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会(第 711 号、第 933 号)の承認を受け実施した。

＜結果＞

経口摂取の可否を目的変数とし、GCS、RSST、MWST、SSPT、咳テストを説明変数とした ROC 曲線での各スクリーニング検査の AUC を比較した結果、もっとも AUC が大きかったもの

はGCS（0.790）でその次はRSST（0.771）であった。MWSTのAUCは、0.660であり、GCS、RSSTに比較してやや感度が低かった。SSPTと咳テストに関しては、AUCが0.5以下であった。

各スクリーニングテストの経口摂取可否に対するカットオフ値は、GCS14点以上、RSST 1回以上、MWST 4点以上、SSPT　2.3秒以下、咳テストはクエン酸濃度1.4mg/ml以下であった。経口摂取可否に対して、最も感度が高かったものはRSSTで0.81であったが、特異度は0.67であった。GCSは感度0.71、特異度0.80と最も有効度が高いと考えられた。SSPTと咳テストについては、感度、特異度ともに低かった。

＜考察＞

摂食機能は先行期、準備期、口腔期、咽頭期、食道期からなる一連の統合運動である。

本研究で、経口摂取可否の予後予測に有用なスクリーニングテストと考えられたのは、GCSとRSSTであり、ROC曲線によるAUCの比較、感度・特異度で、GCSが最も有用であった。

意識障害と嚥下障害との関係は多くの報告で認められているが、本研究での経口摂取可否におけるGCSのカットオフ値１４点は、過去の脳血管障害患者での報告に比較して若干高い。対象者の年齢が高く、また、これまで肺炎をおこしていることから、経口摂取再開にはより高い覚醒レベルが必要だったのではないかと思われた。

RSSTは認知期、口腔期、咽頭期の統合機能のスクリーニングと考えられ、カットオフ値１回/30秒が最良であり、１回でも施行できた者は、83.8%の割合で経口摂取可能となっていた。誤嚥のスクリーニングテストとしてのRSSTのカットオフ値は、VF所見と比較した結果、3回以上/30秒が妥当とされており、本研究のカットオフ値は誤嚥のカットオフ値と比較すると低い値であった。肺炎急性期では、数日間の絶飲食に加え、酸素吸入、口呼吸などで極度の口腔乾燥となっている者が多くみられ、この状態での空嚥下は難易度が高い。そこで１回でも随意嚥下が可能であったということは、嚥下機能と意識レベルがある程度保たれていることを意味し、全身状態の改善に伴い嚥下機能の回復が期待できるのではないかと考えられた。

MWSTは、口腔期、咽頭期の機能を反映し、誤嚥のスクリーニングに有用と考えられているが、GCS、RSSTと比較して経口摂取可否に関するスクリーニングテストとしての検出感度が低かった。MWSTでは検査材料として水を使用するが、水はゼリーや粥と比較して、粘度が低く、流入速度が速い。口腔期、咽頭期の反射が低下している場合、嚥下の速度が間に合わず、食材としての難易度が高いため検出感度が低かったと考えられた。

SSPT と咳テストは、意識レベルが低く、指示に従えなくても施行できるというメリットがあるが、カイ二乗検定、ROC曲線、感度・特異度いずれにおいても、経口摂取可否の予後予測のスクリーニングには有用ではなかった。

SSPT は、水飲みテスト同様、誤嚥に対して有用性の高いスクリーニングテストであるが、嚥

下反応を直接誘発し咽頭期のみを観察する検査であり、準備期、口腔期、また意識レベルという意味での先行期の異常が検出できないためと考えられた。

咳テストも不顕性誤嚥（SA）のスクリーニングに有用であるが、SA があるからといって一切経口摂取が不可能ということではなく、SA を回避するトロミ付けや食物形態を工夫することで、経口摂取が可能となるため、経口摂取可否と有意な相関がなかったと考えられた。

本研究の結果は、あくまで肺炎急性期の高齢患者における結果で、脳血管障害患者や長期療養施設入所中の患者には該当しない。また、経口摂取の基準はペースト食で、この基準で常食を摂取可能、もしくは誤嚥しないということではない。必要に応じ VFSS や FEES を併用し、多角的に観察を行うことが重要である。

＜結論＞

肺炎急性期患者において、ベッドサイドで行える簡便な方法で、経口摂取再開の予後予測が可能かどうかを検証した。経口摂取可否に関して、意識レベルの評価と各種の嚥下障害のスクリーニングテストを検証した結果、GCS と RSST が有用であった。GCS14 点以上、RSST1 回以上では、経口摂取可能となる確率が 80%以上あり、積極的な摂食機能訓練をおこなえることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5079　号	大庭　祥子
論文審査担当者	主　査　深山　治久 副　査　下山　和弘、古屋　純一	
論 文 題 目	Screening tests for predicting the prognosis of oral intake in elderly patients with acute pneumonia	

（論文審査の要旨）

近年、日本では高齢化の進行とともに肺炎が死因の上位を占めるようになり、急性期病院においても、誤嚥性肺炎を含む医療ケア関連肺炎を原疾患とする症例が増加している。当該患者の場合、入院後一時的に絶飲食の措置がとられるが、その時点で、急性期を脱した後の経口摂取の再開を予測することは難しい。脳血管疾患患者の経口摂取の予後予測に関する報告は散見されるが、高齢肺炎患者についての報告はほとんどみられない。摂食嚥下障害の精査としては、ビデオ嚥下造影検査（Videofluoroscopic Swallowing Study : VFSS)が Gold standard だが、設備や人員、費用などの点で、全ての患者に実施することは困難である。そこで大庭は、肺炎急性期の高齢患者に対し、簡単なスクリーニングテストとして、意識レベルの評価と嚥下障害のスクリーニングテストで、経口摂取再開の予後予測の可能性を検証した。

方法は、肺炎で絶食中の 77 名（男性 34 名、女性 43 名、平均年齢 86.0±7.7 歳）の患者について、初回に、意識レベルの評価としてグラスゴー コーマ スケール（Glasgow Coma Scale : GCS)、嚥下機能評価として反復唾液嚥下テスト（Repetitive Saliva Swallowing Test : RSST）、改訂水飲みテスト（Modified Water Swallow Test ： MWST）、簡易嚥下誘発試験（Simple Swallowing Provocation Test : SSPT)、咳テストを行った後、継続的に歯科衛生士、看護師、必要に応じて言語聴覚士が間接・直接訓練を行い、4 週間後の時点またはそれ以前に退院した者については退院時に、ペースト食(800kcal／日)以上を経口のみで摂取できていたものを経口摂取可能群、他の補助的栄養投与が必要であったものを経口摂取不可能群とした。年齢、性別、入院から歯科介入までの期間、入院期間、各スクリーニングテストの結果を 2 群間で Mann-WhitneyU検定とカイ二乗検定で比較し、次に経口摂取可否を目的変数、各スクリーニングテストの結果を説明変数とした受信者動作特性曲線(Receiver Operating Characteristic Curve: ROC 曲線)による解析で各スクリーニングテストの ROC 曲線下面積(Area Under the Curve: AUC)を比較し、それぞれのカットオフ値を検出した。各カットオフ値での、感度、特異度、有効度、陽正反応的中度、陰性反応的中度を求め、より有効度の高いスクリーニングテストについて検討した。ここで、経口摂取の予後予測についての先行研究はいくつかみられるが、ROC 曲線を用いたスクリーニングテストの検討はなく、またスクリー

ニングテストに意識レベルの GCS を採用したことは新しい手法である。

大庭は、本研究より以下の結果を得た。

・ROC 曲線での各スクリーニング検査の AUC を比較した結果、もっとも AUC が大きかったものは GCS でその次は RSST であった。他のスクリーニングテストは AUC が小さく有用ではなかった。

・各スクリーニングテストの経口摂取可否に対するカットオフ値は、GCS14 点以上、RSST 1 回以上、MWST 4 点以上、SSPT　2.3 秒以下、咳テストはクエン酸濃度 1.4mg/ml 以下であった。

・経口摂取可否に対して、最も有効度が高かったものは GCS であり、その次は RSST であった。他のスクリーニングテストは感度、特異度ともに低かった。

これらの結果について大庭は以下のように考察している。

経口摂取可否の予後予測に有用なスクリーニングテストと考えられたのは、GCS と RSST であった。意識障害と嚥下障害との関係は多くの報告で認められているが、経口摂取可否における GCS のカットオフ値 14 点は、脳血管疾患患者における先行研究に比較して若干高い。その理由について、大庭は、対象者の平均年齢が高く、これまで肺炎をおこしていることから、経口摂取再開の判断の際に主治医が覚醒レベルを高く設定したと考えられる。

RSST は認知期、口腔期、咽頭期の統合機能のスクリーニングで、カットオフ値 1 回/30 秒は、誤嚥のスクリーニングテストとしてのカットオフ値 3 回以上/30 秒と比較すると低い値であった。肺炎急性期では、数日間の絶飲食、酸素吸入、口呼吸など、極度の口腔乾燥状態での空嚥下は難易度が高い。1 回でも随意嚥下が可能であれば、嚥下機能と意識レベルがある程度保たれており、全身状態の改善に伴い嚥下機能の回復が期待できると考えられた。

MWST の検査材料としての水は、流入速度が速く、口腔期、咽頭期の反射が低下している場合、食材としての難易度が高いため検出感度が低いと考えられた。

SSPT は、咽頭期のみを観察する検査で、先行期、準備期、口腔期の異常が検出できず、また咳テストも不顕性誤嚥（Silent Aspiration：SA）のスクリーニングであるが、SA を回避するトロミ付けや食物形態を工夫することで、経口摂取が可能となるため、経口摂取可否に関する有意義な検査ではなかったと考えられた。

本研究において大庭は、高齢肺炎急性期患者において、ベッドサイドで行える簡便なスクリーニングテストで、経口摂取再開の予後予測の可能性を検証し、GCS14 点以上、RSST1 回以上では経口摂取可能となる確率が 80%以上あることを明らかにした。これまで摂食機能評価はリハビリテーション医や、専門職種が多角的な診察を行い総合的判断に基づいて行われていたが、このような専門職の数が現在にも増して不足することは自明である。種々の介護施設や長期療養型病院でも、看護師、介護福祉士など非専門職の関連職種が簡単に行える経口摂取可否のスクリーニングテストは必要であると考えられる。本研究は、今後の多疾患、他施設におい

ての同様の臨床研究の発展に寄与することが期待できる。よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたり十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	尾田　誠一郎
論文審査担当者	主査　鈴木　敏彦 副査　井関　祥子　　清水　重臣
論　文　題　目	Golgi-Resident GTPase Rab30 Promotes the Biogenesis of Pathogen-Containing Autophagosomes

（論文内容の要旨）

【要旨】

オートファジーは、Group A *Streptococcus*（GAS）などの病原微生物に対する宿主防御機構として働くもので、本機構には膜輸送タンパク質である Rab タンパク質が関与する。今回、GAS-containing autophagosome-like vacuoles (GcAVs)形成の制御因子として、Rab30 を同定したので報告する。Rab30 は、細胞内に侵入した GAS によるオートファジー誘導に応答して GcAVs へリクルートされた。また、Rab30 の GcAVs へのリクルートは、その GTPase 活性に依存していた。さらに、Rab30 の遺伝子発現をノックダウンすると、GcAVs 形成および GAS の分解が阻害された。Rab30 はゴルジ体の構造維持機能とは無関係に GcAVs 形成に関与した。Rab30 は、栄養飢餓時のオートファゴソーム形成に関わらなかった。これらの結果から、Rab30 は GAS 感染時に特異的に GcAVs 形成に関わることが示唆された。

【緒言】

オートファジーは細胞内自己分解システムであり、栄養飢餓時に著しく誘導され細胞の恒常維持に働く。まず、細胞質成分は隔離膜によって非選択的に取り囲まれ、二重膜構造物のオートファゴソームとなる。その後、リソソームと融合し、リソソーム酵素によって細胞質成分は分解される。さらに、オートファジーは GAS のような病原微生物を分解する役割もある。GAS はエンドサイトーシスによってヒト細胞内に侵入し、ストレプトリジン O（SLO）の作用でエンドソーム膜から脱出する。細胞質内に侵入した GAS は、ユビキチン-p62/NDP52 経路を介して LC3 陽性オートファゴソーム膜（隔離膜）によって取り囲まれ、GcAVs となる。GcAVs はリソソームと融合し、リソソーム酵素によって GAS は分解される。

オートファゴソームの形成には、細胞内膜輸送を制御する Rab タンパク質が関与するが、栄養飢餓時と GAS 感染時では、機能する Rab タンパク質が異なることが報告されている。哺乳類では約 70 種類の Rab タンパク質が存在するが、とくに細菌感染時に関わる Rab タンパク質の役割は未知の点が多い。そこで、今回 GAS 感染モデルのオートファジーを中心に Rab タンパク質の働きを調べたので報告する。

【方法】

細胞は HeLa 細胞を、GAS は JRS4 を使用した。ヒト Rab30 cDNA を用いて、mCherry 融合 Rab30（mCherry-Rab30）、EmGFP 融合 Rab30（EmGFP-Rab30）を作製した。Rab30 の活性変異体として、恒常的不活性型（Rab30 T23N）と恒常的活性型(Rab30 Q68L)を作製した。遺伝子サイレンシング実験には、Rab30 siRNA、Rab1 siRNA、Arf1 siRNA を用いた。感染実験は以下のとおりである。Mid-log phase まで増殖した GAS を DMEM(10%FBS 添加)培地で培養した HeLa 細胞に MOI 100 で感染させた。感染 1 時間後、培地を 100 μg/ml ゲンタマイシン含有 DMEM(10%FBS 添加)培地に交換し、細胞外の GAS を死滅させた。この状態で、細胞培養を続け、共焦点顕微鏡にて細胞を観察した。細胞を観察する際、抗 FLAG M2 抗体、抗ユビキチン化蛋白 (FK2)抗体、抗 Rab30 抗体、抗 Atg5 抗体、抗 LAMP1 抗体、抗 GM130 抗体を用いた。蛍光抗体として、Alexa Fluor 488、Alexa Flour 594、Alexa Flour 660 を用いた。Atg5 遺伝子ノックアウト HeLa 細胞の作製は、CRISPR/Cas9 システムを用いた genome editing 法にて行った。

【結果】

1. GAS 感染時の Rab30 の局在

これまでに GAS 誘導オートファジーにおける役割が解明されている Rab タンパク質（Rab7、Rab9A、Rab17、Rab23）以外の様々な EmGFP 融合 Rab タンパク質を作製し、オートファゴソームのマーカーである mCherry-LC3 と共に HeLa 細胞に強発現した後、GAS 感染時におけるそれぞれの細胞内局在を観察した。その結果、Rab30 が GcAVs に局在していることを発見した。さらに、Rab30 は隔離膜、オートリソソームにも局在していた。また、Rab30 の活性変異体を用いて Rab30 の GcAVs との共局在率を調べた結果、Rab30 は活性型で GcAVs に局在していることが判明した。

2. Rab30 の GcAVs へのリクルート

Rab30 はオートファゴソーム膜の供給源の 1 つとされるゴルジ体に局在しているため、ゴルジ体由来の膜成分と Rab30、GcAVs それぞれの局在を観察した。GAS 非感染時には、Rab30 は cis ゴルジ網のマーカーである GM130 と共局在していた。GAS 感染時では、Rab30 は LC3 と共局在していたが、GM130 とは共局在していなかった。これらの結果から Rab30 は、ゴルジ体由来の膜成分を介して GcAVs へ局在するのではなく、ゴルジ体から GcAVs へ再配分されることが考えられた。

Rab30 はエンドソーム内の GAS 周囲にはリクルートされず、SLO の作用によってエンドソームから脱出した GAS 周囲にリクルートされた。

Atg5KO HeLa 細胞では、Rab30 は GAS 周囲にリクルートされなかったことから、Rab30 は GcAVs の形成誘導が起きてから GcAVs へリクルートされることが示唆された。

3. GcAVs 形成における Rab30 の役割

siRab30 を用いて GcAVs 形成における Rab30 の役割を調べた。GcAVs 形成率と Bacterial viability assay の結果より、Rab30 は GcAVs 形成に関与することが示唆された。しかし、Rab30 は GAS の細胞内への侵入、ユビキチン化、p62、NDP52 による認識には関与しなかった。

4.　ゴルジ体の構造維持機能における Rab30 の役割

Rab30、Rab1、Arf1 をノックダウンするとゴルジ体の断片化が観察されたが、Rab30 をノックダウンしたときのみ GcAVs 形成率は低下した。さらに、GAS 感染前に薬剤にてゴルジ体を破壊した状態では、GcAVs の形成は阻害されなかった。これらの結果から、Rab30 はゴルジ体の構造維持機能とは無関係に GcAVs 形成に関与することが示唆された。

5.　飢餓誘導オートファゴソームの形成における Rab30 の関与

栄養飢餓時には、EmGFP-Rab30 は mCherry-LC3 と共局在していたが、Rab30 をノックダウンしても、オートファゴソーム形成に影響を与えなかった。以上の結果から、Rab30 は栄養飢餓時のオートファゴソーム形成には関与しないことが示唆された。

【考察】

Rab30 はゴルジ体の構造維持に機能するほか、エクソシスト複合体に関与するとされる。エクソシスト複合体は ULK1、Beclin1 と共に隔離膜形成を制御するため、Rab30 はポストゴルジ輸送を制御し GcAVs 形成に関わる可能性が考えられる。

栄養飢餓時には、様々な Rab タンパク質がエンドソーム、ゴルジ体、小胞体などからオートファゴソーム膜に再配分され、オートファゴソーム形成に関与することが報告されている。一方、GAS 感染時においてこれまでに報告されている GcAVs 形成に関わる Rab タンパク質は、いずれもエンドソーム局在である。今回報告した Rab30 はゴルジ体局在である。従って、エンドサイトーシス以外の新たな膜ダイナミクスの可能性やゴルジ体に局在する他の Rab タンパク質が GcAVs 形成に関与する可能性が考えられる。

今回、Rab30 は GTP 型で GcAVs へリクルートされることが解明された。Rab タンパク質は、GDP が結合している状態では不活性化しているが、GTP が結合すると活性化し細胞内膜輸送を担う。この GTP、GDP サイクルは GDP/GTP 交換因子（GEF）と GTPase 活性化タンパク質（GAP）が制御する。すなわち、Rab タンパク質は、GEF の作用によって GTP 型となり活性化、GAP の作用によって GDP 型となり不活性化する。GEF と GAP が解明されている Rab タンパク質は多く存在するが、Rab30 の GEF と GAP は未だ解明されていない。従って、Rab30 の GEF と GAP に関する研究によって、GcAVs 形成を制御する Rab30 のさらなる解明が進むと考えられる。

【結論】

GAS 誘導オートファジーにおける制御因子として Rab30 を同定した。Rab30 はゴルジ体の構造維持機能とは無関係に GcAVs 形成に関わると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5080　号	尾田　誠一郎
論文審査担当者	主　査　鈴木　敏彦 副　査　井関　祥子　　清水　重臣	
論 文 題 目	Golgi-Resident GTPase Rab30 Promotes the Biogenesis of Pathogen-Containing Autophagosomes	

（論文審査の要旨）

オートファジーは細胞内自己分解システムであり、栄養飢餓時などに誘導され細胞の恒常性維持に働くほか、Group A *Streptococcus*（GAS）などのような病原微生物を分解する役割もある。GAS はエンドサイトーシスによって、ヒト細胞内に取り込まれ、ストレプトリジン O（SLO）の作用でエンドソーム膜から脱出する。細胞質内に侵入した GAS は、ユビキチン-p62/NDP52 経路を介して隔離膜によって取り囲まれ、GAS-containing autophagosome-like vacuoles(GcAVs)となる。GcAVs はリソソームと融合し、リソソーム酵素によって GAS は分解される。

GAS 感染時と栄養飢餓時では、オートファゴソーム膜の大きさが異なっており、前者は最大で 10μm に達するが、後者は 0.3～0.9μm の大きさである。さらに、オートファゴソーム膜は GAS 感染時に細菌を選択的に取り囲むが、栄養飢餓時では非選択的に細胞質成分を取り囲む。このように、GAS 感染時と栄養飢餓時では、①オートファゴソーム膜の大きさ、②基質選択性が異なっているため、異なった膜動態を示すと考えられた。実際、細胞内膜輸送を制御する Rab タンパク質はオートファジーに関与するが、GAS 感染時（Rab7、Rab9A、Rab17、Rab23）と栄養飢餓時（Rab1A、Rab1B、Rab4、Rab5、Rab7、Rab8B、Rab11、Rab24、Rab33B）では、機能する Rab タンパク質が異なっていることが報告されている。哺乳類では約 70 種類の Rab タンパク質が存在するが、オートファジーとの関わり、特に細菌感染時における関わりは未知の点が多い。そこで本研究では、新規の Rab30 の機能について、GAS 感染モデルのオートファジーを中心に解析を行った。

実験方法は、過去の GAS 誘導オートファジーと Rab タンパク質との関係を調べた報告を参考にした。今回、新たに CRISPR/Cas9 システムを用いて Atg5KO HeLa 細胞を作製し、オートファゴソームと Rab タンパク質との関係を評価した。

本研究によって得られた結果は、以下の通りである。

1．GAS誘導オートファジーにおいて、Rab30は隔離膜、GcAVs、オートリソソームいずれにも局在していた。また、Rab30のGcAVsへのリクルートは、GTPase活性に依存していた。

2．通常、Rab30はゴルジ体に局在しているが、GAS感染時では、Rab30はエンドソームや細胞質内に侵入したGAS周囲にリクルートされるのではなく、GcAVs形成誘導に伴ってGcAVsへ再配分された。

３．Rab30はGASの細胞内への侵入、ユビキチン化、アダプタータンパク質による認識には関与せず、GcAVs形成に関与することによりGASの殺菌に働いた。

４．Rab30はゴルジ体の構造維持に関与するが、GAS感染時にはゴルジ体の構造維持機能とは無関係にGcAVs形成に作用した。

５．飢餓誘導オートファジーにおいて、Rab30はオートファゴソームに局在するが、オートファゴソーム形成には関与しなかった。

以上の結果や研究方法、実験結果に対する考察、検討などは論文中に明確に示されており、Rab30 は GAS 誘導オートファジーを制御する因子の一つであることを明確に示した。これらの結果は、オートファジーによる細菌に対する宿主防御機構やオートファジーの過程での膜輸送を解明する上で有用であると考えられる。

本研究から得られた知見は、細菌感染に対する宿主のオートファジーを利用した感染防御機構の解明、さらには、これを応用した細菌感染症の治療に寄与する可能性を示すものと考えられ、博士（歯学）の学位請求論文として十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	始平堂　由佳
論文審査担当者	主査　　荒川　真一 副査　　鈴木　敏彦　　新田　浩
論　文　題　目	*Porphyromonas gingivalis,* a Periodontal Pathogen, Enhances Myocardial Vulnerability, thereby Promoting Post-infarct Cardiac Rupture

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年歯周病と心血管疾患との関連が報告されているが、機序は明らかになっていない。本研究では、心筋梗塞（Myocardial Infarction: MI）における歯周病原細菌感染の影響を検討した。*Porphyromonas gingivalis*（*P.g.*）感染群、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（*A.a.*）感染群、対照群の各 MI マウス群において、病理組織学的解析やタンパク発現量の解析等による比較・検討を行った。その結果、*P.g.*感染 MI マウス群において心破裂による死亡率の有意な上昇が認められた。また、この群における酸化ストレスや Matrix metalloproteinase-9（MMP-9）発現・活性の増加、活性型 Bax（p18 Bax）の増加および心筋細胞のアポトーシスの亢進を認めた。さらに、*P.g.*感染 MI マウスの虚血心筋細胞には *P.g.*が侵入しており、この *P.g.*が分泌するプロテアーゼ gingipain が心筋細胞内で p18 Bax の増加に関与していることが判明した。また抗 gingipain 免疫グロブリン Y（IgY-GP）投与により *P.g.*感染 MI マウスでは gingipain 活性が阻害され、MI 後の心破裂が有意に抑制された。以上の結果より、*P.g.*は梗塞後心筋細胞に侵入し、心筋細胞のアポトーシス促進や創傷治癒過程を阻害することで心筋組織を脆弱化し、心破裂を惹起していることが示唆された。

＜緒言＞

歯周病は口腔細菌によって引き起こされる慢性炎症性疾患である。心筋梗塞（MI）は、全世界の死因の 30%を占める心血管疾患のなかで最も重篤な疾患のひとつである。これまでの研究で、心血管疾患と歯周病との関連が指摘されており、実際に急性心筋梗塞患者の冠動脈及び血栓のアテローム斑から *P.g.*の DNA が検出されたという報告がある。しかしながら歯周病が MI の病態に及ぼす影響に関しては詳細な解析がなされていない。本研究では、歯周病が MI の予後に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

＜方法＞

7 週齢のオス C57BL/6J マウスの背部皮下に、歯周病菌感染のためのスペースとして矯正用ステンレスワイヤーで作製したチャンバーを埋入した。感染群には歯周病原細菌 *P.g.* (strain A7A1-28) (10^8 Colony Forming Unit(CFU)/mL)、または *A.a.* (strain Y4) (10^8 CFU/mL)を、対照群にはリン酸緩

衝生理食塩水(PBS)を 0.1 mL ずつ注入した。チャンバー埋入から 3 週間後、人工呼吸器を用いた全身麻酔下で冠動脈を結紮して MI モデルを作製した。MI から 5 日後と 14 日後に心エコー検査を行った後、安楽死させて臓器を摘出した。また *P.g.*感染 MI マウス群に 33mg/g 体重の IgY-GP を投与して、gingipain の病態への関与を検討した。ELISA 法にて血清中の抗 *P.g.*抗体価、抗 *A.a* 抗体価を測定した。MI 発症 5 日後における心筋組織切片の透過電子顕微鏡による微細構造解析、病理組織学的解析および免疫組織学的解析を行った。TUNEL 染色法にて心筋細胞のアポトーシスを評価した。Western blot 法にて各種タンパク発現量を評価した。梗塞心筋から産生される過酸化水素量の測定を行った。RT-PCR 法を用いて各種 mRNA 発現量を定量評価した。MMP-9 のプロテアーゼ活性を Zymography にて検討した。

Bax リコンビナント蛋白（野生型ならびに Bax の 34 番目のアルギニン（Arg）をアラニン（Ala）に置換したアミノ酸置換変異体：Bax-R34A に対して *P.g.*より抽出した gingipain を作用させ、gingipain が Bax 活性に及ぼす影響を *in vitro* 実験系にて検証した。

なお、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行った（0150166A）。

＜結果＞

*P.g.*感染群および *A.a.*感染群にて各細菌の血清抗体価が有意に上昇していることを確認した。MI 発症 14 日後における *P.g.*感染 MI 群、*A.a.*感染 MI 群、対照群の生存率はそれぞれ 52.2%、86.4%、90.9%であり、他群と比較して *P.g.*感染 MI 群の生存率が有意に低かった。剖検の結果、胸腔内に血餅を認め、心尖部に亀裂も確認できたことから *P.g.*感染 MI 群マウスの主な死因は心破裂であることが考えられた。心体重量比/肺体重量比/血圧/心拍数/梗塞サイズ/急性期での心エコーによる左室内径短縮率は各群間で有意差が認められなかった。

次に、*P.g.*感染が心破裂を引き起こした原因を検討した。*P.g.*は細胞内に侵入する性質を持つため、心筋細胞にも侵入している可能性があると考えた。*P.g.*抗体を用いた蛍光免疫染色法にて検討した結果、*P.g.*感染 MI 群の梗塞心筋で *P.g.*が細胞内に侵入していることを示唆する所見を得た。透過電子顕微鏡を用いた観察の結果、*P.g.*感染 MI 群由来の心筋と *P.g.*を感染させた培養心筋細胞内に *P.g.*様の物質が認められた。免疫電顕法を用いて *P.g.*感染 MI 群の心筋細胞を観察したところ、*P.g.*様の物質が *P.g.*抗体で標識されることが確認された。

次に、心筋細胞死に対する *P.g.*感染の影響を検討した。*P.g.*感染 MI 群の梗塞周囲における TUNEL 陽性細胞数は、対照群や偽手術群と比較して有意に増加していた。また、*P.g.*感染 MI 群の心筋組織における活性型 caspase-3 発現量も対照群や偽手術群と比較して有意に増加していた。アポトーシス関連タンパクのうち Bcl-2/p38/JNK の発現量に対する *P.g.*感染の影響はみられなかったが、*P.g.*感染 MI 群においてアポトーシス促進タンパク Bax の活性型である p18 Bax が有意に増加していた。培養心筋細胞に *P.g.*を感染させ、また、培養心筋細胞に gingipain を反応させた結果、心筋細胞内の p18 Bax 量が上昇した。野生型 Bax に gingipain を反応させた結果、p18 Bax が生じたのに対し、アミノ酸置換変異体 Bax-R34A では p18 Bax が産生されなかった。

*P.g.*感染の酸化ストレスへの影響も検討した。*P.g.*感染 MI 群の心筋組織における過酸化水素濃度や酸化ストレスマーカー8-OHdG 陽性細胞数は対照群や偽手術群と比較して有意に増加していた。その一方、心筋における活性酸素種産生酵素 Nox-2/Nox-4 の mRNA 発現レベルは各群間で有

意差を認めなかった。透過型電子顕微鏡による梗塞心筋の観察では損傷ミトコンドリアの数は各群で差がなかったが、*P.g.*感染 MI 群では対照群と比較して有意にマイトファジーの数が減少していた。

組織修復プロセスを担う MMP-9 に対する *P.g.*感染の影響を検討したところ、MMP-9 タンパク量・プロテアーゼ活性のいずれも *A.a.*感染 MI 群および対照群と比較して *P.g.*感染 MI 群において有意に上昇していた。

＜考察＞

本研究では、歯周病原細菌を持続的に感染させたマウスに MI を発症させることで、歯周病原細菌感染の MI に対する影響を検討した。

*P.g.*と *A.a.*はいずれも歯周病を引き起こすグラム陰性嫌気性細菌であり、LPS といったグラム陰性細菌共通の病原因子を保有しているにも関わらず、約 50%の *P.g.*感染 MI マウスが心破裂を起こして死亡したのに対し、*A.a.*感染 MI マウスでは心破裂による死亡例はなかった。以上の結果から、*P.g.*のみが産生する gingipain が MI 後の心破裂の発症に寄与している可能性があることが予想された。

*P.g.*は歯肉上皮細胞ばかりでなく大動脈壁など他臓器の細胞内にも侵入する。本研究により、*P.g.*感染 MI マウスの梗塞心筋にも *P.g.*が侵入することが明らかになった。この知見は、*P.g.*が脆弱化した梗塞後心筋に侵入し、心筋組織の脆弱化に関与している可能性を強く示唆しているものである。

Bax は calpain によって 33 番目のアスパラギン酸が切断され、活性型の p18 Bax に変換される。本研究では新たに Arg またはリシン残基でタンパク質を切断する性質を持つ *P.g.*由来のシステインプロテアーゼ gingipain が Bax を 34 番目の Arg で切断して p18 Bax に変換し、心筋のアポトーシスを誘導していることを明らかにした。このことは、IgY-GP を投与した *P.g.*感染 MI マウスでは MI 後の心破裂の発症が抑制されることで確認できた。

*P.g.*の感染は梗塞後心筋における酸化ストレスを増加させることも示された。マイトファジー形成が抑制されていたことから、*P.g.*感染は損傷ミトコンドリアの除去機構を阻害している可能性がある。また酸化ストレスが MMP-9 の活性を強く促進することや MI 後の MMP 活性亢進は心破裂の引き金になるといったこれまでの報告と本研究で得られた結果を併せると、*P.g.*感染は梗塞心筋における酸化ストレスの増加を介して MMP-9 活性を亢進させ、MI 後の心破裂を助長しているものと考えられる。

＜結論＞

*P.g.*は梗塞心筋細胞に侵入して心筋組織の脆弱性を促進させることで MI 後の心破裂の発症を助長している可能性があることが明らかになった。従って、歯周病の予防や治療は、MI 患者における致死的合併症を防ぐ重要な治療戦略になり得ると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5081　号	始平堂　由佳
論文審査担当者	主　査　　荒川　真一 副　査　　鈴木　敏彦　　新田　浩	
論 文 題 目	*Porphyromonas gingivalis,* a Periodontal Pathogen, Enhances Myocardial Vulnerability, thereby Promoting Post-infarct Cardiac Rupture	

（論文審査の要旨）

現在、疫学研究から歯周病と循環器疾患との関係が指摘されている。実際に急性心筋梗塞患者の冠動脈および血栓のアテローム斑から歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の DNA が検出されたという報告があり、動脈硬化性疾患の中で最も深刻な致死性の病態である心筋梗塞の病態にも歯周病原細菌の感染が関与していることが示唆されている。しかし歯周病原細菌の感染が心筋梗塞の病態に及ぼす影響については分かっていない。そこで始平堂由佳は心筋梗塞における歯周病原細菌感染の影響を検討するため、本研究を行った。

本研究では、マウスに対し、冠動脈をナイロン糸で結紮する方法を用いて心筋梗塞モデルを作製した。また、マウスの背中に埋入したコイルをチャンバーとして用いて、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*（以下 *P.g.*）または *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（以下 *A.a.*）を感染させ、その影響を解析した。なお、本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行った（0150166A）。

本研究の成果は以下の通りである。

1. *P.g.*または *A.a.*の感染により、それぞれの菌に対する血清抗体価の上昇が認められた。
2. 心筋梗塞発症後 14 日間における生存率は対照群で 90.9%、*A.a.*感染群で 86.4%であったのに対し、*P.g.*感染群では 52.2%と有意に低下していた。
3. 剖検により *P.g.*感染群での死因は心破裂であることが明らかになった。
4. 心体重量比、肺体重量比、血圧、心拍数、梗塞サイズ、急性期における心機能は各群間で有意差を認めなかった。
5. *P.g.*抗体を用いた蛍光免疫染色、透過電子顕微鏡および免疫蛍光電子顕微鏡を用いた解析により *P.g.*の梗塞心筋への侵入を認めた。
6. TUNEL 染色陽性、細胞表面への Annexin V 表出、Caspase-3 活性化を指標とした解析により、*P.g.*感染梗塞心筋では心筋細胞アポトーシスの促進を認めた。
7. *P.g.*感染によりアポトーシス促進因子 Bax の活性型である p18 Bax 発現量の増加を認めた。
8. 培養心筋細胞に *P.g.*の病原因子 gingipain を添加したところ、p18 Bax が発現することを認めた。

9. Bax リコンビナントタンパクを作製し、gingipain を添加したところ、p18 Bax が産生されないことを認めた。
10. gingipain が Bax を 34 番目の arginine で切断し、p18 Bax を産生していることを認めた。
11. 抗 gingipain 抗体を含む immunoglobulin Y を混合した食餌を与え *P.g.*に感染させ、心筋梗塞を誘導したマウスでは心破裂による死亡を認めなかった。
12. *P.g.*感染により酸化ストレスの増加を認めた。
13. *P.g.*感染によりマイトファジーの減少が示された。
14. *P.g.*感染により MMP-9 の発現、活性の上昇が認められた。

これらの結果から、以下のことが考察された。

梗塞心筋細胞に *P.g.*が侵入し、gingipain が分泌されることによってアポトーシス促進因子 Bax が活性化され、心筋細胞のアポトーシスが促進する。また *P.g.*感染によりマイトファジー形成が抑制され、損傷ミトコンドリアの除去が阻害されることにより酸化ストレスが増加している可能性が示唆される。増加した酸化ストレスにより MMP-9 の発現・活性が上昇し、梗塞心筋における組織修復能が低下する。つまり *P.g.*感染によりこれらが同時に引き起こされ、心筋梗塞後の心破裂が誘導される可能性が示唆される。これらの考察は理論的であり、論文中に明確に記載されている。

本研究結果は、局所の歯周病原細菌感染が心筋梗塞の予後に影響を及ぼす可能性を示した点で高く評価できる。また *P.g.*が梗塞心筋細胞へ侵入し、アポトーシスの促進、酸化ストレスの増加、MMP-9 の増加を導くことで心筋梗塞後心破裂を誘導するというメカニズムが解明されたことは、歯周病と循環器疾患の連関を理解する上で極めて重要なものであり、歯周病学のみならず循環器病学の今後の発展に寄与するものと考えられる。

したがって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたり十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐藤　隆明
論文審査担当者	主査　　興地　隆史 副査　　宇尾　基弘　　中村　美穂
論　文　題　目	Morphological evaluation of the adhesive/enamel interfaces of two-step self-etching adhesives and multimode one-bottle self-etching adhesives

（論文内容の要旨）

＜諸言＞

従来の接着システムは、エッチング、プライミング、ボンディングの３ステップとして開発され、エナメル質、象牙質ともにリン酸エッチング処理を施すトータルエッチングシステムとして応用された。リン酸によるエッチングは、その強い酸性（pH=1 未満）によりエナメル質表面を脱灰し、エナメル質表面に蜂巣様構造を形成する。この凹凸に接着材が入り込み、硬化することで機械的嵌合力が生じる。しかしリン酸エッチングは、象牙質には不可逆的な大きい変化を与える。このため機能性モノマーを配合することによってエッチングとプライミングの処理を一体化した２ステップセルフエッチング接着システム（以下 2-SEA）が開発された。

セルフエッチングプライマーの pH は約 2 であり、その脱灰力はよりマイルドであるが、セルフエッチングプライマーによりエナメル質と象牙質とを同時処理することが可能となった。さらにセルフエッチングプライマーとボンドを一体化させた１ステップセルフエッチング接着システム（以下 1-SEA）も開発され、臨床手順のより一層の簡略化が行われている。しかし、1-SEA（pH=2.7-2.8）はウルトラマイルドエッチングと分類され、エナメル質に対する処理が不十分となることが懸念される。この問題を補うため、リン酸エッチング処理をエナメル質に限局して行うセレクティブエッチング法も提唱されているが、その効果を検証した報告は少ない。

レジンと歯質との接着界面の耐久性を in vitro で検証するため、接着界面を酸 - 塩基処理した後に電子顕微鏡観察が行われてきた。これまでの観察では主に象牙質の接着界面が中心であったが、樹脂含浸層の直下に酸 - 塩基処理に抵抗を示す歯質類似構造が確認され、これを酸 - 塩基抵抗層（ABRZ）と称している。この ABRZ の形成は、修復物における接着界面の封鎖性に重要な役割を果たし、修復物の長期耐久性の向上に寄与する可能性がある。近年、エナメル質との接着界面においても ABRZ の形成と形態学的評価が報告されている。

本研究では、2-SEA 及び 1-SEA のエナメル質接着界面の酸 - 塩基処理後の形態学的変化について観察し、さらにリン酸によるセレクティブエッチングがその形態学的変化に及ぼす影響についても比較検討した。

＜方法＞

ヒト抜去小臼歯と大臼歯からエナメル質切片を切り出し、エポキシ樹脂に包埋後、表面を耐水研磨紙(#600)にて研削した。試料はリン酸エッチングの有無によって 2 群に分け、4 種の接着システム：1) Clearfil SE Bond (SEB)、2) Optibond XTR (XTR)、3) Scotchbond Universal Adhesive (SBU)、4) Clearfil BOND SE ONE (ONE)を用いて接着した群と、40%リン酸(K-etchant GEL)で 10 秒処理し、各接着材を塗布した群(P-SEB、P-XTR、P-SBU、P-ONE)とに分けた。その後コンポジットレジン (Clearfil Majesty LV)を 築盛し、24 時間水中保管後、試料を半切して再びエポキシ樹脂包埋した。さらに試料表面を耐水研磨紙(#600～1200)にて研削後、人工脱灰液(pH4.5、2.2 mmol/l $CaCl_2$、2.2 mmol/l NaH_2PO_4、50 mmol/l CH_3COOH)にて 4.5 時間脱灰し、さらに 5% NaOCl 水溶液にて 20 分間超音波洗浄した後、水洗した。試料を切り出し、ダイヤモンドペースト(6-0.25 μm)を用いて鏡面研磨後、アルゴンイオンエッチング、金蒸着を行い、走査電子顕微鏡(SEM)観察を行った。

各群の歯面処理によるエナメル質表面を SEM 観察するため、エポキシ樹脂包埋したエナメル質表面を耐水研磨紙(#600-1200)にて研削し、上記と同様に歯面処理後、アセトンで 1 分間超音波洗浄、金蒸着を行い、表面を SEM 観察した。

＜結果＞

酸 - 塩基処理後のエナメル質接着界面の SEM 観察の結果、すべての群において 10～15 μm の Outer lesion、及びボンディング層直下に ABRZ の形成が確認された。ABRZ の厚みは各群で異なり、XTR(約 1 μm)の ABRZ は SEB(約 0.5 μm)と比べて厚く、SBU および ONE においてはより薄い ABRZ (約 0.2 μm)が確認された。一方、リン酸処理群である P-SEB、P-XTR、P-SBU、P-ONE においては、厚い ABRZ (約 5 μm)が認められた。SBU および ONE においては、ABRZ 直下にエロージョンの形成が認められたが、その他の群においてはエロージョンの形成は認められなかった。

エナメル質処理表面の SEM 観察において、SEB および XTR ではエナメル小柱構造を認めたが、明瞭な蜂巣様構造は確認できなかった。また SBU および ONE では、スミヤー層がエナメル質表面を覆っており、エナメル小柱およびエッチングの様相は確認できなかった。一方、リン酸エッチング処理した P-SEB、P-XTR、P-SBU、P-ONE のエナメル質表面には、明瞭な蜂巣様構造が観察された。

＜考察＞

セルフエッチング接着材における機能性モノマーは、水の存在下で歯質のエッチング材として機能し、次いでモノマーの浸透を促進し、さらに歯質の Hydroxyapatite (HAp)と化学的に反応すると考えられる。この化学反応によって生じた塩は、歯質の HAp 結晶を酸によるダメージから保護して ABRZ を形成すると推測される。エナメル質は、象牙質と比べて無機質の構成比率が高く、比較的マイルドなセルフエッチングプライマーでは脱灰が弱く、レジンタグの形成による十分な機械的嵌合効果が得られない可能性がある。一方、リン酸エッチング処理は、セルフエッチング処理と比べてエナメル質のより深部まで脱灰することにより、モノマーの浸透を促すことが可能である。リン酸エッチングによってエナメル質に対する接着強さの向上が報告されており、臨床においてはエナメル質に対する選択的なリン酸処理（セレクティブエッチング）も提案されてい

る。2-SEA においてリン酸処理の併用によってエナメル質に形成される ABRZ の肥厚化が報告されているが、本実験においても SEB、XTR において同様の結果が認められた。しかし、SEB および XTR においては、リン酸処理を併用せずとも良好な ABRZ の形成が確認でき、ABRZ 直下にエロージョンの形成は認められなかった。ABRZ の厚みは各々約 0.5 μm、約 1.0 μm であったが、この厚みの違いはセルフエッチングプライマーの酸性度の違いによるものと考えられる。

接着システムの機能性モノマーの違いは、接着強さのみならず、ABRZ の形成にも影響を及ぼすことが報告されている。SEB と XTR は各々リン酸系機能性モノマーである 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP)と glycerol phosphate dimethacrylate (GPDM)を含有する。MDP と HAp の化学的相互作用については、多くの報告があるが、本研究結果から GPDM は MDP と同様の効果を有することが示唆されたが、今後さらなる検討が必要である。

SEB、SBU、ONE は、いずれも機能性モノマーとして MDP を含有するが、各群で形成された ABRZ には形態学的な違いが認められた。すなわち、1-SEA である SBU および ONE においてのみ ABRZ 直下にエロージョンの形成が認められた。このことは ABRZ 直下に酸 - 塩基処理に対して脆弱な部分が存在することを示している。MDP は水・エタノール溶媒中において強い酸性を示し、溶解された HAp 表層には MDP とカルシウムとの塩の形成が報告されている。1-SEA は、機能性モノマーと水及び溶媒が 1 液中に存在しているため、水の配合比率が 2-SEA のセルフエッチングプライマーより少ない。このため 1-SEA におけるモノマーと HAp との相互作用が不十分となり、ABRZ 直下に脱灰しやすい脆弱な部位が形成された可能性が考えられる。

一方、リン酸エッチング後に SBU、ONE にて接着した P-SBU、P-ONE 群においては、ABRZ の厚みは約 5 μm であり、エロージョンの形成も認められなかった。このことはリン酸エッチングによりエナメル質結晶に微細多孔構造が形成され、モノマーのエナメル質深くへの浸透を促したと考えられる。また、豊富なカルシウム、リン酸塩および水酸化物の各イオンが HAp 表面から溶出した場合、これらのイオンの飽和がメタクリレート樹脂との良好な相互作用を示し、DCPD ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) の堆積を生じることが報告されている。これによってリン酸エッチングにより MDP とカルシウム塩の反応性が向上し、エロージョンの形成が阻止された可能性も考えられる。ABRZ の厚みの違いは、エナメル質の接着界面の保護にとっての必要条件ではないが、リン酸エッチングによって 1-SEA の接着界面に形成される脆弱な部位を補うことが可能であるため、臨床においては 1-SEA におけるエナメル質の選択的なエッチングが推奨される。一方、2-SEA においてはリン酸エッチングは不要であり、セルフエッチング処理によって十分に満足できる接着界面が形成できる。

エナメル質表面の蜂巣様構造に対する機能性モノマーの浸透とそれに次ぐモノマーの浸透、HAp との化学的相互作用がエナメル ABRZ の形成に寄与すると考えられるが、そのメカニズムはいまだ不明な点が多い。本研究においてはエナメル質表面に対する評価を行ったが、臨床的観点からは非切削エナメル質に対する影響についての研究も必要である。さらに接着材からのフッ化物の徐放がエナメル質 ABRZ の形成に及ぼす影響についても今後検討が必要である。

＜結論＞

本実験で用いたすべての群において、エナメル質接着界面に ABRZ の形成が観察された。しかし、2-SEA と 1-SEA においてその形態は異なり、2-SEA では良好な ABRZ の形成が認められたのに対し、

1-SEA においてはより菲薄な ABRZ とその直下にエロージョンの形成が認められた。リン酸エッチングによるエナメル質のセレクティブエッチング処理は、2-SEA には不要であるが、1-SEA においては安定した ABRZ を形成するために必須であることが判明した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5082　号	佐藤　隆明
論文審査担当者	主　査　　興地　隆史 副　査　　宇尾　基弘　　中村　美穂	
論 文 題 目	Morphological evaluation of the adhesive/enamel interfaces of two-step self-etching adhesives and multimode one-bottle self-etching adhesives	

（論文審査の要旨）

従来の 3 ステップ接着システムは、エッチング、プライミング、ボンディングの 3 ステップからなり、リン酸をエッチング材として用いている。これに対して 2 ステップセルフエッチングシステムにおいては、セルフエッチングプライマーに機能性モノマーを配合することによってマイルドな脱灰力が得られる。近年普及してきた 1 ステップ接着システムでは、臨床手順が簡略化された反面、その pH 値はさらにマイルドに設定され、エナメル質に対する処理が不十分となることが懸念されている。

レジンと歯質との接着界面の化学的耐久性を検証する手法として、歯質との接着界面を酸 - 塩基処理後に電子顕微鏡を用いて観察する方法が研究されてきた。その中でエナメル質との接着界面においては、接着界面直下に酸 - 塩基抵抗層(Acid-Base Resistant Zone, ABRZ)が形成されることが報告されている。

このような背景の下、佐藤は、市販 2 ステップ製品 2 種（Clearfil SE Bond、Optibond XTR）と 1 ステップ製品 2 種（Scotchbond Universal Adhesive、Clearfil BOND SE ONE）とを用いて、リン酸処理の有無によるエナメル質との接着界面の形態学的な違いについて走査電子顕微鏡（SEM）を用いて観察、評価した。

エナメル質における ABRZ の形態学的な観察に関する報告は少なく、特に接着システムの違いに着目して ABRZ を評価した研究はなく、新規性の高い研究といえる。またわが国においては、セルフエッチングシステムが広く普及している一方、諸外国においては未だリン酸を用いた接着システムも広く普及している。このことから海外で普及している接着材料を用いてその形態学的変化を検討することは、国際的な視点からも重要である。

評価項目は、SEM を用いた酸 - 塩基処理後の接着界面の観察と分類、及び接着材塗布後のエナメル質表面の観察である。SEM による試料の観察と分析の方法は過去の報告をもとに適切に設定されており、妥当な手法である。さらに十分な理工学的な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

得られた結果は以下のとおりである。

1.　すべての群においてエナメル質接着界面に ABRZ の形成が確認された。しかし、その厚みには違いが認められ、リン酸を併用した群では併用していない群と比べて厚い ABRZ が確認された。

2. １ステップの材料群においては、ABRZ の直下にエロージョンの形成が認められた。一方、２ステップの材料群ではエロージョンの形成は認められなかった。
3. １ステップの材料群においてもリン酸処理を併用した群ではエロージョンの形成は認められなかった。

２ステップの材料群においては、酸 - 塩基処理後の接着界面に良好なエナメル質 ABRZ の形成が認められた。Clearfil SE Bond は、そのプライマーとボンドに MDP (10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate)を含み、MDP は Hydroxyapatite (HAp)との高い化学的相互作用を有することが知られている。Optibond XTR も２ステップシステムであるが、Clearfil SE Bond と同様に良好な ABRZ の形成が確認されたことから、含有する機能性モノマーである GPDM (glycerol phosphate dimethacrylate)も MDP と同様に HAp との化学的相互作用を有する可能性を指摘している。一方、1 ステップセルフエッチング接着システムのエナメル質接着界面に酸 - 塩基に対する脆弱な部位が生じる理由として、２ステップシステムと比べて水の配合比率が少ないことによりモノマーとカルシウム塩の相互作用が不十分になった可能性について考察している。さらにリン酸エッチングによって、その脆弱な部位を補うことが可能であることから、臨床においては 1 ステップシステムにおけるセレクティブエッチングの併用を推奨している。

以上のように、本研究は接着システムの違いやリン酸処理の有無が酸 - 塩基処理後のエナメル質との接着界面の形態に及ぼす影響および役割について明らかにしたものである。得られた知見は臨床的にも非常に有益な情報であり、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	品川　淳一
論文審査担当者	主査　高橋　英和 副査　荒木　孝二　　品田　佳世子
論　文　題　目	Dentin bonding performance and interface observation of an MMA-based restorative material

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

4-META/MMA-TBB レジン（Super Bond C&B, 以下 SB, サンメディカル）は、長い歴史を有する化学重合型接着性レジンセメントであり、粉材と液材及びキャタリストより構成される。粉材は polymethyl methacrylate (PMMA)、液材は機能性モノマーである 4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride (4-META)と methyl methacrylate (MMA)、キャタリストは tri-n-butyl borate (TBB)を含む。TBB は、水を含む歯質において接着界面からの重合を促進する特徴を有する。これまでの in vitro 研究において、SB の高い象牙質接着性と優れた接着耐久性が報告されている。しかし、本材料はコンポジットレジン系レジンセメントと比べて機械的強度が劣るとの指摘がある。

近年、tooth wear による欠損修復を目的とした SB をベースとする新しい修復材料（Bondfill SB、以下 BF, サンメディカル)が開発された。BF は多官能性モノマーとフィラーを添加することによって機械的な性質を向上させたのが特徴である。

一方、象牙質とレジンとの接着界面に関するこれまでの研究によって、セルフエッチング接着システムを用いた場合に樹脂含浸層（Hybrid Layer、以下 HL）の直下に酸 - 塩基抵抗層（Acid-Base Resistant Zone、以下 ABRZ）が形成されることが明らかとなった。しかし、ABRZ は酸エッチング接着システムにおいては形成されない。同様の現象は、4-META/MMA-TBB レジンにおいても Takagaki ら、Nurrohman らによって報告されている。さらにフッ素徐放性を有する接着材料の使用によって ABRZ の耐酸性がより向上するとの報告もある。

本研究の目的は、新規 MMA 系修復材料である BF の象牙質接着性と接着界面の形態について、前処理材及び粉材へのフッ化ナトリウム（NaF）添加の有無について SB と比較検討することである。

＜材料及び方法＞

本実験に供した材料と実験群

本実験には、健全ヒト抜去第三大臼歯を用いた(東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会承認番号 725 番)。MMA 系レジン材料として SB（コントロール）と BF を用いた。NaF 添加粉材とし

て、SB においては 7 wt% NaF 含有ポリマー粉末(筆積 F3, 以下 SB/NaF, サンメディカル)を用いた。BF に対しては F3 と同様 7 wt%の NaF を BF 用粉材に添加した試作粉材（BF/NaF)を用いた。

象牙質の前処理材として 10%クエン酸- 3%塩化第二鉄（表面処理材グリーン, 以下 10-3）とセルフエッチングプライマー（ティースプライマー、以下 TP, ともにサンメディカル）を用いた。

まず SB と BF の象牙質に対する接着性能と接着界面の形態変化について、前処理材（10-3 または TP）の及ぼす影響について比較、検討した（10-3/SB, 10-3/BF, TP/SB ,TP/BF）。次に TP を用いて前処理した試料に対して、SB と BF 各々の粉材中の NaF の添加効果について追加検討した（TP/SB/NaF, TP/BF/NaF）。

微小引張り接着試験

ヒト抜去第三大臼歯の歯冠部をモデルトリマーにて歯軸に対して垂直に切断し、象牙質面を露出させた。次に耐水研磨紙(＃600)で研削後、上記 6 群に分けた。象牙質面に対する前処理を業者指示に従って行った後、SB または BF を用いて筆積み法（高さ 1 mm に規定）にて PMMA ロッド(直径 10 mm、高さ 10 mm)を接着させた。初期硬化のため室温 30 分間放置後、37℃水中に 24 時間保管した。その後、低速切断機（Isomet 1000, Buehler Ltd）を用いて接着界面に垂直に切断し、ビーム状試片（約 1 mm×1 mm）を作製した。試料は万能試験機（EZ-Test, 島津）を用いて微小引張り接着試験を行った（クロスヘッドスピード 1 mm/min）。

接着試験後の試料の破断面を走査電子顕微鏡(SEM, JSM-5310LV, JEOL)を用いて観察し、破壊形態を(1)接着破壊、(2)レジン内凝集破壊、(3)象牙質内凝集破壊に分類した。

各試験群の試料数は 20 個であり、得られた接着強さの値は二元配置分散分析(p= 0.05)を用いて分析後、t 検定の Bonferroni の補正を用いて多重比較を行った。

酸－塩基処理後の接着界面の SEM 観察

ヒト抜去歯を歯軸に対して垂直に切断して 2 枚の象牙質板を得た。その後、象牙質面を耐水研磨紙(#600)で研削し、10-3 または TP で前処理し、SB または BF を筆積み法を用いて築盛し、象牙質板で挟み込んだ。試料は室温 30 分間放置後、37℃水中に 24 時間保管した。その後、試料を接着界面に垂直に半切し、エポキシレジン(Epoxicure 2, Buehler)に包埋した。さらに試料を人工脱灰液(2.2 mmol/L CaCl2, 2.2 mmol/L NaH2PO4 and 50 mmol/L, pH4.5)に 90 分間浸漬し、さらに 5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 20 分間浸漬した。その後、試料を水洗、乾燥し、脱灰面に対してフロアブルコンポジットレジン(Esthelite flow quick high flow shade A2, トクヤマデンタル)を用いて保護した後、さらに接着界面に垂直に切断し、試料表面をダイヤモンドペースト(Struers A/S, Copenhagen, Denmark)を用いて鏡面研磨した。試料表面は 1 kV、0.2 mA の条件下でアルゴンイオンエッチング(EIS-IE, エリオニクス)を 40 秒間行い、金蒸着後、SEM 観察した。

フッ素徐放量の測定

本実験で用いた 4 種のレジン（SB、BF、SB/NaF および BF/NaF）について、シリコンモー

ルド(直径 6 mm、厚さ 1 mm)に填塞し、プラスチックストリップスを用いて圧接後、37℃室内に24 時間放置してディスク試料を作製した(試料数は各 4 個)。試料は、1 ml の脱イオン水(DIRECT-Q3 UV, Merck Millipore)中に 37℃で保管し 24 時間毎にバイアルを十分に振盪、脱イオン水を交換した。水中保管から 1、2、3、4、5、6、7、14、21、28 日後に徐放したフッ素イオン量をフッ素イオン電極(8010-10C, 2060A-10T, 堀場製作所)を用いて測定した。標準溶液(0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ppm)を用いて検量線を作成してフッ素イオン濃度を算出した。得られたイオン濃度は Student の t 検定により統計処理を行った($\alpha = 0.05$)。

＜結果＞

微小引張り接着試験

BF は象牙質の前処理材に関わらず SB よりも高い接着強さを示した（$p<0.05$）。また、前処理については TP が 10-3 よりも有意に高い接着強さを示した（$p<0.05$）。最も高い値を示したのは TP/BF 群であった。粉材への NaF の添加は接着強さを有意に低下させた（$p<0.05$）。

接着試験後の破断面の形態は、いずれの群においてもレジン内での凝集破壊が 80%以上であり、象牙質内凝集破壊は認められなかった。

SEM 観察

人工脱灰液による象牙質表層の脱灰深さ(Outer lesion, OL)はどの試料においても 10～15 μm であった。10-3 による前処理においては、HL の厚みは 10-3/SB で約 2 μm、10-3/BF で約 1 μm であり、接着界面は OL の基底部に対して直角に移行していた。一方、TP による前処理においては、全ての群で約 1 μm の HL が観察されたが、ABRZ の形成は全ての群において認められなかった。しかし、接着界面の形態は使用したレジンによって異なっていた。すなわち、TP/SB では界面は OL の基底部と直角を成していたのに対して、TP/BF では HL 直下に漏斗状の脱灰が認められた。一方、TP/SB/NaF と TP/BF/NaF では HL 直下にスロープ状の肥厚が認められた。

フッ素徐放量

SB 及び BF からのフッ素イオンの徐放は検出されなかった。一方、SB/NaF と BF/NaF においてはフッ素イオンの徐放が認められ、BF/NaF は SB/NaF の約 2 倍の徐放量を示した($p<0.05$)。フッ素徐放量は、SB/NaF、BF/NaF 共に 1 日後に最も高く、その後経時的に減少し、28 日後に安定した。

＜考察＞

微小引張り接着試験の結果より、BF は SB と比べて有意に高い象牙質接着強さを示した。これは BF が液材に多官能性モノマー、粉材に TMPT フィラーを含有し、SB と比べて機械的性質が向上したことによるものと考えられる。また TP による象牙質の前処理は、10-3 と比べて有意に高い接着強さを示した。TP は機能性モノマーとして 4-META を含み、これがスメアー層の脱灰、象牙質へのモノマーの浸透促進ならびに象牙質への化学的な結合などの重要な役割を担うと考えられる。しかしハイドロキシアパタイト(HAp)に対する 4-META の化学結合の強さは、リン酸エ

ステル系モノマーである 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP)と比べて低いことが報告されている。

レジン－象牙質接着界面の SEM 観察の結果、10-3 処理象牙質では TP 処理と比較して厚い HL が観察された。これは 10-3 と TP の pH の違いによる象牙質の脱灰深さの差によるものと考えられる。しかし 10-3/SB の HL は約 2 μm であるのに対して、 10-3/BF では約 1 μm であったことから、HL の厚さはモノマーの浸透性の違いにも影響されると考えられる。一方、TP/BF では接着界面に漏斗状の脱灰が観察された。これは BF に含まれる多官能性モノマー及び TMPT フィラーがモノマーの浸透を低下させた可能性を示すものである。

Tsuchiya らは、セルフエッチング接着システムを用いた場合、HL 直下に ABRZ の形成が認められると報告した。一方、酸エッチング接着システムにおいては ABRZ の形成は観察されていない。本研究においてはセルフエッチングプライマーである TP を含む全ての群において ABRZ の形成は認められなかった。Nurrohman らは、セルフエッチングプライマーを用いた場合、4-META/MMA-TBB 系レジンの象牙質接着界面において ABRZ が形成されることを報告している。本実験においては、接着界面の SEM 観察を 3500 倍で行ったが、より高倍率で観察した場合、TP 処理において ABRZ を検出できる可能性があり、今後さらに検討が必要である。

TP/BF 群においては、HL 直下に漏斗状の脱灰が観察された。Inoue らは 4-MET を含むセルフエッチング接着システムを用いた場合、ABRZ 直下に同様の漏斗状の脱灰を認めている。しかし本実験において TP/SB では接着界面に脱灰が観察されなかったことから、BF における漏斗状の脱灰の形成は、モノマー浸透性の低さや 4-META と HAp との化学反応性の低さなどが原因と考えられる。一方、粉材に NaF を添加した場合（TP/BF/NaF）、漏斗状の脱灰は形成されず、さらに接着界面に沿ってスロープ状の象牙質の肥厚が観察された。このことから粉材からのフッ素徐放は接着界面の耐酸性の向上に有効であることが示唆された。しかし粉材への NaF 添加によって接着強さは低下した。これは NaF の添加によってポリマーの重合性が低下し、接着材自体の機械的強度が低下したことによるものと考えられる。

＜結論＞

BF は酸エッチング及びセルフエッチングの両システムにおいて、SB よりも高い象牙質接着強さを示した。一方、酸－塩基処理後の接着界面の SEM 観察の結果から、TP/BF 群では接着界面には漏斗状の脱灰が認められたが、粉材に NaF を添加することによって接着界面の耐酸性の改善が認められた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5083　号	品川　淳一
論文審査担当者	主　査　　高橋　英和 副　査　　荒木　孝二　　品田　佳世子	
論　文　題　目	Dentin bonding performance and interface observation of an MMA-based restorative material	

（論文審査の要旨）

患者の高齢化とともに歯科における疾患構造も変化している。う蝕と歯周病が予防可能となった昨今、tooth wear が第 3 の疾患として注目されている。本研究は tooth wear に対する修復を目的として開発された 4-META/MMA-TBB 系修復材料である Bondfil SB（以下 BF）について、その接着性能と接着界面の耐酸性について評価しており、新しい着眼点である。

これまでの研究からセルフエッチング接着システム用いた場合、レジンと象牙質との接着界面に樹脂含浸層(Hybrid Layer, HL)とその直下に酸 - 塩基抵抗層(Acid-Base Resistant Zone, ABRZ)の形成が確認されているが､酸エッチングシステムを行った場合には ABRZ の形成は認められない。また ABRZ の形態は接着材料から徐放されたフッ素イオンの影響を受けることも報告されている。

本研究では 4-META/MMA-TBB 系接着材料であるスーパーボンド(以下 SB)を対照として用い、BF の象牙質に対する接着性能と接着界面を評価している。前処理材として表面処理材グリーン(10-3)とティースプライマー(TP)を使用しており、それぞれ酸とセルフエッチングプライマーを用いた前処理方法の選択は適切である。フッ化物の効果を検討するため 7%NaF 添加の SB 用粉材（F3）と、これと等量の NaF を添加した試作 BF 用粉材を用いていることも適切な対応である。評価項目は、微小引張り接着試験、走査電子顕微鏡（SEM）による酸 - 塩基処理後の接着界面観察及びボンディング材からのフッ素徐放量の測定である。各試験方法は、過去の文献情報を考慮しつつ適切に設定されている。得られた結果に対する統計学的な検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

得られた結果は以下の通りである。

1. 前処理材の種類に関わらず BF は SB よりも高い接着強さを示した。また TP を使用した場合、10-3 よりも高い接着強さを示した。粉材への NaF の添加は接着強さを低下させた($p.<0.05$)。
2. 微小引張り接着試験後の破断形態は、いずれの群においてもレジン内での凝集破壊が 80%以上であり、象牙質の凝集破壊は認められなかった。
3. 接着界面の酸 - 塩基処理後の SEM 観察の結果、人工脱灰液による象牙質表層の脱灰深さ(Outer lesion, OL)は 10～15 μm であった。HL の厚みと接着界面の形態は、前処理方法と

用いる接着材料により異なっていた。特に TP/SB では界面は OL 基底部と直角を成していたが、TP/BF では漏斗状の脱灰が認められた。TP/SB/NaF と TP/BF/NaF ではスロープ状に肥厚した像が認められた。全ての群において ABRZ の形成は認められなかった。

4. SB 及び BF からはフッ素イオンの徐放は検出されなかった。一方、SB/NaF と BF/NaF においては、1 日後に高いフッ素イオンの徐放が認められ、浸漬時間の増加とともに減少していき、28 日目に安定した。BF/NaF は SB/NaF の約 2 倍の徐放量を示した($p<0.05$)。

これらの結果について品川は、BF は多官能モノマー及び TMPT フィラーを含み、SB と比べて機械的性質が向上していること、TP に含まれる機能性モノマーである 4-META がスメアー層の脱灰、モノマーの浸透促進ならびに象牙質との化学的結合などに重要な役割を有すること、処理剤の pH の違いとモノマーの浸透性の違い、などの観点から説得力のある考察を展開している。本研究においては ABRZ の形成が認められなかったものの、TP 処理において ABRZ を検出できる可能性があることを指摘していることは、接着界面の詳細な観察から導かれたもので、評価できる内容である。粉材に NaF を添加することについては、接着界面の耐酸性の向上に有効である可能性を指摘する一方で、NaF 添加は接着強さの低下につながることについての弊害についても論じており、幅広い観点からの考察として評価できる。

以上のように本研究は、tooth wear に対する新しい修復材料の象牙質接着性及びその接着界面の評価を行い、その臨床応用における新たな可能性とともに、さらなる改善の方向性を提示したものである。本研究は、臨床的に有益な情報であるばかりでなく、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものであり、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	宿谷　賢一
論文審査担当者	主査　　窪田　哲朗 副査　　沢辺　元司　　戸塚　実
論　文　題　目	Novel round cells in urine sediment and their clinical implications

（論文内容の要旨）

本研究は，腎疾患の病態診断に必要な尿沈渣検査に関して，従来報告されていない小型で丸い細胞（以下，丸細胞）の性状と，その臨床的意義を解明することを目的として行われた。東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科外来に通院中の 372 症例を対象とした。うち，糖尿病は 247 例，非糖尿病は 125 例であった。

検討の結果，丸細胞は，末期腎不全患者尿に多く認められることが明らかになった。それは，赤血球，白血球よりやや大きく，径約 10 μm の球状で，単独または数個の集塊として出現し，尿沈渣検査法のガイドラインとして使用されている日本臨床検査標準協議会尿沈渣検査法 2010 には記載されていない細胞である。硝子円柱内に封入されていることもあって，尿細管腔から出現すると考えられ，尿路上皮細胞，円柱上皮細胞，扁平上皮細胞とは異なる由来の細胞であることが示唆された。細胞質の形状などは，マクロファージとも異なっていた。

免疫組織化学染色では，丸細胞は尿細管マーカーの GGT1 と CD13 が陽性であり，未分化マーカーである PAX-2 も陽性であった。尿沈渣から RNA を抽出して RT-PCR 法にて遺伝子検索した結果，腎臓発生に関与する遺伝子 *PAX2*, *OSR1*, *WT1*, *SIX2* を発現していることが明らかになり，丸細胞は未分化の要素をもつことが示唆された。さらに，尿沈渣の細胞を培地に入れて培養すると，尿細管上皮様の細胞を長期間培養できる例があるが，丸細胞が含まれている場合には，含まれない場合より良好に培養できる傾向があって，丸細胞が培養される細胞の起源に関わっている可能性が考えられた。

臨床経過との比較では，丸細胞が多く認められる症例では陰性群と比べ，1 年以内に血清クレアチニン値が上昇して透析導入になる例が多く認められた。1 年以内に透析導入に至るか否かを ROC 曲線を描いて解析すると，丸細胞数は血清クレアチニン値と類似した予測指標となることが示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5084　号	宿谷　賢一
論文審査担当者	主査　　窪田　哲朗 副査　　沢辺　元司　　戸塚　実	

（論文審査の要旨）

学位審査論文 Novel round cells in urine sediment and their clinical implications (Clinica Chimica Acta 2016;457:142-149)について審査した。

本研究は，腎疾患の病態診断に不可欠な尿沈渣検査に関して，従来報告されていない小型で丸い細胞（以下，丸細胞）を見出し，その性状と臨床的意義を解明することを目的として行われた。東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科外来に通院中の 372 症例の尿検体を解析したものである。

検討の結果，丸細胞は末期腎不全患者尿に多く認められる傾向があった。それは，赤血球，白血球よりやや大きく，径約 10 μm の球状で，単独または数個の集塊として出現し，日本臨床検査標準協議会尿沈渣検査法 2010 や，諸外国の文献にも記載されていない細胞であった。硝子円柱内に封入されていることもあり，尿細管腔から出現することが示唆された。細胞質の形状などより，マクロファージとは異なる細胞であった。

免疫組織化学染色では，丸細胞は尿細管マーカーの GGT1 と CD13 が陽性であり，未分化マーカーである PAX-2 も陽性であった。尿沈渣から RNA を抽出して，RT-PCR 法にて遺伝子検索した結果，腎臓発生に関与する遺伝子 *PAX2*, *OSR1*, *WT1*, *SIX2* を発現していることが明らかになり，丸細胞は未分化の要素をもつことが示唆された。さらに，尿沈渣の細胞を培地に入れて培養すると，尿細管上皮様の細胞を長期間培養できる例があるが，丸細胞が含まれている場合には，含まれない場合より良好に培養できる傾向があって，丸細胞が培養される細胞の起源に関わっている可能性が考えられた。

臨床データとの比較では，丸細胞が多く認められる症例は有意に腎機能が低下していた。1 年以内に透析導入に至るか否かを ROC 曲線を描いて解析すると，丸細胞数は血清クレアチニン値と類似した予測指標となることが示された。

近年，腎不全による透析患者数は増加の一途をたどり，医療経済上の大きな問題の一つとなっている。このため，腎機能障害を早期に的確に診断するための臨床検査法の進歩が求められているが，尿沈渣検査は安全，安価で，繰り返し実施できるため，有用性が高い。本研究は尿沈渣検査に新たな知見を加えたものであり，傷害された尿細管の修復機転など，腎不全の病態解明に寄与する可能性があるとともに，腎不全患者が透析導入に至ることを予測する新しいマーカーとなる可能性も秘めた，臨床的にも価値の高い内容である。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	千葉　恭敬
論文審査担当者	主査　畑　裕 副査　淺原　弘嗣、稲澤　譲治
論　文　題　目	MDCK cells expressing constitutively active Yes-associated protein (YAP) undergo apical extrusion depending on neighboring cell status

（論文内容の要旨）

<要旨>

細胞競合とは多細胞生物における細胞間相互作用のひとつである。ある細胞集団において性質の異なる細胞が混在する場合、細胞同士はどちらの性質をもった細胞がその環境に適しているのか（適応度）を比較し、適応度の高い細胞は競合の勝者となり、適応度の低い細胞は敗者として細胞集団から排除される。近年、転写共役因子である YAP が細胞競合を誘導し、YAP 活性が亢進した細胞は勝者となることが報告された。しかしながら、YAP 誘導性細胞競合現象のメカニズムは未だ解明されていない。今回、我々は活性型 YAP 発現細胞と親株細胞が隣接すると、活性型 YAP 発現細胞が予想外にも敗者として頂端側に突出することを哺乳動物上皮培養細胞を用いた実験系を使用して新たに見出した。代謝に関与することが知られている PI3K、mTOR、p70S6K の阻害剤は本突出現象を抑制した。隣接細胞の親株において filamin や vimentin の発現を抑制することでも本突出現象は抑制された。さらに興味深いことに、活性型 YAP 発現細胞を K-Ras (G12V) 発現細胞や v-Src 発現細胞と混合培養すると、活性型 YAP 発現細胞は敗者ではなく勝者に切り替わることを我々は見出した。以上の結果は、YAP 誘導性細胞競合現象は細胞内の代謝の変化が必要であることや、隣接細胞の状態に依存して勝者と敗者が決定されることを示唆する。

<諸言>

YAP は転写共役因子であり TEAD をはじめとする転写因子と結合して遺伝子発現を制御している。YAP はセリンスレオニンキナーゼカスケードである Hippo 経路によりリン酸化されることで負の制御をうける。リン酸化された YAP は 14-3-3 タンパク質により細胞質に保持され、その後分解される。リン酸化されていない YAP は活性型として核に移行し、転写共役因子としての機能を発揮する。現在、Hippo-YAP シグナル経路は細胞増殖、細胞死、細胞移動など多様な細胞応答を制御し、器官サイズ制御やがん制御シグナルとして機能することが知られている。

細胞競合は細胞応答の一つであり、ショウジョウバエで同定された細胞間相互作用である。細胞は常に互いの適応度を競合しており、適応度の高い細胞は競合の勝者となり、適応度の低い細胞は敗者として細胞死や頂端側への細胞突出（apical extrusion）により細胞集団から排除される。近年、細胞競合に Hippo-YAP シグナル経路が関与していることが報告された。ショウジョ

ウバエにおいてYorkie（YAPのショウジョウバエホモログ）が活性化した細胞（Yorkie発現細胞）をモザイク状に発現させた場合、Yorkie発現細胞の周辺に存在している細胞は細胞死により敗者として排除され、Yorkie発現細胞が勝者として増殖することが報告された。さらにマウス線維芽細胞においてTEAD活性が高い細胞とTEAD活性が低い細胞を共培養したところ、TEAD活性が低い細胞は細胞死により敗者として排除され、TEAD活性が高い細胞は勝者として増殖することが報告されている。このようにYAPはショウジョウバエと哺乳動物いずれの細胞競合にも関与している。しかしながらYAP誘導性細胞競合現象の分子メカニズムについては未だ解明されてない。

論文提出者は哺乳動物上皮培養細胞を用いた細胞競合実験系を使用して、活性型YAP発現細胞が親株細胞と隣接すると、予想外にも活性型YAP発現細胞は敗者としてapical extrusionにより排除されることを見出し、本現象の解析を行った。

<方法>

YAP変異体の作出

YAPにはTEAD binding domain、PDZ binding motif、Hippo経路によりリン酸化される5カ所のセリン残基が存在している。そこで我々はHippo経路による制御を受けず核に局在する活性型変異体YAP（5SA）を用いて、TEAD binding domainに変異を加えたYAP（5SA/TEAD*）及びPDZ binding motifを欠失したYAP（5SA/ΔPDZ）を作出した。

哺乳動物上皮培養細胞を用いた細胞競合実験

藤田らにより報告されたイヌ腎尿細管上皮細胞（MDCK細胞）を用いた細胞競合実験系を使用した。ドキシサイクリン（Dox）依存的にYAP変異体を発現する細胞を樹立した。樹立した細胞を赤色色素でラベルした後、親株MDCK細胞と赤色細胞が50:1の割合となるよう混合培養し、Dox添加により誘導される赤色細胞の動態を評価した。

阻害剤を用いた実験

以下の阻害剤を使用した。actin重合阻害剤（0.4μM）、MEK阻害剤（10μM）、myosin-II阻害剤（30μM）、PI3K阻害剤（10μM）、mTOR阻害剤（0.1μM）、p70S6K阻害剤（10μM）。括弧内は最終濃度を示す。

Filaminあるいはvimentinに対するshRNAを用いた細胞競合実験

Dox依存的にfilamin shRNAあるいはvimentin shRNAを発現するMDCK細胞を使用し、細胞競合実験を行った。

<結果>

2009年に藤田らにより報告された哺乳動物上皮培養細胞を用いた細胞競合実験系では、がん遺伝子であるK-Ras（G12V）もしくはv-Src発現細胞を親株MDCK細胞と混合培養した場合、K-Ras（G12V）もしくはv-Src発現細胞のapical extrusionが示された。そこで我々はこの実験系

を用いて YAP (5SA) 発現細胞の動態を検討した。比較として野生型 YAP (YAP (Wt)) 発現細胞を用いた。その結果、YAP (Wt) 発現細胞を混合培養した場合には apical extrusion は観察されず、すべての細胞を YAP (5SA) 発現細胞にした場合においても、apical extrusion は観察されなかった。一方、YAP (5SA) 発現細胞を親株 MDCK 細胞と混合培養した際には apical extrusion が観察された。これらの結果から、活性型 YAP 発現細胞は混合培養依存的に apical extrusion により敗者として排除されたと示唆された。また、YAP (5SA/ΔPDZ) や YAP (5SA/TEAD*) 発現細胞を親株 MDCK 細胞と混合培養して動態を観察した。その結果、YAP (5SA/ΔPDZ) 発現細胞では apical extrusion は顕著に抑制され、YAP (5SA/TEAD*) 発現細胞においては apical extrusion は完全に抑制された。以上の結果は、活性型 YAP 発現細胞の細胞突出には、TEAD を介した転写活性が必須であることが示唆する。

次に我々は YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion の分子メカニズムを解明するため、阻害剤実験をおこなった。過去に藤田らは K-Ras (G12V) や v-Src 発現細胞の apical extrusion には、actin 重合や MAPK、MyosinII が重要であること報告した。そこで我々は YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion におけるこれらの因子の関与を検討した。その結果、YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion は actin 重合阻害剤で抑制されたが、MAPK や MyosinII の阻害剤では抑制されなかった。同様にその他の阻害剤においても検討した結果、PI3K-mTOR-p70S6K の阻害剤により apical extrusion は抑制された。これらの阻害剤は Ras (G12V) や v-Src 発現細胞の細胞突出には影響しなかったことから、PI3K-mTOR-p70S6K 経路は YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion 特異的に関与していることが明らかになった。また、我々は YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion に関わる隣接細胞における分子メカニズムを調べた。そのため filamin または vimentin を shRNA により発現抑制させた MDCK 細胞を隣接細胞に使用し、YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion への影響を評価した。その結果、どちらを使用した場合でも YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion は抑制された。これらの結果から、活性型 YAP 発現細胞の apical extrusion には隣接細胞における filamin や vimentin の発現が重要であることが示唆される。

我々は次に親株 MDCK 細胞、K-Ras (G12V) 発現細胞、v-Src 発現細胞と YAP (5SA) 発現細胞の 4 種細胞間での apical extrusion の起こりやすさを調べるため以下の競合実験を行った。上記 4 種細胞間でそれぞれ 2 種の混合培養を行い、対象となる細胞の動態を調べた。まず YAP (5SA) 発現細胞を対象とし、K-Ras (G12V) もしくは v-Src 発現細胞を隣接細胞とした際の動態を観察した。その結果、どちらにおいても有意に YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion が抑制された。一方、YAP (5SA) 発現細胞を隣接細胞とした場合における、K-Ras (G12V) もしくは v-Src 発現細胞の動態を観察した結果、いずれにおいても apical extrusion が観察された。同様の実験を K-Ras (G12V) もしくは v-Src 発現細胞についても行った結果、apical extrusion の起こりやすさは親株 MDCK 細胞> YAP (5SA) 発現細胞>K-Ras (G12V) 発現細胞>v-Src 発現細胞であることが明らかとなった。これらの結果から YAP (5SA) 発現細胞は隣接する細胞の状態に応じて勝者にも敗者にもなり得ることが示唆される。

<考察>

今回、我々は活性型 YAP 発現細胞が親株 MDCK 細胞に隣接すると敗者として apical extrusion

により排除されること、この apical extrusion には TEAD 転写活性や PI3K-mTOR-p70S6K 経路が特異的に関与していること、さらに隣接細胞側における filamin と vimentin の発現が重要であることを明らかにした。また活性型 YAP 発現細胞は周辺環境により勝者にも敗者にもなり得ることも示した。

YAP はたとえリン酸化されても細胞質と核を行き来することが報告されている。PDZ binding motif は ZO-2 タンパクと結合することで YAP の核局在に重要であることも報告されている。実際、我々は過去に YAP (5SAΔPDZ) は主に細胞質に局在していることを示している。本論文で我々は YAP (5SAΔPDZ) の apical extrusion は顕著に抑制されることを示しているが、この結果は YAP (5SA) の細胞内局在と TEAD 依存的な遺伝子発現から説明可能である。

PI3K、mTOR、p70S6K はタンパク質合成、糖代謝をなどの様々な代謝に関与していることが報告されている。過去にショウジョウバエにおいてタンパク質合成が細胞競合に重要であることを示唆する報告がなされた。同様に糖代謝の変化も細胞競合に重要であることも報告された。以上のことから、YAP (5SA) 発現細胞での代謝の変化が YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion に必要であることが示唆される。

過去に filamin は vimentin の動態を制御しており、隣接細胞の vimentin は収縮力を生じ apical extrusion を促進することが報告されている。今回我々は K-Ras (G12V) 発現細胞や v-Src 発現細胞と隣接した場合には YAP (5SA) 発現細胞の apical extrusion は観察されないことを見出した。この理由として隣接細胞で K-Ras (G12V) や v-Src を発現すると filamin や vimentin の活性が抑制される可能性が考えられる。別の可能性として隣接細胞で K-Ras (G12V) や v-Src を発現することで、YAP (5SA) 発現細胞での YAP 誘導性シグナルが抑制されることが考えられる。これらについては現在検証中である。

ショウジョウバエでは Yorkie 発現細胞が、マウス線維芽細胞では TEAD 活性が高い細胞が勝者となることが報告されている。しかし、今回の我々の結果では、活性型 YAP 発現細胞は敗者となり、逆の結果を得た。一方、我々は YAP (5SA) 発現細胞は K-Ras (G12V) 発現細胞や v-Src 発現細胞と混合培養すると勝者となることも示した。これらの結果から、細胞が勝者となるか敗者となるかは生物や細胞の種類、周辺の環境に依存していることが示唆される。

<結論>

哺乳動物上皮培養細胞において、活性型 YAP 依存性の apical extrusion は隣接細胞の状態に依存して誘導されることを見出した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5085　号	千葉　恭敬

論文審査担当者	主　査　畑　裕 副　査　淺原　弘嗣、稲澤　譲治

【論文審査の要旨】

１．論文内容

哺乳動物細胞における細胞競合と呼ばれる現象に、腫瘍抑制 Hippo シグナルの標的分子 YAP が関与することを明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

異なる性質をもつ細胞が混在すると、相対的に生存に有意な特性をもつ細胞が生き残り勝者となり、それ以外の細胞が敗者として排除される現象がショウジョウバエで見いだされ、個体形成に重要な役割を果たすと考えられ、細胞競合と命名されている。同様の現象は哺乳動物細胞にも保存されていると推論されるが、まだ確定されていない。本研究は、未解明な点が多い哺乳動物細胞における細胞競合の理解に、新しい洞察をもたらす先駆的、独創的研究である。

２）社会的意義

変異遺伝子をもつ細胞が、細胞競合によって排除される現象は、発がん抑制的に働く可能性があるので重要である。

３）研究方法・倫理観

MDCK 細胞に活性型 YAP（以下、YAP と記載）を発現させると活性型 Ki-Ras（以下、Ki-Ras と記載）、v-Src を発現させた場合と同様に、apical 側に押し出されて（この現象 apical extrusion を以下、AE と記載）敗者になることをまず確認した。TEAD 結合領域、WW領域に変異をもつ YAP、あるいは PDZ 結合モチーフを欠損する YAP のうち、TEAD 標的遺伝子の発現を上昇させない TEAD 結合領域変異体と PDZ 欠乏モチーフ欠損変異体は AE を示さなかった。アクチン重合阻害剤、protein kinase C 阻害剤、vimentin 阻害剤は、YAP、Ki-Ras、v-Src による AE のいずれも抑制し、myosin-II 阻害剤、MEK 阻害剤、sphingosine-1-phosphate receptor-2 阻害剤は、Ki-Ras、v-Src による AE を抑制するが、YAP による AE は抑制せず、PI3K 阻害剤、mTOR 阻害剤、S6 キナーゼ阻害剤は YAP による AE のみを抑制した。周辺細胞の filamin の発現を抑制すると、Ki-Ras、v-Src、YAP による AE は抑制され、vimentin を抑制すると、v-Src と YAP による AE は抑制されるが、Ki-Ras による AE は抑制されなかった。すなわち、YAP、Ki-Ras、v-Src による AE には共通する分子機構も関与するが、異なる点もある。YAP、Ki-Ras、v-Src の間で比較すると YAP は Ki-Ras、v-Src に対しては勝者に、Ki-Ras は v-Src に対して勝者になることが観察された。

４）考察・今後の発展性

変異遺伝子をもつ細胞が、やがて細胞競合によって排除されなくなると発がんに至ると予測されるので、その機構を解明すると、がん予防につながると期待される。

３．その他

特記事項はない。

４．審査結果

審査会では種々の質問が行われたが、申請者はいずれにも適切な回答を行い、自立した研究者としての資質を示した。よって、本学博士（医学）の学位に値すると判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	千葉　佐保子
論文審査担当者	主査　北川　昌伸 副査　吉村　亮一、横関　博雄
論　文　題　目	Chronic Hypersensitivity Pneumonitis With a Usual Interstitial Pneumonia-Like Pattern: Correlation Between Histopathologic and Clinical Findings

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

過敏性肺炎は経気道的に吸入された抗原に対するⅢ型、Ⅳ型アレルギーによって引き起こされる間質性肺疾患である。臨床経過から急性と慢性に分類され、慢性型は、自覚のないまま持続的な抗原曝露が続き肺に不可逆的な線維化を来たし、進行性の咳嗽、呼吸困難、体重減少などを呈する。特に病理学的に通常型間質性肺炎(usual interstitial pneumonia;UIP)パターンを呈する場合予後不良であることが報告されている。近年、慢性過敏性肺炎の特徴的病理像についての知見が集積されてきたが、それらがどのような臨床所見を反映しているかについては未だ明らかになっていない。今回我々は、外科的肺生検で UIP パターンと組織診断された慢性鳥関連過敏性肺炎 16 例について、病理所見と臨床・画像所見との関連について検討した。その結果、病理組織で線維芽細胞巣が多い症例では、高分解能 CT(HRCT)での蜂巣肺、牽引性気管支拡張、網状影をより広範に認め、また予後が不良であった。多変量解析でも線維芽細胞巣は有意な予後不良因子であった。以上より、診断時の肺組織における線維芽細胞巣の程度は、予後を予測するうえで重要な所見であると考えられる。

〈緒言〉

過敏性肺炎は、抗原の反復吸入に対する過剰な免疫応答によって生じるびまん性間質性肺疾患であり、その病変の主座は、抗原が最も沈着しやすい呼吸細気管支周囲とされている。原因抗原の一つに、鳩糞や羽毛由来の鳥抗原がある。本邦の慢性過敏性肺炎を対象とした疫学調査では、鳥関連過敏性肺炎が 60%を占めると報告されている。臨床経過から急性と慢性に分類され、急性では抗原回避により治癒するが、慢性では肺の線維化を生じ、病変は不可逆性で残存ないし進行し、呼吸不全からしばしば死に至る。慢性過敏性肺炎の病理所見は、原因不明の特発性間質性肺炎(idiopathic interstitial pneumonias; IIPs)の国際分類に準じて、UIP パターン、非特異性間質性肺炎(nonspecific interstitial pneumonia; NSIP)パターン、器質化肺炎(organizing pneumonia; OP)パターンに分類される。中でも UIP パターンは、生存期間中央値が診断から約 3 年とされる特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)に類似した臨床経過、画像を呈し予後不良である。UIP パターンの組織学的特徴として、線維芽細胞巣を伴う線維化病変が、正常肺を挟んで

非連続性、斑状に分布する所見が重要とされている。近年、UIP パターンを呈する慢性過敏性肺炎の病理組織において、小葉中心性線維化、架橋線維化、腔内器質化、細気管支炎、肉芽腫、巨細胞が IPF との鑑別に有用な所見であることが報告された。これらを含む慢性過敏性肺炎の病理所見の臨床的な意義について検討を行った。

＜方法＞

1994 年から 2007 年の間に外科的肺生検を施行され、組織学的に UIP パターンを呈した慢性過敏性肺炎症例のうち、鳩糞抽出物による吸入誘発試験陽性により鳥関連過敏性肺炎と確定診断された 16 例を対象とした。慢性過敏性肺炎の診断は吉澤の基準に従った。病理所見については、小葉中心性線維化、架橋線維化、リンパ濾胞、線維芽細胞巣の標本 1cm^{2}あたりの個数、および小葉辺縁性線維化、細気管支炎、腔内器質化、蜂巣肺、肉芽腫、巨細胞、肺胞虚脱線維化、リンパ球性胞隔炎の標本中の程度を 0～3 点(0 点：なし、1 点：わずかにあり、2 点：しばしばあり、3 点：著しい)で、病理医が評価した。標本が複数ある場合には点数の平均を患者の値とした。臨床所見については、診断時の患者背景、血液検査(KL-6、SP-D、PaO_2)、気管支肺胞洗浄液、診断時およびその後の呼吸機能検査結果、治療内容、急性増悪の有無、生存期間について後方視的に抽出した。画像所見については、呼吸器内科医と放射線科医により、診断時の HRCT の大動脈弓、気管分岐部、下肺静脈の 3 レベルの左右それぞれについて(合計 6 か所)、網状影、蜂巣肺、小葉中心性粒状影、すりガラス影、コンソリデーション、気腫の程度を 0～100%まで 5%刻みで、また、牽引性気管支拡張、モザイクパターン、小葉間隔壁肥厚については、0 点：なし、1 点：ありで評価し、6 カ所の平均値を患者の値とした。さらに、間質性肺炎に関連する陰影の分布パターン(上葉優位、下葉優位、びまん性)についても評価した。これらを基に、病理所見と臨床・画像所見との関連性について検討した。

＜結果＞

16 症例のうち、14 例(88%)が男性で、診断時の平均年齢は 58.3 歳であり、12 例(75%)が既喫煙者であった。発症から外科的肺生検までの期間は平均 34.4 ヶ月で、診断後の経過が終えた期間は 1 ヶ月から 8 年であった。経過中全例で、基本的治療である抗原回避を可能な限り行い、さらに 14 例(88%)は副腎皮質ステロイド内服を、さらにこのうち 7 例(44%)では免疫抑制剤を併用していた。8 例(50%)が死亡し、死因は 7 例が原病の急性増悪、1 例が敗血症であった。

病理所見の評価では、慢性過敏性肺炎に特徴的と報告されている小葉中心性線維化が 88%、架橋線維化が 69%、腔内器質化が 75%、細気管支炎が 44%、肉芽腫が 25%、巨細胞が 31%の症例で認められ、また、UIP パターンの特徴の一つである線維芽細胞巣は全例で認められた。これらの所見のうち、小葉中心性線維化の程度は PaO_2 と負の相関を示し($r = -0.55$, 95%信頼区間 $-0.79 \sim -0.07$, $P = 0.03$)、架橋線維化の程度と $\dot{V}_{50}/\dot{V}_{25}$ が正の相関を示した($r = 0.60$, 95%信頼区間 $0.09 \sim 0.90$, $P = 0.02$)。線維芽細胞巣の 16 例中の中央値 2.2/cm^{2}を用い、線維芽細胞巣の多い群($\geq$ 2.2/cm^2)8 例と少ない群($<$ 2.2/cm^2)8 例に分け比較を行ったところ、線維芽細胞巣の多い群で急性増悪が高頻度であった(88 % vs. 25 %, $P = 0.04$)。また、HRCT 所見との関連をみたところ、線維芽細胞巣の多い群で網状影($P = 0.01$)、蜂巣肺($P = 0.01$)、牽引性気管支拡張($P = 0.02$)のスコ

アがそれぞれ高値であった。さらに、生存時間分析を行ったところ、ログランク検定では線維芽細胞巣の多い群で有意に生存率が低く(P= 0.01)、また多変量解析(Cox 比例ハザードモデル)でも、線維芽細胞巣が有意な予後不良因子であることが示された(ハザード比 2.36, 95 %信頼区間 1.02 ~ 5.48, P= 0.04)。

＜考察＞

我々は、慢性過敏性肺炎の外科的肺生検組織を半定量的に評価し、診断時の病理所見がどのような臨床所見と関連しているか明らかにした。小葉中心性線維化の程度と PaO_2は負の相関を示し、架橋線維化の程度と末梢気道閉塞を反映するパラメータである $\dot{V}_{50}/\dot{V}_{25}$は正の相関を示した。また線維芽細胞巣の程度は、HRCT 上の網状影、蜂巣肺、牽引性気管支拡張の程度と関連しており、診断時の線維芽細胞巣が多いと予後不良である可能性が示唆された。

小葉中心性線維化は、気管支の閉塞や変形を伴う細気管支周囲の線維化と定義され、経気道的に吸入された抗原に対する免疫反応である慢性過敏性肺炎の病態を反映した病変と推定されている。また、架橋線維化も慢性過敏性肺炎でしばしばみられる線維化パターンで、小葉中心部の線維化と小葉辺縁、あるいは小葉中心部同士を線状につなぐ線維化である。呼吸機能検査において一般的には拘束性肺疾患に分類される過敏性肺炎だが、その病態や病理組織学的特徴から、末梢気道閉塞所見を呈することは過去にも報告されており、今回の検討で我々は、架橋線維化が多いほど末梢気流閉塞所見が強いことを示した。また、小葉中心性線維化が多いほど動脈血酸素分圧は低値であり、その機序としては気道抵抗増大により肺胞低換気になるためと考えられる。但しこれらの結果は、相関係数の 95%信頼区間が極めて 0 に近いことから、真に有意な相関があるかどうかについては今後さらに症例数を増やしての検討が必要と考えられる。

線維芽細胞巣は、主に線維芽細胞や筋線維芽細胞から成る肉芽組織で、局所における肺胞上皮傷害の修復過程に発生すると推測されている。浮腫を反映して淡明な基質を伴い、急性～亜急性の病変である事を示している。慢性の線維化病変と正常肺の境界部に散在性に認められ、UIP パターンの特徴的所見の一つである時相の多様性(temporal heterogeneity)を表す重要な病変であり、IPF においては独立した予後因子と報告されている。一方、慢性過敏性肺炎の予後予測因子としては、HRCT 上の蜂巣肺と牽引性気管支拡張が報告されている。さらに近年、慢性過敏性肺炎を含む線維性肺疾患において、病理組織における線維芽細胞巣が多いほど、HRCT における蜂巣肺、牽引性気管支拡張、網状影が顕著であることが示された。今回の我々の結果も、これらの既報告に矛盾しない結果であり、さらに慢性過敏性肺炎でも線維芽細胞巣の数が予後規定因子となりうることを初めて示した。

＜結論＞

UIP パターンの病理組織を呈する慢性過敏性肺炎では、診断時の肺生検組織における線維芽細胞巣の数が予後規定因子となりうる。また、線維芽細胞巣の程度は HRCT 所見の蜂巣肺、牽引性気管支拡張、網状影の程度と相関している。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5086　号	千葉　佐保子
論文審査担当者	主　査　北川　昌伸 副　査　吉村　亮一、横関　博雄	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文はUIPパターンを呈する慢性過敏性肺炎における臨床病理学的検討についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

病理学的にUIPパターンを呈する慢性過敏性肺炎は予後不良であることが知られている。この様な症例における特徴的組織像がどのような臨床所見を反映しているのかを解明する目的で、外科的肺生検でUIPパターンと組織診断された16例について病理所見と臨床・画像所見との関連について検討した。これまで慢性過敏性肺炎の特徴的病理像と臨床所見との対比解析は進んでおらず、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.　病理組織で線維芽細胞巣が多い症例では高分解能CT（HRCT）での蜂窩肺、牽引性気管支拡張、網状影をより広範に認めた。

2.　病理組織で線維芽細胞巣が多い症例は予後不良で、多変量解析でも線維芽細胞巣は予後不良因子であった。

以上のように申請者は、慢性過敏性肺炎における線維芽細胞巣の程度が、予後予測の上で重要な所見であることを明らかにしている。これは臨床的にも極めて意義のある研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では臨床検体に対して詳細な病理組織像の解析が行われ、臨床所見との対応の検討がなされた。本手法は十分な病理組織学的診断・解析能力と臨床的知識との裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と能力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果について、UIPパターンを呈する慢性過敏性肺炎における線維芽細胞巣の程度が、予後予測の上で重要な所見であると考察している。これは間質性肺炎に関する先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	中村　輝子
論文審査担当者	主査　清水　重臣 副査　鈴木　敏彦、宮崎　泰成
論　文　題　目	Autophagy induced by intracellular infection of *Propionibacterium acnes*

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Propionibacterium acnes は、なんらかの原因物質に対する Th1 型免疫反応によって引き起こされるサルコイドーシスの原因細菌のひとつとして知られている。近年、細胞内病原体において Autophagy による MHC class II 分子を介した抗原提示が注目されている。本研究では、サルコイドーシス病因追求の一貫として、*P. acnes* が Autophagy を誘導しうるかどうか検討した。実験に用いる被感染細胞として、マクロファージ系 Raw 細胞、間葉系 MEF 細胞、上皮系 HeLa 細胞の 3 系統の培養細胞を用いた。サルコイドーシス病変部リンパ節から分離した *P. acnes* の生菌と死菌それぞれを、細胞あたりの菌量（Multiplicity of infection: MOI)で 100 と 1000 に調整し 1 時間感染させた。その後感染細胞を洗浄し、細胞外の菌だけを殺菌できる抗生剤入りの培養液で被感染細胞の培養を継続した。一定時間の培養を行ったサンプルを用いて、Colony assay による細胞内生菌数の測定、電子顕微鏡観察、LC3, LAMP1 に対する抗体を用いた蛍光顕微鏡観察を行った。その結果いずれの細胞株においても、生菌を MOI 1000 で感染させた場合、少数または多数の菌体を含んだ小型または大型の LC3 陽性空胞（以下、LC3 陽性 *P. acnes*）が高頻度に観察された。LC3 陽性 *P. acnes* の数量は MOI 100 の感染条件下では低下し、死菌を用いた場合にはまったく認められなかった。また、Autophagy 機能を欠如した Atg5$^{-/-}$ MEF 細胞では、同様の LC3 陽性 *P. acnes* はまったく観察されず、MOI 1000 感染後 48 時間時点の細胞内生存菌数も Wild type の MEF 細胞に比較して 7.2 倍高値を示した。電子顕微鏡観察では、細胞内菌体の多くは一重膜に取り囲まれていたが、一部で二重膜や多層膜で取り囲まれた菌体も認められた。稀に、破綻した後期エンドゾーム内の菌体や、細胞質内に膜状構造を欠如して遊離状態にある菌体も観察された。いずれの細胞株でも LC3 陽性 *P. acnes* の多くは LAMP1 陽性であった。本研究では、*P. acnes* の細胞内感染によって Autophagy が誘導されることを初めて証明した。本菌の細胞内感染により誘導される Autophagy は細胞内殺菌に寄与しており、MHC class II を介した細胞内菌体の抗原提示を亢進させる可能性もある。今後、本菌による Autophagy がサルコイドーシスの病因や病態にどのように関与しているか検討する必要がある。

＜諸言＞

サルコイドーシス患者における肉芽腫は微生物の関与が疑われる感染性肉芽腫に類似する。サ

ルコイドーシスリンパ節からはPCRや培養で多量の *Propionibacterium acnes* が検出され、また、*P. acnes* 特異的モノクローナル抗体を用いると、リンパ節および肺の肉芽腫内に陽性を認めることから、最も有力な原因細菌として *P. acnes* が注目されている。この *P. acnes* の菌体（あるいはその菌体成分）が抗原となりサルコイドーシス患者で引き起こされる過度のTh1型免疫反応の機序として、潜伏感染した本菌の細胞内増殖が引き金となってTh1型免疫反応が誘導されると考えられている。近年、細胞内病原体に対する防御メカニズムの一つとしてAutophagyが注目されている。これまでに細菌感染によるAutophagyの誘導は溶連菌、リステリア菌、赤痢菌、結核菌およびサルモネラ菌などで報告されている。またAutophagyは、細胞内病原体のMHC classⅡによる抗原提示にも関与するとされている。これらのことから、細胞内 *P. acnes* に対してもAutophagyを誘導し、MHC classⅡ分子によって抗原提示がなされ、CD4陽性T細胞の活性化により、Th1型免疫反応を引き起こすことが想定される。

本研究では、貪食系細胞、間葉系細胞、上皮系細胞の3系統の培養細胞を用いて *P. acnes* の細胞内感染が、Autophagyを誘導しうるかを検討した。

＜材料と方法＞

マクロファージ系Raw264.7細胞、間葉系MEF細胞、上皮系HeLa細胞の3系統の培養細胞に、サルコイドーシス病変部リンパ節から分離した *P. acnes* の生菌と死菌それぞれを、MOI 100とMOI 1000に調整し感染させた。これらの細胞に対して抗LC3抗体による蛍光免疫染色を施行し *P. acnes* を取り囲むLC3陽性細胞率の経時的変化およびオートファゴゾームの大きさが5μm以上の陽性細胞率をカウントした。また、細胞内感染 *P. acnes* の生存にAutophagyが関与しているかを検討するために、Autophagy機能を欠如した $Atg5^{-/-}$ およびWild typeのMEF細胞を用い、Colony Assayによって24時間および48時間後の細胞内生菌数を解析した。同様にして感染72時間までの細胞内 *P. acnes* 生菌数をRaw264.7細胞、MEF細胞、HeLa細胞を用いて比較した。さらに、高い細胞内生存率を示したHeLa細胞を用いて電子顕微鏡下での形態学的解析を行った。

＜結果＞

P. acnes の生菌をMOI 1000で感染させ、1時間から24時間まで観察すると3系統いずれの細胞内においても大小様々な大きさの *P. acnes* を取り囲むLC3陽性像が認められ、その陽性細胞数のピークは、感染8時間であった。特に大型のLC3陽性像は、感染初期の時間帯では認められず、感染8時間前後で観察された。また、MOI 100の感染条件下ではLC3の陽性細胞率は低下し、死菌を用いた場合にはまったく認められなかった。また、Autophagy機能を欠如した $Atg5^{-/-}$ MEF細胞では、*P. acnes* を取り囲むLC3陽性像はまったく観察されず、MOI 100での感染後48時間時点での細胞内生存菌数は、Wild typeのMEF細胞に比較して25倍高値を示した。さらに細胞内生存菌数を3系統の細胞で比較すると、いずれの細胞株においても感染48時間まで *P. acnes* の生菌が認められ、唯一HeLa細胞においては感染72時間でも生菌が認められた。*P. acnes* を感染させたHeLa細胞における電子顕微鏡観察では、一重膜に取り囲まれる菌体が大半を占め、一部で二重膜や多重膜で取り囲まれた菌体が認められた。また、稀ではあるが、菌体を含む後期エンドゾーム膜が破れた像や、細胞質内にエンドゾーム等の膜構造を認めず遊離状態にある菌体

も観察された。また二重染色による観察では、いずれの細胞株でも *P. acnes* を取り囲む LC3 の陽性は一部で LAMP1 抗体陰性を認めるが、その多くが LAMP1 抗体陽性となった。

＜考察＞

本研究では、貪食系細胞、間葉系細胞、上皮系細胞の 3 系統の培養細胞を用いて *P. acnes* の細胞内感染により Autophagy が誘導されることを示した。基本的に、*P. acnes* はエンドサイトーシス経路で処理されるが、Autophagy 機能を欠如した Atg5$^{-/-}$ MEF 細胞を用いると Wild type の MEF 細胞に比較して細胞内生存菌数が有意に高くなることや、感染菌量が多い場合に *P. acnes* を取り囲む LC3 陽性細胞率が増えることから、エンドサイトーシス経路で処理可能な容量を超える場合には、Autophagy が *P. acnes* の細胞内処理に機能するものと考える。また、細胞内感染菌量が多い場合に認められる大型の *P. acnes* を取り囲む LC3 陽性像は、LC3 などの Autophagy 関連因子が誘導する一重膜のファゴゾーム（LC3-Associated Phagocytosis: LAP）であることが考えられる。この大型の LC3 陽性像の多くは、リソソームマーカーLAMP-1 陽性を認めることから、細胞内細菌の消化に寄与すると考えられる。一方小型の LC3 陽性像は、従来のオートファジーを示すものと考えられ、電子顕微鏡観察においては、少数の *P. acnes* が二重あるいは多重膜に囲まれた像やエンドソームに囲まれた像、細胞質中に消化されずに存在する *P. acnes* が認められた。また *P. acnes* の潜伏感染が成立するためには、細胞内消化を免れて存在する必要がある。本研究では、*P. acnes* を取り囲む LC3 陽性膜の一部で LAMP1 抗体陰性が認められた。さらに *P. acnes* 感染 2 日後においても細胞内で生菌が認められ、上皮系 HeLa 細胞においては、感染 3 日後においても生菌存在が確認された。このことから、*P. acnes* は、ブルセラ菌やレジオネラ菌のように細胞質へ脱出する機序が存在するか、あるいはファゴゾーム内の pH を中性に保ち消化を免れる機序の存在が考えられる。細胞外へ脱出した *P. acnes* は、細胞内病原体を認識する NOD タンパクによって修飾されると考えられる。それは、NOD2 遺伝子異常が認められる Crohn 病では、Autophagy 不全によって細胞内殺菌の低下を導くことが報告されており、NOD タンパクが細胞内細菌に対する Autophagy 誘導と関連する可能性が考えられる。つまり、細胞内感染した *P. acnes* が、エンドゾームから脱出し NOD タンパクにより認識され Autophagy を誘導する可能性がある。NOD2 遺伝子の異常は、サルコイドーシスと類似した肉芽腫像を呈する Blau 症候群や、その孤発型と考えられている若年発症型サルコイドーシスにおいても認められることから、NOD2 の活性化が、オートファジーの誘導および CD4 陽性 T 細胞による抗原提示を亢進し、過度の Th1 型免疫反応を引き起す結果、肉芽腫を形成する機序が考えられる。このように、Autophagy が細胞内に感染した *P. acnes* に対し、一般的なリソソームによる消化経路であるエンドサイトーシスとは別の消化経路として機能する可能性が考えられる。

＜結論＞

P. acnes の細胞内感染により誘導される Autophagy は、細胞内殺菌に寄与すると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5087　号	中村　輝子
論文審査担当者	主　査　清水　重臣 副　査　鈴木　敏彦、宮崎　泰成	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、*Propionibacterium acnes*（*P. acnes*）感染細胞において、*P. acnes* が Atg5 依存的に LC3 陽性の膜に取り囲まれ、その後に殺菌されることを示した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究は、サルコイドーシスの原因細菌の１つである*P. acnes* が細胞に感染した後に、いかなる細胞現象が生じるかを明らかにしようとした研究であり、*P. acnes* を対象とした同様の研究はこれまで為されていないことより評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

1. *P. acnes*と種々の細胞を共培養した時に、細胞内の*P. acnes*はLC3陽性の膜に取り囲まれる。

2.この*P. acnes*を取り囲むLC3陽性vesicleは、Atg5欠損細胞では出現しない。

3. 正常細胞では、*P. acnes*を囲むLC3陽性vesicleとリソソームの共局在像が観察され、*P. acnes*がリソソーム酵素によって殺菌されていることが考えられる。

4. Atg5欠損細胞では*P. acnes*の生存率が高く、これはLC3陽性vesicleができないためであると考えられる。

以上のように申請者は、*P. acnes*感染細胞における殺菌メカニズムを明らかにしており、重要な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

本研究は、細菌学や超微形態学、細胞生物学的知識を基盤として遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力に問題ないことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、この機構を介して分解された*P. acnes*が、その後にMHC class IIにより、CD4陽性Tリンパ球に抗原提示される可能性を考えている。これを実証することができれば、サルコイドーシスの新規治療法の開発にも繋がることが期待できる。

３．その他　なし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	廣瀬　明日香
論文審査担当者	主査　西川　徹 副査　宮崎　泰成、豊福　明
論　文　題　目	Subjective insomnia is associated with low sleep efficiency and fatigue in middle-aged women

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ミドルエイジ女性は睡眠障害や疲労感に悩まされることも多い。不眠に関する主観的評価が、日々の活動・睡眠状況を含むどのような背景因子と関連するかを調べるため横断調査を行った。多重ロジスティック回帰分析により、睡眠効率の低さと疲労感の強さが不眠に関する主観的評価に関連することがわかった。睡眠効率の低下が不眠症状の原因となり、さらに不眠症状は疲労感と双方向性に関連する可能性が示唆された。

＜緒言＞

ミドルエイジ女性は血管運動神経症状や泌尿生殖器系症状だけでなく睡眠障害や疲労感に悩まされることも多い。多くの論文で閉経と睡眠障害の関連が明らかにされ、周閉経期や閉経後に不眠が増加することも示されている（Shaver 2015 Menopause）。睡眠障害は認知機能障害や抑うつを引き起こすだけでなく、心血管系リスクや死亡率を上げることも示されている。

アクティグラフは加速度センサを搭載した生活モニタ装置である。睡眠・覚醒パターンにより、活動頻度や強度に加え睡眠時間や中途覚醒、睡眠効率を含む睡眠状況を計測する。アクティグラフは客観的な睡眠状態の評価手段として注目され、論文数も増加している。ミドルエイジ女性の睡眠障害を主観的または客観的に評価した先行研究はあるがほとんどがポリソムノグラフを用いている。

本研究の目的は、不眠に関する主観的評価がアクティグラフィにより得られた活動状況や客観的な睡眠評価をはじめ、身体症状、精神症状、体組成、心血管系パラメータ、生活習慣等どのような背景因子と関連するかを抽出することである。

＜方法＞

あるサプリメントの効果を検討する研究の baseline data をもとに横断調査を行った。本学医学部附属病院倫理審査委員会の承認を得た。すべての被験者からインフォームド・コンセントを取得した。更年期症状を有する 40 歳以上 60 歳未満の女性 95 名について、年齢、閉経状態、体組成、心血管系パラメータ、更年期身体症状・精神症状、不眠症状、疲労感、生活習慣の調査を

行った。同時にアクティグラフを 72 時間装着させ生活行動を計測した。

不眠に関する主観的評価にはアテネ不眠尺度（AIS）を用いた。客観的な活動状況・睡眠評価にはアクティグラフ（リストバンド型生活モニタ装置、Hitachi）を用い、活動状況の指標となる Zero-crossing (ZC) や Metabolic equivalents (METs)、全睡眠時間、日々の睡眠時間のばらつきの指標である睡眠時間標準偏差、中途覚醒、入眠潜時、睡眠効率の結果を得た。睡眠効率は床上時間に占める睡眠時間の割合で算出した。利き腕の対側に、入浴時以外継続して 72 時間装着させた。更年期症状は更年期 QOL 質問票、HADS 質問票を用いた。気分の状態と疲労感の評価には、POMS 短縮版、Chalder 疲労質問票、簡易倦怠感質問票を用いた。

統計解析は AIS スコアにより 2 群に分類し、まず単変量解析（t 検定、カイ二乗検定、Mann-Whitney 検定）により P＜0.20 で群間に差があり、不眠に関する主観的評価に寄与すると考えられる背景因子を抽出した。次にその中からステップワイズ変数選択による多重ロジスティック回帰分析により P＜0.05 を有意差ありとし、不眠に関する主観的評価に独立して関連する因子を求めた。解析ソフトは GraphPad Prism version 5.02 と JMP version 11.0.0 を用いた。

＜結果＞

AIS 6 点以上を不眠群（N=30）、5 点以下を正常群（N=65）とし 2 群の背景を比較した。まず単変量解析を行った。不眠群では年齢が高く （51.6 ± 5.2 vs. 49.6 ± 5.4 歳, P=0.106）、分娩回数が多く（1.4 ± 1.2 vs. 1.1 ± 1.2, P=0.180）、身長が低く（157.1 ± 4.4 vs. 158.5 ± 4.6 cm, P=0.161）、BMI が高く （22.5 ± 4.0 vs. 21.4 ± 2.8 kg/m^2, P=0.121）、足関節上腕血圧比が低い（1.09 ± 0.06 vs. 1.12 ± 0.07, P=0.114）傾向にあり、更年期 QOL 質問票身体症状スコア（7.1 ± 3.5 vs. 4.9 ± 2.9, P=0.004）、HADS 不安スコア（6.7 ± 3.0 vs. 4.8 ± 2.9, P=0.004）と抑うつスコア（5.9 ± 3.7 vs. 4.6 ± 3.4, P=0.095）、Chalder 疲労質問票（21.8 ± 8.0 vs. 16.2 ± 6.1, P=0.002）、簡易倦怠感質問票（4.1 ± 2.0 vs. 2.3 ± 1.6, P<0.001）、POMS 短縮版の緊張スコア（7.3 ± 4.3 vs. 4.4 ± 3.9, P<0.001）・抑うつスコア （4.6 ± 4.3 vs. 2.3 ± 2.8, P=0.005）・怒りスコア（4.9 ± 4.4 vs. 3.6 ± 3.1, P=0.189）・疲労スコア（9.4 ± 4.0 vs. 6.0 ± 4.0, P<0.001）・混乱スコア（5.6 ± 2.7 vs. 4.0 ± 2.3, P=0.006）が高く、活気スコアは低かった（5.9 ± 3.1 vs. 7.3 ± 4.1, P=0.111）。さらに昼寝をした割合が多く（30.0 vs. 16.9 %, P=0.179）、喫煙率が低く（0 vs. 12.3 %, P=0.053）、フルタイム労働者が多い（フルタイム/パート, 53.3/26.7 vs. 38.5/49.2 %, P=0.113）という傾向であった。アクティグラフィの結果では、不眠群で睡眠効率が低い（96.6 ± 1.8 vs. 97.6 ± 1.5 %, P=0.008）傾向であった。

次に多重ロジスティック回帰分析を行った。多重共線性を避けるため抑うつ症状は HADS 抑うつスコア、疲労感は簡易倦怠感質問票で代表させた。睡眠効率の低さ（調整オッズ比 1.44［95%信頼区間 1.06-2.05], P=0.027）と疲労感の強さ（調整オッズ比 1.57［95%信頼区間 1.19-2.13], P=0.002）のみが独立で不眠に関する主観的評価に関連する因子として抽出された。

＜考察＞

不眠症は通常、主観的な症状や睡眠日誌をもとに診断される。睡眠障害国際分類第 2 版によれば、眠る機会や環境が適切であるにも関わらず入眠困難・睡眠維持困難・早朝覚醒・慢性的に回

復感のない質のよくない睡眠が続くと訴え、それに伴い疲労感・倦怠感、注意力・集中力の低下などの日中障害を１つ以上認めるものを不眠症と定義する。不眠に関する主観的な評価法として、AIS やエップワース眠気尺度、セントマリー病院睡眠質問票、ピッツバーグ睡眠質問票などの自己記入式質問票が多く用いられる。客観的な評価法としては、脳波、筋電図、心電図などを装着して睡眠時間、睡眠効率、入眠潜時、中途覚醒などを計測するポリソムノグラフィがよく用いられるが、主観的な評価と客観的パラメータには乖離があると報告されており（McCall 1992 Sleep）、睡眠障害をより綿密に検討するには両者をともに評価することが好ましい。

アクティグラフは加速度センサにより長期間かつ連続的に活動状況を計測する装置であるが、今回用いた装置は 3 軸加速度センサと温度センサを搭載しておりアルゴリズムで自動的に睡眠・覚醒判定を行う。ポリソムノグラフに比べ軽さや装着の簡便さ、安価な点で有用で、睡眠状態の評価手段として普及しつつあり妥当性と信頼性も確認されている。アメリカ睡眠障害協会によるガイドラインでも睡眠障害の評価法としてアクティグラフィを推奨している。更年期分野でも睡眠障害について多く研究されているがアクティグラフィを用いたものはほとんどない。

先行研究と同様に、本研究でも全睡眠時間、睡眠時間標準偏差、中途覚醒、入眠潜時は AIS スコアと関連がなく、主観的な評価と客観的パラメータに乖離がみられた。しかし睡眠効率の低さが主観的な評価に関連する因子の一つであった。ポリソムノグラフィを用いたある研究では、不眠症患者は健常者に比べ睡眠時間が短く睡眠効率が低く中途覚醒の割合が多いことを示し（Voderholzer 2003 Depress Anxiety）、別の横断調査では不眠症の重症度が睡眠時間・入眠時間と関連し睡眠効率とは関連がないと示した（Sadeghniiat 2014 Indian J Psychol Med）。更年期女性を対象に主観的な評価と客観的な睡眠パラメータをアクティグラフを用いて検証した研究はこれが初めてである。

一方、疲労感は不眠に関する主観的評価と関連することが多くの研究で示されている。ある横断調査では救急隊員を対象に睡眠の質、疲労感、職務上の安全性を調査し、疲労感を訴える隊員では睡眠の質が低く（Patterson 2012 Prehosp Emerg Care）、慢性疲労を訴える患者への不眠症治療に関する研究では、不眠症の重症度の改善が疲労感改善につながった（Kallestad 2015 J Psychosom Res）。疲労度と不眠に関する主観的評価は双方向性に影響しているのかもしれない。

これまでの研究で、不眠症への認知行動療法や運動療法が睡眠効率を高め、疲労感の改善には運動療法、カウンセリング、鍼灸療法が効果的と言われている。これらを併用することで主観的な不眠症状をより効果的に改善できるかもしれない。

本研究では比較的健康な女性を対象としたが、不眠に関する主観的評価と睡眠効率・疲労度の関連を確かめるには、不眠症を訴える更年期女性を対象としたさらなる研究が必要である。

＜結論＞

ミドルエイジ女性において、不眠に関する主観的評価に独立に関連する因子は睡眠効率の低さと疲労度であった。睡眠効率の低下が不眠症状の原因となり、さらに不眠症状は疲労感と双方向性に関連する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5088　号	廣瀬　明日香
論文審査担当者	主　査　西川　徹 副　査　宮崎　泰成、豊福　明	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

閉経期女性に睡眠障害や疲労感の訴えが多いことに注目し、その病態や治療法の手がかりを得る目的で、本時期の 40～60 歳の女性を対象に、主観的な不眠と関係する因子を検索した。このため、初めての試みとして、不眠を主観的に評価するアテネ不眠尺度および睡眠—覚醒状態を客観的に評価するアクティグラフを実施するとともに、身体的背景因子、心血管系機能指標、各種の身体・精神症状評価尺度、生活習慣、社会的背景因子等を検討した。これらのデータについて、単変量解析基づく、多変量ロジスティック回帰解析を行い、不眠の主観的評価には、睡眠効率の低さと疲労感の強さが独立して有意に関連することを明らかにした。以上から、睡眠効率の低下が、疲労感と密接に関係した不眠に繋がることや、疲労感または不眠の効果的な治療法の組合せによって、より効率的に双方の改善が得られることが示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

機器による睡眠の客観的評価、身体・精神症状、身体的・社会的背景因子、心血管系機能、生活習慣､経産回数等と不眠の主観的な評価との関係を明らかにすることを目指した初めての研究。

２）社会的意義

閉経期の女性では、睡眠障害と共に多彩な身体的・精神的変調が訴えられるが、これらの相互関係を明らかにし、より合理的な治療法の手がかりを与えた点で、臨床的・社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

ヒトを対象とした研究であり、東京医科歯科大学の倫理委員会の承認および対象者の同意のもとに、確立された安全な方法で正確に進められている。

４）考察・今後の発展性

不眠および疲労感の治療における今後の改良点も考察され、今回得られた指標と内分泌系等の分子レベルの変化との関連を調べ新規治療法開発に活用する発展性についても言及があった。

３．その他

スライド、口頭発表ともに良く準備され、わかり易い内容であった。質疑応答においても概ね満足すべき解答が得られた。

４．審査結果

申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断される。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	毛　瑩
論文審査担当者	主査　石川　俊平 副査　横田　隆徳、黒柳　秀人
論　文　題　目	The hnRNP-Htt axis regulates necrotic cell death induced by transcriptional repression through impaired RNA splicing

（論文内容の要旨）

<Abstract>

In this study we identify signaling network of necrotic cell death induced by transcriptional repression (TRIAD) by α-amanitin, the selective Pol II inhibitor, as a model of neurodegenerative cell death. We performed genetic screen of a knockdown (KD) fly library by measuring the ratio of transformation from pupa to larva (PL ratio) under TRIAD, and selected the cell death promoting genes. Systems biology analysis of the positive genes mapped on protein-protein interaction databases predicted the signaling network of TRIAD and the core pathway including hnRNPs and Htt. RNA sequencing revealed that α-amanitin impaired transcription and RNA splicing of Htt, which is known as an ER-stabilizing molecule. The impairment in RNA splicing and PL ratio was rescued by overexpresion of hnRNPA that had been also affected by transcriptional repression. Fly genetics with suppressor or expresser of Htt and hnRNP worsened or ameliorated the decreased PL ratio by α-amanitin, respectively. Collectively these results suggested involvement of RNA splicing and a regulatory role of the hnRNP-Htt axis in the process of the transcriptional repression-induced necrosis.

<Introduction>

In CAG/polyglutamine expansion disorders including Huntington's disease and spinocerebellar ataxias, among various pathological pathways such as ubiquintin-proteasome system, autophagy, chromatin structure, synaptic function, mitochondrial function, and so on, impairment of a broad spectrum of gene expression at transcriptional and post-transcriptional levels has been implicated in the pathology because nuclear transfer of disease proteins is essential to induce large impact on phenotypes, because mutant proteins interact with numerous transcription-related factors and because mutant RNAs transcribed from the disease genes form nuclear speckles or cytoplasmic RNA foci including stress granules. Suggesting that impaired expression of a wide range of genes is one of the main

pathological domain in neurodegenerative diseases in general. In neurodegenerative diseases, cell death never occurs simultaneously in a huge number of neurons in the brain. Recent progress of necrosis provides another possibility for cell death of neurodegenerative diseases. However, it is still unclear how the necrotic signaling pathway can explain the slowness of cell death in neurodegenerative diseases.

As a model connecting slow cell death and impaired transcription, we previously proposed a unique necrosis named TRIAD induced by general transcriptional repression with AMA in mammalian neurons. TRIAD is characterized with enormous expansion of ER that is distinct from mildly enlarged ER in apoptosis.

In this study, we elucidated the molecular network of TRIAD and identified Htt and two hnRNPs involved in splicing as key molecules in the network.

<Method>

To elucidate signaling network of TRIAD, we performed genetic screen of a library of KD flies fed with AMA and identify modifier genes. We found the candidate key molecules for TRIAD including Htt, FBXW11, Plk1, hnRNPA2B1 and hnRNPAB. To test their expression levels at mRNA level, we performed qPCR in fly brain tissue and rat cortical neurons. qPCR confirmed the reduction of them except Htt. To find reasons for the discrepancy, we performed RNA sequencing. To test protein expression levels of these genes, we performed western blot. To test our hypothesis that transcriptional decrease of hnRNPs cause the secondary splicing impairment of target genes, we performed RT-PCR of Htt. Further to examine the significance of the hnRNP-Htt axis in TRIAD, we examined KD and OE of normal Htt and hnRNPAB on PL ratio. Moreover, to confirm the significance of hnRNP-Htt axis in mammalian neurons, we transfected hnRNPs OE and/or normal Htt into rat primary cortical neurons. Finally, we tested the effect of two specific kinase inhibitors against Plk1 on TRIAD by PL ratio in fly and by viability in rat primary cortical neurons.

<Result>

We performed genetic screen of a library of KD flies fed with AMA and identified Htt, FBXW11, Plk1 are the key molecules in the network of TRIAD. qPCR confirmed the reduction of FBXW11/slmb, Plk1/polo except Htt/htt. To find reasons for the discrepancy, we performed RNA sequencing. Consequently we found that AMA dramatically changed splicing pattern of Htt. Futhermore, we found hnRNPAB/sqd and hnRNPA2B1/hrb98DE. RNA sequencing revealed that not only transcriptional but also RNA splicing were changed in these splicing-related molecules. To test our hypothesis that transcriptional decrease of hnRNPs causes the secondary splicing impairment of target genes, we performed RT-PCR of Htt, the representative gene dramatically changed in splicing by AMA, and examined whether down- or up-regulation of hnRNP affects the splicing pattern of the possible target gene. Further to

examine the significance of the hnRNP-Htt axis in TRIAD, we examined KD and OE of normal Htt and hnRNPAB on PL ratio. When the two molecules were knocked down, the decrease of PL ratio was accelerated. On the other hand, when the two molecules were overexpressed, the decrease of PL ratio was recovered. These results supported the critical role of the hnRNP-Htt axis in TRIAD. Moreover, to confirm the significance of hnRNP-Htt axis in mammalian neurons, we tested whether OE of hnRNPs and/or normal Htt could inhibit TRIAD in rat primary cortical neurons. As expected, hnRNPAB, hnRNPA2B1 and normal Htt suppressed TRIAD. Finally, we tested the effect of two specific kinase inhibitors against Plk1 on TRIAD. These results with inhibitors might be applicable to the development of pharmaceuticals against TRIAD or TRIAD-like necrosis that could occur in neurodegenerative diseases.

<Discussion>

In this study we intended to elucidate molecular network of TRIAD taking advantage of a library of KD flies and bioinformatics based on protein-protein interaction network database. Through screening of KD fly library, we identified modifier genes of TRIAD. Mapping them on the high quality protein-protein interaction databases, we identified the molecular network of TRIAD crossing over multiple signaling pathways. In addition, our systems biology analyses elucidated that hnRNPs and Htt, the causative gene product of Huntington's disease, might play critical roles in the network. The role of Htt was linked to the ER shape, as discussed below. Another intriguing finding in this study was that RNA splicing-related molecules, hnRNPs, were decreased in TRIAD both of fly and rat, leading to the splicing impairment of Htt. We therefore proposed the axis from hnRNPs to Htt mediated by the change of RNA splicing could be a new domain of TRIAD.

Functional role of Htt in the maintenance of ER has been already reported. The experiment revealed fusion of vesicles in ER-Golgi network, which is basically consistent with our observation with TRIAD in this study. The loss of physiological function of Htt might unify TRIAD since mutant Htt impairs function of normal Htt. The relationship between two forms of necrosis should be further investigated.

This study indicated that the dual pathways, direct as well as indirect impairments of gene expression of key genes, contribute to TRIAD. In the direct pathway, expression of key genes was decreased by transcriptional impairment by Pol II inhibition. In the indirect pathway, RNA splicing of key genes was impaired through the decrease of hnRNP by transcriptional repression.

Since temporal dynamics of signaling becomes slower in a complex network including multiple branches and feedback loops rather than in a simple cascade, the complexity of TRIAD signaling network might be a cause why the cell death process is so slow in neurodegeneration. Our study is not complete. We used Drosophila CNS instead of human

neuron to identify the signaling network. Information of temporal dynamics of nodes and edges was not clarified. Signaling could be specific in each single neuron. However, our results would make sense as a preliminary approach at this time point and actually cast a light on the TRIAD network, a candidate model of neurodegeneration.

<Conclusion>

Collectively these results suggested involvement of RNA splicing and a regulatory role of the hnRNP-Htt axis in the process of the transcriptional repression-induced necrosis.

<和文要約>

本研究において、我々は選択的 Pol II 阻害剤α-amanitin による転写抑制性細胞死（TRIAD)のシグナルネットワークを、網羅的関連遺伝子スクリーニングを基盤として解析し、TRIAD の主要な分子経路を同定した。この際、ショウジョウバエの幼虫/成虫変態（PL ratio)を指標とし、遺伝子ノックダウンショウジョウバエライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。得られた候補遺伝子を蛋白質—蛋白質間相互作用データベースにマッピングし、システムズバイオロジーを用いて TRIAD におけるシグナルパスウェイを探索し、その中で中心的役割を果たす分子として hnRNPs や Htt を同定した。また、RNA シークエンス解析により、α-amanitin は hnRNPs の発現低下を介して ER 構造安定性関連分子である Htt の転写阻害・RNA スプライシング不全を生じることが明らかとなった。これら RNA スプライシング不全および PL ratio 変化は、Htt 同様に転写不全の影響を受ける hnRNPA を強制発現させると改善した。Htt や hnRNP の発現制御と PL ratio との関係については、発現を促進すればα-amanitin による PL ratio 減少を抑え、発現抑制に転ずれば PL ratio を悪化させた。以上の結果から、転写抑制性ネクローシスの過程には、RNA スプライシングおよび hnRNA-Htt axis が関わることが明らかとなった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5089　号	毛　瑩
論文審査担当者	主　査　石川　俊平 副　査　横田　隆徳、黒柳　秀人	

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

本論文は神経変性疾患における転写障害性細胞死（TRIAD)に対する hnRNP-Htt axis の役割に関するについての論文である。

2.　論文審査

1）研究目的の先駆性・独創性

申請者はすでに先行研究において同定していた神経変性疾患における転写障害性細胞死(TRIAD)について、それに関わるシグナル経路を同定するために、ショウジョウバエのスクリーニング系と、タンパク相互作用ネットワークの情報を用いて絞り込みを行った。そのアプローチは独創的で評価に値する。

2）社会的意義

本研究で得られた結果は、神経変性疾患に関わる神経細胞死のメカニズムに関するものであり、その疾患病理が未だ明らかでない神経変性疾患の診断・治療に資するものと考えられる。

3）研究方法・倫理観

申請者は、神経細胞における TRIAD のシグナル経路を明らかにするために、ショウジョウバエの蛹化率を指標として、スクリーニングを行った。既知の細胞死に関わる 93 遺伝子のノックダウンショウジョウバエを α-アマニチン入りの餌で飼育し、22 遺伝子のノックダウンで蛹化率の改善を認めた。22 個タンパク質をもとにタンパク質間相互作用（PPI）データベースにおける betweenness centrality analysis を指標として重要な役割を果たす因子を推定したところ hnRNPs, huntingtin (htt), PLK1 を同定した。またトランスクリプトーム解析により α-アマニチンは hnRNPs の発現低下を介して ER 構造安定性関連分子である Htt の転写阻害・RNA スプライシング不全を生じることを示し、逆に hnRNPA や Htt を強制発現させることにより α-アマニチンによる影響を改善することを確認した。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されたと考えられる。

4）考察・今後の発展性

本研究結果は、転写障害性細胞死（TRIAD)における hnRNP-Htt axis の役割を明らかにし、今後の神経変性疾患へのメカニズムの解明に発展可能と考えられる。

3. 審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	祖力皮亜　艾比布拉
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　関矢一郎、淺原 弘嗣
論　文　題　目	Xanthine oxidoreductase activation is implicated in the onset of metabolic arthritis

（論文内容の要旨）

Abstract

A metabolic syndrome (MetS) is accompanied by hyperuricemia, during which xanthine oxidoreductase (XOR) catalyzes the production of uric acid. In the cohort study, a correlation between uric acid concentration in the synovial fluid and osteoarthritis (OA) incidence is observed. The purpose of our study was to elucidate XOR function in terms of correlation between MetS and OA. Seven week-old male C57BL6J mice were fed normal diet (ND) or high fat diet (HFD) with or without febuxostat (FEB), a XOR inhibitor. HFD stimulated xanthine oxidase activity in the IPFP and the visceral fat. OA changes at the site of the knee joints had progressed due to HFD, but these changes were reduced upon FEB administration. IL-1β expression in the HFD group was increased in accordance with the enhancement of NLRP3 or iNOS expression in the IPFP, whereas it was inhibited by FEB administration. In the organ culture system, when the IPFP was stimulated with insulin, IL-1β expression was increased in accordance with the increase of NLRP3 expression; however, they were reduced by FEB administration. Based on the above results, we showed that inflammasome activation accompanied by an increase in XOR activity contributed to IPFP inflammation followed by OA progression.

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a common phenotype associated with an increased risk of cardiovascular disease and diabetes. Osteoarthritis (OA) is a common progressive joint disease characterized by articular cartilage destruction and osteophyte formation. Obesity and high body mass index are associated with a higher incidence of OA . Recent studies have revealed that a metabolic syndrome, rather than obesity itself, is implicated in the etiology of OA. However, the mechanisms underlying the correlation between metabolic syndrome and OA remain elusive.

The adipose tissue has been characterized as an active endocrine organ. Recently, the

endocrine function of the infrapatellar fat pad (IPFP), which is localized at a site outside of the synovium, has been implicated in the initiation and progression of OA. In a previous study, we showed that the murine IPFP secretes inflammatory cytokines within eight weeks of exposure to a HFD. In this model, the initiation of OA change, indicated by phenomena such as osteophyte formation and articular chondrocyte apoptosis, occurs in association with adipocyte hypertrophy and increased angiogenesis of the IPFP, suggesting that adipocyte hypertrophy is closely linked to osteophyte formation through the secretion of inflammatory cytokines.

In MetS, ATP was transiently consumed in conjunction with the intake of fat or sucrose, and excess nucleic acids generated were metabolized into uric acid by xanthine oxidoreductase (XOR), a rate-determining enzyme of uric acid metabolism, with simultaneous production of ROS. In vascular endothelial cells, XOR induced an abnormal inflammatory reaction via ROS, which caused cardiovascular disorders. Moreover, some reports show the correlation between uric acid concentration in the blood or the synovial fluid and OA incidence. A cohort study showed a positive correlation between the uric acid concentration in the synovial fluid and IL-1 or IL-18 concentration, and these concentrations showed positive correlation with progression of knee OA. These facts suggest possible roles for XOR in the maintenance of the articular cartilage through fat tissue metabolism. However, the precise role of XOR in OA pathogenesis is poorly understood. This study sought to investigate the involvement of

Materials and Methods

Animals Male C57BL6J mice were fed a diet containing 32% fat for the high fat diet group (HFD) or 4.8% fat for the normal diet group (ND) ,from the age of seven weeks. The half of the HFD mice were treated with febuxostat (5μg/ml in the drinking water).

Organ culture conditions

The IPFP were isolated from C57BL6J mice and cultured in 24-well plates in DMEM/F12 medium containing 10% FBS and and 1%GPS culture medium. After 24h incubation, the medium was replaced to 0.5%BSA in DMEM with or without 10nM insulin and with or without 200uM FEB. Thereafter, the total RNA was isolated after 24h treatment.

Assessment of OA severity

All the mice were sacrificed at twelve weeks after initiating the diet (n = 10).OA severity, scored with osteoarthritis research society international (OARSI) scoring. The protein expression of Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) was determined by immunohistochemistry. Apoptotic cells in the articular cartilage were detected by a TUNEL detection kit according to the manufacturer's instructions.

RNA extraction and real-time RT-PCR

The total RNA of the epiphyseal bones of the femora were excised as previously described. The IPFP tissue and the visceral fat tissue were excised using a surgical microscope and microsurgical technique at the previously indicated periods. The expression levels of IL-1β, NLRP3, TNF-α were evaluated by q-PCR analysis.

Results

The effect of an XOR inhibitor with a HFD on the body weight and histological findings of the femorotibial joints

First, the effect of HFD on the activity of xanthine oxidase (XO), a form of XOR, in the adipose tissues was evaluated. XO activity was significantly increased by three months of HFD both in the visceral fat and in the IPFP Next, to investigate the role of XOR in obesity-induced OA, male C57BL6J mice were fed a HFD or normal diet (ND) for three months starting at 7 weeks of age. Half the mice in HFD were administered the XOR inhibitor febuxostat, and the other half were administered the vehicle solution. All the mice fed the HFD weighed 20% more regardless of FEB administration after twelve weeks on the diet

Histological analysis of the knee joints

After 12 weeks of the diets, the knee joints were histologically investigated. When HFD was applied to the mice, the histological features of OA, such as attenuated Safranin-O intensity and the irregularity of the joint surface, were observed in HFD/vehicle mice, whereas the OA change was attenuated in HFD/ FEB mice. The OA severity based on OARSI score indicated HFD/FEB mice scored lower compared to HFD/vehicle group.

The osteophyte formation and synovial tissue hypertrophy

The osteophyte formation was enhanced at the in HFD/vehicle mice, but not in HFD/FEB group. These findings suggested inflammation of synovium in association with osteophyte formation triggered by HFD was attenuated by FEB.

Immunohistological analysis for OA markers

The expression of MMP-13, a matrix protease implicated in the OA process, was significantly increased at the articular cartilage in HFD group compared to control group. FEB administration suppressed the expression of this OA marker. These observations support the notion that FEB attenuates OA change in articular cartilage.

Chondrocyte apoptosis

TUNEL-positive cells were abundant among the chondrocytes present in HFD/vehicle mice. In contrast, TUNEL-positive cells were rare in joints following FEB administration. The number of TUNEL-positive chondrocytes in joints of HFD/FEB group was significantly reduced compared to HFD/vehicle group ($P < 0.05$). These data indicated that the anti-apoptotic effect of FEB functions to protect the articular cartilage.

mRNA profiles in the fat tissues

mRNA expression levels of inflammatory cytokines in the visceral fat and the IPFP at sacrifice. Whereas the mRNA levels of TNF-α and IL-1β were increased by HFD in the visceral fat and the IPFP, FEB administration canceled these effects of HFD. Simultaneously, NFRP3 was increased in HFD group, but not in HFD+FEB group. To investigate the role of XOR in the IPFP, cytokine expression was examined in the organ culture system of the IPFP. When the IPFP was stimulated by insulin, mRNA expression of IL-1β was enhanced in association with the enhancement of NFRP3. However, FEB treatment attenuated the effect of insulin. These results indicated FEB inhibited the IPFP inflammation through inflammasome inactivation.

DISCUSSION

Despite the differences between the purine metabolism of humans and mice, here we revealed the roles of XOR in the etiology of metabolic syndrome-induced osteoarthritis. First, XOR inhibitor suppressed the expression of inflammatory cytokines in the visceral fat and the IPFP. Second, enhanced inflammation of the IPFP was associated with accelerated OA progression, including cartilage surface irregularity, increased osteophyte formation, and increased expression of MMP-13 in HFD mice. FEB treatment blocked these alterations in the knee joints. The adipokines secreted from the fat tissues are reported to be involved in the pathogenesis of metablic syndrome-induced OA. However, XO may be one of the relevant factor in this process, as FEB treatment clearly blocked OA change induced by HFD in this study. In conclusion, our results provide clues that XOR inhibitor prevents articular cartilage degradation and IPFP inflammation caused by metabolic syndrome. These results support a potential therapeutic application of XOR inhibitor in human OA.

＜要旨＞

変形性関節症（OA）はメタボリックシンドローム（MetS）の一症候として位置づけられる。メタボリックシンドロームは高尿酸を伴うが、尿酸は、キサンチンやヒポキサンチンのようなオキシプリンからキサンチンオキシダーゼ（XOR）によって合成される。血中や関節液中の尿酸濃度と OA 発生率の相関が認められ、尿酸コホート研究では、関節液中の尿酸濃度と IL-18 濃度は正の相関を示し、これらの濃度は膝 OA の進行度と正の相関を示す。以上から尿酸代謝と OA 発症が関連する可能性が示唆されるが、そのメカニズムは不明である。メタボリックシンドロームに伴う変形性膝関節症モデルとして、C57BL/6J マウスに高脂肪食（HFD）を与えることによって給餌開始後 2 カ月以降に変形性膝関節症を惹起（HFDOA モデル）することに成功した。このモデルでは HFD 群において膝蓋下脂肪体の肥大、炎症に伴い骨棘形成、関節軟骨変性の進行、及び IPFP における IL-1β の発現が増加したことが示された。FEB 投与によって抑制された。本研究の目的は、このモデルを用いて MetS と OA の関連における XOR の機能を XOR 阻害剤であるフェブキソスタット（FEB）の関節内投与により解明することである。

＜方法＞

生後 7 週雄 C57BL6J マウスを通常食群、高脂肪食群（HFD 群）に分類した。それぞれ半数に XOR 阻害剤のフェブキソスタット（FEB）5ug/ml を飲水投与した。飼養開始後 3 ヵ月後に屠殺し、膝関節の組織解析を行った。膝蓋下脂肪体（IPFP）を採取し qPCR にて炎症性サイトカイン、アディポカインの発現を解析した。組織培養では C57BL6J マウスの IPFPs を培養し、細胞を 10nM のインスリンで刺激をしたが、又は 200nm フェブキソスタットなしで処理した。免疫組織化学では MMP-13 の抗体を使用してタンパク質発現を検査した。TUNEL キットを使用して関節軟骨におけるアポトーシス細胞は、検出した。

＜結果＞

HFD におけるキサンチンオキシダーゼの活性を検証した結果では、 XO 活性が内臓脂肪および IPFP の両方で増加した。HFD によりマウスの体重は約 20%増加し、FEB 投与は体重増加に影響を与えなかった。膝関節では HFD により骨棘形成、滑膜増殖、関節軟骨の OA 変化は進行したが、FEB 投与によってこれらの変化は軽減した。TUNEL 染色では HFD 群において陽性細胞が増加したが FEB 投与により著しく減少した。免疫組織化学では HFD における増加した MMP-13 の発現が FEB 投与により抑制された。IPFP における IL-1β,iNOS,インフラマソームである NLRP3 の発現は HFD 群にて増加したが、FEB 投与によって抑制された。

＜考察と結論＞

血管内皮細胞では活性酸素を介した異常な炎症反応が XOR によって惹起されることから、膝関節においても HFD によって惹起された IPFP の炎症に XOR 活性増加が寄与した。XOR 阻害剤である FEB は、内臓脂肪と IPFP における炎症性サイトカインの発現を抑制された。HFD マウスにおける IPFP の炎症が骨棘形成、関節軟骨変性が進行したが、FEB 投与によって抑制された。我々の結果は、XOR 阻害剤である FEB は、メタボリックシンドロームによって惹起された関節軟骨変性の進行と IPFP 炎症を予防する可能性が示唆された。本研究にて XOR が OA 制御の新たなターゲットとなり、OA 発症を標的とした新たな治療指針の確立が期待できる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5090　号	祖力皮亜　艾比布拉
論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　関矢一郎、淺原 弘嗣	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

マウスの High Fat Diet (HFD) osteoarthritis (OA) model を用いて、xanthine oxidase (XOR) inhibitor が fatty inflammation を抑制し、OA の進行を制御することを示した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

高尿酸血症の治療薬として広く用いられている XOR inhibitor が OA の進行を抑える可能性を示唆する独創的な研究である。ヒトにおける高尿酸血症と膝 OA の進行には正の相関が報告されている。今後 DMORDs（OA の自然経過を改善する可能性のある薬剤）としての XOR inhibitor の有効性を検討する意義を示唆する研究である。

２）社会的意義

超高齢化社会における大きな問題である OA による生活の質の低下の制御は世界的な課題である。DMORDs の開発は世界的なニーズであり、本研究の示唆する XOR inhibitor が DMORDs の可能性を有することを示す意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

本学動物実験倫理審査に則り、マウスを用いた確立したモデルを用いた研究である。7 週齢のマウスに 12 週間 HFD を与え OA モデルとした。膝蓋下脂肪体（IFP）や軟骨、脛骨前方の組織学的検討により、炎症や軟骨表層の apoptosis、深層の MMP13 の高発現を HFD 群で認め、それらの滑膜炎と OA の所見が XOR inhibitor により改善することが示された。さらに IFP を用いた organ culture system を用いて IL-1 や iNOS, NLRP3 inflammasome の変化が XOR inhibitor の添加により抑制されることを示した。

４）考察・今後の発展性

ヒトの資料を用いた XOR inhibitor の OA の進行に対する効果の検討や、さらにヒトを対象とした効果判定の研究により XOR inhibitor の DMORDs としての価値を検証すべき可能性がある。

３．その他

本モデルにおける OA の程度が軽いこと、長期的な変化が明らかでないことなど、研究の意義の大きさに対する疑問が残る。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	加茂　実武
論文審査担当者	主査　植竹　宏之 副査　星　治、藤井　靖久
論　文　題　目	Kinking of the upper ureter in CT urography: anatomic and clinical significance

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

従来から、尿管は腎臓と膀胱をつなぐ後腹膜を真っ直ぐに下降する構造として認識されてきた。しかし逆行性尿路造影や CT urography などの放射線画像において、上部尿管がちょうど同側の性索静脈を交差する領域近傍で高度の屈曲を呈している症例にしばしば遭遇する。本研究の目的は、この上部尿管の「屈曲」の頻度、位置および程度を把握し、その臨床解剖学的意義を検証することである。はじめに尿路精査目的に施行された CT urography 画像、連続 176 症例について後方視的に検討を行った。画像上有意な「屈曲」は右側で 18.4%、左側で 21.8 %に認められ、全ての場合において「屈曲」は尿管と性索静脈の交差部（Crossing point: CP と定義付けする）よりも頭側に位置していた。続いて 7 解剖実習体、14 側の標本を対象に、尿管およびその周囲構造との関連に関して肉眼解剖学的評価を行った。尿管は腎周囲脂肪体を通過する領域においては比較的可動性を有する一方、それより尾側では大腰筋の前内側に強固に固定されており、その固定の上端はほぼ CP のレベルと一致していた。本研究から、上部尿管の「屈曲」は放射線画像においてしばしば認められる正常所見であり、それは尿管の後腹膜における固定の程度の差によって生じることが明らかとなり、尿管が固定される境界を認識するメルクマールとして CP が有用であることが明らかとなった。

＜序論＞

ほぼすべての解剖学成書において尿管は後腹膜を真っ直ぐに下降する構造として描かれている。しかし、日常診療において頻繁に行われる逆行性尿路造影や CT urography において、しばしば高度の「屈曲」を認識することが出来、それはちょうど同側の性索静脈と交差するレベルに相当する(Fig. 1)。一方、従来から尿管の生理的狭窄部として腎盂尿管移行部、腸骨動静脈交差部および膀胱尿管の 3 か所が広く知られているが、近年 CT 画像を用いた尿路結石の研究において尿路結石嵌頓のひとつのピークが上部尿管レベルにあるとする報告が複数なされた。我々は、この「屈曲」が生じ、また結石嵌頓の好発部位となり得る上部尿管に、何らかの共通の解剖学的背景が存在するのではないかという仮説をたてた。本検討の目的は、「屈曲」の頻度、位置、程度を CT urography 画像を用いて評価し、その臨床解剖学的意義を肉眼解剖学的知見と併せて検証す

ることである。

＜対象と方法＞

聖路加国際病院において 2014 年 4 月より 2015 年 3 月にかけて施行された排泄相を含む腹部骨盤部造影 CT 検査（CT urography）、連続 176 症例を対象に後方視的に評価を行った。検査施行目的の内訳は、血尿精査（n=95）、その他の検査機器にて疑われた尿路悪性腫瘍の検索（n=31）、膀胱癌の治療前評価（n=24）、膀胱癌に対する TURBT（Transurethral resection of bladder tumor）後のフォロー（n=23）、腎移植前（ドナー）の評価（n=3）であった。除外項目は、尿路先天性奇形、悪性腫瘍等の上部尿路異常、腎盂尿管移行部ないし上部尿管の結石、腹部骨盤部の開腹/腹腔鏡等の手術の既往とした。CT urography においてみられる上部尿管の「屈曲」を軽度/なし（Grade 1）、中等度（Grade 2：水平の部分を含む）、高度（Grade 3：逆行する部分を含む）の 3 段階に分類（Fig. 2）、中等度以上を有意な「屈曲」と定義した。尿管が同側の性索静脈を交差するレベルを CP：Crossing point と定義付け、「屈曲」との位置関係およびその椎体レベルに関しても評価を行った。CT 画像の評価は、放射線科診断専門医 2 名による合議で決定した。

続いて、東京医科歯科大学解剖学実習用の 7 解剖体、14 側の標本に関して、腹腔内臓器を除去後に前方より切り出し、上部尿管の走行および周囲組織との関連について肉眼的観察を行った。また性索静脈と尿管の関係についても併せて評価を行った。

「屈曲」の程度の左右差の判定に chi-square test、CP の椎体レベルの左右差の判定に paired t-test、「屈曲」の程度と椎体レベルの相関の有無の判定に one-way ANOVA を用いた。

＜結果＞

CT urography を試行した 176 症例中、左右それぞれ 2 症例で尿管ないし性索静脈の同定が困難であり、除外対象とした。上記に示した分類により、上部尿管の「屈曲」の程度は、右側で Grade 1：81.6%、Grade 2：9.8%、Grade 3：8.6 %、左側で Grade 1：78.2%、Grade 2：15.5%、Grade 3：6.3%の結果となった（Table 1、Fig. 3）。「屈曲」の程度に有意な左右差は認められなかった。また、両側ともすべての「屈曲」は CP と同じレベル、あるいはその頭側のレベルで認識された。CP の椎体レベルは右側で有意に低位であった（Fig. 4）。「屈曲」の程度と CP の位置に相関は見られなかった。

解剖体の観察では、尿管は腎周囲脂肪体を通過するレベルでは相対的に可動性を有する一方、その尾側では大腰筋の筋膜内側前方でより強固に固定されていた。尿管が強固に固定されている上端のレベルが、尿管が性索静脈と交差するレベル、すなわち CP とほぼ一致していた（Fig.5）。この固定が強固な領域において、尿管の血管支配および神経支配は相対的に疎であり、この頭側、即ち腎周囲腔の領域においては腎門部から、尾側においては腸骨動静脈領域から血流および神経支配が主に分布していた。

＜考察＞

尿管は、両側の腎臓と膀胱の間をつなぐ長い管状構造である。膀胱が骨盤内に固定された臓器

である一方、腎臓は横隔膜直下に位置し、呼吸等の生理的運動等に伴って、あるいは加齢性変化に伴う腰椎の変形性変化などの生理的変化に応じて、その位置を大きく変化させる。それ故、尿管はこれらの可逆的あるいは不可逆的な腎臓の移動に対応するように常にその長さを調節することが強いられている。

従来、尿管の画像学的評価として逆行性尿路造影が用いられてきたが、現在はより詳細かつ多面的な評価が可能な CT urography が広く施行されている。これら 2 種類の検査の相違点のひとつとして撮像するタイミングが挙げられる。つまり、前者は呼気時、後者は吸気時に撮影されることが一般的であり、従って CT urography では腎臓が下降した状態での画像が得られることが多い。

今回の CT urography 画像の検討において、上部尿管の「屈曲」は稀な所見ではなく、それは常に CP あるいはそのすぐ頭側のレベルの尿管で生じることが明らかとなった。また、解剖体の観察では尿管は腎周囲腔を通過する領域では比較的可動性を有する一方、その尾側では大腰筋の前内側面に強固に固定されていることが明らかとなった。これらのふたつの結果を併せると、上部尿管の「屈曲」は腎臓が下降した際に尿管がその長さを調整することによって生じる所見であるという推察が得られる。つまり、より可動性を有する腎周囲腔領域の尿管が‘たるむ’ことによって生じる所見と考えられる（Fig. 6）。この‘たるみ’は、血管造影時や逆行性尿路造影時など尿管の動的変化が評価可能な検査においてもしばしば観察することが出来る（Fig. 7）。また CP は、その尿管の固定がより強固となる上端のメルクマールとして認識出来ることが明らかとなったが、その発生解剖学的理由に関しては明らかではない。今回の検証において、尿管の「屈曲」の頻度に有意な左右差は認められなかった一方、CP の椎体レベルは有意に右側で低位であった。これは一般に腎臓が右側でより低位に位置することが多いのと関連していると示唆される。尿管の固定も右側でやや低位な可能性がある。また、尿管の「屈曲」の程度と CP の椎体レベルに有意な相関は認められなかった。

日常診療において、腎盂尿管移行部より少し下流の上部尿管に嵌頓する結石にしばしば遭遇する（Fig. 8）。また近年の CT 画像を用いた尿路結石嵌頓の位置を検証した報告においても、上部尿管のレベルに結石嵌頓の好発部位があるとしているが、その理由に関する検討や記載は非常に限られる。我々はこの結石嵌頓を生じる領域が、今回の検証における CP の近傍、即ち尿管の固定がより強固になる領域に合致すると考えており、上部尿管の「屈曲」が観察されるそのすぐ尾側に位置すると推察している。

本研究の問題点について補足する。今回の検証において CT urography を撮像したのは正常群ではなく、尿路に何らかの異常がある患者ないし何らかの異常が疑われた患者である。また尿管は呼吸等の生理的運動のみならず、尿管そのものにも尿を膀胱に運ぶべく蠕動運動を有し、CT urography で得られた画像はあくまでその動きの一点のみを捉えたものである。こういった事項は今回の結果の評価にあたって与すべき事項である。また、結石嵌頓の位置と尿管の屈曲ないし CP との関連に関しては、今回の検証事項とはしておらず、今後の追加研究が望まれる。

＜結論＞

本研究により、上部尿管の「屈曲」は、CT urography においてしばしば認められる正常所見

であることが明らかとなった。これは、より可動性を有する腎周囲腔を通過する領域の尿管が、‘たるむ’ことによって生じる所見であり、その尿管の固定がより強固となる上端のレベルは、CP を観察することで推測することが出来る。同領域が結石の潜在的な嵌頓部位、即ち上部尿路の新たな生理的狭窄部位の概念として提唱出来る可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5091　号	加茂　実武

論文審査担当者	主　査　植竹　宏之 副　査　星　治、藤井　靖久

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、尿管の屈曲の解剖学的意義、臨床的意義についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

尿管は後腹膜をまっすぐ下行することが大半だが、時に屈曲することがある。その部位や隣接臓器との関係（解剖学的特徴）や尿管結石の嵌頓との関係（臨床的意義）はこれまで不明であった。筆者はこれらについて CT 画像を用いて解析しており、先駆性、独創性がある。

２）社会的意義

本研究得られた結果は

① CT urography 上, 有意な尿管の屈曲は右側で 18.4%, 左側で 21.8%に認められ, その全例において屈曲は精巣/卵巣静脈との交差部よりも頭側に位置していた。

② 解剖体では, 尿管が強固に固定されている上端のレベルは, 尿管が同側の精巣/卵巣静脈と交差するレベル（CP: Crossing point）とほぼ一致していた。

である。尿管結石はしばしば CP 近くに嵌頓することが知られており、これが生理的狭窄部、ひいては尿管の屈曲に至る可能性がある部分として認識されることは臨床的意義が極めて大きい。

３）研究方法・倫理観

本研究はCT画像のRetrospectiveな解析と解剖実習体による検討を用いて行われた。すなわち、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

今後は結石嵌頓症例の画像を解析し、上記の生理学的屈曲部位（CP 付近）での嵌頓が実際に多いことを証明すれば、臨床的にはさらに有用となるだろう。

３．その他

特記事項無し

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	植島　大輔
論文審査担当者	主査　立石　宇貴秀 副査　根本　繁、井上　芳徳
論　文　題　目	Popliteal Retrograde Approach is Effective and Safe for Superficial Femoral Artery Chronic Total Occlusion

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

浅大腿動脈完全閉塞に対する血管内カテーテル治療(Endovascular treatment: EVT)において膝窩動脈逆行性穿刺によるアプローチは時に有用であるが、その有効性と安全性の評価は確立していない。我々は 2008 年から 2013 年にかけて 3 施設で施行した 324 例の連続した EVT において浅大腿動脈完全閉塞を含む 91 件で「膝窩動脈穿刺を行った群：(with popliteal approach: WPA)」と「膝窩動脈穿刺を行わなかった群(without popliteal approach: WOPA)」の比較対象試験を行った。

高血圧併発率(WPA, 88.9% vs. WOPA, 69.1%; p = 0.04)、血管完全閉塞長＞200mm の率(55.6% vs. 28.3%, respectively; p <0.01)は WPA 群で高かった。一方初期成功率は WPA 群で有意に高かった(97.2% vs. 78.2%, respectively; p <0.01)。 全合併症率、重大合併症率は両群間で差がなかった。

膝窩動脈アプローチにシースを用いた群と、シースを使用せず、さらに細い microcatheter を用いた群を比較したが、両群間に成功率(95.5% vs. 100%, respectively; p = 0.61、合併症率(22.7% vs. 14.2%, respectively; p = 0.53)の差はなかった。

浅大腿動脈完全閉塞に対し膝窩動脈アプローチは初期成功率向上に寄与した。

＜緒言＞

浅大腿動脈完全閉塞に対する EVT の初期成功率は 2001 年には 75%程度であったが 2014 年は 81-94%に飛躍的に改善している。浅大腿動脈へのカテーテル治療は一般的には順行性アプローチで行う。すなわち患側の総大腿動脈を血流に対して順行性（足の基部から足先に向かう方向）に穿刺するか、健常側の総大腿動脈を逆行性（足の基部から体幹に向かう方向）に穿刺し総大腿動脈分岐部を介し患側の浅大腿動脈に到達する方法がとられる。Tonnesen らが初めて膝窩動脈を穿刺した例を報告しているが、初期は膝窩動脈部位を穿刺するのに手術台上で患者を腹臥位とし、穿刺後仰臥位に体位変換するという方法がとられており手間を要するだけでなく、動脈解離、動脈穿孔、仮性瘤、血腫などの多くの合併症が報告されており、一般化しなかった。しかしその後、仰臥位での膝窩動脈穿刺法、穿刺後 3Fr のシースを用いる方法(従来は 4-6Fr のシースを用いてい

た)などにより膝窩動脈穿刺は徐々に一般的になりつつある。

本研究は膝窩動脈穿刺の有効性と安全性を初期成功率と穿刺にかかわる合併症を比較することで評価した。また穿刺後シースを用いず、さらに細い microcatheter のみ用いる方法を初期成功率と穿刺合併症の観点から評価した。

方法

2008 年から 2013 年にかけて 3 施設で行った全 EVT のうち浅大腿動脈の完全閉塞を含むものを検討した。新規病変のみを検討し、再治療は除外した。また急性閉塞も除外した。症例は「膝窩動脈穿刺を行った群：(with popliteal approach: WPA)」と「膝窩動脈穿刺を行わなかった群 (without popliteal approach: WOPA)」に分け、初期成功率と合併症発生率について検討した。また膝窩動脈アプローチに microcatheter をシースの代わりに用いる手技についても初期成功率と合併症率を検討した。

本研究は観察研究であるため治療に対し介入は行わなかった。抗血小板薬はアスピリン、チクロピジン、クロピドグレルのうち 1−3 剤が使用されており、シロスタゾール、またはサルポグラレートの併用が推奨された。治療前に禁煙と 30 分以上の運動療法を命じ、それによって症状が 2 ヶ月以上改善しない患者を治療対象としたが間欠性跛行以上のより重篤な病態を有する場合は結構再建術を優先的に行った。血行再建術に EVT を選択するか外科手術を選択するかは各施設の判断に任されていたが、Rutherford 分類 6 以上の重篤な下肢虚血に対しては手術が推奨された。術式はすべて術者の判断によって決定されていたが、一般的には後述の通りだった。総大腿動脈穿刺により 4.5−6Fr のシースを挿入し順行性アプローチを行った。穿刺後 5000−8000 単位のヘパリンが投与され、0.014 または 0.018 インチのワイヤーで完全閉塞部通過が試みられた。膝窩動脈穿刺が加えられた 36 例のうち 33 例では術前に膝窩動脈穿刺を行うことを決め、術開始直後に穿刺が行われた。残りの 3 例では順行性アプローチのワイヤーが操作不能となった段階で術中に膝窩動脈穿刺が追加された。膝窩動脈穿刺の方法は①手術台の上でまず患者を腹臥位とし膝窩動脈を 22 ゲージの穿刺針で穿刺、ガイドワイヤーを挿入した後シースもしくは microcatheter を挿入した段階で体位変換を行い仰臥位に戻し手技を継続する方法、②仰臥位のまま患側の下肢を挙上しエコーや透視ガイド下で膝窩動脈を下方から穿刺する方法　のいずれかが取られた。術中に膝窩動脈穿刺が加えられた 3 例は後者の方法で穿刺がなされた。

187 名に対し 324 例の EVT が行われ、91 例の浅大腿動脈完全閉塞を伴う症例について検討を行った。36 例で膝窩動脈穿刺がなされ(WPA 群)、55 例は膝窩動脈穿刺がなされなかった(WOAP 群)。膝窩動脈穿刺でシースが使われたのは 22 症例で、microcatheter 群は 14 症例だった。
合併症は重大合併症とそれ以外に分けて検討され、重大合併症は輸血を要する穿刺部出血、止血に手術を要したもの、2 日以上の自発痛を伴ったものと定義した。初期成功は治療後の血管造影で遅延造影がないものと定義した。

＜結果＞

膝窩動脈穿刺を試みたもののすべてで穿刺に成功した。初期成功は WPA 群で 36 例中 35 例、WOPA 群で 55 症例中 43 例だった。患者群の年齢は平均 70 歳、BMI は 22kg/m2、重症虚血肢

は 30%で見られ約 15%が透析を受けていた。完全閉塞の病変長は WPA 群で有意に長かった(<50mm; WPA 群 0%, WOPA 群 15.1%, >200mm; WPA 群 55.6%, WOPA 群 28.3%)。薬物治療は両群間で類似しており、スタチンと ACE-I/ARB は 50%、シロスタゾールは 60%、アスピリンは 70−80%、チクロピジンは約 20%の症例で使用されていた。ステント使用率や使用したステント、バルーン最大径に差はなかった。

穿刺による全合併症発生率(WPA, 13.9% vs. WOPA, 23.6%; p = 0.29) と重大な合併症発生率(WPA 2.8 vs. WOPA, 5.5; p = 0.48)に両群間で差はなかった。初期成功率では WPA 群で優位に高かった(97.2% vs. 78.2%, respectively; p <0.01)。手技時間と透視時間は WPA 群でやや長かったが有意差は認めなかった。各合併症の詳細を表に示したが、3 例が純粋に膝窩動脈穿刺による合併症だった(1 例は重大な合併症で 2 例は重大な合併症ではなかった)。全体として 4 例の重大な合併症を経験し、1 例は WPA 群、3 例は WOPA 群だった。死亡や下肢切断に至った合併症はなかった。

膝窩動脈穿刺に Microcatheter を使用した群とシースを使用した群の比較では初期成功率は共に高かった(シース群 95.5%、microcatheter 群 100%, p=0.61)。シース群では 1 例で輸血を要した穿刺部出血を経験し、4 例で重大でない合併症が生じた。Microcatheter 群では重大な合併症は経験しなかったが 2 例の重大でない合併症を経験した。両群間で成功率と合併症発生率に有意差はなかった。

＜考察＞

本研究は浅大腿動脈完全閉塞に対する EVT における膝窩動脈穿刺によるアプローチは有効かつ安全であることを示した。また膝窩動脈穿刺は手技として簡便で、本研究中の穿刺成功率は 100%だった。膝窩動脈穿刺により生じた合併症はわずかで、いずれも重篤なものではなかった。膝窩動脈穿刺を加えた群での手技成功率は非常に高く、不成功に至ったのはわずか 1 例だった。浅大腿動脈完全閉塞へワイヤーを通す手技として 1.5mm の親水性コーティングワイヤーを J の形とし、完全閉塞部位を鈍的に穿通させていく方法もあり、ワイヤーは動脈の偽腔を通るものの通過時間の短縮が得られ、再閉塞の確立は血管真腔を通したものと同等であると報告されている。しかし本研究中我々は全症例で 0.014 または 0.018 インチのワイヤーを用い、すべて血管真腔を通すよう試みた。海外では偽腔に入ったワイヤーを真腔に戻すさまざまなデバイスが使用可能だが、本邦では使用でないことから偽腔を広げることで閉塞末梢端で健常部まで傷つけてしまう可能性があると考えた。健常部に傷をつけないためには完全閉塞部に両方向性にワイヤーを挿入できる膝窩動脈穿刺などの方法が特に本邦では有用であると考える。従来の膝窩動脈穿刺は患者を一度腹臥位にする手間を要したが、近年は仰臥位のまま穿刺する下肢を挙上することで膝窩動脈を穿刺する方法が考案されている。この方法だと腹臥位にする手間が省けるだけでなく、一方向からのワイヤー通過が困難なケースで術中に後から膝窩動脈穿刺を追加することができる。このような理由から我々は好んで膝窩動脈の直接穿刺を行っている。膝窩動脈にシースを挿入する方法と microcatheter のみを挿入する方法で合併症発生率に有意差はみられなかったが、シース挿入群で数例の重篤な合併症を経験しており、また両群とも初期成功率が同等なことから止血の簡便さを加え microcatheter のみの使用を推奨したい。

近年の報告で浅大腿動脈完全閉塞に対するカテーテル治療は非常に高い初期成功率が得られているが、依然閉塞性動脈硬化症患者の予後は悪い。本研究でもスタチンや ACE-I/ARB の処方率は低かった。治療にあたっては全身血管管理に重点を置いた治療を心掛ける必要があると考える。本研究は多くの limitation がある。後ろ向き観察研究かつ症例数が十分でないこと、またわずか 3 施設の研究結果であることから EVT の手技上の特徴や薬物治療は偏りがあると思われる。シロスタゾールの処方率が低いことや運動療法を行うセンターがないことが不必要な治療や予後悪化に至っている可能性がある。また本研究は介入研究でないことから術者の判断に多分に影響を受けていると考えられる。

本研究では、特に合併症を詳細に示した。これは膝窩動脈穿刺を行うにあたり有用な情報であると考える。

＜結論＞

浅大腿動脈完全閉塞に対する EVT において膝窩動脈穿刺は有用であり、明らかに高い初期成功率が得ら、重大な合併症はほとんど生じなかった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5092　号	植島　大輔
論文審査担当者	主　査　立石　宇貴秀 副　査　根本　繁、井上　芳徳	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、浅大腿動脈完全閉塞に対する血管内カテーテル治療(Endovascular treatment: EVT)において膝窩動脈逆行性穿刺によるアプローチの有効性と安全性の評価について後方視的に検討した論文である。「膝窩動脈穿刺を行った群：(with popliteal approach: WPA)」と「膝窩動脈穿刺を行わなかった群(without popliteal approach: WOPA)」の比較対象試験により、高血圧併発率、血管完全閉塞長＞200mm の率は WPA 群で有意に高く、一方、初期成功率は WPA 群で有意に高い結果であった。浅大腿動脈完全閉塞に対し膝窩動脈アプローチは初期成功率向上に寄与することが示唆された臨床的に有用性の高い研究成果である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

浅大腿動脈完全閉塞に対する EVT の初期成功率に関しては以前より諸家の報告がなされてきているが、順行性アプローチで行うものが主であり、健常側の総大腿動脈を逆行性（足の基部から体幹に向かう方向）に穿刺し総大腿動脈分岐部を介し患側の浅大腿動脈に到達する方法が採用される場合もある。しかし、膝窩動脈を穿刺した場合の EVT の初期成功率に関する検討結果はまとまった報告はなく、本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

浅大腿動脈完全閉塞に対する血管内カテーテル治療(Endovascular treatment: EVT)において「膝窩動脈穿刺を行った群：(WPA)」と「膝窩動脈穿刺を行わなかった群(WOPA)」の比較対象試験により、初期成功率は WPA 群で有意に高い結果であった。順行性アプローチ、あるいは、健常側の総大腿動脈を逆行性（足の基部から体幹に向かう方向）に穿刺し総大腿動脈分岐部を介し患側の浅大腿動脈に到達する方法が採用されたとしても十分な初期成功が望めない場合には、積極的に膝窩動脈アプローチを採用することで手技施行時間の短縮が図られるため、リスクのある患者にも安全に施行できる可能性が高い。今回の検討では、透析を施行している腎不全患者は多く含まれていないが、浅大腿動脈完全閉塞の EVT では検査時間が短く造影剤の使用を必要最小限にする工夫が望まれている。当手法ではそのような合併症を有する患者群にも適応できる可能性を有しており、その社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

浅大腿動脈完全閉塞に対する血管内カテーテル治療(EVT)において「膝窩動脈穿刺を行った群：(WPA)」と「膝窩動脈穿刺を行わなかった群(WOPA)」の比較対象試験であり、全例十分な術後の経過観察が施行されている。単施設での症例集積は困難であるため、多施設共同で患者をリクルートし治療を行い、データを抽出しているため、患者負担を軽減するために必要最小限の検査にとどめられるよう十分配慮されている。得られたデータを評価し再現性のある結果を導き出している。

４）考察・今後の発展性

浅大腿動脈完全閉塞に対する血管内カテーテル治療を行ったあとの症状変化をモニターし、リハビリテーションによる補助治療が十分なされることが予後を見ていく上で重要である。治療後血管の開存性はエコー検査などを適宜行うことで非侵襲的に評価が可能である。膝窩動脈穿刺による脛骨神経へのダメージが原因となり、筋萎縮をきたす可能性も考えられるが、MRI などによる筋萎縮の有無を評価し臨床症状と照らし合わせていく必要がある。

３．その他

特記事項なし。

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は本学博士の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	国分　貴徳
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　秋田　恵一、柳下　和慶
論　文　題　目	Effect of Changing the Joint Kinematics of Knees With a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a Rat Model

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

膝前十字靭帯（Anterior Cruciate Ligament: 以下 ACL）は、膝関節の関節包内という特殊な環境下に存在し、自己治癒能が低いことから、完全損傷では自己治癒しないとされてきた。今回、メカノバイオロジーの概念を背景に ACL 損傷後の関節不安定性に着目し、損傷により生じる異常な関節運動が、ACL の自己治癒能に影響を及ぼしていると仮説を立てた。そのため、異常な関節不安定性を制動することが ACL の損傷後治癒反応の正常化あるいは促進に繋がるのではと考え、実験動物を対象として研究を行った。結果として組織学的分析により、ACL 損傷後介入せず自由飼育とした群と比較し、ACL 損傷後の異常運動を制動した群では、損傷後 1 週時点から治癒に向かう反応が観察され、損傷後 2 週目時点では断端部の再接合が観察された。この時、治癒に向かう ACL 断端においては、靭帯損傷後の治癒に関連するいくつかの遺伝子で mRNA レベルの発現量が増加し、細胞外マトリックス分解酵素である MMP などの治癒を阻害しうる因子では発現の亢進が抑えられていた。また、損傷後 8 週目時点における治癒靭帯の破断強度は、正常な同靭帯の 50%程度まで回復していた。本研究結果より、ACL 損傷後の関節内においては、損傷に伴う関節の異常運動という関節キネマティクスが関節内組織の治癒に影響を及ぼしている可能性が示唆され、関節運動を介したメカノバイオロジーの概念が、ACL 損傷後の治癒反応に影響を及ぼしている可能性の一端を明らかにした。

＜諸言＞

ACL は、膝関節運動における安定性に寄与しており、損傷により膝関節は安定性を喪失し、日常生活動作にも影響を及ぼすため、一般的には自家腱を用いた外科的再建術が行われる。これまで、多くの研究において ACL 損傷後の治癒反応について報告されており、他の靭帯と比較して細胞活性が低いことや scaffold（鋳型）が存在しないこと、関節内という特殊な環境下に存在するため、損傷断端が関節液中にさらされ、損傷からの治癒に向かう上で重要な clots（血餅）が洗い流されてしまうことなど、自己治癒に至らない多くの要因が挙げられてきた。しかし、これら多くの研究は ACL 損傷後の関節内環境に関してのみ注目してきているが、関節外からの影響、すなわち ACL 損傷に伴い大きく変化する関節キネマティクスが損傷靭帯の治癒に及ぼす影響に

ついてはこれまで注目されてこなかった。同じ膝関節の周囲靭帯で、ACL 以上に損傷頻度が高いとされる内側側副靭帯（Medial Collateral Ligament：以下 MCL）と ACL の損傷後治癒反応を比較した Woo らの報告では、MCL は自己治癒するが ACL は治癒しない要因として、MCL 損傷後に失われる関節の安定性（外反動揺）は ACL により補償しうるが、ACL 損傷後に生じる前方への動揺性についてはどの組織も代償しえないことを理由として挙げている。すなわち、ACL 損傷後の膝関節では、他の組織損傷と比較して、制動しえない異常な関節運動が惹起されることを意味しており、このことが関節内組織損傷における治癒反応に影響を及ぼしている可能性は否定できない。

近年、生体へのメカニカルストレスが、生体内でバイオロジカルな反応に置換され、様々な組織の恒常性維持や、損傷からの治癒に影響することが明らかとなってきている。関節内といういわば閉鎖された空間内における組織損傷においても、この関節包外からのメカニカルな要因の変化が、メカノトランスダクション機構を介して関節内組織の状態に影響を及ぼしていることは想像に難くない。

以上の背景をふまえ、本論文では ACL の損傷後に生じる異常な関節キネマティクスが、損傷した ACL の治癒反応に影響を及ぼしている可能性を探索し、その一端を明らかにした。

＜方法＞

Wistar 系雄性ラットを対象とし、ACL 損傷後に膝関節に生じる異常な脛骨の前方引き出し運動を関節包外で制動した群（Controlled Abnormal Movement : CAM 群）をオリジナルのモデルとして確立し、通常飼育群（Intact: IN 群）、ACL を外科的に損傷させた群（ACL-T 群）、ACL 損傷以外の外科的介入のみを行った群（Sham 群）の 4 群間で、損傷 ACL の経時的変化を以下の方法で解析した。

1）組織学的解析

損傷 ACL の構造的な変化を観察するために、介入後 1、2、4、6 週時点おいて、Hematoxylin-Eosin(H-E)染色を行い、断端部の構造や治癒経過、断端靭帯の核形状などを評価することで、ACL の状態を評価した。また、治癒した ACL において、靭帯の主成分である Collagen Type I と、損傷後治癒過程において増加する Collagen Type III について、免疫蛍光組織化学染色により治癒靭帯の質的評価を行った。

2）分子生物学的解析

ACL 損傷後に生じる靭帯内での分子生物学的な治癒に向かう反応を観察するため、介入後 1、2 週時点において、炎症性サイトカインや損傷靭帯の異化・同化因子の mRNA レベルでの発現量を real-time RT PCR 法により定量的に評価した。

3）治癒靭帯破断強度解析

治癒靭帯の、膝関節安定性への貢献という機能的側面を明らかにするため、介入後 8 週時点において引っ張り試験による破断強度を計測した。なお、本研究では、大腿骨および脛骨は固定せず、関節裂隙に特注の Jig を挟み込み、破断試験を行った。

＜結果＞

組織学的観察により、ACL-T 群ではこれまでの報告同様に損傷靭帯は経過を追うごとに退縮し、自己治癒へ向かう反応は見られなかった。一方で ACL 損傷後に関節の異常運動を制動した CAM 群では、損傷後 1 週時点から治癒へ向かう反応が見られ、損傷後 2 週時点においては、靭帯断端間に肉芽組織の浸潤を認め、再接合が生じていた。その後経過を追うごとに接合部組織の安定性を認め、未発達な核の凝集も観察された。免疫組織化学染色では、IN 群に比べ治癒靭帯において Collagen Type I および III ともに染色性の増強を認め、特に接合部分でその傾向は強く見られた。

分子生物学的観察では、介入後 2 週時点において、I および III 型 collagen に対して分解性の働きを有する MMP-3 の発現量が、CAM 群と比較して ACL-T 群では有意に高い傾向を示した。また、CAM 群との間に統計的有意差は見られなかったが、同様の働きを有する MMP-13 においても、ACL-T 群で発現量の増加傾向を認める一方、損傷後早期の瘢痕組織形成に関与する TGF-β の発現量は ACL-T 群と比較し CAM 群で増加傾向を認めるなど、ACL-T 群と CAM 群の関節内反応に差異が認められた。

また、CAM 群の治癒した ACL の力学的破断強度については、８週時点において、正常 ACL の 54%程度まで回復していた。

＜考察＞

今回、ACL 損傷モデル動物に対して、ACL 損傷後の膝関節に生じる異常運動である脛骨の前方引き出しを、関節包外で外科的に制動する新たなモデルを開発し、本モデルにおける損傷 ACL の治癒反応を継時的に観察した結果、これまでに報告されてきた種々の動物モデルとは異なり、ACL が自己治癒に導かれることを示した。

今回開発したモデルと、これまでの ACL 損傷モデルとの違いは、関節包外で異常運動を制動しているという一点のみであり、関節内の状態については同様であるにもかかわらず、残存 ACL 断端における損傷後の治癒反応は分子生物学的探索においても異なる傾向が認められた。関節内組織である ACL の損傷後治癒反応において、正常に近い関節運動が維持されることが重要であることが示唆され、この関節運動により生じるメカニカルストレスが、細胞内において分子生物学的な反応に置換されるメカノトランスダクションメカニズムを介し治癒が導かれたと考えられる。先に述べた ACL と MCL の損傷後の治癒反応が異なる点を考慮すると、今回の介入は ACL 損傷後に膝関節の動的安定性が失われた状態においても可能な限り正常な関節運動を維持したことが、治癒に貢献した可能性が高い。一方で、これまでに種々の動物モデルにより報告されてきた ACL 損傷後の不十分な治癒反応は、損傷後に生じる異常運動により付与される正常とは異なるメカニカルストレスが、ネガティブなメカノトランスダクション機構を介して ACL が本来有している自己治癒能力を阻害していた可能性が示唆される。

また、今回のモデルにより自己治癒した ACL の力学的破断強度は、介入後 8 周時点において正常 ACL の 50%を超える値を示した。この結果は、これまでに報告されている ACL 損傷に対して自家腱を用いて再建術を行ったモデルにおける力学的強度と十分に比較できるレベルである。

本論文で示した結果は、ACL 損傷後に生じる異常な関節キネマティクスに対する介入が、損傷

ACL の治癒反応に影響を及ぼしていることを示唆しており、ACL 損傷患者に対する新たな治療介入の選択肢を提示できる可能性があるとともに、様々な運動器疾患における組織損傷後のリハビリテーション介入に関する科学的根拠となり得る。

＜結論＞

組織損傷とメカニカルストレスの関係性から ACL 損傷後の自己治癒モデルを確立し、その背景にメカノバイオロジーの概念が包含されている可能性を示した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5093　号	国分　貴徳

論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　秋田　恵一、柳下　和慶

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本研究はラット膝前十字靭帯（ACL）切離モデルを用い、関節外の糸による運動コントロールを行うことにより、実験動物で初めて損傷 ACL が機能する靭帯として治癒することを示した

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

関節腔内に孤立して存在する膝前十字靭帯（ACL）は断裂すると治癒することは困難である。ACL 損傷後に治癒能力は存在するが、その大半は機能を有する靭帯として治癒しない。目的の先駆性には欠けるが、実験動物で初めて損傷 ACL が機能する靭帯として治癒するモデルを開発した独創的な研究である。また本研究により ACL 受傷後早期の治癒を目指した研究及び臨床的アプローチを加速する可能性のある先駆的な研究である。

２）社会的意義

スポーツ膝外傷として代表的である ACL 損傷は、その機能回復のために通常外科的治療を必要とし術後 1 年のリハビリテーション期間を要する。本研究は ACL 損傷後の初期治療の工夫により一次的な損傷治癒について改めて問題提起し、新しい損傷治療法の再認識・再開発を即すものである。

３）研究方法・倫理観

倫理審査を経た後に実験動物ラットを用いて行われた。ACL 切離群、運動コントロール群、Sham 手術群、正常群での損傷治癒過程の違いを RT-PCR を用いて検討し、組織学的、免疫組織学的検討により治癒靭帯の治癒の違いを示した。さらに力学的検討により、治癒した靭帯の機能の回復を証明した。

４）考察・今後の発展性

本研究でのハサミによる ACL 切離は、人における実際の ACL 損傷と損傷様式やメカニズムが異なる。したがって本実験での切離後の機能回復をそのまま人における ACL 損傷に当てはめることには問題がある。しかし切離後にも機能回復することを実験的に示したことの本研究の意義は大きい。今後受傷初期におけるリハビリ、運動コントロール、小侵襲手術の追加などを工夫することにより、本研究で示された機能する治癒靭帯を実現することが一つの将来展望として開かれる。また本実験での損傷形態を実際の ACL 損傷に近づけることにより、より人の ACL 損傷に近いモデルでの結果が得られる可能性がある。

３．その他

特になし。

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのみ十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Ripa JAMAL
論文審査担当者	主査　山岡　昇司 副査　中村　桂子　　藤原　武男
論　文　題　目	Anti-trypanosome effects of nutritional supplements and vitamin D_3: in vitro and in vivo efficacy against *Trypanosoma brucei brucei*

（論文内容の要旨）

Abstract

Background: Previous publications suggested that nutritional supplements have anti-trypanosome activity *in vitro*, although apparent efficacy was not noted *in vivo*. This study was conducted by experimentally infecting murine with *Trypanosoma brucei brucei* to assess the anti-trypanosome activity of a variety of nutritional supplements with the hope for their possible application for treatment of African trypanosomiasis.

Methods: Activities of nutritional supplements were screened *in vitro* against bloodstream forms of *T. b. brucei*. To evaluate selectivity, we used two mammalian cells, Jurkat cells and Vero cells. The values of IC_{50} and selectivity index values were calculated and supplements with promising efficacy *in vitro* were selected for further testing *in vivo*. Mice were infected intraperitoneally with $1x10^3$ *T. b. brucei*. We observed parameters for disease progression such as parasitaemia, red blood cell count, white blood cell count, survivability and splenomegaly. Morphological profiles after the treatment was analyzed by scanning electron microscopy.

Results: Vitamin D_3 showed anti-trypanosome efficacies both *in vitro* and *in vivo*. It seemed to have suppressive effects on parasitaemia, and spleen weight was also significantly lower in vitamin D_3 treated mice in comparison with non-treated control mice. There was, however, no significantly prolonged survivability of infected mice treated with vitamin D_3. Among green tea extracts, polyphenon-60 and epigallocatechin gallate had suppressive effects against *T. b. brucei* in vitro, but in vivo efficacies were marginal.

Conclusion: Treatment with nutritional supplements, vitamin D_3 seemed to have anti-trypanosome activity *in vitro* and protective activity to some extent *in vivo* respectively, although those supplements themselves did not have curable effects. The exact mechanisms of action are not clear, but the significant efficacy *in vitro* suggested direct effects of

supplements against African trypanosome parasites.

Keywords: *Trypanosoma brucei brucei*, Nutritional supplement, Vitamin D_3, African trypanosomiasis

African trypanosomiasis consisting of human African trypanosomiasis (HAT) and animal African trypanosomiasis (AAT/Nagana) is listed as Neglected Tropical Diseases endemic in sub-Saharan Africa. It is caused by parasitic protista of the order kinetoplastida and genus *Trypanosoma*.

Trypanosomes are transmitted by an insect vector, Tsetse flies (*Glossina spp.*). At the onset of infection, the parasites proliferate in the bloodstream and lymphatic system and after a few weeks, they are able to cross the blood-brain barrier and enter the central nervous system and ultimately death. Therefore, effective treatment at the early stage is crucial. The current drugs available for treatment of trypanosomiasis are less effective with severe side effects. Furthermore, the route of administration of these drugs and their optimal doses should be re-considered to achieve better treatment efficacy.

The host immune response system is known to play an important role in the disease progression and is considered to be highly essential for the control of the early phase of parasite replication which may be associated with host resistance to the parasite proliferation. The use of nutritional supplements to aid in host response against protozoan parasites has been studied, some of which revealed anti-trypanosome effects. Considering the situation that no safe and effective drugs are available, treatment regimens using drugs and supplements might be a challenge for the trypanosomiasis control strategy.

In view of these, we postulated that nutritional supplements may have some inhibitory/protective activity against *T. b. brucei*. We thus screened various known nutritional supplements from different functional groups for their inhibitory effects *in vitro* and compounds that showed promising results were further assessed *in vivo* for their protective abilities.

T. b. brucei bloodstream forms of strain GUTat 3.1 and TC221 maintained at Tokyo Medical and Dental University were used for all *in vitro* and *in vivo* experimental procedures.

Effects of the nine supplements against the blood-stream form of *T. b. brucei* GUTat 3.1 were determined using the alamarBlue method as was shown elsewhere. We determined selectivity index of tested supplements against trypanosome cells by comparing the efficacies against two mammalian cells, Jurkat cells and Vero cells. Sensitivity of the mammalian cells was measured using alamarBlue assay, as described previously.

Mice were randomly assigned into 5 mice/group and treated with three test supplements, vitamin D_3, polyphenon-60, catechin hydrate, two positive controls, suramin and curcumin, and a healthy control. The parameters used to assess the disease progression were body weight, level of parasitaemia, total red blood cell count (RBC count), total white blood cell count(WBC count), survivability and splenomegaly.

Digital images were collected using a Scanning Electron Microscope operating at 10 kV at 500 to 40,000 times magnification.

Data were presented as mean values with standard deviation. The data were subjected to analysis of variance using ANOVA. Means were considered significant at 95% Confidence Interval with a p value < 0.05.

Nutritional supplements with possible anti-trypanosomal efficacy were assayed for inhibitory activity against *T. b. brucei*. In the *in vitro* testing, polyphenon-60, vitamin D_3 and epigallocatechin gallate showed relatively low IC_{50} values of 16.9 μM, 4.58 μM and 8.40 μM, respectively, which were, however, less effective than that of suramin (1.18 μM). From the results, testing those supplements against mammalian cells, the selective index of vitamin D_3 was good enough, but other supplements were having medium or low selectivity index values. Based on these *in vitro* results, we selected vitamin D_3 and polyphenon-60 to see the effects *in vivo.*

We tested selected nutritional supplements for five parameters *in vivo*. During 10 days before trypanosome infection, treatments with polyphenon-60 made no significant changes in body weight, RBC and WBC count, suggesting no apparent negative effects for mice. But continuous administration of vitamin D_3 may cause statistical significant difference in body weight. When we compared results of parameters of RBC count and WBC count with infection-free control mice, RBC count recovered by vitamin D_3 treatment, polyphenon-60 and suramin, indicating treated mice recovered from anemic conditions induced by infection with *T. b. brucei.* On the other hand, WBC count significantly reduced by the infection ($p<0.05$), and treatment of supplements (vitamin D_3 and polyphenon-60) and suramin resulted more profound leukopenic condition. Vitamin D_3 provided significant decrease in parasitemia compared with that of non-treated control mice. It seemed to be dose-dependent. Polyphenon-60 showed suppression of parasites, but it was statistically marginal difference ($p=0.056$). Although survivability of mice treated with polyphenon-60 slightly prolonged, there was no statistical significance with that in non-treated control. Suramin-treated group showed 100% survivability during the period of our observation. Splenomegaly in vitamin D_3 treated mice was significantly suppressed in comparison with non-treated mice in a dose-dependent manner ($p<0.05$). Considering that splenomegaly being one of the sign of disease progression of African trypanosomiasis, treatment of vitamin D_3 might have had

protective effect.

Morphological profiles of *T. b. brucei* treated with vitamin D_3 was assessed by scanning electron microscopy.

In our study, we examined the possible efficacy of available nutritional supplements for enhancing host defense response to suppress the parasite growth and disease progression.

Results obtained here suggested that vitamin D_3 and polyphenon-60 showed anti-trypanosome activity both *in vitro* and *in vivo*, while catechin hydrate showed only a faint effect *in vivo*. Vitamin D_3 showed a parasite growth inhibition *in vitro* with a good selectivity index. Although vitamin D_3 failed to show curable effects *in vivo*, significant parasite growth inhibition was again observed *in vivo* and also splenomegaly during the disease course was suppressed. In this sense, vitamin D_3 cannot be a therapeutic drug for African trypanosomiasis in the protocol tested here which is severely dose dependent, but it might be expected to enhance efficacy of therapeutic drugs.

We were not able to observe curable effects for this supplement *in vivo*; several parameters of disease progression were improved by the treatment with this supplement. The results obtained suggest that treatment with nutritional supplements may possibly have protective/prophylactic roles, but details of efficacy mechanisms and the optimal protocol still remained uncovered.

要約

アフリカトリパノソーマ原虫（*Trypanosoma brucei brucei*）に対しては今日まで安全で効果の高い薬剤開発が進んでいない。その克服の方法の一つとして、現有治療薬効果の増強をめざすアプローチがあり、栄養サプリメントの非特異的な抗原虫効果を検討する研究が進められているが、治療応用の意義が確認できるものはまだ得られていない。今回の研究では、生体に何らかの増強効果を持つことが期待される栄養補助食品やビタミンの *T. b.brucei* 原虫に対する効果を *in vitro* で検討し、安全で効果が高いことが期待されるものをさらに *in vivo* で調べて、アフリカトリパノソーマ症への治療応用の可能性を検討した。その結果、ビタミン D_3 やエピガロカテキンは *in vitro* で安全で抗原虫活性を示し、さらにビタミン D_3 投与は実験感染マウス体内での原虫増殖を緩徐化し、脾臓の肥大が有意に抑えられた。しかし、原虫のクリアランスは見られず、救命効果は観察できなかった。ビタミン D_3 は単独で直接原虫に阻害効果を持つことが示唆され、今後の治療薬との併用による治療効率向上に資する可能性が考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5094　号	Ripa JAMAL
論文審査担当者	主　査　山岡　昇司 副　査　中村　桂子　　藤原　武男	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

トリパノソーマ原虫に対する Vitamin D3 等栄養サプリメントの増殖抑制効果を、*in vitro* および *in vivo* で解析した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

トリパノソーマ原虫感染症は Neglected tropical diseases の中でも、毒性の低い特効薬の開発が遅れている難治性疾患である。申請者は、途上国で入手可能な比較的毒性が低いと思われる栄養サプリメントに着眼し、過去の報告を参考にその抗原虫効果を期待して研究を行った。

２）社会的意義

アフリカ睡眠病等トリパノソーマ原虫感染症の症状軽減・現行治療薬の減量などの研究に発展する可能性がある。

３）研究方法・倫理観

本学の病原体管理規則および動物実験規則を遵守して、十分な知識と技術を以て培養系およびマウス感染実験系で Vitamin D3 等栄養サプリメントのトリパノソーマ原虫増殖抑制効果を検討した。

４）考察・今後の発展性

動物実験でのトリパノソーマ原虫増殖は感染マウスの健康状態にも依存すると考えられ、感染個体の生死を含めて結果の解釈は慎重に行わなければならない。現行治療薬との併用実験等が今後の課題と思われる。

３．その他

特記すべき事項なし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	増尾　昌宏
論文審査担当者	主査　横関　博雄 副査　東田　修二、明石　巧
論　文　題　目	Factors associated with positive inhalation provocation test results in subjects suspected of having chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

慢性鳥関連過敏性肺炎（bird-related hypersensitivity pneumonitis; BRHP）の診断において吸入誘発試験（inhalation provocation test; IPT）は最も有用性の高い検査法であるが、疾患の増悪リスクもあり限られた施設での実施に留まっている。今回、臨床的に慢性 BRHP を疑う患者において IPT の陽性予測因子を探索するための検討を行った。慢性 BRHP が疑われ IPT を試行した患者 107 例を対象に後方視的に行った。鳩糞抽出物に対する抗体の陽性率は、IPT 陽性患者で 52%、陰性患者で 38%であった（p=0.172）。ロジスティック回帰分析を行ったところ、（１）鳥の飼育歴（odds ratio [OR] 3.112）、（２）自宅周囲への鳥の飛来（OR 7.321）、（３） 白血球数（$\times 10^2/\mu l$; OR 0.959）の 3 項目が IPT の陽性予測因子として同定され、鳥関連抗原の暴露歴が慢性鳥関連過敏性肺炎を疑われた患者における IPT 陽性予測因子である事が示された。

＜緒言＞

過敏性肺炎（hypersensitivity pneumonitis; HP）は、様々な抗原の吸入により免疫学的に誘導される間質性肺炎であり、臨床経過から急性・亜急性と慢性に分類される。鳥関連過敏性肺炎(bird-related hypersensitivity pneumonitis; BRHP)は、環境中の鳩糞や羽毛に含まれる鳥関連抗原を原因とする頻度の高い HP である。ヨーロッパにおける報告では、HP は全間質性肺炎の 4-13%であるとされている。また Hanak らは HP の 34%が鳥関連抗原が原因であったと報告し、日本では、慢性 HP のうち 60%以上が BRHP であったと報告されている。慢性 BRHP の臨床像は 5 年生存率が 20-30%と予後不良である特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis; IPF）と類似しており、両者の鑑別が問題となる事が多い。原因抗原に対する沈降抗体は急性または亜急性 HP においては診断に有用であると報告されているが（odds ratio 5.3）、 慢性 BRHP の診断における免疫学的検査の有用性はまだ確立していない。Ramírez らは慢性 BRHP における鳩血清を用いた吸入誘発（inhalation provocation test; IPT）の有用性を報告し、Morell らは IPT を診断のゴールドスタンダードとするべきだと提唱しているなど、方法や診断基準が標準化されていないという問題はあるが、IPT の有用性は広まってきつつある。我々も IPT を慢性 BRHP 診断のゴールドスタンダードとして使用しており、感度 92.9%、特異度 94.7%と良好であった

ことを過去に報告している。今回、臨床の場において慢性 BRHP を疑う患者に IPT を行うべきかどうか判断する際の助けとなるべく、慢性 BRHP を疑う患者に対する IPT の陽性予測因子を探索するための検討を行った。

＜方法＞

2004 年 1 月から 2013 年 3 月までの期間中に、鳥関連抗原暴露歴や、HRCT 所見、肺組織の病理所見、抗血清鳩糞抽出物（pigeon dropping extract; PDE）抗体や末梢血のリンパ球刺激試験（lymphocyte proliferation test; LPT）といった免疫学的検査などから、慢性 BRHP が疑われ IPT を行った連続症例を対象とし後方視的に検討を行った。IPT が陽性で慢性 BRHP と診断された IPT 陽性群と、陰性で他の間質性肺炎と診断された IPT 陰性群の 2 郡に分け、患者背景、抗原暴露歴を含めた生活歴、身体所見、抗 PDE 抗体や末梢血 LPT を含めた血液検査、肺機能検査、HRCT、気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid; BALF）を解析した。抗原暴露歴の聴取には質問票を用いた。単変量解析で両群に優位差があった項目を用いてロジスティック回帰分析を行い、陽性予測因子の探索を行った。

＜結果＞

期間中に間質性肺炎の診断で入院した患者は 962 例であり、慢性 BRHP を疑われ IPT を行った患者は、IPT 陽性群 60 例、IPT 陰性群 47 例の計 107 例であった。IPT 陰性群 47 例のうち 37 例は特発性間質性肺炎の診断となり、4 例は他の抗原による HP、6 例は膠原病肺の診断となった。IPT 陽性群は陰性群と比較して、女性が多く（$p = 0.025$）、喫煙歴が少なく（$p = 0.038$）、鳥飼育歴がある者が多く（$p = 0.029$）、自宅周囲への鳥の飛来がある者が多かった（$p = 0.001$）。また IPT 陽性群 60 例のうち 31 例、IPT 陰性群 45 例のうち 17 例で抗 PDE 抗体が陽性であった（$p = 0.172$）。白血球数は IPT 陽性群で有意に少なかった（中央値, 陽性群 $64.5 \times 10^2/\mu l$ 対陰性群 $72 \times 10^2/\mu l$, $p = 0.001$）。HRCT 所見では、IPT 陰性群で線維化の程度が強かったが（$p = 0.023$）、粒状影の程度においては差を認めなかった（$p = 0.277$）。BALF では、IPT 陽性群でリンパ球の割合が高い傾向にあったが、優位差は認めず（13.3%対 8.3%, $p = 0.108$）、CD4/CD8 比は陽性群で有意に高値であった（3.01 対 1.8, $p = 0.004$）。外科的肺生検で IPT 陽性群の 5 例中 4 例、IPT 陰性群の 3 例中 1 例に肉芽腫または巨細胞を認め（$p=0.464$）、経気管支的肺生検では IPT 陽性群の 35 例中 2 例において認めたが、IPT 陰性群の 35 例中には 1 例も認めなかった（$p=0.464$）。

ロジスティック回帰分析を行うにあたり、BALF のデータを欠損している症例が IPT 陽性群で 18 例、陰性群で 14 例と多かったため、まず BALF を除いたうえで分析を行った。その結果、（1）鳥の飼育歴（odds ratio [OR] 3.112）、（2）自宅周囲への鳥の飛来（OR 7.321）、（3） 白血球数（$\times 10^2/\mu l$; OR 0.959）の 3 項目が IPT の陽性予測因子として同定され、鳥関連抗原への暴露歴が最も強い予測因子であった。BALF を加えて分析を行った結果、上記 3 項目に加え、（4）BALF の CD4/CD8 比（OR 1.207）が予測因子として同定された。

＜考察＞

今回の検討では、慢性 BRHP を疑う患者における IPT 吸入予測因子として、鳥関連抗原への

曝露歴が最も有用であるとの結果であった。抗原暴露に対する詳細な病歴聴取が慢性 BRHP の診断に対して重要だと考えられるが、抗原の曝露量を定量的に評価する事は困難であり、今回は定量的な評価までは行っていない。我々は以前、家庭のホコリに含まれる鳥関連抗原測定の有用性を報告しており、詳細な病歴聴取と組み合わせる事で、慢性 BRHP の診断の向上に寄与する可能性が考えられる。

今回の検討では抗 PDE 抗体は IPT 陽性予測因子として有用とは示されなかった。鳥関連抗原に対する血清 IgG 抗体は、病態というよりは曝露を反映していると考えられ、また慢性 BRHP の診断において鳥関連抗原に対する抗体は、急性や亜急性の過敏性肺炎と比較し、感度・特異度ともに低いとされている。我々の以前の報告では、急性 BRHP における血清抗 PDE 抗体の感度は 93-100%、特異度は 90%であり、慢性 BRHP においては、感度 87-88%、特異度 26-34%という結果であった。

BALF 中の CD4/CD8 比が IPT の陽性予測に有用な可能性が示されたが、今後のさらなる検討か必要であると考えられる。急性や亜急性の HP の BALF においては、CD8 優位になる事が知られているが、慢性過敏性肺炎においては CD4 優位になるとの報告がある。肺の CD4 細胞と慢性過敏性肺炎の関連に関してはまだ不明な点が多いが、慢性期での線維化の形成と関係している可能性が考えられる。

多変量解析において WBC が低いことが IPT 陽性予測因子であるとの結果であったが、その因果関係ははっきりせず、白血球数自体が非特異的な炎症性マーカーであり、IPT 陰性群での膠原病肺の存在などが影響を与えたのかもしれない。

画像所見や病理所見を含め慢性 BRHP の臨床像は特発性間質性肺炎と類似しており、診断に苦慮する事が多い。IPT 後の間質性肺炎増悪は極めて少ないとされるが、診断の未確定な間質性肺炎患者全てに IPT を行うのは、そのリスクから困難である。我々の以前の検討では IPT 後に 130 例中 2 例（1.5%）にステロイドパルス療法が必要な増悪を認めたため、急性 HP 例、呼吸不全例（PaO2 < 60 mmHg または在宅酸素療法を要する）、または急性増悪の既往のある例を IPT の除外基準としている。

今回の研究の限界は、IPT を行った時点で既に慢性 BRHP が疑われた患者が選択されておりバイアスが存在していること、また IPT 自体の偽陽性・偽陰性の可能性があることである。今回、免疫学的検査は陰性であるものの IPT は陽性であった症例が存在した事に関して、PDE に含まれる内容物が非特異的な反応を引き起こした可能性は否定できないが、Costabel らは農夫肺のうち 10-15%が沈降抗体陰性であったと報告しており、我々の以前の検討でも、PDE 抗体や LPT の AUC は低く（AUC; 0.5–0.8）、IPT の AUC は高かった（0.966）ことから、免疫学的検査が陰性でも慢性 BRHP の可能性を否定はできず、IPT が最も診断に有用なツールであると考える。

＜結論＞

鳥抗原の曝露歴は慢性 BRHP 患者の IPT 陽性予測因子として有用であると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5095　号	増尾　昌宏
論文審査担当者	主　査　横関　博雄 副　査　東田　修二、明石　巧	

（論文審査の要旨）

１、論文内容

慢性鳥関連過敏性肺炎(BRHP)の診断に鳥抗原誘発試験(IPT)は有用な検査であるが急性増悪の可能性もあり一般的には行われていない検査である。申請者は慢性 BRHP が疑われた IPT が施行された１０７症例を対象に鳥関連抗原暴露歴、ＨＲＣＴ所見、肺生検所見、肺機能検査、身体所見などを後方視的に IPT 陽性群、陰性群間で比較検討した。ロジスティック回帰分析を行ったところ１）鳥の飼育歴、２）自宅周囲への鳥の飛来、３）白血球数の３項目が IPT の陽性予測因子として同定された。鳥関連抗原の暴露歴が慢性 BRHP を疑われた患者の ITP 陽性予測因子が明らかにされたことは BRHP 診断する上で非常に有意義な研究と考えられた。

申請者は自らの言葉で研究の背景と目的、研究方法、結果の解釈と意義、今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の高度な研究能力とその基礎となる豊富な学識に基づき実践されたものであることが確認された。

２、論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

鳥関連抗原の暴露歴が慢性 BRHP を疑われた患者の ITP 陽性予測因子が明らかにされたことは BRHP 診断する上で非常に有意義な研究と考えられ独創的で評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は

１．　１）鳥の飼育歴、２）自宅周囲への鳥の飛来、３）白血球数の３項目が IPT の陽性予測因子として同定されたことは有意義な結果である。

２．　IPT 陽性予測因子を明らかにすることにより危険な検査である IPT を行わなくても慢性 BRHP を診断可能になったことは臨床的に意義のある研究と考えられた。

３）研究方法・倫理観

慢性BRHPが疑われたIPTが施行された１０７症例を対象に鳥関連抗原暴露歴、ＨＲＣＴ所見、肺生検所見、肺機能検査、身体所見などを後方視的にIPT陽性群、陰性群間で比較検討した。本手法は十分な解剖学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

３、審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	齊藤　正徳
論文審査担当者	主査　淺原　弘嗣 副査　関矢　一郎、江面　陽一
論　文　題　目	The Indispensable Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Skeletal Development

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

骨格の形成および発達は、主として軟骨細胞の増殖および分化によって制御されている。しかしその制御機構については未だ不明な点が多い。また、細胞増殖において重要な役割を果たす細胞周期制御因子と軟骨細胞の増殖・分化との関連について、In vivo レベルでの報告は未だない。今回、我々は骨格形成における_cyclin-dependent kinase1(Cdk1)の働きを解明するため、軟骨細胞において Cdk1 を特異的に欠損させ、その表現型について解析した。

マウス大腿骨において Cdk1 は長管骨成長板の柱状増殖細胞層に強く発現しており、分化が進んだ肥大軟骨細胞層においてはその発現がほぼ消失していた。また、軟骨細胞特異的 Cdk1 ノックアウトマウスにおいては正常の増殖軟骨層の形成が著しく障害されており、長管骨の成長障害を認めた。また、Ex vivo の実験の結果、軟骨の増殖と分化を司る PTHrP シグナリングにおいて Cdk1 は必須のタンパクであり、Cdk1 が軟骨細胞の増殖から分化への切り替えにおける重要な分子スイッチの働きをしていることが明らかとなった。

＜緒言＞

骨格の形成および発達は、主として軟骨細胞が重要な役割を担っている。マウス胎児の骨端部から骨幹部においては、骨端から順番に円形静止軟骨細胞、円形増殖軟骨細胞、柱状増殖軟骨細胞、そして肥大軟骨細胞の順に並んでいる。その肥大軟骨細胞に細胞死が誘導され、最終的に骨細胞に置換されることで長管骨が形成される。この過程においては、Parathyroid hormone-related peptide(PTHrP)、および Indian hedgehog(Ihh)が重要なタンパクとして知られている。PTHrP は骨端部の円形静止軟骨細胞より分泌され、骨の中心に向けて徐々に濃度が減少していく。PTHrP の濃度の減少によって、軟骨細胞は増殖から分化へと向かい、肥大軟骨細胞層を形成する。柱状増殖細胞と肥大軟骨細胞の移行部において軟骨細胞は Ihh を分泌する。この Ihh は PTHrP によって発現が抑制されるが、一方で静止軟骨細胞層における PTHrP の分泌を促進しており、この PTHrP と Ihh の相互作用が軟骨細胞の増殖と分化を調節している。しかし、

この詳細な機序についてはいまだに分かっていないことも多い。

細胞増殖において重要な役割を果たしているタンパクとして、Cyclin, Cyclin-dependent kinase(Cdks)が存在する。Cyclin は Cdk と結合することで活性を持ち、細胞周期の移行を制御する。Cdk1 は最初に同定された Cdk ファミリーの遺伝子であり、細胞増殖においてエンジンの役割を果たしているが、その骨格形成における役割については未知である。ここで、今回我々は Cdk1 の骨格形成における働きを検討するため、骨格形成において必須である軟骨細胞と Cdk1 との関連について解析した。また、さらに成長板における軟骨増殖および分化において重要な PTHrP シグナリングと Cdk1 との関連についても検討した。

＜方法＞

In vitro モデルとして、軟骨細胞分化に伴う Cdk1 の発現を時系列的に観察するため、マウス軟骨細胞様細胞(以下 ATDC5 細胞)を軟骨細胞分化培地で培養し、そのタンパクおよび RNA 発現の経時的変化を Western-blotting 法および qPCR 法を用いて測定した。また、Cdk1 の軟骨細胞増殖に対する影響を検討するため、ATDC5 細胞における Cdk1 の発現をノックダウン、および過剰発現させ、その増殖能の変化を解析した。さらに今度は軟骨細胞の分化に対する影響を調べるため、Cdk1 の発現をノックダウンした細胞における軟骨分化マーカーの発現を qPCR を用いて解析した。

Cdk1 ノックアウトマウスは胎生致死に至るため、In Vivo モデルとして α1typeⅡcollagen をプロモーターとした Cre/Lox-P システムを用いて軟骨細胞特異的 Cdk1 ノックアウトマウス(以下 cKO マウス)を作成し、その骨軟骨系における表現型について解析した。

最後に、軟骨増殖・分化、そして成長板の形成・発育にとって最も重要な PTHrP シグナリングと Cdk1 遺伝子との関連について調べた。まず In vitro モデルとして ATDC5 細胞に PTHrP および CDK1inhibitor である RO3306 を投与し、細胞増殖能の変化および軟骨細胞分化マーカーの RNA 発現の変化を解析した。そして Ex vivo モデルとして、胎生 16.5 日のマウスより四肢を摘出し、軟部組織を取り除いた状態の下肢骨を PTHrP を添加した培養液中で培養し、その成長板における軟骨細胞の増殖能の変化ついて BrdU 染色を行って解析した。また、同様に培養した四肢骨幹端から RNA を抽出し、骨幹端部における mRNA の発現を qPCR で解析し、PTHrP シグナリングとの関連について精査した。

＜結果＞

軟骨分化における細胞周期関連タンパクの発現を経時的に観察したところ、CDK1 タンパクは軟骨細胞の分化に伴い発現は低下した。また、RNA レベルにおいても、Cdk1 の発現は分化に伴って減少した。

ATDC5 細胞に対して、Cdk1 の発現をノックダウンしたところ細胞増殖能は低下し、Cdk1 を過剰発現したところ細胞増殖能は上昇した。また、ATDC5 細胞の Cdk1 の発現をノックダウン

したところ、軟骨細胞分化マーカー(α1typeⅡcollagen, α1type x collagen, Sox9)の発現はノックダウン群で上昇した。

In vivo モデルとして解析を行った cKO マウスは、メンデルの法則に従って出生するが、出生直後に呼吸困難と思われる原因で死亡した。また、cKO マウスは体長および四肢の短縮を認めた。次に大腿骨の組織標本の解析を行った。HE 染色では、cKO マウスにおいては柱状増殖軟骨細胞層が消失しており、またそれぞれの軟骨細胞のサイズは拡大し、細胞数および細胞密度は低下していた。マウス大腿骨における Cdk1 の発現を in situ hybridization(ISH 法)を用いて解析したところ、コントロールマウスでは円形軟骨増殖層で中等度、柱状増殖層で強く発現しており、肥大軟骨細胞層では発現を認めなかった。一方、cKO マウスにおいては、軟骨増殖層で弱い発現を認めたのみであった。増殖中の細胞を示す BrdU 染色を行ったところ、cKO マウスでは増殖細胞層における陽性細胞数が明らかに低下していた。軟骨細胞分化について、ISH 法を用いて検討したところ、α1(Ⅱ)collagen 染色域は cKO マウスで短縮していた。また Ihh は前肥大軟骨層で陽性となるが、cKO マウスではその陽性域の幅が拡大しており、前肥大軟骨層の拡大が示唆された。

通常、ATDC5 細胞に PTHrP を投与すると、その細胞増殖能は促進されるが、Cdk1-inhibitor である RO3306 を同時に投与することにより、PTHrP の働きは阻害され増殖能に変化を認めなかった。また、軟骨細胞の分化については、PTHrP の投与によって Ihh の発現は抑制され、肥大軟骨への分化は抑制される。しかしながら、PTHrP と RO3306 の同時投与によって ATDC5 細胞において Ihh の発現は変化を認めず、PTHrP の分化に対する作用は抑制された。Ex vivo モデルにおいて、マウス大腿骨の培養液に PTHrP を投与すると、野生型マウスではその軟骨増殖層における軟骨細胞増殖が促進され、BrdU 陽性細胞数が上昇するが、cKO マウスの下肢骨においては BrdU 陽性細胞数に変化を認めなかった。また、同様に培養した下肢関節軟骨においても、野生型マウスでは PTHrP 投与によりその軟骨分化は抑制されたが、cKO マウスにおいて分化は抑制されなかった。以上より、Cdk1 は PTHrP の下流に位置しており、軟骨細胞の増殖・分化に必須であることが判明した。

＜考察＞

Cdk1 ノックアウトマウスは胚細胞の段階で細胞増殖を止めてしまい出生しないことから、Cdk1 は細胞分裂において非常に重要な役割を果たしていることが知られている。本研究の結果により、Cdk1 が正常な軟骨増殖に必須であり、Cdk1 が欠損した状態では軟骨細胞は不適切に分化してしまうことが判明した。また、シグナリングにおいては PTHrP の下流に位置しており、軟骨細胞増殖および分化における重要な分子スイッチの役割を果たしていることが判明した。

骨格形成と細胞周期関連遺伝子との関係においては、いくつか報告が散見される。しかしながら、報告されている遺伝子を単独でノックアウトしたマウスにおいては特記すべき骨格系正常の表現系を認めない。一方、Cdk1 ノックアウトマウスは単独の欠損において成長障害の表現系を示しており、このことから Cdk1 が骨格形成において特に重要な遺伝子であることを示している。

また、興味深いことに、CK-Inhibitor として知られる p57 のノックアウトマウスは我々のマウスと同様に四肢の短縮を認める。しかしこの表現系は細胞増殖の増加および分化の障害によるものである。そして P57 は増殖細胞層において少なく、肥大軟骨細胞層に多く発現している。このことは P57 と Cdk1 との間に何らかの相互作用といった関連性があり得るが、いまだ良く分かっていない。

Cdks の作用を抑えることで疾患の進行を遅らせる研究が癌の領域や膠原病といった領域でなされており、Cdk1 が軟骨細胞の増殖や分化に起因する疾患に対する治療のターゲットとなる可能性が考えられる。

＜結論＞

Cdk1 は、正常な軟骨増殖および分化において必須であり、軟骨細胞の分化を司る PTHrP の下流に位置して細胞増殖と細胞分化における分子スイッチの役割を果たしている。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5096　号	齋藤 正徳
論文審査担当者	主　査　淺原　弘嗣 副　査　関矢　一郎、江面　陽一	

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

骨格の形成および発達は、主として軟骨細胞の増殖および分化によって制御されている。しかしその制御機構については未だ不明な点が多い。また、細胞増殖において重要な役割を果たす細胞周期制御因子と軟骨細胞の増殖・分化との関連について、*in vivo* レベルでの報告は未だない。今回、我々は骨格形成における_cyclin-dependent kinase1(Cdk1)の働きを解明するため、軟骨細胞において Cdk1 を特異的に欠損させ、その表現型について解析した。

マウス大腿骨において Cdk1 は長管骨成長板の柱状増殖細胞層に強く発現しており、分化が進んだ肥大軟骨細胞層においてはその発現がほぼ消失していた。また、軟骨細胞特異的 Cdk1 ノックアウトマウスにおいては正常の増殖軟骨層の形成が著しく障害されており、長管骨の成長障害を認めた。また、Ex vivo の実験の結果、軟骨の増殖と分化を司る PTHrP シグナリングにおいて Cdk1 は必須のタンパクであり、Cdk1 が軟骨細胞の増殖から分化への切り替えにおける重要な分子スイッチの働きをしていることが明らかとなった。

2.　論文審査

１）　研究目的の先駆性・独創性

骨格の形成および発達は、主として軟骨細胞が重要な役割を担っている。十分量の軟骨細胞を用意するために PTHrP による刺激が必要であることが示されていたが、どのように細胞周期が制御されるかについては、未知の点が多い。本研究においては、軟骨細胞特異的 Cdk1 ノックアウトマウスを用いた分子・発生学的による解析から、軟骨の増殖における Cdk1 の機能を詳細に明らかにした点で意義が高い。

２）　社会的意義

骨の発生・成長における分子メカニズムの解明は小児の骨・軟骨系統疾患や骨折など、整形外科、小児科、内科の基盤となる情報である。その点において、本研究は、医学に寄与する重要な知見を提示している。

３）　研究方法・倫理観

組織特異的なノックアウトマウスや間葉系細胞の分化系を用いた分子生物学的および発生学的な解析は、現在求められる研究レベルとして必要かつ十分なレベルであると考えられる。また動

物倫理的にも十分な配慮がなされている。

3.　考察・今後の発展性

本研究での知見が、医学に資することは明らかであり、その応用や方向性においては、より深い洞察が求められる。本人は現在、海外の研究室において研究を展開しており、今後更なる研究の発展が期待される。

4.　その他

審査発表において、研究背景のさらに深い理解を今後の課題とされた。

5.　審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	鈴木　英嗣
論文審査担当者	主査　関矢　一郎 副査　北川　昌伸、岡崎　睦
論　文　題　目	Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

腱の発生・恒常性維持について分子生物学的機構はいまだ不明な点が多く、再生医学による腱損傷治療には課題が多い。マウスを用いた腱の研究からは多くの知見が得られているが、体格が小さいことから制約も多い。今回我々は、遺伝子編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて転写因子 Mohawk ノックアウトラット（*Mkx*$^{/-}$ラット)を作成した。*Mkx*$^{/-}$ ラットでは *Mkx*$^{/-}$ マウスと同様に全身性の腱の低形成を認めるだけでなく、アキレス腱での早期の異所性骨化を認めた。tendon stem/progenitor cells (TSPCs)を解析すると、*Mkx*$^{/-}$ により骨分化能・軟骨分化能が亢進する一方、Mkx の過剰発現により骨分化能・軟骨分化能は抑制された。また伸長刺激により野生型では腱細胞への分化誘導が起こる一方、*Mkx*$^{/-}$ では軟骨分化能が亢進した。Mkx を過剰発現させた TSPCs による ChIP-seq 解析では、*Col1a1*・*Col3a1* といった腱関連遺伝子のみならず、*Sox5*・*Sox6*・*Sox9* といった軟骨関連遺伝子にもピークを認めた。これらのことから Mkx が腱分化に促進的に作用する一方、軟骨分化・骨分化に抑制的に働くことで、腱分化を調節する可能性が示唆された。

＜緒言＞

腱組織は細胞成分・血流に乏しいため、損傷後の修復において再断裂や癒着といった問題をしばしば生じる。このため腱の治癒能力を高める細胞治療・薬剤治療が今後期待されるが、そのためには腱の発生・再生に関わる分子生物学的なメカニズムの解明が不可欠である。転写因子 Mkx は腱特異的に発現し、*Mkx*$^{/-}$マウスでは全身の腱の低形成を認めることから、Mkx が腱の発生に重要であることが明らかになっている。

しかし *Mkx*$^{/-}$マウスを用いた研究にはいくつかの問題点がある。外科的手術を腱組織で正確に行うにはマウスの体格は小さい。また細胞成分に乏しい腱組織において、１匹のマウスの腱から多くの細胞を得ることも難しい。さらにトレッドミルなどの生理学的な研究にはよりヒトに近い動物が好ましい。

これらの制約から、筋骨格系領域の研究にはマウスより体格が大きく、生理学的にもヒトにより近いラットがしばしば用いられてきた。ラットの胚性幹細胞の樹立が困難であることから、遺

伝子改変ラットはこれまで報告は少なかったが、clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9)に代表される新しいゲノム編集技術の報告により一般的になりつつある。そこで今回我々は、*Mkx*$^{-/-}$ ラットを作成することで、腱発生における Mkx の機能解析を試みた。

＜方法＞

ラット胚において Whole mount in situ hybridization (WISH) を行い、胎生期の *Mkx* 発現を観察した。生後の各臓器での *Mkx* 発現の確認には定量的リアルタイム PCR 解析 (RT-qPCR)を用いた。*Mkx*$^{-/-}$ ラット作成のため、*Mkx* の第２エクソンを標的とした gRNA と hCas9 をラット受精卵に注入し、シークエンス解析を行った。得られた *Mkx*$^{-/-}$ ラットから膝蓋腱・アキレス腱の切片標本を作成し、組織学的に評価した。ラットとの比較のため、*Mkx*$^{-/-}$ マウスにおいても同様に、組織学的評価を行った。コラーゲンの観察には、透過型電子顕微鏡 (TEM)を用いた。各サンプルからの mRNA を用いて RT-qPCR を行った。

膝蓋腱より tendon stem/progenitor cells (TSPCs)を分離・培養し、軟骨／骨／脂肪分化誘導を行い、各分化能を評価した。レトロウイルスを用いて、*Mkx*$^{-/-}$ TSPCs に Mkx を過剰発現させ、各分化能を評価した。また *Mkx*$^{-/-}$ TSPCs をシリコンチャンバーにて培養し、伸張刺激を加えた後に RT-qPCR を行った。

最後に HA タグにて標識した Mkx を、レトロウイルスを用いて *Mkx*$^{-/-}$ TSPCs に導入し、クロマチン免疫沈降(ChIP)-seq 解析を行った。

＜結果＞

WISH では E11.5 ラット胚において *Mkx* が肢芽に発現し、E15.5 では腱の走行に一致した発現を認めた。生後では、*Mkx* は腱組織に特異的に発現していた。

そこで *Mkx*$^{-/-}$ ラットの作成に移った。受精卵への CRISPR/Cas9 の導入により得られた F0 世代の ラット 26 匹のうち 9 匹において標的配列の変異を確認した。フレームシフト変異を確認した 3 ラインいずれも *Mkx*$^{-/-}$において、全身性に腱の低形成を認め、尾は波型 (wavy tail)を呈した。TEM による観察では、野生型と比べて *Mkx*$^{-/-}$ ラットで腱の Collagen fibril 径が細くなっていた。

Mkx$^{-/-}$ ラットのアキレス腱では、P0 の時点で腱内に軟骨集積を認め、生後３週前後から内軟骨性骨化が進行した。その他の部位には、著名な異所性骨化は認められなかった。P0 および生後４週の *Mkx*$^{-/-}$ マウスにおいては、アキレス腱内に同様の異所性骨化は認められなかった。

Mkx$^{-/-}$ ラットのアキレス腱にて内軟骨性骨化が認められたことから、間葉系幹細胞 (MSC)から腱細胞への分化に Mkx が関与し、軟骨・骨分化を抑制する仮説が考えられた。そこで腱由来の幹細胞 TSPCs を、野生型・*Mkx*$^{-/-}$ ラットからそれぞれ採取し分化能を評価した。骨分化においては、*Mkx*$^{-/-}$ TSPCs では野生型より強い石灰沈着を呈し、骨関連遺伝子の増加を認めた。軟骨分化においては、*Mkx*$^{-/-}$ TSPCs ではより大きな軟骨ペレットを呈し、軟骨関連遺伝子の増加を認めた。*Mkx*$^{-/-}$ TSPCs での骨分化・軟骨分化の促進は、Mkx の過剰発現によって抑制された。このことから、Mkx が TSPCs における骨・軟骨分化に抑制的に作用していると考えられた。

過去の報告から、適切な機械刺激は MSC において腱細胞への分化を促す。そこで機械刺激に

対する *Mkx*$^{/-}$ TSPCs の応答を評価した。その結果、野生型 TSPCs では伸張刺激により腱関連遺伝子の上昇を認めた一方で、*Mkx*$^{/-}$ TSPCs では腱関連遺伝子の上昇は認められず、軟骨関連遺伝子の上昇を認めた。このことから、*Mkx*$^{/-}$ TSPCs では骨分化・軟骨分化能の亢進に加えて、腱分化能が喪失していると考えられた。

以上のことから各系統への分化への Mkx の関与が示唆されたが、腱細胞における Mkx の標的遺伝子について網羅的に解析した報告はいまだない。そこで *Mkx*$^{/-}$ TSPCs に HA 標識された Mkx を導入し、次世代シークエンサーを用いた ChIP-seq 解析を行った。結合候補領域のアノテーションにて得られたオントロジーには skeletal system development (GO:0001501)がリストアップされ、このなかには *Col1a1, Col3a1, Mkx* といった腱関連遺伝子のみならず、*Sox5*、*Sox6*、*Sox9* といった軟骨関連遺伝子も含まれていた。

＜考察＞

体格の大きさや生理学的観点から、実験動物としてラットがマウスよりも好まれることも多い。しかしこれまで遺伝子改変ラットの作成は技術的に困難であり、ラットによる分子生物学的研究には限界があった。新たな遺伝子編集技術は、こうした問題を克服する点で有用である。今回我々は、CRISPR/Cas9 を用いることで *Mkx*$^{/-}$ラットの作成に成功した。*Mkx*$^{/-}$ラットではマウスに比べてより重篤なアキレス腱の骨化を呈し、ChIP-seq 解析に必要十分な細胞を一匹から得ることができるなど、マウスのみでは難しい知見を得ることができた。

ヒトでの異所性骨化を呈する疾患としては、進行性骨化性線維異形成症や後縦靭帯骨化症などの全身性の病態がよく知られており、それぞれのモデルマウスも存在する。ヒトのアキレス腱に限局した骨化を呈する病態は主に外傷後や手術後などの二次性である。遺伝的素因を示唆する報告もあるが、アキレス腱に限局した異所性骨化のモデルマウスの報告はない。

今回 *Mkx*$^{/-}$ラットでは出生直後の段階でアキレス腱内に軟骨集積を認め、後に内軟骨性骨化を生じた。*In vitro* での分化誘導実験結果も鑑みると、Mkx の機能喪失下では TSPCs の腱分化能が喪失し、胎生期に軟骨細胞へ分化した可能性が示唆される。*Mkx*$^{/-}$マウスよりも *Mkx*$^{/-}$ラットにおいてより重篤なアキレス腱の骨化が起こったのも、体格がより大きいために TSPCs に加わる機械刺激が大きく、より強い軟骨分化誘導が加わった可能性がある。

過去の報告でも Mkx の過剰発現により腱関連遺伝子が促進されると同時に軟骨・骨への分化が抑制されていた。今回、我々の行った ChIP-seq の結果からも Mkx の標的遺伝子として *Col1a1* などの腱関連遺伝子と同時に *Sox6*・*Sox9* などの軟骨関連遺伝子が抽出されたことから、Mkx がこれらの遺伝子に促進的および抑制的に働いている可能性が示唆される。

まとめると、今回の結果から Mkx が腱関連遺伝子に促進的に働く一方で軟骨関連遺伝子を抑制することで腱発生・分化を調整していると考えられた。Mkx が腱細胞分化に重要な役割を果たしていることから、Mkx が腱修復における重要な治療ターゲットと成り得る。これらの知見を得ることができた点で、*Mkx*$^{/-}$ラットが有用であった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5097　号	鈴木　英嗣
論文審査担当者	主　査　関矢　一郎 副　査　北川　昌伸、岡崎　睦	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

腱の発生・恒常性維持について分子生物学的機構はいまだ不明な点が多く、再生医学による腱損傷治療には課題が多い。マウスを用いた腱の研究からは多くの知見が得られているが、体格が小さいことから制約も多い。今回、遺伝子編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて転写因子 Mohawk ノックアウトラット（*Mkx*$^{/-}$ラット)を作成した。*Mkx*$^{/-}$ ラットでは *Mkx*$^{/-}$ マウスと同様に全身性の腱の低形成を認めるだけでなく、アキレス腱での早期の異所性骨化を認めた。tendon stem/progenitor cells を解析すると、*Mkx*$^{/-}$ により骨分化能・軟骨分化能が亢進する一方、Mkx の過剰発現により骨分化能・軟骨分化能は抑制された。また伸長刺激により野生型では腱細胞への分化誘導が起こる一方、*Mkx*$^{/-}$ では軟骨分化能が亢進した。Mkx を過剰発現させた TSPCs による ChIP-seq 解析では、*Col1a1*・*Col3a1* といった腱関連遺伝子のみならず、*Sox 5*・*Sox6*・*Sox9* といった軟骨関連遺伝子にもピークを認めた。これらのことから Mkx が腱分化に促進的に作用する一方、軟骨分化・骨分化に抑制的に働くことで、腱分化を調節する可能性が示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

体格の大きさや生理学的観点から実験動物としてラットはマウスよりも優れている。しかし、これまで遺伝子改変ラットの作成は技術的に困難であり、ラットによる分子生物学的研究には限界があった。今回 CRISPR/Cas9 を用いることで *Mkx*$^{/-}$ラットの作成に成功し、マウスの解析のみでは難しい知見を得ることができた点で先駆性・独創性がある。

２）社会的意義

今回 Mkx が腱関連遺伝子に促進的に働く一方で軟骨関連遺伝子を抑制することで、腱発生・分化を調整していることを示し、Mkx が腱修復における重要な治療ターゲットと成り得ることを示した点で、臨床的にも有用な研究成果と言える。

３）研究方法・倫理観

マイクロ CT による画像診断、電子顕微鏡を含めた形態学的解析、生体力学的解析、さらには分子生物学的解析まで種々の手法を駆使して、現在求められる研究レベルとして必要かつ十分なレベルであると考えられる。また動物倫理的にも十分な配慮がなされている。

４）考察・今後の発展性

ヒトでもアキレス腱に限局した骨化を呈する病態がある。今回作成したラットはこのヒトの病態に類似するものであり、病態解明や予防・治療法の開発に結び付く可能性を有する。

３．その他

プレゼンテーション及び質疑応答は満足のいくものであった。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	齋藤　賢将
論文審査担当者	主査　植竹　宏之 副査　三宅　智、田邉　稔
論　文　題　目	Is a Central Venous Catheter Necessary for the Perioperative Management of Esophagectomy? A Prospective Randomized Pilot Study Comparing Two Different Perioperative Regimens

（論文内容の要旨）

【要旨】

胸部食道癌周術期管理は術前に中心静脈カテーテル（CVC）を挿入し、これを利用して行ってきた。近年、術後早期から経腸栄養（EN）が開始されるようになり栄養路としての CVC の必要性が低下した可能性が高い。

胸部食道癌切除再建術を行う 41 例を無作為に、CVC を挿入せず末梢静脈栄養（PPN）に EN を併用する周術期管理（PPN 群）と、CVC を挿入し TPN に EN を併用する従来の管理（TPN 群）とに割り付け、CVC の必要性を検証した。TPN 群：手術前 2 日間経口摂取に加え TPN を実施する。手術後から術後第 2 病日までは両群間で同様の輸液管理を行い、術後第 3 病日より TPN と EN を開始する。PPN 群：同様に手術前 2 日間 PPN を実施し、第 3 病日から PPN、EN を開始する。同等のカロリーを投与するため脂肪製剤を 1 日 1 回投与した。栄養指標として Albumin 値および Retinol Binding Protein（RBP）値を測定し、術後早期合併症発生率、カテーテル関連合併症を評価した。

両群間で体重当たり同等のカロリーを投与でき Albumin 値、RBP 値に有意差を認めなかった。術後早期合併症発生率にも有意差を認めず、カテーテル関連合併症の発生率にも有意差は認めなかった。

CVC なしでも従来と同様に安全な周術期管理が施行可能であり、周術期の状況に応じて CVC の要否を選択可能と考えられた。

【緒言】

胸部食道癌根治術は胸部操作、腹部操作、頸部操作を必要とし、消化器癌手術において最も侵襲の大きな手術の 1 つである。術後は、吻合部の安静のため経口摂取はしばらく控えることが多い。そのため周術期に CVC を挿入し TPN を実施する栄養管理が一般的に行われてきた。近年、EN の有用性が報告され、周術期栄養管理に EN が実施されるようになってきている。また、CVC 挿入時気胸やカーテル感染などの合併症は一定頻度で生じ得る。そこで CVC を挿入せず PPN と EN による周術期管理が従来と同様安全に施行可能かどうか検証するため、栄養指標、術後合併症、カテーテル関連合併症につき比較した。

【方法】

組織学的に食道扁平上皮癌または、食道腺癌と診断され、根治的右開胸食道切除再建術または胸腔鏡下切除再建術を予定している 20 歳以上で、研究に関して十分な説明を行った上で同意が得られている患者を選択基準とした。除外基準として、併用禁忌薬を服用中の患者、本研究使用薬剤で重篤な副作用を発現したことのある患者、腎障害・肝障害・心不全などの合併により本研究への参加が困難な患者は除外した。また、高度進行食道癌による低栄養状態のため術前に積極的な栄養介入を要する患者も除外した。2012 年 8 月から 2014 年 9 月に当科で右開胸または右胸腔鏡下に根治的食道切除再建術を行う予定の 41 例を無作為に TPN 群、PPN 群に割り付け周術期管理を行った。

TPN 群では手術 3 日前に CVC を挿入、手術 2 日前および手術前日に TPN 製剤（エルネオパ 1 号®）を 2000ml/日投与する。PPN 群では手術 2 日前より PPN 製剤（ビーフリード®）を 2000ml/日投与する。術前日夕食まで経口摂取は継続した。術当日は術中を除き同様の輸液が行われ、術後第 2 病日まではいずれの群も PPN 製剤と 5%アルブミン製剤を投与した。術後第 3 病日より、TPN 群では TPN 製剤を 80ml/hr で投与再開し、2 日おきに 20ml/hr ずつ減量した。PPN 群でも PPN 製剤を同量投与し、1 日投与カロリーが同等になるように 1 日 1 回脂肪製剤 100ml（イントラリポス 20%®）を投与した。いずれの群でも術後第 3 病日から、EN 製剤（エレンタール ®を 1kcal/ml に調整）を術中上部空腸に留置したカテーテルから 20ml/hr で投与開始し 2 日おきに 20ml/hr ずつ 60ml/hr まで増量した。食事摂取は術後経過に応じて術後第 7 病日から再開した。両群とも各症例の臨床所見、検査所見等により投与速度の増減は許容した。

主要評価項目として栄養状態を評価し、指標として Albumin 値と RBP 値を術当日手術前、術後第 3 病日、術後第 8 病日に測定した。副次評価項目として術後合併症、カテーテル関連合併症を評価し、術後合併症は Clavien-Dindo 分類を用いて評価し、カテーテル関連合併症は、CVC 感染、深部静脈血栓、CVC 挿入時合併症および末梢静脈炎などを評価した。

数値は平均±標準誤差で記載した。有意水準を 0.05 とし連続変数では t 検定と Mann-Whitney U 検定を行い、離散変数では χ^2検定と Fisher 検定を行った。

当研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会の承認を得て行い（承認番号 第 24-17 番）、大学病院医療情報ネットワーク(UMIN-CTR)に研究計画を登録した（UMIN000008555）。

【結果】

21 例を TPN 群に 20 例を PPN 群に割り付けた。TPN 群で SIADH に伴う低ナトリウム血症により意識障害を発症し手術自体が延期となった 1 例を解析から除外した。両群間で年齢、性別、身長、体重など患者背景に有意差は認めなかった。また、手術時間、術式に関しても有意差は認めなかった。

9 例（TPN 群 7 例、PPN 群 2 例）にプロトコール逸脱を認めた。プロトコール逸脱率は両群間で有意差を認めなかった（$P = 0.058$）。TPN 群での逸脱例の内訳は 3 例が CVC の抜去、3 例が輸液製剤の変更、1 例が EN の中止であった。

CVC を抜去した 3 例のうち、2 例はカテーテル感染の疑いで術後第 3 病日および術後第 7 病日にカテーテルを抜去、1 例は内頚静脈血栓症および脾梗塞で術後第 7 病日に CVC を抜去した。

輸液製剤の変更を行った3例は、1例が低ナトリウム血症、高カリウム血症を伴う致死的不整脈を術後第1病日に発症し、カリウムを含まない輸液製剤に変更した。他の1例は術前HbA1cが正常範囲内で、糖尿病の既往もなかったが、術後第3病日から高血糖が出現し、インスリン持続点滴静注および追加皮下注射開始後も血糖コントロールが不良であったため術後第7病日に糖質を含まない輸液製剤に変更した。もう1例は体重40kg以下の女性で、プロトコール通り投与では水分過多および過栄養と判断し、術後第7病日からPPN製剤を規定の半量投与した。

ENを中止した1例は、術後第7病日に上部消化管内視鏡検査で縫合不全と診断され、縫合不全部から縦隔内へ腸液の漏出を認めたため、腸液を減らす目的でENを中止した。

PPN群では2例CVC挿入を要する病態となったためプロトコール逸脱とした。内訳は、1例が術後呼吸不全のため第8病日まで人工呼吸器管理を要した。麻痺性イレウスによりENも実施困難であったため、TPN管理が必要と判断した。他の1例は術後第5病日に原因不明の敗血症性ショックを発症し、カテコラミン等の投与経路としてCVCを挿入した。

プロトコールを完遂したTPN群13例、PPN群18例を比較して体重1kg当たりの投与カロリーに有意差は認めなかった。またAlbumin値、RBP値に関しても有意差は認めなかった（P = 0.442および0.235）。同様に術前除外した1例を除く全40例のintention to treat（ITT）解析でも有意差は認めなかった（それぞれP=0.602,0.384,0.443,0.063）。

GradeII以上の術後合併症を33例に認めた。両群間で術後早期合併症の発生率、重症度とも有意差は認めなかった。

カテーテル関連合併症を8例に認めた）。TPN群でgrade IのCVC感染を2例、grade IIの血栓症を1例、grade IIIaの医原性気胸を1例認めた。PPN群でgrade Iの4例末梢静脈炎を認めた。これら合併症の発生率に有意差は認めなかった（P= 0.948）

【考察】

当研究はCVCなしで食道癌術後周術期管理が安全に施行可能かという仮説に基づき、従来当科で行ってきた周術期管理と比較した。この周術期管理は2010年から2015年までに根治的食道切除再建術を行う239例に行い、術後在院日数中央値が14日、在院死亡率2.5%と安全に施行可能な周術期管理法と考えている。

Albumin値とともにRBP値を栄養指標として採用した。RBPは体内半減期が約12時間とturn-overが早いため他の栄養指標に比較して栄養状態を鋭敏に評価することが可能と考え、RBP値を栄養指標として用いた。

我々の施設では、食道癌切除術施行時に両側頸部郭清を施行するため、CVC挿入経路として、鎖骨下静脈を第1選択としている。当研究ではCVC挿入時の医原性気胸を1例認め挿入時の合併症発生率は4.7%であった。鎖骨下静脈穿刺によるCVC挿入で最も多い合併症は胸腔、肺、鎖骨下動脈の誤穿刺であり、大部分が処置施行者の経験に依存し0-12%の発生率と報告されている。

カテーテル感染も最も多い合併症の一つであり、当研究では2例（10%）に認められた。2例とも明らかな感染源を認めない高熱によりカテーテル感染が疑われCVCを抜去した。抜去後数日で解熱したが血液培養およびカテーテル先端の培養は陰性であった。カテーテル感染の定義は、カテーテル感染の疑い、カテーテル関連菌血症、カテーテル関連敗血症など曖昧な部分を含み発

生率は 1%から 40%以上と報告されている。

PPN 群では 4 例（20%）に末梢静脈炎を認め外用薬による治療を要した。末梢静脈炎発生率は 25%から 35%と報告され、頻回のカテーテル入れ替えを要する。この点で CVC は、合併症はより重症であるものの長期間の留置が可能で、鎖骨下静脈穿刺であれば両手を自由に動かせるため、術後の離床や QOL の点で優れていると考えられた。

当研究では 9 例（TPN7 例、PPN2 例）プロトコール逸脱を認めた。有意差は認めなかったものの TPN 群で逸脱が多い傾向にあった。研究デザインとして TPN 群ではカテーテル関連合併症が発生した際、CVC を抜去し末梢静脈カテーテルを挿入、PPN を開始することになっていたためプロトコール逸脱としたが、PPN 群では、末梢静脈炎の様なカテーテル関連合併症が発生しても、末梢静脈カテーテルを別部位に入れ替え治療継続可能であったため逸脱としなかった。この違いが TPN 群で逸脱が多い傾向が生じた理由の 1 つと考えられる。

CVC を挿入せず PPN および EN を用いることで従来と同様の周術期管理が安全に施行可能であると考えられた。CVC を挿入するか否かは周術期の状態により選択可能であると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5098　号	齋藤　賢将
論文審査担当者	主　査　植竹　宏之 副　査　三宅　智、田邉　稔	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は食道癌術後、経腸栄養と併用する輸液療法のルートとしての、中心静脈経路と末梢静脈経路の有効性、安全性を比較した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

中心静脈栄養は長く標準治療として使われているがカテーテル感染や穿刺の合併症を来す危険性も伴っている。末梢静脈経路が中心静脈経路に代わりうるとすれば臨床的な意義は大きい。

２）社会的意義

本論文によって得られた結果は以下の通りである。

1. 末梢血管経路は中心静脈経路に比べて合併症は少なく、それによる本試験のプロトコール逸脱も少なかった。
2. 末梢血管経路ではやや高率（20%）の末梢静脈炎を認めたが、重篤な合併症には至らなかった。

食道癌手術において、特に頚部郭清が行われれば中心静脈経路は合併症を起こしやすい鎖骨下静脈穿刺を用いるしかない。今回の研究結果によって末梢静脈経路の有効性と安全性が示されれば、臨床的な意義は極めて大きい。

３）研究方法・倫理観

中心静脈と末梢静脈経路の有効性の比較として、多くの栄養学的マーカーを測定している。また、臨床的マーカー（肺炎、創感染など）を用いた比較も十分に行われている。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

今後、末梢血管炎の予防の方策や、必要カロリー数の計算などの研究がなされれば、食道癌術後は全症例に中心静脈経路を用いる必要がないことが示されることになり、日常診療・標準治療を変える研究となりうる。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	近藤　雄太
論文審査担当者	主査：　原田　浩之 副査：　井関　祥子　横山　三紀
論　文　題　目	Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

VISTA(V domain-containing Ig suppressor of T-cell activation)はT細胞の活性化を抑制する新規免疫チェックポイント分子である。本研究では、VISTAに対するモノクローナル抗体（MIH63）を用いて、低免疫原性の扁平上皮癌における抗VISTA抗体単独療法と他の免疫チェックポイント分子であるCTLA-4あるいはPD-1阻害との併用療法の効果を検討した。抗VISTA抗体単独療法は、明らかな癌縮小効果を示さなかったが、休止および疲弊$CD8^+$ T細胞を機能的エフェクターT細胞に変換させ、$CD8^+$ T細胞の活性化を促進させていた。しかしながら、抗VISTA抗体単独療法は癌局所における制御性T細胞（Treg）の集積を阻害できなかった。抗VISTA抗体療法に加えてのCTLA-4あるいはPD-1阻害では、 抗CTLA-4抗体との併用でのみ、さらなる癌縮小が認められた。抗CTLA-4抗体との併用は、癌局所のTreg集積を効率よく阻害し、CD8/TregとCD4/Treg比率の両方を増加させていた。抗PD-1抗体との併用は、活性化$CD8^+$ T細胞を顕著に集積させるがTreg集積を阻止できず、CD4/Treg比率の明らかな減少に至っていた。本結果から、VISTA阻害は、$CD8^+$ T細胞を機能的エフェクターT 細胞に効率よく変換できるが、TME(Tumor microenvironment)におけるTreg集積を阻止できないために癌縮小効果が十分でなかったことが示された。Tregによる免疫抑制が強い頭頸部扁平上皮癌において抗VISTA 抗体は、抗PD-1抗体の併用より抗CTLA-4抗体との併用療法の方が効果的であることが示された。

＜緒言＞

免疫システムは癌に対する免疫応答を惹起できるにもかかわらず、癌微小環境では、多種の制御性細胞の存在や制御性分子の発現あるいは分泌によって免疫不全状態が起きている。このような抑制機構の排除は癌免疫療法に不可欠であり、免疫チェックポイント分子であるCTLA-4やPD-1阻害は悪性黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部癌、腎癌などの固型癌治療において有望な臨床結果を示している。CTLA-4とPD-1は、共に活性化T細胞に発現が誘導されるが、CTLA-4は2次リンパ組織での応答に強く関与しているのに対して、PD-1は末梢組織での応答により強く関与している。CTLA-4とPD-1の併用阻害は、進行悪性黒色腫患者において単独療法より優れた効果を示している。

VISTAは、新規に同定された免疫チェックポイント分子であるが、CTLA-4やPD-1と異なり、B細胞以外のほとんどの免疫細胞に発現が認められる。VISTAはT細胞においては受容体として、抗原提示細胞においてはリガンドとして機能することが示されている。抗VISTA抗体(13F3)投与は、複数のマウス癌モデルにおいて、癌周囲におけるTregと ミエロイドサプレッサー細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)を減少させ、機能的エフェクター T細胞 (effector T cells, Teff)や活性化樹状細胞を増加させることで、癌縮小効果を示すことが報告されている。しかしながら、これらは比較的免疫原性の高い癌での評価である。本研究では、低免疫原性で免疫療法に抵抗性の扁平上皮癌である SCCVII を用いて、抗VISTA抗体単独療法とCTLA-4もしくはPD-1阻害との併用効果を検討した。

＜方法＞

抗VISTAモノクローナル抗体の作成

VISTA遺伝子導入細胞株でSDラットを免疫し、免疫脾細胞とミエローマ細胞株を融合させ、VISTA遺伝子導入細胞とのみ強く反応する抗体を産生するハイブリドーマ MIH63を選択した。

癌細胞接種と抗体投与

6-7週齢のC3H/HeNマウスを使用し、扁平上皮癌細胞株SCCⅦを皮下接種した。動物実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認のもとに、法令に基づいて実施した。抗VISTA抗体(MIH63)、抗CTLA-4抗体 (UC10-4F10) 、抗PD-1抗体 (RMP1-14) 単独あるいは抗VISTA抗体との併用投与を行った。抗体は、200 μgずつ週3回2週間腹腔内投与した。

免疫学的解析

癌細胞接種10日後あるいは実験最終日の脾細胞、所属リンパ節細胞、腫瘍浸潤リンパ球を分離し、種々の抗体を用いて、細胞表面および細胞内染色後に、フローサイトメーターで解析した。

＜結果＞

SCCVII接種20日後の腫瘍浸潤リンパ球における VISTA発現を検討したところ、VISTAは、腫瘍浸潤 T細胞すべてに発現が認められ、特に $CD8^+$ T細胞では、PD-1および CTLA-4と共に発現していた。

抗VISTA抗体単独投与は明らかな癌縮小効果を示さなかった。接種20日後の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析では、T細胞比率と $CD8^+$ T細胞中のIFN-γ発現細胞比率の増加がみられたが、 $CD8^+$ T細胞やTreg比率に変化は認めなかった。所属リンパ節における $CD8^+$ T細胞の解析では、抗VISTA抗体投与は、$PD\text{-}1^-IFN\text{-}\gamma^-Eomes^+Ki\text{-}67^-$の休止期メモリー細胞と $PD\text{-}1^+IFN\text{-}\gamma^-Eomes^-Ki\text{-}67^-$の疲弊細胞の比率を減少させ、$PD\text{-}1^-IFN\text{-}\gamma^+Eomes^+Ki\text{-}67^-$である最終分化したTeff と $PD\text{-}1^+IFN\text{-}\gamma^-Eomes^+Ki\text{-}67^+$の増殖 Teffの比率を増加させていた。

PD-1あるいは CTLA-4に対する抗体投与との併用効果について検討したところ、抗CTLA-4抗体あるいは抗PD-1抗体単独投与で顕著な癌縮小効果を示したが、抗VISTA抗体との併用によりさらなる縮小がみられたのは、抗CTLA-4抗体との組み合わせのみであった。TIL (Tumor-infiltrating lymphocyte) 解析では、抗CTLA-4抗体あるいは抗 PD-1抗体単独で、 $CD8^+$ T細胞、Tregを除いたコンベンショナル $CD4^+$ T細胞 (Tcon)およびIFN-γ発現 $CD8^+$ T細胞の有意の増

加と Treg の有意な減少による CD8/Treg および Tcon/Treg 比率の増加が認められた。抗 PD-1 抗体と抗 VISTA 抗体の併用投与では、Tcon と Tcon/Treg 比率の顕著な減少が認められるのに対して、抗 CTLA-4 抗体と抗 VISTA 抗体では、CD8/Treg および Tcon/Treg の両者のバランスが高く維持されていた。

担癌による免疫抑制が顕著になる前の 10 日後の所属リンパ節および脾臓 $CD8^+$ T 細胞の IFN-γ と TNF-α発現による多機能性の変化について解析したところ、抗 VISTA 抗体単独投与は、多機能性を劇的に増強させ、抗 CTLA-4 抗体と抗 VISTA 抗体の併用療法ではさらに増強されていた。

＜考察＞

SCCⅦモデルにおける癌微小環境では、活性化 $CD8^+$ T 細胞の集積の低さと $CD4^+$ T 細胞における Treg 有意の状態が、既報告における悪性黒色腫等の癌モデルとの大きな違いであった。抗 VISTA 抗体は、2 次リンパ組織において休止 $CD8^+$ T 細胞を機能的エフェクターT 細胞に変換できる点においては非常に優れているが、癌局所における Treg の集積を阻止できなかったために、癌縮小に至らなかったと考えられた。癌縮小効果には、癌微小環境における CD8/Treg と CD4 Tcon/Treg 比がよい指標となっている。CTLA-4 阻害は、特に Treg 抑制に優れていることが報告されており、本結果においても、 Treg の集積を顕著に抑えていることから、抗 VISTA 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用で有益な効果が認められたと思われる。これに対して、PD-1 阻害は、疲弊 $CD8^+$ T 細胞の機能的 Teff への転換能に優れており、この点において 抗 VISTA 抗体と機能が重複していたために、有益性が得られなかったと考えられた。

＜結論＞

VISTA 阻害は、$CD8^+$ T 細胞を休止期メモリー細胞と疲弊細胞を効果的に機能的 Teff に変換できるが、癌への Treg 集積を抑制する効果は弱い。Treg による免疫抑制が顕著な頭頸部扁平上皮癌では、PD－１と VISTA 阻害と比べ CTLA-4 と VISTA 阻害の併用療法が効果的であると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5099　号	近藤　雄太
論文審査担当者	主　査：原田　浩之 副　査：井関　祥子　横山　三紀	
論 文 題 目	Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma	

（論文審査の要旨）

＜要旨＞

癌細胞と宿主免疫応答には、NK 細胞やキラー T 細胞などによる癌を排除する正の免疫と、逆に、癌による免疫回避機構により癌の増殖を促進させてしまう制御性 T 細胞などの負の免疫の相反する応答が存在している。これまでの癌免疫療法は、正の免疫強化が中心であったが、近年、正の免疫強化に先立って負の免疫排除が不可欠であることがわかってきた。CTLA-4 や PD-1 に代表される免疫チェックポイント分子は、 T 細胞に対して抑制性シグナルを入れる負の共刺激分子である。これらの分子の機能を抗体により阻害すると、T 細胞の機能が維持されて抗癌免疫応答が増強される。そこでこのような阻害抗体は、進行中の多種の固型癌に対する臨床試験において、有効な結果を示している。本邦においても、CTLA-4 や PD-1 を標的とした阻害抗体は、転移性悪性黒色腫および非小細胞性肺癌では既に保険導入されており、頭頸部癌においても、現在臨床試験が進行中である。しかしながら、実際に腫瘍縮小効果を示す例は 10-30%であり、また、薬価が非常に高いことから、有効症例の選択、併用療法による投与量削減、あるいは奏効率の向上などが課題とされている。本研究において、近藤雄太は、新しい免疫チェックポイント分子である VISTA に注目し、癌微小環境における VISTA の 発現と新規に作成された抗 VISTA 抗体(MIH63)の単独投与および抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体との併用投与における効果を検討した。

本研究で得られた結果は以下である。

1．腫瘍浸潤リンパ球において、 VISTA 発現はすべての T 細胞に認められ、特に $CD8^+$ T 細胞上では、 PD-1 と CTLA-4 が共発現していた。

2．同系マウスへの SCCⅦ移植モデルでは、抗 VISTA 抗体(MIH63)投与による明らかな腫瘍縮小効果は見られなかったが、腫瘍浸潤リンパ球における T 細胞比率と $CD8^+$ T 細胞中の IFN-γ 陽性率の有意の増加が認められた。

3．所属リンパ節における $CD8^+$ T 細胞の解析では、抗 VISTA 抗体(MIH63)投与は、$PD\text{-}1^-IFN\text{-}\gamma^-Eomes^+Ki\text{-}67^-$の休止期メモリー細胞と $PD\text{-}1^+IFN\text{-}\gamma^-Eomes^-Ki\text{-}67^-$の疲弊細胞比率を減少させ、$PD\text{-}1^-IFN\text{-}\gamma^+Eomes^+Ki\text{-}67^-$の最終分化した機能的エフェクター細胞と $PD\text{-}1^+IFN\text{-}\gamma^-Eomes^+Ki\text{-}67^+$の増殖エフェクター細胞の比率を増加させていた。

４．CTLA-4 あるいは PD-1 単独阻害で顕著な癌縮小効果を示したが、抗 VISTA 抗体(MIH63)と抗 CTLA-4 抗体との併用によりさらなる縮小がみられた。

５． CTLA-4 あるいは PD-1 単独阻害は、腫瘍浸潤リンパ球における活性化 CD8+ T 細胞を有意に増加させ、逆に制御性 T 細胞 (Treg)比率を有意に低下させて、結果的に CD8/Treg および Treg を除いたコンベンショナル $CD4^+$ T 細胞 (Tcon)/Treg 比を増加させていた。

６．抗 PD-1 抗体と抗 VISTA 抗体(MIH63)の併用では、Tcon と Tcon/Treg 比の顕著な減少が認められるのに対して、抗 CTLA-4 抗体と抗 VISTA 抗体(MIH63)の併用では、CD8/Treg および Tcon/Treg の両者のバランスが高く維持されていた。

７． 担癌による免疫抑制が顕著になる前の 10 日後の所属リンパ節および脾臓 $CD8^+$ T 細胞の多機能性について IFN-γと TNF-α発現で解析したところ、抗 VISTA 抗体(MIH63)単独投与は、多機能性を劇的に増強させ、抗 CTLA-4 抗体と抗 VISTA 抗体(MIH63)の併用ではさらに増強されていた。

今回の免疫学的解析から近藤は、新規抗 VISTA 抗体(MIH63)の投与は、2 次リンパ組織において $CD8^+$ T 細胞を機能的エフェクターT 細胞に変換する能力が非常に優れていることを明らかにした。しかし、抗 VISTA 抗体は癌への Treg 集積を阻止できないために、単独では癌縮小効果が得られなかった。 CTLA-4 阻害は、効果的に Treg の癌への集積を抑制し、抗 VISTA 抗体との併用でさらなる効果が発揮できたことからも、上記の仮説が正しいことが裏付けられた。本結果から、３つの免疫チェックポント分子阻害のメカニズムの類似点と相違点が明らかになり、併用する場合の留意点が示された。

本研究は、頭頸部扁平上皮癌に対する癌免疫療法あるいは免疫チェックポイント阻害薬の選択において有益な情報を与えるもので、将来の癌治療の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられた。よって本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	会田　麻美
論文審査担当者	主 査　　宇尾　基弘 副 査　　三浦　宏之　　笛木　賢治
論　文　題　目	Effect of enamel margin configuration on color change of resin composite restoration

＜諸言＞

近年、光重合型コンポジットレジンは、優れた接着性、審美性、耐久性及びコストパフォーマンスにより審美修復材料として、前歯部から臼歯部まで幅広く用いられている。しかしながら、歯の色調は部位や年齢によって様々であり、周囲歯質と正確に色調適合させることは容易ではない。コンポジットレジン修復物の色調は、コンポジットレジンの明度、彩度、色相、光透過性、光拡散性等の様々な要素が影響するといわれている。また、半透明性材料であるコンポジットレジンと周囲歯質の色調は、それらが相互に反映しあうことで変化し、実際に窩洞へ充填した時の方が、色調差が小さく見えることが知られている。坪根、田中らは、ヒト抜去歯を用いてコンポジットレジン修復物の色調変化を評価し、窩洞マージン部における色調変化は、コンポジットレジン側よりも歯質側の方が大きいことを報告している。これらのことは、窩洞のマージン形態がコンポジットレジン修復物の色調変化に影響を与える可能性があることを示唆している。臨床的には、窩洞マージン部にベベルを付与することによって移行的な色調変化が期待できるとされているが、その詳細については不明である。また、臨床上、う蝕象牙質を除去する際、遊離エナメル質が残存することがあるが、審美的コンポジットレジン修復における遊離エナメル質の処理の仕方についてもいまだ結論は出ていない。本実験では、牛歯エナメル質板にマージン形態の異なる３種の打ち抜き窩洞（ノンベベル窩洞、45 度のベベル窩洞、45 度のリバースベベル窩洞）を形成後、窩洞に 4 種の光重合型コンポジットレジンを充填し、二次元色差計（RC500）にて測色し、コンポジットレジン修復物及び周囲エナメル質の色調変化について評価、検討を行った。

＜方法＞

本研究では、光重合型コンポジットレジンとして以下 4 種(シェードは A2 を採択した場合に業者指示されたエナメル色）を使用した ; Estelite Asteria A2B (EA; Tokuyama Dental Corp.), Estelite Pro A2E (EP; Tokuyama Dental Corp.), Kalore WE (KA; GC America Inc.), Clearfil Majesty ES-2 Premium A2E (MJ; Kuraray Noritake Dental Inc.)。60 本の冷凍保存されたウシ抜去歯を用い、厚さ 1.0 mm のエナメル質板を切り出した後、中央部に円柱状ダイヤモンドバーにて打ち抜き窩洞（直径 1.0 mm） を形成し、その後 3 つの異なるマージン形態（ベベルを付与しない窩洞、45 度ベベルを付与した窩洞、45 度逆ベベルを付与した窩洞）を付与した。Clearfil Tri-S Bond Plus（Kuraray Noritake Dental Inc.）で業者指示に従

って接着処理後、4 種のコンポジットレジンをそれぞれ窩洞に充填し、エナメル質板の表側および裏側から 60 秒間ずつ光硬化させて 24 時間 37º C にて湿潤保管後、エナメル質板両側を 2000 番の耐水研磨紙で研磨し、測色用試料とした。D65 光源下、黒色板背景、湿潤下にて、二次元色差計（RC500, PaPaLaB Co.）で試料を撮影し、その CIE XYZ データから、窩洞中央部を通る近心側から遠心側エナメル質までの CIE L*C*h*を連続的に算出した。コンポジットレジン修復エナメル質板の 5 点(1; コンポジットレジン中心部、2; ノンベベル窩洞表側境界部、3; ベベル窩洞表側境界部、4; リバースベベル窩洞表側境界部、5;周囲エナメル質)の各カラーパラメーター（L*C*h*）について評価した。またノンベベル窩洞では、コンポジットレジンーエナメル質境界部と周囲エナメル質の L*C*h*が平坦になる変化点との間の距離を算出した。併せて、コントロール群として、コンポジットレジンの板状試片（厚さ 1.0 mm、直径 6.0 mm）を作製し、24 時間 37º C 湿潤保管、2000 番の耐水研磨紙で研磨後、RC500 にて測色した。それぞれの値は Three-way ANOVA, Two-way ANOVA と t-test を用いて有意水準 5%で統計学的分析を行った。さらに、これら 4 種類の材料において上記のようにコンポジットレジン板状試片を作成し、変角光度計にて 2 次元透過光強度のグラフを求め、正透過光特性（G0）、拡散透過光特性（DF）と透過光総量（Area）を計測した。それぞれの値は、Dunett'3 検定と t-test 検定を用いて有意水準 5%で統計学的分析を行った。

＜結果と考察＞

本研究で試料の測色に用いた二次元色差計（RC500）は、CIE 等色関数を線形座標変換した関数と等価な３つのフィルターを用いることで、対象物の CIEXYZ 3 刺激値を手に入れることができ、得られた XYZ デジタルデータから必要な範囲の色調変化を二次元的に評価することが可能である。また、カメラに分光光度計を内蔵したカラーキャリブレーションシステムが組み込まれているため、高い再現性で測色することができる。本研究では、この色差計を用いて、コンポジットレジン修復物及び周囲エナメル質の色調変化を検討、評価した。

全ての材料の L*値は、ノンベベル窩洞では、コンポジットレジン修復物中央部からコンポジットレジンーエナメル質境界部をこえて上昇し、周囲エナメル質で平坦になり、ベベル窩洞では中央部から表側境界部に向かって緩やかな勾配で上昇し表側境界部で平坦になり、リバースベベル窩洞では、中央部から表側境界部に向かって鋭い勾配で上昇し裏側境界相当部で平坦になることが観察された。一方で、コンポジットレジン修復物中央部から境界部までの C *h*値の変化は、材料によって異なっていることが観察された。

ノンベベル窩洞内のコンポジットレジン修復物中央部の色調は、全ての材料でコンポジットレジン板状試片と比較して、L *値が上昇し、EA と MJ の C *値と EP の h*値も窩洞に充填されたことによる影響が認められた。この結果より、ノンベベル窩洞内のコンポジットレジン修復物は、周囲エナメル質の影響により色調変化した事が明らかとなった。L*値は、ベベル窩洞では MJ と KA でノンベベル窩洞に対し有意に減少し、リバースベベル窩洞では全ての材料で他の窩洞に対し有意に減少した。 EA、EP、KA では、マージン形態によって C *h *値に有意差は認められなかったが、MJ ではマージン形態による影響が認められた。この結果より、エナメルマージン形態がコンポジットレジン修復物の色調変化に及ぼす影響は、

使用する材料により異なり、特に MJ では大きくなることが示唆された。以前の研究で、歯質に見立てたコンポジットレジンに異なるシェードのコンポジットレジンを充填することで、光透過性の高いコンポジットレジンほど大きく色調が変化し、窩洞を小さくするほど内外のコンポジットレジンの色差が減少することが報告されている。今回、使用したコンポジットレジンはそれぞれ異なる光学的特性が認められた。すなわち MJ と KA の Area 値に有意差はなく、EA と EP よりも大きい値を示し、MJ の DF 値は KA よりも大きく、MJ の G0 値は KA より低かった。この結果より、コンポジットレジン修復物の色調変化は、コンポジットレジンの Area 値と DF 値の大きさに影響される可能性がある。

一方、コンポジットレジン修復物境界部での色調変化は、コンポジットレジン側よりも、歯質側の方が大きいことが報告されているが、本研究においても、L*値は、ノンベベル窩洞の全ての材料で、境界部を越えて上昇し、その後エナメル質で平坦になり、境界部においては周囲エナメル質との間に有意差が認められた。 C*値 は EP と KA では境界部で平坦になったが、EA と MJ では、境界部と周囲エナメル質との間に有意差が認められた。一方、h*値は、全ての材料で、境界部において周囲エナメル質との間に有意差は認められなかった。これらの結果より、コンポジットレジン修復物は、周囲エナメル質の色調に影響を与え、特に L*値に影響を与えることが明らかになった。ノンベベル窩洞において、境界部から周囲エナメル質で L*値が平坦になる変化点までの距離は、材料により異なり、MJ が他の材料よりも有意に長かった。 一方、境界部から周囲エナメル質で C*値が平坦になる変化点までの距離は、EA と MJ でのみ認められ、EA の方が有意に長かった。周囲エナメル質の色調変化が最も大きかった MJ は、材料の中で最も大きい Area 値と、及び EA と EP より小さい DF 値を示し、L*値における色調変化が最も小さかった EA は、最も小さい Area 値と最も大きい DF 値を示した。すなわち、この周囲エナメル質の色調変化の違いは、コンポジットレジンの透過光特性の違いが影響したものと思われる。一方で EA は、C*値の色調変化は最も大きかったが、これは EA の C*値がエナメル質の C* 値よりも高かったためであると考えられる。

本研究では、ベベル窩洞では、EA の C *値を除くすべての材料の L*C*h*値において、コンポジットレジンーエナメル質境界部と周囲エナメル質に有意差は認められなかった。また、L*値の変化はベベル窩洞では、ノンベベル窩洞よりも緩やかだった。これにより、窩洞にベベルを付与することは境界部における色調調和性を向上させることが示唆される。特に、MJ では境界部の C *値が、L *値と同様にノンベベル窩洞と比較して有意に上昇しているため、ベベル付与による効果が大きいと考えられる。一方で KA では、C* h*値において、ベベル付与による影響が認められず、L*値においてもベベル付与による効果が小さいため、窩洞にベベルを付与する必要がないことが示唆される。

一方、リバースベベル窩洞はノンベベル窩洞に対し、すべての材料で、コンポジットレジンーエナメル質境界部の L*値が有意に減少し、MJ の C* 値と EA と EP の h*値も、有意に減少した。この結果より、リバースベベルの付与は色調調和性の点からは効果的ではないことが示された。窩洞マージン部に残された遊離エナメル質は強度が弱く修復材料の重合収縮による遊離エナメル質の微細な亀裂が起こる事があるため除去した方がよいという報告があるが、審美的な要求からも遊離エナメル質は除去した方がよいことが本研究で示唆された。

本研究より、窩洞内部のコンポジットレジンの色調変化と窩洞境界部の色調調和性はマージン形態の影響をうけ、その程度は、材料により異なることがわかった。またベベル付与により色調調和性が向上することが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5100　号	会田　麻美
論文審査担当者	主 査　　宇尾　基弘 副 査　　三浦　宏之　　笛木　賢治	
論 文 題 目	Effect of enamel margin configuration on color change of resin composite restoration	

（論文審査の要旨）

近年、光重合型コンポジットレジン（以下レジン）は、審美歯冠修復材料として広く用いられている。しかしながら、歯の色調は部位や年齢によって異なり、周囲歯質と正確に色調適合させることは困難である。一般に、半透明性材料であるレジンと周囲歯質の色調は、おのおの色調が反映しあうことで変化し、色調差が小さく見えることが知られており、周囲歯質に付与するマージン形態がレジン修復物の色調調和と色調変化に影響を与えることが考えられる。臨床的には、窩洞マージン部にベベルを付与することで色調調和性を向上させることが期待されているが、詳細については不明である。また、遊離エナメル質の処理の仕方について、色調調和性を検討した報告はほとんどない。

このような背景のもと、本研究では、ウシ抜去歯から切り出したエナメル質板に、打ち抜き円柱窩洞を形成後、３つの異なるマージン形態（ベベルを付与しない群、45 度のベベル付与した群、遊離エナメル質を想定し、45 度のリバースベベルを付与した群）を付与し、4 種のレジンを充填し、レジン修復物の色調変化について評価し、あわせてレジンの透過光特性を調べ、その関連性を検討したもので、その着眼は極めて高く評価できる。使用された 4 種類のレジン材料（Estelite Asteria:A2B（以下、EA)、 Estelite Pro:A2E (EP)、Kalore:WE (KA)、 Clearfil Majesty ES-2 Premium:A2E (MJ)）は、臨床的に広く用いられているもので、それぞれフィラー成分は様々であり、また、その色調再現における業者指示の積層充填法も異なっている。すなわち、EA、KA、MJ ではボディ色を充填した後、最表層にエナメル色を充填することが推奨されているが、EA では最表層にボディ色が露出しエナメル質との境界部を形成することが許容されている。これら材料の特性を理解したうえで選択されたものであり、妥当な選択といえる。さらに、本研究では、自動変角光度計を用いてそれぞれの透過光特性評価を行っているが、その結果も 4 種のレジンで様々であることが確認されている。色調評価項目は、レジン修復エナメル質板の５点 (1; コンポジットレジン中心部、2; ノンベベル窩洞境界部、3; ベベル窩洞表側境界部、4; リバースベベル窩洞表側境界部、5;周囲エナメル質)の各カラーパラメータ（CIE L*C*h*）について評価した。カラーパラメータ（L*C*h*）は、RC500 で撮影し得られた CIE XYZ ３刺激値より算出している。本研究で使用した二次元色差計（RC500）は RGB 等色関数にある負の感度を生じさせないように座標転換した CIE XYZ 等色関数に適応したフィルターを実装することで、３バンドでありながら十分な計測精度を得ることができ、全色域カメラとして様々な分野で使用さ

れ、その有用性は高いことが認められている。一方で歯科分野での研究応用はなされておらず、本研究の測色で RC500 を使用したことは、新たな試みとして高く評価できる。測色方法は、過去の文献を考慮しつつ慎重に設定されたものであり適切な手法と考えられる。コンポジット充填エナメル質板の色調変化について連続的に観察し、その結果から窩洞境界部における色調（L*C*h*）、ノンベベル窩洞の周囲エナメル質における色調、それぞれの窩洞形態におけるコンポジットレジン修復物中央部における色調（L*C*h*）について注意深い分析がなされており、高く評価できる。得られた結果に対する統計学的な検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1. すべての材料で窩洞内のコンポジットレジン修復物中央部の色調は、周囲エナメル質の影響により色調変化したことが明らかとなった。Area 値と DF 値の両方が比較的大きな MJ ではマージン形態による影響が認められたが、EA、EP、KA ではマージン形態による影響が小さかった。コンポジットレジン修復物の色調変化は、コンポジットレジンの Area 値と DF 値の大きさに影響される可能性が示唆された。
2. ノンベベル窩洞ではコンポジットレジン修復物により、周囲エナメル質が色調変化することが明らかになった。周囲エナメル質の色調変化の程度は材料により異なり、MJ が最も大きい結果になった。
3. 窩洞にベベルを付与することは境界部における色調調和性を向上させることが示唆された。その程度は材料により様々であり、MJ ではベベルの効果が大きく、KA ではベベルの効果はあまりみられなかった。
4. 窩洞にリバースベベルを付与することは境界部における色調調和性を低下させることが明らかになり、遊離エナメル質は除去した方が良いことが明らかになった。

本研究により、窩洞内部のコンポジットレジンの色調変化と窩洞境界部の色調調和性はマージン形態の影響をうけ、その程度は、材料により異なることがわかった。またベベル付与により色調調和性が向上する一方で、遊離エナメル質は除去した方がよいことが示唆された。

以上のように、本論文はコンポジットレジンと歯質との色調適合性に関して、臨床的に極めて有益な示唆を導き出していることは、本論文の成果として高く評価できる。本研究は今後の歯科保存学、歯科材料学の発展に大いに寄与するものと考えられる。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分に価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小黒　玲奈
論文審査担当者	主 査　　高橋　英和 副 査　　若林　則幸　　岡田　大蔵
論　文　題　目	The role of enamel thickness and refractive index on human tooth colour

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

近年歯冠修復治療において審美的な要求が高まっているが、審美的な処置を行うためには、まず歯の色調を正しく評価する必要がある。歯の色調は、光が歯の構造物（エナメル質、象牙質など）を通過する際に生じる様々な光学的相互作用（反射、透過、吸収、散乱）に応じて決定される。エナメル質は半透明なため、歯の色調は主に象牙質の色調に左右され、エナメル質の影響は少ないとされてきた。そのため、エナメル質が歯の色調に及ぼす影響に関する報告はほとんどない。しかしながら、近年エナメル質のミネラル含有量や組成が歯の色調に影響していることが明らかとなった。このことから、エナメル質の厚さや屈折率は歯の色調に影響を及ぼしている可能性が考えられる。本研究ではヒト抜去歯を用い、エナメル質の厚さおよび屈折率に伴う歯の色調変化について、評価、検討を行った。

＜材料と方法＞

本研究では、抜去後 4° C 水中下にて保存された歯内治療や歯冠修復等を認めないヒト上顎中切歯 15 本を使用した。抜去歯の唇側歯冠部中央 1.0×1.0mm の範囲を、歯科用測色計（Crystaleye）にて色彩イメージを撮影し、波長走査型光干渉断層計（SS-OCT）にて残存エナメル質の光学的厚さを測定しながら象牙質が露出するまで約 100μm ずつ削除し、その都度撮影を行った。撮影した色彩イメージから CIELAB 色空間内の座標 L*（明度）、a*（赤/マゼンタと緑の座標）および b*（黄と青の座標）を算出し、さらにその値から CIEDE2000 色差式を用いエナメル質削除前後の ΔL'（明度）、ΔC'（彩度）、ΔH'（色相）および色差 ΔE_{00} を算出し評価、検討を行った。また、測色に用いた抜去歯の歯冠部切縁側より、厚さ 0.5mm のエナメル質板状試片（1.0mm×4.0mm）を作成し、その屈折率を SS-OCT にて算出した。求められた屈折率とエナメル質の光学的厚さから、エナメル質の実際の厚さを算出した。エナメル質の厚さと屈折率がエナメル質削除前後の ΔE_{00} に、またそれらの色調パラメーター（ΔL'、ΔC'、ΔH'、Δa*、Δb*）に及ぼす影響を調べるため、重回帰分析を用いて統計学的分析を行った。

＜結果＞

エナメル質の厚さが薄くなるに従い、各抜去歯の ΔE_{00} は大きくなった。また、それぞれの色調パラメー

ター（ΔL'、ΔC'、ΔH'、Δa*、Δb*）においては、各抜去歯のΔL'、ΔC'およびΔb*は歯によって様々に変化し、ΔH'はほとんどの抜去歯で緩やかに大きくなったが、Δa*はほとんど変化しなかった。

重回帰分析により、エナメル質の厚さと屈折率の両方がエナメル質削除前後のΔE_{00}に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。その中でも、エナメル質の屈折率がエナメル質削除前後のΔE_{00}に影響を及ぼす主な因子であることが明らかとなった。また、重回帰分析により、エナメル質の厚さはエナメル質削除前後のΔH'に影響を及ぼす因子であることは認められず、エナメル質の屈折率はエナメル質削除前後のΔH'に影響を及ぼす因子であることが認められた。一方で、エナメル質の厚さ及び屈折率はエナメル質削除前後のΔL'、ΔC'、Δa*、Δb*に影響を及ぼす因子であることは認められなかった。

＜考察＞

各抜去歯のΔE_{00}はエナメル質の厚さが薄くなるに従い大きくなり、66.7%の抜去歯で許容可能とされている色差閾値2.23を越える値となった。また、重回帰分析によりエナメル質の厚さと屈折率の両方がエナメル質削除前後のΔE_{00}に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。これらの結果より、エナメル質が歯の色調に影響を及ぼしていることが示唆された。また重回帰分析では、エナメル質の屈折率がエナメル質削除前後のΔE_{00}に影響を及ぼす主な因子であることが明らかとなったが、これはエナメル質の厚さよりもエナメル質の屈折率の方が歯の色調に影響を及ぼしていることを示唆している。

それぞれの色調パラメーターでは、エナメル質の厚さが薄くなるに従い各抜去歯のΔL'及びΔC'に様々な変化が認められたことは、エナメル質の光学的特性のひとつである半透明性が関与していると考えられる。半透明性はその物体の厚みに影響を受けるので、もしエナメル質の半透明性が歯の色調に大きな影響を与えるとした場合、エナメル質の厚さも歯の色調に相関を示すはずである。しかしながら本研究では、エナメル質の厚さはエナメル質削除前後のΔL'及びΔC'に影響を及ぼす因子であることは認められなかった。このことより、エナメル質の半透明性は歯の色調に影響を与えているが、その影響は小さいということが示唆される。一方で、エナメル質の厚さが薄くなるに従い各抜去歯のΔH'が緩やかに大きくなった。エナメル質の光学的特性のひとつにオパール効果がある。オパール効果とは光がエナメル質などの物体に入射して短波長の光が散乱することにより、物体が反射光では青白く、透過光ではオレンジ色に見える現象である。これらのことから、歯の色相は主に象牙質によって決まるが、エナメル質がオパール効果によりわずかに青みの影響を与えている可能性が考えられる。また、エナメル質が薄くなるに従って、各抜去歯のΔa*はほとんど変化を示さなかった一方で、Δb*は様々に大きく増加または減少した。色調変化にはb*が大きな役割を果たしていることが示唆されるが、これは過去の研究でも報告されており、b*の変化はエナメル質のオパール効果によるものであると考えられている。これらのことより、オパール効果はエナメル質の光学的特性の中で歯の色調に最も影響を及ぼしていると示唆される。しかしながら、抜去歯本来のエナメル質の厚さは、エナメル質削除前後のΔH'及びΔb*の変化に対する統計的に有意な予測因子であるとは認められなかった。このことより、エナメル質のオパール効果はエナメル質の厚さの影響を受けていないことが示唆された。これは、短波長の光の散乱がエナメル質内ではなく、エナメル質表面で起きているため

だと考えられる。また本研究では、エナメル質の屈折率がエナメル質削除前後の ΔH'に影響を及ぼす因子であることが認められた一方で、ΔL'、ΔC'に影響を及ぼす因子であることは認められなかった。屈折率は真空中の光速を物質中の光速で割った値であり、歯を含む生体組織内での光の進み方を記述する上での重要な指標である。このことから、エナメル質の屈折率が、エナメル質内における象牙質から反射してきた光の挙動と関連していて、結果として歯の色相に影響したものと考えられる。また、過去の研究ではエナメル質の光の散乱は歯の明度と相関があるという報告があるが、屈折率は物質の表面ではなく内部の光の挙動に関連していることから、本研究ではエナメル質の屈折率はエナメル質削除前後の ΔL', ΔC'に影響を及ぼす因子であることは認められなかったと考えられる。

歯の色調に影響を及ぼす可能性があるものとして加齢変化が挙げられる。一般的に、高齢者の歯の色は若年者のものより暗いことが知られており、歯の生理的加齢変化はその形態学的・光学的特性に影響することが知られている。加齢に伴いエナメル質のハイドロキシアパタイトの結晶が大きくなり、またエナメル質中のハイドロキシアパタイト結晶が大きい歯では、その色調が暗くなることが報告されている。過去の研究では、エナメル質の屈折率がエナメル質のミネラル含有量や組成に影響を及ぼしていることが報告されており、またエナメル質のミネラル含有量や組成が歯の色調に影響を及ぼしていることが報告されている。しかしながら、本研究で使用した抜去歯の年齢は分かっておらす、加齢変化とエナメル質の厚さ・屈折率についての関係性を明らかにすることは出来なかった。今後、加齢変化に伴いエナメル質が歯の色調に及ぼす影響がどのように変化するのかについて検討を加えていく必要がある。

＜結論＞

本研究より、エナメル質は歯の色調に影響を及すことが明らかとなり、特にエナメル質の屈折率が大きな影響を及ぼしていることが判明した。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5101　号	小黒　玲奈
論文審査担当者	主 査　　高橋　英和 副 査　　若林　則幸　　岡田　大蔵	
論 文 題 目	The role of enamel thickness and refractive index on human tooth colour	

（論文審査の要旨）

近年歯冠修復治療において審美的な要求が高まっているが、審美的な処置を行うためには、まず歯の色調を正しく評価する必要がある。歯の色調は、光が歯の構造物を通過する際に生じる様々な光学的相互作用に応じて決定されるが、エナメル質は半透明なため、歯の色調は主に象牙質の色調に左右されエナメル質の影響は少ないとされ、エナメル質が歯の色調に及ぼす影響についての報告はほとんどない。近年、エナメル質のミネラル含有量や組成が歯の色調に影響していることが明らかとなったが、透過光特性（正透過性、拡散透過性、透過光総量）などに影響を与えるエナメル質の厚さ、及び媒体の厚さから独立した光学的因子であるエナメル質の屈折率が歯の色調に及ぼす影響を検討した報告はない。

このような背景のもと、本研究では、ヒト抜去上顎中切歯を用い、エナメル質の厚さの変化に伴う歯の色調変化を検討し、さらにエナメル質の厚さと屈折率が歯の色調に及ぼす影響について重回帰分析を用いて解析されており、その着眼点は極めて高く評価できる。

本研究では、抜去歯の唇側歯冠部中央 1.0×1.0mm の範囲を、象牙質が露出するまで約 100μm ずつ削除し、その都度 CIELAB 色空間内の座標 L*、a*、b*を算出し、さらにその値から CIEDE2000 色差式を用いエナメル質削除前後の ΔL'、ΔC'、ΔH'及び色差 ΔE_{00} を算出し評価、検討を行っている。色差 ΔE_{00} は従来の色差 ΔE^*_{ab} に比べヒトの目によって知覚される色差との違いが少ないことが報告されており、その評価方法は妥当である。実験はヒト抜去歯を用いて行われているが、倫理審査委員会の承認を得て（承認番号；725 号）適切に遂行されている。

また本研究では、測色に用いた抜去歯の歯冠部切縁側より、厚さ 0.5mm のエナメル質板状試片を作成し屈折率を算出しており、その方法は過去の文献に則った適切な手法と考えられる。さらに、エナメル質の厚さと屈折率がエナメル質削除前後の ΔE_{00} に、またそれらの色調パラメーター（ΔL'、ΔC'、ΔH'、Δa*、Δb*）に及ぼす影響について統計学分析が適切に行われており、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

本研究により得られた結果は以下の通りである。

1. エナメル質の厚さが薄くなるに従い、各抜去歯の ΔE_{00} は大きくなり、66.7%の抜去歯で許容可能とされている色差閾値を越えた。それぞれの色調パラメーターにおいては、各抜去歯の ΔL'、ΔC'及び Δb*は

歯によって様々に変化し、ΔH'はほとんどの抜去歯で緩やかに大きくなったが、Δa*はほとんど変化しなかった。

2. エナメル質の厚さと屈折率の両方がエナメル質削除前後の ΔE_{00} に影響を及ぼす因子であることが認められた。その中でも、エナメル質の屈折率がエナメル質削除前後の ΔE_{00} に影響を及ぼす主な因子であることが認められた。
3. エナメル質の厚さはエナメル質削除前後の ΔH'に影響を及ぼす因子であることは認められず、エナメル質の屈折率はエナメル質削除前後のΔH'に影響を及ぼす因子であることが認められた。
4. エナメル質の厚さ及び屈折率はエナメル質削除前後のΔL'、ΔC'、Δa*、Δb*に影響を及ぼす因子であることは認められなかった。

以上の結果から、エナメル質が歯の色調に影響を及ぼしていることが明らかとなり、また、エナメル質の厚さよりもエナメル質の屈折率の方が歯の色調に影響を及ぼしていることが示唆された。

また、エナメル質の厚さが薄くなるに従い各抜去歯の ΔH'が緩やかに大きくなり、Δa*はほとんど変化を示さなかった一方でΔb*は大きく変化したことに関し、論理的に考察を加え、エナメル質のオパール効果が重要な役割を果たしていることを提示している。さらに、エナメル質の屈折率がエナメル質削除前後のΔH'に影響を及ぼす因子であることが認められたことに関して、エナメル質の屈折率が、エナメル質内における象牙質から反射してきた光の挙動と関連しており、結果として歯の色相に影響したものと考察している。これらの考察は、歯の色調を理解するうえで、これまでにない解釈を提案するものであり高く評価できる。

本研究により、エナメル質は歯の色調に影響を及ぼすことが明らかとなり、特にエナメル質の屈折率が大きな影響を及ぼしていることが判明した。得られた知見は臨床的にも非常に有益な情報であり、今後の歯科保存学、歯科材料学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	岡村　武志
論文審査担当者	主査　柴田俊一 副査　原田浩之、田畑　純
論　文　題　目	Disordered arrangements of basal cells as a prognostic factor for oral epithelial dysplasia: a morphometric study of 96 cases

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

本研究は、病理組織学的に基底層の異型が口腔異型上皮の癌化を予測する因子となり得るかを客観的に検討した研究である。研究手法は、口腔異型上皮 96 症例(癌化症例 38 症例、非癌化症例 58 症例)に対し、基底層の異型を中心とした 12 項目の病理組織学的指標を抽出し形態計測学的に定量化した上で、Cox 比例ハザード解析にて統計学的に解析した。その結果、基底層の異型は口腔異型上皮の癌化を予測する因子として有用であること、さらにその中でも、基底細胞の上端と基底膜との距離の標準偏差、即ち基底細胞の配列の乱れが、最も有用であると考えられた。

＜背景＞

口腔異型上皮は世界保健機構 (World Health Organization、以下ＷＨＯ)によって、病理組織学的に mild, moderate, および severe dysplasia の 3 種類に分類されている。しかし、この分類が癌化リスクと相関するか否かは未だに議論がある。そこで現在まで、口腔異型上皮の予後を予測する有用な因子が求められてきた。例えば現在、様々な分子生物学的指標が提唱されているが、そのほとんどが技術的に困難なものであり、日常臨床に浸透していない。そのような状況下で日本の幾人かの研究者は、病理診断をする上で最も基盤となる形態学的な観点から、病理組織学的に基底層の異型が口腔異型上皮の癌化を予測するのに有用であることを示唆している。しかし、その客観的なデータは存在せず、その示唆を裏付けるための解析が求められていた。そこで本研究は、病理組織学的に基底層の異型が口腔異型上皮の癌化を予測するのに有用であるか否か、また有用であるとすればその中でもどのような異型が相対的に最も有用であるかを、客観的手法を用いて解析することを目的として行われた。

＜方法＞

対象症例は、2000 年 1 月から 2014 年 12 月の間、東京医科歯科大学歯学部附属病院において、舌の生検を受けた一次症例のうち、mild, moderate, または severe dysplasia と診断された症例である。それらの症例に対し、以下の病理組織学的項目 12 項目について形態計測学的に定量化を行った。

Factor1→角化層の最大厚さ、Factor2→角化層を除いた上皮層の最大厚さ、Factor3→上皮層全体の最大厚さ、Factor4→基底細胞核の平均面積、Factor5→基底細胞核の面積の標準偏差、Factor6→基底細胞核の円形度の標準偏差、Factor7→基底細胞核の縦横比の標準偏差、Factor8→基底細胞核の上端から基底細胞下端までの距離の平均、Factor9→基底細胞上端から基底膜までの距離の標準偏差、Factor10→基底細胞核の長軸と基底膜から引いた垂線との角度の標準偏差、Factor11→基底細胞の密度、Factor12→100μm 四方の正方形中の細胞密度。次に、Cox 比例ハザード解析にて多変量解析を行った。その際、単変量解析で有意確率が 0.1 より小さかった項目を多変量解析に投入し、項目同士の相関は分散増幅因子(Variance inflation factor; 以下 VIF)を用いて検討した。さらに多変量解析に投入された項目について受信者動作特性曲線(Receiver Operating Characteristic curve; 以下 ROC 曲線)を用いて、曲線下面積を算出した。最後に、最も曲線下面積が高かった項目の 25,50,75 パーセンタイル値にて対象症例を均等に 4 分割し、4 グループ間で年齢・性別・対象症例のうち癌化したものの割合の 3 項目について統計学的検討を行った。形態計測学的解析に用いたソフトは WinROOF ver.6.4(三谷社)、統計学的解析に用いたソフトは SPSS ver22.0(IBM 社)である。

＜結果＞

対象症例は 96 症例となった。そのうち、癌化した症例(以下、癌化群)は 38 例、癌化しなかった症例(以下、非癌化群)は 58 例であった。2 群間で年齢・性別・診断名の割合に、統計学的に有意差は認めなかった。単変量解析では、Factor4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 が、すべて有意確率が 0.05 より小さく、癌化を予測するのに有用な因子として抽出された。その中で Factor5, 8 は VIF が高く他の因子と高い相関を持っていると考えられたため、多変量解析に投入される項目から除外された。多変量解析の結果、Factor9 が、癌化を予測する因子として最も有用な因子として抽出された(P<0.001, ハザード比：3.124)。さらに、ROC 曲線を引いたところ、Factor9 の曲線が他の Factor の曲線と比べてグラフの最も左上端に近づいており、曲線下面積も最も大きかった(面積=0.979)。最後に、Factor9 の 25, 50, 75 パーセンタイル値で症例群を均等に 4 分割し統計学的に検討した結果、4 群間で年齢・性別に有意差は認めなかったものの、Facor9 の値が大きくなるほど、癌化した症例の割合が有意に上昇していた(P<0.001)。

＜考察＞

本研究は、病理組織学的に基底層の異型が口腔異型上皮の癌化を予測する因子として有用であると客観的に示した初めての研究である。その結果を考察すると、まず、単変量解析の結果から、基底層の異型が口腔異型上皮の予後の予測に有用であると考えられた。さらに、多変量解析の結果から、その中でも Factor9、すなわち基底細胞上端から基底膜までの距離の標準偏差が最も有用であると考えられた。そして、その有用性は ROC 曲線下面積の比較や、症例群を 4 分割した上で統計学的解析を行った結果からも裏付けられた。Factor9 の標準偏差は、基底細胞の配列の乱れを定量化した因子である。よって、本研究の結果から、基底細胞の配列の乱れの程度が口腔異型上皮の予後を予測する有用な因子であることが示された。

一方、本研究にはいくつかの課題がある。まず、本研究は舌以外の口腔内亜部位については検

討を行っていないということである。次に、技術的要因によって核・細胞質比をはじめとした他の病理組織学的な異型の因子について検討を行えていない。さらに、本研究は後ろ向き研究であることから、非癌化群の症例が経過観察期間終了後に癌化し得た可能性は排除できない。これらの課題を考慮し、今後は口腔内の他の亜部位、ならびに他の病理組織学的因子も含めた前向き研究が必要であると考えられた。

＜結論＞

われわれは、病理組織学的に基底層の異型が口腔異型上皮の癌化を予測する因子となり得るかを客観的に検討した。研究の結果、病理組織学的に基底層の異型は口腔異型上皮の癌化を予測する有用な因子であり、さらにその中でも基底細胞の配列の乱れが最も有用である、と結論づけられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5102　号	岡村　武志
論文審査担当者	主　査　柴田俊一 副　査　原田浩之、田畑純	
論 文 題 目	Disordered arrangements of basal cells as a prognostic factor for oral epithelial dysplasia: a morphometric study of 96 cases	

（論文審査の要旨）

＜要旨＞

今般、口腔異型上皮の癌化を予測するのに有用な因子が求められている。現在、世界で共通で使われているものとしてはWHOによる分類があるが、癌化のリスクと相関するか否かについては未だに議論がある。また、様々な分子生物学的指標も提唱されているが、日常臨床で容易に適用できるものは存在しない。そこで岡村武志は、日本の幾人かの研究者が、病理組織学的に基底層の異型が口腔異型上皮の癌化を予測する有用な因子であると提唱していることに注目した。ただしこの理論は経験的背景としたもので客観的データを基にした論理的背景がなかったことから、本学歯学部附属病院における多数の症例を基にして、形態計測という客観的な手法を用いて検討を行えば、理論的に有用な裏付けができるのではないかと考えた。この着眼は、きわめて優れたものであると評価された。

本研究で得られた結果は次の通りである。

１．形態計測学的手法を用いて基底層の異型を中心とした 12 項目の病理組織学的因子を定量化することにより、それまで病理医個人の眼に委ねられていた異型の程度を、客観的な数値として算出することに成功した。

２．Cox 比例ハザード解析を用いた統計学的検討により、まず単変量解析の結果から、検討した 12 項目のうち、基底層の異型を中心とした 7 項目が口腔異型上皮の癌化を予測するのに有用な因子として抽出された。

３．次に多変量解析の結果から、その中でも特に、基底細胞上端から基底膜までの距離の標準偏差の因子が相対的に最も有用な因子として抽出された。

４．受信者動作特性曲線（Receiver Operating Characteristic curve; ROC 曲線）下面積は、基底細胞上端から基底膜までの距離の標準偏差の因子が最も大きかった。

５．さらに、基底細胞上端から基底膜までの距離の標準偏差の 25, 50, 75 パーセンタイル値により症例群を均等に 4 分割し統計学的検討を行ったところ、値が大きくなるほど、癌化した症例の割合が有意に上昇していた。

以上の結果から、岡村は病理組織学的に基底層の異型が口腔異型上皮の予後を予測する有用な因子であることを見出し、さらにその中でも基底細胞の配列の乱れが最も有用であると考え

た。さらにそれだけでなく、他の統計学的手法も加味することにより、その結果の裏付けをとり、臨床的に有用である可能性も示した。さらに、今後は口腔内の他の亜部位、ならびに他の病理組織学的因子も含めた前向き研究を行う必要があるとの展望を述べている。

今般、口腔異型上皮の癌化を予測する有用な因子が求められているなかで、岡村の注目した要素は、すべての病理診断の基本となるヘマトキシリン―エオジン染色標本で解析可能なものであり、汎用性があるものである。さらに、形態計測的手法を用いることにより、病理組織学的な異型を、診断者の経験値によらず客観的に定量化することに成功した。また多変量解析という比較的新しい統計学的解析手法を用いることにより、検討項目同士の中での相対的な有用性も検討することができている。実際に統計学的解析を行うにあたり、本学歯学部附属病院における多数の症例を用いて行い、その結果に剛強性を持たせることを意識したことも大いに評価できる。本研究を通じて岡村が示した以上の結果は、診断者の経験値や、検索過程が複雑で難しい分子生物学的指標によっていたこれまでの口腔異型上皮の予後の診断基準に日常臨床で適用することが可能な新たな基準を加えるものである。

以上のことから、本研究は、口腔異型上皮の癌化を予測する有用な因子の探索に重要な示唆を与える研究であり、今後の口腔病理学、歯科医学の発展に寄与するところがたいへん大きいものであると考えられる。よって本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	浦羽　真太郎
論文審査担当者	主査　倉林　亨 副査　荒木　孝二　　大槻　昌幸
論　文　題　目	Ability of cone-beam computed tomography to detect periapical lesions that were not detected by periapical radiography: A retrospective assessment according to tooth group

【緒言】

歯内領域におけるエックス線画像検査は，術前・術後診断、治療計画立案や予後調査に必要不可欠である．口内法 X 線撮影（以下 PR）はこの目的で今なお最も一般的に適用されているが，本法は三次元の構造物を二次元の画像に変換するため，撮影対象と他の構造物が重なり合うことで，根尖病変を必ずしも正しく画像として反映できないという限界がある．こうした PR における問題点を克服し得るのが 1990 年代後半に開発されたコーンビーム CT（以下 CBCT）である．すなわち CBCT では撮影対象の三次元的観察，あるいは構造物の重なりの影響を排除しつつ任意の断面像を確認することが可能であり，PR より高い根尖病変検出能を備えた有効な検査法であるとする多くの報告がなされている．

ところが CBCT は PR より被曝線量が高いため，現行のガイドラインでは歯内治療目的でのルーチンの撮影は適切とは認められていない．従って，臨床の場で「CBCT 撮影を行うかどうか」の判断に資するものとして，歯や周囲構造の形態的相違に基づく PR の根尖病変検出能の歯種間での相違についての知見を得ることは有益と思われる，ところが，PR で検出できない根尖病変に対する CBCT の検出能について，歯種間で比較した調査は限られている．本研究の目的は，既根管処置歯における「PR では検出されない病変」に対する CBCT の検出能について，歯種ごとに検討を行うことである．帰無仮説は，CBCT の「PR では検出されない病変」の検出能は歯種間で差がない，とした．

【材料および方法】

本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号第 1010 号）．東京医科歯科大学歯学部附属病院むし歯外来（歯内）を 2012 年 1 月から 2014 年 6 月の期間に受診し，CBCT 撮像を行った患者のデータを研究対象とした．被験歯として，CBCT の撮影領域（以下 FOV）内にある検査対象歯以外の既根管処置歯のうち，PR の検査データが存在するものを選択した結果，86 名の患者（平均 55.17 歳（SD11.53），男性 16 名、女性 70 名）から 178 歯が対象となった．

CBCT 撮影にはファインキューブ（ヨシダ製作所、日本）を使用し，撮影条件として FOV は直径 56mm×高さ 51mm，管電圧 90kV，管電流 4mA，撮影時間は 16.8 秒とした．撮影された画

像はスライス厚 0.14mm で再構成を行い，各断面において観察ができるようにした．PR については 2013 年 12 月以前のものに関してはフィルムによるアナログ撮影が行われていたため，フィルムをスキャナーにて取り込み JPG 形式の画像として保存，2014 年 1 月以降のものはデジタル撮影によって得られた JPG 形式の画像を使用した．

エックス線写真上の根尖と接する透過像で歯根膜腔幅径の 2 倍以上のサイズのものを根尖病変と定義し，CBCT 画像においては同様の所見が複数の断面画像で観察されることを要件とした．複根歯の場合は全ての識別可能な根に対して評価を行い，1 根でも病変が認められる場合は病変ありとした．

画像評価は，歯科医師 2 名（CBCT 使用経験 4 年及び 15 年）が行った．CBCT 画像での病変の有無を記録し，結果に対し意見の相違があった場合は討議を行いコンセンサスを得た．得られた CBCT 画像での評価結果をゴールドスタンダードとして用いた．PR 画像についてはそれぞれ 2 週間以上の期間を空けて 2 度評価を行い，感度，特異度，陽性的中率（PPV），陰性的中率（NPV）及び正答度を算出した．

統計学的解析は統計用ソフトウェア（SPSS）を用いて行い，McNemar 検定により CBCT と PR の病変検出能の比較を行った（有意水準 5%）．観察者内および観察者間の一致度に対してはカッパー分析を行った．

【結果】

全被験歯における根尖病変検出率は，PR が 31.5%（56 / 178 歯），CBCT が 52.2%（93 / 178 歯）であり，CBCT が PR と比較して高い結果となった（31.5% 対 52.2%，$p < 0.0001$）．CBCT で病変ありと判定された 93 歯のうち 42%にあたる 39 歯については PR では病変なしと判定された（$p < 0.0001$）．

歯種別に見ると，CBCT で検出されたが PR では検出されなかった病変は，上顎前歯で 23.2%（16 / 69 歯）及び上顎大臼歯で 34.6%（9 / 26 歯）の割合で存在し，この 2 群において検出能力に有意な差が認められた（$p < 0.05$）．

CBCT をゴールドスタンダードとした場合の PR の感度・特異度・PPV・NPV・正答度は、それぞれ 0.58，0.98，0.96，0.68，0.77 であった．

2 名の観察者内一致度は 0.91 及び 0.73，2 回の判定における観察者間一致度は 0.68 と 0.65 であった．

【考察】

本研究では，既根管処置歯において，PR で検出されず CBCT では検出が可能であった病変の出現頻度について検討を行った．調査対象全体における病変検出率は，CBCT が PR と比較して有意に高い値であった．PR の感度・特異度・PPV・NPV・正答度は、いずれも過去に行われた他の研究と同様の結果となった．PPV は 1 に近い値となり，PR において病変が検出された場合，同様の結果が CBCT においても得られることを示している．一方で NPV0.68 が示すように，PR において病変が認められないケースの約 3 分の 1 において病変が正しく検出されず見落とされる結果となっている．実際の臨床の場において，PR の読影を行う場合，偽陰性の判定を行ってし

まう可能性があることに十分注意する必要がある．

本研究では CBCT 撮影の検査対象歯は調査対象から除外した．これは，本研究では CBCT は全例において歯内治療目的での撮影であったことを理由とする．すなわち，検査対象歯の大部分では PR で根尖病変がすでに確認されており，この種のサンプリングバイアスが PR の病変検出能の過大評価につながる可能性が想定されたためである．

本研究において，上顎前歯部及び大臼歯部において病変検出能が PR と比べて CBCT で有意に向上する結果となり，帰無仮説は棄却された．従って，「PR では検出されない病変」に対する CBCT の適用は，これらの歯種で特に有用であることが示唆された．

上顎大臼歯は PR での診断が困難となりうる部位であることが知られており，今回の結果もこの見解を支持するものであった．これは，同部位では複数の歯根や上顎洞、頬骨弓などの解剖学的形態の画像上での重なりが生じやすいことを主たる理由とする．とりわけ，根分岐部内の病変は歯根の重なりによって読影が難しく，また上顎洞底に近接している病変も PR では検出が難しいことが報告されおり，本研究においても同様の結果が得られた．

一方，本研究では上顎前歯部で PR が CBCT より有意に低い病変検出能を示すとの結果が得られたが，これは同部位における解剖学的ノイズの影響を看過すべきでないことを示唆するものである．すなわち上顎前歯部では歯槽骨が口蓋側方向で厚く，それが PR において病変の検出を困難にしている一因と考えられる．また，唇側では皮質骨が薄く，根尖突出のように PR による読影が困難な形態となることも多く，特に病変が歯根の唇側面もしくは口蓋側面に沿って伸展した場合は，歯根や口蓋側の骨の重なりのため検出が困難になると思われる．

今回の調査は対象を既根管処置歯としたが，これは後ろ向き調査では未根管処置歯の歯髄の生活性を判断できないためである．当該歯や隣在歯の根管充填材やポスト等の補綴装置に起因するアーチファクトによって CBCT 画像の読影が困難になり得る点を考慮すると，今後，未根管処置歯における根尖病変の検出に関して，歯髄の生活反応の有無を含めた前向き調査が必要であると考えられる．

【結論】

本研究の結果，PR での検出が困難な病変に対する CBCT の検出能を評価したところ，上顎前歯部及び大臼歯部において有意な差が認められた．従って，CBCT による病変の検出は，とりわけ上記の部位で有効性が高いことが示唆された．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲第　5103　号	浦羽　真太郎
論文審査担当者	主　査　倉林　亨 副　査　荒木　孝二　　大槻　昌幸	
論文題目	Ability of cone-beam computed tomography to detect periapical lesions that were not detected by periapical radiography: A retrospective assessment according to tooth group	

（論文審査の要旨）

歯内領域におけるエックス線画像検査は，診断，治療計画立案や予後調査に必要不可欠である．口内法 X 線撮影（以下 PR）は現在なお最も一般的な検査法であるが，本法で得られる二次元画像では撮影対象が他の構造物と重なり合うため，根尖病変の存在を必ずしも画像として反映できない．一方，コーンビーム CT（以下 CBCT）では，構造物の重なりの影響を排除しつつ任意の断面像を観察することが可能であり，PR より高い根尖病変検出能を備えるとの多くの報告がなされている．ところが CBCT は PR より被曝線量が高く，現行のガイドラインでは歯内治療目的でのルーチンの撮影は適切とは認められていないため，CBCT 撮影の必要性を症例に応じて判断することが臨床上重要となる．PR の根尖病変検出能が歯や周囲構造の形態的相違に影響を受けると考えられることから，CBCT 撮影の必要性判断に資する情報として，PR の根尖病変検出能の歯種間での相違を検討することは有意義と考えられる．

本研究は，上記のような状況を背景として，既根管処置歯における「PR では検出されない病変」に対する CBCT の検出能について歯種ごとに検討を行ったものであり，その着眼は十分評価に値するものである．

本研究では，東京医科歯科大学歯学部附属病院むし歯外来（歯内）を 2012 年 1 月から 2014 年 6 月に受診し CBCT 撮像を行った患者データより，CBCT の撮影領域内にある既根管処置歯で PR の検査データが存在する歯が研究対象とされている．さらに，サンプリングバイアスを避けるため CBCT 検査の対象歯以外の歯を選択した結果として，178 歯（患者 86 名）のデータが使用されている．これらの被験歯に対して，2 名の評価者が CBCT および PR での根尖病変の有無を評価したのち，CBCT をゴールドスタンダードとして PR における根尖病変検出の感度，特異度，陽性的中率，陰性的中率，正答度が算出されるとともに，CBCT と PR の病変検出能が McNemar 検定を用いて比較されている．なお，PR については，2 週間以上の期間を空けて 2 度評価が行われるとともに，観察者内および観察者間の一致度がカッパ分析で検討されている．以上の研究方法は，PR では検出されない病変に対する CBCT の検出能の評価・解析を行う上で周到かつ適切なものと判断される．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 全被験歯における根尖病変検出率は，PR が 31.5%（56 / 178 歯），CBCT が 52.2%（93 / 178 歯）であった．
2. CBCT で検出されたが PR では検出されなかった病変は，上顎前歯で 23.2%（16 / 69 歯）及び上顎大臼歯で 34.6%（9 / 26 歯）の割合で存在し，この 2 群において検出能に有意な差が認められた（$p < 0.05$）．
3. 2 名の観察者内一致度は 0.91 及び 0.73，2 回の判定における観察者間一致度は 0.68 と 0.65 であった．

以上のように，本研究では PR では検出されない根尖病変に対する CBCT の検出能の評価・解析が行われており，上顎大臼歯部のみならず上顎前歯部においても PR による根尖病変検出の妨げとなる解剖学的ノイズの存在を看過すべきでないことを指摘するとともに，CBCT での根尖病変の検出が上記の歯種において特に有効であると考察している．

本研究は，近年普及が進んでいる CBCT の根尖性歯周炎の診断における有効性，および PR の診断上の限界を新たな着眼点から示すとともに，患者の放射線被曝量低減にも貢献しうるものである．得られた知見は臨床的に非常に有益な情報であり，歯科医学・医療の今後の発展に寄与するところが大きいと考えられる．従って，本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められる．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐藤　瑞希
論文審査担当者	主 査　　若林　則幸 副 査　　宇尾　基弘、　上野　剛史
論　文　題　目	Effect of strontium ions on calcification of preosteoblasts cultured on porous calcium- and phosphate-containing titanium oxide layers formed by micro-arc oxidation

＜諸言＞

Ti や Ti 合金はその良好な機械的特性や高い耐久性、低い細胞毒性から、歯科領域においてインプラント材料として用いられている。Ti あるいは Ti 合金を骨内に埋めると骨と接合する現象は、オッセオインテグレーションと呼称されている。Ti や Ti 合金のオッセオインテグレーションを改善するために、プラズマスプレー法やソルーゲル法、電気化学堆積法などの様々な表面修飾方法が開発されてきた。これらの修飾方法の中で、マイクロアーク酸化（MAO）は、金属表面に酸化皮膜を堆積させるための簡便で効果的な技術として注目された。MAO によって、骨形成において重要な役割を果たす微量元素を、多孔質構造の酸化層に取りこませることが可能である。Sr はインプラントのオッセオインテグレーションを改善する元素の１つと考えられている。Sr イオンは骨のコラーゲン合成を促進し、破骨細胞の骨吸収活性を抑制して、骨量を増加させることが報告されている。したがって、インプラント表面から局所的に Sr イオンを放出させることによって、オッセオインテグレーションの促進が期待できる。これまでの我々の研究から、MAO が、金属基板の上に骨形成に関連する元素を含む多孔質の緻密な酸化皮膜をつくる有望な方法であることが示された。したがって、MAO における電解質組成を変えることで、酸化物堆積層中の Sr 量を最適化することが可能である。更に、酸化皮膜に取り込まれた金属イオンは、MAO によって形成された微小多孔質の構造から長期間安定して放出される。そこで、本研究においては、前骨芽細胞による石灰化を促進するために、異なる Sr 濃度の電解液を用いて MAO をおこなって Ti 表面を修飾した。Ti 試料表面とその横断面の形態および元素組成は、走査電子顕微鏡検査（SEM）とエネルギー分散型Ｘ線分光分析（EDS）により解析した。MAO による酸化皮膜中の Sr 含有量が、骨形成に及ぼす作用を検討するために、マウス由来の前骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。試料上で培養した MC3T3-E1 細胞の分化と石灰化組織形成は、アルカリホスファターゼ（ALP）活性の測定とアリザリンレッド S を用いた染色によって評価した。

＜方法＞

円板状の純 Ti（JIS2 種、8 mmφ）を#800 まで湿式研磨後、超音波洗浄を行い、12mA^2 の定電流で上限電圧を 420 V に設定し、600 s 通電し MAO を行った。電解液の組成および各電解液から得た試料の名称を表１に示す。各試料は Calcium glycerophosphate を一定量（0.10 mol/L）含有し、Sr 濃度によって、Sr0M（Strontium acetate = 0 mol/L、Calcium acetate = 0.15 mol/L）、Sr0.05M（同 0.05 mol/L、0.10 mol/L）、Sr0.1M（同 0.10 mol/L、0.05 mol/L）、Sr0.15M（同 0.15 mol/L、0 mol/L）と命名し、未処理の Ti 試料は BMAO とした。試料の表面分析には SEM/EDS を用いた。

試料の上で MC3T3-E1 細胞を培養し、培養 6, 10, 14 日後に、細胞数と ALP 活性を測定した。また、石化化組織形成を、アリザリンレッド S 染色をおこなった後に、その面積を Image J を用いて測定して、評価した。

＜結果＞

Ti 表面および断面 SEM 像から、電解液の Sr の濃度変化は、Ti 表面の多孔質の酸化物層の形成に影響を及ぼさないこと、EDS の解析結果から、各元素が酸化物層中に均一に分布することが明らかになった。電解液の Sr 濃度の上昇によって、酸化物層中の Sr 濃度は高くなり、電解液の組成が酸化物層の組成に影響することが明らかになった。

MAO 処理した Ti 試料上で培養した細胞は、14 日後に未処理 Ti（BMAO）上で培養した細胞に比較して、ALP 活性が高かった。特に Sr を 0.15mol/L を含んだ MAO 電解液で処理された試料（Sr0.15M）上で培養した細胞は、培養 10 日後に ALP 活性が高かった。また、骨様組織の石灰化は、培養 21 日で全ての Sr 含有 MAO で、28 日では Sr0.1M 以上の MAO で、促進された。

＜考察＞

本研究で用いた MAO は極めて簡便で、微小多孔質構造内に特定の金属元素を含む酸化 Ti 層を形成することが可能である。MAO の作動電圧と電流を変化されることで、素地に形成される微小孔多孔質構造を制御することが可能である。本研究においては Ca と Sr の濃度を除いて、MAO は一定の条件で行い、電解液の Sr の濃度の変化が、表面に形成される微小構造の酸化層に影響しないことを明らかにした。MAO の処理時間が一定であれば、全ての試料上で同様の厚さの微小多孔質構造が形成された。MAO を用いることで、Ti 試料上に微小多孔質構造の酸化層を形成させ、その酸化層中に異なる濃度の Sr を含有させ、さらに、Sr、Ca、P 等を含む全ての元素が、均一にこの層の中に分布することが明らかになった。

電解液中の Sr 濃度が高くなれば、酸化層中の Sr 濃度も高くなることが明らかになった。表面の酸化物層の微小孔構造形態と厚みは、MAO 処置の条件を変えることによってコントロールできる。しかし、MAO による微小孔構造酸化物層中の Sr の正確な濃度をコントロールすることは困難であった。

Ti 試料に Sr を含有する微小孔構造酸化物層を形成させることが可能であったので、MC3T3-E1 前骨芽細胞を用いて、材料が細胞増殖、骨芽細胞分化と骨様の石化化組織形成に及ぼす影響を評価した。MAO の電解液中の Sr を 0～0.15Mまで変化させたが、処理した材料上で培養した細胞の増殖は変化しなかった。しかし、MAO が施された試料上に付着した細胞数は、BMAO（未処理）の試料上に付着した細胞数より少なかったので、MAO が細胞増殖に影響を及ぼす可能性が考えられる。この現象は、微小孔構造の酸化層から放出される金属イオンが多ければ、より高い細胞ストレスを誘導し、細胞増殖に関連した細胞シグナリングに影響を与えることによって説明できる可能性がある。

MAO によって、微小孔構造の酸化層上/中に Sr，Ca，P を取り込ませることによって、骨芽細胞の分化は促進された。培養 14 日後の微小孔構造酸化層上の MC3T3-E1 細胞は高い ALP 活性を示し、骨芽細胞への分化が促進された。特に培養 10 日後では Sr0.15M の試料上でのみ高い ALP 活性が見られた。従って Sr を電解液中に加えることは骨芽細胞分化促進効果を示し、Sr を 0.15M 含んだ電解液で MAO をおこなった試料は特にその効果が高い。MAO によって産生される Sr を含有する微小孔構造酸化物層が骨芽細胞分化を促進し、その細胞によって形成される骨様組織の石灰化に影響を及ぼす可能性が考えられる。アリザリンレッド S 染色によって、MAO が施された試料表面のほぼ全域が深紅色に染色された。興味深いことは、電解液の Sr 濃度の上昇が微小孔構造の酸化層の Sr 含有量を増加させ、材料表面上に形成された骨様組織の石灰化した部位の面積を増加させることである。微小孔構造の酸化層に取り込まれた Sr 量を増加させることで、Ti 基板表面のオッセオインテグレーションの改善が期待できる。

培養細胞において、0.1mM の Sr イオン濃度が骨芽細胞分化を促進し、骨様の結節形成を増加させることが報告されている。Sr は骨粗鬆症の治療薬として臨床応用されており、骨粗鬆症患者における血中活性濃度として 0.12mM が用いられている。しかし、過度に高い Sr 濃度では、オステオネクチン、Cbfa1、骨シアロプロテインの発現が減少し、骨芽細胞の分化が抑制される。本研究では、MAO の電解液として高い Sr の濃度を用いた。他の表面修飾方法と比較すると、目的とする金属イオンの材料表面への取り込みは安定しており、MAO 処理によって材料からのイオンの放出は継続した。初期に比較的高い濃度の Sr が微小孔構造の沈着コーティングから放出されるが、その後長期間、安定して低濃度の Sr イオンの放出が継続する。

本研究において、MAO によってチタン表面に Sr を取り込ませることは骨芽細胞の分化を促進し、材料表面に形成される骨様組織の石灰化を亢進することが示された。MAO によって形成された Sr 含有微小孔酸化層は、インプラントのオッセオインテグレーションの向上に寄与する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5104　号	佐藤　瑞希
論文審査担当者	主 査　　若林　則幸 副 査　　宇尾　基弘、　上野　剛史	
論 文 題 目	Effect of strontium ions on calcification of preosteoblasts cultured on porous calcium- and phosphate-containing titanium oxide layers formed by micro-arc oxidation	

（論文審査の要旨）

チタンあるいはチタン合金は、骨内に埋入すると骨と接合し、骨内で安定して固定されるため、歯科用インプラント材料として用いられている。骨との結合（オッセオインテグレーション）を向上させるために、様々な表面の改変技術が開発されている。マイクロアーク酸化(MAO)は、そのような表面改変技術の一つであり、多孔性の酸化層を容易に形成できる。さらに、電解溶液中に何らかのイオンを添加することで、そのイオンを酸化層中に含有させることが可能である。一方、ストロンチウム(Sr)は骨芽細胞による骨形成を促進し、破骨細胞による骨吸収を抑制することが報告されており、骨粗鬆症の治療薬として既に臨床応用されている。このような背景を基に、佐藤瑞希が、MAO を用いチタン表面への Sr 含有酸化層の形成条件について検討する本研究をおこなったことは、高く評価できる。

MAO の条件は一定にして、電解液中の Sr 濃度を変化させ、形成された酸化層を、SEM および EDS により解析した。また、各電解液中で MAO した試料上で、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を培養し、細胞の増殖および骨芽細胞分化に及ぼす作用について検討した。一定期間培養し、ミトコンドリアの酵素活性とアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定することで、細胞増殖と骨芽細胞分化をそれぞれ評価した。本研究で用いられたこれらの実験手法は適切であったと判断される。

本研究の実験結果は以下である。

1. 電解液中の Sr 濃度は、MAO によって形成させる酸化層の微細構造を変化させなかった。
2. 電解液中の Sr 濃度が増加すると、形成された酸化層中の Sr 濃度が増加した。
3. 電解液中に Sr を加えて MAO した試料上では、骨芽細胞の分化と骨様組織の石灰化が促進された。
4. この促進効果は、Sr を 0.15mol･L^{-1} を含む電解液で MAO した試料で顕著であった。

論文中に、これらの実験結果が明確に記載されていることを確認した。

これらの実験結果について、過去の報告された研究を引用し、適切に考察がなされていることを確認した。特に、高濃度の Sr は骨芽細胞の分化促進効果ではなく、抑制効果を示すことが懸念される。しかし、論文中で、試料からの Sr の放出パターンと、過去の論文での Sr の影響から、Sr の骨芽細胞への影響についても適切に考察がなされていることを確認した。

MAO において電解液中に Ca と P を加えることで、材料表面に形成される多孔質酸化層中に Ca と P を付加することが可能である。MAO によって Ca と P を含む材料表面は、骨芽細胞の分化を促進することが知られており、このような表面処理をおこなったインプラントは臨床応用されている。本研究においては、さらに MAO の電解液中に Sr を添加することによって、酸化層に Sr を付加することが可能であり、そのような表面処理をおこなった材料表面では、骨芽細胞の分化の促進と、骨様組織の石灰化が亢進することが明らかになった。そして、Sr を 0.15mol･L^{-1} を含んだ MAO 電解液で処理することで、これらの促進効果が最も高いことを示した。

以上のように、本論文は、陽極酸化法を用いた歯科インプラントの表面の改変処理に関して重要な情報を提供している。本論文の内容は、骨との結合が極めて強固な歯科インプラントの開発に繋がるものであり、歯科インプラント学および歯科の生体材料工学の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。よって本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	新井　祐貴
論文審査担当者	主査　和泉　雄一 副査　春日井　昇平　　鵜澤　成一
論　文　題　目	Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

抜歯後の歯槽骨は三次元的な吸収を引き起こし，結果として顎堤の減少が起こる．顎堤の減少は，義歯やインプラントによる補綴治療の予後不良因子となるため，抜歯後の歯槽骨保全のために血小板凝集因子や rhPDGF, rhBMP-2 などの成長因子・サイトカインが使用されてきた．それらの中でも，rhBMP-2 は骨修復において強力で効果的なサイトカインであるが，高用量の使用において腫脹や浮腫，発がんリスクの増加という副作用を持つことが報告されている．そのため，rhBMP-2 の使用量を減らす試みが行われてきた．タンパク製剤と比較して，ペプチド製剤は抗原性と製作コストの低さから有益である．破骨細胞形成の促進因子 RANKL のアンタゴニストペプチドである OP3-4 は，骨吸収抑制することが報告されている．また，OP3-4 は全身的な適用により骨形成を促進することが報告されている．しかしながら，OP3-4 の局所適用が局所の骨形成による歯槽骨保全に有効かどうかは明らかではない．

本研究の目的は，OP3-4 の局所投与が，十分な骨形成を示さない最小限の rhBMP-2 との併用により，マウス抜歯窩骨新生モデルにおいて抜歯窩内部の骨形成を促進し，抜歯により起こる骨減少を防止するかを検証することである．

＜方法＞

シート状のゼラチンハイドロゲル(GH)を，幅 1 mm，長さ 5 mm に切断し，rhBMP-2 を 1 µg，OP3-4 とその control peptide それぞれのペプチドを 0.56 mg（DMSO 2 µl に溶解）GH に添加し，室温にて 4 時間放置した．マウスの下顎左側切歯を麻酔下にて抜歯し，薬剤を添加した GH を填入した．薬剤により a) 溶媒群(VEH 群)，b) BMP-2 単独群(BMP 群)，c) BMP-2 と OP3-4 併用群(BMP/OP3-4 群)，d) BMP-2 と control peptide 併用群(BMP/CTRP 群)の 4 群とした（各群 6 匹ずつ）．抜歯後 8 日目にカルセインを，13 日目にアリザリンをマウス背部皮下に注射し，骨ラベリングを行った．抜歯後 21 日で安楽死させ，両側下顎骨を摘出し，固定後 PBS にて洗浄した．抜歯後の顎堤減少の評価として，左右下顎骨を軟 X 線撮影し，解析を行った．第一大臼歯近心咬頭と抜歯窩の先端とを結んだ直線の長さを，抜歯側(a)と非抜歯側(b)から計算し，顎堤の減少率(1-a/b)として解析した．また，µCT 撮影および pQCT 撮影を行い，オトガイ孔から 1mm 前方における解析を行った．pQCT 解析では，骨密度 690 mg/cm^3 以上を周囲皮質骨とし BMC および BMD の解析を行った．その後，非脱灰凍結切片を用いて，骨形態計測を行った．

＜結果＞

μCT 再構築像より抜歯窩内部に海綿骨状構造が認められ，BMP/OP3-4 群は他の 3 群よりも多くの海綿骨状構造が現れていた．pQCT 解析より， 抜歯窩内部の BMC と BMD は BMP/OP3-4 の群において他の 3 群と比べ有意に高かった．組織学的解析では，Von Kossa 染色の結果，BMP/OP3-4 の群の抜歯窩内部には多くの石灰化した骨が認められ，X 線学的解析と同様の所見であった．蛍光標識ラベルの結果では，抜歯窩内部のカルセインのラベルは BMP/OP3-4 群が他の 3 群に比べ変わらない一方で，アリザリンにラベルされた部位は，BMP/OP3-4 の群が他の 3 群に比べ有意に広く，13 日目での顕著な骨形成活性が示された．また，軟 X 線による歯槽骨の吸収評価では，VEH 群で約 3%の歯槽骨の減少が認められ，BMP/OP3-4 群では他の 3 群と比べ有意に骨吸収の減少が抑えられていた．抜歯窩周囲の皮質骨の pQCT 解析では，周囲皮質骨の平均厚さは，BMP/OP3-4 の群が他の 3 群に比べて厚い結果を示した．組織切片にて，抜歯窩周囲骨膜上の TRAP 陽性細胞を観察したところ，特に舌側の骨面に破骨細胞が多く，BMP/OP3-4 群で他の 3 群と比較して有意に少ない破骨細胞を示した．

＜考察＞

抜歯窩モデルにおいて抜歯 21 日後の抜歯窩内部において OP3-4 が最小限の骨形成を示す rhBMP-2 の新生骨形成を促進することが示された．今回用いた 1 μg の rhBMP-2 は抜歯窩内部に十分な量の骨形成を示すことができなかった．一方で，rhBMP-2 に OP3-4 を添加した場合においては，BMC や BV/TV を増加させ，骨量を増加させた．加えて，OP3-4 を使用した群では，他の群に比べてより高い BMD を示した．OP3-4 は，rhBMP-2 なしの *in vitro* の細胞実験においてオステオカルシンや アルカリフォスファターゼの遺伝子発現を強めることが示されており，また rhBMP-2 は間葉系幹細胞を誘導する．そのため，OP3-4 によって起こった高い BMD は，rhBMP-2 と OP3-4 との細胞誘導活性と骨芽細胞分化活性の相互作用により起きた可能性がある．

他の RANKL 結合ペプチドである W9 も骨形成遺伝子発現やアルカリフォスファターゼ活性を強めることで骨芽細胞の分化を促進することが報告されている．この W9 の効果がワイルドタイプマウスで確認されたが，RANKL-K.O. マウスでは少なかったことから，W9 の引き起こす骨芽細胞分化には少なくとも部分的に RANKL に依存したメカニズムがある可能性が示されている．そのため，RANKL 結合ペプチドである OP3-4 も，W9 と同様に RANKL に依存した方法で骨芽細胞分化を促進しているであろうと考えられている．近年の報告では，RANK を表面に覆ったビーズで骨芽細胞を刺激すると，骨芽細胞膜上の RANKL に結合し RANKL を含んだ分泌型ライソソームを放出することが報告された．これらのデータは，骨芽細胞上の膜接合型 RANKL を介した逆シグナルが骨芽細胞の分化を促進していることを示唆させている．Sims and Romas もまた，本研究の OP3-4 の研究に対する論説において，OP3-4 の引き起こす逆シグナルの可能性について示している．

切歯の抜歯は，破骨細胞形成を伴う歯槽骨の有意な減少を起こす．BMP/OP3-4 群では，破骨細胞形成の減少により抜歯後の歯槽骨欠損が減少することが示された．BMP/OP3-4 群が抜歯後の歯槽骨を保存した理由には幾つかの可能性がある．一つは，抜歯窩内部の多くの新生骨により下顎骨にかかる機械的歪みが変化した可能性である．マウスの上顎骨において一定レベルの機械

的歪みにより破骨細胞の形成が起きることが報告されている．そのため，OP3-4 を使用した群では，他の３群に比べて抜歯窩の外側の皮質骨表面における機械的歪みが少なかった可能性がある．大腿骨頸部では，機械的荷重試験や有限要素解析において，内部の海綿骨が皮質骨と同じように機械的荷重により起こる頸部骨折に抵抗し重要な役割を持つこと報告されている．それゆえに，抜歯窩内部の高い海綿骨密度は抜歯窩外側の皮質骨骨膜上の歪みを減らし，抜歯後に起こる歯槽骨の骨減少と破骨細胞形成を妨げた可能性がある．二つ目の可能性は，OP3-4 が破骨細胞分化の要素である RANKL に結合することで破骨細胞形成を阻害し歯槽骨の減少を抑えるものである．OP3-4 が計測時に GH から放出され皮質骨外側に達していたならば，破骨細胞形成を防いでいたのかもしれない．OP3-4 の骨形成効果が，抜歯後の骨減少を防ぐメカニズムとの関連性を無視することはできないであろう．他の３群に比較して OP3-4 の適用が骨減少を低下させた理由を明らかにするためにさらなる研究が必要である．

＜結論＞

本研究は，OP3-4 ペプチドの局所適応が，マウス切歯抜歯モデルにおいて少量の rhBMP-2 との併用によって抜歯窩内部の骨形成を促進することを示した．抜歯窩内部に新たにできた新生骨は歯槽骨の吸収を阻害し，歯槽骨の保全に有効であることが示唆された．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5105　号	新井　祐貴
論文審査担当者	主　査　和泉　雄一 副　査　春日井　昇平　　鵜澤　成一	
論 文 題 目	Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model	

（論文審査の要旨）

歯の抜去は歯槽骨の減少を引き起こす．それによって起こる顎堤の減少は，可撤性義歯の痛みの原因となることやインプラントの埋入位置の制限となる等，補綴治療の予後不良因子となる．そのため，抜歯と同時に骨の増生を行い，抜歯後の顎堤の減少を抑えることで．歯槽骨を保全する試みが行われている．BMP-2 は骨形成能を有するサイトカインであり，ヒトの抜歯窩の骨形成に対して有効であることが報告されている．一方，BMP-2 は高用量により腫脹や浮腫、発がん性の増加等の副作用を生じることが近年報告されている．そのため新井は、BMP-2 使用量を減らせる新規骨形成薬の開発に注目している．近年，骨吸収阻害薬として開発した RANKL 結合ペプチドである OP3-4 が，*in vitro* および全身投与による *in vivo* において骨形成作用を持つことが示された．新井は，この OP3-4 に着目し，少ない用量の BMP-2 を用いたマウス抜歯窩骨新生モデルにおいて，OP3-4 の局所における骨形成増強効果および抜歯後の骨吸収抑制作用を検討した．

10 週齢の雄性 C57BL6/j マウスの下顎切歯を抜歯し，薬剤を含ませたゼラチンハイドロゲルを抜歯窩に使用した．薬剤はそれぞれ溶媒のみ，BMP-2 のみ，BMP-2 と OP3-4 の併用，そして BMP-2 とコントロールペプチドの併用とした．抜歯窩内部の骨形成を抜歯後 21 日目にエックス線学的および組織計測学的に解析した．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．まず，抜歯窩内部の解析結果を示す。本研究で用いた BMP-2 量では抜歯窩内部における骨新生がほとんど亢進せず，BMP-2 とコントロール用ペプチドとの併用でも同様である一方，BMP-2 と OP3-4 との併用は多くの新生骨の形成を示した．BMP-2 と OP3-4 との併用群は，BMP-2 の単独群や BMP-2 とコントロールペプチドとの併用群，溶媒のみの群と比較して，抜歯窩内部の新生骨の骨塩量および骨密度が有意に高い値を示した．BMP-2 と OP3-4 の併用により，抜歯窩内部の新生骨における抜歯後 13 日目に投与したアリザリン（赤色蛍光）の取りこみ面積が増加しており，抜歯窩内の抜歯後後期の骨造成活性が他群より亢進していることを示唆している．次に，抜歯窩周囲の骨の解析結果を示す．X 線学的解析により BMP-2 と OP3-4 併用群は抜歯窩周囲の歯槽骨の長さの減少が少なく，また顎骨の厚みも厚さを保っていた．組織学的解析では，舌側の骨において少ない破骨細胞数を示した．これらにより抜歯窩内部の新生骨の早期形成が抜歯窩周囲の皮質骨の吸収を阻害する可能性が示唆された．

本研究結果は，OP3-4 が抜歯窩内部において BMP-2 の開始する骨形成を促進することを示し，より少ない BMP-2 使用量で十分な骨形成ができることを示した．また，破骨細胞の発現を抑えることで，周囲歯槽骨を吸収から保護することを示した．そのため，OP3-4 は，抜歯後の歯槽骨を保全する新規薬剤として効果を発揮することが期待出来る．

以上の成果は今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きく，よって，本論文は博士（歯学）

の学位を申請するに十分価値あるものと認められた.

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Moe　Htet
論文審査担当者	主 査　　和泉　雄一 副 査　　塙　隆夫、　坂本　啓
論　文　題　目	Decontamination of anodized implant surface with different modalities for peri-implantitis treatment: Lasers and mechanical debridement with citric acid

Introduction

Dental implants are considered a favorable treatment for single or multiple edentulous patients with a promising long-term prognosis and survival rates ranging from 95% to 99%. Despite the excellent outcome of the treatment, peri-implant diseases can arise over time. Peri-implantitis is an infectious disease characterized by crestal bone loss. Various surgical and non-surgical methods have been used to treat peri-implant. However, there is no general consensus on the most effective treatment for peri-implantitis. The aim of this study was to evaluate the effects of the four different treatment modalities: Er:YAG laser treatment, photodynamic therapy (PDT), treatment with a titanium bur alone and a combination of titanium bur and citric acid treatments on an anodized implant surface in a ligature induced peri-implantitis model in dogs.

Materials and Methods

Animals

Five healthy adult female beagle dogs (aged from 18 to 20 months, and weighing 8.7 to 9.2 kg) were used in this study. All surgical operations were performed under general anesthesia and infiltration anesthesia at the surgical site. Animal selection, management and surgical protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Tokyo Medical and Dental University.

Surgical procedures and experimental Peri-implantitis

Bilateral extraction of all mandibular premolars was performed. After a healing period of 6 weeks, full thickness mucoperiosteal flaps were raised to expose the newly created edentulous ridge. Before implant installation, 3mm x 3mm bone defects were created on the buccal side of each osteotomy site in order to enhance the progression of experimental peri-implantitis.

Three dental implants with anodized surface (3.3 mm x 10 mm) were installed in each side of the edentulous ridge of the mandibles of all five dogs. Healing abutments (3.5 mm x 3 mm) were connected to the implants, and the mucoperiosteal flaps were repositioned and sutured. Implants were left to heal in a non-submerged position for 8 weeks. A plaque control program, which included 0.12 % chlorhexidine-gluconate irrigation three times per week and scaling once a month, was maintained during the healing period.

Experimental peri-implantitis was initiated 8 weeks after implant placement. Oral hygiene measures were discontinued, and cotton with silk ligatures was placed sub-marginally around the neck of each implant. When approximately 40% of the initial bone was lost as determined by radiographic observation, the ligatures were removed and oral hygiene procedures were resumed for 3 weeks before the treatment

Treatment procedures

Full thickness mucoperiosteal flaps were raised and granulation tissues from the peri-implantitis bone defect were removed thoroughly with a plastic scaler. The peri-implant bone defects i.e. the distance from the implant-shoulder to the bottom of the peri-implant defect, were

measured by a single trained precalibrated examiner, using a periodontal probe at four sites (mesial, buccal, distal and lingual). Each implant was allocated one of the following four decontamination modalities, and allocation was randomized. Randomization was performed using a computer-generated list.

1) Er:YAG laser
2) Photodynamic therapy
3) Titanium bur alone
4) Titanium bur with citric acid

After the treatment procedures, the healing abutments of the implants were replaced with cover screws. Bioabsorbable PLLA membrane was applied over the implants and the mucoperiosteal flaps were sutured. Oral irrigation of 0.12% chlorhexidine was performed 3 times per week for 3 months. Three months after treatment, the animals were sacrificed.

Clinical evaluation

Peri-implant probing depth was recorded at baseline (before treatment) and at the time of sacrifice (after treatment) using a periodontal probe. The deepest PD value for each implant was recorded and the mean for each treatment group was obtained.

Radiographic observations

Digital radiographs were taken at baseline (ligature removal) and at the time of sacrifice (after treatment). The abutment-implant junction was used as a fixed point for implants. The measurements were made from the implant shoulder (IC) to the base of the bone defect (BD) to compare the change in marginal bone height before and after treatment.

Histological preparation and histomorphometric analysis

For the analysis of the bone area around each implant, a 1.5 x 5 mm box was drawn on both mesial and distal aspects. The bone to implant contact (BIC) was analyzed 5mm extending from the implant shoulder. BIC was defined as the length of bone surface in direct contact with the implant surface. BIC was calculated as percentage of bone surface in direct contact to the implant surface.

Results

Clinical evaluation

The mean of deepest probing depths were comparable in all the treatment groups after the healing period (paired *t*-test, $p < 0.05$), and there was no significant difference between the treatment groups.

Radiographic observation

Increased vertical bone height after the treatment was observed radiographically. The mean (± standard deviation) increases in vertical bone height after treatment were: Er:YAG 0.2 mm (± 0.6), PDT 1 mm (± 0.6), bur alone 0.7 mm (± 1.0) and bur and citric acid 1.5 mm (± 1.2). A Statistically significant difference between the groups was detected (ANOVA, $p < 0.05$) and the Tukey's test demonstrated that the bur and citric acid group was significantly higher than the Er:YAG group.

Histological analysis

The mean values (± standard deviation) for bone area around the implants after the 3 months healing period were: Er:YAG 3.02 mm^2 (± 2.11), PDT 3.17 mm^2 (± 0.93), bur alone 3.38 mm^2 (± 2.11) and bur and citric acid 4.37 mm^2 (± 0.94). There were no significant differences between any of the treatment groups (ANOVA, $p = 0.1$). Mean BIC measurements (± standard deviation) were: Er:YAG 13.76% (± 17.23), PDT 2.7% (±5.85), bur alone 8.09% (±12.15), and bur and citric acid 22.81% (14.45). A statistically significant difference between the groups was detected (ANOVA, $p < 0.05$) and the Tukey's test demonstrated that the bur and citric acid group was significantly higher than the bur alone group and PDT group.

Discussion

In this current study, the deepest probing depths were comparable in all the treatment groups. However, no significant differences in probing depth were observed between the groups. Probing depth

measurements of a dental implant may reveal the changes in soft tissue inflammation rather than the supporting tissue itself.

In contrast to previous studies, our results showed that peri-implantitis progression around anodized implant surface ceased after the treatment as did further tissue breakdown. This could be explained by the different treatment methods used in the previous studies. It was also concluded that the results of peri-implantits treatment are influenced by characteristics of the implant surface, and should be duly considered, especially for implants with complicated surface characteristics such as anodized implants.

Er:YAG laser treatment has yielded promising treatment outcomes, and is reportedly able to promote re-osseointegration in the treatment of peri-implantitis lesions. In the current study however, radiographically the Er:YAG laser group yielded an inferior result compared with the bur and citric acid group, and the difference was statistically significant. This may be due to limited instrument accessibility which was influenced by the design of the implant which has a narrower inter thread distance than the implants used in previous studies. Solely using mechanical methods for the removal of bacterial biofilms is not sufficient due to the design of the implants and their surface characteristics.

A titanium round bur was used to treat infected implant surface under copious irrigation. To the best of the authors' knowledge, this is the first study to use titanium round burs for the treatment of peri-implantitis.

It has been reported that citric acid improves blood clot adhesion to contaminated implant surfaces, and it was suggested in that report that it was an effective method for removal of an organic smear layer. However, the data achieved by the radiographic observation alone is insufficient to address the outcome of the treatment groups. In the current study, the bur and citric acid group exhibited the best outcome, based not only on radiographic measurements but also the histological analysis.

Limitations of the current study are the relative decrease sample size and the diameter of the titanium round bur used that allows partial mechanical debridement to the implant surface. Thus, the results of the bur and citric acid group might be to a greater extent due to citric acid. Also, the effect of different Er:YAG laser settings should be evaluated in relation to the complex TiUnit implant surface. Further studies using titanium round bur with smaller diameter are needed for investigating its actual mechanical decontamination effect on implant surface.

Conclusions

Periimplantitis treatment for anodized implant surface can be achieved by using mechanical as well as laser therapy. However, combining mechanical and chemical decontamination methods provide better results for anodized implant surface.

（日本語要旨）

歯が欠損した場合の治療として歯科インプラント治療（以下インプラント治療）は極めて有効であるが、治療後に起きるインプラント周囲炎が大きな問題となっている。インプラント周囲炎に対して様々な治療がおこなわれているが、有効な治療法は確立されていない。本実験の目的はビーグル犬を用いてインプラント周囲炎に対する有効な治療法について検討することである。

5匹のビーグル犬の下顎小臼歯を抜去して6週後に、インプラントを埋入し、ヒーリングアバットメントを装着した。インプラント埋入から8週後に、ヒーリングアバットメントに絹糸を巻き付けて、インプラント周囲炎を惹起した。4週間のインプラント周囲炎誘発期間を経て絹糸を除去し、絹糸を除去した3週間後に、汚染したインプラント表面に対して以下の4種類の治療をおこなった：(1)Er:YAGレーザーによる治療、(2)光線力学的療法（photodynamic therapy, PDT)、(3)チタンバー単体によるデブライドメント療法、(4)クエン酸を併用したチタンバーによるデブライドメント療法。治療をおこなってから3ヶ月後に実験動物を屠殺し、放射線学的、組織学的に評価した。クエン酸を併用したチタンバーによるデブライドメントをおこなったグループにおいて、他のグループに比較して、インプラント周囲の垂直方向の骨形成量が大きかった。本研究の結果から、陽極酸化処理されたインプラントのインプラント周囲炎の治療法として、クエン酸を併用したチタンバーによるデブライドメントが有効であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5106　号	Moe　Htet
論文審査担当者	主 査　　和泉　雄一 副 査　　塙　隆夫、　坂本　啓	
論 文 題 目	Decontamination of anodized implant surface with different modalities for peri-implantitis treatment: Lasers and mechanical debridement with citric acid	

（論文審査の要旨）

歯が欠損した場合の治療として歯科インプラント治療（以下インプラント治療）は極めて有効であり、近年インプラント治療を受けた患者は著しく増加している。インプラント治療の長期症例が増える一方で、インプラント周囲炎の発症が大きな問題となっている。インプラント周囲炎に対する様々な治療方法が報告されているが、有効な治療法は確立されていない。このような臨床的な問題に着目して、インプラント周囲炎に対する有効な治療法について、イヌを用いた動物実験において検討したことは高く評価できる。

本研究においては、スウェーデンの研究グループによって開発された「イヌにおけるインプラント周囲炎の実験モデル」を用いている。すなわち、イヌの下顎小臼歯を抜去し、抜歯した部位の治癒を待ってから、インプラントを埋入し、インプラントが骨に結合した後に、インプラントの上部に装着してあるヒーリングアバットメントに絹糸を巻き付け、インプラント周囲炎を惹起する実験モデルである。このインプラント周囲炎の動物実験モデルと、臨床におけるインプラント周囲炎の類似性については議論がある。しかし、本研究で用いた動物実験モデルは既に多く論文報告されており、本研究においてこの動物実験モデルを選択したことは科学的に妥当であったと考えられる。

本研究においては、汚染したインプラント表面に対して、以下の4種類の異なる治療法を適用した：(1)Er:YAGレーザーによる治療、(2)光線力学的療法（photodynamic therapy, PDT)、(3)チタンバー単体によるデブライドメント療法、(4)チタンバーとクエン酸溶液を併用したによるデブライドメント療法。(1)Er:YAGレーザーによる治療、(2)光線力学的療法（photodynamic therapy, PDT)、(3)チタンバー単体によるデブライドメント療法は、いずれも現在臨床において実際におこなわれている治療法である。これらに加えて、クエン酸溶液による化学的表面処理を加えたことは高く評価できる。

治療をおこなってから3ヶ月に実験動物を屠殺し、マイクロCTを用いた放射線学的評価と、組織形態学的な評価をおこなった。本実験で用いられたこれらの実験手法は適切であったと考えられる。

本研究において、チタンバーとクエン酸溶液を併用したデブライドメントをおこなったグループにおいては、他のグループに比較して、インプラント周囲の垂直方向の骨形成量が大きいことが明らかにされた。この実験結果は論文中に明確に提示されていた。

本研究において、陽極酸化処理したインプラントのインプラント周囲炎の治療法として、「クエン酸を併用したチタンバーによるデブライドメント」の有効性が示された。陽極酸化処理したインプラント表面は、他の表面処理をしたインプラント表面に比較して表面形状が複雑であるため、汚染した場合には汚染物の除去が極めて困難であると考えられている。したがって、「クエン酸を併用したチタンバーによるデブライドメント」は、陽極酸化処理したインプラントだけではなく、他の表面処理をおこなったインプラントのインプラント周囲炎に対しても有効である可能性は高いと考えられる。

現在大きな問題となっているインプラント周囲炎に対する有効な治療法を提示した本論文は、歯科臨床医学の発展に大きく貢献するものであり、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	GUAN Rui
論文審査担当者	主 査　　高橋　英和 副 査　　興地　隆史　　髙久田　和夫
論　文　題　目	Dentin bonding performance using Weibull statistics and evaluation of acid-base resistant zone formation of recently introduced adhesives

（論文内容の要旨）

Introduction

Etch-and-rinse adhesive systems require the use of 30-40% phosphoric acid (PA) etching before application of a primer and bonding resin. Although more effective enamel bonding is achieved by PA etching, the application of PA on dentin surfaces is still problematic requiring a meticulous technique for long-term success. Two-step self-etch adhesive systems (2-SEA) were introduced, in part, to overcome the problems of PA etching of dentin and have demonstrated good bonding performance and sealing ability both in clinical and laboratory studies. Some manufacturers have recently released more versatile adhesive systems that have been termed 'universal', 'multi-purpose' or 'multi-mode' adhesives. This 'new' group of adhesives, which can be used in either an etch-and-rinse or self-etch mode. However, concerns exist with respect to both the short- and long-term bonding effectiveness as well as the quality of the dentin-bonding interface of these relatively new systems.

The acid-base resistant zone (ABRZ) for resin-based systems was characterized as a structure at the resin-dentin interface that is resistant to acid-base challenges and different from the hybrid layer (HL). Recent studies have demonstrated the formation of ABRZ with 1-step and 2-step SEA and it seems to contribute to the sealing of restoration margins and therefore promoting the durability of the restoration.

Therefore, the purpose of this study was to investigate the bonding properties and the micromorphological features of the ABRZ with SEM and TEM by testing Clearfil SE Bond 2 (SE2) and Optibond XTR (XTR) and one 1-step universal adhesive: Scotchbond Universal in the self-etch mode (SBS), etch-and-rinse mode on moist dentin (SBM) and etch-and-rinse mode on dried dentin (SBD).

Materials and Methods

Caries-free extracted human third molars were obtained for μTBS, SEM and TEM

experiments. The μTBS samples were prepared according to the manufacture's instruction and cut into slabs before thermal cycled for 0, 5,000 and 10,000 cycles. The μTBS test results were calculated then analyzed using Tukey's HSD Test and Bonferroni correction ($\alpha = 0.05$). The bond strength test results were also analyzed using two-parameter Weibull statistics for each material group at 0, 5,000 or 10,000 thermal cycles. From this the Weibull moduli, *m*, were determined. The 63.2% probability of specimens failing was also determined for each material by number of cycles.

For SEM observation, "dentin disk sandwich" were prepared following application of the adhesives. The specimens were sectioned vertically and embedded before acid-base challenges with demineralizing solution (2.2 mmol/L $CaCl_2$, 2.2 mmol/L NaH_2PO_4, and 50 mmol/L acetic acid) adjusted to pH 4.5 for 90 minutes, and 5% sodium hypochlorite solution for 30 minutes. Then SEM observation was done after argon-ion etching and gold sputter coating.

TEM samples were prepared using the same protocol as for the other parts of the study. Acid-base challenge was undertaken to the adhesive interface before being sectioned into ultrathin specimens for TEM observation.

Results

Tukey's HSD Test with Bonferroni correction revealed the 24 h bond strengths of the etch-and-rinse groups were significantly lower than the self-etch groups ($p<0.05$). After the 5,000 thermal cycle challenge, the μTBS result in SBM decreased significantly ($p= 0.001$). After 10,000 thermal cycles, SE2 remained stable, whereas that of XTR was significantly elevated ($p= 0.0006$), SBS, SBM and SBD groups all decreased significantly ($p<0.05$).

No premature failure was observed in any of the groups. The SEM observation indicated the fracture pattern of etch-and-rinse groups were predominately adhesive failure which involved the HL, whereas the failure pattern in self-etch groups was mainly mixed as well as cohesive failure either in dentin or resin composite. Chi-square analysis revealed that there was no significant difference in the failure mode after the thermal cycling challenge for any of the groups ($p>0.05$).

The outcomes of the Weibull analysis showed the modulus, *m,* varied amongst materials. At 0 cycles the variation was quite small with SBM showing the highest modulus at 5.749, the lowest being 4.256 for SBD. The other SEA systems were quite similar. At 5,000 cycles the moduli for all groups except SBM increased. SE2 *m* doubled whilst the others saw *m* increase slightly. The change in *m* was associated with an increase in bond strength for most groups. The trend for which 63.2% probability of specimen failure showed an increase in bond strengths by number of cycles for SE2 and XTR, but falls for all groups associated with SBU for the different dentin surface etching modes.

ABRZ was observed at the demineralization front of outer lesion(OL) only in the self-etch

groups. A slope was formed at the bottom of OL region in the XTR group. For SBS group, a funnel-shaped lesion was at the bottom of OL. In etch-and-rinse SBM and SBD groups, the HL were about 5 μm thick without the appearance of an ABRZ. The morphological features of TEM tend to vary. In the SE2 and XTR groups, electron-dense zones were noted beneath the HL with a thickness of 0.5 μm in SE2 and 0.1 μm in XTR, respectively. An approximately 0.5 μm thick electron-dense zone with densely arranged crystallites was formed in SBS. In the SBM and SBD groups, no electron-dense crystals were observed beneath the HL. In the SBM group, scattered remnants of crystallites could be found in certain areas at the front of the acid-base challenge zone.

Discussion

In this study we examined the efficacy of PA etching prior to application of the recently introduced 'universal' dentin bonding system. However, the immediate bond strengths to dentin of the etch-and-rinse groups were significantly lower than those of the 2-step SEA or when this system was used as a 1-step SEA. With 5,000 or 10,000 thermal cycles, the bond strengths of etch-and-rinse groups also decreased significantly. In general, it would seem that the use of PA on dentin leads to an increased number of defects at the bonded interface. This is reflected by the lower Weibull modulus values recorded for the PA-treated groups compared with the self-etch group for SBU.

ABRZ was detected only in the self-etch groups, but not in etch-and-rinse groups. It is believed this was due to the aggressiveness of PA that dissolves the dentin substrate and leaves no remnant apatite crystals at the frontier that can react with infiltrating monomers. SE2 and SBU contain the functional monomer, MDP. The MDP monomer has been rated as the most promising monomer for chemical bonding to hydroxyapatite of enamel and dentin. The characteristics of the ABRZs of SE2 and SBS indicated a similarity in thickness which was approximately 0.5 μm. However, a funnel-shaped lesion adjacent to the ABRZ was observed in SBS. Fluoride release from adhesives was reported to be a key factor to create thick ABRZs. However, the ABRZ of the XTR group was relatively thinner (0.1 μm) than those of SE2 and SBS. XTR contains the functional monomer, GPDM in both the primer and the bonding resin. According to the manufacturer's instructions, the pH value of the primer on dentin surface drops from 2.4 to 1.6 after application of mild air stream. The pH value of XTR is regarded as a "strong" self-etch adhesive, that demineralizes dentin deeper and dissolves more of the hydroxyapatite, resulting in a thinner ABRZ even with the presence of a fluoride component in the adhesive. In the etch-and-rinse groups, no electron-dense zone could be observed. Sparsely arranged crystallites remained at the bottom of the HL in the SBM group.

Considering the relationship between the μTBS result and the ABRZ pattern obtained from each adhesive system, bonding durability to tooth substrates may be predicted by using

the morphological pattern of the ABRZ. The ABRZ pattern may become a good indicator of dentin bonding durability and subsequent degradation of the bond. This can be related to the Weibull modulus and possibly serve as a predictor of clinical performance. Further correlations are needed between laboratory and clinical studies to confirm or deny this point.

CONCLUSION

The results of this study suggest that the etch-and-rinse method with a universal adhesive created an inferior interface on the dentin surface which resulted in reduced bond durability.

ABRZ formation was detected with the use of self-etch adhesive systems; SE2, XTR and SBS. In the PA etching protocols of SBM and SBD, thick HL, but no ABRZ was detected, which might affect dentin bond durability.

（和文による要約）

象牙質接着界面の酸塩基処理後に観察される Acid-base resistant zone(ABRZ)の形成には、機能性モノマーとハイドロキシアパタイトとの化学的な相互作用が重要な役割を果たすことが示唆されている。近年開発されたユニバーサル接着システムにおいては、１ボトルセルフエッチングとしてそのまま使用も可能であり、リン酸エッチングを象牙質にも併用するトータルエッチングでも使用可能であるとされているが、その接着耐久性や象牙質接着界面の酸塩基処理抵抗性における報告は少ない。

今回使用した２つの２ステップセルフエッチング接着システムでは、熱負荷試験後も接着の低下はみられず、また、ABRZ も安定して観察された。しかし、ユニバーサル接着システムにおいては、セルフエッチング、トータルエッチングいずれの手法で用いても安定した接着強さは得られず、また象牙質接着界面では酸塩基処理抵抗性が低下した。ワイブル分布を用いた解析により、サーマルサイクル負荷に対する信頼性は各群間で異なることが示唆された。

すなわち臨床においては、ユニバーサル接着システムをトータルエッチング法で使用することは推奨されない。また、ユニバーサル接着システムを１ボトルセルフエッチングとして用いても、２ステップセルフエッチング接着システムと比較してその接着性能は劣っていることから、現状では２ステップセルフエッチングシステムの使用が推奨される。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5107　号	GUAN Rui
論文審査担当者	主 査　　高橋　英和 副 査　　興地　隆史　　髙久田　和夫	
論 文 題 目	Dentin bonding performance using Weibull statistics and evaluation of acid-base resistant zone formation of recently introduced adhesives	

（論文審査の要旨）

近年の歯質接着材料の進歩は目覚ましく、その臨床応用が進んでいる。接着材料の評価においては、これまでの接着強さの評価に加えて、接着耐久性や辺縁封鎖性に関する評価も重要視されるようになっている。また、象牙質接着界面の酸塩基処理後に観察される酸塩基抵抗層（ABRZ)の形成には、機能性モノマーとハイドロキシアパタイトとの化学的な相互作用が重要な役割を果たすことが示唆されている。歯質接着システムは、開発当初においてエッチング、プライミング、ボンディングの３ステップで構成されていたが、近年では１ボトル・１ステップに簡略化された１ステップセルフエッチングシステムが臨床では主流になりつつある。近年開発されたユニバーサル接着システムにおいては、１ステップセルフエッチングとしてそのまま使用も可能であり、リン酸エッチングを象牙質にも併用するトータルエッチングでも使用可能であるとされているが、その接着耐久性や象牙質接着界面の酸塩基処理抵抗性における報告は少ない。

このような背景のもと、本研究ではヒト抜去歯象牙質を用い、２ステップセルフエッチングシステム２種、ならびにユニバーサル接着システム１種を用い、サーマルサイクル負荷後の接着耐久性を検討した。ユニバーサル接着システムにおいては、臨床上想定されるセルフエッチングでの使用法、リン酸エッチングを併用したのちにブロットドライを行う方法、リン酸エッチングを併用したのちにエアー乾燥を行う方法の３種を検討している。これは臨床での実際の使用法を網羅的に検討したものであり、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

さらに接着界面の酸塩基耐久性を走査電子顕微鏡ならびに透過電子顕微鏡にて形態学的に評価を行ってしている。初期接着強さだけでなく、その耐久性や界面の安定性を検討したものであり、象牙質接着の理解を深めるための情報を提供するものとして高く評価される。

酸塩基抵抗層の走査電子顕微鏡観察ならびに透過電子顕微鏡観察は、過去の文献に則った適切な手法で実施されており、形態学的な評価も過去の文献との比較検討も含め深く考察されている。実験はヒト抜去歯を用いて行われているが、倫理審査委員会の承認を得て（承認番号；725 号）適切に遂行されている。

接着強さの長期耐久性における統計学的解析においては、サーマルサイクル負荷に対しての劣化現

象を統計的に記述するために、ワイブル分布を用いた信頼性解析が実施されており、長期的な信頼性の検討を行う工夫がなされている。

本研究により得られた結果は以下の通りである。

1. ２種の２ステップセルフエッチングシステムでは、サーマルサイクル試験後も接着強さの低下はみられず、また、接着直後の象牙質界面において酸塩基抵抗層が安定して観察された。
2. ユニバーサル接着システムにおいては、セルフエッチングでの使用法、リン酸エッチングを併用したのちにブロットドライを行う方法、リン酸エッチングを併用したのちにエアー乾燥を行う方法の３種すべてにおいて安定した接着耐久性は得られず、また象牙質界面では酸塩基処理抵抗性が低下した。
3. 引張り接着試験後の破断面観察の結果においては、２ステップセルフエッチングシステムでは象牙質凝集破壊もしくは混合破壊が主であったが、ユニバーサル接着システムにおいては樹脂含浸層を含む界面破壊が多くみられた。
4. ワイブル分布を用いた解析により、サーマルサイクル負荷に対する信頼性は各群間で異なることが示唆された。

以上の結果から、使用する接着システムにより、その接着耐久性や象牙質接着界面の酸塩基処理抵抗性は異なることが明らかとなり、また形態学的観察により、接着界面における酸塩基処理抵抗性の有無が、接着耐久性の指標となる可能性が示唆された。

本研究により、ユニバーサル接着システムにおける象牙質面処理におけるリン酸エッチングの併用は、接着耐久性を低下させ、接着界面の酸塩基抵抗性を損なう可能性があることが明らかとなった。１ステップセルフエッチングシステムとして用いても、２ステップセルフエッチング接着システムと比較してその接着耐久性ならびに接着界面の酸塩基抵抗性は劣っていることから、現状では２ステップセルフエッチングシステムの使用が推奨される。これらの知見はこれまでに報告されたことがなく、今後の臨床における材料の使用に関して重要な指針を示す研究成果として評価できる。

本研究により、使用する接着システムならびにその使用法によって、接着耐久性が異なることが明らかとなり、特にユニバーサル接着システムは象牙質の処理法にかかわらず接着界面の劣化が発生しやすいことが明らかとなった。以上より、本研究は、臨床的に有益な情報であるばかりでなく、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は、博士（歯学）の学位請求論文として十分に価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	SHRESTHA Abhishekhi
論文審査担当者	主査　谷口　尚 副査　泰羅　雅登　下山　和弘
論　文　題　目	Effects of mouthguards on electromyographic activity of masticatory muscles

（論文内容の要旨）

Abstract

Aim: This study aimed to assess electromyographic activities of jaw muscles, to analyze occlusal contacts and differences in adaptation of two different types of mouthguards.

Material and methods: Eighteen healthy volunteers (age, 21.5 ± 2.8 years) with natural dentition were recruited in this study. Custom-made mouthguards (CMs) and commercial boil and bite mouthguards (BBs) were used. Subjects were asked to clench at maximum voluntary clenching (MVC) and at 50% MVC under three conditions: without wearing mouthguard (Control), wearing BB, and wearing CM. The normalized values of mean root mean square (RMS) of electromyographic potentials from each muscle were extracted, and the absolute values of the Asymmetry index (AsI) and Activity index (AcI) of masticatory muscles were calculated. Occlusal contact was analyzed using a BITEEYE BE-I device with blue silicone material. Statistical analyses were performed using paired t-test, one-way analysis of variance, and Bonferroni test ($p<0.05$).

Results: There was a significant difference in AsI values for temporalis muscle between BB and CM groups (paired t-test: $p=0.038$) and AcI values for the right side (paired t-test: $p=0.014$) at 50% MVC. Bite eye analysis showed significant differences in anterior–posterior contact areas both at MVC and 50% MVC [Control vs. BB ($p=0.000$) and BB vs. CM ($p=0.002$)]. A significant difference was observed between the adaptation of BBs and CMs ($p=0.000$).

Conclusion: Our results suggest that CMs not only provide protection to the oral cavity but also provide the appropriate occlusion and retention.

Introduction

A mouthguard is an effective oral protector to prevent orofacial injuries and is primarily used in contact sports, such as American football, boxing, rugby football, and martial arts.

Primarily, there are three types of mouthguards: stock, mouth-formed, and custom-made

mouthguards (CMs) fitted by a dental practitioner. The masseter muscle (MM) and the anterior temporal muscle (TM) are the most commonly and frequently studied jaw muscles, owing to their easy accessibility. However, there is limited evidence on the use of electromyography (EMG) to investigate the effects of different types of mouthguards on jaw muscles.

The purpose of this study was to evaluate EMG activities of jaw muscles using two different types of mouthguards and to analyze the occlusal contact areas of mouthguards using specialized silicone bite-registration material and occlusal analytic device.

Materials and methods

Subjects

EMG and occlusal contact analysis: Eighteen (9 men and 9 women; mean age±S.D: 21.5±2.8 years) healthy subjects with natural dentition were recruited in this study.

Testing mouthguard adaptation: Ten (2 men and 8 women; mean age±S.D: 21.2±1.3 years) volunteers from among the subjects recruited for EMG and bite eye analysis were also recruited for this test. Informed written consent was obtained from each participant (Approval no. 1057).

Mouthguards

A CM was fabricated using 4-mm-thick mouthguard sheet (Capture Sheet, Shofu Inc., Kyoto, Japan) followed by chair-side occlusal adjustments. For boil and bite (Canterbury of New Zealand, Auckland, New Zealand) type (BB) mouthguards, subjects were asked to follow the instructions provided by the manufacturer and prepare the mouthguard themselves under the supervision of an experimenter.

Experimental procedure

Before sEMG recordings on experiment day 1, occlusal bite registration was recorded using blue silicone material (Blue Silicone, GC Co.) at maximum voluntary clenching (MVC) and 50% MVC under three conditions: (a) without mouthguard (Control), (b) wearing BB, and (c) wearing CM. Verbal guidance was provided to facilitate clenching without any visual feedback. The sEMG potentials of the right and left masseter muscles (Rt. MM; Lt. MM) and the right and left temporalis muscles (Rt. TM; Lt. TM) during MVC and 50% MVC were recorded under the same three aforementioned conditions.

Adaptation of mouthguard

This test was a chair- side test where each mouthguard was assessed with using a silicone-based fit- checking material (Fit Checker®, GC Co.). The fitting material was separated from the mouthguard after hardening. Excess materials were was trimmed and

weighed 5 times on a digital weighing scale and the average was calculated.

Data analyses

The mean root mean square (RMS) values of sEMG potentials from each muscle were calculated and then normalized by the mean RMS values of Control. Absolute values of the Asymmetry index (AsI) and Activity index (AcI) of masticatory muscles were calculated. For additional calculation of occlusal areas after bite eye analysis, the following formulae were applied:

$$\text{Asymmetry Index} = \frac{|(RMS_{right} - RMS_{left})|}{(RMS_{right} + RMS_{left})} \times 100$$

To assess the level of each muscle side, +100% means increase in activity of right side and −100% means increase in activity of left side

$$\text{Activity Index} = \frac{|(RMS_{masseter} - RMS_{temporal})|}{(RMS_{masseter} + RMS_{temporal})} \times 100$$

To assess the activity level of each muscle, +100% means increase in MM activity and −100% means increase in TM activity

$$\text{Anterior-Posterior area} = \frac{\text{Total anterior area}}{\text{Total posterior area}} \times 100$$

$$\text{Right-Left area} = \frac{|\text{Right side} - \text{Left side}|}{\text{Right side} + \text{Left side}} \times 100$$

Statistical analyses were performed using paired t-test, one-way analysis of variance, and Bonferroni test with SPSS analysis software (Version 21, IBM, Chicago, IL, USA) ($p<0.05$).

Results

sEMG potentials at MVC and 50% MVC

The sEMG activity of all four muscles measured at MVC increased to a significant level while clenching with CM but not with BB ($p=0.000$).

AsI and AcI

At MVC, there was no significant difference in AsI and AcI when comparing between CM and BB.

Similarly, on comparing CM and BB at 50% MVC, significant differences were found in AsI for TM ($p=0.038$) but not for MM ($p=0.914$); in addition, significant difference was observed in AcI for the right side ($p=0.014$); however, the difference for the left side was statistically insignificant.

Bite eye analysis for occlusal contact area

Significant differences were observed in anterior–posterior occlusal contact areas at both MVC and 50% MVC.

Similarly, at MVC, significant differences were observed in the total occlusal area (OA) however, no significant differences were observed in the occlusal point (OP) values. At 50% MVC, significant differences were observed in OA and OP values

.

Adaptation of mouthguard

A significant difference was observed between the adaptation of BB and CM ($p<0.001$).

Discussion

Our study aimed to evaluate EMG activities of masticatory muscles and occlusal balance using commercially available BB type and the chair-side fabricated CM type of mouthguards.

sEMG potentials and mouthguards

The sEMG activity during MVC increased substantially while wearing CM than that while wearing BB or Control. It is possible to assume that the clenching intensity of a person may not be fully and accurately 100% when the clenching is involuntary and that the definition of clenching level (strong or light) naturally varies from person to person. CM prevents such tooth distortion during clenching regardless of its intensity. Consequently, CM, in particular, may be more effective in preventing possible occlusal trauma as well as to improve athletic performance to the maximum.

AsI and AcI

At 50% MVC, the AsI and AcI values decreased while wearing CM. The asymmetry of MM activity increases as the muscle contraction level decreases, and in general, the degree of asymmetry is always greater in the MM than in the TM. The present results concur with these earlier reports. Moreover, TM is sensitive to immediate changes in the position of the mandible

On the other hand, we did not observe any significant differences in AsI and AcI values in BB

and CM at MVC. This could partly be attributed to the resilience of both mouthguard materials. The insertion of intraoral appliances does not alter or influence the AsI or AcI after immediate insertion in healthy subjects. We assume that the same mechanism works for the mouthguard. Further research is warranted to evaluate such possible alterations with the use of mouthguards.

Occlusal contact area analysis

Our results showed that BB had greater anterior–posterior contact area than Control and CM. In addition, when wearing BB, the occlusal contact area in the anterior tooth region was greater than that with Control or CM. This may be attributed to the non-retentive nature of BBs, which leads to unstable movements inside the oral cavity. Thus, anterior biting on a fluctuating mouthguard increases the risk of developing TMJ disorders.

Adaptation of mouthguard

In this study, the method adopted has been slightly modified from previous research which seemed simple, easy, less time-consuming, and a clinically approachable method to prove the adaptability or retention of both types mouthguards. The design of CMs details the precise anatomical structure of the oral cavity, thus favoring comfort, accurate fit, and stability, as well as making it easy for the person to communicate and breathe.

Conclusion

Within the limitations of this study, overall, it can be concluded that besides providing protection to the oral cavity, CMs also contribute in providing better occlusal stability and retention, which is essential to maintain athletic abilities as well as sound oral health conditions.

＜要旨（和文）＞

本研究の目的は、既製品とカスタムメイドの 2 種マウスガード（MG）装着時の咀嚼筋表面筋電図と咬合接触面積を客観的に比較分析することである。被験者は顎口腔機能に異常の認められない健常成人 18 名（平均年齢 21.5 歳）であり、4mm 厚 MG シートを加熱成形し歯科医師が調整したカスタムメイド MG（CMG）と被験者自身で調整したボイル&バイト MG（BMG）について測定した。筋電図活動は表面電極を用いて両側咬筋および側頭筋より記録した。課題は最大噛みしめ（MVC）と 50%MVC で、MG なし、CMG 装着、BMG 装着の 3 条件で行った。筋電図 RMS（root mean square）を算出し、MG なし条件 RMS により基準化した。左右の筋活動比較には Asymmetry index （AsI） を用い、咬筋と側頭筋の筋活動比較には Activity index（AcI）を用いた。歯接触分析装置による咬合接触面積による分析評価も行い、咬合接触面積の左右および前後バランスを検討した。さらに、被験者 10 名（平均年齢 21.2 歳）において、義歯適合試験材を応用して MG の適合試験を行った。その結果、側頭筋｜AsI｜は 50%MVC で、BMG と比較

し CMG では有意に小さい値を示した。右側｜AcI｜は 50%MVC で、BMG と比較し CMG では有意に小さい値を示した。左側｜AcI｜は 50%MVC で、BMG と比較し CMG では小さい値になった。咬合接触面積の前後バランスは MVC、50%MVC ともに、BMG では MG なしと CMG より有意に大きい値になった。適合試験材の重量は BMG と比較し CMG で有意に小さい値であった。したがって CMG は外傷から歯や歯周組織を守るだけでなく、適切な咬合によるバランスのとれた咀嚼筋活動と高いリテンションを与えることができることがわかった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5108　号	SHRESTHA Abhishekhi
論文審査担当者	主　査　　谷口　尚 副　査　　泰羅　雅登　　下山　和弘	
論　文　題　目	Effects of mouthguards on electromyographic activity of masticatory muscles	

（論文審査の要旨）

マウスガード（MG）は、スポーツ外傷事故から歯、歯周組織ならびに口腔軟組織を保護することを目的として装着される口腔内弾性装置であるが、筋パワー発揮に伴うスポーツクレンチング時や、打撃や衝撃を受けた際の防御姿勢時などでは、下顎位や咀嚼筋活動がさまざまに変化することが予想される。しかしこれまでに、MG 着用が咬合や咀嚼筋に与える影響に着目した研究は殆どなく、不明な点が多い。また MG の適合性や装着感などについてもアンケートによる主観的評価が多く、客観的評価はなされていないのが実情である。こうした背景を踏まえて、SHRESTHA Abhishekhi は MG 機能時の咀嚼筋活動や咬合様相の把握はスポーツ歯科の臨床上極めて重要なテーマであると考え、筋電図と咬合解析装置を用いた機器計測を行い、併せて適合性について客観的な分析評価を試みた。

健常成人 18 名を被験者とし、実験用 MG には被験者自身が温湯軟化して適合させる既製の Boil & Bite タイプ MG（以下 BMG）とカスタムメイド MG（CMG）を用いた。このように、我が国で主流の BMG と CMG を採用し、スポーツクレンチングが必ずしも最大限の噛みしめ強度で遂行されるとは限らないことを考慮して咬合強度を MVC と 50%MVC の 2 段階設定としたことは、実際のスポーツ現場や臨床観察に基づいて実験系を構築しようとする試みであり、その姿勢は高く評価できる。

咀嚼筋の活動は両側咬筋および側頭筋を対象に表面筋電図検査を、咬合分析はブルーシリコーンバイトを採得し歯接触解析装置で行っている。MG 専用の咬合分析機器が存在しない中、先行研究を参考に、現有機器を駆使して客観評価を試みた点は評価できる。適合性についても義歯適合試験材を利用した分析法を提案しており，新規性が高い。得られたデータも筋活動の左右バランスを評価する非対称性指数 Asymmetry Index（AsI）や、咬筋と側頭筋の相対バランスを評価する活動性指数 Activity Index（AcI）にて多面的に解析し、咬合接触についても前歯と臼歯や左右歯列などエリアに分け詳細に分析している。以上のことから、本実験が十分な知識と情報収集のもとで、周到な準備と計画に基づいて遂行されたことが窺える。

得られた主な結果は以下の通りである。

1. 左右咬筋ならびに側頭筋の筋活動量に関して、CMG 噛みしめ時にはいずれも有意に増加したのに対し、BMG では有意差を認めなかった。

2．50%MVC 時の側頭筋 AsI と右側 AcI について、BMG と CMG 間で有意差を認めた。
3．MVC、50%MVC のいずれにおいても、BMG の咬合接触面積前後バランスは有意に高値を示した。
4．CMG の適合試験材重量は BMG より有意に低値を示した。

本研究結果から、CMG は既製品に比べて、適合性と維持力に優れるだけでなく、咀嚼筋活動と咬合接触バランスが良好な状態に維持されることが明らかとなった。したがって CMG は外傷防護に貢献するばかりでなく、機能時の咀嚼筋バランスや咬合安定性にも寄与する可能性が強く示唆された。考察では実験データと過去文献を照会しながら、マウスガードの装着やクレンチングの強度変化が咀嚼筋に及ぼす効果や下顎位への影響について論述し，またさらには不適合で咬合不良な既製 MG 使用による顎関節症の発症リスクについても論考されている。

以上のように、本研究はスポーツ用マウスガード装着下の咀嚼筋活動および咬合様態を表面筋電図と咬合解析装置を用いて初めて客観的かつ多角的に分析を加えたものであり、CMG の価値とその優位性に新たな科学的根拠を与えた点で高く評価できる。これらの研究成果は、カスタムメイドマウスガードの普及啓発とともに、今後のスポーツ歯学の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	MAJKUT Patrycja Zaklina
論文審査担当者	主 査　　興地　隆史 副 査　　宇尾　基弘　　渡邊　裕
論　文　題　目	Validation of optical coherence tomography against microcomputed tomography for evaluation of remaining coronal dentin thickness

（論文内容の要旨）

Introduction

Current caries removal techniques in restorative dentistry involve removal of infected dentin structure. Changing the Black's principle concept of extension for prevention to minimal intervention dentistry, operators are advised to follow the caries lesion shape and remove only infected dentin while preserving affected and sound dentin. However, excavation of deep dentin caries might lead to unexpected, unwanted iatrogenic exposure of the dental pulp. This accidental damage to the dentin structure over the pulp will shift the treatment strategy from restorative to endodontic and endanger the longevity of tooth. Estimation of remaining distance from the pulp horn/chamber is necessary for conservative treatment of dental caries. Usually radiographs are taken for the diagnosis and to see the extension of the caries. Radiographs may help to identify either new or recurrent caries, but can only roughly assess the remaining dentin thickness (RDT) and pulp horns to avoid the exposure of the vital pulp tissue. Moreover, since radiography produces harmful x-radiations and superimposition of the structures results in limited diagnostic accuracy, it is not a convenient option at the time of treatment.

Optical coherence tomography (OCT) is a non-invasive (no ionizing radiation) and non-destructive (no cutting of the specimens), relatively high resolution, near infra-red imaging technique which allows to obtain and interpret cross-sectional scans of the research area in real time. It has found a great potential in dentistry for applications ranging from caries and crack detection to assessment of material defects. Although there is no clinical gold standard method for RDT assessment, microcomputed X-ray tomography (micro-CT) was used which can capture 3D images with macro morphology and architectural information of hard tissues.

Therefore aim of the study was to determine if OCT can serve as a suitable method for assessment of RDT by obtaining OCT and micro-CT images of teeth during excavation of deep dentin caries lesions and compare measurements. The null hypothesis was that there is no agreement in the RDT measurements between OCT and micro-CT.

Materials and Methods:

Human third molars with class I deep dentin caries were selected. The most superficial soft debris was removed with spoon excavator. A caries detecting dye Caries Check (Nishika, Japan) was applied to

ensure removal of infected dentin. The specimens were scanned in 3D and in high resolution 2D cross-sections at every 100 μm in mesio-distal direction. The 3D data sets were reconstructed into 3D images. This allowed to identify pulp chamber and the location of pulp horns with minimum RDT. After obtaining 2D and 3D OCT scans by swept source OCT System at 1330 nm center wavelength, RDTOCT values were evaluated by image analysis software. Micro focus X-ray Computed Tomography (micro-CT) images were obtained from the same cross-sections to confirm OCT findings. Smallest RDT values at visible pulp-horn were first measured on OCT B-scan and then micro-CT were com-pared by Pearson's correlation, followed by analysis of covariance (ANCOVA) to probe whether a linear relationship existed.

Results:

In OCT images, the anatomical shape of pulp horn was visible with higher backscatter intensities at the border distinguished from hollow region of pulp chamber. In comparison, micro-CT images at the same cross sections of the anatomical structures showed well distinguished contours. RDT measurements were done for up to three pulpal horns in each tooth. A strong significant correlation was found between optical thickness measurements on OCT and the RDT values obtained from micro-CT. The ANCOVA analysis indicated that the intercept of regression line was not significantly different. Pulpal horns and pulp chamber roof observation under OCT and micro-CT resulted in comparable images that allowed measurement of dentin thickness; however, in the case of thick (> 2 mm) and/or caries-infected dentin tissue, the lower boundary of pulpal roof was occasionally masked.

Discussion:

The optical contrast between the dentin and pulp chamber and differences in refractive indices of the tissues enable accurate detection of pulp horn boundary. In present study it was possible to observe peaks of pulpal horns at around 1.5~2.0 mm depth in deep dentin structure which allows in-depth assessment. In pulpal roof analysis it was possible to make observations at 2.0 mm depth in case of caries affected or sound dentin.

All the specimens were intentionally not ground to mimic the clinical situation. Whenever the dentinal tissue was covered by enamel structure, it was impossible to observe the deep dental structure. Anatomy of the dentin through the coronal length varys according to the plane and proximity to the pulp chamber and physiological processes influence and modify anatomical changes within the dental structure. The penetration depth of OCT in biological structures reaches up to 2~3 mm. The imaging depth depends not only on the device attributes and specifications but also on the optical properties of the tissue structure. Physiology modifies dental responses and changes in anatomy structure.

Dentin properties and microstructure are responsible for clinical determination and limitation of operative procedures and application of dental materials. Dentin provides the best protection of pulp and its reciprocal influence and response is well recognized as a pulpo-dentin complex and should be treated as one structure. Performing accurate measurement of RDT in very deep caries prevents from

perforation.

The null hypothesis of this study was rejected, as significant correlation in measurements has been found between OCT and micro-CT. Within the limitations of this in vitro study OCT technique demonstrates promising possibilities as a chairside novelty. RDT measurement conducted in this study accessible by OCT exceeded in a few cases 1.5 mm. Caries being a multi layered process needs proper analysis of the anatomy and optical properties. Effect of caries–affected and caries–infected dentin on light scattering and penetration requires further investigation.

Conclusions:

This study visualized RDT over the pulp chamber using 1330 nm center wavelength Dental SS-OCT. Applicability of SS-OCT was demonstrated during deep caries excavation for the prevention of perforation of the vital dental pulp. OCT with near infrared light can act as a reliable tool to visualize the RDT because of the optical contrast between the dentin and the pulp tissue.

（和文要旨）

う蝕治療では感染歯質のみを切削し、非感染歯質や健全部を保存する侵襲の少ない処置が望まれる。しかしながら窩洞が深くなると露髄のリスクが高まり、歯髄保存の観点から、歯髄の位置と残存する窩底象牙質の厚さを正確に把握する手段の開発が望まれる。本研究では、窩洞形成における窩底象牙質の状態と残存象牙質の厚さの計測を、光干渉断層計(OCT)を用いて行い、マイクロ CT と比較した。

咬合面に深いう蝕を有するヒト抜去第三大臼歯を用い、う蝕検知液を用いて注意深く感染う蝕象牙質を除去した。その後、光源中心波長 1330nm の波長走査型 OCT(SS-OCT)を用い、窩洞から３D 画像構築ならびに高解像度２D 断層画像を近遠心方向に 100 μm 間隔で撮影し、画像処理ソフトにて窩底面から歯髄までの残存窩底象牙質の厚さ(RDT)を計測した。次にマイクロ CT を用い、SS-OCT 画像と同一断層面の画像を撮影し、SS-OCT の結果と比較した。髄角部における最短 RDT について、SS-OCT とマイクロ CT の計測値を比較し、Pearson’s correlation と ANCOVA にて線相関性を検討した。

その結果、SS-OCT 画像では歯髄腔境界部の後方散乱光の増加によって歯髄の髄角部の解剖学的形態を識別し観察することができた。一方マイクロ CT では、歯髄全体の形態を明瞭に観察することができた。髄角部における RDT の計測値は、SS-OCT とマイクロ CT との間に強い相関がみられ、SS-OCT から得られた計測値はマイクロ CT とほぼ一致していた。しかしながら RDT が 2 mm よりも厚く、脱灰象牙質が窩底部に残存する場合、歯髄腔の画像表示は不明瞭になり、観察が困難であった。

SS-OCT における歯髄の画像は、歯髄と象牙質の屈折率の変化によって生じる光の散乱情報から構築され、象牙質の厚さが 1.5～2 mm まで表示することが可能であった。象牙質の厚さは歯冠部位によって異なり、また生理的な変化を生じることから、SS-OCT 画像は様々な影響を受ける可能性がある。う蝕は OCT の後方散乱光を増加させるため、深部の歯髄画像を獲得する上で影響を検討する必要がある。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5109　号	MAJKUT Patrycja Zaklina
論文審査担当者	主 査　　興地　隆史 副 査　　宇尾　基弘　　渡邊　裕	
論 文 題 目	Validation of optical coherence tomography against microcomputed tomography for evaluation of remaining coronal dentin thickness	

（論文審査の要旨）

近年のう蝕治療においては、感染歯質のみを切削し、非感染歯質や健全部を保存する侵襲の少ない処置が推奨されている。この際に窩洞が深くなると露髄のリスクが高まり、歯髄保存の観点から、歯髄の位置と残存する窩底象牙質の厚さを正確に把握する手段の開発が望まれていた。本研究は、窩底部の残存象牙質の厚さを、光干渉断層計（OCT）により計測することを試みたものである。特に波長走査型 OCT（SS-OCT）は、非侵襲で歯の硬組織の断層画像が得られるため、歯科臨床における様々な状況での応用が可能であり、その実用化が期待されている。申請者は SS-OCT の特性をよく理解し、臨床的にいまだ有効な方法のない残存象牙質の厚さ（RDT）の計測への応用に取り組んだものであり、その着眼は高く評価できる。

実験には実際にう蝕を有するヒト抜去歯を用いているが、健全な象牙質と異なり、う蝕による変化の生じた象牙質を対象とした計測は、臨床応用の上でも極めて有益な情報である。マイクロ CT による画像を比較対象として、それらの画像から得られる RDT を検討しており、特に髄角部における最短 RDT について相関性を評価したことも適切な方法として評価できる。

得られた結果は以下の通りである。

1. SS-OCT では、歯髄の髄角部の解剖学的形態観察が可能であったが、マイクロ CT では歯髄全体の形態が明瞭に観察できた。
2. 髄角部における RDT の計測値は、SS-OCT とマイクロ CT との間に強い相関がみられ、その計測値は両者ともほぼ一致していた。
3. RDT が 2 mm よりも厚く、脱灰象牙質が窩底部に残存する場合、SS-OCT による歯髄腔の画像表示は不明瞭になり、観察が困難であった。

以上の結果について、申請者はこれまでの SS-OCT による歯の硬組織画像診断に関する多くの情報を十分に理解し、さらにう蝕象牙質に関する知識に基づいた考察を展開している。特にう蝕による象牙質の病理的変化により、SS-OCT による計測では後方散乱光が増加するため得られる画像に影響が生じることを言及し、今後の計測法や装置の改善に向けた貴重な提言となっている。こうした特徴を理解したうえで、あらためて本装置の活用を考えた場合、1.5～2 mm 以下という制約はあるものの、歯髄への最小 RDT が臨床の場で計

測できることは、今後のう蝕治療において極めて有益であり、歯科医療の高度化に大きく貢献するものである。

以上のように本研究は、う蝕治療に際しての窩底部残存象牙質の厚さを把握するに際し、SS-OCT による計測が有効で信頼性が高いことを明らかにしたもので、歯科保存学および歯科材料学の発展に大きく寄与するものであり、博士（歯学）の学位請求論文として十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	NGUYEN Chi Thi Kim
論文審査担当者	主 査　　三浦　雅彦 副 査　　渡部 徹郎、鵜澤　成一
論　文　題　目	LAMC2 is a predictive marker for the malignant progression of leukoplakia

Introduction

Oral leukoplakia is the most common potentially malignant disorder of the oral mucosa, and dysplasia is regarded as the most important factor associated with increased risk of oral squamous cell carcinoma (OSCC) development. Early invasion of OSCC is determined by encroachment of dysplastic epithelium into the lamina propria, but the decision involves subjective judgment by a pathologist and shows inter-examiner variability. Submucosal invasion of OSCC starts when neoplastic cells penetrate the basement membrane. Laminin-332, a trimeric complex of laminin alpha chain 3, laminin beta chain 3, and laminin gamma chain 2 (LAMC2), is the major constituent of the basement membrane. It has been reported that LAMC2 is overexpressed in various types of cancer including OSCCs. A few articles have investigated LAMC2 expression in oral epithelial dysplasia and reported the absence of its expression; however, alterations in LAMC2 expression during the transition from dysplasia to cancer have not been elucidated. The first aim of this study was to compare the expression of LAMC2 in different stages of OSCC: early and advanced. The association of LAMC2 alteration with clinicopathological features of OSCC was also analyzed to clarify the significance of LAMC2 alteration. The second aim of this study was to evaluate LAMC2 as a marker of malignant transformation in leukoplakia.

Materials and Methods

Case selection

Sixty surgical specimens of advanced OSCCs, 39 surgical specimens of early OSCCs, and 93 incisional biopsy specimens of leukoplakia of the tongue were collected from the archives of the Dental Hospital of Tokyo Medical and Dental University. Six disease-free tissues were also collected. The specimens of advanced OSCC were obtained from the cases that did not receive preoperative chemoradiotherapy and histologically exhibited muscular invasion. The specimens of early OSCC were obtained from the cases that did not receive preoperative chemoradiotherapy and histologically showed less than 1 mm of invasion. Malignant progression of leukoplakia into cancer was defined as the histological confirmation of invasion by a second incisional biopsy, an excisional biopsy, or resection of the lesion. The follow-up time was 0.5–39.2 months (mean 6.3 months) and 3.5–158.4 months (mean 34.3 months) in the cases with and without malignant progression, respectively. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Tokyo Medical and Dental University, Faculty of Dentistry (Nos. 99, 991, and 1087).

Histological, immunohistochemical, and cDNA microarray analysis

Three tissue microarrays, containing 50 spots of 5 mm in diameter, were constructed using the advanced OSCCs. Histological evaluation was done according to the WHO guideline. Depth of invasion was measured at the deepest invasion front on the specimen, from the imaginary line that was drawn by extension of the basal layer of the adjacent normal epithelium.

Immunohistochemical staining was performed as previously described using the anti-LAMC2 antibody (clone B-2, Santa Cruz Biotechnology). LAMC2 immunoreactivity in OSCC was quantified on a scale of 1 to 3 according to the percentage of stained cells at the cancer–stoma interface. The criterion of the grading was as follows: grade 1, less than 10% of the cells at the cancer–stroma interface are positive for LAMC2; grade 2, 10%–50% of the cells are positive; and grade 3, more than 50% of the cells are positive. LAMC2 immunoreactivity in leukoplakia was evaluated by scoring 3 items in the whole specimen as follows: (1) size of foci—score 0, no LAMC2-positive cells; score 1, a focus consisting of 1 to 9 positive cells; score 2, 10–19; score 3, 20–29; and score 4, more than 30 positive cells. When multiple foci existed, the highest score was regarded as the score of the case. (2) Number of LAMC2-positive foci—in cases where more than 4 foci existed, the number of foci was delimited to 4. (3) Basement membrane staining pattern—the pattern and intensity of LAMC2 staining of the basement membrane were scored as follows: score 1, thin and smooth, which is identical to that in normal epithelium; score 2, thick and jagged, although the intensity of staining is similar to that in score 1; and score 3, thick and jagged, with staining at higher intensity than that for normal epithelium. Fresh frozen tissues of 43 advanced OSCC and 9 normal oral epithelia were collected by laser-capture microdissection and cDNA microarray analysis was performed as previously described.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using SPSS version 22.0 (IBM, Chicago, IL, USA). $P < 0.05$ was judged to be statistically significant.

Results

Associations of LAMC2 expression with clinic-pathological features of OSCC

In normal oral mucosa, LAMC2 was present specifically at the basement membrane but not in the cells. In all cases of advanced OSCC, pronounced LAMC2 expression was observed in the cytoplasm of cancer cells that face the stroma. cDNA microarray analysis revealed that *LAMC2* mRNA was significantly increased in OSCC compared with normal epithelia. We found a significant relationship between the LAMC2 grade and the pattern of invasion, indicating that cancers with less LAMC2-positive cells exhibit less invasive phenotypes. In line with this, cancers of low LAMC2 grades tended to show exophytic growth. To gain insight into how LAMC2 expression is induced and expands over the course of transition from dysplasia to cancer, the depth of invasion of early OSCCs as well as advanced OSCCs was measured and its correlation with the LAMC2 grade was evaluated. There was a significant association between the LAMC2 grade and the depth of invasion, indicating that LAMC2-positive cells at the cancer-stroma interface increase in parallel with the progression of cancer invasion.

LAMC2 is a predictive marker for malignant progression of leukoplakia

93 incisional biopsy specimens of leukoplakia of the tongue were examined for LAMC2 expression. These were all diagnosed as epithelial dysplasia. The numbers and distribution of LAMC2-positive cells varied across cases. We elaborated upon the LAMC2 grading for leukoplakia, by scoring 3 items: the size of foci, the number of foci, and the basement membrane staining pattern. Both the size and the number of foci were significantly associated with the grade of dysplasia, while the basement membrane staining pattern was not. The size and the number of foci were predictive factors for malignant progression in multivariate analysis. We next divided leukoplakia specimens into 2 groups by the presence or absence of LAMC2-positive foci in the biopsy. In univariate analysis, the binary grading of LAMC2 expression, the basement membrane score and the grade of dysplasia were significantly associated with malignant progression. Since using the 3-grade dysplasia system made it difficult to recommend whether moderate dysplasia should be surgically treated or not, we also evaluated a binary grading in which mild dysplasia was classified as low grade dysplasia, whereas moderate and severe dysplasias were grouped into high grade dysplasia. Multivariate analysis

revealed that the presence of LAMC2-positive foci is a significant predictive factor with an approximately 11-fold increased risk of malignancy. Although the 3 grades of dysplasia had shown a significant association with malignancy, the binary grading of dysplasia was not a significant predictive factor for malignancy. We also analyzed the risk of malignant progression at the time point of 1 year after biopsy by using logistic regression. The LAMC2-positive leukoplakia had about an approximately 14-fold risk of malignant progression within 1 year compared to the LAMC2-negative leukoplakia.

Discussion

In this study, we demonstrated that LAMC2 expression was elevated in OSCC and associated with the progression of cancer invasion. This finding is consistent with the previous studies showing that an increase of LAMC2-positive cells is associated with a poor prognosis. Our results suggest that LAMC2-positive foci in a biopsy specimen of leukoplakia should be taken as a warning sign that neoplastic cells with invasive potential could be present in the lesion, which predicts the imminent risk of cancer, rather than the long-term incidence of malignant transformation. Our data indicated that the binary grading based on LAMC2 expression was superior to the binary grading system of dysplasia, in terms of recommendation for surgical intervention. We collapsed the LAMC2 scores for leukoplakia specimens into either positive or negative, for the sake of convenience. However, since both the size and the number of foci were significantly associated with malignant progression, a more refined combination of these two scores would increase their specificity and sensitivity in predicting malignancy.

The study underscored the value of LAMC2 as a marker indicative of invasion. LAMC2-positive foci in leukoplakia suggest the imminent risk of cancer. LAMC2 immunostaining would assist diagnostic practice and contribute to a more objective and precise assessment of the malignancy of leukoplakia.

（日本語要旨）

白板症は口腔粘膜の前癌病変であり、その癌化リスクの評価には上皮異形成が重要な指標となる。しかし上皮異形成の評価は主観的判断を含み、診断者による不一致も生じる。癌の浸潤は異常細胞が基底膜を超えるとともに発生する。ラミニン C2（LAMC2）は基底膜の構成要素であり、種々の癌における発現の亢進が報告されている。しかし上皮異形成から口腔癌への進展過程の LAMC2 発現の変化はよく分かっていない。本研究は LAMC2 発現の変化と癌の動態の関連を明らかにすることと、白板症の悪性化リスク評価への LAMC2 発現の応用の検討を目的とした。60 症例の進行癌、 39 症例の初期癌の手術材料と、93 症例の白板症の生検材料を収集し、LAMC2 の発現を免疫組織学的に調べた。正常上皮で LAMC2 は基底膜のみに検出されたが、癌ではすべての症例で間質との境界部の癌細胞に著明な発現の亢進が見られた。43 症例の癌を用いた cDNA マイクロアレイ解析でも癌における発現亢進が確認された。発現をスコア化して調べた結果、LAMC2 の高発現はより高浸潤性の浸潤様式と、より深い浸潤と有意な相関が見られた。白板症では一部の症例に LAMC2 陽性細胞の領域が観察された。LAMC2 陽性領域をスコア化して調べると、上皮異形成の程度、および悪性転化との有意な相関が見られた。生検材料における LAMC2 陽性領域の有無で白板症を 2 群に分けると、LAMC2 陽性の白板症は、LAMC2 陰性の白板症に比べて 11-14 倍の悪性化リスクを示した。以上より、LAMC2 は腫瘍細胞の浸潤性を反映するマーカーとして、白板症の悪性化の予測に有用であり、客観的で正確な診断に有用であることが示された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5110　号	NGUYEN Chi Thi Kim
論文審査担当者	主 査　　三浦　雅彦 副 査　　渡部 徹郎、鵜澤　成一	
論 文 題 目	LAMC2 is a predictive marker for the malignant progression of leukoplakia	

（論文審査の要旨）

白板症はその数～十数%が扁平上皮癌に進展するため、前癌病変として注意深く取り扱う必要がある。白板症の悪性度評価と癌化の予測は、上皮異形成の有無や程度の病理組織学的評価に基づいて行われる。しかし、その判定は病理学者の主観に負うところが大きく、診断の不一致も稀ではない。また、現在一般的な３段階の上皮異形成分類システムにおいて、中等度上皮異形成の病理診断はあいまいな概念であり、経過観察か治療かの判断という臨床的に重要な要請に対して明確な回答を与えているとはいいがたい。より客観的で、治療方針を明快に提案することのできる検査・診断手法が望まれる。本研究は、上皮異形成の診断に内在する難点の解決を目指しており、問題解決の姿勢と、研究の意義は高く評価できる。

本研究は上皮異形成から癌への進行が基底膜の破壊によって特徴づけられる点から発想されており、基底膜物質であり種々の癌の進展に関与することが報告されているLAMC2に着目している。LAMC2を研究対象として選択したことは、上皮異形成から癌への進行の可能性の予測という研究目的に沿い、妥当なものであったと考えられる。

本研究にあたっては、統計学的解析に必要な多数の症例を、正常上皮から進行癌に至る病期の異なる病変にわたり注意深く収集している。解析手法は病理組織検査で日常的に使用される免疫組織染色であり、実際の診断への応用は容易である。免疫組織学的染色は明瞭かつ特異的で、発現動態の詳細な解析を行う基盤として適当である。以上のように本研究で採用された解析手法は科学的に妥当であり、検査・診断への応用という研究目的に沿ったものと考えられる。

本研究においては、LAMC2の発現と、癌の臨床・病理学的動態との相関を解析している。その結果、LAMC2が癌の浸潤部で特異的に発現が上昇し、癌の浸潤の進行と密接に相関し、浸潤のマーカーとして有用であることが示された。また、上皮異形成と診断された白板症においてLAMC2が発現している症例が存在することを始めて見出し、LAMC2陽性細胞は浸潤能を持つ細胞の出現を示唆し、白板症の悪性化の予測因子として有用であることを示した。

本研究で示された、生検材料におけるLAMC2陽性細胞の有無によって白板症を低リスクと高リスク群に分ける分類法は、上皮異形成の病理診断の難点を緩和するものと考えられ、大きな意義が認められる。この分類法は経過観察か治療かの択一的な決定を容易にするという点において、臨床的価値が極めて高く、さらに、診断者の主観的判断を可及的に排除することにより、客観化と画一化に寄与するという点で、診断的価値も十分に高いものと考えられる。

以上のように口腔癌の発生過程における LAMC2 の発現動態の変化を明らかにし、口腔の上皮異形成の病理組織診断に内在する問題点の解決法を提案した本論文は、歯科医学の発展に大きく貢献するものであり、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	ELBASHTI Mahmoud Ellarousi
論文審査担当者	主査　水口 俊介 副査　三浦 宏之　　柴田 俊一
論　文　題　目	Application of Digital Technologies in Maxillofacial Prosthetic Rehabilitation

（論文内容の要旨）

Purpose: A considerable number of patients who have defects of the head and neck region secondary to surgical and/or radiotherapy management of carcinoma are seen each year in a dental practice. Resection of the head and neck tumors causes problems in fundamental activities such as speech, swallowing and mastication as well as appearance deformity. The medical treatment of head and neck cancer has advanced significantly. Therefore, these patients survive longer and the responsibility to provide them with prosthetic rehabilitation has increased. The conventional methods of visualization, designing, fabrication, and evaluation of maxillofacial prostheses require more frequently visit to the clinic and more time consuming for both practitioners and patients. Therefore, alternative treatment methods are needed to improve the quality of life for these patients.

Maxillofacial prosthetic rehabilitation for head and neck defect patients has become more sophisticated with the use of digital technologies. However, in the last few years the application of digital technologies in prosthetic rehabilitation has been limited. The previous and up to date studies have concentrated on numerous aspects of digital technologies such as, computed tomography, magnetic resonance imaging, three-dimensional laser scanning and printing, computer-aided design and computer-aided manufacturing, rapid prototyping, three-dimensional digital photographic imaging, digital acoustic analysis, and digital colorimetric analysis.

The essentially important aspects of digital technologies efficiency in the field of maxillofacial prosthetic rehabilitation have not yet been fully studied. Comprehensive evaluation of the efficiency of digital technologies in visualization, designing, fabrication, and evaluation of prostheses rehabilitation for head and neck defect patients are needed. Therefore, the aim of this research is to identify, validate and evaluate the potential benefits of using different resources of digital technologies and computer aided technologies in visualization, designing, fabrication and evaluation of prostheses that use for rehabilitate head and neck defect patients.

Material and Methods: The methods in this thesis were mixed research methods. The primary methods were case studies and action research. These methods are utilized ideally when dealing with small sample numbers and where the methods must adapt to changing situations. The overall research aim was broken down to form separate case studies, experiments, and clinical studies with more specific aims. Each of these studies has their own research design. A literature review was undertaken prior to each case study in order to identify recognized methods of measurement or evaluation used in practice or that have been validated by relevant scientific research. Four methods were used according to their suitability;

Questionnaires: A descriptive survey questionnaire was used to determine current practices, the awareness of digital methods and the need for development in digitized prosthetics rehabilitation. Closed-ended and multiple-choice questions as well as open questions were asked in order to maintain flexibility in the responses.

Pilot studies: Pilot studies were used to develop the techniques and gain a greater understanding of the issues before continuing with case studies. Findings from the pilot studies were also used to indicate methodology modifications and develop new theories that could be tested through case studies or experiments.

Case studies: Single case studies were used to test an existing theory, a unique or a typical case. Multiple studies were also used to validate the findings from a single study by simply replicating the methods to other cases. Results were obtained by measuring single (or where possible, multiple) aspects of prostheses construction using alternative methods.

Experimental and clinical studies: In addition to case study research design, aspects of experimental and clinical study designs were used. Experimental design was used where more accurate results could be obtained by controlling the environment and only measuring specific aspects without the influence of extraneous factors that may introduce bias to the results, in order to validate the findings of a case study or to help develop a case study method before it can be applied, or where it is not possible to involve patients because of ethical problems. In contrast, clinical studies were also used along with experiment studies to overcome the limitation that related with experiments.

Results: Eleven studies were performed to achieve the aim of this research thesis. Two literature review studies, two questionnaire studies, a pilot study, three case studies, and three experiment and clinical studies.

Questionnaires: The results of the first questionnaire study showed that Japanese dental practitioners are highly interested and willing to use digital technology in maxillofacial prosthetics. The average digital technology use was fairly widespread among dental practitioners (68%), but differs in the purpose of use. Overall, administrative and diagnostic technologies were used more often than clinical technologies. The results of the second questionnaire study showed that the proportion of head and neck surgeons who consistently

considered prosthetic rehabilitation before and after maxillectomy (22%) was considerably smaller than that of oral and maxillofacial surgeons (47%).

Pilot studies: The results of this study showed that the entire obturator was successfully scanned regardless of its structural complexity, modeled as three-dimensional data, and stored in the digital system of our clinic at a relatively small size (19.6 MB). A simulated obturator model was then accurately manufactured from these data.

Case studies: The results of the first case study showed that the definitive obturator was successfully delivered at the second visit. The patient was satisfied with the oral function and aesthetics of reproduced obturator. The results of the second case study showed that marked improvements in oral function were seen during both treatment phases. The patient's ability to perform psychosocial functions at school also improved during the use of the obturators. The results of the third case study showed that digital treatment planning has improved the patient's expectations of treatment options by virtual visualization. It has successfully managed complex maxillofacial defects and accelerated the treatment delivery by three-dimensional designing and manufacturing. Consequently, the patient's function and aesthetics were improved.

Experiments and clinical studies: The results of the first study showed that formants and nasalance of simulated /a/ sounds were successfully detected and analyzed. The results suggest that an articulation simulation system can be used to help surgeons and maxillofacial prosthodontists to plan post-surgical defects that will be facilitate maxillofacial rehabilitation. The results of the second study showed that no interaction between defect types and impression methods, and the accuracy of the impression methods was significantly different. Digitizing edentulous maxillectomy defect models using a chairside intraoral scanner appears to be feasible and accurate. The results of the third study showed that class II maxillectomy patients had a significantly higher F2 range than class I and class IV patients. In contrast, there was no significant difference in the F1 range between the three classes. The value of vowels pentagon space was a significantly higher in class II maxillectomy patients compared to class I and class IV. The results of this study indicated that the digitized acoustic characteristic of maxillectomy patients affected by the defect area. These findings can clinically be used to predict the speech ability after maxillectomy.

Conclusion: This research has identified the current state of art in maxillofacial prosthetic digital technologies. Previous research into the application of digital technologies has been reviewed and the limitations that require further development have identified. A several of study designs which include questionnaires, pilot study, case studies, experiment and clinical studies have been undertaken in order to address these limitations and develop new techniques in application of digital technologies to maxillofacial prosthetics.

＜要旨（和文）＞

この論文は顎顔面補綴治療におけるデジタル技術の応用の現状について示したものである．これまでのデジタル技術の応用に関する研究を総括しその限界と今後発展させるべき点についてまとめた．

総説‘補綴誌における顎顔面補綴に関する文献：10 年間の観察‘では補綴歯科においてインパクトファクターの高い 5 つの国際誌に掲載された論文の論文数，内容，著者，所属施設の地理的分布について分析した．顎顔面補綴に関する論文は症例報告が最も多かった．多くが一つの国からの著者によって書かれていた．アメリカ，インド，トルコ，日本の順に論文数が多かった．今後は症例報告だけでなく原著論文が多く出されること，また国際共著の論文が多く出されることが望ましいと考えられる．また，総説’顎顔面補綴治療の海外協力におけるデジタル技術の役割：将来の展望‘では様々な場面での顎顔面補綴治療の海外協力について述べた．具体的なモデルとしてリビアのミズラタ大学と東京医科歯科大学で補綴装置の作製をする例がある．

アンケート調査‘上顎欠損患者の補綴治療に関する外科医の認識と考えについて’では本学の口腔外科と頭頸部外科を対象にアンケートを行った．補綴治療について考慮している頭頸部外科医は口腔外科医より少ないことが分かった．頭頸部外科において術後の補綴治療の認識を高めることが今後必要と考えられた．またアンケート調査‘日本における顎顔面補綴治療へのデジタル技術の適応と使用について’では第 32 回日本顎顔面補綴学学会の参加者を対象にアンケート調査を行った．多くが顎顔面補綴治療におけるデジタル技術の応用に興味があり，応用したいと回答したが技術の使用目的は個人によって異なっていた．

パイロットスタディー‘顎顔面補綴装置（オブチュレーター）の電子データベースの作成’では口腔内スキャナーを用いてレジン床のオブチュレーターをスキャンし，複製を 3D プリンターにて出力した．顎顔面補綴装置をスキャンして装置の形状をデータベース化することが可能であることが示唆された．

症例報告‘高齢虚弱患者のオブチュレーターを短期で複製する際のデジタル技術の役割’では 89 歳の患者のオブチュレーターを再製作するにあたり，オブチュレーターを CT 撮影し得られた 3D データを元にコピー義歯を作製したところ，装着できたことを報告した．症例報告‘未就学，就学時の小児における上顎切除術後の補綴的リハビリテーション’では子供の上顎欠損症例における未就学時の審美の改善と発話の回復を目標とした補綴治療について報告した．また就学時には補綴装置の使用により学校生活における機能が改善していた．症例報告‘デジタル技術を用いて顎顔面補綴治療計画を行った症例’では左上顎洞の扁平上皮癌摘出術により左上顎欠損，左顔面欠損となった 75 歳の男性の治療計画を行った．三次元モデ上で補綴装置を設計し，患者と相談した．

‘上顎欠損モデルを用いたシミュレーションにおける構音の評価’は顎欠損の模型を用いて音声のシミュレーションを行った研究である．上顎欠損の模型を石膏で作製した．この模型を通して音声を発生させ，フォルマントと鼻音化率を測定した．このシミュレーションシステムは，術後の補綴的リハビリテーションを計画するのに役立つと考えられた．‘無歯顎の上顎欠損をデジタル化する際の精度と実現可能性について：比較研究’では 20 個の無歯顎上顎欠損患者の顎模型についてシリコン印象材を用いて印象採得する方法と口腔内スキャナーを用いた印象法の二通り

の方法でデジタル化したところ，口腔内スキャナーによる印象の精度が高いことが示された．‘上顎欠損患者の発話のデジタル計測’では，27 人の上顎欠損患者に‘あいうえお’を発声させフォルマント解析を行ったところ，欠損の大きさにより発話への影響が異なることが示された．

デジタル技術を応用することは具体的な利益をもたらすが，この研究によりデジタル技術の限界も明らかになった．しかし他のデジタル技術と同じように技術が急速に進歩して顎顔面補綴治療に応用可能となると考えられた．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5111　号	ELBASHTI Mahmoud Ellarousi
論文審査担当者	主　査　水口 俊介 副　査　三浦 宏之　柴田 俊一	
論 文 題 目	Application of Digital Technologies in Maxillofacial Prosthetic Rehabilitation	

（論文審査の要旨）

ELBASHTI Mahmoud Ellarousi の論文は顎顔面補綴治療におけるデジタル技術の応用の現状について示したものである．これまでのデジタル技術の応用に関する研究を総括しその限界と今後発展させるべき点についてまとめている．総説，アンケート調査，パイロットスタディー，症例報告，基礎研究と臨床研究という様々な手法によって，補綴治療における可視化，設計，製作，評価の各ステップにおいて，デジタル技術を応用することの意義と利益を明らかにし，顎顔面補綴治療に用いる上での問題点について言及した．

まず総説では，‘Maxillofacial prosthetic literature in prosthodontic journals: A 10-year observation. Journal of Prosthodontics 2016.‘として，補綴歯科においてインパクトファクターの高い 5 つの国際誌に掲載された論文について論文数，内容，著者，所属施設の地理的分布について分析した．顎顔面補綴に関する論文は The Journal of Prosthetic Dentistry に最も多く，内容は症例報告が最も多かった．多くが一つの国の著者によって書かれていた．アメリカ，インド，トルコ，日本の順に論文数が多かった．今後は症例報告だけでなく原著論文が多く出されること，また国際共著の論文が多く出されることが望ましいと考察した点が評価される．次に‘The role of digital technology in overseas maxillofacial prosthetic collaboration: A model of future collaboration.’として CT，MRI，口腔内スキャナー，光学スキャナー，3D 写真などを用いた診査・診断や装置の作製，データの受け渡しや遠隔医療などについて考察した．具体的なモデルとしてはリビアのミズラタ大学と東京医科歯科大学で患者のデジタルデータをやりとりし，補綴装置の作製をする例がある．しかし新しい技術を導入するには新たなワークフローの設定や術者のトレーニングが必要となり，それが欠点であるとの考察が加えられている．

次にアンケート調査では‘Surgeons awareness and consideration about prosthetic rehabilitation of maxillectomy patients.‘として，本学の口腔外科と頭頸部外科を対象にアンケートを行なっている．上顎切除術を行なっている頭頸部外科医は，術後の補綴治療について考慮していると答えた割合が口腔外科医より低いことから，頭頸部外科において術後の補綴治療の認識を高めることが今後必要であると考察している．また’ Adoption and use of digital technologies in maxillofacial prosthetics in Japan. Journal of Prosthodontic Research. 2016. ‘として，第 32 回日本顎顔面補綴学学会の参加者を対象にアンケート調査を行った．

回答者の多くが顎顔面補綴治療におけるデジタル技術の応用に興味があり，応用したいと回答する傾向があった．68 パーセントの回答者がデジタル技術を応用していたが，その目的は個人によって異なっていたとまとめられている．術者の専門による認識の違いや興味の違いという，誰もが日常に実感することを改めて科学的に示したという点で画期的な研究であった．

pilot study の‘Creating digitized database of maxillofacial prostheses (Obturators): A pilot study.’では口腔内スキャナーを用いてレジン床のオブチュレーターをスキャンしてデータ保存したところ，比較的容量の小さいデータ量で保存できた．また 3D プリンターを用いて出力したところ複製できたモデルは精度の高いものであった．この研究により患者の顎顔面補綴装置をスキャンして装置の形状をデータベース化することが可能であることが示唆されている．

症例報告では‘The role of digitization in the rapid reproduction of an obturator in a frail elderly patient’にて 89 歳の患者のオブチュレーターを再製作するにあたり，オブチュレーターを CT 撮影し得られた 3D データを元にコピー義歯を作製したところ，装着することができた例を報告した．また‘Preschool and school phases of post-maxillectomy prosthetic Rehabilitation in a child: A clinical report.‘として， 小児の 8 年間の経過を報告した．未就学のステージでは審美の改善と発話の回復を目標とし，就学時には補綴装置の使用により学校生活における機能が改善していた．最後に‘Digital treatment planning in maxillofacial prosthetics: A case report. ’では左上顎洞の扁平上皮癌摘出術により左上顎欠損，左顔面欠損となった 75 歳の男性の治療計画を行った． CT 撮影と 3D デジタル写真による三次元モデル上で補綴装置を設計し，設計について患者と相談した．これらは実際の臨床症例の様々な段階でデジタル技術が応用されたことを具体的に示した報告である．

また基礎研究と臨床研究では‘Evaluation of articulation simulation system using artificial maxillectomy models.’として，アラマニー分類 I から VI の上顎欠損の模型と欠損無しの模型を石膏で作製して音声を発生させ，フォルマントと鼻音化率を測定した．このシミュレーションシステムは，術後の補綴的リハビリテーションを計画するのに役立つと考えられた．また‘Feasibility and accuracy evaluation of digitizing edentulous maxillectomy defects: A comparative study.’では 20 個の無歯顎上顎欠損患者の顎模型についてシリコン印象材を用いた方法と口腔内スキャナーを用いた印象法の二通りの方法でデジタル化したところ，無歯顎上顎欠損模型をデジタル化する際に口腔内スキャナーによる印象の精度が高いことが示された．また‘Digitized speech characteristics in various maxillectomy patients.‘では 27 人の上顎欠損患者に‘あいうえお’を発声させてフォルマント解析を行ったところ，欠損の大きさにより発話への影響が異なることが示された．この結果は上顎欠損術後の発話能力を予測するのに役立つと考えられた．

これらの研究について ELBASHTI Mahmoud Ellarousi は補綴治療における可視化，設計，製作，評価の各ステップという独自の視点から総合的に解説し，デジタル技術を応用することの意義，利益と問題点について，まとめている．以上，本論文に含まれる研究のそれぞれが，総説，アンケート調査，症例報告，研究論文として顎顔面補綴の臨床に大変意義のあるものであるが，それらを元に顎顔面補綴治療におけるデジタル技術の応用について総体的に考察した

点がさらに高く評価される．また多くの論文が国際的な協力によるものであり，今後の国際的な発展も大いに期待される．従って本研究は今後の歯科医学の発展に大いに寄与すると考えられ，博士（歯学）の学位を申請するのに十分価値あるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	前川　祥吾
論文審査担当者	主査　木下　淳博 副査　中島　友紀　　新田　浩
論　文　題　目	Bone metabolic microarray analysis of ligature-induced periodontitis in streptozotocin-induced diabetic mice

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

歯周病は、歯槽骨の吸収を伴う慢性感染症である。糖尿病罹患者における歯周病の悪化が多くの疫学研究により報告されているが、未だ詳細なメカニズムは不明である。本研究では、9 週齢の C57BL/6J 雄野生型マウス（WT）およびインスリン欠乏性糖尿病モデルであるストレプトゾトシン誘導糖尿病マウス（STZ）を用いて、絹糸を上顎左側第二臼歯に結紮し、結紮誘導歯周炎を惹起させた。糖尿病と歯周病の関係について評価するために、骨吸収量の測定、歯肉における炎症性サイトカインおよび骨吸収・骨添加に関与する mRNA レベルの測定、骨代謝マイクロアレイ解析、骨吸収に関する組織学的評価を行った。高血糖状態において、非結紮側歯肉では Osteoprotegerin (Opg)の mRNA 発現が有意に亢進し、Osteocalcin の mRNA 発現は有意に減少していた。結紮 1 日目において、STZ のみ結紮側歯肉で Tumor necrosis factor-α（Tnf-α)が有意に亢進していた。結紮 3 日目では、WT では非結紮側と比較して結紮側に有意な骨吸収は認められなかったが、STZ において有意な骨吸収が観察された。また結紮 7 日目において、WT の結紮側では非結紮側と比べ有意に骨吸収が進行していたが、STZ ではさらに進行した骨吸収が認められた。結紮 3 日目の骨代謝マイクロアレイ解析では、STZ の結紮側歯肉において Gli1 および Collagen TypeⅥα1（Col6a1）の発現が有意に減少していた。また Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)法においても、STZ では WT と比較して歯肉における Gli1 および Col6a1mRNA 発現の有意な低下が確認された。組織学的解析では、STZ において Alkaline phosphatase (ALP)活性が低下しており、結紮側において STZ の歯槽骨に Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)陽性細胞の浸潤が有意に増加していた。本研究により、インスリン欠乏性糖尿病では骨代謝が変化しており、より早期に歯槽骨吸収をおこすことが示唆された。

＜緒言＞

歯周病は歯周病原細菌の感染によって惹起される、歯槽骨の吸収を伴う炎症性疾患である。プラーク中の歯周病原細菌は、内毒素や線毛、様々な酵素により歯周組織に炎症を誘発し、破骨細胞を活性化し歯槽骨の吸収を促進させる。多くの疫学的研究により、糖尿病が歯周病のリスクファクターであることが明らかとなっており、糖尿病の高血糖状態による終末糖化産物や酸化ストレスなどが炎症に関与することが報告されているが、糖尿病がどのように歯周病を悪化させるの

か、具体的なメカニズムは未だ不明な点が多い。

近年では、常在菌叢の菌構成バランスが崩れることで歯周病が発症するとする「ディスバイオーシス」と呼ばれる概念が新たに提唱されている。この概念に則り、歯に結紮を行うことで嫌気性細菌を局在させ、歯周炎を誘発させるマウスモデルが 2013 年に提唱された。本研究では、インスリン欠乏性糖尿病モデルマウスに結紮誘導歯周炎を誘発し、マイクロアレイを用いた骨代謝関連遺伝子発現の網羅的解析および骨吸収に関する組織学的評価を行い、糖尿病が歯周組織に与える影響について検討した。

＜方法＞

6 週齢の C57BL/6J 雄マウスにストレプトゾトシンを腹腔内注射し、空腹時血糖が 350mg/dl を超えたものを STZ として用いた。9 週齢時に WT と STZ に対し、#6-0 絹糸を上顎左側第二臼歯に結紮し、歯周炎を惹起させた。結紮後 3 日目および 7 日目に屠殺後、骨標本を作製し、歯槽骨吸収量を測定した。3 日目の結紮側において骨代謝マイクロアレイ解析を行い、1 日目、3 日目、7 日目での遺伝子発現を qPCR 法で解析した。パラフィン切片を作製し、Hematoxylin and Eosin (HE)染色および免疫組織染色、また破骨細胞の数の計測に TRAP 染色を、さらに破骨細胞と骨芽細胞のバランスを確認するため TRAP および ALP の二重染色を行い、組織学的解析を行った。

＜結果＞

ストレプトゾトシンの連続投与により、STZ では体重の有意な減少と空腹時血糖の有意な増加が認められた。歯肉におけるストレプトゾトシン誘導糖尿病の影響を調べるため、非結紮側における炎症性サイトカインおよび骨代謝関連遺伝子の発現を qPCR 法により調べたところ、STZ では WT と比べ有意な Opg の上昇と Osteocalcin の低下が認められたが、Tnf-α、Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (Rankl)、Transforming growth factor β1 (Tgf-β1)については有意な差は認められなかった。結紮側と非結紮側を比較すると、結紮 3 日目において、STZ では結紮側で有意に進行した骨吸収が認められたものの、WT でその差は認められなかった。結紮 7 日目において、WT の結紮側では非結紮側と比べ有意に骨吸収が進行していたが、STZ の結紮側ではさらに進行した骨吸収が認められた。結紮側歯肉における mRNA 発現の解析では、STZ では結紮 1 日目に Tnf-α の有意な上昇が認められたが、WT では Tnf-α は 3 日目に有意な上昇を示した。Tnf-α は結紮 7 日目には両群ともに非結紮側と変わらないレベルの発現量に落ち着いた。Opg は結紮 3 日目に STZ で有意に減少し、7 日目には WT で有意に亢進していた。Osteocalcin は、結紮 1 日目および 3 日目は両群ともに結紮側で減少し、STZ でのみ結紮 7 日目においても有意に減少していた。Tgf-β1 は結紮による変化がなく、Rankl は結紮側においてどちらの群も結紮 1 日目は約 7 倍、3 日目および 7 日目は約 3 倍上昇していたが、これら 2 つの mRNA の変化は WT と STZ において有意な差は認められなかった。WT と STZ の結紮側 3 日目の歯肉のマイクロアレイ解析では、Unpaired t-test および FDR 補正により、STZ の Gli1 および Col6a1 の mRNA 発現に有意な低下が認められた。さらに qPCR 法により、非結紮側歯肉の Gli1 および Col6a1 の mRNA 発現に差はなかったものの、結紮 3 日目において WT と比較した際の STZ における Gli1 と Col6a1 の mRNA 発現の有意な減少を確認した。免疫組織学的解析によって、Gli1 を発現している細胞は、WT と STZ 両群とも主に歯根膜に局在しており、歯肉上皮においても認められた。組織学的解析では、結紮 3 日目における STZ 結紮側の歯槽骨に TRAP 陽性細胞の有

意な増加が認められた。WT で歯槽骨の骨膜部および歯根膜部において ALP の活性が認められたが、STZ では ALP 活性が抑制されていた。

<考察>

疫学的研究により 1 型糖尿病が歯周病の悪化に影響することが示唆されているが、若い 1 型糖尿病患者と健常者では歯周組織における臨床パラメーターに差がないなど、相反する報告も存在する。本研究ではインスリン欠乏性糖尿病モデルマウスである STZ では結紮 3 日後に骨吸収が認められ、7 日後では WT と比べ有意に骨吸収が進行していたことから、1 型糖尿病患者ではより歯周炎が悪化するという説を支持している。

歯周炎における骨吸収については、RANKL-OPG の関与に焦点をおいて議論されることが多く、RANKL の上昇もしくは OPG の減少は骨吸収を促進するとされている。興味深いことに、本研究の STZ では Opg が非結紮側で WT に比べ上昇しているが、STZ の方が骨吸収を大きく起こし、また Osteocalcin も減少していた。Opg の上昇および Osteocalcin の減少は、1 型糖尿病患者では血漿中の OPG が上昇し、Osteocalcin が減少するという報告と一致している。

組織学的解析により、3 日目では STZ では WT に比べて結紮側での破骨細胞の増加が認められた。さらに結紮側では、WT、STZ ともに Rankl の上昇がみられたが、Opg の減少は STZ においてのみ認められた。これは結紮 3 日後に STZ 群のみ骨吸収が認められた原因のひとつとして考えられる。またインスリンシグナルによって Osteocalcin の分泌は促進されるが、Osteocalcin にはインスリン分泌を促すフィードバックが存在し、1 型糖尿病ではインスリンの欠乏によりこのフィードバックが崩壊することで Osteocalcin 分泌低下が起きることが報告されている。

骨芽細胞の分化には Hedgehog、notch、Wnt、BMP、FGF などいくつもの経路が必要であるが、Hedgehog シグナルは間葉系前駆細胞から骨芽細胞へ分化するために必要なシグナルである。Gli1 は Gli 相同体のひとつで、zinc-finger 転写因子であり、骨芽細胞分化に働く Hedgehog シグナルに関与する。本研究では STZ では結紮側歯肉における Gli1 の mRNA 発現は抑制されており、骨形成能が抑制されたことが示唆された。Collagen TypeⅥはリモデリングしている骨などで確認されており、骨形成に関与すると考えられている。Collagen Type I は骨基質としてのコラーゲンの大部分を占めており、Advanced Glycation End Products (AGE)架橋の形成によるコラーゲン構造の変化により、高血糖状態は骨質の低下を招くと報告されている。また Collagen Type Ⅵの合成が抑制されると、ヒト骨芽細胞において Collagen Type I が減少することが知られている。

組織学的解析では、STZ において非結紮側および結紮側の ALP の活性が骨膜上および歯根膜上で減少しており、高血糖状態が骨形成能の低下を促すことと一致している。過去の報告でも骨芽細胞における ALP 活性が高血糖で低下すること、糖尿病により歯根膜細胞において石灰化能が低下することが報告されており、今回の結果を支持するものである。

<結論>

STZ は骨芽細胞形成の低下および破骨細胞の活性化により、結紮 3 日後において骨吸収を惹起した。また結紮側の STZ の歯肉では結紮 3 日目において Gli1 と Col6a1 の mRNA 発現量が低下していた。インスリン欠乏性糖尿病では骨代謝が変化するため、より早期の歯槽骨吸収が起こることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5112　号	前川　祥吾
論文審査担当者	主　査　木下　淳博 副　査　中島　友紀　　新田　浩	
論 文 題 目	Bone metabolic microarray analysis of ligature-induced periodontitis in streptozotocin-induced diabetic mice	

（論文審査の要旨）

多くの疫学研究によって歯周病と糖尿病の関連性に関して報告されているが、歯周病と糖尿病の病態悪化に関する具体的なメカニズムは未だ不明な点が多い。

前川祥吾らは、膵臓β細胞特異的に毒性を持つストレプトゾトシンを使用し、インスリン産生ができず高血糖となったストレプトゾトシン誘導糖尿病マウス（STZ）を作製した。本研究では9週齢のC57BL/6J雄マウス（WT）およびSTZを用いて左側上顎第二臼歯に絹糸を結紮し、結紮誘導歯周炎を惹起させた。高血糖状態において歯肉の炎症性サイトカインや代表的な骨代謝遺伝子の違いについて mRNA の評価を行った。また、結紮後の歯槽骨吸収の測定を行い、歯周病と糖尿病の結紮による歯槽骨吸収の違いについて検討した。さらに炎症を惹起させた歯肉における骨代謝 DNA マイクロアレイ解析および mRNA の測定、骨吸収に関する組織学的評価を免疫組織学染色、HE 染色、TRAP/ALP 染色にて行った。いずれの実験も適正に計画された研究であると考えられる。

本研究から以下のような知見を得ている。

- STZの非結紮側歯肉ではWTと比べ *Opg* の mRNA 発現が高く、*Osteocalcin* の mRNA 発現が低かった。
- 結紮後3日でSTZでは歯槽骨吸収が起こり、結紮7日ではWTに比べ大きく骨吸収していた。
- 結紮側の歯肉における *Tnf-α* の mRNA の発現上昇は、STZ では1日目、WT では3日目に認められた。
- 結紮側の歯肉において、STZ では結紮3日目に *Opg* の mRNA の発現低下が認められた。また *Rankl* や *Tgf-β1* の mRNA の発現に WT とは相違なかった。
- 骨代謝マイクロアレイ解析にて、STZ 結紮側の歯肉では WT 結紮側と比べて *Gli1* および *Col6a1* の発現が低下することが認められた。
- 免疫組織学染色により、STZ では骨膜および歯根膜において Gli1 の発現が減弱していた。
- 組織学的評価により結紮 3日目の結紮側歯周組織では、STZ のみ破骨細胞の増加を認め、また STZ では ALP の発現低下を認めた。

これらの結果から、インスリン産生不能による高血糖状態は骨芽細胞の分化・増殖を低下させ、結紮による炎症によって早期に歯槽骨吸収を惹起したと考察した。

このように本研究において前川祥吾は、高血糖状態による歯周病病態悪化のメカニズムを骨代謝の面から多角的に評価を行い、以上の知見より歯学・医学分野の治療の発展に大きく貢献するものと期待される。

よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたり十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	康 思雯
論文審査担当者	主査　　鈴木 敏彦 副査　　中島 友紀、坂本 啓
論　文　題　目	Unique B7-H1 expression on masticatory mucosae in the oral cavity and trans-coinhibition by B7-H1-expressing keratinocytes regulating $CD4^+$ T-cell-mediated mucosal tissue inflammation

（論文内容の要旨）

The PD-1:B7-H1 pathway regulates immune responses and maintains homeostasis. Here, we identified a unique expression of B7-H1 on masticatory mucosae. B7-H1 was physiologically expressed on the dorsal surface of the tongue (DT), gingiva, and hard palate. Other squamous epithelia and other structures of the epithelia did not express B7-H1 in the steady state. Physiological B7-H1 expression on masticatory mucosae was limited on prickle cells, and its expression on basal keratinocytes (KCs) was strictly regulated. B7-H1 on prickle cells was upregulated by external topical stimuli, but B7-H1 on basal KCs was induced only by internal stimuli via infiltrating cells. The blocking of KC-associated B7-H1 or the lack of PD-1 on tissue effector $CD4^+$ T cells in mice lacking B7-H1 on immune cells drastically exacerbated the tissue inflammation induced by topical OVA painting as an exogenous antigen, indicating direct interaction with KCs and $CD4^+$ T cells. Trans-coinhibitory signals by KCs may modulate local T-cell/dendritic cell (DC) activation, resulting in inhibition of T-cell responses in both peripheral and secondary lymphoid tissues. Careful control of B7-H1 induction in KCs may play a crucial role in the protection from $CD4^+$ T-cell-mediated tissue inflammation by exogenous antigens (Ags) delivered from the mucosal surface.

<Introduction>

The oral mucosa is the type II mucosa lining the inside of the mouth and consists of

stratified squamous epithelium. Oral mucosae are divided into the masticatory and lining mucosae by their function. Masticatory mucosae are tough mucosa covered by keratinized stratified squamous epithelium, whereas lining mucosae are flexible mucosae covered by a non-keratinized epithelium.

Immune checkpoint co-inhibitory molecules play crucial roles in maintaining self-tolerance and preventing tissue damage by excessive immune responses. PD-1 (CD279) plays an important role in regulating immune responses at sites of tissue inflammation and in the tumor microenvironment via the ligand binding expressed on parenchymal tissue cells. B7-H1 (CD274) is one of ligands for PD-1 and is often induced in non-lymphoid tissue cells, such as epithelial and endothelial cells during an inflammatory episode. B7-H1 binding to PD-1 on T cells negatively regulates T-cell activation, and blockade of the PD-1:B7-H1 pathway converts resting or exhausted T cells into functional effector T cells. Although direct contribution of KC-associated B7-H1 to endogenous Ag-specific $CD8^+$ T-cell responses has been reported, contribution of KC-associated B7-H1 in $CD4^+$ T-cell responses against exogenous Ags has not been demonstrated.

In this study, we examined expression, regulation, and function of B7-H1 in murine masticatory mucosae.

<Materials and Methods>

Mice. Female 5-7-week-old BALB/c mice were purchased, and B7-H1$^{-/-}$ PD-1$^{-/-}$ WKO and RAG2$^{-/-}$ DO11.10 PD-1KO mice were generated by breeding B7-H1KO/c to PD-1KO/c mutants and by breeding RAG2$^{-/-}$ DO11.10 TCR to PD-1$^{-/-}$ mutants, respectively. All procedures were reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of Tokyo Medical and Dental University.

Topical application to oral mucosa and skin. Five μl each of the following reagents were applied onto the dorsal tongue or the right side of the buccal mucosa. For skin painting,

20 μl of each reagent was applied to the abdominal skin. TPA (400 μg/ml for the oral mucosa and 250 μg/ml for the skin), DNFB (0.2% dissolved in acetone:olive oil), and OVA (100 mg/ml) were used.

Immunohistochemistry. Cryostat sections were fixed in cold acetone and subjected to enzymatic immunohistochemistry. After blocking, sections were incubated with primary monoclonal antibodies (mAbs), followed by biotinylated anti-rat IgG. Antibody binding was detected using avidin-biotin-peroxidase complex system, visualized with the substrate diaminobenzidine and counterstained with haematoxylin.

Generation of dorsal tongue inflammation by DO11.10 T-cell transfer and OVA painting. DO11.10 T cells from RAG2$^{-/-}$ DO11.10 or RAG2$^{-/-}$ DO11.10 PD-1KO mice were stimulated with OVA and IL-2 for 7 days. Violet tracker-labeled activated DO11.10 T cells were transferred and OVA/DNFB were then topically applied to the dorsal tongue after 24 h. For mAb blocking experiments, 500 μg of control rat IgG (Cappel) or anti-B7-H1 mAb (MIH5) was intraperitoneally injected 2 h before topical painting.

Generation of bone marrow (BM) chimera mice. Recipient mice received a lethal dose of irradiation (7 Gy) and erythrocyte-depleted BM cells from 6-week-old B7-H1/PD-1WKO mice were intravenously transferred. At 5 weeks after the irradiation, transfer of DO11.10 T cells and topical painting of OVA/DNFB were performed, as described above.

<Results>

Prickle cells of the masticatory mucosa physiologically express B7-H1

B7-H1 was physiologically expressed in three keratinized masticatory mucosae, including the DT, gingiva, and hard palate. The epithelia of the dorsal tongue and gingiva expressed high B7-H1 in prickle cells, but not in basal KCs. Other oral non-keratinized lining mucosae, including the ventral tongue, buccal mucosa (BM), and soft palate did not express B7-H1.

Other organs with stratified squamous epithelium, the single squamous epithelium in the lung, and the single columnar epithelium of respiratory and digestive mucosae did not express B7-H1 in the steady state. Levels of B7-H1 expression in the DT and gingiva were age-dependently increased. The lack of B7-H1 expression in basal KCs was consistently observed, even in the older mice.

B7-H1 in non-masticatory mucosa and skin is inducible by topical stimuli, while B7-H1 expression in basal KCs is impaired

In the steady state, basal cells of abdominal skin did not express Ki-67 and B7-H1. In contrast, some basal cells in the buccal mucosa and dorsal tongue expressed low levels of Ki-67. TPA painting markedly increased the thickness of the epithelial layers and proliferation of basal cells in all three epithelia at 48 h. B7-H1 was clearly induced in prickle cells and in the upper layers but not in basal cells of the skin and BM. B7-H1 expression in the dorsal tongue was further up-regulated by TPA painting, but B7-H1 expression was not observed in the basal cells. Similar to TPA painting, OVA/DNFB painting induced epithelial thickness and proliferation of basal cells. OVA/DNFB painting induced B7-H1 expression in some basal cells, but expression on the basement membrane side was consistently impaired.

Blockade of B7-H1 on KCs exacerbates $CD4^+$ T-cell-mediated tissue inflammation

Transfer of in vitro-activated DO11.10 T cells and topical OVA/DNFB painting in BALB/c mice showed infiltration of a few $CD4^+$ T cells in the subepithelium at 48 h. In contrast, OVA/DNFB painting in the DO11.10 T-cell-transferred B7-H1/PD-1WKO BM chimera mice induced abundant $CD4^+$ T cell infiltration. Some lesions of basal cell layer were destroyed, and some $PD\text{-}1^+CD4^+$ T cells located over the basement membrane. Treatment with anti-B7-H1 mAb in the B7-H1/PD-1WKO BM chimera mice induced much more severe $PD\text{-}1^+CD4^+$ T cell infiltration and destruction of epithelial structures. These results indicate that KC-associated B7-H1

confers protection against epithelial tissue damage induced by $CD4^+$ T-cell infiltration.

Analysis of regional LN cells revealed that the percentages of DO11.10 T cells were dramatically increased by the anti-B7-H1 mAb treatment. Less than half of DO11.10 T cells did not divide in the control group, but the anti-B7-H1 mAb treatment markedly increased the proportion of divided cells and the division times. The proportion of IFN-γ^+ cells was markedly enhanced by the mAb treatment, and there was a reciprocal suppression of the proportion of IL-10^+ or $Foxp3^+$ cells. The profiles of Foxp3 expression and cell division showed that anti-B7-H1 mAb treatment inhibited the proliferation of regulatory T cells (Tregs). These results suggest that blockade of KC-associated B7-H1 at the local tissues inhibits activation of Tregs in the secondary lymphoid tissues.

Tissue-recruiting PD-1^+ T cells directly contribute to B7-H1-mediated protection

To examine the direct contribution of PD-1 expressed on DO11.10 T cells, we compared the responses of PD-$1^{-/-}$ and PD-$1^{+/+}$ DO11.10 T-cell transfer in the B7-H1/PD-1WKO BM chimera mice. PD-$1^{-/-}$ DO11.10 T-cell transfer elicited severe tissue inflammation with destruction of the basal cell layer and abundant $CD4^+$ T cell infiltration in the regional LNs. Total cell numbers, the proportions of DO11.10 T cells, and cell division assessed by violet tracker dilution were markedly increased by the PD-$1^{-/-}$ T-cell transfer. The lack of PD-1 on DO11.10 T cells markedly increased the ratio of IFN-γ^+ cells and decreased the proportions of Tregs, especially IL-10^+ Tregs. These results indicate the direct involvement of PD-1 on DO11.10 T cells in the inhibition of local tissue inflammation.

<Discussion>

We identified the unique expression of B7-H1 on prickle cells in masticatory mucosae and impaired expression of B7-H1 on basal cells. B7-H1 on prickle cells in the steady state appears to be induced by external dietary physical stimuli, accompanied by the functions

of mastication and swallowing. Both the dorsal tongue and gingiva possess complex anatomical structures that may receive various microbial stimuli through the mucosal surface.

It should be noted that external stimuli alone do not directly induce B7-H1 on basal KCs. Induction of B7-H1 on basal KCs appears to be closely correlated with infiltrating cells under the epithelium. Topical OVA/DNFB painting with DO11.10 T-cell transfer induced substantial $CD4^+$ T-cell infiltration. We previously demonstrated B7-H1-expressing KCs near the basement membrane in oral tissues from patients with oral lichen planus. Because IFN-γ is a potent cytokine for B7-H1 induction, IFN-γ secreted from recruiting effector $CD4^+$ T cells augments B7-H1 expression in KCs from the internal side.

Here, we demonstrated the substantial contribution of KC-associated B7-H1 in the regulation of local tissue inflammation. In our experimental setting, interactions only occur between the PD-1 on tissue recruiting effector T cells and B7-H1 on KCs and the applied Ags were exogenous; therefore, a possible explanation is that B7-H1-expressing KCs provide trans-coinhibitory signals to the PD-1-expressing recruiting T cells that receive the first signals via local professional APCs. “Cis-costimulation” has been shown to elicit much more efficient T cell activation than “Trans-costimulation”. However, trans-costimulation functions under some conditions in vivo (e.g., under high B7 expression or the weak requirement of the first signal). Tissue-recruiting effector T cells are already primed and activated, and therefore may not require strong TCR signals from professional APCs. Trans-coinhibitory signals by KCs modulate both local T-cell and DC activation and regulate T-cell immune responses at the peripheral and the secondary lymphoid tissues. Fine-tuning the control of B7-H1 induction in KCs may play a crucial role in mucosal homeostasis and protection from excess immune responses in disease.

＜和文要約＞

PD-1:B7-H1 抑制性共刺激経路は免疫応答を制御し恒常性維持に関わっている。本研究で、口腔咀嚼粘膜である舌背、歯肉、硬口蓋に B7-H1 の生理的な発現を見いだした。口腔内のその他の扁平上皮、口腔外の扁平上皮および扁平上皮以外の他臓器上皮では、 B7-H1 の生理的発現は認めなかった。咀嚼粘膜上皮における B7-H1 発現は、有棘細胞に限られており、基底細胞における発現は厳格に制御されていた。有棘細胞上の B7-H1 は、外来性の刺激で増強されるが、基底細胞上の B7-H1 は、炎症性細胞による内在性の刺激でのみ誘導された。上皮角化細胞上の B7-H1 の阻害あるいは組織浸潤エフェクター $CD4^+$ T 細胞における PD-1 の欠如が、外来性抗原として粘膜塗布された OVA による組織炎症を激しく悪化させたことから、上皮角化細胞と $CD4^+$ T 細胞との直接の相互作用が示された。上皮角化細胞によるトランス位の抑制性共刺激が局所における T 細胞と樹状細胞の活性化を修飾した結果、末梢局所および 2 次リンパ組織における T 細胞応答の抑制に至ったと考えられた。角化上皮細胞上の B7-H1 発現の微妙な調整が、粘膜由来の外来抗原によって誘導された $CD4^+$ T 細胞による組織炎症の防御に有用な役割を果たしていると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5113　号	康 思雯
論文審査担当者	主査　　鈴木 敏彦 副査　　中島 友紀、　坂本 啓	
論 文 題 目	Unique B7-H1 expression on masticatory mucosae in the oral cavity and trans-coinhibition by B7-H1-expressing keratinocytes regulating $CD4^+$ T-cell-mediated mucosal tissue inflammation	

（論文審査の要旨）

共刺激分子は、T 細胞の抗原特異的活性化を正および負にコントロールする細胞表面機能分子群であるが、なかでも PD-1 は、自己応答性 T 細胞や炎症局所に集積する T 細胞に発現されており炎症制御に深く関わっている分子である。 PD-1 のリガンド分子としては、 B7-H1 と B7-DC の２分子が存在するが、 B7-H1 は炎症状態下の組織細胞や癌細胞に高頻度で誘導される。康　思雯は、マウスの舌背粘膜上皮に B7-H1 が生理的な状態で発現していることに気付き、種々の粘膜上皮を解析したところ、咀嚼粘膜である舌背、歯肉、硬口蓋粘膜にのみ、生理的 B7-H1 発現があることを見いだした。次に、 B7-H1 はどのように発現誘導されるかを検討し、さらに、上皮細胞に発現している B7-H1 の機能的関与を調べるために、免疫系細胞には B7-H1 を発現せず、組織細胞のみに B7-H1 が誘導可能な骨髄キメラマウスを作成し、抗原特異的な $CD4^+$ T 細胞応答が評価可能な DO11.10TCR トランスジェニックマウス由来 $CD4^+$ T 細胞移入モデルを利用して、舌背粘膜より侵入する抗原に対する T 細胞応答を評価し、いくつかの新しい知見を見いだした。研究の着眼点は良く、機能解析のために用いた手法はよく計画されていた。

本研究で得られた結果は以下である。

１．咀嚼粘膜である舌背、歯肉、硬口蓋のみに生理的な状態での B7-H1 発現を認めた。

２．他の口腔粘膜および他の臓器の粘膜上皮には、 B7-H1 発現は認めなかった。

３．咀嚼粘膜における生理的 B7-H1 発現は、有棘細胞に限定されており、その発現は年齢と共に増加した。

４．生理的 B7-H1 発現を認めない皮膚および頬粘膜において、有棘細胞層の B7-H1 は、粘膜表面からの TPA あるいは DNFB、さらには DNFB/OVA 刺激で増強されたが、細胞増殖とはリンクしておらず、基底細胞における B7-H1 は制限されていた。

５．免疫細胞上の B7-H1/PD-1 発現を無視できる骨髄キメラマウスへの活性化 DO11.10$CD4^+$ T 細胞に移入は、舌背粘膜への DNFB/OVA 抗原塗布により、粘膜下に OVA 特異的 PD-1^+CD4^+ T 細胞の浸潤を促したが、抗 B7-H1 抗体投与により T 細胞浸潤はさらに増強された。

６．所属リンパ節においても、 B7-H1 阻害により OVA 特異的 T 細胞数と IFN-γ発現細胞の

顕著な増加および 免疫抑制サイトカインである IL-10 発現細胞および制御性 T 細胞誘導の低下が認められた。

７．上記 5 、6 と同様の結果が PD-1 欠損 DO11.10 $CD4^+$ T 細胞移入によっても確認できた。

８．B7-H1 発現上皮角化細胞と B7-H1/PD-1 ダブルノックアウトマウス由来 DO11.10 $CD4^+$ T 細胞と OVA パルス骨髄由来樹状細胞との共培養実験系において、角化上皮細胞数依存的 T 細胞増殖の抑制と抗 B7-H1 抗体添加による $CD4^+$ T 細胞増殖と IFN-γ発現の回復が認められた。

以上の結果から、康　思雯は、 角化上皮細胞に発現誘導される B7-H1 は、抗原特異的 T 細胞と樹状細胞との相互作用をトランス位で抑制できることを初めて明らかにした。 また、上皮局所での制御が、 局所リクルート T 細胞と樹状細胞の機能を修飾することで、所属リンパ節における T 細胞応答も制御されていることが示された。B7-H1 発現角化上皮細胞が自己応答性 $CD8^+$ T 細胞に対して制御的に働くことはすでに報告されていたが、本研究で、粘膜由来に侵入した外来抗原に対する $CD4^+$ T 細胞応答における上皮細胞上の B7-H1 の抑制機能を明らかに示したことは高く評価できる。また、日々様々な刺激を受ける咀嚼粘膜上皮では、免疫系の過度の応答から護るために、上皮細胞上の B7-H1 発現は繊細に制御されていることを明らかにした。

本研究は、これまで知られていなかった咀嚼粘膜特有の免疫制御分子発現を明らかにすると共に、その機能を明確に示したものである。本研究は、口腔における免疫制御メカニズムの解明に繋がる価値ある研究であり、医歯学および生物学の発展に寄与するものと考えられ、博士（学術）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	Asiya Hapaer
論文審査担当者	主査：玉村　啓和 副査：山岡　昇司 副査：伊倉　貞吉 副査：由良　敬
論　文　題　目	Investigating influential factors on the estimation of the origin of a recombinant virus using phylogeographic approach

（論文内容の要旨）

Abstract

Human immunodeficiency virus type 1 CRF07_BC is one of major HIV subtypes in China and its origin and transmission route have been analyzed by several previous studies. Despite the fact that the same phylogeographic analysis software was used by thesestudies, different results were reported. In this study, I focused on the estimation of viral origin and investigated possible factors that may influence the phylogeographic analysis of a recombinant virus. I designed 12 datasets which included much more viral samples than previous studies for conducting comparative analysis and important findings were obtained. First, the analysis using pure subtype genome region did not give better performance in the estimation of the viral origin. Second, adding an outgroup to the analysis did not increase the power to identify the viral origin. Third, sample bias had a major impact on the estimation and could lead to a different conclusion. Last, using multiple genes and multiple methods increases the chance to correctly identify the viral origin. By examining influential factors, I clarified several confusing issues in the estimation of the evolutionary history of a recombinant virus, which provide new insights on the phylogeographic analysis of viruses.

Keywords　HIV-1 CRF07_BC; Viral origin; Recombinant virus; Outgroup sequence; Phylogeographic analysis

Introduction

HIV-1 CRF07_BC virus is a recombinant virus whose genome included Thailand subtype B (B') and India subtype C fragments. It has been reported that these two subtypes were introduced into Yunnan province of China in the late 1980s and then the recombinant event occurred between the subtypes during the viral evolution, resulting in the emergence of the CRF07_BC virus in this area. However, a phylogeographic study published in 2011 by Liu et al proposed that the viral origin is Xinjiang Uyghur autonomous region of China (Xinjiang origin), which challenged the traditional view that CRF07_BC virus first emerged in Yunnan (Yunnan origin). Subsequently, Meng et al. conducted a

detailed analysis using more viral samples on this issue and their result supported Yunnan origin. I noticed, except for the difference in the sample collection, the two studies analyzed the data in different ways although the same computer software, BEAST, was employed. In the analysis of the *gag* and *pol* genes which include both subtypes B' and C fragments, Liu et al. used the pure subtype fragments only, while Meng et al. analyzed the recombinant genome regions. Moreover, Liu et al. added outgroup sequences, Thailand subtype B or Indian subtype C, to their analysis, whereas Meng et al. conducted the analysis without any outgroup sequences.

The view of Yunnan origin has been supported by epidemiological evidence. First, it was reported that the earliest HIV infection in Yunnan province was identified in 1989. Since 1989 to the mid-1990s, multiple subtypes of HIV-1 had been found coexisting in Yunnan area, which made it possible that a recombinant event occurred between subtypes. Second, it has been well known that Thailand subtype B and Indian C viruses were introduced into China via drug trafficking route and Yunnan province is adjacent to a famous heroin-producing area of Southeast Asia, the Golden Triangle region. By contrast, Xinjiang is located in northwest China which is far away from the heroin-producing area. Moreover, the earliest HIV infection in Xinjiang region was found in 1995, which is six years later than in Yunnan. The above evidence strongly support that the Yunnan is the most likely location where CRF07_BC virus emerged. Therefore, I am curious about what factors have influenced the analysis of previous studies and led to different conclusions. In this study, I conducted a comprehensive analysis to investigate possible factors that might have influenced the estimation of the virus origin.

Method

Sequences of the *gag*, *pol* and *env* genes of HIV-1 CRF07_BC were retrieved from public databases. To avoid bias in sample selection, less than four sequences were selected from the same geographic location in the same sampling year. The pure subtype datasets were created for the *gag* and *pol* genes. Then I employed BEAST2 to conduct phylogeographic analysis. The maximum clade credibility (MCC) tree was produced by using TreeAnnotator and the final location tree was displayed using FigTree v.1.4.2. Since the earliest viral samples of CRF07_BC virus available in the databases for Yunnan and Xinjiang were collected in the same year, beside the BEAST analysis, I further performed a linear regression analysis using Path-O-Gen to infer evolutionary relationship of viral samples.

Result

The comparative analyses showed that the similar results were obtained from recombinant and pure subtype datasets, and also the same results were obtained from with and without outgroup datasets (Table1, Fig1). In contrast, the sample bias between Yunnan and Xinjiang viruses had a major impact on the estimation. Thus I further made three bias-free datasets, recombinant *pol*, *gag* and pure subtype *env*, to conduct the BEAST analysis using the same parameter settings. However, a dataset, pure subtype *env,* still inferred the origin to be Xinjiang after removing the sample bias (Table 2). To find other possible influential factors, I further performed an evolutionary

analysis using Path-O-Gen tool. The result showed that the evolutionary relationship among viral samples from Yunnan and Xinjiang played an important role in the estimation of viral origin.

Discussion

The evolutionary analysis of recombinant viruses is becoming increasingly common in the field in recent years. However, whether the mosaic genome region can be used to the evolutionary analysis is poorly understood. The result obtained from this study suggests that it is unnecessary to use pure subtype to analyze the recombinant virus, but rather a longer sequence would provide more evolutionary information for the analysis. Whether the outgroup should be used in the phylogeographical analysis is another important issue raised by previous studies. My analyses showed that the same result was produced by with and without outgroup datasets in all analyses of three viral genes, suggesting that the outgroup is unnecessary in the phylogeographic analysis using BEAST.

Sample bias has been a challenge for evolutionary analysis using real viral data. The results obtained from my analysis demonstrated that the bias between viral samples from the candidate locations for viral origin can significantly affect the estimation of viral origin and so probably should be removed from the analysis. Moreover, by further performing the Path-O-Gen analysis to the three bias-free datasets, I found that the evolutionary relationship among viral samples from Yunnan and Xinjiang appeared to be a crucial factor in determining the viral origin. In addition, I suggest that the epidemiological evidence should always be taken into account for identifying a viral origin, because it is very difficult or impossible to remove all influential factors from the analysis.

Conclusion

To my knowledge, this is the first study that investigated the influence factors on the estimation of viral origin using phylogeographic approach. The findings revealed in this study may provide important and useful information for inferring the evolutionary history of viruses, in particular those recombinant viruses whose genome consists of different subtype fragments.

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	Asiya Hapaer
論文審査担当者	主査：玉村　啓和 副査：山岡　昇司 副査：伊倉　貞吉 副査：由良　敬
論　文　題　目	Investigating influential factors on the estimation of the origin of a recombinant virus using phylogeographic approach

（論文審査の要旨）

申請者は、組換えウイルスの起源推定研究における問題点を明らかにするとともに、どの地域を起源として発生したのかの正確な起源推定のための塩基配列情報から解析する方法を見出した。これまでに、その起源を推定するソフトウエアは開発されており、ソフトウエア BEAST の利用が標準である。本論文では、起源推定ために正しい実行するにはどのようなデータを用いればよいのかを、具体的に HIV のサブタイプのひとつである CRF07_BC を直接的な標的として解析した。これまでに、2 つの研究グループが BEAST を用いて解析しており、CRF07_BC の発祥地は雲南省と新疆ウイグル自治区の２つの説が導き出されている。本論文では、アウトグループの有無、データ数など、独自に改良を加えた新たな解析法を用い、発祥地の推定を実施した。その結果、アウトグループの有無等は解析結果にほとんど影響を与えないことを明らかにした。本研究の結果は、HIV の解析にとどまらず、他のウイルスへの応用の可能性も示唆され、ウイルスの起源情報はウイルス感染の被害拡大の防止に対して有用な情報となる。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	Hari Prasad Dulal
論文審査担当者	主査：鍔田　武志 副査：玉村　啓和 副査：伊倉　貞吉
論　文　題　目	Recombinant expression of a C-type lectin-like receptor Dectin-1 and analysis of its interaction with β-glucans

（論文内容の要旨）

Dectin-1 is a 28 kDa C-type lectin-like pattern recognition receptor (PRR) for β(1-3)-glucans. It recognizes highly conserved specific molecular structures called pathogen associated molecular patterns (PAMPs) present on the microbial cell surface, enabling the host to recognize a broad range of pathogens. It is expressed on dendritic cells, macrophages, monocytes, neutrophils and subset of T-cells. It contains an extracellular C-type lectin-like domain (CTLD) connected by a stalk to a transmembrane region, followed by a cytoplasmic tail containing an immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAM). When CTLD interacts with β-glucans, ITAM becomes phosphorylated and triggers superoxide production, phagocytosis enhancement, and cytokines induction.

Detail knowledge of interaction between Dectin-1 and β-glucan at atomic level is essential for the understanding its binding mechanism. Crystal structure of Dectin-1 is reported, and previous mutagenesis studies have revealed key residues essential for the ligand-binding. However, the ligand binding and successive oligomerization is still not fully understood in detail. We are trying to elucidate the details of β-glucan binding using CTLD of murine Dectin-1. Hexahistidine-tagged CTLD of murine Dectin-1 was expressed as inclusion bodies in E. coli and purified by Ni^{2+} affinity chromatography and size exclusion chromatography. Stable and concentrated samples are required for structural studies but we experienced its poor bacterial expression and low solubility. Heterologous protein production in E. coli host system can be diminished by biased codon usage so we tried its expression using codon optimized synthetic genes. Use of codon optimized genes slightly improved the expression, however, the yield was still low due to its inherent low solubility. We solved the problem of solubility and yield of Dectin-1 by adding a highly soluble GB1 (B1 domain of streptococcal protein G) fusion tag on its N-terminus (NT). Functional status of recombinant Dectin-1 was checked by performing binding analyses with β(1-3)-glucans using blue native PAGE, size exclusion chromatography, thermal shift assay, and NMR. CTLD showed binding with medium chain β-glucan, laminarin (degree of polymerization; DP~25) but not with short chain laminariheptaose (DP=7). Folding status was checked by ^{1}H-NMR which showed a good dispersion of signals suggesting its correct folding. Binding analysis was analyzed with ^{1}H-NMR and 2D ^{1}H-^{15}N HSQC titration experiments monitoring possible signal changes in the aliphatic region (-1.5 to 0 ppm).

Laminariheptaose hardly changed the ^{1}H-signals even at 1:50 molar ratio, in contrast, laminarin induced significant signal broadening at 1:1 molar ratio, which became more profound at a molar ratio of 1:3. Similar results were obtained with ^{1}H-^{15}N HSQC spectra. GB1 tag fusion to mDectin-1 CTLD enhances solubility 14-fold and expression 5-fold retaining its ß-glucan binding capacity without any effect of the tag on ligand binding (Dulal et al. *Protein Expr. Purif.* **193**, 97-104, 2016).

Binding analysis of mDectin-1 CTLD with laminarin showed the formation of an oligomeric complex which was found about 3 times of ligand-free CTLD, suggesting its trimer or high order complex after binding with laminarin. The formation of the high order oligomeric complex without the formation of dimer indicated the cooperative ligand binding of CTLD and also indicated the presence of some protein-protein interaction in the presence of ligand. Since ß-glucan binding and successive oligomer formation of Dectin-1 CTLD is strongly coupled to each other, we indirectly monitored the ß-glucan binding by detecting the formation of CTLD oligomer. The apparent *K*a of Dectin-1 with laminarin was found to be 9.2×10^{4} M^{-1} which indicates the medium affinity of Dectin-1 towards laminarin. Dectin-1 binds ß-glucan in a calcium-independent manner unlike with most of the C-type lectin receptors because Ca^{2+} binding site is spatially apart from the putative ligand binding site. CTLD of lectins typically contains highly conserved Glu-Pro-Asn (EPN) and Gln-Pro-Asp (QPD) motifs for recognizing mannose- and galactose-containing ligands, while, these motifs are also not conserved in Dectin-1 suggesting its unique binding with ß-glucans.

To identify the ligand binding residues of CTLD, we performed mutagenesis study and analyzed their oligomer formation with laminarin. We prepared series of CTLD mutants selecting most conserved and solvent exposed amino acids around the putative ligand binding site. W221A, H223A or Y228A showed no oligomer formation even in the presence of 1:10 equivalent molar ratio of laminarin. In the crystal structure of Dectin-1, W221, H223, and Y228 are spatially close to each other. These observations suggest that these residues are involved in direct binding with ß-glucans. Furthermore, we analyzed oligomerization of Dectin-1 mutants selecting most conserved surface exposed residues spatially apart from the putative ligand binding site (W221, H223 and Y228). All the mutants showed oligomer formation at 1:10 protein-laminarin ratio but some mutants showed reduced oligomer formation up to 1:5 ratio as compared to WT. We successfully identified some amino acid residues involved in protein-protein interaction and cooperative binding with laminarin. We optimized and established the production of selectively labeled Dectin-1 samples to obtain good quality signals which would be an important achievement for the next step of atomic level analyses of the binding events by NMR.

Keywords: Dectin-1; GB1 tag; *Escherichia coli*; NMR; solubility enhancement, mutagenesis, oligomer; cooperative binding

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	Hari Prasad Dulal
論文審査担当者	主査：鍔田　武志 副査：玉村　啓和 副査：伊倉　貞吉
論　文　題　目	Recombinant expression of a C-type lectin-like receptor Dectin-1 and analysis of its interaction with β-glucans

（論文審査の要旨）

Dectin-1 は主に骨髄球系細胞に発現する C 型レクチン様ドメイン(CTLD)を持つ膜分子で、真菌の β グルカンを特異的に認識して自然免疫を活性化する。申請者は、Dectin-1 による β グルカン認識の分子基盤を解析する目的で、Dectin-1 の CTLD 組み換えタンパク質の産生を種々のコンストラクトで試み、プロテイン G の B1 ドメインとの融合タンパク質を多量に精製することに成功した。β グルカンとの反応により Dectin-1 CTLD は三量体を形成し、この際に二量体が形成されず、また、蛍光スペクトロスコピーによる解析からも positive cooperativity が測定されたことから、Dectin-1 CTLD がリガンドとの会合により三量体形成が誘導されることが明らかとなった。また、Dectin-1 の系統的な変異体を作成して解析したところ、リガンド結合に関わることが示されているアミノ酸の変異によりリガンドとの結合と三量体形成が阻害されたが、周辺部の変異によってもより多量なリガンドが三量体形成に必要となった。以上の知見から Dectin-1 CTLD がリガンド依存的に三量体を形成することが明らかとなった。三量体形成はシグナル伝達に関わると考えられ、新規性の高い価値のある知見である。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉井　紗織
論文審査担当者	主査　清水　重臣 副査　古川　哲史　　中田　隆夫
論　文　題　目	Systemic Analysis of *Atg5*-Null Mice Rescued from Neonatal Lethality by Transgenic ATG5 Expression in Neurons.

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

オートファジーは細胞内分解システムで、飢餓応答や細胞内の品質管理に重要である。オートファジー因子である Atg5 を全身で欠損したオートファジー不全マウスは新生仔致死となるが、その致死の原因は明らかとなっていなかった。新生仔致死の原因として神経変性による母乳吸啜障害が疑われたため、この Atg5 不全マウスに神経細胞でのみ外因性 ATG5 を発現させたところ、Atg5 不全マウスが新生仔致死を克服することが観察された。成体まで生き延びる Atg5 不全マウスが作成されたため、このマウスを全身網羅的に解析することが可能となった。この神経特異的 Atg5 レスキューマウスでは成長不全、肝脾腫、全身性の炎症、生殖器の発達不全、鉄欠乏性貧血などの様々な異常が観察された。

＜緒言＞

オートファジーはほとんどの真核生物で保存されている細胞内分解システムである。飢餓などのストレスによりオートファジーが誘導されると、二重膜のオルガネラであるオートファゴソームが細胞質の一部を取り囲み、リソソームと融合することでオートファゴソームの中身が分解される。オートファジーは飢餓応答や細胞質タンパク質やオルガネラの品質管理に重要であると考えられている。オートファジーに必須な因子である Atg5 を全身で欠損したマウスは出生後 1 日以内に致死となるが、その新生仔致死の具体的な原因は明らかとなっていなかった。この Atg5 不全マウスは母乳を飲むことができないことが観察されていたため、母乳吸啜障害による脱水及び飢餓による致死が疑われ、その原因として神経変性が疑われた。そこで本論文では、Atg5$^{+/-}$マウスと神経特異的プロモーター下で外因性 ATG5 を発現するマウスを掛け合わせることで、全身で Atg5 を欠損するが神経でのみ ATG5 を発現するマウスを作製し、その表現型を全身網羅的に観察した。

＜方法＞

Atg5$^{+/-}$マウスと Neuron-specific enolase プロモーター下に GFP-ATG5 を発現する NSE-GFP-ATG5 トランスジェニックマウスを掛け合わせることで Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスを

作製した。このマウスの全身の臓器をウェスタンブロット法により生化学的に、また HE 染色及び免疫染色法により組織学的に解析した。ホルモン測定は ELISA キットあるいは外注検査により行った。鉄投与実験では 500 μg/g 体重の鉄デキストランを皮下投与し、血算は外注検査により行った。組織鉄定量は、組織ホモジネートと鉄抽出溶液（1 N HCl、10% TCA）を混合、加熱することで組織鉄を抽出し、メタロアッセイフェロジン法により定量した。骨髄鉄染色は Perls'法に DAB による増感法を組み合わせることで行った。生殖器及び小腸の発現遺伝子解析は RNA の逆転写反応及び cDNA のリアルタイム PCR 法により行った。

＜結果と考察＞

Atg5 不全マウスに神経特異的に ATG5 を再発現させたマウスは新生仔致死を克服する

$Atg5^{+/-}$マウスと NSE-GFP-ATG5 トランスジェニックマウスを掛け合わせることで $Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスを作製した。$Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは神経でのみオートファジーが回復していたが他の全身の臓器ではオートファジー不全であることが観察された。生存数を数えたところ、離乳時点で $Atg5^{-/-}$マウスは存在しなかったのに対し $Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスはメンデル比に近い頻度で観察された。$Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスはほとんどの個体が 8 週齢以上まで生存し、長い個体では半年まで生存した。以上のことより、Atg5 欠損マウスの新生仔致死は神経変性が原因であること、神経でのみオートファジーを回復させることで $Atg5^{-/-}$マウスは生き延びることができることが示唆された。

$Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスの解剖学的、組織学的解析

$Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは肝臓、脾臓、リンパ節が腫大し、骨格筋、脂肪組織、下垂体、唾液腺、生殖器が際立って小さいことが確認された。各臓器の組織を観察したところ、肝臓、脾臓、小腸陰窩のパネート細胞、骨格筋などで過去の報告と同様の異常が観察された。また、全身で様々な程度の炎症性変化が観察された。

特に目立った異常として生殖器が有意に小さいことがあげられる。雌の $Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスの卵巣では形態的に正常な 1 次、2 次およびグラーフ卵胞が観察されたが、黄体は観察されず、多数の閉鎖卵胞が観察された。このことから、雌の $Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは排卵がないことが示唆された。また、$Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスの子宮は糸状に細く、子宮内膜の発達がなかった。これらの形態は、二次性徴前の組織と類似していた。同様に、オスの $Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスの精巣では形態的に正常な精祖細胞が観察されたが、成熟精子が有意に減少していた。ライディヒ細胞は小さく、未成熟な形態を示していた。精巣上体内にはコントロールマウスでは多数の成熟精子が観察されるのに対し、$Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは成熟精子が極端に減少し異常細胞が増加していた。以上より $Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは精子形成に異常をきたしていると考えられた。

上記の異常に加え、$Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは複数の未報告の組織学的異常が観察された。腎臓はメサンギウム増殖性糸球体腎炎の像を示し、肺は間質性肺炎と肺胞の虚脱が観察された。骨格筋では既報告の異常に加え、核の数の増加が観察され、障害と再生が繰り返されていることが示唆された。げっ歯類の顎下腺は性差があることが知られるが、雄の $Atg5^{-/-}$;NSE-Atg5 マウ

スでは顎下腺の雌化が観察された。

Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスは LH、FSH、テストステロン低下を伴う精子形成不全を示す

雄の Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスの精巣で精子形成不全が観察され、顎下腺で雌化が見られたことから、Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは性ホルモンによる変化が減少していることが示唆された。そこで血清テストステロンを調べたところ Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでテストステロンが大きく低下していたため、観察された精子形成不全はテストステロンの低下によることが示唆された。ライディヒ細胞からのテストステロン産生は下垂体ホルモンである LH と FSH に依存することが知られるが、血清 LH、FSH は Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスで低下していることが観察された。これらのことから Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスの精子形成不全は LH、FSH とテストステロンの低下が強く関わると考えられた。

Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスは鉄吸収低下による鉄欠乏性貧血を示す

Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスは貧血を呈し、末梢血の塗抹像では厚みが少なく染色性の低い赤血球が観察された。これは鉄欠乏性貧血の赤血球像と類似していたため血清鉄を調べたところ、Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスの血清鉄は有意に低下していることが観察され、鉄欠乏が示唆された。そこでマウスに鉄を投与したところ、鉄を投与していない Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでみられる低色素性貧血が鉄を投与することで改善した。このことから貧血の少なくとも一部が鉄欠乏によるということが示唆された。鉄欠乏の原因を調べるため、鉄の吸収、鉄の体内分布、鉄の損失を調べた。各臓器で組織鉄を定量したところ、鉄は全身的に欠乏していることが示唆された。また明らかな外表出血と消化管出血も陰性だったため、鉄損失の増加による鉄欠乏も否定的であった。一方小腸上皮に発現する鉄吸収関連因子のタンパク質発現を調べたところ、Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスで DCYTB と FPN の発現が低下していることが観察された。以上より Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスは小腸上皮における鉄吸収関連因子の発現低下により鉄吸収不全をきたし、鉄欠乏を呈していることが示唆された。

小腸上皮における鉄吸収関連因子の発現量は転写制御とホルモンによる分解制御を受けることが知られる。肝臓ホルモンであるヘプシジンは鉄吸収関連因子の分解を亢進することで鉄吸収を阻害するが、Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは血清ヘプシジンが有意に低下していた。このことからホルモンによる分解制御過剰が原因である可能性は否定的であった。一方、鉄吸収関連因子の転写制御を調べるため、マウスに鉄欠乏食を与えたところ、コントロールマウスでは鉄吸収関連因子の mRNA 発現が非常に大きく上昇することが観察されたが、Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスではこれらの印紙の発現が有意に低下していた。以上のことから Atg5$^{-/-}$;NSE-Atg5 マウスでは鉄吸収関連因子の転写不全によりタンパク質発現量が低下し、鉄吸収不全をきたしていることが示唆された。

＜結論＞

- 全身性オートファジー欠損マウスである Atg5$^{-/-}$マウスは神経でのみ ATG5 を発現させることで新生仔致死を生き延びることができる

- オートファジー不全マウスは既報告の異常を含め、様々な臓器で組織学的異常を示す
- オートファジー不全マウスはゴナドトロピンとテストステロン低下を伴う精子形成不全を示す
- オートファジー不全マウスは鉄欠乏を示し、鉄吸収関連因子の転写不全に起因すると考えられる全身性オートファジー欠損マウスで新生仔致死が回避できたことにより、成体におけるオートファジーの生理的役割を解析することができた

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5116　号	吉井　紗織
論文審査担当者	主　査　清水　重臣 副　査　古川　哲史　　中田　隆夫	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、オートファジーの生理的役割を解析したもので、神経におけるオートファジーが出生直後の吸啜に関わっていること、小腸におけるオートファジーが鉄欠乏性貧血に関わっていることなどを明らかにしている。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究で申請者は、神経以外の全身でオートファジーを欠損したマウスを作製し、これを全身のオートファジー欠損マウスあるいは臓器特異的オートファジー欠損マウスと比較している。これにより、成体におけるオートファジーの役割を明らかしようとしている。これらの研究は、オートファジーの新たな生理的役割を知る上で貴重なものであり、極めて高く評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

1. 全身のオートファジー欠損マウスが出生直後に死亡する原因は、神経におけるオートファジーが吸啜に必要な為である。
2. 神経以外の全身でオートファジーを欠損したマウスは、成体になるものの成長不全が認められる。また、このマウスでは、間質性肺炎やメサンギウム腎炎などの病態が観察される。
3. このマウスでは、さらに鉄欠乏性貧血が顕著であり、その原因は小腸上皮細胞における鉄の取込み障害が関与している。

以上のように申請者は、オートファジーの新たな生理機能を発見しており、重要な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、生理学、細胞生物学、血液内科学などの豊富な知識が必要であり、申請者の研究に対する知識と技術力が優れていることが窺われる。

４）考察・今後の発展性

オートファジー欠損によって鉄吸収障害が生じる分子メカニズムに関しては今後の解析が必要

であるが、この機構が鉄欠乏性貧血の発症に関わっている可能性も考えられ、今後の臨床応用に繋がることが期待できる。

３．その他　なし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	馬場　裕信
論文審査担当者	主査　三木　義男 副査　三宅　智、　田中　真二
論　文　題　目	Identification of SATB1 as a Specific Biomarker for Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

大腸癌においてリンパ節転移は予後不良因子であり、リンパ節転移に関わる因子の同定は大腸癌における新しい診断法や治療に寄与する。本研究において、コピー数解析および発現解析の統合解析を利用し、大腸癌リンパ節転移に関連する遺伝子の同定およびその有用性の検討を目的とした。手術を施行した Stage Ⅰ～Ⅲ大腸癌 156 例の凍結組織標本を用いたマイクロアレイ法により網羅的遺伝子発現解析と網羅的ゲノムコピー数解析を行い、リンパ節転移なし群とリンパ節転移あり群に分けて遺伝子発現量とコピー数変化を比較した。リンパ節転移あり群でコピー数の増幅とともに遺伝子発現が有意に上昇している遺伝子をリンパ節転移関連遺伝子とし、抽出された遺伝子による組織標本での免疫組織科学的染色(IHC)を行い蛋白発現を評価した。結果と臨床病理学的因子との関連について統計学的解析を行った。網羅的統合解析によりリンパ節転移に有意に関連する遺伝子として SATB1(Special AT-rich binding protein 1)が抽出された。IHC では SATB1 高発現群においてリンパ節転移陽性例が多く、またリンパ節転移のない大腸癌においても予後不良因子であった。網羅的分子情報の統合的解析により大腸癌のリンパ節転移関連因子として、SATB1 を同定した。SATB1 の高発現は、リンパ節転移予測因子および予後予測因子となる可能性がある。

＜諸言＞

世界において大腸癌は 3 番目に多い癌であり、部位別死亡率としては 2 番目に多い癌である。日本においては、大腸癌はこの 20 年で 2 倍以上増加し、2 番目に多い癌である。TNM 分類は有用な診断基準であり、治療方針決定の基準となる。リンパ節転移を伴う患者の予後は不良であり、リンパ節転移の予測は大腸癌における個別化医療に寄与する。以上のことから大腸癌リンパ節転移関連遺伝子の同定は大腸癌の診断、治療に有用である。

マイクロアレイ分析は癌関連遺伝子の同定に有効な手段である。近年において SNP アレイはコピー数解析に有用な方法となってきている。網羅的遺伝子発現解析と網羅的ゲノムコピー数解析の統合解析により、双方ともリンパ節転移陽性群において有意な発現をする遺伝子は有用なバイオマーカーであるはずである。本研究においては統合解析により SATB1 遺伝子が抽出された。

SATB1 は様々な癌での高発現が報告され、腫瘍増殖、浸潤、転移に関連するとされている。

＜方法＞

2002 年から 2011 年まで東京医科歯科大学にて切除したリンパ節転移あり群 144 症例、無し群 184 症例の合計 328 症例を対象とした(学内承認番号 831)。328 例のうち、156 例を網羅的統合解析の対象とし候補遺伝子を抽出し、QuantitativeRT-PCR を 124 例、IHC は 328 例に施行した。網羅的統合解析においては Fold change>2.0,P＜0.05 となる遺伝子を候補遺伝子とした。IHC では SATB1 遺伝子の発現を、staining intensity(SI)および positive percentage(PP)で評価し、それぞれ negative:0, weak:1, moderate:2,strong:3,染色比率 0–9%:1、10–50%：2、 >50%：3 とし、SI×PP が 1 以下を低発現、2 以上を高発現とした。IHC の結果に臨床病理学的検討を加え評価した。

＜結果＞

網羅的統合解析により FDR<0.25 の条件において、Fold change>2.0 のものは SATB1 のみであり、これを候補遺伝子とした。

Quantitative RT-PCR では、非癌部に比べ癌部で有意に SATB1 の発現が見られた。またリンパ節転移陽性群において陰性群に比較し有意に SATB1 の発現が見られた。

IHC においては、非癌部での発現はほとんど見られなかった。IHC を施行した 328 例(SATB1 高発現群：147 例、低発現群：181 例)で臨床病理学的検討を行った。その結果、SATB1 高発現群は静脈侵襲、術後再発、リンパ節転移に有意に関連していた。また、予後の検討では SATB1 高発現群の生存率 OS および無再発生存率(RFS)は有意に不良であった。多変量解析においても SATB1 高発現は予後不良単独因子であった。また、リンパ節転移陰性の症例においても SATB1 は予後不良因子であった。

＜考察＞

SATB1 機能は主に免疫細胞において研究され、T 細胞の分化に重要な役割を果たすとされてきた。SATB1 は genome organizer として働き、base-unpairing region(BURs)に結合するとされる。リン酸化の有無により SATB1 は activator と repressor の双方の作用し、細胞の遺伝子発現を変化させるとされるが、詳細は明らかではない。また癌においては、細胞増殖、浸潤、転移に関連するとされるが、その機序は明らかでない。

大腸癌治療において手術治療が主であるが、治癒切除した患者の 40%で術後再発を認める。様々な補助化学療法が術後の予後改善に寄与しているが、効果のない患者もいる。また化学療法は高価であり、副作用のリスクもあるため、転移や再発の高リスク因子の同定は、補助化学療法やその他の治療に有用である。リンパ節転移のないステージⅡ大腸癌においても、再発ハイリスク群では補助化学療法が推奨されているが、補助化学療法の有用性は現状明らかでない。本研究においては、ステージⅡにおいても SATB1 高発現は予後不良単独因子であり、リンパ節転移のない患者におけるハイリスク因子と考えることができる。

また、リンパ節転移のない早期大腸癌では内視鏡治療が行われるが、リンパ節転移高リスク群

では、リンパ節郭清を伴う追加腸管切除が必要となる。日本においてハイリスク早期大腸癌におけるリンパ節転移陽性率は 10%程度であるが、90%の患者はリンパ節転移を認めず過大手術が施行される。以上からリンパ節転移関連因子の同定は個別化医療に寄与するはずであるが、本研究では早期大腸癌症例は 35 例とその有用性は示されなかった。

＜結語＞

SATB1 高発現は大腸癌リンパ節転移に有意に関連し、予後不良因子でもあった。SATB1 は大腸癌において有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5117　号	馬場　裕信
論文審査担当者	主　査　三木　義男 副　査　三宅　智、　田中　真二	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、網羅的遺伝子発現解析と網羅的ゲノムコピー数解析の統合解析により、大腸癌のリンパ節転移関連因子及び予後因子として、SATB1 を同定した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

大腸癌においてリンパ節転移を規定する因子の同定は新しい診断法や治療に寄与する。そこで、網羅的遺伝子発現解析と網羅的ゲノムコピー数解析の統合解析により、リンパ節転移陽性群において有意に発現が増加しコピー数が増幅した遺伝子を探索することが、有用なバイオマーカー同定に繋がることに注目し、リンパ節転移予測因子や予後予測因子の探索を進めた点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. リンパ節転移陽性群でコピー数の増幅とともに遺伝子発現が有意に上昇している SATB1 をリンパ節転移関連遺伝子として同定、免疫染色(IHC)でも SATB1 高発現群においてリンパ節転移陽性例が多いことを見出した。
2. リンパ節転移陰性大腸癌においても、IHC による SATB1 高発現群は予後不良因子であった。

以上のように、SATB1 の高発現が、大腸癌リンパ節転移予測因子及び予後予測因子となる可能性を認めたことは新しい知見であり、基礎・臨床両面において有意義な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では、重要な臨床情報が付加された臨床検体を対象に、ゲノム解析技術、免疫組織科学的染色技術が用いられ、本手法は十分なゲノム科学的及び病理学的知識の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について早期大腸がんのリンパ節転移ハイリスク群への展開が重要と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小谷野　岳
論文審査担当者	主査　関矢　一郎 副査　塙　　隆夫、立石　宇貴秀
論　文　題　目	Comparison of Bone Remodeling Between an Anatomic Short Stem and a Straight Stem in 1-Stage Bilateral Total Hip Arthroplasty

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

骨リモデリングは人工股関節置換術(THA)後の大腿骨への荷重伝達の変化によって生じる。X線学的には荷重部の骨新生による cancellous condensation (CC) と応力遮蔽による骨萎縮(SS)などが観察される。SS はステム周囲骨折や再置換術の困難さの原因となる可能性が指摘されており、骨温存は重要である。日本人の変形性股関節症の９割以上は寛骨臼形成不全が原因と報告されている。寛骨臼形成不全股では大腿骨の形状が特異的で、モジュラー型や、特別に設計されたステムの使用が推奨されている。アナトミカル・ショート・ステム（A-stem）は寛骨臼形成不全股のデータを三次元的に解析し、より近位での固定・荷重伝達を目的として設計された。本検討ではステム形状が骨リモデリングに与える影響を明らかにするために、両側一期的 THA において、片側に A-stem を、反対側に従来型ストレート・ステム（S-stem）を設置し、前向きに中期の骨リモデリングを検討した。単純 X 線によりステム固定性、CC、SS を、また DEXA を用いてステム周囲の骨密度を検討した。これらの評価は Gruen の zone 分類と、新たに設定した等間隔 zone 分類で行った。

ステムは全例固定性良好だった。A-stem 側では S-stem 側より CC を近位に認め、SS の範囲は狭く、骨密度は近位まで高く保たれた。これらのことはより近位固定されたため骨温存できたことを示している。A-stem では設計思想通りの荷重伝達・骨温存が実現できたと考えられる。

＜緒言＞

人工股関節全置換術（THA）後には、荷重がステムを介して大腿骨に伝わり、荷重伝達が変化し、骨リモデリングが起こる。骨リモデリングはX線学的には荷重部の骨新生による cancellous condensation (CC) 、骨皮質肥厚や、その近位での応力遮蔽による骨萎縮(SS)などとして観察される。SS による骨密度低下は、ステム周囲骨折の原因となる可能性や、再置換術を困難にする可能性が指摘されており、骨温存は重要な課題である。一般的なステムは、ほぼ正常な形態を持つ一次性変形性股関節症の股関節に基づいて設計されたものが多い。日本人の変形性股関節症の 9 割以上は寛骨臼形成不全が原因の二次性股関節症によると報告されている。寛骨臼形成不全股は、短い頸部、大きい大腿骨頚部前捻角、細くストレートな骨幹部など、特徴的な異常を認めるため、

これらの異常に適応できるモジュラー型や、特別に設計されたステムなどが推奨される。アナトミカル・ショート・ステム（A-stem）は、日本の寛骨臼形成不全患者の三次元データを用いて、より近位でステムを固定・荷重伝達する目的で設計されており、術後の骨温存が期待されている。

本研究では、形状の異なるステムの骨リモデリングを評価するために前向き無作為試験を設計した。両側一期的 THA において、一方に A-stem を、他方に従来型ストレート・ステム（S-stem）を挿入し、術後中期の臨床成績及び骨リモデリングを評価した。

＜方法＞

対象は両側一期的 THA に際し、無作為に片側に A-stem(CentPillar GBHA, Stryker Orthopaedics, Mahwah, NJ, USA)を、反対側に S-stem(Super Secur-Fit HA, Stryker Orthopaedics, Mahwah, NJ, USA)を挿入した 41 例（男/女=6/35、手術時平均年齢 51.7 歳）である。Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA)を施行できなかった 5 例（男 2 例、女 3 例。死亡 2 例、lost follow-up 3 例）を除外し、最終的に 36 例（72 股関節）を術後平均 9.2（7.9-11.0）年において評価した。診断は変形性股関節症 30 例、特発性大腿骨頭壊死 4 例、関節リウマチ 1 例、多発性骨端異形成症 1 例だった。

S-stem と A-stem は、いずれもチタン合金（Ti6Al4V）製のセメントレスステムである。S-stem は従来のダブル・ウェッジ型で、近位固定の fit and fill ステムである。近位表面はアーク蒸着したチタン上に hydroxyapatite (HA)をコーティングしている。A-stem は、解剖学的かつ短い形状を持つ近位固定のステムである。近位表面は sand blast 加工した上に HA をコーティングしている。

術前の骨形態は股関節単純X線写真を用い Dorr 分類と Flare index で評価した。大腿骨頚部前捻角は CT を用いて評価した。術後のステム固定性は Engh の分類に準じて、骨リモデリングは CC、SS 及び皮質骨肥厚を、股関節単純 X 線写真で評価した。大腿骨の骨密度(BMD)は DEXA で計測した。これらの評価は Gruen の zone 分類(G 分類、G1-G7)と、新たに設定した等間隔 zone 分類（E 分類）で行った。E 分類は 1.5cm 幅の zone を外側及び内側の近位からそれぞれ L1-L6 及び M1-M6 とし、M2 及び M3 の間が小転子中央となるようにした。各 zone において CC、SS、皮質骨肥厚の出現率は McNemar 法で、BMD は対応のある t 検定で比較した。

＜結果＞

術前の大腿骨形状は、Dorr 分類、Flare index、大腿骨頚部前捻角のいずれも S-stem 側と A-stem 側の間に有意な差はなかった。

有害事象は 3 例（4 股関節）に認められた。1 例（2 股関節）において A-stem 側(左)で反復性脱臼が、また S-stem 側(右)で有痛性偽腫瘍があり、両側とも術後 9 年でカップ及びヘッドの再置換術を施行した。この症例は両側ともステムには問題がなく、再置換しなかったため、骨リモデリングの評価に含めた。ステム周囲骨折は 2 例あり、いずれも A-stem 側で観察された。統計学的には A-stem 側と S-stem 側の骨折の発生率に有意差はなかった。これら骨折の 2 例は最終評価から除外した。いずれの側にも深部感染は観察されなかった。

骨折した症例を除いて、全てのステムは Engh の分類の bone ingrown stable だった。G 分類

では CC は全ての症例でいずれの側でも G2 及び G6 に認められた。E 分類を用いると、CC は S-stem 側では L4 から L5 及び M4 から M5 に、A-stem 側では L3 から L4 及び M3 から M4 に対応していた。CC の出現率は、S-stem 側に比べ A-stem 側の方が近位（L2、L3、M2、M3）で有意に高く、遠位（L5、L6、M5、M6）では有意に低かった。

SS は CC の領域より近位に観察された。G 分類では SS は S-stem 側及び A-stem 側のいずれでも G1～G2 及び G7～G6 に認められた。これらは E 分類では、S-stem 側では L1～L5 及び M1～M5 に、A-stem 側では L1～L3 及び M1～M3 に相当した。SS の出現率は E 分類では L3、L4、M3、M4 において S-stem 側よりも A-stem 側で有意に低かった。

BMD は A-stem 側で G2、G3 及び G6 の値が有意に低かった。E 分類では、L3、M3、M4 の BMD が S-stem 側より A-stem 側で有意に大きかった。E 分類において BMD の関心領域（ROI）の面積は、S-stem 側より A-stem 側において近位部（L1、L2、L3、M2）で有意に小さかったのに対し、遠位部（L5、L6、M4、M5、M6）では有意に大きかった。

皮質骨肥厚は、S-stem 側と A-stem 側のいずれも G2、G3、G4、G5、G6 で認められ、G4 では S-stem 側より A-stem 側で出現率有意に低かったが、G4 以外では有意差はなかった。

＜考察＞

本検討では骨リモデリングを G 分類と E 分類によって評価した。Gruen の zone の幅はステム長に比例しており、異なる形状のステムを比較する際に必ずしも適していない。本研究では大腿骨の同じ部位を比較するために E 分類を定義した。その結果、S-stem 側より A-stem 側で CC は近位に観察され、A-stem 側でより近位での固定・荷重伝達されていること明らかになった。A-stem 側で S-stem 側より SS の領域がより小さく、より骨温存できたと考えられる。

S-stem と A-stem は形状と表面処理が異なり、これらの影響を区別することは難しい。しかし、同一の形状を持ち、表面処理が異なるステムの骨リモデリングを比較すると、非常に類似した骨リモデリングパターンを示すことが報告されており、本研究の結果では骨リモデリングに対する表面処理の影響は比較的小さく、主に形状の違いによるものと考えられる。

A-stem 側の BMD は S-stem 側よりも L3、M3 及び M4 で有意に高かったが、BMD の解釈にはステム形状を考慮する必要がある。ステムの形状の違いによって同じ zone の ROI 面積が大きくなると、海綿骨の割合が大きくなり BMD は低くなる。E 分類 M3 の ROI 面積は S-stem 側と A-stem 側で統計学的に有意な差はなかったことから、M3 の結果は有意であると考えられる。さらに M4 では ROI 面積は A-stem 側で有意に大きく、BMD の低下が期待されるが、実際には BMD は A-stem 側で有意に高く、M4 の結果も有意であると考えられる。

内側遠位の zone（G4～G5）の皮質骨肥厚は、A-stem 側よりも S-stem 側でより有意に高い頻度で認めら、ステム遠位部での荷重伝達に起因すると考えられる。S-stem の遠位部はわずかに先端が細いが、円筒形に近い形状で長いため、骨幹部で皮質骨と容易に干渉する。一方で A-stem の遠位部は短く、より先細で、遠位での皮質骨との接触を回避でき、皮質骨肥厚が少なかったと考えられる。これらの結果は A-stem 側で適切な荷重伝達が達成されたことのひとつの証拠であると考えられる。

本研究の限界として、中期の骨リモデリングが良好な結果だったからといって、必ずしも長期

骨リモデリングの結果が良好であることを保証するわけではないことがあげられる。実際に、術後 10 年以降に患者の 3 分の 1 が後期リモデリングを示し、骨密度低下を起こすことが報告されている。しかし、この報告では術後 15 年において無症状で、臨床的には良好な成績だった。本研究の結果でもいずれのステムも良好な中期の結果を示したことから、長期においても良好な臨床成績が期待される。

＜結論＞

S-stem も A-stem も良好な中期の臨床成績及びステム固定性を示したが、A-stem は S-stem よりも近位での固定及び荷重伝達をすることが明らかになった。A-stem はより骨温存することができ、A-stem の設計概念を実現できたと考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5118　号	小谷野　岳
論文審査担当者	主　査　関矢　一郎 副　査　塙　　隆夫、立石　宇貴秀	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

高齢者の変形性股関節症の治療として人工股関節全置換術が日本国内で年間 5 万件以上行われている。人工股関節全置換術後にインプラント周囲では荷重伝達が変化するため、骨リモデリングが起こる。Anatomic stem は、大腿骨側の近位での荷重伝達を目的に設計された。本研究では両側同時人工股関節全置換術において、一方に Anatomic stem を、反対側に従来型の Straight stem を挿入し、術後の骨リモデリングを比較した。Anatomic stem では海綿骨硬化像が大腿骨のより近位に認められ、コンセプト通りの荷重伝達が実現できていることを明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

人工股関節全置換術における異なる形状のステムを用いた大腿骨リモデリングの比較はこれまで報告されているが、個体差を完全に除外できなかった。本研究では両側同時人工股関節全置換術で左右の比較を行なったため、影響を与える因子を除外でき、精度の高い比較を実行したことに先駆性・独創性がある。

２）社会的意義

Anatomic stem では骨リモデリングが大腿骨のより近位に認められ、コンセプト通りの荷重伝達が実現できていた一方で、骨折を生じた例が散見された。これは大腿骨近位部に集中して大きな力学ストレスがかかるためであることが判明し、臨床的にも有用な研究成果と言える。

３）研究方法・倫理観

レントゲン評価と骨密度測定を中心として、整形外科領域の臨床研究において、一般的な方法を用いている。本研究に関するインフォームドコンセントを全患者から取得し、倫理的にも配慮がなされている。

４）考察・今後の発展性

患者因子を極力排除した本研究で、インプラントデザインの違いにより、骨リモデリングの挙動が異なることが明らかになった。患者の大腿骨形状にあったインプラントの選択が重要であることが認識され、これは人工股関節置換術の成績向上に寄与するものである。

３．その他

プレゼンテーション及び質疑応答は満足のいくものであった。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	神田　敏博
論文審査担当者	主査　吉村　亮一 副査　植竹　宏之、田邉　稔
論　文　題　目	Favorable outcome of intraoperative radiotherapy to the primary site in patients with metastatic prostate cancer

（論文内容の要旨）

【要旨】

有転移前立腺癌、特に Stage D2（所属外リンパ節転移、骨転移、他臓器転移）前立腺癌に対する標準治療は男性ホルモン枯渇療法ないし抗がん剤投与（ドセタキセル）である。一方、こうした症例に対し、前立腺への局所治療を追加することで予後の改善並びに前立腺癌局所進行による有害事象が軽減できる可能性が示唆されている。そこで、1993 年から 2000 年まで術中開窓前立腺照射（Intraoperative radiotherapy = IORT）を受けた、有転移前立腺癌症例 48 名[IORT 群＝Stage D1（所属リンパ節転移） 16 名（D1 IORT 群）、Stage D2 32 名（D2 IORT 群）]を対象として疾患特異生存率に関する予後因子を解析した。その結果、重度の骨転移（Extent of disease = EOD4）および所属外リンパ節転移が予後不良因子であることが判明した。また、2000 年から 2005 年までに経験した局所療法非施行の stage D2 38 症例を D2 control 群とし、Stage D2 前立腺癌に対する IORT の生存期間延長効果について検討したところ、D2 IORT 群の疾患特異生存率は D2 control 群より有意に優れていた。以上より EOD3 以下で、所属外リンパ節転移のない、有転移前立腺癌に対し、IORT による局所療法が予後改善効果を示すことが示唆された。IORT による合併症は比較的軽微であった。また、IORT により前立腺癌局所進行に伴う下部尿路通過障害が軽減できる可能性が示唆された。

【背景】

欧米諸国では前立腺癌は主要な男性死因の一つで、罹患率は日本を含むアジア各国で急速に高まっている。PSA スクリーニングの導入は、前立腺癌の早期発見を可能にしたが、依然として診断時に転移を有する前立腺癌症例も多い。腎癌、卵巣癌、大腸癌などは、有転移癌であっても、腫瘍負荷軽減を目的とした局所療法による予後改善効果が報告されている。一方有転移前立腺癌においては、男性ホルモン枯渇療法ないし抗がん剤投与（ドセタキセル）が依然標準的治療であり、局所療法の意義は確立されていない。一方、最近有転移前立腺癌であっても局所療法を追加することにより予後を改善できる可能性が報告されている。例えば、骨盤リンパ節郭清術により確認された所属リンパ節転移陽性例（Stage D1）において、男性ホルモン枯渇療法単独群と比較し、局所療法併用群が生存率を改善することが示されている。また、米国 SEER database、ドイ

ツ Munich Cancer registry database を用いた報告では、selection bias などの制限があるものの、局所療法が Stage D2（骨転移、他臓器転移、所属外リンパ節転移）前立腺癌においても予後改善効果を示す可能性が示唆されている。

本研究は有転移症例、特に StageD2 前立腺癌の局所療法の意義を解明することを目的とし、1993 年から 2000 年まで、術中開窓前立腺照射（IORT）を施行された有転移前立腺癌症例群を対象として予後因子を解析するとともに、前立腺癌局所進行に伴う有害事象についても検討した。

【対象】

当院において、1993 年 2 月から 2000 年 3 月まで、術中開窓前立腺照射を施行した計 102 名（Stage A:4 名/ Stage B:12 名/ Stage C:12 名/ Stage D1:16 名/ 内臓転移を有さない Stage D2:32 名/ ホルモン不応性前立腺癌:7 名/ Stage 不明:19 名）の前立腺癌患者のうち、Stage D1 16 名を D1 IORT グループ、Stage D2 32 名を D2 IORT グループとし、計 48 名を IORT 群とした。また、2000 年 4 月から 2005 年 12 月まで局所療法非施行の stage D2 38 症例を D2 control 群とした。

【方法】

IORT 群へは、男性ホルモン枯渇療法を併用しながら、開腹骨盤リンパ節郭清術および前立腺開創照射（25-30Gy/1Fr）を施行し、術後約 1 週間目に前立腺へ外照射（30Gy/10Fr）を追加した。術後は男性ホルモン枯渇療法を長期間継続した。IORT 群の初診時の臨床データおよび治療内容をもとにして、疾患特異生存に対する予後因子解析を JMP version10 を用いて行った。また、全生存率、疾患特異的生存率、前立腺癌局所進行に伴う有害事象発生率に関して、D2 IORT 群と D2 control 群間で比較検討を行った。

【結果】

IORT 群における前立腺癌死亡率は 37.5%であり（最長経過観察期間 209 ヶ月）、13 名（27.1%）が現在も生存中である。IORT 群の 5 年/10 年全生存率は 61.0/31.7%であり、生存中央期間は 72 ヶ月であった。IORT 群の 5 年/10 年疾患特異生存率は 75.9/52.7%であり、生存中央期間は 200 ヶ月であった。疾患特異生存に対する単変量および多変量解析において EOD4（HR:7.51, P=0.012）、所属外リンパ節転移（HR:5.58,P=0.027）が有意な予後因子であった。EOD4 および所属外リンパ節転移を予後不良因子として解析したところ、予後不良因子を有さない群（Favorable group）、および有す群（Unfavorable group）の 5 年疾患特異生存率/全生存率はそれぞれ、90.6/71.6%、31.2/27.3%であり統計学的有意差を認めた（P＜0.001）。D2 IORT 群、D2 control 群間の患者背景に有意差は認められなかった。D2 IORT 群、D2 control 群の 5 年疾患特異生存率/全生存率はそれぞれ、71.0/60.4%、45.8/42.1%であった。D2 IORT 群の疾患特異的生存率は D2 control 群に比べ有意に延長していた(P=0.030)。前立腺癌局所進行に伴う有害事象に関しては、IORT 群において、計 4 人（8.3%）の患者が尿閉もしくは尿管閉塞となり、D2 control 群では 9 人（23.7%）の患者が尿閉となった。両群間で前立腺癌局所進行に伴う有害事象発生率に有意差は認めなかった（P=0.088）。放射線治療による有害事象は、Radiation Therapy Oncology

Group（RTOG）morbidity grading system において、Grade3 の消化管障害および尿路障害をそれぞれ 1 例に認めた以外はすべて Grade2 以下であった。

【考察】

本研究は、EOD を含む詳細な臨床的、病理学的データが含まれるコホートにより、有転移前立腺癌に対する IORT による局所療法の有用性を初めて報告するものである。IORT は骨転移を有する前立腺癌患者であっても、良好な局所コントロールと生存期間の延長をもたらす可能性が示された。これは、IORT により通常の放射線治療より高い生物学的等価線量（BED=102.92-130.00Gy）が得られることも一因と考えられる。D2 IORT 群の 5 年疾患特異的生存率は 71.0%で、これは D2 control 群の 45.8%に比べ有意に高かった。一方、全生存率に有意差は認めなかった（P=0.287）。ただし、治療後約 6 年目までは両群間に生存率の差が認められており、IORT 後 6 年以降に多因死した症例が多いことが原因と考えられた。

IORT 群の疾患特異生存率に関する予後因子の単変量および多変量解析において、EOD4 (HR:7.51, P=0.012)、所属外リンパ節転移（HR:5.58,P=0.027）が有意な予後因子であった。これは、転移の重症度により、転移性前立腺癌患者の局所療法後の経過が影響を受けることを示唆している。EOD 3 以下で遠隔リンパ節転移のない有転移前立腺癌患者における局所療法は生存率が改善させる可能性があると考えられる。一方、リンパ節郭清の有無は単変量解析において有意な予後因子ではないことから、局所療法時のリンパ節郭清は省略し得ると考えられる。

前立腺癌局所進行に伴う有害事象（local progression-related events=LPREs）に関しては、IORT 群において、4 人（8.3%)および、1 人（2.1%）の患者（全て T3 以下）がそれぞれ尿閉、尿管閉塞となった。また、統計学的有意差はないが、D2 IORT 群において LPREs 発生率が D2 control 群と比べて低い傾向を認めた。これまでに有転移前立腺癌の LPREs 発生率を放射線治療が低下させるとする報告はないが、IORT などの高線量の局所療法が、有転移前立腺癌の LPREs 発生率を低下させる可能性があると考えられた。特に LPREs の発生率が高いとされる T4 症例においてはその有用性が期待される。

比較的高い生物学的等価線量にも関わらず、Grade3 以上の消化器および尿路障害はそれぞれ 2.1%の患者に認めたのみであった。放射性直腸障害の発生は 70Gy 以上照射された直腸体積によるとされ、治療時、スペーサーの直腸内挿入により、直腸出血発生率が低下することが報告されている。本研究では、直腸および膀胱の被爆を最小限に留めるため、直腸内にスペーサーを挿入し照射シリンダーを尾側に傾けて術中照射を施行している。これにより、重篤な合併症発症率を低く抑えられたと考えられた。

【結論】

EOD3 以下、所属外リンパ節転移のない、有転移前立腺癌に対し、IORT による局所療法が予後改善効果を示すことが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5119　号	神田　敏博
論文審査担当者	主　査　吉村　亮一 副　査　植竹　宏之、田邉　稔	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文では、有転移前立腺癌患者を対象として前立腺局所に術中照射を行い、その治療成績および予後因子を解析した結果を報告している。

有転移前立腺癌術中照射患者の 5 年疾患特異生存率は 75.9%と高く、しかし予後不良因子として重度の骨転移（びまん性骨転移）、所属外リンパ節転移が統計学的に認められた。有遠隔転移前立腺癌患者で同じ背景を持ち、局所療法を行っていない患者群をコントロールとして比較したところ、術中照射群で疾患特異生存率が有意に優れており、さらに術中照射群の下部尿路通過障害発症患者数はコントロール群より少なかった。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

有転移癌患者の原発巣に、予後延長を目的として局所治療を行うことの有意性はあまり報告がなく、前立腺癌については最近になっていくつかの報告が認められるだけである。

申請者らは 1993 年よりすでに有転移前立腺癌患者に局所療法として大量の放射線を安全に照射する方法として術中照射を施行しており、その着眼的は先駆的であり、その治療解析結果は評価に値するものである。

２）社会的意義

前立腺癌は現在、男性の癌として罹患患者数が最も多い。PSA スクリーニングの導入により早期発見を可能にしたが、未だに診断時にすでに転移を有している患者もいる。従来では有転移前立腺癌の治療としてホルモン治療ないし抗がん剤治療が選択されるが、効果の持続や副作用の問題も指摘されている。

本研究では

1. 有転移前立腺癌の局所治療が予後延長に有効である。
2. 局所治療は尿路症状や直腸症状の出現も軽減する。

ことが示されており、社会的に重要な意義を示すものである。さらに本研究の結果は、本研究で施行した術中照射に留まらず、他の局所治療方法の有効性を示唆するものでもあり、極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本臨床研究の施行においては、泌尿器科学の知識のみだけではなく、放射線治療科学および腫瘍科学を理解し、安全性と倫理性を考慮して望んだと考えられる。また、本研究における限界も理解しており、申請者が広い視野をもって研究を進めてきたと判断される。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究結果より有転移前立腺癌患者の他因死の問題、局所療法の際のリンパ節郭清省略の可能性について考察しており、このことは現在放射線治療として可能となったIMRTや定位照射の技術を用いることで開窓することなく非侵襲的に局所照射を行うことの重要性を示唆しており、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特記すべきことなし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	池田　大輔
論文審査担当者	主査　東田　修二 副査　田中　雄二郎、伏見　清秀
論　文　題　目	Study on Evaluation of Alanine Aminotransferase(ALT) as Surrogate Marker in Hepatitis Virus Test

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

1999 年 10 月に日本赤十字社（Japanese Red Cross Society）が導入したウイルス核酸増幅検査（nucleic acid amplification test；NAT）が、2014 年 8 月より全輸血製剤（Transfusion formulation）に対して行われることになった。この結果をもとに HBsAg、HBcAb、HBsAb、HCVAb、HIVAb の各種免疫学的スクリーニング（Immunological screenings）の精度についての評価、また従来通り ALT 検査（alanine aminotransferase test）の意義についても再評価をおこなった。

その結果、HBsAg、HBcAb、HBsAb、HCVAb、HIVAb の各種免疫学的スクリーニングによる感染症検出能力（Infectious disease detection capability）が高いこと、その一方で ALT 検査による感染症スクリーニング（Infectious disease screening）の意義が極めて低いことが示された。

また、ALT 値上昇については NAT や免疫学的スクリーニングの結果よりも γGTP と BMI（body mass index）に比較的強い相関関係がみられており、感染症よりも飲酒や肥満などの生活習慣が関与している可能性が高いことが今回の分析で判明した。

＜はじめに＞

本格的な少子高齢化社会の到来により、血液製剤の献血による供給が少なくなると見込まれている。この状況では安全性の向上を図りながら提供いただいた貴重な献血血液（Donated blood）をできる限り有効に活用する必要がある。その対策のひとつとして 2014 年 8 月より血液製剤ごとに NAT が行われることになった。NAT の結果をもとに HBsAg、HBcAb、HBsAb、HCVAb、HIVAb の各種免疫学的スクリーニングの精度についての評価、また従来通り ALT 検査の意義についても再評価をおこなった。

＜目的＞

本研究は、献血血液について HBsAg、HBcAb、HBsAb、HCVAb、HIVAb の各種免疫学的スクリーニングについて、および ALT の基準設定の合理性ならびに有効性について、個別 NAT

（Individual Donor Nucleic Acid Amplification Test）の結果をもとに分析したものである。

個別 NAT の導入により、献血血液およびそれから製造される血液製剤の安全性は飛躍的に向上したと考えられることから、NAT を基準とした基礎的データを収集し、血液製剤の安全基準（Safety criteria）見直しに寄与することを目的として研究を実施した。

＜方法＞

2014 年 8 月から 9 月の 2 ヶ月間における日本全国の献血データ 839、376 件について、肝炎ウィルス抗体価や ALT 値、その他の生化学検査の結果を日本赤十字社の献血者データ統一システムのデータから抽出した。HBV・HCV・HIV の各種免疫学的検査および ALT が感染症スクリーニング surrogate marker として適しているかどうかについて、ALT 値上昇に影響する因子について、NAT の結果を基準として統計的手法により評価した。これらの分析には IBM SPSS Statistics 22 を用いた。

＜結果＞

各指標の cut off 値については日本赤十字社の現行基準に従った。

１.各指標の感度（sensitivity）・特異度（specificity）の評価

HBsAg、HBcAb、HBsAb それぞれ 1.0mIU/mL 以上を陽性として NAT を基準に有効性を検証したところ、感度はそれぞれ 0.8384、0.9091、0.3990、特異度はそれぞれ 0.9998、0.9712、0.8984、陽性反応的中度（Positive Predictive Value）はそれぞれ 0.4573、0.007403、0.0009256、陰性反応的中度（Negative Predictive Value）はそれぞれ 0.99996、0.99998、0.99984 となった。

「HBsAg1.0mIU/mL 以上」もしくは「HBcAb 1.0mIU/mL 以上かつ HBsAb 200mIU/mL 未満」いずれかを満たす場合を HBV 陽性として、HBsAg、HBcAb、HBsAb の３種の組み合わせでの検査の有効性について検証したところ、感度は 0.9293、特異度は 0.9957、陽性反応的中度は 0.05063、陰性反応的中度は 0.9998 となり、感度、特異度、陰性反応的中度は HBsAg 単独での免疫学的検査結果よりも優れているという結果となった。

HCVAb 1.0mIU/mL 以上を陽性として NAT を基準に有効性を検証したところ、感度は 1.000、特異度は 0.9998、陽性反応的中度は 0.320513、陰性反応的中率は 1.000 となった。HCVAb 値は HCV 感染の取りこぼしのない極めて有効なスクリーニングだという結果となった。

HIVAb 1.0mIU/mL 以上を陽性として NAT を基準に有効性を検証したところ、感度は 1.000、特異度は 0.9999、陽性反応的中度は 0.01861、陰性反応的中率は 1.000 となった。感度、特異度ともに極めて高い数値となり、HIVAb 値は HIV 感染の取りこぼしのない極めて有効なスクリーニングだという結果となった。

ALT については、日本赤十字社の独自基準 ALT61IU/L 以上を陽性として HBV-NAT、HCV-NAT を基準に有効性を検証したところ、HBV-NAT に対して感度は 0.02052、特異度は 0.977962、陽性反応的中度は 0.032667、陰性反応的中率は 0.964948 となり、HCV-NAT に対して感度は 0.095368、特異度は 0.978031、陽性反応的中度は 0.001821、陰性反応的中率は 0.999597 となった。感度や陽性的中率が非常に低い結果となり、感染者を見逃す（偽陰性、False-negative）確率が高くなるという問題が示された。

ＲＯＣ曲線（ROC curve）による評価

今回の分析では、 HBV-NAT に対する HBsAg と HBcAb の AUC(Area under the curve)はそれぞれ 0.927、0.972 で高精度の検査、HBsAb は 0.677 で低精度の検査という結果になった。HCV に対する HCVAb の AUC は 1.000、HIV に対する HIVAb の AUC は 1.000 という結果が出ており、ともに非常に高い精度の検査という結果となった

一方、HBV-NAT、HCV-NAT に対する ALT の AUC はそれぞれ 0.539、0.584 となり、ともに低い精度の検査という結果となった。

重回帰分析による評価

HBV、HCV、HIV の NAT の結果を従属変数（dependent variables）（NAT 陽性を 1、NAT 陰性を 0）とした強制投入法（forced entry method）による重回帰分析を行い、各免疫学的指標や ALT の NAT に対する相関関係を分析した。

HBsAb、 HCVAb、 HIVAb の数値の上昇は各ウィルスの NAT 陽性と相関が認められた一方、ALT の数値の上昇はどのウィルスの NAT 陽性との相関がほぼ認められなかった。

ALT 値上昇の要因についての重回帰分析

献血データより得られた 17 の因子について、ALT 値との相関関係を調査した。ステップワイズ法による重回帰分析で共線性の高い 12 の独立変数を除外し、残る 5 因子の相関関係を調査したところ、γGTP、BMI、HCVAb、HBsAg、HBcAb の標準化係数はそれぞれ 0.350、0.225、0.018、0.018、0.008、-0.006 となった。この結果より今回用いた 17 の因子の中で、γGTP と BMI が ALT 上昇との相関が比較的強いと推測される結果となった。

＜考察＞

過去の諸外国の文献においても HBV、HCV 感染が認められていながらも ALT 上昇がみられなかった報告が上がっており、今回の調査結果もそうした先行の報告を裏付ける形となった。今回の調査でも、ALT 値はウィルス感染の指標よりも γGTP や BMI との相関がより強く出ており、諸外国の過去の調査においても同様の結果が出ている。加えて、ALT 高値によって製剤化できなかったことによる経済的損失が 30 億円規模（2012 年）となっていることが当教室での 2013 年の調査で判明している。以上の調査結果により、ALT を献血におけるスクリーニング指標より除外することが望ましいという結論に至った。

今後は、現在行っている免疫学的検査を基礎的なスクリーニングとして継続して用いるのとともに、より精度の高い検査方法の導入・病原体不活化技術による安全性の確保・無過失補償制度による受益者の保護を行っていくことが主な対策として挙げられる。

＜結論＞

今回の研究では、HBsAg、HBcAb、HBsAb、HCVAb、HIVAb の各種免疫学的スクリーニングによる感染症検出能力が高いこと、その一方で ALT 検査による感染症スクリーニングの意義が極めて薄いことが示された。

また、ALT 値上昇について、免疫学的検査よりも γGTP と BMI に比較的強い相関関係がみられており、感染症よりも肥満や飲酒などの生活習慣に基づく代謝異常が関与している可能性が高いことが今回の分析で判明した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5120　号	池田 大輔
論文審査担当者	主　査　　東田　修二 副　査　　田中　雄二郎、伏見　清秀	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、輸血製剤に対して日本赤十字社が行なったB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、HIVに対するウイルス核酸増幅検査（NAT）、これらの免疫学的スクリーニング検査、ALTなどの生化学検査の結果を総括して、ALT値はウイルス感染のスクリーニングとしての意義が極めて低いことを示した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

輸血製剤に起因するウイルス感染は医療において重大な問題である。日本赤十字社は 2014 年から全輸血製剤に対する個別の NAT 検査を導入し、製剤中のウイルスを高感度に検出できるようになった。しかし、NATの結果と、免疫学的スクリーニング検査やALTなどの生化学検査の結果との関連や意義を評価した研究はなかった。申請者は赤十字社から入手した 84 万件のデータを統計学的に解析して、これらの検査の感度や特異度、意義を初めて明らかにした点で評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. HBsAg、HBcAb、HCVAb、HIVAbの免疫学的スクリーニング検査はウイルスの検出能力が極めて高い。
2. ALT検査の結果は感染スクリーニングの意義は極めて低く、飲酒や肥満などの生活習慣が関与している可能性が高い。

以上のように申請者は、 ALT検査のウイルス感染スクリーニングの意義は極めて低く、ALT高値のために廃棄されている輸血製剤の経済的損失が多額になっていることより、ALT値を除外するなどの安全基準の見直しを提唱しており、医療経済学的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には日本赤十字社による膨大な献血データが使用され、申請者により詳細な統計学的解析が行なわれた。献血データの使用については、本学医学部倫理審査委員会と日本赤十字社の倫理委員会の承認を得ている。本検査は十分な学術的根拠のもとに遂行されており、申請者の研究方

法に対する知識が十分に高いと同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

本研究は、集めた献血データの統計学的解析にとどまらず、献血における医療経済上の問題点や、外国での献血の安全管理の現状、無過失補償制度の課題、製剤中の病原体の不活性化技術にも言及している。今後、本研究の成果が、日本における献血の新たな安全基準の見直しに用いられる可能性がある。

３．その他

なし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	萬野　智子
論文審査担当者	主査　古川　哲史 副査　木村　彰方、吉田　雅幸
論　文　題　目	Factors Suggestive of Cardiac Complications in Takotsubo Cardiomyopathy :Multicenter Study

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

たこつぼ心筋症は急性心筋梗塞様の胸痛を伴い、心尖部の一過性の壁運動異常を来す疾患である。一般的には予後両行な疾患と考えられているが、心不全や致死的不整脈などの重篤な心合併症や死亡に至る症例もある。多施設において、たこつぼ心筋症と診断された 83 症例を後ろ向きに調査を行い、重症心合併症の予測因子に関して検討を行った。重症心合併症の有無により、患者を二群に分類した上で患者背景、初発症状、発症契機や各種検査所見について比較検討した。結果として、呼吸困難での発症が重症心合併症の予測因子であった。また、重症心合併症群では、より広範な左室壁運動異常を来し、炎症反応、心筋逸脱酵素も高値であった。以上より、心筋障害範囲の広いたこつぼ心筋症では重症心合併症を来す可能性を考慮し、慎重な管理が必要と考えられる。

＜緒言＞

たこつぼ心筋症は、1990 年にの佐藤らによって最初に報告がなされた、急性心筋梗塞に類似する胸痛や心電図変化とともに、心尖部を中止とする広範囲な左心室の収縮低下とそれを代償する心基部の過収縮により特徴的な左室壁運動異常を呈する疾患である。この壁運動異常は一つの冠動脈支配領域に一致せず、冠動脈造影では有意な病変は認めない。多くの症例では、左室の壁運動異常は数週間から 1 ヶ月以内にほぼ完全に正常化し、一般的には予後良好とされている。発症原因ついて、当初は多枝冠攣縮による気絶心筋が原因と考えられたが、心筋気絶や攣縮による心筋微小循環障害は、慢性期での冠攣縮が約 1/3 例しか誘発されないことや、心筋の組織診にて心筋気絶では見られないこと、心筋障害・壊死像が見られることより否定的と考えられている。その他に、限局性の心筋炎、心臓交感神経の過剰反応（障害と亢進）、神経液性因子の関与、心膜心筋炎に起因する冠攣縮と心筋脂肪酸代謝障害などが想定されているが、未だ特定されていない。予後良好とされているが、心不全、不整脈、心破裂等の重症心合併症を有する場合もある。このように様々な病態を起こし得る疾患であるため、たこつぼ心筋症の定義も統一されたものはなく、論文間でまちまちであったが、最近は Mayo Clinic criteria が最も汎用されており、それに従って診断されたたこつぼ型心筋症の患者背景や経過、増悪因子などの報告が多く見られる。我が国

では 2004 年に厚生労働省難治性疾患特発性調査研究班で提案された診断手引きがあり、Mayo Clinic criteria とは壁運動異常の部位の定義や、脳血管疾患を除外しているところが異なっており、より典型的な症例をたこつぼ型心筋症と診断することができる。我が国の診断手引きにより診断されたたこつぼ心筋症を母集団として解析を行った報告は今のところ少ない。そこで今回たこつぼ心筋症患者の背景、心電図変化より、重症心合併症の予測因子にて検討した。

＜方法＞

東京医科歯科大学医学部附属病院を中心として、関連 7 施設において、2001 年から 2010 年 11 月までにたこつぼ心筋症と診断された症例を対象に、患者背景と重症心合併症を発症する関連性を後ろ向きに調べた。たこつぼ心筋症の診断は、厚生労働省難治性疾患特発性調査研究班による『たこつぼ心筋症　診断の手引き』に基づいて行い、原則冠動脈造影検査を施行し、虚血性心疾患の関与を否定的できた症例のみとした。診断の手引きによると、たこつぼ心筋症とは、急性発症の原因不明の左室心尖部バルーン状拡張を呈する症例を指すとされている。本症では左室はあたかも「たこつぼ」様の形態をとり、心尖部の無収縮は数週から 1 か月以内に、大多数の症例はほぼ正常化する。心室収縮異常は主に左室に生じるが、右心室にも認められる場合があり、心室流出路機能性狭窄(圧格差、血流速度亢進、心雑音)も観察される。除外項目としては、冠動脈の器質的有意狭窄または攣縮、脳血管障害、褐色細胞腫、ウイルス性もしくは特発性心筋炎を有する症例が挙げられる。また、診断を行う際に参考所見として、症状、発症契機、年齢、性別、心電図、採血検査、心臓核医学検査などを用いることとされている。診断指針に基づき、たこつぼ心筋症と診断された症例の患者背景、初発症状、心電図、他の検査結果などを調べ、重症心合併症や死亡との関連性について分析を行った。尚、左室造影検査における壁運動の評価は、右斜位での観察で左室を#1:前壁基部、#2:前側壁、#3:心尖部、#4:横隔膜、#5:後壁基部のセグメント毎に分け、normal、mild hypokinesis、moderate hypokinesis、severe hypokinesis、akinesis、dyskinesis の 6 段階で壁運動評価を行った。

＜結果＞

期間中 83 例が対象となった。全体の転帰としては、79 例が軽快であり、死亡は 4 例であった。患者を入院期間中に重症心合併症発症あるいは死亡した群（cardiac complication group=CC group)29 例と、非心臓合併症群（no-cardiac compilcation group=NC group)54 例に分類した。

CC group の内訳は、心原性ショックを含む心不全が 22 例、心停止が 2 例、心室性不整脈が 4 例、心破裂が 1 例であった。また、CC group のうち、機械的補助を必要とした症例は、PCPS が 1 例、IABP が 5 例、電気的除細動が 1 例であった。対象患者全体の平均年齢は 71.9±11.0 歳であり、女性が多かった。

初発症状としては、胸痛、呼吸困難、意識障害、その他の症状に分けられ、胸痛での発症が最も多かった。発症契機は大きくは身体的ストレス、精神的ストレス、不明の 3 つに分類でき、頻度としては、精神的ストレスと身体的ストレスは同程度であった。

グループ別の患者背景を見ると、平均年齢は両群間では有意差は認めなかった。性別に関しても、全体の傾向と同様に女性が多く、両群間では差は認めなかった。冠動脈危険因子(高血圧、高

脂血症、糖尿病、喫煙)に関しても、両群間に有意差は認めなかった。

初発症状は、胸痛での発症例は NC group に多く(p=0.01)、呼吸困難での発症例は CC group に有意に多かった(p＜0.001)。

発症契機に関しては、NC group で精神的ストレスを発症契機とする例が有意に多かった(p=0.04)。単変量解析で有意差を認めた項目について多変量解析を行ったところ、呼吸困難での発症が独立した心合併症予測因子であった(p=0.002)。

次に、各種検査所見についても二群間で比較を行った。血液検査では、WBC、CRP、CK が CC group で有意に高値であった。

左室造影は全症例中、66 症例(CC group:23、NC group:43)で施行されており左室駆出率(EF)の平均値は CC group で有意に低値であった(p=0.002)。左室造影上、2 つ以上のセグメントで severe hypokinesis、akinesis あるいは dyskinesis の壁運動異常を来していた症例は CC group で有意に多かった(p=0.02)。

心電図に関しては、発症から 1 週間の心電図を継時的に記録された 49 症例(CC group:18、NC group:31)において、経過中で最も深い陰性 T 波の波高値及び最大 QTc 時間を比較した。陰性 T 波に関しては、両群間で明らかな差は認められず、QTc 時間に関しても、CC group の方が延長している傾向はあるものの、有意差は認めなかった。

＜考察＞

最近のたこつぼ心筋症に関する報告の多くで使用されている診断基準である Mayo Clinic criteria では、(1)冠動脈支配に一致しない、一過性に左室中部の壁運動異常異常を来している症例で、心尖部の壁運動異常は問わない。また、ストレスを発症契機としている場合があること。(2)冠動脈にプラーク破綻を認めない。(3)新規の心電図異常(ST 上昇や T 波の陰転化)あるいはトロポニンの上昇を認める。 (4)褐色細胞腫、心筋炎は除外する、の 4 点を満たすものをたこつぼ心筋症と診断している。本研究で診断基準として用いた、厚生労働省難治性疾患特発性心筋症調査研究班による診断指針は、心尖部のバルーン状拡張を来しているこのみを条件としている点と、脳血管障害を除外していることが Mayo Clinic criteria と異なっている。多様な壁運動異常を来し得ると報告されている脳血管疾患を除外し、典型例である心尖部型のみを対象とすることにより、純粋なたこつぼ心筋症の病態の究明につながると考えた。尚、厚生労働省の指針では冠攣縮性の関与に関しても除外すべきとされているが、薬物による誘発試験は必須とはされておらず、今回でも誘発試験を施行されている症例は 7 例と少なく、いずれも陰性であった。微小血管の攣縮の評価は困難であり、必ずしも冠攣縮の関与は除外できないと考えられる。

男性患者は心合併症の独立した予測因子であるとの報告があるが、本研究では性別に関しては有意差は認めなかった。また、胸痛を初発症状とする例が多い点は従来の報告と同様であったが、呼吸困難で発症した例は重症心合併症が有意に多かった。また、発症契機に関しては、身体的ストレス、精神的ストレスともに 30-40%程度とする報告が多く、今回も同様の結果であった。また、今回新たに、精神的ストレスを発症とする症例では心合併症が少ないことが明らかとなった。

たこつぼ型心筋症の血液検査結果に関する報告は少ないが、本研究では、重症心合併症群で、WBC、CRP、CK がより高値となっていたことから、心筋障害範囲の広さを反映していると考え

られた。また、低心機能の症例では心合併症のリスクが高いとの報告があるが、本研究の左室造影の結果より、より広範に壁運動異常を来してることも、重症心合併症のリスクであることが明らかとなった。心電図に関しては、QTc 延長を来した場合に死亡率が高いとの報告があるが、本研究では有意差は認めないものの、重症心合併症群でより QTc が延長している傾向は認めた。

＜結語＞

厚生労働省難治性疾患特発性調査研究班の診断の手引きに基づいたたこつぼ型心筋症において、重症心合併症の予測因子に関して調査を行った。呼吸困難を初発症状とし、広範な壁運動低下や炎症反応、心筋逸脱酵素の上昇など、心筋障害を反映する値の上昇を伴った症例では、重症心合併症を来す可能性を考慮し、慎重に管理を行う必要がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5121　号	萬野　智子

論文審査担当者	主　査　古川　哲史 副　査　木村　彰方、吉田　雅幸

【論文審査の要旨】

1. 論文内容

タコツボ心筋症患者で入院中に心破裂、心不全、心室性不整脈などの合併症をていした群とそうでなかった群で比較して、合併症群で呼吸困難を初発症状とすることが有意に多く、心機能が有意に低下し、血液生化学検査で白血球数、CRP、CK が有意に高かった。

2. 論文審査

1) 研究目的の先駆性・独創性

タコツボ心筋症は、従来臨床予後が良好とされており、その転帰に関する研究がほとんど行われていない。2001 年～2010 年に本学関連病院に入院した 83 例のタコツボ心筋症患者の転帰を調べ、その情報を提供する点が独創的である。

2) 社会的意義

タコツボ心筋症は、従来臨床予後が良好とされ、入院後は積極的治療は行わず経過観察に終始することも稀ではないが、その中でも重篤な心合併症を呈するケースが一定の割合で含まれることを明らかにし、タコツボ心筋症患者の管理における重要な示唆を与えた点で、社会的に意義がある研究と考えられる。

3) 研究方法・倫理観

2001 年～2010 年に本学関連病院に入院した 83 例のタコツボ心筋症患者のカルテから後ろ向きに様々なデータを集めた。患者を、入院中に心破裂、心不全、心室性不整脈などの合併症を呈した群(29 例)と呈さなかった群(54 例)に分け、両者で様々な因子を比較した。研究計画は東京医科歯科大学の倫理審査委員会の承認を得ている。

4) 考察・今後の発展性

結果自体は、もともと心機能が悪く心不全傾向のあった患者で合併症が多いという、当たり前の結果であるが、タコツボ心筋症患者で重症臨床症状を呈するケースが一定の割合あることを明確にした点で評価される。今後は、入院中の転帰だけでなく長期的な生命予後との関連についても検討を行うことが望まれる。

3. その他

特になし。

4. 審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	池田　崇
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　下門　顕太郎、緒方　泰子
論　文　題　目	Effects and feasibility of exercise therapy combined with branched-chain amino acid supplementation on muscle strengthening in frail and pre-frail elderly people requiring long-term care: a crossover trial

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

分枝鎖アミノ酸（BCAA）は、運動前に摂取することによりタンパク質同化に影響するが、週 2 回程度の頻度でも有用かは不明であったため、効果と実現可能性を検討した。クロスオーバー比較試験を用いて、6g の BCAA もしくはマルトデキストリン（MD）を各 3 か月間摂取した上で、最大筋力の 30%負荷での筋力練習を中心とした運動療法を行った。結果、BCAA 群の下肢粗大筋力、バランス能力は約 10%高い改善率を示した。また、BCAA の投与順序による比較でも、BCAA 摂取と運動療法の相乗効果を認めた。この点から BCAA と運動療法との併用による筋力増強効果の再現性が認められた。BCAA 摂取を併用し、30%負荷での筋力練習を中心とした運動療法を週 2 回程度の頻度で実施することにより、虚弱高齢者であっても、効率的に下肢筋力とバランス能力を改善することが示唆された。

＜緒言＞

BCAA に関する研究は、近年、生理学的な側面から研究が進められ多くの知見が明らかとなった。BCAA は、運動前に摂取することにより筋内の乳酸蓄積や筋損傷を予防し、タンパク質同化作用に影響する事が報告されている。さらに近年、高齢者は筋代謝に若年者より多くの BCAA を要し、アミノ酸摂取に対する筋タンパク合成反応も減弱し 、遅延することも報告され、高齢者のサルコペニア予防に BCAA の摂取が有効であることが明らかとなった。こうした先行研究から、Kim らはサルコペニアを有する虚弱高齢者に対して、週 2 回 1 時間の運動教室と週 7 日間との BCAA 6g の摂取の併用を 3 か月継続して実施し、運動教室のみや BCAA のみの高齢者と比較して、有意に筋力と筋量が増加したと報告している。BCAA 摂取および運動療法を単独で実施するよりも、BCAA と運動療法との併用が筋力増強を目指していく上で有用であることが示された。

一方、筋力増強を目指すにあたって、高齢であっても最大筋力の 50-80%の強度でのトレーニング実施が効果的であることのコンセンサスはすでに得られているが、虚弱高齢者は体力レベルの点で 50%負荷の運動強度を適応することが困難なことが多い。30%負荷程度の低強度の運動であっても遠心性収縮を強調した運動方法や、筋疲労が生じるまで実施することで筋力増強が得ら

れることが報告されている。これらの研究は、低負荷の運動であっても、BCAA と運動療法の併用により効率的に筋力増強を得られることを示唆しているものの、併用による効果を得るためにBCAA を毎日摂取する必要があるかどうかは不明である。そこで本研究は外来リハにおいて、週2 回の BCAA を併用した運動療法の実施が身体機能改善に及ぼす効果について検討することを目的とする。

＜方法＞

研究デザインはクロスオーバー比較試験とした。研究期間は、コース A（3 か月）、ウォッシュアウト期間（1 か月）、コース B（3 か月）とした。外来リハビリテーションにいて筋力トレーニングマシンを用いて運動介入の実施が可能な虚弱高齢者を対象とした。

対象者 55 名を無作為に、コース A で BCAA を摂取し、コース B で MD を摂取する前投与群29 名とコース A で MD を摂取し、コース B で BCAA を摂取する後投与群 26 名との 2 群に分類した。コース A 終了までに参加辞退をし、介入開始後の評価が困難であった 3 名を除く、前投与群 27 名、後投与群 25 名を解析対象とした。患者の内訳は平均年齢 79.4±8.3 歳、男性 33 名、女性 19 名であった。

・評価項目

介入開始の 1 週間前と介入開始 3 か月後に評価を実施した。対象者背景（年齢、性別、BMI、Co-morbidity Index、基礎疾患分類、外来リハビリテーションの実施期間）を診療録より調査した。

四肢粗大筋力の測定は筋力トレーニングマシンを用いて等尺性の最大筋力を測定し、体重比筋力を算出した。測定項目は①レッグプレス(LP)、②ヒップアブダクション(HA)、③ニーエクステンション(KE)、④ローイング(RO)を実施した。握力は、スメドレー式握力計を用いて測定した。

バランス機能評価は、動的バランスとして Timed up and go test（TUG）と Functional reach distance test（FR）を実施した。身体活動は、過去 3 か月間の平均的な日常生活における活動を Frenchay Activities Index（FAI）を用いて評価した。

外来リハビリテーションの回数と運動と栄養介入のコンプライアンス率は、コース A、 ウォッシュアウト期間、コース B の外来リハビリテーションの回数を記録するとともに、介入時の BCAA および MD の摂取率、運動の実施率を評価した。

・栄養介入および運動介入

1) アミノ酸サプリメントの投与

コース A および B において、週 2 回を目標に栄養介入を 3 か月間継続して実施した。栄養介入は、運動開始 10 分前に BCAA 群は 6g のタブレット型 BCAA サプリメントを摂取し、コントロール群は同量の MD を摂取した。ウォッシュアウト期間は、コース A 終了後に 1 か月間の期間を設け、栄養介入を実施せず、運動時にノンカロリーの飲料 200ml の摂取のみを行った。

2) 運動介入

運動介入はコース A、ウォッシュアウト期間、コース B の 7 か月間連続して監視下で実施した。筋力トレーニング 3 セット、有酸素運動 1 セット、バランス運動 1 セット、合計 3 種目 5 セットとクールダウン体操を 10 分間に設定し、各種目のセット間を 15 分に設定したインターバル制で行った。

筋力トレーニングマシンを用いて 1 セット 20 回、3 セットの筋力増強練習を実施した。運動種目は LP、HA、KE、RO の 4 種目とし、運動負荷は低負荷の 30% 負荷に設定した。運動様式は低速度での運動と筋収縮を用い、筋力トレーニングマシンに着座し、求心性収縮 3 秒間、等尺性収縮 1 秒間および遠心性収縮 3 秒間に設定し、反復運動の間に休憩はとらずに実施した。各セッションの運動反復回数は 20 回に設定した。

有酸素運動をエルゴメーターもしくはリカンベントクロストレーナーを用いて、自覚的運動強度 Borg scale 12 点に相当する負荷量で 1 セット 10 分間を実施した。バランス運動はバランスパッドを用いて 1 セット 15 分間を平行棒内での応用歩行練習と組み合わせて実施した。

＜結果＞

各時期の外来リハビリテーション実施回数は、コース A(前投与群: 18.8±5.6 回, 後投与群: 16.1±7.7 回)およびコース B(前投与群: 17.1±5.2 回, 後投与群: 16.2±5.9 回)で両群間に差を認めなかった。運動介入及び栄養介入のコンプライアンスはコース A および B において両群ともに 95%以上と高値で差を認めなかった。

BCAA 群と control 群との比較では、四肢粗大筋力の内、LP(BCAA:113.9±36%, control:102.7±12.5%)および KE(BCAA:109.5±26.3%, control:99.2±18.2%)の改善率が BCAA 群で有意に高値であった。また、バランス機能の評価では、FRT (BCAA:111.0±22.0%, control:101.0±17.0%)の改善率が BCAA 群で有意に高値であった。一方、四肢粗大筋力の内、HA、RO、握力および TUG は両群間で差を認めなかった。

BCAA の投与順序による群の比較では FRT がコース A において前投与群が有意に高値であった。投与順序による各群の交互作用(相乗効果)は、LP と FRT において、両群ともに BCAA 投与時(前投与群: コース A, 後投与群: コース B)にのみ有意な相乗効果を認め、HA は、後投与群がコース B において有意な相乗効果を認めた。他の項目は有意な交互作用を認めなかった。

考察

運動耐容能の低い障害を有する高齢者に運動療法を行う場合、筋疲労や筋痛が生じない範囲の低負荷の運動強度で、筋力増強を目指していくという矛盾した課題を突き付けられることが多い。運動が筋に及ぼす negative な要素を予防した上で、より効果的に筋力増強を行っていくことは虚弱高齢者の介護予防を進めていく上でも重要な要素である。BCAA と運動療法の併用の効果を得るためには毎日摂取が必要か否か、実際の臨床場面で摂取可能な分量か否か、が挙げられる。特に外来リハにおいて、週 1 回ないし 2 回の BCAA と運動療法との併用が、運動療法単独と比較して十分に効果を期待できるか否かが問題となる。

BCAA 群と control 群との比較では、BCAA 群の下肢粗大筋力(LP, HA)と FRT は有意に高い

改善率を認め、それぞれ約 10%高い改善率を示した。また、BCAA の投与順序による群の比較では、LP は両群ともに BCAA 投与時にのみ有意な効果を認め、この点から BCAA と 30%負荷での運動介入との併用による筋力増強効果の再現性が認められた。3 か月間の実施期間における BCAA と運動療法を併用しての介入回数は平均 17.5±5.8 回、1 週間あたり 1.5 回であった。

この結果は、一般的な外来リハの頻度に相当する介入回数であっても、BCAA 摂取と運動療法とを併用することで、下肢粗大筋力とバランス能力をより効率的に改善し得ることを示唆していると考える。低負荷の筋力トレーニングで効果を得るためには、高負荷と比較して多くの反復回数もしくは低速度で行う必要があるが、本研究では監視下で栄養と運動の介入を行うことで、BCAA 摂取を確認した上で、筋力トレーニングの反復回数も含めた運動内容の遵守率を高めることができた。この点も 1 週間に 1-2 回程度の介入回数であっても BCAA 群は有意に高い改善率を得られたことに寄与していると考える。

一方で、control 群は BCAA 群と同様に運動内容の遵守率は 95%と高い水準にあったものの、四肢粗大筋力のベースラインからの改善率は低く、ほぼ横ばいであった。要因としては、第 1 に対象者は 1 年半程度の外来リハの実施歴があること、第 2 に運動負荷設定が 30%MVC と低負荷であることが挙げられる。継続期間から運動療法単独では機能改善が得られにくかったのではないかと思われる。

＜結論＞

週 2 回程度の頻度で BCAA 摂取と運動療法とを併用することで、虚弱高齢者であっても、効率的に下肢筋力と動的バランス能力を改善することが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5122　号	池田　崇
論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　下門　顕太郎、緒方　泰子	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

分枝鎖アミノ酸（BCAA）訓練前に内服し、30%負荷での筋力練習を中心とした運動療法を週1、2 回実施することにより、虚弱高齢者であっても、効率的に 10%程度の下肢筋力とバランス能力が改善することが示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

高齢者の健康寿命を長く維持することの社会的意義はますます高まっている。過去の BCAA 併用筋力強化訓練の研究成果を応用し、虚弱高齢者を対象として実現可能な負荷と運動頻度で筋力を増すことを目的に行った本研究は独創的であり、高齢者健康増進を実現する先駆的試みである。

２）社会的意義

高齢者の健康増進は超高齢化社会における我が国で大きな課題である。本研究成果を地域社会で実現することにより高齢者の健康維持が期待でき、福祉向上や高齢者の社会保障費の削減に役立つことが期待される。

３）研究方法・倫理観

本研究は学位申請者が属した病院の倫理審査をもとに無作為前向き、クロスオーバー試験を用いて行われた。クロスオーバー試験形式を用いることにより症例数が少なくても危険率 5%で80%の検出力を獲得した。これまで毎日摂取での筋力向上の結果は得られていたが、本研究では運動負荷、運動頻度共に虚弱高齢者でも十分継続可能な運動メニューを用いて実現できた。

４）考察・今後の発展性

本研究結果は一般的な外来リハの頻度に相当する介入回数であっても、BCAA 摂取と運動療法とを併用することで、下肢粗大筋力とバランス能力をより効率的に改善し得ることを示唆している。本研究成果を地域社会で実施することにより、福祉向上や高齢者の社会保障費の削減を実現することが期待される。

３．その他

学位審査において学位申請者の虚弱高齢者のリハビリにおける豊富な経験を裏付けとして、研究実現能力と科学的な思考能力の高いことが示された。

４．審査結果

以上をふまえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するために十分な価値があると認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	相澤　宏樹
論文審査担当者	主査　磯部　光章 副査　藤原　武男、河原　和夫
論　文　題　目	Factors associated with 30-day readmission of patients with heart failure from a Japanese administrative database

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

多くの国々において心不全患者の再入院関連因子を検討する研究が行われているが、今まで日本での大規模な管理データベースを用いたこのような研究はなされていない。そこで、本研究の目的は、Diagnosis Procedure Combination（DPC）データを用いて日本における心不全患者の30日以内の再入院関連因子を明らかにすることである。2012年4月から2013年3月までのDPCデータから 68,257 名の患者を抽出（複数回再入院のあった患者においては再入院までの期間が最短だった場合以外を除外し、開胸あるいは開心術、計画的な再入院、院内死亡の症例も除外）し、30 日以内の再入院の有無で群分けを行った。独立変数は年齢、性別、NYHA 重症度分類、併存症（Charlson comorbidity index＜CCI＞）、入院日数（LOS）、体格指数（BMI）、入院施設における心不全入院患者数及び退院時処方（アンジオテンシン変換酵素阻害薬＜ACEs＞あるいはアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬＜ARBs＞、β遮断薬、カルシウム拮抗薬、ジギタリス、ループ利尿薬、サイアザイド、スピロノラクトン、硝酸薬）とした。30 日以内の再入院群は 4,479 名、30 日以内の再入院なし群は 63,778 名であり、多重ロジスティック回帰分析を用い 30 日以内の再入院関連因子の解析を行ったところ、増加させる因子は高齢（65 歳未満；reference、65～74 歳；オッズ比 1.267、75 歳以上；オッズ比 1.330）、NYHA 高値（Ⅰ；reference、Ⅱ；オッズ比 1.354、Ⅲ；オッズ比 1.548、Ⅳ；オッズ比 1.627）、CCI 高値（オッズ比 1.087）、β遮断薬（オッズ比 1.225）、ループ利尿薬（オッズ比 1.286）、サイアザイド（オッズ比 1.280）、硝酸薬（オッズ比 1.405）の使用で、30 日以内の再入院を減らす因子は、長い LOS（オッズ比 0.997）、BMI 高値（オッズ比 0.972）、ACEs あるいは ARBs（オッズ比 0.749）、カルシウム拮抗薬（オッズ比 0.834）、スピロノラクトン（オッズ比 0.795）の使用であった。これらの結果から、特に退院後数週間において、高齢者、重症度の高い者、併存症の多い者、β遮断薬、ループ利尿薬、サイアザイド、硝酸薬の服用者に対し注意深い診察を行うことで、再入院を減らすことができる可能性が示された。

＜緒言＞

心不全は入院治療を必要とする主要な病態の一つである。我が国において、少ない疫学研究で

はあるが、心不全の有病率は約 1～2%で近年急速に増加しているとの報告がある。米国では、心不全患者の増加は再入院の患者を増やし、その結果として医療費の増加につながっているとみられており、再入院を減らすことが医療資源利用を抑えることにつながるとの考えのもと、再入院しやすい患者像を把握することを目的に数多くの研究が行われている。一方、我が国での心不全に関する大規模な登録研究としては、the Acute Decompensated Heart Failure Syndromes (ATTEND) registry、the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD)、the Chronic Heart Failure Analysis and Registry in the Tohoku District 2 (CHART-2) study があるものの、大規模な管理データベースを用いた研究はなされていない。そこで我々は、DPC データを用いて日本における心不全患者の 30 日以内の再入院関連因子について研究を行った。

＜方法＞

DPC データ調査研究班の参加施設 1,057 病院（日本の急性期病棟の約 48%）において、2012 年 4 月から 2013 年 3 月までに収集された DPC データを用いた。15 歳以上の症例で、「主傷病名」、「入院契機傷病名」、「医療資源を最も投入した傷病名」のいずれかに心不全 ICD-10 コード（I50.0、I50.1、I50.9、I09.9、I11.0、E05.9）が含まれる症例を抽出し、その中から複数回再入院のあった患者においては再入院までの期間が最短だった場合以外を除外し、開胸あるいは開心術、計画的な再入院、院内死亡の症例も除外し、68,257 名を抽出した。得られた症例を 30 日以内の再入院の有無で群分けし、独立変数として年齢、性別、NYHA 重症度分類、CCI、LOS、BMI、入院施設における心不全入院患者数及び退院時処方（ACEs あるいは ARBs、β遮断薬、カルシウム拮抗薬、ジギタリス、ループ利尿薬、サイアザイド、スピロノラクトン、硝酸薬）を検討した。統計解析は単変量解析については χ^2 検定あるいは Wilcoxon rank-sum 検定を用い、30 日以内の再入院に関連する因子の解析については多重ロジスティック回帰分析を行い、オッズ比を算出した。

＜結果＞

30 日以内の再入院群は 4,479 名、30 日以内の再入院なし群は 63,778 名であった。30 日以内の再入院を増加させる因子は高齢（65 歳未満；reference、65～74 歳；オッズ比 1.267、95%信頼区間 1.127-1.425、75 歳以上；オッズ比 1.330、95%信頼区間 1.199-1.475）、NYHA 高値（Ⅰ；reference、Ⅱ；オッズ比 1.354、95%信頼区間 1.179-1.556、Ⅲ；オッズ比 1.548、95%信頼区間 1.351-1.774、Ⅳ；オッズ比 1.627、95%信頼区間 1.416-1.869）、CCI 高値（オッズ比 1.087、95%信頼区間 1.065-1.108）、β遮断薬（オッズ比 1.225、95%信頼区間 1.149-1.306）、ループ利尿薬（オッズ比 1.286、95%信頼区間 1.187-1.349）、サイアザイド（オッズ比 1.280、95%信頼区間 1.145-1.431）、硝酸薬（オッズ比 1.405、95%信頼区間 1.302-1.516）の使用で、30 日以内の再入院を減らす因子は、長い LOS（オッズ比 0.997、95%信頼区間 0.995-0.998）、BMI 高値（オッズ比 0.972、95%信頼区間 0.964-0.979）、ACEs あるいは ARBs（オッズ比 0.749、95%信頼区間 0.703-0.798）、カルシウム拮抗薬（オッズ比 0.834、95%信頼区間 0.776-0.896）、スピロノラクトン（オッズ比 0.795、95%信頼区間 0.743-0.851）の使用であった。

＜考察＞

高齢、NYHA 高値、CCI 高値が再入院しやすい因子であるという結果は、他国の既存の報告と同様であった。また、β遮断薬の服用は再入院しやすい因子であった。β遮断薬の投与が心不全の長期予後改善に有効であるのは明らかであり、再入院の抑制に貢献すると考えていたが、今回の研究では逆の結果となった。その一因としては、本研究が退院後 30 日以内といった早期の再入院を検討した為、β遮断薬の陰性変力・変時作用が影響し、心不全の悪化をきたしたと推測した。更に、ループ利尿薬、サイアザイド、硝酸薬の服用も再入院しやすい因子であったが、これらの薬の服用が必要な症例は、退院時の心不全の状態が不安定であったことを反映している可能性がある。一方、長い LOS、BMI 高値は再入院しにくい因子であった。LOS に関しては、米国の報告では我々の結果と反対に長い LOS は再入院しやすい因子であるとのことだが、我が国の LOS は欧米より 2～3 倍長く、欧米に比べ入院時教育等により心不全が安定してから退院する患者が多いことがこの違いの一因と推測された。BMI に関しては、以前から報告されている「obesity paradox」と同様な結果であった。更に、ACEs あるいは ARBs、カルシウム拮抗薬、スピロノラクトンの服用も再入院しにくい因子であったが、これらも他国の既存の研究と同様の結果であった。最後に、研究の限界点としては、1）他の病院に再入院した症例は再入院群に含まれない、2）血圧値、心機能、血液生化学データなどが含まれておらず、登録研究に劣る、3）外来通院時のデータが追跡できず、外来での死亡患者は再入院なし群に含まれてしまう、等があげられた。

＜結論＞

本研究では、日本の大規模な管理データベース（DPC データ）を用いて心不全患者の 30 日以内の再入院関連因子を明らかにした。30 日以内の再入院を増加させる因子は高齢、NYHA 高値、CCI 高値、β遮断薬、ループ利尿薬、サイアザイド、硝酸薬の使用で、30 日以内の再入院を減らす因子は、長い LOS、BMI 高値、ACEs あるいは ARBs、カルシウム拮抗薬、スピロノラクトンの使用であった。これらの結果から、特に退院後数週間において、高齢者、重症度の高い者、併存症の多い者、β 遮断薬、ループ利尿薬、サイアザイド、硝酸薬の服用者に対し注意深い診察を行うことで、再入院を減らすことができる可能性が示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5123　号	相澤　宏樹

論文審査担当者	主　査　磯部　光章 副　査　藤原　武男、河原　和夫

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文はわが国の DPC データを用いて、心不全患者における 30 日以内の再入院の要因を解析した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

近年わが国において心不全は増加の一途であり、かつ再入院を繰り返すことが臨床上の問題点として上げられている。その要因を解析するために本研究では DPC というビッグデータを利用して検討を行ったものである。かつて無い規模で、詳細な検討を行った点で評価に値するものである。

２）社会的意義

心不全の再入院は、医学的な問題であるばかりで無く、社会的にも患者自身の負担、家族の負担、地域社会の負担、医療経済面での負担と、非常な大きな問題となっており、その要因を解明することで、再入院の減少を図る対策を立てるための資料となれば社会的にも極めて意義深いところがある。検討の結果高齢、NYHA 高値、CCI 高値など既存の報告に一致する報告に加えて、β 遮断薬使用、利尿薬や硝酸薬の使用などが再入院をきたしやすい要因として抽出された。逆に BMI 高値が再入院しにくい因子として抽出された。

３）研究方法・倫理観

保険診療上導入されている DPC のデータを用いた研究である。ICD10 コードから心不全症例 68，257 人を抽出して 30 日以内の再入院の有無で分類し、その差を解析したものである。

４）考察・今後の発展性

目的、方法論とも重要かつ適切である。ただ、年齢や重症度を層別化するなどのより詳細な検討によりさらに臨床的に意義のある結果が得られるものと考えられた。また解析に用いたデータが限られており、他のデータについての検討を併せて行うことが求められた。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大滝　陽一
論文審査担当者	主査　東田 修二 副査　古川 哲史、小山 高敏
論　文　題　目	Dielectric permittivity change detects the process of blood coagulation: Comparative study of dielectric coagulometry with rotational thromboelastometry

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

誘電コアグロメータ（DBCM）は血液の誘電率の変化を経時的に計測し血液凝固状態を評価する新規の検査法である．本研究では東京医科歯科大学附属病院循環器内科外来を受診した患者128人におけるDBCMおよびトロンボエラストメトリ（ROTEM）による血液凝固時間を測定し，抗血小板剤および抗凝固薬の内服内容に基づき比較した．その結果，DBCMとROTEMの凝固時間に有意な相関関係を認め($R = 0.707$, $p < 0.001$)，抗凝固薬内服群において対照群と比較し凝固時間に有意な延長を認めた(抗凝固薬内服群　43.8 ± 11.9 min　対　対照群 29.4 ± 8.3 min, $p<0.001$)．これよりDBCMが抗凝固療法の状態を評価できるものと示唆された．

＜諸言＞

血管内における血栓形成は脳梗塞，冠動脈疾患，静脈血栓塞栓症，心房細動，人工心臓弁など様々な心血管疾患に関与している．血液凝固状態の観測は生来の凝固機能のスクリーニングや，出血性・塞栓性合併症の予防並びに抗凝固療法を治療域に管理することにおいて重要である．プロトロンビン時間（PT）や活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）は凝固状態の評価指標として従来から広く利用され，また標準的な方法と認識されてきた．しかしながら，PTの測定においてトロンボプラスチンが血液凝固促進に用られるため，検査データは製造ロットや製造会社に依存することから，標準化されたより正確な評価方法が求められている．トロンボエラストメトリ（ROTEM）は血液凝固の進行に伴い経時的に変化する回転運動に対する弾性抵抗の変化を計測する検査法であり，一方，誘電コアグロメータ（DBCM）は血液凝固の進行に伴い経時的に変化する誘電率の変化を計測する新規の検査法で，これらの検査法は血液凝固を測定するものの異なる物理学的現象を観測する技術に基づいている．Hayashiらは，DBCMが全血の血液凝固の進行過程で変化する誘電率を測定することによりその変化率のピークが血液凝固時間に相当し，また，誘電率の変化は交流周波数10MHzにおいて血球の形態および分布の不均一性に対し感度が高く，全血の誘電率が血栓形成に伴い徐々に変化し，凝血塊に集合する細胞の変化を反映することを報告した．さらに，これまでの研究ではDBCMの凝固時間はレオロジー法での凝固時間と良好な相関を示したことが報告されている．本研究の目的はDBCMの実臨床での有用性

の評価のため，既存の検査系である PT，aPTT および ROTEM に対する相関と抗凝固療法のモニタリングに対する有用性を検討することである．

＜方法＞

本研究は 2012 年に東京医科歯科大学倫理委員会において承認された．

東京医科歯科大学附属病院の外来患者 128 症例で未分画ヘパリンおよび低分子ヘパリンの投与を受けていない空腹時全血を DBCM および ROTEM を用いて血液凝固時間を計測し，抗血小板剤および抗凝固薬の内服内容に基づいた患者群間[対照群（26 例），抗血小板療法群（44 例），抗凝固療法群（52 例）、抗血小板療法抗凝固療法併用群（6 例）]において比較検討した．また脳梗塞，心筋梗塞，静脈血栓塞栓症，頭蓋内出血および消化管出血で定義した一次エンドポイントの発生を計測後 6 か月に渡り追跡評価した．

静脈から採取した血液は抗凝固剤として 3.13%クエン酸ナトリウム　0.2ml を含有する採血管に収集され，採血から 5 時間以内に摂氏 37 度で 10 分加温した後，撹拌し DBCM で測定した．DBCM の測定は自動的であり，血液サンプル 180μl が 12μ l の塩化カルシウム（200mM）を含むカートリッジに混和され摂氏 37 度で交流周波数 100Hz から 40MHz までの誘電率を 1 分間隔で 60 分間計測される．これまでの報告から 10MH z における誘電率の変化率のピークがレオロジー法での凝固時間と一致しており，これを凝固時間と定義した．

ROTEM による計測は NaTEM assay，Ex-TEM assay，In-TEM assay および Fib-TEM assay を用い標準的な方法で計測した．

＜結果＞

DBCM における血液凝固時間と NaTEM assay および Ex-TEM assay で計測した ROTEM の血液凝固時間に有意な正の相関を認めた(NaTEM assay: $R = 0.707$, $p < 0.001$, Ex-TEM assay: $R = 0.409$, $p < 0.004$)．しかし，In-TEM assay および Fib-TEM assay では相関を認めなかった．また，DBCM における血液凝固時間において，抗凝固薬内服群[新規抗凝固薬（NOAC）含む]と非抗凝固薬内服群との間に有意差を認めた(43.8 ± 11.9 min vs. 29.4 ± 8.3 min, $p<0.001$)．血液検査後の観察期間は中央値で 182 日（四分位範囲: 140-249 日）で，3 例の出血性イベントを認めたがいずれも ISTH 分類の定義を満たすイベントではなかった．DBCM と ROTEM は血液凝固の評価は同等であった．

＜考察＞

本研究では，DBCM の凝固時間と ROTEM の NaTEM assay における凝固時間，PT-INR および aPTT に正の相関を認めた．また，DBCM の凝固時間は対照群と比較しワルファリンおよび新規経口抗凝固薬を含む抗凝固療法群において有意に延長していた．

DBCM と ROTEM を比較すると，DBCM の凝固時間はより ROTEM の CT（Clotting Time），CFT（Clot Formation Time）および MCF（Maximum Clot Firmness）に相関しており，DBCM の凝固時間は血栓形成も反映していると考えられた．また，DBCM はカルシウムを添加した後に進行する血液凝固に伴い上昇する誘電率を測定するが，これはフィブリン重合体の架橋結合と赤

血球および白血球との集合体を主に反映していると考えられた．DBCM の検査特性の評価のため，抗凝固薬を内服しているものを真陽性、抗凝固薬を内服していないものを真陰性として ROC 曲線による解析を施行したところ，AUC は DBCM で高値を示し，また DBCM において感度が高く，ROTEM において特異度が高い傾向が示された(DBCM AUC 0.838, 95%CI: 0.768-0.908; $p < 0.001$ vs. ROTEM AUC 0.779, 95%CI: 0.699-0.859; $p < 0.001$).

DBCM と ROTEM の抗凝固薬に対する評価を行うため，ワルファリン内服群と新規経口抗凝固薬（Dabigatran および Rivaroxaban）内服群において平均凝固時間を測定した．その結果，対照群とワルファリン内服群，新規経口抗凝固薬群間においても同様に有意差を認めた．Dabigatran を内服する患者では aPTT が延長し，Rivaroxaban を内服する患者において PT が延長したことから，これらの新しい方法は総合的な凝固状態をより正確に評価することができ，DBCM は包括的な血液凝固に対する標準化した評価系を提示する可能性があると考えられた．

本研究には以下の限界がある．サンプルサイズが小さく，患者の選択において施設バイアスの影響が除外できない．さらなる DBCM の評価を行うためにはより大規模なコホート研究が必要であると考えられる．また，血液サンプルはすべて東京医科歯科大学附属病院で空腹時および内服後二時間以内に採取されたものであるが，それ以外の検体採取の標準化は本研究が観察研究であるため施行できなかった．

＜結論＞

本研究において，血液凝固の新規の評価方法である DBCM は，抗凝固療法に対する詳細な評価を提供できることを示した．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5124　号	大滝　陽一

論文審査担当者	主　査　東田 修二 副　査　古川 哲史、小山 高敏

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、新たな血液凝固能の検査法である誘電コアグロメーター（DBCM）による凝固時間の臨床的な有用性を検討した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

血液凝固能の評価には、現在、血漿検体を用いた PT と APTT が用いられている。最近、全血の凝固過程における誘電率の変化を経時的に計測することで、血液凝固状態を評価する新規の検査法 DBCM が開発されたが、新たな検査法であるため、臨床上の有用性を評価した研究はない。申請者は抗凝固療法などが行われている外来患者の血液検体を用いて、現行の検査法、および、トロンボエラストメトリー（ROTEM）という別の新規の検査法の結果と、DBCM の結果を比較することで、DBCM の臨床上の意義を初めて示した点で評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. DBCM による凝固時間は、ROTEM による凝固時間や PT-INR および APTT と正の相関を認めた。

2.DBCMの凝固時間は、対照群と比較し、抗凝固療法群において有意に延長していた。

以上のように申請者は、 DBCMによる凝固時間と、現行のPTやAPTTとの間に相関性があることを明らかにしている。これはDBCMが抗凝固療法による血液凝固のコントロールの評価を提供できることを示し、臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には本学医学部附属病院の外来患者の血液検体が用いられ、DBCMによる凝固時間とROTEMによる凝固時間の計測が行なわれた。患者検体の使用については、医学部倫理審査委員会の承認を得ている。本検査は十分な学術的根拠のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示される。

４）考察・今後の発展性

本研究は、論文でも考察されているように、検体数が十分に多いとは言えず、かつ、抗凝固療法を行なっている患者としてワルファリンの内服患者が大半を占め、現在増加している新規経口抗凝固薬の内服患者が少ないという制限がある。今後、多数の新規経口抗凝固薬内服患者での DBCM 法による凝固時間の検討が進み、薬の有効域の決定に有用な検査法であることが実証されれば、現行の検査法に変わる、新たな血液凝固検査法として臨床で用いられる可能性がある。

３．その他

なし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	髙﨑　千尋
論文審査担当者	主査　清水　重臣 副査　稲瀬　直彦、石川　俊平
論　文　題　目	Expression of hypoxia-inducible factor-1α affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer

（論文内容の要旨）

【緒言】

酸素は，好気生物にとってエネルギー産生に欠かせない重要な物質である。組織の酸素欠乏は生体の危機に直結するため、細胞には低酸素環境に対応するためのさまざまな機構が備わっている。細胞の低酸素応答のなかで、主要な役割を果たす遺伝子として、低酸素誘導因子（hypoxia-inducible factor: HIF）-1 が広く知られている。HIF-1 タンパクは、α と β のヘテロ 2 量体として存在し、核内に移行して DNA に結合することで転写因子として機能する。HIF-1β タンパクは酸素分圧に関係なく恒常的に存在するが、HIF-1α タンパクは、酸素分圧依存的に分解調節される。通常酸素下において、HIF-1α は速やかに細胞質で pVHL と結合し、ユビキチン - プロテアソーム系にて分解される。しかし低酸素下では、HIF-1α は pVHL と結合することができず、核内に移行して HIF-1β と 2 量体を形成し、標的遺伝子の転写を促進する。HIF-1 が転写調節する遺伝子群は血管新生、細胞増殖、糖代謝亢進などに関わり、細胞の低酸素環境下での生存を有利にする。

固形癌は、正常組織と比較して無秩序に増大するため、癌細胞は極度の低酸素環境にさらされる。そのため癌細胞においても、しばしば HIF-1α の発現が認められる。複数の癌腫において、腫瘍細胞内における HIF-1α 発現と、腫瘍増殖能、アポトーシス抵抗性、血管新生亢進、解糖系亢進、患者予後との間に相関があると報告される。

しなしながら、原発性肺癌の切除検体での HIF-1α タンパク発現を調べた報告は少ない。今回、我々は肺癌の臨床検体を用いて HIF-1α の免疫染色による腫瘍内発現を調べ、その標的遺伝子となる cMyc、Survivin 及び腫瘍増殖指標となる Ki67 の腫瘍内発現との関連について、臨床病理学的所見を含めて包括的に検討した。

【対象】

2013 年 4 月から 2015 年 1 月までに、東京医科歯科大学附属病院呼吸器外科において肺切除手術を施行された原発性肺癌 216 症例を対象とした。

【方法】

216 例の切除標本における腫瘍部分パラフィンブロックから、4μm 厚の薄切標本を作製し、免疫染色で HIF-1α（抗体：H1 alpha 67, Novus Biologicals）発現率を評価した。腫瘍増殖能、アポトーシス抵抗性の指標として、cMyc（抗体：9E10, Santa Cruz Biotechnology, Inc）、Survivin（抗体：D-8, Santa Cruz Biotechnology, Inc）の腫瘍内発現率についてもそれぞれ測定した。また、Ki67（抗体：MIB-1, Dako Denmark A/S）免疫染色で、腫瘍増殖指標となる Ki67 指数（Ki67 発現率）を評価した。上記結果を，臨床病理学的所見を含めて解析した。

臨床病理学的所見としては、年齢、性別、喫煙指数、GGO 率、PET での腫瘍 SUVmax 値、腫瘍径、病理病期、組織型、分化度、ly 因子、v 因子を評価項目とした。

腫瘍部分における HIF-1α の染色率を％で評価し、症例を cut off 値 40％として HIF-1α 高発現群と HIF-1α 低発現群の 2 群に分けた。高発現群と低発現群で、cMyc、Survivin の免疫染色での発現率、Ki67 指数、臨床病理学的因子に有意差を認めるか、t 検定、χ 二乗検定を用いて検討した。

【結果】

腫瘍細胞における HIF-1α 発現は、cMyc 発現率、Survivin 発現率、Ki67 指数と有意に相関していた。単変量解析では、GGO 率の低い腫瘍、PET で SUVmax 値の高い腫瘍、扁平上皮癌、ly(+)、v(+)の腫瘍で有意に HIF-1α 発現率が高かった。多変量解析では、組織型（扁平上皮癌）、ly(+)、高 SUVmax 値の 3 つが、HIF-1α 高発現と相関する因子であった。

【考察】

HIF-1α タンパクは、細胞が低酸素環境に置かれたときに発現し、転写因子として働いて血管新生、解糖系亢進、細胞増殖などに関連する遺伝子を活性化させる。複数の癌腫において、HIF-1α が高発現することは、腫瘍増殖、浸潤を促進する方向に働き、癌細胞での HIF-1α 発現が、腫瘍の悪性度や予後と関連しているとの報告がある。

Survivin と cMyc は、いくつかの癌腫で高発現していることが知られる遺伝子である。Survivin は、アポトーシス阻害分子（inhibitor of apoptosis: IAP）ファミリーに属するタンパクで、アポトーシス経路の途中にあるカスパーゼ活性を阻害することで、細胞のアポトーシスを抑制する働きをする。また cMyc は転写因子として働き、細胞周期を調節する各種タンパク発現を調節することで細胞周期を進行させる。各種癌細胞において cMyc の過剰発現が報告されており、腫瘍の悪性度や増殖能と関連していることが示されている。HIF-1α と Survivin、cMyc の関連については未だ明らかになっていない部分も多いが、HIF-1α が、Survivin と cMyc の上流で転写因子として働き、両者の発現を促進すると考えられている。

本研究において、肺癌臨床検体の免疫染色で、HIF-1α 発現は Survivin、cMyc の発現率と相関を示し、肺癌における HIF-1α 発現が、腫瘍の増殖能、アポトーシス抵抗性の指標となりうることが示唆された。

また本研究において、HIF-1α 高発現群には扁平上皮癌、低 GGO 率の腫瘍、PET で高 SUVmax 値の腫瘍が多いことを明らかにした。充実部分の多い腫瘍ほど、血流が不足して低酸素になり易

く、HIF-1α の発現率が高くなると考えられる。HIF-1α 発現と臨床病理学所見においては、ly 陽性、低分化度及び高 Ki67 指数が HIF-1α 発現と相関しており、HIF-1α 発現と腫瘍の悪性度との関連を示す所見と考えた。

【結語】

原発性肺癌における HIF-1α 発現は、腫瘍増殖能、アポトーシス抵抗性の指標となる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5125　号	髙﨑　千尋

論文審査担当者	主　査　清水　重臣 副　査　稲瀬　直彦、石川　俊平

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、肺がん手術検体を対象に、低酸素誘導因子(HIF)-1α の発現を解析し、その発現が腫瘍増殖関連分子 c-myc やアポトーシス関連分子 survivin の発現と正の相関が見られることを見出したものである。また、HIF-1α 高発現群には低分化・高悪性度の腫瘍、扁平上皮癌が多いことも合わせて見出している。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

HIF-1αは低酸素応答性に種々の蛋白質の転写を促進し、細胞を低酸素環境から保護しようとする分子であり、低酸素環境下におかれているがん細胞の生存、増殖などに深く関わっている。しかしながら、肺がんの手術検体において、HIF-1αの発現と臨床データや病理組織像とを比較した報告はない。申請者は、HIF-1αの重要性に着眼し、実際の肺がん臨床症例を用いてその解析を行なった。本研究は、肺がんにおけるHIF-1αの重要性を知る上で必要な研究であり評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

1. 原発性肺がん216症例に関して、HIF-1αをはじめ種々の分子の免疫染色を行い、臨床データや病理組織像と比較した。
2. HIF-1αの発現と腫瘍増殖関連分子c-mycやアポトーシス関連分子survivinの発現には、一定の正の相関が認められた。
3. HIF-1α高発現群には低分化・高悪性度の腫瘍、扁平上皮癌が多かった。

以上のように申請者は、肺がんにおけるHIF-1α発現の重要性を見出しており、充分に評価できる研究成果である。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、病理学、生理学などの知識が必要であり、申請者の臨床研究に対する知識と技術力は充分である。

４）考察・今後の発展性

肺がん症例におけるHIF-1α発現を定量することの重要性、ひいてはHIF-1αを治療標的とした抗がん剤の開発に繋がることが期待できる。

３．その他　なし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	金子　俊
論文審査担当者	主査　仁科　博史 副査　田邉　稔、　田賀 哲也
論　文　題　目	Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

B 型肝炎ウイルス（HBV）は現存の治療薬では宿主細胞に HBV covalently closed circular DNA(cccDNA)が長期残存してしまうために根治ができない。従って、宿主細胞から cccDNA を排除しうる治療薬の開発が望まれているが、*in vitro* 感染培養系において HBV の完全な life cycle を再現しつつ、汎用性のある宿主細胞がなく、創薬研究の妨げになっていた。そこで我々は、ヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)から誘導した肝細胞系譜細胞を用い、新たな HBV 感染培養系を構築する事を目的に本研究を行った。

iPS 細胞から誘導・純化して培養した肝幹/前駆様細胞株(iPS-HPCs)とより成熟化した肝細胞様細胞(iPS-Heps)を宿主細胞として使用した。これら iPS-HPCs と iPS-Heps で受容体の発現解析や HBV 感染実験を行ったところ、iPS-Heps の方が HBV 侵入受容体である NTCP の発現が高く、HBV 感染性が有意に上昇した。一方で、iPS-Heps では成熟化の進行と増殖の停止に伴い、長期維持培養が困難であり、感染後長期間のウイルス動態を観察する事はできなかった。そこで、感染性は比較的低いが長期培養も可能である iPS-HPCs において、Tetracyclin (Tet)誘導性に NTCP を強制発現できる iPS-HPC-NTCP 株を樹立した。iPS-HPC-NTCP では doxycycline (Dox)依存的に NTCP の発現が増加し、感染性の有意な増加を認めた。これらヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞では Interferon (IFN)誘導性自然免疫応答が肝癌細胞株と比較して、有意に高く維持されており、既存の様々な機序の抗ウイルス薬に対する反応性が確認された。さらに iPS-HPC-NTCP を用いた検討では、IFN signal 抑制下に約 2 か月間 cccDNA の残存がみられ、cccDNA 維持には IFN 関連自然免疫応答の抑制が関与する事が示唆された。iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞は自然免疫応答を維持し、かつ分化段階の調節と遺伝子改変が可能であり、HBV life cycle の再現および創薬研究に有用な宿主細胞である事が示された。

＜諸言＞

HBV は世界的に蔓延する感染症であり、現在も 2 億 4 千万人が持続感染しており、肝硬変や肝癌の原因となっている。核酸アナログ治療によりウイルス複製抑制が可能にはなったが、現存の治療では完全なウイルス排除が極めて困難である。依然として難治性の疾患であり、完全なウ

イルス排除を可能とする創薬研究の進展が期待されている。*In vitro* での HBV 感染培養系として、これまで HBV に感染できる宿主細胞が少なく、主に初代培養ヒト肝細胞、及び近年同定された HBV 侵入受容体 NTCP を強制発現した肝癌細胞株（HepG2-NTCP）などが用いられてきた。しかし、初代培養ヒト肝細胞は、樹立にドナー肝組織が必要なため汎用化が難しく、しかも培養による急速な機能低下があり、長期培養は不可能であった。一方、肝癌細胞株では自然免疫や代謝機能が正常な肝細胞とは著しく異なるという問題があった。HBV を完全排除するためには、細胞内に長期間残存する cccDNA の排除が必要であるが、上記の如く HBV の life cycle を再現し、かつ長期間の安定培養が可能な感染培養系はなく、病態解析・創薬研究の進展に妨げとなっている。これらの背景の元に、我々は、ヒト iPS 細胞から誘導した肝細胞系譜細胞を用いて、新たな HBV 感染培養系を構築し、細胞分化度、免疫応答の観点から、既存の感染培養系と比較して有用性について検証した。

＜方法＞

肝細胞系譜への誘導が効率的に可能である事が報告されている RIKEN-2F（臍帯由来線維芽細胞由来）ヒト iPS 細胞株を用いて以下の研究を行った。このヒト iPS 細胞株を用いて、既報(Yangida et al, PLoS ONE 2013)と同様の手法を用いて、肝細胞系譜へと誘導した後に CD13/CD133 陽性画分を FACS により純化した iPS 由来肝幹/前駆様細胞(iPS-HPCs)を株化して培養した。さらに hOSM 添加後も培養継続し成熟分化させた iPS 由来肝細胞様細胞（iPS-Heps）を誘導し、これらを宿主細胞として使用した。Luciferase 発現型組み換え HBV(HBV/NL)、HBV 恒常発現株 HepG2.2.15.7 細胞由来培養上清、および 1.2 倍長 HBV 発現 plasmid を用いて、宿主細胞における HBV の感染性とウイルス粒子産生能を検討した。さらに PiggyBac Transposon system を用いて Tet 誘導性 NTCP 強制発現 iPS-HPCs (iPS-HPC-NTCP)株を樹立し、同様に宿主細胞として使用し比較検討した。

＜結果＞

iPS-HPCs では hepatoblast に発現する AFP、HNF4α、CK7、ALB の発現がみられ、Feeder 細胞（MEF）上で、3 か月間以上の長期間、安定した培養が可能であった。本細胞では、肝癌細胞株に比べ有意に高い NTCP の発現を認めた。HBV/NL、HepG2.2.15.7 由来 HBV の感染を検討すると、感染性が示された。さらに IFNα の添加時の IFN-stimulated genes 発現誘導能は肝癌細胞株に比べて有意に高く、その主要な経路である JAK-STAT pathway の活性化も確認された。また、HBV DNA genome 発現 plasmid を transfection して、ウイルス複製能を検討したところ、細胞内の HBV DNA の発現・HBV 関連抗原の上清への産生がみられ、これが HBV 複製阻害薬で阻害される事が示され、さらに培養上清に放出されるウイルスが感染性を有する事が確認された。

次に、成熟分化させた iPS-Heps と iPS-HPCs との比較検討では肝細胞成熟化マーカー、NTCP 発現および HBV 感染性は iPS-Heps で有意に高く、成熟化誘導によって感染性が亢進する事が示された。また、既存の抗 HBV 薬である IFNα、核酸アナログ、PreS1 Peptide (entry inhibitor) の抗ウイルス効果が確認しえた。これらの結果を踏まえて樹立した iPS-HPC-NTCP では Dox 容

量依存的に NTCP の発現増加がみられ、感染実験では親株より有意に HBV 感染性が亢進していた。さらに前記の種々の機序の抗 HBV 薬効果も確認された。

iPS-HPC-NTCP は自然免疫応答の維持された長期培養可能な HBV 感染性細胞であり、HBV 感染後に長期継代培養を 2 か月間行った。通常の細胞では、細胞内の cccDNA は継代培養後に減衰していく事が知られているが、iPS-HPC-NTCP を用いて JAK inhibitor によって IFN response pathway を抑制した群では cccDNA の発現が有意に高く維持された。これらの結果より、cccDNA の長期維持には自然免疫応用の制御が関与している事が示唆された。

＜考察＞

本研究により iPS-HPCs の HBV 感染の感染培養系における有用性が初めて示された。iPS 細胞からの誘導としては 4-step protocol (Si-Tayeb et al, Hepatology 2010)が報告されているが、本手法は誘導に数週間が必要で、さらに誘導過程で不規則に間葉系細胞へ分化した細胞が混入してしまう不安定さがみられた。しかし、本研究では CD13 及び CD133 で純化し、継代培養した iPS-HPCs を用いる事で安定した表現系を確保し、そして検出感度が高い HBV/NL も用いる事で、初めて hepatoblast stage も含めた肝細胞分化と HBV 感染性の関係、複製過程の詳細な解析が可能になった。iPS 由来肝細胞系譜細胞では自然免疫応答反応が肝癌細胞株より有意に保持されている事も示され、既存の様々な機序の抗ウイルス薬反応を確認する事ができた。

長期間細胞内に残存する HBV cccDNA の動態を検討する上では iPS-HPCs は iPS-Heps に比べ感染性が低い、一方 iPS-Heps は長期間培養が困難であるという点を克服する必要があった。そこで NTCP の発現に注目し、NTCP を強制発現した iPS-HPC-NTCP を樹立したところ、NTCP の発現依存的に顕著な感染性の増加がみられ、NTCP の HBV 感染における重要性が再確認された。この自然免疫応答が維持された長期培養可能な iPS-HPC-NTCP を用いた応用として、感染後に長期培養を行うと cccDNA の維持された潜伏感染の培養系での再現ができ、cccDNA の維持には自然免疫応答の制御が重要である知見が得られた。

iPS 由来細胞にはヒト肝組織を必要としないという大きな利点がある。これを用いた今後の研究の進展として、自然免疫応答の維持された宿主細胞としてのドラッグスクリーニング・HBV を完全に排除する創薬研究、既存の細胞では困難であった異なる genetic background に合わせた精緻な検討や遺伝子導入における解析、細胞分化の視点からみた HBV 持続感染に関与する因子に関する検討、宿主-ウイルス間相互作用の解析などの研究への新展開が期待される。

＜結論＞

ヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞を用いた新たな HBV 感染培養系を構築した。これらの細胞では肝癌細胞株に比べ自然免疫応答が保たれるのに加え、分化度の制御や遺伝子導入も可能な汎用性の高い創薬開発モデルとなりうる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5126　号	金子　俊
論文審査担当者	主　査　仁科　博史 副　査　田邉　稔、　田賀 哲也	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文はヒト人工多能性幹（iPS）細胞を用いたＢ型肝炎ウイルス（HBV）感染培養系の開発についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

２億を超える人々がＢ型感染ウイルス（HBV）に持続感染しており、肝硬変や肝がんのリスクにさらされている。核酸アナログ治療によりウイルス複製抑制が可能にはなったが、現存の治療では完全なウイルス排除は困難である。創薬研究の妨げになっている理由の一つは、HBV の完全な生活環を再現する汎用性のある HBV 感染培養系が無いことが挙げられる。このような背景の下、申請者は、HBV の生活環を再現し、自然免疫応答を維持し、長期の安定培養も可能な細胞として、ヒト iPS 細胞の利用を考えた。申請者はウイルス学および再生医学の技術を駆使して、これまでには無かった有効な HBV 感染培養系の開発に成功した。その着眼点には先駆性と独創性があり、研究成果は有用であると評価される。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１）ヒト iPS 細胞から誘導した肝幹/前駆様細胞株(iPS-HPCs)と、成熟化した肝細胞様細胞(iPS-Heps)、さらに HBV 侵入受容体である NTCP を Tetracyclin (Tet)で誘導可能にした iPS-HPC-NTCP 株をそれぞれ宿主細胞として樹立し、新規の HBV 感染培養系を開発した。

２）上記を用いて HBV の複製や自然免疫応答を評価した。

以上のように申請者は、医学・生物学の研究に多くのメリットのあるヒト人工多能性幹（iPS）細胞を用いた新規 HBV 感染培養系の開発に成功した。医学において極めて有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

研究には、ヒト iPS 細胞から肝細胞への細胞分化誘導技術、HBV 感染技術、組換え DNA 技術に加えて、抗体や RNAi を用いた組織学的および分子生物学的解析が適切に行われた。これら手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と倫

理観が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究成果から、HBV covalently closed circular DNA(cccDNA) の長期維持には自然免疫応答の制御が重要であると考察している。今後の研究の進展として、本 HBV 感染培養系を用いた HBV 持続感染に関与する因子の探索や、HBV を完全に排除するドラッグのスクリーニングが期待される。

３．その他

特になし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	伊藤　美帆
論文審査担当者	主査　吉田　雅幸 副査　藤原　武男、平井　伸英
論　文　題　目	Presentation of Coping Strategies Associated with Physical and Mental Health during Health Check-ups

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

健康診断では、受診者が結果をどのように受け止め、いかに適切な対処行動をとるかが重要である。本研究では、健診受診者のコーピングに着目し、精神的・身体的健康状態と関与しているかどうか明らかにすることを目的とした。本研究は横断研究デザインであり、小金原健診クリニックで健康診断を受診した201名を対象に実施された。評価項目は、身体的健康、健康的健康、コーピング(Brief COPE)である。結果から、いくつかのコーピングと精神的・身体的健康との間には関連がみられ、コーピングに基づいた認知行動的な保健指導は、精神的・身体的健康の増進に寄与することが示唆された。

＜緒言＞

健康診断の目的は、生活習慣を改善して疾病の発生を予防する一次予防と、発生した疾患を早期発見して早期治療につなげ、身体・費用・時間などの負担を減らす二次予防である。また、健康診断後に実施される保健指導では、受診者が、自身の生活習慣における問題点に気付き、生活習慣を改善するための健康的な行動変容の方向性を自ら導き出せるように支援している。健康診断の目的をより効果的に達成するためには、受診者が結果をどのように受け止め、どのような対処行動をとっているのかを把握し、受診者の適切な行動変容を導くためにはどのような保健指導が有効であるか、という考察が必要である。

コーピングはストレッサーに対してなされる認知･行動的努力のプロセスとして位置づけられ、ストレス反応に及ぼす影響の個人差を説明するだけでなく、認知的ないし行動的な介入に容易に役立てられるという特徴を持つ。これまで、コーピングと精神的健康との関連について多くの研究が行われてきた。個人が選択するコーピングによって、運動・食生活改善など適切な行動につながることもあれば、飲酒・過食・喫煙など不適切な行動につながることもあり、コーピングは、身体的健康にも関連すると考えられる。

本研究は、健診受診者のコーピングに焦点を当て、コーピングと精神的・身体的健康との関連について明らかにすることを目的とし、保健指導において、コーピングに基づいた認知行動的な手法が有効であるかどうかについて検討した。

＜方法＞

本研究は、2013 年 7 月から 12 月の期間に実施された。対象者は、一般健康診断受診者で、(1)20 歳未満の者、(2)健診内容に生化学検査を含まない者、(3)精神疾患の治療歴がある者、(4)今回の健診で重篤な問題が指摘された者、は除外した。データは、小金原健診クリニックで定期健康診断を実施した受診者を連続サンプリングした。適格基準に該当する受診者に対し、2 名の研究者により研究内容の説明が行われ、紙面による同意を得た。同意の得られた受診者を対象とし、自己記入式質問用紙への回答を求めた。本研究の研究計画は、東京医科歯科大学の倫理審査委員会で承認を得ている。

評価項目は、人口統計学的変数、コーピング、身体的健康、精神的健康、とした。人口統計学的変数については、性別、年齢、喫煙、内服について情報収集した。コーピングについては Brief COPE を用いてスコアを算定した。身体的健康については、BMI、血圧、中性脂肪、HDL コレステロール、LDL コレステロール、空腹時血糖、の生活習慣病に関する項目で評価した。精神的健康については、二質問法を用いてうつの有無をスクリーニングし、アテネ不眠尺度（AIS）を用いて睡眠レベルを評価した。自己記入式質問用紙は、Brief COPE 日本語版、二質問法、アテネ不眠尺度で構成されている。

統計解析として、年齢は「60 歳未満」と「60 歳以上」で 2 群に分類した。うつの有無は、二質問法で二項目とも該当しない者を「うつなし群」、一項目でも該当したものを「うつあり群」、と二つの群に分類した。睡眠レベルは、AIS スコアに基づいて、「睡眠障害なし群（スコア 0-3）」、「睡眠障害の疑い群（スコア 4-5）」、「睡眠障害あり群（スコア 6 以上）」、の 3 群に分類した。

はじめに、一元配置分散分析を用い、性別、年齢、うつ、睡眠レベルについて各群間のコーピングを比較した。次に、身体的健康を予測する因子を検討するために、目的変数に健診データを、説明変数に人口統計学的変数、目的変数以外の健診データ、Brief COPE の 14 尺度のスコア、を投入し、階層的重回帰分析を行った。全ての統計解析は、Statcel3 で実施した。

＜結果＞

全受診者 6587 名のうち、適格基準に該当しない者、同意の得られない者、質問用紙に記入漏れや未回答があった者、を除いた 201 名が最終的な解析対象者となった(AIS については 199 名)。

二質問法の結果から、「うつなし群」は 130 名(64.7%)、「うつあり群」は 71 名(35.3%)であった。AIS スコアの結果から、「睡眠障害なし群（スコア 0-3）」は 118 名(59.3%)、「睡眠障害の疑い群（スコア 4-5）」は 43 名(36.1%)、「睡眠障害あり群(スコア 6 以上)」は 40 名（33.9%）であった。

一元配置分散分析を用いたコーピングの比較は、性別では、男性は「アルコール・薬物使用」で、女性は「気晴らし」、「積極的コーピング」、「情緒的サポートの利用」、「道具的サポートの利用」でスコアが高かった。年齢別では、60 歳未満は「情緒的サポートの利用」、「道具的サポートの利用」、「ユーモア」でスコアが高く、60 歳以上は「否認」でスコアが高かった。

うつの有無別では、「うつあり群」は「自己非難」のスコアが高かった。睡眠レベル別では、「睡眠障害あり群」が、「睡眠障害なし群」と比較して「行動的諦め」のスコアが高かった。

階層的重回帰分析では、収縮期血圧の上昇を予測する因子として「ユーモア」が、HDL コレステロールの上昇を予測する因子として「アルコール・薬物使用」が、LDL コレステロール
の上昇を予測する因子として「感情表出」が示された。

＜考察＞

本研究の目的は、健診受診者のコーピングと精神的・身体的健康との関連について明らかにすることであった。まず、精神的健康の評価について、対象者の 35%以上がうつ病スクリーニングで陽性であった。わが国でもうつ病患者は増加しているが、はじめにプライマリ・ケア医を受診することが多い。うつ病の診断は精神科医によって慎重に行わなければならないが、本研究で用いた二質問法は簡便かつ感度・特異度ともに高く、健康診断においても容易に実施でき、精神科医へのコンサルトが必要な者を拾い上げることができる。次に、コーピングとうつとの関連について、「うつあり群」では「うつなし群」と比較して、「自己非難」コーピングのスコアが有意に高かった。「自己非難」は情動焦点型コーピングに分類されるが、情動焦点型コーピングは、うつ病や不安障害との関連が報告されている。

うつ病や不安障害に対する効果的な治療法として、不適切な思考パターンや行動パターンを正していく、という手法の認知行動療法がある。近年、グループプログラム、セルフヘルプ、アドバイスクリニック、などの手法を用いた簡易型(低強度)の認知行動療法も開発され、既にプライマリ・ケア、地域・職場の精神保健、教育などの分野で活用されている。

AIS では、対象者の 41%以上に睡眠障害が疑われた。「睡眠障害あり群」は、「睡眠障害なし群」と比較して「行動的諦め」コーピングのスコアが有意に高かった。先行研究でも「行動的諦め」、「気晴らし」、「アルコール・薬物使用」の三種のコーピングが睡眠障害の予測危険因子と報告されている。睡眠障害がある者は、日常生活の中でストレスを感じやすく、不適切なコーピングに依存しやすいが、認知行動療法は睡眠障害の非薬物療法としても効果をあげている。

以上より、うつが疑われた者、睡眠障害が疑われた者、不適切なコーピングでスコアが高かった者、などに対しては、認知行動療法の手法を活用した保健指導で精神的健康の改善をはかることが望ましい。

コーピングと身体的健康について、本研究では、階層的重回帰分析により「ユーモア」コーピングは収縮期血圧の上昇の予測因子であった。先行研究でも、情動焦点型コーピングは高血圧のリスクを増加させ、問題焦点型コーピングは平均血圧や収縮期血圧を低下させるなど、血圧がコーピングに依存することが報告されている。「ユーモア」は、困難な状況において精神的苦痛を調節するのに使用される情動焦点型コーピングである。「ユーモア」には、ストレッサーについて考えることを避ける「回避」タイプもあり、高血圧患者でよくみられる「回避行動」パターンと一致している。

また、「アルコール・薬物使用」コーピングは HDL 上昇の,「感情表出」コーピングは LDL 上昇の予測因子であった。アルコール摂取が HDL を増加させることは先行研究の報告で広く知られており、本研究の結果はこれを支持するものであった。「感情表出」コーピングが LDL に対して持つ特異的な効果は示されていない。

本研究にはいくつかの限界点として、サンプルサイズが小さいこと、横断研究であるためコー

ピングと精神的・身体的健康との因果関係が示されていないこと、が挙げられる。今後はサンプルサイズ、観察期間ともに拡大し、コーピングと精神的・身体的健康との関連について、因果関係も含め、より詳細に検討することが望まれる。

＜結論＞

本研究の特徴は、健康診断受診者のコーピングに焦点を当てたことにある。結果から、いくつかのコーピングと精神的・身体的健康との関連が明らかになった。受診者が健康的な行動変容を行うためには、受診者のコーピングに基づいて認知行動療法の手法を用いる保健指導が有効であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5127　号	伊藤　美帆
論文審査担当者	主　査　吉田　雅幸 副　査　藤原　武男、平井　伸英	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本研究では、健診受診者のコーピングに着目し、精神的・身体的健康状態と関与しているかどうか明らかにすることを目的とした。本研究は横断研究デザインであり、小金原健診クリニックで健康診断を受診した201名を対象に実施された。評価項目は、身体的健康、健康的健康、コーピング(Brief COPE)である。結果から、いくつかのコーピングと精神的・身体的健康との間には関連がみられ、コーピングに基づいた認知行動的な保健指導は、精神的・身体的健康の増進に寄与することが示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

健康診断の目的は、生活習慣を改善して疾病の発生を予防する一次予防と、発生した疾患を早期発見して早期治療につなげ、身体・費用・時間などの負担を減らす二次予防であり、健康診断後に実施される保健指導では、健康的な行動変容を促すための支援を試みるが容易ではない。本研究ではストレスに対するコーピングという点から新たな行動変容を促す保健指導の開発をめざすものであり、この着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究によって、男性では「アルコール・薬物使用」、女性では「気晴らし」「積極的サポートの利用」というコーピングが多くみられた。また、重回帰分析では、収縮期血圧の上昇と「ユーモア」が、LDL コレステロール上昇と「感情表出」というコーピングに相関が強いことが明らかになった。

３）研究方法・倫理観

本研究は倫理審査委員会の承認のもと、一般健診受験者を対象として自己記入式質問紙への回答をもとに実施された。

４）考察・今後の発展性

本研究でみられた身体的健康とコーピングとの関連は興味深く、今後の保健指導への応用が期待された。

３．その他

特記すべきことなし。

４．審査結果

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	岩﨑　優子
論文審査担当者	主査　田賀　哲也 副査　淺原　弘嗣　　関矢　一郎
論　文　題　目	Differentiation/purification protocol for retinal pigment epithelium from mouse induced pluripotent stem cells as a research tool

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

【目的】マウスの induced pluripotent stem cells（iPSC、人工多能性幹細胞）から Retinal pigment epithelium（RPE、網膜色素上皮細胞）を分化誘導し、高純度で培養する方法を作成した。【方法】既報に従いマウス iPSC から網膜前駆細胞を誘導し、RPE への分化を促進した。分化した色素細胞を Accutase® 処理と用手的な処理により純化し、維持培養した。遺伝子発現を quantitative reverse transcription polymerase chain reaction（qRT-PCR）で、構造を免疫細胞染色及び電子顕微鏡で評価し、種々の機能を解析した。【結果】iPS-RPE の純度は約 98%であった。細胞は頂端 - 基底極性と RPE に特徴的な構造的特徴を有した。RPE の分化・機能に関する遺伝子の発現は、生後 10 日目のマウスの RPE と比べ低値であったが、RPE 機能に関する遺伝子の発現はマウス初代培養 RPE（pRPE）と同等であった。iPS-RPE は視細胞外節の貪食能を有し、密着結合を形成し、T 細胞増殖抑制能を示した。【結論】RPE の機能・形態学的な研究に有用と考えられるマウス iPS-RPE の分化、純化手順方法の作成に成功した。

＜緒言＞

近年、ヒト iPSC や embryonic stem cells（ESC、胚性幹細胞）から分化誘導した RPE を用いた患者臨床研究が複数の研究機関により行われている。移植された RPE が病気の眼内で生存し機能を果たす過程は未だ明らかでなく、モデル動物を用いる in vivo 研究は依然として重要で、種々の疾患モデルや遺伝子改変モデルのあるマウスの RPE 細胞の必要性は高い。マウスの RPE 細胞は従来 pRPE が用いられてきたが、RPE の立方体様形態を保ったままで沢山の細胞数を得ることは難しい。細胞間接着は、細胞表面に発現する細胞接着因子の質と量に影響を受ける。美しい立方体様形態を保つヒト iPS-RPE の生着過程を理解するための研究素材としてのマウス RPE は、同様に美しい立方体様形態を保っていることが望ましい。マウスの幹細胞から純度が高く質を保った RPE を十分な細胞数得られれば、上記の目的にかなう実験素材が得られることとなる。マウスの幹細胞から RPE を分化する方法は既に報告があるが、分化 RPE を純化する方法は未だ報告されていない。本研究では、マウスの iPSC から RPE を分化および純化する方法を検討し、得られた細胞の性質を解析した。

＜方法＞

視細胞のレポーターマウスであるNrl-GFPトランスジェニックマウスから樹立したiPSCを用い、永楽ら（Nature, 2011）が報告した方法に従い、分化7日までに網膜前駆細胞を含む細胞塊を得た。分化7日に細胞塊を注射器と針を用いて機械的に破壊し、ラミニンコーティングを施した培養基材に接着、CHIR99021（Wnt シグナル経路の活性化）、SU5402（繊維芽細胞増殖因子シグナル経路の抑制）、Y27632（Rho関連、コイルドコイル含有タンパク質キナーゼの抑制）を添加し培養継続した。分化11日に、接着した細胞をAccutase® 処理及び用手処理することで色素細胞を純化し、トリプシンを用いて継代した。分化16日よりヒトpRPE用培地で培養した。分化 29 日以後、色素細胞の形態を、共焦点顕微鏡を用いた免疫細胞染色評価と電子顕微鏡で観察した。遺伝子発現をqRT-PCRで評価した。色素細胞の純度を評価するため、分化29日で細胞を固定し、明視野撮影を行った。得た写真を画像処理ソフトウェア ImageJ で解析し、色素細胞の占める面積の割合を評価した。細胞の密着結合形成能はTransepithelial electrical resistance（TER、経上皮電気抵抗）で評価した。視細胞外節の貪食機能は、蛍光標識した視細胞外節をiPS-RPEの培地に添加し、蛍光陽性の細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。免疫抗原の発現解析は、IFN-γ有無の条件下で培養した色素細胞を、MHC-class1、MHC-class2、PD-L1（CD274） に対する抗体で標識し、フローサイトメトリーで評価した。T細胞増殖抑制能評価には、マウス脾臓より得たT細胞を抗CD3抗体及び抗CD28抗体で増殖刺激したものを用いた。iPS-RPE との共培養でT細胞の増殖が抑制されるかどうかを、抗CD4抗体ないし抗CD8抗体と抗Ki67抗体との共染色を行いフローサイトメトリーで評価した。

＜結果＞

分化7日までに分化した細胞塊を崩し、接着培養とすると、接着した小細胞塊は同心円状に広がった。この際Y27632を用いることで、得られる細胞数は有意に増加した（分化7日の60個の細胞塊あたり、Y27632 投与群で中央値 2.02×10^6 cells、Y27632 投与無群で中央値 9.07×10^5 cells の色素細胞が得られた（n=7、$p<0.05$、Mann-Whitney U test））。分化7日の細胞塊が網膜分化能を持つことは、網膜への分化を既報の通り継続し、分化26日にNrl-GFPの発現を評価することでさらに確認された。分化11日に、Accutase® 処理を行い無色素細胞を効率的に除去し、わずかに残った無色素細胞は用手的に除去した。継代された色素細胞は分化 16 日までに集密状態となり、分化29日には立方体様で敷石状の形態をとった。ZO-1、P-cadherin、F-actin抗体による免疫細胞染色で、多くの細胞が六角形、立方体様の単層構造を取り、ZO-1は細胞間隙の頂端側寄りに発現していることが確認された。電子顕微鏡による観察では、頂端側に微絨毛があり、細胞間には電子密度の高い細胞間接着装置が観察され、基底膜側には細胞外基質が存在した。以上の頂端-基底極性を伴う形態と、これらの色素上皮細胞が網膜への分化能を持つ網膜前駆細胞に由来することをもって、我々はこれらの色素細胞をRPEであるとし、以下iPS-RPEと記載した。分化 29 日の細胞の明視野写真の解析から、iPS-RPE の純度は平均 98.6%であった（n=12）。分化マーカーであるMitf、Pax6、Otx2、Sox9は、iPS-RPEで発現していたが、コントロールRPE（生後10日マウスのRPE）よりも低かった。RPE機能マーカーであるTyr、Mertk、Serpinf1（PEDF）及びRpe65の発現もコントロールRPEより低値であった。これらの機能マーカーの

発現はマウス pRPE とも次の様に比較した。pRPE は、生後 10 日マウスから得て、2 日の培養を行ったもの（pRPE（2d））と、成体マウスから得て、2 週の培養を行ったもの（pRPE（2w））を使用した。3 種の培養 RPE の中で、Rpe65、Mertk 及び Tyr の発現は pRPE（2d）で最も高く、PEDF の発現は pRPE（2w）で最も高かった。iPS-RPE は視細胞外節の貪食能を有し、密着結合を形成していた（平均 TER=59.0 Ωcm^2、n=3）。マウス iPS-RPE は MHC-class 1 を恒常的に発現し、IFN-γ 投与下においてその発現は亢進した。MHC-class 2 と PD-L1 は IFN-γ 投与下で発現が見られた。マウス脾臓より得て刺激・活性化した T 細胞の増殖は、iPS-RPE との共培養で抑制された。

＜考察＞

我々の手順により、60 個の細胞塊から約 2×10^6 cells、純度約 98%の iPS-RPE が得られた。Y27632 は獲得できる細胞数を増すのに有用であった。Y27632 は、ストレスファイバーの形成やアクチン骨格の安定化に寄与する Rho 関連、コイルドコイル含有タンパク質キナーゼを阻害し、ヒト iPSC/ESC や、ヒト iPSC/ESC から分化誘導された RPE の継代に有用とされる。我々の観察では、Y27632 を分化 7 日から 11 日に加えることで、色素細胞のみならず無色素細胞も広く展開した。Y27632 の作用機序としては、細胞骨格に影響してコロニーの拡大に寄与する可能性と、同時に増加する無色素細胞の産生する何らかの液性因子が寄与する可能性の、二つが考えられる。qRT-PCR で評価した遺伝子発現は、コントロール RPE や 2 種の pRPE、iPS-RPE でそれぞれ異なった。Rpe65 は、視細胞の機能維持に重要なレチノイドサイクルに関与する酵素であり、Aoki らは、ESC から分化誘導した色素細胞を chick 胚の眼内で in vivo 培養することで Rpe65 が発現することを示した。移植後の in vivo 環境下においてこれらの遺伝子発現が変化する可能性もあると思われた。iPS-RPE は密着結合を形成し、視細胞の機能維持に重要な視細胞外節の貪食能を有し、マウス pRPE を用いた既報と同様の免疫抗原発現様式を示し、ヒト iPS-RPE を用いた既報と同様に T 細胞増殖抑制能を有した。

＜結論＞

マウスの iPS-RPE の分化および純化手順を示した。マウスの iPS-RPE はヒト iPS-RPE と同様、RPE に似た形態やその特徴的な機能を示し、RPE の機能や形態学的研究の素材として有用と考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5128　号	岩﨑　優子
論文審査担当者	主　査　　田賀　哲也 副　査　　淺原　弘嗣　　関矢　一郎	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、マウス人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells, iPSC）から網膜色素上皮細胞（retinal pigment epithelium, RPE）を分化誘導および純化する新たな方法を報告するとともに、その意義を論じたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ヒト iPSC から分化誘導した RPE を移植する臨床研究が近年行われているが、移植された RPE が眼内で生存し機能する過程については明らかでない点が多く、モデル動物による研究の必要性が依然として高く、RPE を iPSC から独自の方法で効率良く分化させ高純度に得ようとする本研究の目的は先駆性・独自性のいずれにおいても高い。

２）社会的意義

マウス iPSC から RPE を分化誘導および純化する新たな方法を報告した本論文は、移植 RPE の in vivo での研究を展開し、ヒトへの応用研究につながる可能性が高いという点で有意義である。

３）研究方法・倫理観

RPE の分化の過程と純度についてマーカー遺伝子の発現や形態的特徴などから定性的・定量的に確認しながら研究を実施しており、また、倫理的な考察もなされている。

４）考察・今後の発展性

本論文は今後の臨床応用についてもその開発的研究へ展開できる可能性を示唆するものであり、今後の発展が期待される。

３．審査結果

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	篠原　宏成
論文審査担当者	主査　関矢　一郎 副査　北川　昌伸、岸田　晶夫
論　文　題　目	Establishment of novel therapy to reduce progression of myopia in rats with experimental myopia by fibroblast transplantation on sclera

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

近視は最も一般的な視覚障害の原因の一つで、眼軸長の過度な延長が特徴的である。近視眼に生じる過度な眼軸延長を抑制する試みはこれまでにもなされてきたが、未だ確立された方法は報告されていない。眼軸の病的延長を生じた近視眼では、強膜の菲薄化とコラーゲン線維の狭細化が生じており、我々は線維芽細胞の強膜上への移植により、移植した線維芽細胞が強膜直上でコラーゲンを産生することで強膜を補強し、近視化と病的眼軸延長を抑制することを試みた。この検討のため、我々は Wistar ラットを用いて視覚刺激遮断による実験近視モデルを作成した。眼瞼縫合を用いた視覚刺激遮断にて、ラットでも眼軸延長を伴う近視化を誘導でき、また強膜では菲薄化とコラーゲン線維の狭細化が見られた。ラット強膜直上への線維芽細胞移植を行ったところ、強膜直上での 1 型コラーゲン線維の産生が見られた。産生されたコラーゲン線維は束状の構造をしており、また縞様構造も見られ、成熟したコラーゲン線維であると考えられた。ラット実験近視誘導眼を用いた線維芽細胞移植による近視抑制実験では、線維芽細胞移植眼は非移植眼と比較して有意に近視化と眼軸延長が抑制された。移植した線維芽細胞により産生されたコラーゲンが強膜を補強し、近視化と眼軸延長を抑制したと考えられた。

〈緒言〉

近視は最も一般的な視覚障害の原因の一つで、網膜より前面で焦点が合う状態であり、眼軸長の過度な延長が特徴的である。近視の中でも特に病的近視では、強膜の菲薄化と眼球形状の変形を起こし、後部ぶどう腫や近視性脈絡膜新生血管、網脈絡膜萎縮などの高度な視力障害をきたす合併症を生じる。そのため近視に生じる過度な眼軸延長を抑制する治療の確立が望まれている。

近視研究に用いられる動物モデルとして、これまで視覚刺激遮断によりヒヨコや霊長目、マウスなどで近視誘導が行えることが報告されている。しかし、ヒヨコはヒトと解剖学的に大きく異なることや、霊長目は使用に制限があることや近視誘導に時間がかかること、マウスは眼球のサイズが小さく、測定や処置が困難なことなどの問題点があった。そこで我々は眼球サイズがマウスよりも大きく、入手や使用が容易なラットに着目した。しかしラットの実験近視モデルはこれまでに報告がなく、我々はまず視覚刺激遮断によりラットでも近視誘導が可能かどうかを検討した。視覚刺激遮断により、他の動物種と同様にラットでも眼軸延長を伴う近視化を誘導でき、ま

た強膜の菲薄化やコラーゲン線維の狭細化といった構造変化が生じていることも認められた。

次にこのラット実験近視モデルを用いて、ヒト線維芽細胞を強膜直上に移植することにより、視覚刺激遮断による近視化と眼軸延長を抑制できるかどうかを検討した。更にヒト線維芽細胞移植が近視誘導眼の強膜コラーゲンへ影響を及ぼすかどうかも検討した。

〈方法〉

ラットにおける視覚刺激遮断による近視誘導の検討では、3 週齢の Wister ラットを 15 匹用いた。右眼を眼瞼縫合により視覚遮蔽し、左眼は処置を行わずコントロールとした。視覚遮蔽後 1 週、2 週、4 週目において超音波 A モードにて眼軸長を、スキアにて屈折度を計測し、遮蔽眼とコントロール眼とを比較検討した。4 週後に眼球を摘出し、強膜厚と強膜コラーゲン線維径を比較検討した。強膜厚の検討はパラフィン切片にて行い、視神経から鼻側と耳側 1mm の部位での強膜厚の平均値を遮蔽眼とコントロール眼で比較検討した(n=5)。強膜コラーゲン線維径の検討は、電子顕微鏡にて 10 万倍の拡大率で 3 視野撮影し、視野内のコラーゲン線維の直径を全て計測して中央値を算出して、遮蔽眼とコントロール眼の中央値で比較を行った。検討は後極部と周辺部強膜の内層、中層、外層でそれぞれ行った(n=3)。

ヒト線維芽細胞の強膜直上への移植による近視抑制の検討においては、まずラット強膜直上に移植したヒト線維芽細胞が生着しコラーゲンを産生しているかどうかを、免疫抑制剤使用下に monomeric Azami-Green(mAG1)遺伝子を導入したヒト線維芽細胞を移植し 1 週後と 4 週後で凍結切片を作成し、ヒト 1 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色で検討した。更に、電子顕微鏡にて産生されたコラーゲンの超微細構造を観察した。次に、3 週齢 Wistar ラットを①遮蔽なし/sham 移植群(n=16)、②遮蔽あり/sham 移植群(n=15)、③遮蔽なし/細胞移植群(n=16)、④遮蔽あり/細胞移植群(n=15)の 4 群に分けて、免疫抑制剤使用下にヒト線維芽細胞の強膜直上への移植による近視抑制効果を検討した。更に、ヒト線維芽細胞移植が強膜のコラーゲン線維に影響を及ぼすか検討するため、後極部強膜中層のコラーゲン線維径の中央値を 4 群で比較した。

〈結果〉

ラットにおける視覚刺激遮断による近視誘導の検討では、片眼視覚刺激遮断前は遮蔽眼、コントロール眼に屈折度、眼軸長に差はなかった。片眼視覚刺激遮断後 1 週目より遮蔽眼はコントロール眼と比較して有意に近視化と眼軸延長が見られ、4 週目までその傾向は継続した。また遮蔽眼はコントロール眼と比較して強膜厚は有意に薄く、強膜コラーゲン線維は後極部中層と外層、周辺部中層において有意に細い結果だった。

ヒト線維芽細胞の強膜直上への移植では、移植後 1 週にヒト線維芽細胞は強膜直上に生着しており、細胞周囲には 1 型コラーゲン線維の産生が見られ、産生されたコラーゲン線維は一部強膜内に入り込んでいた。4 週目では移植したヒト線維芽細胞はほぼ見られなかったものの、強膜周囲のヒト 1 型コラーゲン線維は 1 週後とほぼ同様に見られた。電子顕微鏡では移植したヒト線維芽細胞の周囲に束状のコラーゲン線維が見られ、コラーゲン線維には縞様構造があり、成熟したコラーゲン線維であると考えられた。更に、ヒト線維芽細胞の強膜直上への移植による近視抑制の検討においては、遮蔽あり/細胞移植群は、遮蔽あり/sham 移植群と比較して 2 週から有意に近

視化と眼軸延長の抑制効果が得られ、4 週目の時点で近視化と眼軸延長は 60%程度に抑制できた。また後極部強膜中層のコラーゲン線維径も、遮蔽あり/細胞移植群は、遮蔽あり/sham 移植群と比較して有意に狭細化が抑制されていた。

〈考察〉

今回の結果において、視覚刺激遮断によって Wistar ラットにおいても眼軸延長を伴う近視化を誘導できることが示された。ラットの実験近視モデルの報告はこれまでになく、我々の結果は初めての報告である。C57BL/6J マウスでは 1 週から 6 週の視覚刺激遮断によって近視化と眼軸延長が誘導できることが報告されている。我々の結果では 4 週の視覚刺激遮断にて-2.8D の近視化と 150μm の眼軸延長が認められており、他の動物種における報告と比較しても遜色のない結果であった。また、ラットの近視誘導眼では強膜の菲薄化と、後極部中層、外層と周辺部内層のコラーゲン線維の狭細化が見られた。ニホンザルやツパイでの近視誘導眼において、強膜の菲薄化や強膜コラーゲン線維の狭細化が見られたと報告されており、ラットにおいても視覚刺激遮断により強膜の構造変化が生じることが示された。ラット眼球はマウスのほぼ 2 倍の大きさがあり、屈折度、眼軸長の測定や眼球への処置がマウスと比較して容易であり、我々の作成したラット実験近視モデルは動物モデルにおける近視研究に有用であると考えられた。

また、ヒト線維芽細胞のラット強膜直上への移植は、視覚刺激遮断眼において有意に近視化と眼軸延長の抑制効果を示した。移植されたヒト線維芽細胞は移植後 1 週では強膜直上に生着し 1 型コラーゲンを産生し、一部は強膜に入り込んでいた。4 週目では線維芽細胞はほぼ消失していたが、産生されたコラーゲン線維は 1 週目とほぼ同様に残存していた。近視化と眼軸延長の抑制効果は、強膜直上に産生されたコラーゲン線維による強膜の補強効果によるものと考えられた。今回の研究で移植した線維芽細胞の長期間の生着が得られなかったのは異種移植を行っていたためと考えられ、線維芽細胞の自家移植により長期間の生着とコラーゲン産生が可能になり、更なる眼軸延長抑制効果が得られる可能性があると考えられた。強膜の補強による近視抑制の試みとしては、長波長紫外線を強膜に照射することにより強膜を補強し、近視進行を抑制できたとの報告があり、強膜の補強による近視抑制は合理的な方法と考えられる。強膜に対する長波長紫外線照射は安全性が確立されていないが、線維芽細胞の自家移植は安全性が高く、より効果的な近視進行抑制治療になり得ると考えられる。

更に、今回の結果ではヒト線維芽細胞の移植により、近視誘導眼において強膜のコラーゲン線維の狭細化にも抑制効果が見られた。近視誘導眼では強膜における TGF- ß やレチノイン酸、cAMP などの発現に変化が生じているとの報告がある。線維芽細胞は TGF- ß や lysyl oxidase の分泌も行っており、これらのサイトカインが強膜のコラーゲン線維に影響を及ぼした可能性も考えられた。

〈結論〉

強膜上へのヒト線維芽細胞移植はラット実験近視誘導モデルにおいて近視抑制効果を示し、それは移植細胞からの強膜上へのコラーゲン産生による強膜補強によるものと考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5129　号	篠原　宏成
論文審査担当者	主　査　関矢　一郎 副　査　北川　昌伸、岸田　晶夫	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

病的近視は眼軸長の過度な延長が特徴的である。近視眼に生じる過度な眼軸延長を抑制する試みはこれまでにもなされてきたが、未だ確立された方法はない。Wistar ラットに眼瞼縫合を用いた視覚刺激遮断により、眼軸延長を伴う近視化を誘導でき、強膜には菲薄化とコラーゲン線維の狭細化が認められた。ラット強膜直上へのヒト線維芽細胞移植により、強膜直上での I 型コラーゲン線維の産生が認められ、近視化と眼軸延長が抑制された。移植した線維芽細胞により産生されたコラーゲンが強膜を補強し、近視化と眼軸延長を抑制するものと考えられた。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

今回、視覚刺激遮断によって眼軸延長を伴う近視化を誘導できることをラットで初めて報告した。また、ラットの近視誘導眼では強膜の菲薄化とコラーゲン線維の狭細化が認められることを示した。ラット眼球はマウスのほぼ 2 倍の大きさがあり、屈折度、眼軸長の測定や眼球への処置がマウスと比較して容易であり、ラット実験近視モデルは動物モデルにおける近視研究に有用であることを示した点で、先駆性・独創性がある。

２）社会的意義

ヒト線維芽細胞のラット強膜直上への移植は、近視化と眼軸延長の抑制効果を示した。これは強膜直上に産生されたコラーゲン線維による強膜の補強効果によるものと考えられた。強膜への線維芽細胞移植は、病的近視に対する新たな治療法に結び付く可能性がある点で、臨床的にも有用な研究成果と言える。

３）研究方法・倫理観

眼科に特有な屈折度や眼軸長測定に加え、免疫染色を含めた組織学的解析、さらに電子顕微鏡による微細構造解析の手法を駆使して、現在求められる研究レベルとして十分なレベルであると考えられる。また動物倫理的にも十分な配慮がなされている。

４）考察・今後の発展性

病的近視のハイリスク群を検出することが可能になれば、自己線維芽細胞の強膜移植は、予

防医学に結び付く可能性を有する。

３．その他

プレゼンテーション及び質疑応答は満足のいくものであった。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	松本　太一
論文審査担当者	主査　樗木　俊聡 副査　植竹　宏之、影近　弘之
論　文　題　目	Retinol promotes *in vitro* growth of proximal colon organoids through a retinoic acid-independent mechanism

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

アルコール型ビタミン A であるレチノール（ROL）は細胞内でレチノイン酸（RA）に変換され、さまざまな細胞の増殖・分化調節に関わることが知られている。しかしながら、正常大腸上皮幹細胞に対する ROL の作用は不明であった。本研究では、大腸上皮を３次元的に培養するオルガノイド培養技術を用いて、マウス大腸上皮に対する ROL の作用を解析した。ROL を RA へ変換する酵素群の発現が近位と遠位の大腸上皮で異なることから、これら２つの部位の大腸上皮オルガノイドそれぞれに対する ROL の作用を調べた。その結果、ROL の投与が近位大腸細胞におけるオルガノイド形成と細胞増殖、さらには幹細胞マーカーLgr5 の発現を著明に促進すること、一方遠位大腸細胞にはこれらの作用を示さないことが明らかとなった。RA、あるいは ROL から RA への変換の中間代謝物である RAL には近位大腸上皮増殖促進効果がないことから、ROL の作用は RA への代謝経路を介さない可能性が示された。実際、RA による転写促進機構を抑制する薬剤の投与によっても ROL による大腸上皮細胞増殖作用が阻害されないことから、ROL の作用が RA 非依存性であることを確認した。これらより、ROL が未知の機構を介して大腸上皮増殖にはたらく作用をもつことが明らかとなった。

＜緒言＞

大腸上皮は、陰窩（クリプト）と呼ばれる単層円柱上皮の凹み構造の連なりとして構成される。各々のクリプト底部に幹細胞遺伝子マーカーLgr5 を発現する上皮幹細胞が局在し、恒常的な組織の再生に寄与している。近年、複数の液性因子（R-sopndin1、Noggin、EGF）の存在下に正常な腸上皮をオルガノイドと呼ばれる 3 次元構造体として培養する手法が開発された。また、学位申請者が所属する研究グループにおいても、類似の添加因子と細胞外マトリックスの組合せを用いて大腸上皮細胞を維持するオルガノイド培養法を確立した。これらオルガノイド培養技術は、腸上皮細胞およびその幹細胞集団を生理的状態に近い細胞集団として解析する手法として期待されている。

アルコール型ビタミン A であるレチノール（ROL）の作用の多くは、ROL が 2 段階の酸化反応を受け変換される RA による転写調節機能によるものされる。最初の酸化反応は、複数の酸化

酵素（Adh1、Adh5、Adh7、Rdh1、Rdh10）により ROL が RAL に変換される反応である。第二の反応は、RAL が Aldh1 酵素ファミリー（Aldh1a1、1a2、1a3）により変換され RA となるものである。RA は核内受容体 Rar（Rarα、Rarβ、Rarγ）と結合し、加えて別の核内受容体 Rxr（Rxrα、Rxrβ、Rxrγ）と共合して多様な遺伝子発現を制御している。この ROL-RA 経路は、さまざまな種類の幹細胞の増殖・分化調節に関与し、これらの運命決定制御に重要な役割を担うことが知られる。しかしながら、大腸上皮細胞、特に正常なこれら細胞群およびその幹細胞集団に対する ROL の作用は不明であった。
本論文では、大腸上皮オルガノイド培養技術を用いることで、ROL が大腸上皮細胞、中でも特に幹細胞に及ぼす作用を検討することを目的とした。

＜方法＞
マウス大腸を既報の通りオルガノイド培養に用いた。近位および遠位に二分した上皮単離とオルガノイド培養も同様の方法を用いておこなった。また、6 日間培養し幹細胞集団を増やし、これを単一細胞群に解離した細胞集団からのオルガノイド形成能を幹細胞増殖の評価に用いた。オルガノイド培養に必須の因子に加え、ROL（1μM、3μM、10μM）もしくは RAL（１μM）、RA（１μM）を添加しその作用を解析した。また、RA 機能の阻害には Rar アンタゴニストである AGN193109（１μM）の添加実験を行った。各因子の作用は、オルガノイド形成能の他、オルガノイド径、全細胞数、Ki67 陽性細胞数で解析した。Lgr5 を含む遺伝子発現解析は半定量的 RTPCR でおこなった。また、腸組織における Aldh1a1・Aldh1a3 の発現は in situ hybridization（ISH）および免疫染色（IHC）を用いて解析をした。

＜結果＞
マウス全大腸より単離したクリプトを用いオルガノイド培養をおこない、ROL 非投与群、ROL 投与群（1μM、3μM、10μM）でオルガノイド形成を検討した結果、ROL１μM、３μM 投与群で他群と比較してオルガノイド形成が高いことが示唆された。ROL-RA 経路に関与する遺伝子の発現を半定量的 RTPCR で調べた結果、Aldh1a2 を除く酵素（Adh1、Adh5、Adh7、Rdh1、Rdh10、Aldh1a1、Aldh1a3）が大腸上皮に発現し、これらの複数が近位大腸、遠位大腸で異なる発現を示した。このうち Aldh1a1・Aldh1a3 については、実際に ISH および IHC により近位大腸と遠位大腸で発現パターンがことなることを見いだした。
これを受けて、ROL による作用が近位大腸あるいは遠位大腸由来の上皮で異なる可能性を考え、これらを別々に単離しオルガノイド培養をおこなった。ROL（1μM）投与の影響を解析した結果、による ROL は近位大腸に著明なオルガノイド形成率の上昇を誘導した。また、オルガノイド径、全細胞数、さらに細胞増殖マーカーKi67 を発現する細胞数のいずれで評価しても ROL 投与群では非投与群と比較して有意な上昇がみられた。また、半定量的 RTPCR で幹細胞マーカーである Lgr5 の発現を調べたところ、ROL を投与した近位大腸オルガノイドにおいて非投与群と比較して著明な上昇が見られた。ROL によるこれら全ての作用は、近位大腸由来オルガノイドにのみ見られ、遠位大腸由来オルガノイドにはみられなかった。次に、この ROL の作用への RA の関与を調べるため、近位大腸オルガノイドに ROL、RAL、あるいは RA を投与した。しかしな

がら、RAL および RA には ROL と同様のオルガノイド増殖促進効果は見られなかった。さらに、RA 機能を阻害する AGN193109 は、ROL や RA 投与による標的遺伝子発現を抑制するものの、ROL による近位大腸オルガノイド増殖促進効果は抑制を受けなかった。

＜考察＞

本研究ではまず、RA 合成に関わるいくつかの酵素が、大腸上皮の頭尾軸に沿って異なる発現分布を示すことを明らかにした。特に Aldh1a1 および Aldha1a3 は近位側で高い発現を示すことを、半定量的 RTPCR のみならず ISH と IHC でも示した。これまで腸管における Aldh1a1・Aldh1a2・Aldh1a3 の発現パターンを調べた報告はあるが、胎生マウスさの小腸組織を解析したものである。成体マウスの大腸における Aldh1a1・Aldh1a3 の発現局在を初めて報告するものである。本研究では、このデータを得たことで、近位と遠位の大腸オルガノイドを個別に解析する発想に至り、そして実際に ROL が近位大腸オルガノイドのみに増殖促進作用をもつことを明瞭に示した。本結果は、大腸における幹細胞制御と増殖調節機構が頭尾軸に沿う部位により異なることを示唆する重要なものと考える。

ROL の作用の多くは、ROL が RA に酸化され、RA が核内受容体を介して標的遺伝子発現を誘導する機構を介するものとされてきた。しかしながら、本研究で示した ROL 依存性の近位大腸上皮増殖促進は、RA シグナル経路を介するものではないことを示した。すなわち、RAL あるいは RA を近位大腸オルガノイドに投与しても ROL と同様の効果はみられず、また、Rar の阻害によっても ROL によるオルガノイド増大および Lgr5 の上昇は抑制をうけなかった。今後この ROL-RA 経路とは独立した近位大腸に対する ROL 作用機構を明らかにすることは重要な課題であると考える。

＜結論＞

本研究では、大腸上皮幹細胞およびオルガノイドの増殖を増強する ROL の新しい作用を報告した。またこの ROL の作用は近位大腸由来上皮細胞にのみみられるものであり、大腸における幹細胞制御と増殖調節機構が頭尾軸に沿う部位により異なることを示した。さらにこの ROL の作用は、RA 経路とは異なる機構を介するものであることを示した。これらの成果は、大腸上皮幹細胞研究、および大腸上皮をオルガノイドとして増やして用いる様々な応用技術の両者に重要な知見を与えるものと考えた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5130　号	松本　太一

論文審査担当者	主　査　樗木　俊聡 副　査　植竹　宏之、影近　弘之

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、アルコール型ビタミンＡであるレチノール（ROL）が近位大腸オルガノイド形成と細胞増殖を促進することを示した研究である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

レチノール（ROL）は２段階の酸化反応によりレチナール（RAL）を経てレチノイン酸（RA）に変換される。このROL-RA経路は、さまざまな種類の幹細胞の増殖・分化に重要な役割を担うことが知られているが、大腸上皮および同幹細胞への作用は不明であった。このような背景の下、申請者は、大腸オルガノイド培養系を駆使して、ROL, RAL, RAの幹細胞性維持における役割を解析しており、評価に価する研究テーマである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．ROL が近位大腸オルガノイド形成能・幹細胞性を亢進すること。

２．ROL の当該作用は近位大腸オルガノイド特異的であり、遠位大腸には作用しないこと。

３．RAL および RA には当該作用が認められないこと。

これらの結果は、小腸オルガノイドと比較して大量培養が困難な大腸オルガノイド培養への光明となるものであり、臨床応用のヒントとなる有用な知見を含む研究成果である。

３）研究方法・倫理観

申請者の研究室で過去に報告したマウス大腸オルガノイドの二次培養系に、ROL（1,3,10μM）、RAL（1μM）、RA（1μM）を添加して、オルガノイド数と大きさ（径）さらには Ki67 陽性細胞数を指標に作用を解析している。

４）考察・今後の発展性

本研究結果は、ROL が近位大腸オルガノイドのみに増殖促進作用をもつことを明瞭に示した。大腸における幹細胞制御と増殖調節機構が頭尾軸に沿う部位により異なることを示唆する重要な知見といえる。また、ROL の代謝産物である RAL および RA には同様の機能は認めら

れなかった。今後、ROL が近位大腸のみに機能する理由、さらには ROL が RA 非依存性に如何なるメカニズムで機能を発揮するのかが明らかになることで、効果的な細胞移植療法を含めた医療応用への可能性が高まることが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	石津　暢隆
論文審査担当者	主査　田中　光一 副査　石川　欽也、赤澤　智宏
論　文　題　目	Impaired striatal dopamine release in homozygous Vps35 D620N knock-in mice

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

家族性パーキンソン病PARK17は常染色体優性遺伝形式を示し、近年VPS35遺伝子の点変異(多くは D620N 変異)がその原因であることが同定されている。VPS35は様々なタンパク質のリサイクリングを行うレトロマータンパクとしてVPS26およびVPS29と複合体を形成し、細胞質内に幅広く存在しているがその発症機序については未だ不明な点が多い。我々はその病態を解明するため、CRISPR/Cas9法によりVps35 D620N ノックインマウス及びnon-homologous end-joining (NHEJ) Deletion 1(Del 1) マウスを作成し、遺伝学的解析をはじめ、生物学的、組織学的および神経化学的解析等を行った。CRISPR/Cas9法で得られたヘテロ接合Vps35 D620Nノックイン($Vps35^{D620N/+}$)マウス(+、WT:野生型)の交配で得たホモ接合ノックイン($Vps35^{D620N/D620N}$)マウスは野生型($Vps35^{WT}$)マウスと同様に成長し、70週齢まで黒質tyrosine hydroxylase(TH)免疫染色陽性細胞数、線条体の同陽性線維は保たれていた。一方ヘテロ接合Vps35 Del1($Vps35^{Del1/+}$)マウスの交配ではホモ接合($Vps35^{Del1/Del1}$)マウスは誕生せず、同アレルは致死性を伴うと考えられた。またVps35$^{D620N/+}$及びVps35$^{Del1/+}$マウスの交配ではVps35$^{D620N/Del1}$マウスの誕生を認め、Vps35D620N シングルノックインアレルは致死性Vps35 Del1アレルをrescue可能であることが示された。生後３日までの同マウスの総数は野生型Vps35^{WT}マウスと同様であったが、3週齢におけるVps35$^{D620N/Del1}$マウスの総数は約30%減少し、経過中の死亡が認められた。誕生後3日から３週までの間に生存に対して不利な因子が作用している可能性が推測されたことからVps35D620Nアレルは、WTが持つ全ての機能は備えておらず、partial loss of functionアレルであると考えられた。また20週齢のVps35$^{D620N/+}$,Vps35$^{D620N/D620N}$及びVps35^{WT}マウスのホモジェネート線条体dopamine (DA) 濃度は各遺伝子型マウス間で有意差は認められなかったが、*in vivo* microdialysis解析では、Vps35$^{D620N/D620N}$マウス線条体シナプス末端からの細胞外DA放出量がVps35^{WT}マウスのDA放出量に比べ優位に少なく、線条体シナプス末端でのDA放出障害が認められた。これらの解析結果よりVps35 D620Nノックインアレルはpartial loss of function アレルであり、本疾患は、VPS35遺伝子変異に加齢性変化などが加わり、黒質線条体DAシステムの変性が生じ発症するものと考えられる。

＜緒言＞

VPS35はVPS26、VPS29と共にレトロマー複合体を形成しエンドソームからトランスゴルジネットワークへの逆行性輸送にかかわる主要タンパク構成成分である。2011年以降VPS35遺伝子点変異に伴うパーキンソン病(PARK17)症例が欧米をはじめ本邦からも報告され、振戦、筋強剛、歩行障害など孤発性パーキンソン病に類似の症状を呈しLDOPAの投与により症状の改善が認められる。その発症原因についてはgain of functionあるいはloss of functionの観点から近年多くの報告がなされており、ミトコンドリアの機能異常やautophagyの異常などが疑われているが結論に至っていない。また内因性のVPS35 D620N変異を伴う哺乳動物実験モデルを用いた報告はこれまでになく、よりヒトに近い条件でその病態を解明するため我々はCRISPR/Cas9法を用いVps35D620N変異マウス及びNHEJ1塩基欠失(Del1)マウスを作成した。本論文ではVPS35 D620Nアレルはpartial-loss-of-functionアレルであり、また$Vps35^{D620N/D620N}$マウスの黒質、線条体の神経変性が明らかには認められないにも関わらず、線条体のシナプス末端からのDA放出が障害されていることを示した。

＜方法＞

CRISPR/Cas9法により*Vps35*の存在するexon15領域内でCAGTG から TTCGAへの5塩基置換を行いヘテロ接合Vps35D620Nマウスを作成した。さらにNHEJ を介したDel1マウスを作成した。各々を交配して得られたマウス（$Vps35^{D620N/D620N}$、$Vps35^{D620N/+}$、$Vps35^{D620N/Del1}$、$Vps35D620N^{Del1/+}$及び$Vps35^{WT}$）について遺伝子型解析を行った。各遺伝子型のマウスの体重測定を定期的に行い、運動機能評価として12週齢マウスに対しrotarod test 及び open field testを行い比較解析を行った。またVPS35D620N変異に伴うVPS35,VPS26やVPS29タンパク発現量、α-synucleinのタンパク発現異常の有無や、またその分解に関わるcathepsin D の発現量について20週齢マウスのホモジェネート脳を用いimmunoblot解析を行った。またVPS35D620NによるVPS26へのタンパク発現への影響を調べるためVPS35,VPS26抗体を用いて免疫沈降解析を行った。また同遺伝子異常に伴うautophagyの亢進の有無に関しそのマーカである抗LC3抗体を用い、またライソゾーム系タンパク（EEA1、GM130、LAMP1、Parkin）についてimmunoblot解析を行った。最近VPS35異常に伴うミトコンドリアの融合や離開異常を示唆する報告があり、ミトコンドリア関連タンパク（VDAC1、DRP1、MFN2、MUL1、Tom20）についてimmunoblot解析を行った。MFN2、MUL1、Tom20については各遺伝子型のマウス線条体からミトコンドリア分画を採取した。PARK17は孤発性パーキンソン病と同様、L-DOPAの補充が臨床上効果的であり、黒質線条体DA系の異常がその病態に反映されていると考えられ、20週齢マウスのホモジェネート線条体に含まれる DA及びその代謝物である3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA)の各濃度をhigh-performance liquid chromatography(HPLC)を用いて測定し、Dopamineの代謝回転率(DOPAC+HVA)/DAを求め各遺伝子型マウスの比較解析を行った。さらに*in vivo*でのDA放出機能について調べるため、20-28週齢の各遺伝子型マウス線条体にプローブを挿入し、*in vivo* microdialysisを行った。120mM KCl刺激を20分間行い、線条体における細胞外DA濃度を経時的に測定しrepeated measures ANOVA解析を行った。*In vivo* microdialysis 施行後、各マウス脳を摘出し10%ホルマリン固定、パラフィン包埋を施行後6□m

の厚さで薄切し、DA作動性ニューロンのマーカである抗Tyrosine hydroxylase (TH)抗体を用いて線条体及び黒質の免疫染色を行った。線条体のTH免疫染色陽性線維の濃度については吸光度測定を、黒質の同陽性細胞については細胞数カウントを行い各遺伝子型マウスの比較を行い、さらに抗リン酸化(ser129) α-synuclein抗体を用い異常α-synucleinの凝集やLewy小体の有無について病理学的検索を行った。

＜結果＞

CRISPR/Cas9法によって2種類のVps35D620Nノックインマウス及び５種類のNHEJマウスの作成に成功した。NHEJマウスについてはDel1マウスを実験に用いた。また交配で得られたマウスの3週齢時の遺伝子型解析の結果、VPS35$^{D620N/D620N}$、Vps35$^{D620N/+}$、Vps35$^{D620N/Del1}$、Vps35D620N$^{Del1/+}$及びVps35^{WT}マウスの生存を確認したがVps35$^{Del1/del1}$マウスは誕生せず同アレルは致死性を伴うと考えられた。胎生期9.5日におけるDel1/Del1胎仔は極めて異常な外観像を呈しており、同アレルは正常なマウスの発達に極めて重大な影響を及ぼしていることが推測された。Immunoblot解析ではVps35D620N$^{Del1/+}$マウスのVPS35発現量はVps35^{WT}マウスに比べ58%程度低下しており、Del1アレルはnullアレルであると考えられた。またVps35 D620N ノックインマウスはヘテロ、ホモ接合型ともに外観や体重は野生型と比べて著明な変化は認められなかった。またVps35$^{D620N/Del1}$マウスの生存によって、Vps35D620N ノックインアレルがDel1アレルの致死性からのrescueに成功したことを示したが生後３日におけるVps35$^{D620N/Del1}$マウスの生存数に比べ3週後の生存数は約30%減少した。したがってVps35 D620Nアレルは野生型が持つすべての機能は備えておらず、partial loss of functionアレルであると考えられた。また各遺伝子型マウスにおけるホモジェネート脳のimmunoblot解析ではVPS35や複合体を形成するVPS26、VPS29の発現量は野生型と比べ有意差は認められず、さらに免疫沈降解析の結果VPS35D620Nアレルは VPS26のタンパク発現には明らかな影響を及ぼしていないことが示された。またα-synucleinやcathepsin Dの発現量の異常やautophagyの亢進は認められず、ライソゾームやミトコンドリア関連タンパクについてもその発現量に有意差は認められなかった。さらに行動試験や、黒質のTH免疫染色陽性細胞数及び線条体の同陽性線維の濃度（吸光度）解析においても各遺伝子型マウス間で有意差は認められなかった。70週齢のマウスでも明らかな黒質や線条体の変化は認められず、少なくとも同齢まで明らかな神経変性は指摘できなかった。各遺伝子型のマウスホモジェネート線条体のDA、DOPAC、HVA濃度及びDA代謝回転率解析も同様に有意差は認められず、VPS35D620Nノックインアレルは DAの代謝に影響を与えていないと考えられた。興味深いことに線条体からの細胞外DA放出機能を調べるために行った*in vivo* microdialysis解析では、120mM KCl刺激に対する線条体の細胞外DA濃度の経時的変化では、VPS35 $^{D620N/D620N}$マウスにおけるDA放出量がVps35^{WT}マウスに対し有意に減少していることが示された。また細胞外へ放出されるDAの累積量を示すArea under the curve (AUC)も、VPS35$^{D620N/D620N}$マウスのAUCはVps35^{WT}マウスに比べて有意に小さいことが認められた。これらの結果はVps35$^{D620N/D620N}$マウスの線条体が明らかな神経変性を生じる以前より同部位のシナプス末端からのDA放出機能が障害されていることを示唆した。

＜考察＞

Vps35 D620Nアレルは致死性Del1アレルをrescue可能であったが、Vps35$^{D620N/Del1}$マウスが生後3日から3週までに生存数が減少してしまうことからVps35 D620Nアレルは野生型に備わる全ての機能が保持されているわけではなく、partial-loss-of-function アレルであると考えられる。その生存数減少の原因については、Del1/Del1胎仔が異常な外観像を示したことから同アレルがマウスの生存に不利な因子として作用し重大な発達障害を引き起こした可能性がある。VPS35D620Nノックインアレルが線条体における細胞外DA放出機能障害を生じる機序については不明であるが、最近ではVPS35のシナプス小胞のリサイクリングやトラッフィッキングへの関与について言及している報告があり、DAを運搬するシナプス小胞のリサイクリングやトラフィッキング異常の結果、DA放出機能障害が出現する可能性については有力な仮説となりうるが今後さらなる解析が必要である。また*in vivo* microdialysis解析においてヘテロ接合Vps35 D620Nノックインマウスの野生型に対する細胞外DA濃度に明らかな有意差は認められなかったことは、少なくとも28週齢マウスまでは野生型アレル単独でも成長に障害なく十分に機能していると考えられた。PARK17はヘテロ接合型であり、およそ40代以上の成人に発症する疾患であり、VPS35 D620N変異によるpartial-loss-of-functionに加え、加齢性変化等が黒質線条体DA系に影響を及ぼし、発症を促すのではないかと考えられる。

＜結論＞

本論文では、VPS35D620Nノックインアレルがpartial loss of functionによってPARK17の発症に関与していること、さらに同ノックインマウスの組織所見では明らかな神経変性が認められていないにも関わらず線条体からのドーパミン放出が障害されていることを示した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5131　号	石津　暢隆
論文審査担当者	主　査　田中　光一 副　査　石川　欽也、　赤澤　智宏	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、家族性パーキンソン病 PARK17 の原因である VSP35 の点変異(D620N)を持つマウスを CRISPR/Cas9 法を用いて作成し、そのマウスに線条体シナプス末端からのドーパミン放出の障害が見られたことを示した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

家族性パーキンソン病 PARK17 の原因として、VSP35 の点変異(D620N)が報告されている。VSP35 は、様々な蛋白質のリサイクリングを行うレトロマー蛋白質として知られているが、VSP35 D620N がどのような機序でパーキンソン病を起こすか不明な点が多い。このような背景の下、申請者は VSP35 D620N を再現したモデルマウスを作成し、VSP35 変異のパーキンソン病発症における役割を解析しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. VSP35 D620N ノックインアレルは partial loss of function により PARK17 の発症に関与する。
2. VSP35 D620N ノックインマウスは、明らかな神経変性は認められなかったが、線条体におけるドーパミン放出が障害されていた。

以上のように申請者は、VSP35 D620V は線条体の神経終末からのドーパミン放出障害により PARK17 の発症に関与していることを明らかにしている。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

モデルマウスの作成には、最新の CRISPR/Cas9 技術が用いられ、その解析には行動学的・組織学的・神経化学的・遺伝学的方法が使われている。これは、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことを示していると同時に。本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。全ての実験は、動物実験委員会や組換え DNA 実験委員会の承認のもとに行われている。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について VSP35 D620N ノックインアレルは partial loss of function アレルであり、本遺伝子変異に加齢性変化などが加わり、黒質線条体ドーパミンシステムの変性を生じ、PARK17 が発症するものと考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	澤田　麻紀
論文審査担当者	主査　角田　達彦 副査　根本　繁、立石　宇貴秀
論　文　題　目	Exome Sequencing Identified *CCER2* as a Novel Candidate Gene for Moyamoya Disease

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年、東アジアにおけるもやもや病（MMD）の疾患感受性遺伝子として *RNF213* 遺伝子が同定された。しかし、同遺伝子変異から MMD 発病に至る機序に関しては、未だに不明な点が多い。我々は先行研究で、日本人 MMD 患者の約 20%が *RNF213* 遺伝子変異を持たず、遺伝学的に多様な変異を持つことを明らかとした。そこで、*RNF213* 遺伝子以外にも新規候補遺伝子が存在するのではないかと考え、全エクソーム解析を行って網羅的に探索した。

まず、*RNF213* 遺伝子変異を持たない MMD 患者群のうち、全エクソーム解析の対象として 3 人の患者を有する家系 A と、形質不一致の一卵性双生児姉妹の家系 B を抽出した。家系 A において共通検出され、一般人口でのアレル頻度（MAF）0.01%未満のきわめて稀な変異は、12 遺伝子 12 変異であった。このうち、CADD の C スコアおよび PROVEAN によって予測された機能障害度も高く、家系 B でも変異が検出された遺伝子は *CCER2* 遺伝子（家系 A: p.T76_G80delinsPS、家系 B: p.E242K）だけであった。

CCER2 遺伝子変異によるタンパク二次構造変化を *in silico* で解析すると、タンパク凝集やオリゴマー形成が促進されると予測された。

次に、MMD 患者 135 例と正常群 199 例で *CCER2* 遺伝子のリシーケンスを行った。機能障害度の高い変異は、家系 A と同じ p.T76_G80delinsPS が 1 例、新たな p.H218_H220del 、p.E229del が各 1 例、いずれも患者群で同定された。

最後に、*CCER2* 遺伝子の組織発現量を RT-PCR で半定量すると、脳で特異的に発現していることが明らかとなった。

CCER2 遺伝子の機能は十分には解明されていないが、脳で特異的に発現する分泌タンパクであることから、MMD のバイオマーカーとなる可能性が示された。

＜緒言＞

もやもや病（MMD）は内頚動脈終末部に生じる進行性狭窄性疾患である。近年、東アジアにおけるもやもや病（MMD）の疾患感受性遺伝子として *RNF213* 遺伝子が同定された。しかし、*RNF213* 遺伝子変異から MMD 発病に至る機序に関しては、未だに不明な点が多い。我々は先行

研究で、日本人 MMD 患者の約 20%（103 人中 25 人）が *RNF213* 変異を持たず、遺伝学的に多様な機能的変異を持つことを明らかとした。そこで、*RNF213* 遺伝子以外にも新規候補遺伝子が存在するのではないかと考え、全エクソーム解析を行って網羅的に探索した。

＜方法＞

本研究は東京医科歯科大学と共同研究施設である東京女子医科大学の倫理委員会で承認され、研究参加者には書面で同意を得た。

（1）2 家系に対する全エクソーム解析

先行研究で *RNF213* 変異陰性であった 25 人のうち、特徴的な家族歴をもつ 2 家系をエクソーム解析の対象とした。家系 A は、兄弟、出血で死亡した母方大叔父の 3 人の患者を有する濃厚な家族歴をもつ。遺伝学的要因が強く疑われ、*RNF213* 遺伝子以外の候補遺伝子が関与している可能性が考えられた。患者兄弟と非患者の母親、未検査の父親と母方祖母の計 5 人から gDNA を得た。家系 B は一卵性双生児の姉妹で、姉は小児 MMD 患者だが、妹は非患者である。姉妹で異なる *de novo* 変異を検出できれば、疾患との関連が示唆されると考えて、この姉妹からも gDNA を得た。

全エクソーム解析は Illumina 社 HiSeq2000 を用いて行った。ゲノム標準配列は NCBI Build 37/hg19 に則り、非同義置換、スプライス部位変異、挿入/欠失を検出した。これら変異の一般人口におけるアレル頻度（MAF）は、4 つの公共データベース（1000G, EVS, HGVD, ExAC）の最大値を採用した。

（2）機能解析

検出された変異や遺伝子に対しては、*in silico* による機能解析を行った。CADD の C スコアと PROVEAN を用いた変異の機能障害度予測、Chou-Fasman と Garnier-Osguthorpe-Robson を用いたタンパク二次構造予測、AGGRESCAN を用いたタンパク凝集ホットスポット予測などを行った。さらに、コイルドコイルドメインの局在やオリゴマー形成確率は MultiCoil program で予測した。

（3）候補遺伝子のリシーケンス

これらの解析で同定された機能的遺伝子変異に関しては、MMD 患者 135 例と非患者 199 例でリシーケンスを行い、両群間で変異検出率の差を Fisher' exact test および multiple logistic regression を用いて検定した。

（4）候補遺伝子の発現解析

候補遺伝子の組織ごとの mRNA 発現量は、ヒト胎児組織パネルを用いた RT-PCR を行い、ヒトハウスキーピング ACTB 遺伝子をリファランスとして相対定量した。

＜結果＞

（1）2 家系に対する全エクソーム解析

エクソーム解析により 7 サンプルで各 11187～11557 個の変異が検出された。

はじめに、家系 A において変異の絞り込みを行った。まず、MMD の有病率が 0.06%と希少で、浸透率も 0.5%未満と極めて低いことに基づいて、患者兄弟に加えて母親と祖母も疾患遺伝子の保

因者であり、父親は非保因者であると仮定した。この仮定の下、非保因者が持たず、保因者 4 人が共通して持つ変異を探索し、さらにアレル頻度 0.0.1%未満の一般人口で稀な変異に絞り、ゲノム重複箇所の変異は除いた。結果、12 遺伝子（12 変異）が候補遺伝子として同定された。このうち機能障害度の大きかった変異は、*CCER2* 遺伝子 p.T76_G80delinsPS 変異と *PER1* 遺伝子 p.H422Q 変異であった。

家系 B においては、一卵性双生児の姉妹間で異なる *de novo* 変異は検出されなかった。*PER1* 遺伝子変異は検出しなかったが、*CCER2* 遺伝子内の p.E242K 変異を検出した。

一方で、双方の家系に *CCER2* 変異キャリアの非患者が存在し、*RNF213* 遺伝子と同様に浸透率の低さも示された。

（２）機能解析

CCER2 遺伝子がコードするタンパク、coiled-coil glutamate-rich protein 2 は、266 のアミノ酸から成り、N 末端に分泌シグナルペプチドと C 末端にコイルドコイルドメインを持つ分泌タンパクである。p.T76_G80delinsPS 変異は機能的ドメインやモチーフとは無関係の場所に存在していたが、タンパク二次構造変化を起こし、タンパク凝集ホットスポットを誘導すると予測された。一方、p.E242K 変異はコイルドコイルドメイン内に存在し、コイルドコイルドメインのオリゴマー形成確率が高くなると予測された。

（３）候補遺伝子のリシーケンス

次に、MMD 患者 135 例（*RNF213* 変異陽性 102 例、陰性 33 例）と正常群 199 例で *CCER2* 遺伝子のリシーケンスを行った。その結果、前述のエクソーム解析で検出した 2 変異も含めて合計 12 変異を *CCER2* 遺伝子内に検出した。このうち、CADD と PROVEN で deleterious と判定された 4 変異（p.T76_G80delinsPS、p.H218_H220del、p.E229del、p.E242K）は、いずれも正常 199 例では検出されず、MAF1%以下のレアバリアントであった。機能障害をもつレアバリアントは、正常 199 例と患者 137 例（全エクソーム 2 例、リシーケンス 135 例）の間で有意差をもって患者群で多く検出された（*P=0.011*）。

EAS panel を用いて東アジア人の 504 サンプルで CCER2 変異を調べると、機能障害をもつレアバリアントを 3 例で検出したが、自施設患者群（137 例中 5 例）と比較すると有意に少ない検出頻度であった（*P=0.013*）。

（４）候補遺伝子の発現解析

最後に、*CCER2* の転写産物 mRNA の組織ごとの発現量を調べた。Gene-Tissue Expression portal によると、*CCER2* は中枢神経系で特異的に発現し、発現量は 1.278～3.379RPKM とされる。この発現様式と発現量は、自閉症に関係するとされる CSMD1 と同等であった。ヒト胎児組織を用いた半定量 RT-PCR によっても、脳組織に特異的な発現パターンが確認できた。

＜考察＞

これまでの遺伝学的研究では、*RNF213* 遺伝子が MMD や頭蓋内主幹動脈狭窄性疾患と有意に相関することが明らかとなった。遺伝子組み換え動物を用いた研究では、*RNF213* 遺伝子をノックダウンさせたゼブラフィッシュで血管発生への作用が示されたが、一方で *RNF213* 変異ノックインマウスおよび *RNF213* ノックアウトマウスいずれも血管異常は発現せず、MMD 発病の因子

は複数あることが示された。

今回の研究では、*RNF213* 変異のない 2 家系に着眼し、全エクソームシーケンスを行った。2 家系に共通して *CCER2* 遺伝子変異を検出し、これら変異はオリゴマー形成やタンパク凝集を誘導すると *in silico* 解析により予測された。

CCER2 遺伝子がコードする coiled-coil glutamate-rich protein 2 の分子学的機能に関しては、これまでに報告がない。しかし、*CCER2* は中枢神経系で特異的に発現し、Gene-Tissue Expression によれば発現量は 1.278～3.379RPKM である。この発現量は、MMD 患者の脳脊髄液における血管新生バイオマーカーとして報告された *HGF* や *FGF2* よりも高い。ゆえに、*CCER2* が脳組織に発現する分泌タンパクとして、新たなバイオマーカー候補になりうると考えた。

本研究の limitation は、家系 A で亡くなった患者の遺伝子型を確定できなかった点が挙げられる。また、非コーディング領域、構造変異、低頻度多型（MAF1-5%）も検討から外れている。

RNF213 遺伝子の創始者変異 p.R4810K は、疾患との関連は非常に高い一方で、C スコアは 6.746 で、PROVEAN では neutral と判定され、機能障害度は低い。発病に至るには *RNF213* 以外の要因が必要であることが示唆される。それゆえ、*RNF213* 変異に限った遺伝子検査では不十分であり、対象を広げる必要がある。さらに解析家系を増やし、タンパク同士の相互関与や伝達回路に関する研究を行うことが次の課題となる。

＜結論＞

本研究により、*CCER2* が新たな MMD 候補遺伝子として同定された。*CCER2* は脳組織に特異的に発現する分泌タンパクであるが、まだ生化学的機能に不明な点は多く、*CCER2* 変異がどのように MMD を発現するのか、更なる研究が必要である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5132　号	澤田　麻紀
論文審査担当者	主　査　角田　達彦 副　査　根本　繁、立石　宇貴秀	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本研究は、もやもや病（MMD）の感受性遺伝子の探索を目的とする。これまで、*RNF213* 遺伝子が同定されているが、日本人患者では *RNF213* 遺伝子変異を持たない症例も約 20%存在していた。そこで申請者らは本研究で、申請者らの先行研究ですでに *RNF213* 変異陰性であった 25 人の MMD 患者のうち、特徴的な家族歴をもつ 2 家系に対し、全エクソーム解析を行った。その結果、患者らと保因者らに共通し、インシリコの機能解析によって機能障害度が大きいと推定された変異は、*CCER2* 遺伝子内のみ、両家系で共通に認められた。同遺伝子の変異は、インシリコの解析で、タンパク質凝集やオリゴマー形成を促進すると予測された。さらに申請者らは、MMD 患者 135 症例と正常者 199 例とで、*CCER2* 遺伝子のリシークエンスを行った。その結果、同じ変異を別症例にも認め、また、機能障害性の高い新たな変異を同定した。これらとともに、同遺伝子の組織発現量を実験で定量し、脳で特異的に発現していることを確認できたことから、同遺伝子は MMD のバイオマーカーになる可能性を示すに至った。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

MMD の感受性遺伝子は、*RNF213* 遺伝子が既報告であるが、本研究では、日本人患者で *RNF213* 遺伝子変異を持たない症例も約 20%存在していたことに着目し、新たな感受性遺伝子を、家系の全エクソーム解析やインシリコ解析、発現解析を駆使して探索することを目的としており、先駆的、独創的である。

２）社会的意義

本研究では、内頚動脈終末部に生じる進行性脳血管閉塞症である MMD の新たな感受性遺伝子の有力な候補を示しており、同遺伝子が MMD のバイオマーカーとなること、また MMD の発症機序や治療などの糸口となる可能性が高く、社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

申請者らは、申請者らの先行研究ですでに *RNF213* 変異陰性であった 25 人の MMD 患者のうち、特徴的な家族歴をもつ 2 家系に対し、全エクソーム解析を行った。患者らと保因者らに共通し、インシリコの機能解析によって機能障害度が大きいと推定された変異が両家系に存在した遺

伝子 *CCER2* に絞り込み、同遺伝子の変異の影響を、タンパク質二次構造変化のインシリコ解析で予測した。さらに、患者 135 症例と正常者 199 例とで、*CCER2* 遺伝子のリシークエンスを行い、新たな変異を同定するとともに、CMC 法による変異集積の解析を行った。また同遺伝子の各組織の発現量を実験で定量した。倫理面では、ヒトの遺伝子を対象とした研究として倫理委員会承認のもと、適切な手続きが行われた。

4）考察・今後の発展性

本研究は、MMD の特徴的な家系を用いた全エクソーム解析をもとにインシリコ予測解析を加え、共通した候補遺伝子の絞り込みによる感受性遺伝子候補 *CCER2* の同定、変異の機能的意味のインシリコ解析、また新たな患者群と正常群とでのリシークエンスと変異集積解析、そして組織特異的発現の解析を行っていることから、戦略的に研究を進めてきたことがうかがえる。今後は、動物や細胞を用いた同遺伝子の変異の機能解析やパスウェイ解析などを通じて、MMD を発症するメカニズムや、治療応用などにつながる研究へと発展することが期待される。

３．その他

主論文に加えて、追加のレポートにおいても、本研究に用いた方法の詳細について十分な議論を行うことができた。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	廣田　晋
論文審査担当者	主査　泰羅　雅登 副査　松島　英介、大友　康裕
論　文　題　目	Correlations between Cognitive Impairments and Employment Status in Patients with Diffuse Axonal Injury

（論文内容の要旨）

【要旨】

びまん性軸索損傷（DAI）患者では後遺した認知機能障害のために失職することがある。本論文では、受傷後早期（3 ヶ月以内）と後期（2 年以内）おいて神経心理検査を施行し、検査結果と復職予後との相関を検討した。

運動・視機能障害を負っていない DAI 症例 56 例について、神経心理検査の Wechsler Adult Intelligent Scale - Revised (WAIS-R)、Wechsler Memory Scale - Revised (WMS-R)、Trail Making Test (TMT)、Wisconsin Card Sorting Test (WCST)、Word Fluency Test (WFT)の結果を検討した。全神経心理検査値は早期から後期にかけて有意に改善し、TMT 以外は正常域（Z-score が-2 以上）にまで改善した。患者因子（年齢、性別）や外傷重症度（受診時 GCS、外傷後健忘の持続時間）は予後に相関しなかったが、早期・後期両方の TMT part B の結果が、復職に有意に関与した(p=0.01, 0.04)。

TMT は注意機能検査であり、DAI 患者の失職が注意機能障害に起因しているといえる。また DAI 患者において、早期・後期の TMT part B の結果が慢性期機能障害を予見できる可能性も示唆された。

【緒言】

DAI とは、頭部外傷に起因する広範な軸索損傷のことで、脳実質での多病巣での軸索損傷と病理学的に定義される。神経連絡障害による認知機能障害を呈し、典型例では局所性脳損傷がなくても昏睡状態を呈する。外傷性脳損傷での入院症例の 40-50%を占めるとされる一般的な病態である。認知行動障害が後遺し、個人的・社会的に大きな損失となる。

神経心理検査は、リハビリテーション介入前後での認知機能評価のために多用されており、これまでも復職との関係が検討されてきた。しかし適切な検査方法の組み合わせや検査時期は確立されていない。また被検者の構成も報告により様々で、DAI か局所性脳損傷かは明示されてなく、重症例の割合や、認知機能障害以外の運動障害や視機能障害、心理的障害などの程度なども様々である。

本研究ではこれらを限定して観察を行い、DAI における認知機能障害の自然歴と予後因子を検

討した。

【方法】

＜被検者＞

武蔵野赤十字病院に 1990 年から 2012 年に入院され、MRI（FLAIR、DWI、T2*）で大脳白質・脳梁・脳幹病変を検知できた DAI 症例について検討した。(1)16 歳から 75 歳で、(2)大きな局所損傷がなく保存的治療が選択され、(3)受傷時点で就業・就学しており、(4)2 年以上追跡でき、(5)神経心理検査を施行でき、(6)運動障害がなく、(7)視機能障害がなく、(8)神経障害・精神疾患・アルコール中毒症の既往がないもの、56 人を検討した。外傷後健忘（PTA）の持続時間は 24 時間以上と以下とに分けて検討した。受傷 2 年後の時点で 34 人（61%）が復職していた。(**Table1**)

＜神経心理検査＞

受傷後 3 ヶ月以内（平均 1.8±1.4 ヶ月）の早期と、2 年以内（平均 18.4±6.5 ヶ月）の後期とで、神経心理検査を施行した。

WAIS-R：成人向け知能検査で、言語性知能指数（VIQ)、動作性知能指数（PIQ)、全検査知能指数（FIQ）を算出して検討した。

WMS-R：成人向け記憶検査で、論理的記憶（Logical Memory）と視覚性再生（Visual Reproduction）の、それぞれの I（即時再生）と II（遅延再生)、合計 4 つの下位検査について検討した。

WCST：前頭葉機能検査の 1 つで概念の転換障害を反映する。CA（categories achieved）について検討した。

TMT：前頭葉機能検査の 1 つで注意障害を反映し、part A と part B からなる。

WFT：前頭葉機能検査の 1 つで流暢性を反映する。動物名想起について検討した。

WAIS-R と WMS-R は年齢標準化がなされている。また WCST、TMT、WFT については年齢層毎の健常者平均値、標準偏差がこれまで報告されている。これらを用いて、各症例の Z-score[Z = (検査粗点–健常者平均値) / 標準偏差]を算出して、検査間の比較検討をした。Z-score が-2 以下を異常低値と判断した。

＜統計解析＞

検査値の時系列変化は paired t-test で解析した。単変量・多変量ロジスティック回帰分析によって、予後予測因子である患者因子（年齢、性別)、外傷重症度（初診時 GCS、PTA 持続時間)、神経心理検査値と、復職予後との相関を検討した。

【結果】

＜DAI における神経心理検査値の時系列変化について＞

全ての神経心理検査値は有意に改善した（$p<0.001$, **Table2**)。後期においては TMT part A、part B を除いた全てで正常域（Z-score が-2 以上）に改善していた（**Figure1**)。

＜患者因子、外傷重症度と復職予後について＞

患者因子（年齢、性別）や外傷重症度（初診時 GCS、PTA 持続時間）と、復職予後との間に有意な相関はなかった（**Table3**)。

＜受傷後早期の、神経心理検査値と復職予後について＞

早期においてはTMT part Bのみが復職予後と相関した（p=0.01）。他の神経心理検査値は復職予後との間に有意な相関をみなかった（**Table4**）。

＜受傷後後期の、神経心理検査値と復職予後について＞

後期においてもTMT part Bのみが復職予後と相関した（p=0.04）。他の神経心理検査値は復職予後との間に有意な相関をみなかった（**Table5**）。

【考察】

これまでの報告では、年齢、初診時 GCS、PTA 持続時間、PIQ、Functional Independence Measure（FIM）、心理状態、注意機能などが予後予測因子としてあげられているが確立されたものはない。

過去の報告では、DAI や脳挫傷、急性硬膜下血腫、急性硬膜外血腫などが区別されずに含まれている。これらはおそらく違う病態、自然歴、予後を呈すると思われ、これらの混在が予後予測を困難にしていると考えられる。本研究では、DAI のうち、さらに運動障害や視機能障害のないものに症例を限定した。Grauwmeijer らは GOS(Glasgow Outcome Scale)、Barthel Index、FIM、Functional Assessment Measure が予後と相関すると報告したが、これらの要素は強く運動機能に影響される。認知機能に焦点を絞るならば、運動機能障害、視覚機能障害をおった症例は除外しなければならない。

今回の結果では、早期から後期にかけて全ての神経心理検査値が有意に改善した。認知機能障害が改善していくことはアルツハイマー病や脳血管性認知症などと違い、脳外傷による認知機能障害に特徴である。TMT 以外の神経心理検査値は正常範囲にまで改善した。

復職予後と外傷重症度（初診時 GCS や PTA 持続時間）との関係については否定的な報告が多く、本研究結果も同様であった。Brown らは PTA 持続時間が、FIM や 1 年後の復職予後を予見すると報告している。Nakase らは PTA の持続時間が、14 日間以下の群では 1 年後予後が良好で（68%が復職）、28 日以上の群では不良である（18%が復職）と報告しているが、この 2 つの研究では本研究とくらべ初診時 GCS が不良である。少なくとも軽症・中等症 DAI 症例においては、患者背景や初期の意識障害が慢性期の機能予後を反映しないといえる。

本研究結果からは TMT part B は復職予後の予見因子と考えられる。TMT は 25 個の点をできるだけ早く正確に線でつなぐ検査である。Part A は番号の順(1, 2, 3, etc.)に点をつなぎ、part B は文字と番号が交互になるように順につなぐ(1, A, 2, B, etc.)。Part B のほうがより複雑で、障害を検知する感度が高いと考えられる。Finnanger らは遂行機能障害と注意障害が、自立や復職に影響すると報告している。Williams らは我々と同様に、TMT part A と part B が予見因子として有用だと報告している。

Ryu らと Kai らは、記憶機能が復職に影響すると報告しているが、我々の研究では WMS-R の値は正常域にまで改善し復職と相関しなかった。外傷の重症度や病態が混在することが、この違いを生んだのかもしれない。Kai らは知能についても検討し、FIQ が復職予見因子であるとも報告しているが、他の多くの報告では、知能と復職の関連はないとされている。

神経心理検査をいつ行うことが適切かも問題である。過去の報告では、受傷後早期での認知機

能と社会的予後との関係は強くないとされている。慢性期の神経心理検査についても相関がないという報告もある。本研究では早期でも後期でも TMT part B が低値で復職予後と相関した。同一症例に複数回の神経心理検査を行っている報告は少なく、今回の結果が一般化できるかは不明である。

復職予後は、神経症状以外にも、多数の因子（受傷前の雇用状態、人口統計学的因子、周囲や家族のサポートなど）に影響される予測困難な因子である。鬱や不安などの精神症状も慢性期には多く、Werner らは失業の危険因子であると報告している。本研究では、これらについては検討していない。

本研究では DAI における認知機能障害と社会的予後の関係に注目し、比較的均一な群を対象とした。DAI 患者が失職する主な原因は注意障害であった。局所性脳損傷の影響や、認知機能障害以外の障害は考慮しておらず、また後ろ向き研究である。さらなる前向き研究が必要である。

【結論】

DAI 症例での神経心理検査値と復職予後について検討した。神経心理検査値は全て時間経過とともに有意に改善したが、TMT の結果は不良なままであった。受傷後早期・後期の TMT part B の結果が復職予後と相関した。本研究対象においては、DAI 症例の復職は注意障害の程度に強く依存しており、TMT part B は復職の優れた予測因子であった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5133　号	廣田　晋
論文審査担当者	主　査　泰羅　雅登 副　査　松島　英介、大友 康裕	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、認知機能障害のために失職することがあるびまん性軸索損傷（DAI）患者について、受傷後早期（3 ヶ月以内）と後期（2 年以内）での神経心理検査結果と復職予後との相関を検討した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

DAI とは、頭部外傷に起因する脳実質での多病巣での軸索損傷と病理学的に定義される。外傷性脳損傷での入院症例の 40-50%を占めるとされるが、神経連絡障害による認知機能障害による復職困難なケースが多くみられ、個人的・社会的に大きな損失となる。

復職予後の予測のために、リハビリテーション介入前後での神経心理検査による認知機能評価が行われてきたが、適切な検査方法の組み合わせや検査時期は確立されていない。またこれまでの研究は、DAI 以外の症例や重症例が含まれる、運動障害、視機能障害や心理的障害などの程度が様々など、被験者の統制が不十分であった。

本研究は過去の研究のこれらの不備をふまえ、被験者を十分に統制したうえで DAI における認知機能障害の自然歴と予後因子を検討しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究によって以下の結果が得られた。

１．全ての神経心理検査値は有意に改善し、後期においては TMT part A、part B を除いた全てで正常域に改善していた。

２．患者因子（年齢、性別）や外傷重症度（初診時 GCS、PTA 持続時間）と、復職予後との間に有意な相関はなかった。

３．早期においては TMT part B のみが復職予後と相関した。

４．後期においても TMT part B のみが復職予後と相関した。

以上のように、TMT part B の早期・後期の結果が復職率に有意に関与し、復職予後を予見できる可能性を明らかにしている。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では、被検者を厳密に統制し、MRI で大脳白質・脳梁・脳幹病変を検知できた DAI 症例のうち、(1)16 歳から 75 歳で、(2)大きな局所損傷がなく保存的治療が選択され、(3)受傷時点で就業・就学しており、(4)2 年以上追跡でき、(5)神経心理検査を施行でき、(6)運動障害がなく、(7)

視機能障害がなく、(8)神経障害・精神疾患・アルコール中毒症の既往がないもの、56 人を選び、外傷後健忘（PTA）の持続時間を 24 時間以上と以下とに分けて検討している。

神経心理検査は、受傷後 3 ヶ月以内の早期と、2 年以内の後期とで施行し、（1）成人向け知能検査として WAIS-R : 言語性知能指数（VIQ）、動作性知能指数（PIQ）、全検査知能指数（FIQ）、（2）成人向け記憶検査として WMS-R : 論理的記憶と視覚性再生の即時再生と遅延再生、（3）前頭葉機能の概念の転換障害を反映する WCST、(4) 前頭葉機能の注意障害を反映する TMTpart A と part B、（5）前頭葉機能の流暢性を反映する WFT ついて、これまで報告されている年齢標準化データ、年齢層毎の健常者平均値、標準偏差データを用いて、各症例の Z-score を算出しの比較検討し、さらに、検査値の時系列変化、および単変量・多変量ロジスティック回帰分析によって、予後予測因子である患者因子（年齢、性別）、外傷重症度（初診時 GCS、PTA 持続時間）、神経心理検査値と、復職予後との相関を検討している。

以上のように、本研究は十分な脳神経学的知識、認知心理学的知識、統計学的知識の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

<u>４）考察・今後の発展性</u>

申請者は、脳外傷による認知機能障害は改善していくことに特徴があり TMT 以外の神経心理検査値は正常範囲にまで改善したことから被験者として DAI 患者の選定が適切であったこと、復職予後と外傷重症度（初診時 GCS や PTA 持続時間）との間には過去の研究同様、関係が見られないこと、前頭葉機能の注意障害を反映する TMT part B が復職予後の予見因子と考えられること、また、これは DAI 症例の復職は注意障害の程度に強く依存している可能性について考察している。

これは極めて妥当な考察であり、今後の症例観察を増やすことでさらに発展することが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Sujata SAKHA
論文審査担当者	主査　田中　真二 副査　石川　俊平、渡部　徹郎
論　文　題　目	Exosomal microRNA *miR-1246* induces cell motility and invasion through the regulation of *DENND2D* in oral squamous cell carcinoma

（論文内容の要旨）

SUMMARY

Metastasis is associated with poor prognosis in cancers. The exosomes which are packed with RNA and proteins and released in all biological fluids are emerging as an important mediator of intercellular communication. However, the function of exosomes remains poorly understood in cancer metastasis. Here, we demonstrated that exosomes isolated from highly metastatic human oral cancer cell line, HOC313-LM, by size exclusion chromatography, induced cell growth through the activation of ERK and AKT as well as cell motility of low metastatic cancer cells, HOC313-P. MicroRNA (miRNA) array analysis identified two oncogenic miRNAs, *miR-342-3p* and *miR-1246*, highly expressed in exosomes. These miRNAs were transferred to low metastatic cells by exosomes, resulting in increased cell motility and invasive ability. Moreover, *miR-1246* increased cell motility by directly targeting DENN/MADD Domain Containing 2D (*DENND2D*). Taken together, these findings signify the metastatic role of exosomes and exosomal miRNAs, underlining their application in miRNA-based therapeutics.

INTRODUCTION

Oral cancer is a subtype of head and neck cancer (HNC) which is the sixth most common cancer diagnosed worldwide and over 145,000 deaths occurred in 2012 mainly because of metastasis. The molecular pathogenesis behind oral cancer metastasis is still unclear and recently studying the role of extracellular vesicles called exosomes has shown promise.

Exosomes are 30-100nm diameter vesicles of endosomal origin that are secreted in all biological fluids including blood, urine as well as *in vitro* cell culture medium. They play biological and pathological role in intercellular communication through their cargo molecules of protein and RNA including miRNA. Increasingly direct evidence links miRNAs to cancer development and progression but the mechanism is still not clearly understood.

Since we have previously established highly metastatic oral cancer subline HOC313-LM

from HOC313 parent cell line (HOC313-P), we used these cell lines for revealing the function of exosome. We demonstrated that exosomes derived from highly metastatic HOC313-LM are one of the potential factors promoting cell growth and also migration and invasion of HOC313-P cells through its vesicular cargo, miRNAs, thereby increasing malignant potential of the cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Human oral cancer cell line, HOC313 from (Tokyo Medical and Dental University Hospital) and highly metastatic HOC313-LM from HOC313 established previously by our laboratory were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). Exosome were isolated by size exclusion chromatography using Sepharose beads. PKH26 (MINI26-1KT) was used for fluorescent labelling of exosomes. Functional assays were carried out by Water-soluble tetrazolium salt (WST-8) assay for growth and transwell migration and invasion assays. Western blotting and qRT-PCR were performed to analyse protein and RNA respectively.

Cellular and exosomal RNA were profiled for miRNA expression using Human miRNA V3 microarray, 8×15K miRNA microarray system. Analysis of gene expression profiles was performed using SurePrint G3 Gene Expression Microarrays. For luciferase assay, luciferase reporter plasmids were made using pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector. Loss and gain of function was screened by using siRNAs and miRNA mimic respectively. For statistical analysis, differences between subgroups were tested with the student *t*-test and were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

To investigate the significance of metastatic function of HOC313-LM cells through exosomes, we isolated exosomes from culture media of HOC313-LM cells by the method of size exclusion chromatography. Exosomes were characterized by western blotting by detection of exosomal marker proteins CD9, CD63 and CD81. Also, by labelling LM-exosomes with PKH26, we were able to visualize their uptake by HOC313-P cells.

Furthermore, functional assay of LM-exosomes was performed. *In vitro* cell growth assay for 7 consecutive days showed that HOC313-P cells on exosomes treatment proliferated rapidly compared to control group with concurrent activation of ERK and AKT. Also, the number of migrated and invaded cells increased when treated with LM-exosomes. Collectively, these data implicated that LM-exosomes can function in promoting cell growth, migration and invasion ability of HOC313-P cells.

By performing and analyzing miRNA microarray of total RNA of HOC313-P and -LM and their respective exosomal RNA, we found a set of 11 miRNAs commonly upregulated in HOC313-LM both at cellular and exosomal level. Seven miRNAs, *miR-17, -30a-3p, -30a-5p,*

-92a, 181a, -342-3p and *-1246*, were further selected based on several reports as oncogenic miRNAs (oncomiR) where two miRNAs, *miR-342-3p* and *-1246* were functionally validated. To address whether exosomes mediate transfer of miRNAs, we directly incubated HOC313-P cells with LM-exosomes. After 72 hours of treatment with LM-exosomes, we found that the levels of *miR-342-3p* and *-1246* in HOC313-P cells were elevated. In addition, transwells cell culture showed the expressions of *miR-342* and *-1246* increased when HOC313-LM cells were placed in the upper chamber compared to the HOC313-P cells being placed in the upper chamber. Transient overexpression of *miR-342-3p* or *-1246* into HOC313-P cells showed no significant change in cell growth but enhanced migration and invasion ability in HOC313-P cells.

Furthermore, we performed gene expression array analysis on HOC313-LM cells and HOC313-P cells transfected with *miR-NC*, *-342-3p* or *-1246* to explore the downregulated genes. The array data showed that gene expression pattern of *miR-1246* transfection resembled closer to that of HOC313-LM cell. On basis of previous reports as tumor suppressor and their inclusion in TargetScan (www.targetscan.org) as predicted target genes of *miR-1246,* we found that DENN/MADD Domain Containing 2D (*DENND2D*) was directly targeted by *miR-1246*. It was evident by luciferase reporter assay and also by western blotting. When we suppressed *DENND2D* in HOC313-P cells, the cell growth was not affected but resulted in increase in cell motility and invasion. Collectively, these results indicated that *DENND2D* is regulated by targeting gene of *miR-1246* and which when suppressed, promotes migration and invasion of the HOC313-P cells.

DISCUSSION

Recently, many studies have focused on determinants of exosomes in intercellular communication. In the present study, we proved the interaction between cancer cells by identifying functional oncogenic miRNAs, *miR-342-3p* and *miR-1246*, delivered from highly metastatic oral cancer cells, HOC313-LM, to low metastatic cells, HOC313-P, through exosomes.

Despite progress in exosome research, there is yet no standard methods of exosome isolation. Ultracentrifugation, commercial based kit and size exclusion chromatography are common methods. Here, we chose the size exclusion chromatography method because this method yielded larger amount of exosome RNA and retained the biophysical properties of exosomes compared to other methods.

The miRNA microarray analysis of exosomal and cellular RNA showed that secretion of miRNAs in exosomes were selective and not paralleled to their abundance in cell of origin suggesting the existence of selective RNA sorting mechanism. MicroRNAs taken up by HOC313-P cells showed no difference between direct treatment of LM-exosome and indirect transwell co-culture. This observation suggests the potency of exosomal delivery and its

uptake at both local site and distant site to propagate metastatic potential. Although migration and invasion abilities of HOC313-P cells were promoted by overexpression of *miR-342-3p* and *-1246*, cell growth was not affected. Thus, we propose that cell proliferation activity of exosomes might be governed by some unknown mechanisms other than miRNAs like cytokines or other exosomal determinants that are yet to be explored in detail.

Importantly, *DENND2D* was identified as direct target of *miR-1246*. It is known that *DENND2D* is a tumor suppressor gene but only reported to be downregulated by hypermethylation mechanism in gastric and hepatic cancers. Nevertheless, our results showed for the first time that *DENND2D* was directly targeted by *miR-1246* and thus its downregulation was mediated by miRNAs. Hence, downregulation of *DENND2D* by *miR-1246* may suggest the acquisition of migratory and invasive abilities of low metastatic cancer cells in various types of cancer.

CONCLUSION: Overall our study demonstrates an important role of exosomes from cancer cells and exosomal miRNAs in cancer progression. In addition to the important cellular functions, these exosomal miRNAs secreted might be potential therapeutic targets for cancer treatment and diagnostic biomarkers.

要旨

がん転移は、がん悪性化の要因の一つであり、複雑かつ多段階のステップによって成立する現象である。近年、細胞から分泌される小胞（エクソソーム)が、がん転移に重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで我々は、当教室で独自に樹立した高転移性を獲得した口腔扁平上皮がん細胞株（HOC313-LM)由来のエクソソームを解析することにより、がん転移とエクソソームの関係を明らかにすることを試みた。まず、我々は培養上清中のエクソソームをカラムクロマトグラフィーを用いて単離し、機能検証を行った。LM 由来エクソソームをその親株(HOC313-P)に添加することにより、細胞増殖ならびに移動・浸潤能が上昇すること確認した。また、エクソソーム中のマイクロ RNA（miRNA)を解析するため、miRNA 発現アレイを施行した。その結果、*miR-342-3p*、*-1246* の２つの miRNA がエクソソーム内に豊富に存在していることがわかり、それら miRNA を過剰発現させることにより、細胞の移動・浸潤能が亢進した。さらに、*miR-1246* の過剰発現では遺伝子の発現プロファイルが高転移性のものと類似したため、*miR-1246* の標的探索を行った。標的予測データベースの結果を基に、*miR-1246* の直接の標的として DENND2D を同定し、その発現抑制は、細胞の移動・浸潤を亢進させることを明らかにした。これらのデータは、エクソソーム内 miRNA の機能解析が核酸治療法の開発に寄与する可能性を示唆するものである。

最終試験の結果の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5134　号	Sujata Sakha
論文審査担当者	主　査　田中　真二 副　査　石川　俊平、渡部　徹郎 公開審査　：　平成２８年１２月６日	

（最終試験の結果の要旨）

副　査　　石川　俊平

本論文の主な研究成果は、がん細胞から分泌される小胞（エクソソーム）が、がん転移に重要な役割を持つことを示したことである。独自に樹立した高転移性口腔扁平上皮がん細胞亜株由来のエクソソームを単離し、網羅的発現解析と機能的解析によって細胞の移動・浸潤能に重要なマイクロ RNA である *miR-342-3p*、*-1246* を同定し、さらに *miR-1246* に関しては下流の DENND2D を移動・浸潤関連遺伝子として同定したことはエクソソームのバイオロジーや核酸治療法の開発に資する研究として有用な成果であると言える。また申請者は研究の背景と目的、実験方法、結果の解釈、本研究の意義や今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の研究能力とその基礎となる学識に基づき実践されたものだということが確認された。

試問ではマイクロ RNA や下流遺伝子の選択の基準、エクソソーム単離の手法の確認、発現解析の手法等に関する質問をして、各々について一定レベルの回答を得た。

したがって申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判断した。

副　査　　渡部　徹郎

本論文の主な研究成果は、口腔扁平上皮がん細胞株 (HOC313)から樹立した高転移性亜株(HOC313-LM)から分泌されるエクソソームを回収し、エクソソームおよび内包されているmiRNAの働きを解析し、エクソソームを介したがん転移のメカニズムを明らかにしたことであり、これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。また申請者は自身の言葉で研究の背景と目的、実験方法、結果の解釈、本研究の意義や今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の高度な研究能力とその基礎となる豊かな学識に基づき実践されたものだということが確認された。

試問では、今回高転移性亜株から分泌されるエクソソームに内包されているmiR-1246の発現がどのような機序で制御されているか、またmiR-1246や、その直接の標的であるDENND2Dの発現が臨床検体において変動しているか等の質問をし、的確な回答を得た。

したがって申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判断した。

主　査　　田中　真二

最終試験は英語セミナー形式で行われ、申請者のプレゼンテーションの後、本研究に関する背景と目的、実験方法、結果の解釈、本研究の意義や今後の課題などに関する質疑として、エクソソームの単離法、口腔がん細胞株における microRNA 発現機序、エキソソーム microRNA の伝搬機序、microRNA や標的遺伝子選択の理論的根拠、エキソソーム microRNA の生体内転移における機能的意義、バイオマーカーとしての臨床的意義、今後の課題等について質問した。

申請者の回答は、いずれも十分な論理的な思考に裏打ちされた適切なものであり、自立した研究者としての見識を示した。副査の石川教授、渡部教授と協議の上、申請者は博士（医学）の学位授与に値する十分な学識を有するものと判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	荒木　智子
論文審査担当者	主査　秋田　恵一 副査　宗田　大、星　治
論　文　題　目	Incidence of floating toe and its association with the physique and foot morphology of Japanese children

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

昨今散見される「浮き趾（Floating toe）」について、身体発育、運動発達が著しく進む 3-5 歳の日本人の幼児に注目し、「浮き趾」の出現状況、および身体発育と足部形態の成長と足趾の接地状況の関係について検討した。対象は 3-5 歳の健康な幼児 198 名であった。身体計測としては身長・体重を測定し、足部形態として足長・足幅を計測した。「浮き趾」の評価はフットプリントを用い、インクプリントの陰影で足趾の接地状況を評価した。質問紙調査として出生時の体格および歩行開始時期について聴取した。3 歳児で 87.7%（50 名）、4 歳児で 88.7%（55 名）、5 歳児で 98.7%（78 名）に 1 趾以上の「浮き趾」がみられた。特に第 5 趾の「浮き趾」が最も多く、全体の 74.2%を占めた。3-5 歳の幼児においいて、「浮き趾」は高率にみられ、出生時体重以外の身体形態、足部形態、歩行開始時期とは関連がみられなかった。浮き趾の本数については、足部形態、出生時の身長、歩行期間は関係しないことが明らかとなり、浮き趾は月齢、身長、足部形態、歩行期間に関わらずみられることが示唆された。浮き趾が月齢の増加や体格の発育に伴って出現するのではなく、運動発達、環境要因や生活習慣などほかの要因が影響している可能性があると考えられた。

＜諸言＞

これまでに Anderson ら、Gould らにより、足部の成長は幼児期に著しく進み、また Cheng らにより足部の成長は身長に先行することが報告されている。幼児期は身体の発育発達が著しく進む時期であり、足部の成長にとっても重要な時期である。

近年、疼痛や変形は伴わないが、立位時に足趾が床面に接地できていない、いわゆる「浮き趾（Floating toe）」が散見される。Hofstartter らや Migues らは成人における「浮き趾」が外科手術後の後遺症として出現すると報告している。Smith らは Floating toe と Hammer toe を区別し、「浮き趾」は中足趾節関節の不安定性による屈筋力の低下によって起こると報告している。また、Fukuyama らによると、成人の「浮き趾」では足趾把持力や前方重心移動能力の低下がみられたと報告している。

一方で「浮き趾」の発生時期については明らかにされていない。また、「浮き趾」についての研

究報告で海外に向けて報告されたものはみられず、国内文献において、内田らによる日本人幼児を対象にした研究では「浮き趾」が高率に出現していることが報告されている。また原田らの研究では、1980 年代よりも 2000 年代において「浮き趾」が増加していることや外遊び量が出現に影響しているという報告もみられている。

そこで本研究では身体発育、運動発達が著しく進む 3-5 歳の幼児に注目し、「浮き趾」の出現状況と、身体発育と足部形態の成長、足趾の接地状況について把握することを目的に行った。

＜方法＞

対象は 3-5 歳の日本人幼児 198 名（男児 102 名、女児 96 名）である。足部に形態学的な変形や既往歴のないものを対象とし、足部形態に影響を及ぼす神経学的疾患、整形外科的疾患があるものも除外した。

測定は身体計測、足部形態の計測、フットプリントの撮像、質問紙調査を行った。身体計測は身長、体重について計測を行った。足部形態の計測はスライディングスケール（Junior Brannock Device, The Brannock Device Co. Ltd., USA）を用い、足長（Foot length)、足幅(Foot width)を計測した。足長は第 2 趾から踵部中央まで、足幅は足長に直行する MTP 関節から第 5 趾中足骨頭までの直線とした。測定は立位で行った。

フットプリントの撮像はインクプリント式のフットプリンター(Pedoprint foot imprinter set, Bauerfeind Co. Ltd., Germany）を用いて撮像した。フットプリントにより足趾接地状況の評価を行った。足趾接地の状況は不完全であっても少しでも接地しているものは 1 点、全く接地が確認できないものは 0 点として評価した。左右で合計点を算出し、接地した足趾の本数として解析した。浮き趾の本数としては、左右それぞれの差を算出し、解析を行った。

質問紙調査は被験者の保護者に対し、被験者の生育歴として、出生時の身長、体重、独歩の開始時期を聴取した。

統計処理として、月齢、体格と足部形態、足趾接地状況に関して、Spearman の順位相関係数を算出した。また月齢と身長を調整変数とする偏相関係数を評価した．統計学的分析は SPSS Statics20 (IBM Co. Ltd, IL, USA）を用いて行い、統計的有意水準は，いずれも危険率 5%未満とした。

＜結果＞

月齢、身長、体重と足長、足幅はいずれも有意な相関を示した($p<0.01$)。特に身長は体格のなかで最も足長、足幅と強い相関を示した。一方で出生時の身長、体重と足部形態とは足長のみが有意な相関を示したが、相関係数の絶対値は最大で 0.152 であり、統計的に有意であるものの、弱い相関を示すにとどまった（$p<0.05$)。またこれらの結果については、性差はみとめられなかった。

浮き趾の出現状況としては、3 歳児で 87.7%（50 名)、4 歳児で 88.7%（55 名)、5 歳児で 98.7%（78 名）に 1 趾以上の浮き趾がみられた。浮き趾の本数はすべての年齢において、左右ともに 0 本か 1 本で過半数（3 歳児：左 52.7%/右 59.7%、4 歳児：左 62.9%/右 56.4%、5 歳児左 69.6%/右 60.7%）を占めた。両側の合計では 2 本が最も多く、3 歳児で 26.3%、4 歳児で 24.2%、5 歳

児で 25.3%であった。浮き趾がみられた部位ではすべての年齢で第 5 趾が最も多く、全体の 74.2%にみられた 。

また、月齢、身長、体重を調整変数とする偏相関係数では、出生時の身長、体重、歩行期間、足長、足幅と浮き趾の本数で出生体重と両側の浮き趾本数が有意な相関を示したが（$p<0.05$）、偏相関係数の絶対値は 0.147 で極めて弱い相関を示すにとどまった。ほかの項目間では有意な相関はみとめられなかった。

＜考察＞

足部形態は月齢、身長、体重と高い相関を示し、中でも身長が高い相関を示した。この点からも足部形態の成長がいわゆる月齢や体重よりも身長と関連することが示され、足部の成長が身長に先行して進む先行研究と一致した結果となった。また出生時の身長と足部形態は弱い相関を示すにとどまり、出生時の体格は幼児期の足部形態には関連がないことが明らかとなった。

次に足趾接地状況は浮き趾を有する者が大半をしめ両側合わせて 2 本の浮き趾を呈するものがどの月齢においても最も多かった。「浮き趾」が第 5 趾に多くみられる点についても先行研究と一致した。松田らは第 5 趾以外の浮き趾について年齢とともに低下していくと報告しているが、本研究ではそのような傾向はみとめられなかった。

浮き趾の本数については、足部形態、出生時の身長、歩行期間は関係しないことが明らかとなった。足部形態、歩行期間は月齢や身長と強く相関するが、浮き趾の出現については、月齢、身長、足部形態、歩行期間に関わらずみられることが示唆される。また出生時の体格においては、出生体重と両側の浮き趾の本数について極めて弱い相関がみとめられたが、左右別になるとその傾向はなくなるため、出生体重が浮き趾に影響を及ぼすとは言い切れない。

また、Assaiante らや Rival らによる 6 歳以降に姿勢制御が成人のパターンに近づくという報告や 6 歳以前の立位姿勢制御においては支持面や足関節周囲筋からの情報が動的姿勢制御にとって重要であるという報告も先行研究でみられていることから、6 歳よりも低年齢の幼児を対象とした本研究においては、浮き趾が月齢の増加や体格の発育に伴って出現するのではなく、運動発達の段階、環境要因や生活習慣などほかの要因が影響している可能性があると考えられた。

これらを考慮すると、幼児期から足部の接地状況を把握し、身体発育や運動発達とともに観察を続けていくことは適切な姿勢制御や歩行を獲得していく上でも大変重要である。

＜結論＞

身体発育、運動発達が著しく進む 3-5 歳の幼児に注目し、身体発育と足部形態の成長、足趾の接地状況について把握することを目的に身体計測、足部形態の計測、浮き趾に関する評価を行った。

足部形態は月齢、身長、体重と高い相関を示し、足部形態の成長は月例や身長、体重と関連することが示された。浮き趾の出現は、全ての年齢において 85%以上に 1 趾以上の浮き趾がみられた。浮き趾がみられた部位ではすべての年齢で第 5 趾が最も多かった 。

浮き趾の本数については 2 本が最も多く、足部形態、出生時の身長、歩行期間は関係しないことが明らかとなった。浮き趾は月齢、身長、足部形態、歩行期間に関わらずみられることが示唆

された。これらから、浮き趾が月齢の増加や体格の発育に伴って出現するのではなく、運動発達の段階、環境要因や生活習慣などほかの要因が影響している可能性があると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5135　号	荒木　智子
論文審査担当者	主　査　秋田　恵一 副　査　宗田　大、星　治	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、「浮き趾(Floating toe)」という足の機能との関連が十分に明らかでないにも関わらず広く受け入れられているものについて、足部形態との関係を調査した研究である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

「浮き趾(Floating toe)」の機能的推察は多くなされているが、足の発達過程に関係されるものかどうかについてはこれまでほとんどデータもなく、議論をする上で具体的なデータの収集が非常に重要であると考えられ、その解析が望まれてきたものであった。

２）社会的意義

足部形態は月齢、身長、体重と高い相関を示し、中でも身長が高い相関を示しており、身体の発達段階との関係を考える上で十分な対象と考えられた。また、このことから幼児期の成長が、運動発達とくに適切な姿勢制御や歩行の獲得に関係があると予想され、そのように考えられてきた。しかし、一般的に考えられてきたこととは異なり、足の接地状況は、身体の発達段階との関係は特に認められず、足部形態との関係も認められなかったことが明らかになった。

３）研究方法・倫理観

対象は 3-5 歳の日本人幼児 198 名（男児 102 名、女児 96 名）である。調査のための同意や協力が十分に得られた対象を扱っており、倫理的に問題がないことが確認された。測定方法や質問紙についても十分に計画が練られたものであることが示された。

４）考察・今後の発展性

幼児期から足部の接地状況を把握し、身体発育や運動発達とともに観察を続けていくことは適切な姿勢制御や歩行を獲得していく上でも大変重要である。しかし、浮き趾は月齢、身長、足部形態、歩行期間に関わらずみられることが明らかになった。今後予定している長期間にわたる足の形態と歩行機能に関する変化についての縦断的調査計画に期待される。

３．その他

足の機能や発達との間に、明確に相関する要素は見出すことはできなかったが、そもそもこのような研究がなかったために、仮説によって議論されるということが多かった。そこに明確なデータを示したことは大きな意義がある。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐藤　敦子
論文審査担当者	主査　大川　淳 副査　吉田　雅幸、江面　陽一
論　文　題　目	Scoliosis in osteogenesis imperfecta caused by *COL1A1/COL1A2* mutations — genotype–phenotype correlations and effect of bisphosphonate treatment

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ビスホスホネートは主にⅠ型コラーゲン（*COL1A1,COL1A2*）の変異によって引き起こされる骨脆弱性疾患である骨形成不全症（osteogenesis imperfecta ;以下 OI）の小児患者の治療として広く使用されている。しかし、本治療が OI における側弯症のリスクを低下させるかどうかは不明である。我々は *COL1A1* もしくは *COL1A2* 変異を病因とする 437 人（女性 227 人）の OI 患者について、側弯症と遺伝子型及びビスホスホネート治療歴の関係を比較した。最終観察時（平均年齢 11.9 歳 (SD: 5.9 歳)）に 242 人(55%)の患者に側弯症を認めた。側弯症の発症頻度は OI Ⅲ型で最も高く(89%)、Ⅳ型(61%)、Ⅰ型(36%)の順であった。中~高度の側弯症（Cobb 角≧25°）は *COL1A1* のハプロ不全 mutation 患者では稀であったが triple-helical glycine substitutions または C-propeptide mutation では 40%に認めた。ビスホスホネート治療の最初の 2~4 年でⅢ型は Cobb 角の増加率が治療前より低かったが、Ⅰ型とⅣ型では変化を認めなかった。骨成熟期における側弯症の有病率はビスホスホネート治療歴には影響をうけなかった。

＜緒言＞

OIは骨脆弱性と骨量減少、成長障害などを特徴とする稀な遺伝性疾患である。通常Ⅰ型コラーゲンα鎖がコードされる２つの遺伝子(*COL1A1*/*COL1A2*)のうち１つの欠損により発症するが、他の１０以上の遺伝子異常でも発症する。*COL1A1*もしくは*COL1A2*に起因するOIは４つの型に分類される。Ⅰ型は発症頻度が最多の型で骨脆弱性は比較的軽症で骨変形も少ない。Ⅱ型は周産期致死型である。Ⅲ型は重症で出生時の骨折や多発性の骨変形、三角顔, 象牙質形成不全、著しい成長障害を示す。Ⅳ型はⅠ型とⅢ型の中間の骨脆弱性と骨変形や成長障害に多様性を示す。

現在のところ原因療法はないが、ビスホスホネートの経静脈投与療法は症状の改善を目的に広く使われている。多くの研究では小児OI患者における骨密度の増加、骨折率の低下や椎体圧迫骨折における椎体形状の回復を報告している。側弯症はOIで頻繁に認め、痛みや機能障害、重症のOIにおける主な死因である呼吸障害につながる。現在のところビスホスホネート治療が小児OI患者における側弯症の増悪を防ぐことができるのかはっきりしていない。本研究では遺伝子検査で*COL1A1*もしくは*COL1A2*変異を確認された437人のOIⅠ、Ⅲ、Ⅳ型患者を評価した。本研究の主な目的は側弯症に対する経静脈ビスホスホネート治療の効果を評価することである。

＜方法＞

対象は 1984 年～2014 年に当院で OI と診断された患者のうちｉ）少なくとも１枚の脊椎レントゲン写真、ⅱ）*COL1A 1* もしくは *COL1A2* にヘテロ接合型変異の存在、の基準を満たした患者である。565 人のうち 437 人に *COL1A1* もしくは *COL1A2* に変異を認め、modified Sillence 分類の OI Ⅰ型、Ⅲ型もしくはⅣ型と臨床診断されていた。うち２人（Ⅲ型；１人、Ⅳ型；１人）は術後の脊椎レントゲンのみ評価可能であったため、この２人は側弯の進行に関する分析から除外した。

経静脈ビスホスホネート治療にはパミドロネートもしくはゾレドロン酸を用いた。パミドロネートの初年度投与量は９mg/kg であった。ゾレドロン酸は一回 0.05mg/kg を６ヶ月ごとに繰り返した。側弯症は Cobb 角が 10°以上の場合有りとし、中等度側弯症は Cobb 角 25°以上 50°未満、高度側弯症は Cobb 角 50°以上もしくは脊椎固定術歴有りの場合と定義した。遺伝子 DNA の *COL1A1* または *COL1A2* の配置分析は全ての *COL1A1* と *COL1A2* の exon に PCR 法の後サンガー法（Applied Biosystems 3100 DNA sequencer）を施行、もしくは Ion Torrent PGM（Life Technologies 社）を使用した次世代シーケンスを行った。

＜結果＞

４３７人の患者のうちⅠ型が最も多く１８８人、次いでⅣ型１６７人、Ⅲ型８２人であった。全体の 65%に *COL1A1*、35%に *COL1A2* 変異を認めた。最終観察時平均年齢は 11.9 歳であり、約 75%の患者がビスホスホネート治療を受けていた。全患者のうち５５％に側弯症を認めたが、有病率（Ⅰ型：36%、Ⅲ型：89%、Ⅳ型：61%）（p＜0.01）及び脊椎固定術を受けた割合（Ⅰ型：2%、Ⅲ型：21%、Ⅳ型：9%）（p＜0.01）は OI 型によって有意に異なった。

異なる年齢グループ（＜5 歳、5～9 歳、10～14、≧15 歳）による側弯症の有病率についての検討では中～高度側弯症（Cobb 角≧25°）はⅠ型の 5 歳未満では認めず、10 歳以上のグループでも 20%以下であった。対して、Ⅲ型では 5 歳未満でも 15%に中～高度側弯を認め、15 歳以上では 91%まで増加した。Ⅳ型では中～高度側弯の有病率は全ての年齢グループでⅢ型の半分であった。

phenotype によるグループ間比較では、*COL1A1* ハプロ不全変異のグループでは約 1/3 に側弯症を認めたが、中～高度側弯症は８％と少なかった。対して、triple helical glycine substitutions もしくは C-propeptide 変異のグループでは約 40%に中～高度側弯症を認めた。splice site 変異の患者では中～高度側弯症の出現率はハプロ不全グループと他のグループ群の中間程度であった。

Cobb 角の増加率は、ビスホスホネート治療を受けていない患者ではⅢ型（6.7°/年）がⅠ型(1.7°/年)やⅣ型（0.7°/年）と比較して有意に増加率が高かった（p＝0.004）。単変量解析では Cobb 角増加率は治療前と治療開始 2～4 年間では有為差を認めなかった（I 型, P = 0.41, III 型, P = 0.15; IV 型, P = 0.06; t-テスト）。しかしながらⅢ型において Cobb 角増加率の平均はビスホスホネート治療中（3.1°/年）では治療前と比べて約半分であった。

次にCobb角の増加率に対するビスホスホネート治療の効果を調べるため重回帰分析を用いた。全ての患者を対象とした時、年齢（P=0.17）性別（P=0.57）、ビスホスホネート治療歴（P=0.37）

では相関を認めなかったが、OIの重症度（P<0.001）で相関を認めた。しかし、Ⅲ型のみを対象とした時、年齢（P=0.81）、性別（P=0.51）は相関を認めなかったが、ビスホスホネート治療歴はCobb角増加率との相関を認めた（P=0.03）。回帰式はCobb角増加率（°/年）= 9.4 - 0.04×年齢(歳) + 0.98×性別（女性= 1;男性= 2) - 3.7×治療歴（ビスホスホネート治療前 = 1; 治療中= 2)であった。Ⅲ型の患者ではビスホスホネート治療中、Cobb角増加率は3.7°/年緩やかになることを示し、単変量解析の結果と似たものとなった。

次にほぼ身体的に成熟した１５歳以上の患者について、５歳以前にビスホスホネート治療を開始した群（早期治療群）と１０歳以上で治療開始した、もしくは治療を受けていない群（治療晩期群）を比較したところ、中～高度側弯症の有病率には各OI型における両グループで有為差を認めなかった。

＜考察＞

本研究ではOIの側弯症についてこれまでの報告の中で最大である４３７人のOI患者について報告した。経静脈ビスホスホネート治療は OI のうちⅢ型でのみ側弯症の増悪率を減少させる効果があったが、それは他の報告と類似する結果であった。Ⅲ型ではビスホスホネート治療中はCobb 角の増加率が減少したことより側弯症の有病率を下げる結果につながることが予測されたが、成長期後の中～高度側弯症の発症を防ぐことにはつながらなかった。また、ビスホスホネート治療は脊椎の骨密度を上げ、しばしば脊椎圧迫骨折のある小児患者の椎体骨の形状を回復することが知られている。椎体形状の改復は脊椎全体の形を改善することにつながるように予想されたが、今回の結果より OI の側弯症は大部分が傍脊椎靭帯や筋緊張などの軟部組織により決定されると考えられた。

Genotypeとphenotypeの相関について、*COL1A1*ハプロ不全変異の３４％に側弯症を認め、これは我々の以前の報告と類似した結果であった。ハプロ不全変異の患者では中～高度側弯症はごくわずかしかみられなかったが、glycine substitutions またはC-propeptide変異の患者では約半数に中～高度側弯症を認めた。これは一般的にハプロ不全変異と比べより重度のphenotypeはglycine substitutions もしくはC-propeptide変異と関連づけられることに一致する。

＜結論＞

COL1A1 と *COL1A2* 遺伝子変異を持つ患者についての本研究で、成熟後の側弯症の有病率はビスホスホネート治療歴に影響を受けなかった。それゆえ OI 患者の子供には他の治療法が必要である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5136　号	佐藤　敦子
論文審査担当者	主　査　大川　淳 副　査　吉田　雅幸、江面　陽一	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

Ⅰ型コラーゲン（*COL1A1,COL1A2*）の変異によって引き起こされる骨脆弱性疾患である骨形成不全症（osteogenesis imperfecta ;以下 OI）の小児患者の治療として広く使用されているビスホスホネートの脊柱側弯症に対する治療効果に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

OI における側弯症発症リスクを低下させる目的で骨粗鬆症治療薬のビスフォネートが広く用いられているが、この効果について検証した報告はない。申請者は OI 患者 437 人（女性 227 人）という大きなコホートにおいて、脊柱側弯症と遺伝子型及びビスホスホネート治療歴の関連について、後方視的とはいえ縦断的な解析を行っており、臨床的意義は高い。

２）社会的意義

本研究では、

１）　最終観察時（平均年齢 11.9 歳（SD: 5.9 歳））に 242 人(55%)の患者に側弯症を認めた。側弯症の発症頻度は OI Ⅲ型で最も高く(89%)、Ⅳ型(61%)、Ⅰ型(36%)の順であった。

２）　経静脈ビスホスホネート治療は最初の 2~4 年でⅢ型は Cobb 角の増加率が治療前より低かったが、Ⅰ型とⅣ型では変化を認めなかった。

３）　成長期後の中～高度側弯症の発症を防ぐことにはつながらなかった。

という結論を得た。現在一般的なビスホスホネート治療の効果が限定的であることを明らかにした点で社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

申請者は留学先の病院のデータソースを使い、レントゲン写真の計測と OI の病型分類の関連性、統計解析を行った。研究は周到な準備と患者の承諾のもとで遂行されており、臨床研究に関する深い見識と倫理観を有すると判断された。

４）考察・今後の発展性

結果的には、従来一般的とされたビスホスホネートの治療の脊柱側弯症に対する有効性に疑問を呈する形となり、新規治療法開発のきっかけになるものと期待される。

３．その他

質疑の中で十分な回答が得られなかった OI の詳細な病型分類およびビスホスホネートの作用機序について追加レポートを課したが、最終的な考察は満足できる内容であった。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	丸山　陽子
論文審査担当者	主査　朝蔭　孝宏 副査　田邉　稔、横関　博雄
論　文　題　目	Neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as predictors of wound healing failure in head and neck reconstruction

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

頭頸部癌は、手術、放射線、化学療法などによる集学的治療が行われることが多く、術後合併症である創感染や縫合不全、皮弁トラブルなどの局所合併症が生じた場合、術後療法を遅らせることになる。そこで、頭頸部癌に対して腫瘍切除および血管吻合を伴う自家遊離組織移植による再建を行う患者において、術後局所創傷治癒障害の発症を予測できるリスク因子の評価を行った。その結果、70 才以下の症例において、好中球割合<64.9%、NLR（neutrophil-lymphocyte ratio、好中球のリンパ球数に対する比）<3.5、PLR (platelet-lymphocyte ratio、血小板数のリンパ球数に対する比) <160 では、術後局所創傷治癒障害発生が高いことが示唆された。

＜緒言＞

頭頸部癌切除同時再建術は口腔、咽頭、頸部食道などの常に唾液にさらされた環境の下に行うため、手術は準清潔手術となり、他の部位と異なり創感染の頻度は高く、創感染の合併症は 10-40%との報告がある。さらに、広範囲欠損の場合は、遊離組織移植が必要となり、10 時間前後の長時間手術になるため、合併症率はさらに上昇することとなる。つまり、頭頸部切除同時再建術は、創傷治癒障害の発生率が高くなる様々な要素を含んだ手術である。これまでに、頭頸部癌や遊離組織移植再建における術後全身合併症を論じた論文は多くあるが、創傷治癒障害の局所合併症発生の予測因子に関する研究は少ない。そこで我々は、術後合併症のリスク因子として挙げられている既存の合併症リスク因子に加え、血液検査データより血小板数、白血球分画を測定し、術後局所創傷治癒障害との相関関係の評価を行った。

本研究では、血液検査データより、リンパ球と好中球や血小板の比である NLR、PLR を算出し、単球の変化にも注目した。NLR は、様々な癌においての予後因子として有効であると多数報告されており、PLR は虚血肢や循環器疾患の予後因子として有効であると報告されている値である。しかし、NLR や PLR と様々な疾患の予後との関連性において、確かなメカニズムは証明されていない。様々な仮説が唱えられているが、体内環境のバランスを反映する指標であることは確かである。好中球、血小板、単球は創傷治癒過程で活性化され、創傷の成熟に関わっているため、NLR、PLR のような相対的変化は、創傷治癒障害の評価として有用である可能性は高いと考

えたため、我々はこれらの指標を創傷治癒予測評価に用いることができるのではないかと考えた。

＜方法＞

2011 年 4 月から 2014 年 3 月に、頭頸部癌（頭蓋底腫瘍、頸部食道癌を含む）に対して切除同時再建を行い、血管吻合を伴う自家組織移植による再建術施行症例で、術前後の血液検査データにて白血球分画を抽出できた 104 例を対象として、検討した。

術前の患者背景として、年齢、性別、術前合併症の有無、body mass index(BMI)、術前化学療法の有無、術前放射線療法の有無、術前陽子線療法の有無、喫煙歴(pack-year)、手術時間、出血量、T-stage、ASA scores、総蛋白質量を記録した。血液検査では、術前 30 日以内に末梢血において白血球分画、血小板数を測定している場合にデータを抽出した。術前 30 日以内の血液像を含む血液学的データが得られなかった症例では、前述の期間内であっても調査対象に含めなかった。対象とした症例の術後合併症は、創感染、縫合不全、瘻孔など創傷治癒過程における局所合併症のみとし、術後せん妄や吻合血管のトラブル、その他全身疾患など、創傷治癒障害ではない術後合併症は合併症としては記録しなかった。合併症の記録は術後毎日行われる形成外科医の診察により行われた。術前因子と術後局所合併症発生の相関については Fisher's extra test および Wilcoxon rank sum test による単変量解析を行った。単変量解析で相関を認めた因子について多変量解析をおこなった。

＜結果＞

年齢層別で術後局所合併症率を比較した結果、年齢の低い方が、術後局所合併症が多いという結果を示した。また 70 才以上での合併症率は 19.2%となり、他の年齢層と比較すると明らかに局所合併症率が低い結果となった。これは、70 才以上では「高齢」を理由に、術前に厳しい患者選択が行われているためと考えられる。そのため、「年齢」による手術適応の患者選択が行われない 70 才未満(n=78)での症例においての検討を行った。術後局所合併症と術前予想因子との相関を単変量解析した結果、好中球比率(p=0.00039)、リンパ球比率(p=0.0121)、単球比率（p=0.0493）、NLR 値(p=0.039)、PLR 値(p=0.004)、において有意差を認めた。

また好中球比率、NLR、PLR 各々の cut-off 値は、ROC 解析により、好中球比率 64.9 付近（AUC=0.73）、NLR は 3.5 付近（AUC=0.676）、PLR は 160 付近（AUC=0.688）となった。好中球率 64.9%以上では、局所合併症率が 46 例中 12 例の 26.1%であったのに対し、好中球率が 64.9%以下では局所合併症率が 31 症例中 22 例の 71%となり、術前好中球率が低値の患者において術後局所合併症が有意に多く発生することが示された。(p=0.0002) NLR 3.5 以上では、局所合併症率 27 例中 6 例の 22.2%であったのに対し、NLR が 3.5 以下では局所合併症率が 28 症例中 50 例の 56%となり、術前 NLR が低値の患者において術後局所合併症が有意に多く発生することが示された。(p=0.0042) PLR 160 以上では、局所合併症率が 41 例中 10 例の 24.3%であったのに対し、PLR 値が 160 以下では局所合併症率が 36 症例中 24 例の 66.7%となり、術前 PLR 値が低値の患者において術後局所合併症が有意に多く発生することが示された。（P=0.00021）

また単変量解析にて有意差を認めた項目において、多変量解析を行ったところ、好中球率のみで局所合併症率に有意差（p=0.020）を認めた。

＜考察＞

本研究において、創傷治癒過程に必要とされている好中球、血小板、単球、リンパ球を含んだ血液学的データによって、術後局所合併症を予測できることが分かった。

創傷治癒は、出血凝固期、炎症期、増殖期、再構築期と進む。これらの創傷治癒過程のなかで、本研究で術後局所合併症発生と相関の認められた因子のメカニズムを以下のように考える。

まず、血小板、PLR であるが、血小板は最初に創傷に到達して、様々なサイトカインを放出して創傷治癒を開始する役割がある。血小板とリンパ球は、同じ造血幹細胞から分化した細胞であり、恒常状態では PLR は一定に保たれると考えられる。しかし、血小板の寿命は 10 日前後であるのに対し、リンパ球は数週間から数ヶ月であるため、血小板の産生、消費の異常では、リンパ球よりも血小板で早く数的異常が現れるため、PLR が変動すると考えられる。PLR が低下する要因としては、①産生低下（担癌状態、放射線治療や化学療法による骨髄抑制状態、肝臓におけるトロンボポエチン産生の減少、②消費増加（担癌状態での組織破壊による血小板利用が亢進、血栓や血液凝固亢進、血小板の turnover が亢進）などの全身性の要因が考えられる。PLR が低下している患者の創傷においては、創傷に到達して創傷治癒に参加する血小板の相対的な数的減少、質的異常に加えて、これらの全身性の要因が相まって創傷治癒障害が発生すると考えられる。

次に、好中球、NLR については、創傷治癒過程で、好中球は損傷組織の浄化反応である「炎症期」において重要な役割を示す事が明らかになっている。炎症期に入ると、好中球が炎症部に引き寄せられ（走化性）、細胞内の顆粒から蛋白質分解酵素や活性化酵素を産出して、壊死組織の融解や殺菌作用を発揮する。好中球減少および NLR 低下の原因としては、①産生能力の低下や、②好中球寿命の低下などの全身性要因も存在し、血小板、PLR 低下と同様の機序で創傷治癒を障害すると考えられる。

単球（マクロファージ）は、炎症期に好中球に続いて出現してくる。単球は血管内を循環し、損傷部位があると血管外に出て、創内に侵入し、マクロファージへと変化した後、活性化したマクロファージが損傷部組織を分解し、貪食し、さらに繊維芽細胞の増殖を促進し、その働きを活性化することによって肉芽が形成され、組織の修復を行い創傷治癒過程が進んで行く。このように創傷治癒過程のなかで、血小板と好中球、単球は重要不可欠な細胞であり、血小板や好中球の相対的低下や単球の相対的変化は、創傷治癒過程を障害すると思われ、本研究の結果もそれを裏付ける結果であった。そして、この結果を基に、これらの因子を創傷治癒における術前指標として用いることは合理的であると考える。さらに、従来の術前検査である血液検査で得られる血液データのみで算出することができるため、簡易かつ安価な指標であり、従来の術前血液検査のみで、術後創傷治癒障害を予測できるため、非常に有用である。

＜結論＞

頭頸部癌切除同時再建手術における術後創傷治癒障害合併症は、好中球割合<64.9%、NLR（neutrophil-lymphocyte ratio、好中球のリンパ球数に対する比）<3.5、PLR (platelet-lymphocyte ratio、血小板数のリンパ球数に対する比) <160 では、術後局所創傷治癒障害発生が高いことが判明した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5137　号	丸山　陽子
論文審査担当者	主　査　朝蔭　孝宏 副　査　田邉　稔、横関　博雄	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は自家遊離組織移植例の創傷治癒不全と血液データの相関に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

好中球数/リンパ球数(NLR)および血小板数/リンパ球数(PLR)が様々な癌の予後と相関するという報告が近年続いているが、術後創傷治癒不全との相関については報告がない。このような背景の下、申請者は頭頸部癌に対する自家遊離組織移植例の創傷治癒不全と NLR および PLR の関連に関する検討を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１、単変量解析において好中球数、NLR、PLR、TP と創傷治癒不全の相関を認めた。

２、多変量解析において好中球数と創傷治癒不全の相関を認めた。

以上のように申請者は術前の好中球数と術後の創傷治癒不全の間に相関があることを明らかにしている。これは臨床的に極めて有効な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には通常の術前検査で行われた採血データを用いられ、NLR および PLR の計測を行った。本手法は安全、簡易、そして安価であり、高い外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究結果について、好中球数、NLR、PLR を用いた術後創傷治癒不全の予測は極めて有効であると考察している。今後の実臨床においてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	永田　紘子
論文審査担当者	主査　田邉　稔 副査　田中　雄二郎、藍　真澄
論　文　題　目	Serial measurement of *Wisteria floribunda agglutinin* positive Mac-2-binding protein is useful for predicting liver fibrosis and the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients treated with IFN-based and IFN-free therapy

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Wisteria floribunda agglutinin $^{+}$(WFA^{+})Mac-2 binding protein(M2BPGi)は M2BP の糖鎖異性体であり、肝臓の線維化による微小な糖鎖の構造変化を指標とした、非侵襲的な肝線維化マーカーとして近年実臨床で用いられるようになった。本研究では治療前後で経時的に血清 M2BPGi 値、また M2BP 全体の蛋白量を測定することにより、C 型肝炎患者における肝線維化、肝発癌の予測因子としての有用性を検討した。IFN-based 治療を行った 97 例、IFN-free 治療を行った 22 例において、治療前、治療終了時、治療終了後 24 週の血清 M2BPGi 値、M2BP 値を測定し、臨床学的所見、血液学的所見、治療効果、肝発癌との関連について解析を行った。IFN-based 治療群では治療終了時に一旦上昇し、その後低下したのに対し、IFN-free 治療群では上昇はみられず治療開始後から漸減した。治療前 M2BPGi 値は治療効果に関わらず肝線維化と有意相関を認めたが、治療後は sustained virological response(SVR)症例では線維化の程度に関わらず治療前より有意に低下した。多変量解析にて治療終了後 24 週時の M2BPGi≧2.2(C.O.I)に関わる因子として非 SVR、肝発癌が独立因子として抽出された。血清 M2BP 値も肝線維化、肝発癌と有意に相関していた。C 型慢性肝炎患者における血清 M2BPGi 値の経時的測定は肝発癌予測に有用であることが示唆された。本研究は C 型慢性肝炎患者における IFN-based, IFN-free 療法施行前後の M2BPGi 値の変化を詳細に解析した初めての臨床報告と考える。さらに M2BP そのものの増加とその糖鎖の変化いずれもが肝発癌機構に関与している可能性が考えられた。

＜諸言＞

C 型肝炎ウイルス（hepatitis C virus: HCV）は慢性肝炎の契機となる主要なウイルスであり、肝線維化の進行に伴う肝細胞癌に至る病態形成に深く関与している。近年、ウイルス蛋白を標的とした direct-acting antiviral agents (DAA)の導入により HCV に対する抗ウイルス療法の治療

効果は飛躍的に向上した。しかし、以前から持続的ウイルス陰性化後も特に高齢、男性、高度線維化症例では発癌がみられることが報告されており、また DAA 治療後に SVR となった症例で従来の IFN-based 治療と同等の抗腫瘍効果が得られるかはいまだ明らかでない。そのため DAA 治療後 SVR 症例において高発癌リスク群を囲い込み、適切なサーベイランスを施行することが必要である。近年、M2BP の糖鎖異性体である WFA+M2BP(M2BPGi)が肝線維化を反映する新たな糖鎖マーカーとして開発された。さらに M2BPGi 値は肝発癌と関連するといった報告もなされたが(Yamasaki et al. Hepatology.2014)、抗ウイルス療法による経時的な変化、特にウイルス駆除による影響は明らかにされていない。さらに M2BP という蛋白そのものの増加と糖鎖の変化、そのいずれかあるいは両者が発癌に関与しているのかは不明である。今回我々は IFN-based, IFN-free 治療を施行した C 型慢性肝炎患者血清を用いて、治療前後で経時的に M2BPGi 値、M2BP 値を測定し、肝線維化、発癌との関連について検討を行った。

＜方法＞

当院ならびに関連施設で治療前に肝生検を施行し、各種画像検査にて肝癌が存在しないことを確認したうえで、抗ウイルス治療を導入した C 型慢性肝炎患者の中から、HBs 抗原・HIV 抗体陽性例、他の慢性肝疾患罹患例を除き、最終治療効果が判定可能であった症例を対象とした。IFN-based 治療群として PEG-IFN/RBV 併用治療または Simeprevir(SMV)/PRG-IFN 併用療法または Telaprevir(TPV)/PEG-IFN 併用療法を施行した 97 例、IFN-free 治療群として Asnaprevir(ASV)/Daclatasvir(DCV)併用療法を施行した 22 例の保存血清を用いて、治療前、治療終了時、治療終了後 24 週(SVR 判定時)の M2BPGi、M2BP 値をサンドウィッチアッセイ法にて測定を行った。IFN-based 治療群、IFN-free 治療群において臨床学的所見(年齢、性別、肝病理学的所見)、血液学的所見(血小板数、肝胆道系酵素)、治療効果、肝発癌の有無について血清 M2BPGi 値、M2BP 値との相関の有無を検討した。

＜結果＞

IFN−based 治療施行例 97 例、IFN-free 治療施行例 22 例、いずれにおいても治療前の血清 M2BPGi 値は組織学的な肝線維化(p <0.0001, r^2=0.32)、炎症の程度(p=0.0005, r^2=0.097)と相関した。IFN-based 治療を施行した 97 例では、治療終了時に M2BPGi 値は一旦上昇し、治療終了後 24 週時は再度低下していたのに対し、IFN-free 治療を施行した 22 例では治療終了時、治療終了 24 週時において漸減を認めており治療による上昇はみられなかった。また治療効果別に検討を行うと、SVR 群では線維化の程度に関わらず治療後に M2BPGi 値の低下を認めたのに対し、非 SVR 群では治療前後で有意な低下は認められなかった。

治療後発癌が認められたのは患者群 119 例のうち 8 例(平均観察期間 7.2 年)であったが、発癌

例は非発癌例に比し治療前(p=0.0033)、治療終了 24 週(p=0.0004)いずれも M2BPGi 値は有意に高かった。また SVR 症例のみで比較しても治療後 M2BPGi 値は非発癌例に比し発癌例で有意に高かった(p=0.0007)。

治療前後の M2BPGi 値について肝線維化(F≧3)、肝発癌に対する predictability を評価するために ROC 解析を行った。肝線維化予測には治療前 M2BPGi 値が治療後に比べ有用と考えられ(AUROC=0.848 vs 0.784、PPV=0.688 vs.0.462)、ヒアルロン酸(AUROC=0.789)、4 型コラーゲン(AUROC=0.805)、APRI(AUROC=0.757)、Fib-4 index(AUROC=0.810)などの既知の線維化マーカーと比べ診断能が高いことが示唆された。一方、発癌に関しては治療後 M2BPGi 値が治療前に比し有用と考えられ(AUROC = 0.973 vs. 0.742, PPV=0.500 vs.0.224)、治療後 M2BPGi 値は SVR 症例のみでの検討でも発癌予測に有用と考えられた(AUROC=0.821,PPV=0.300)。また治療後 M2BPGi 値は APRI(AUROC=0.743)、Fib-4 index(AUROC=0.777)、AFP(AUROC=0.752)と比べ、AUROC=0.973 と高値であり有用なマーカーと考えられた。肝線維化(F≧3)における治療前 M2BPGi 値、治療後発癌における治療後 M2BPGi 値のカットオフ値はいずれも 2.2(C.O.I)であった。治療前 M2BPGi 値≧2.2(C.O.I)に関与する因子について多変量解析を行うと、線維化、治療前 APRI、発癌が独立因子として抽出された。一方、治療後 M2BPGi 値≧2.2(C.O.I)に関与する因子としては SVR の有無と発癌のみが抽出された。

血清 M2BP 値は肝線維化の程度に相関したのに対し(p=0.01, r^2=0.20)、炎症とは有意相関を認めなかった(p=0.72,r^2=0.01)。SVR の有無によって治療前後の推移に一定の傾向を認めなかったが、治療前後の M2BP 値は発癌患者では非発癌患者に比し有意に高値であり M2BP と肝発癌との関連が示唆された(p=0.043 and p=0.0002)。

＜考察＞

今回我々は C 型慢性肝患者において経時的に血清 M2BPGi 値を測定することで、①血清 M2BPGi 値は外因性インターフェロンによって上昇する、②ウイルス排除後は線維化の程度に関わらず M2BPGi 値は低下する、③治療後の M2BPGi 値は肝癌予測因子として有用であり、M2BP 値も発癌症例で高値であることから、M2BP の発現上昇と糖鎖の変化のいずれもが発癌に関与する可能がある、ということを見出した。

治療前の血清 M2BPGi 値は肝線維化の程度を反映しているが、SVR 症例では線維化の程度に関わらず治療後は低下した。ウイルス排除に成功したとしても治療後 24 週時点で線維化が大きく改善するとは考えがたいため、これは HCV 感染による炎症の改善が関与しているものと考えられる。B 型慢性肝炎、NASH、自己免疫性肝炎などの他の慢性肝疾患患者においては肝線維化進行例に対する血清 M2BPGi 値のカットオフ値が、C 型慢性肝炎患者と比べて低いことが報告されており、HCV 感染特有の免疫動態の変化によって M2BPGi 値が上昇するものと考えられる。

また今回我々は IFN-based 治療期間中のみ血清 M2BPGi 値が上昇することを見出した。これは IFN-stimulated genes(ISG)の動態にも類似しており、外因性インターフェロンによって免疫が賦活化されたことを反映していると考えられる。これらの結果から線維化進行だけではなく、HCV 感染による内因性インターフェロンやサイトカインによる免疫応答、外因性インターフェロンによる免疫賦活化においても M2BP の糖鎖変化が誘導されるものと考えられる。多変量解析では治療前の M2BPGi 値が発癌の他に炎症や線維化の程度と関連していたのに対し、治療後はウイルス排除の有無と発癌にのみ関連していた。治療後に HCV が排除されると HCV に対する免疫応答の影響が軽減され、より直接的な発癌リスクを反映するのではないかと考えられる。

M2BP は乳癌、肺癌、前立腺癌などにおいて腫瘍細胞の増殖や癌の転移に関連することが報告されているが、肝癌との関連はこれまで十分明らかとなっていない。今回、血清 M2BP 値が発癌患者で非発癌患者に比し高値であったことから、M2BP そのものの産生増加と糖鎖構造の変化の両者が肝発癌に関与していると考えられた。

本論文は IFN-based、IFN-free 治療を施行した C 型慢性肝炎患者において治療前後の血清 M2BPGi 値を詳細に解析した初めての論文であり、治療後の血清 M2BPGi 値測定がウイルス排除後の発癌サーベイランスに有用であることを示唆するものである。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5138　号	永田　紘子
論文審査担当者	主　査　田邉　稔 副　査　田中　雄二郎、藍　真澄	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

M2BPGiは非侵襲的な肝線維化マーカーとして近年開発されたが、肝発がんとの関連も示唆されている。申請者はIFN-based 治療を行った97 例とIFN-free 治療を行ったC型肝炎患者22 例において、治療前後で経時的に血清中のM2BPGi値とM2BP値を測定し、肝線維化、肝発癌の予測因子としての有用性を検討した。その結果、①血清M2BPGi 値は外因性インターフエロンによって上昇する、②ウイルス排除後は線維化の程度に関わらずM2BPGi 値は低下する、③治療後のM2BPGi 値は肝癌予測因子として有用であることなどが見いだされた。また、発癌症例ではM2BPGi値とM2BP値の双方が高値であることから、M2BP の発現上昇と糖鎖の変化のいずれもが発癌に関与する可能が示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究は C 型慢性肝炎患者における IFN-based、IFN-free 療法施行前後の M2BPGi 値の変化を詳細に解析した初めての臨床報告である。近年インターフェロンに続いて DAA 製剤が導入されたことにより、C 型肝炎に対する治療はめざましく進歩した。いかし、C 型肝炎ウィルス駆除に至るまでの肝線維化を背景として持続的なウィルス陰性を達成した後も肝細胞癌を発症するリスクは残存することが知られている。本研究の成果は SVR 後の肝発癌のハイリスク症例を抽出し、その後の綿密なフォローアップにつなげる一助となり、臨床的に意義深い。

２）社会的意義

世界的に膨大な数の C 型肝炎患者がいる中で、近年の薬物治療の発達により SVR を達成する症例が今後益々増えるものと予測される。したがって本研究の成果はこれらの多くの患者に対してより綿密な肝発癌のスクリーニングを可能にしうるものであり、社会的にも意義深い。

３）研究方法・倫理観

「国立大学法人東京医科歯科大学における研究活動に係わる行動規範」を遵守し、学内倫理委員会の承認を得ている。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが試問を通じて確認された。

４）考察・今後の発展性

申請者の行った研究では、DAA 治療を行い SVR 後に発癌した症例は 5 例にとどまるが、治療後の M2BPGi は高い症例が多い。今後このような新規治療薬による SVR 後の長期フォローアッ

プを行い、データを集積することにより、M2BPGi や M2BP を含めた肝発癌のスクリーニングの体系化が望まれる。また、今回、血清 M2BP 値が発癌患者で非発癌患者に比し高値であったことから、M2BP そのものの産生増加と糖鎖構造の変化の両者が肝発癌に関与していると考えられた。M2BP は乳癌、肺癌、前立腺癌などにおいて腫揚細胞の増殖や癌の転移に関連することが報告されているが、肝癌との関連はこれまで十分明らかにされていない。この点も今後の課題の一つとして挙げられる。

３．その他

試問では、スライドによる研究の目的、方法、結果、考察に関する発表が行われた。また、①M2BPGi の測定方法、②測定値の解釈、③血清 M2BPGi と M2BP を用いた臨床現場における具体的なフォローアップ方法、④M2BPGi の肝発癌時の変化、⑤M2BP の発現や glycosylation が行われる肝内の部位、などについて質疑応答がなされた。その回答は適切であり、本研究が十分な学識と研究能力のもとに行われたものと認められた。

４．審査結果

申請者はこの領域における知識と見識および将来への発展性を有していることが確認でき、博士（医学）の学位授与に値するものと判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	杉浦　真貴子
論文審査担当者	主査　大友　康裕 副査　槇田　浩史、蘇原　映誠
論　文　題　目	Polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion mainly helps to constrict peripheral blood vessels in treatment for septic shock

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

エンドトキシン吸着療法である polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion (PMX)は、敗血症性ショックの患者に効果をもたらすといわれている。しかし PMX がどのような状態の患者にどのような効果をもたらすかは明らかでない。そこで、PMX の臨床効果について検討し、考察した。重症敗血症あるいは敗血症性ショックのため、PMX の治療を行った 78 名を対象とし後ろ向きに検討した。循環動態（平均動脈圧、inotropic score、vasopressor dependency index）、酸素化能（PaO_2/F_IO_2 ratio）、血中エンドトキシン濃度、血清乳酸値、生存期間、微生物学的データ、APACHEⅡ score、SOFA score を検討項目とし、さらに、PMX 治療前後で inotropic score が改善した群を改善群、改善しなかった群を非改善群としてさらに比較検討を行った。結果は、PMX 治療後に inotropic score、vasopressor dependency index は有意に改善していた。一方で、PaO_2/F_IO_2 ratio は差を認めなかった。また、改善群のほうが PMX 治療前の inotropic score が有意に高く、カテコラミンを多量に必要とする循環動態であった。結論として、PMX 治療により循環動態の改善がみられることが示唆された。また、改善群のほうが PMX 治療前の inotropic score が有意に高く、末梢血管が拡張しカテコラミンが多量に必要な状態であったことから、PMX 治療はおもに、末梢血管が拡張した敗血症性ショック患者の循環動態改善に寄与するのではないかと考える。

＜緒言＞

グラム陰性菌の細胞膜成分であるエンドトキシンは敗血症性ショックの病因として重要な役割を果たしている。エンドトキシン吸着療法である polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion (PMX)は、ポリミキシン B 固定化カラムを用いて直接血液灌流を行うことにより血中のエンドトキシンを吸着除去する治療法であり、日本では 1994 年から保険適応となり、敗血症性ショック患者の治療に使用されている。エンドトキシンを除去することで IL-6 や TNFα、tissue inhibitor of metalloproteinase 1 といったメディエーターが減少することが報告されていたり、PMX 治療により敗血症患者の平均動脈圧の改善や PaO_2/F_IO_2 ratio の改善がみられたりとの報告が多数ある。しかしながら PMX 治療をしていても恩恵にあずからない患者もおり、PMX

がどのような状態の患者にどのような効果をもたらすかは明らかでない。そこで、PMX の臨床効果について後ろ向きに検討し、PMX がより効果を及ぼす患者側要因について考察した。

＜方法＞

2004 年 4 月から 2013 年 7 月までに東京医科歯科大学医学部附属病院の集中治療室に重症敗血症あるいは敗血症性ショックのために入室し、PMX の治療を行った 78 名を対象とした。検討項目は循環動態（平均動脈圧、inotropic score、vasopressor dependency index）、酸素化能（PaO_2/F_IO_2 ratio）、血中エンドトキシン濃度、血清乳酸値、生存期間、微生物学的データ、APACHEⅡ score、SOFA score とした。PMX 治療を行ったのは、血中エンドトキシン濃度が上昇している、あるいはグラム陰性菌感染が予想される重症敗血症患者もしくは敗血症性ショック患者とした。PMX 治療にはトレミキシン 20R®（東レ）を使用し、抗凝固剤としてはナファモスタットメシル酸塩を使用した。PMX は重症敗血症あるいは敗血症性ショックと診断後 24 時間以内に開始し、少なくとも 2 時間以上使用した。治療時間に関しては、主治医、集中治療医、腎臓内科医らでの相談にて決定した。血中エンドトキシン濃度測定にはリムルスアッセイを用いた。また、inotropic score は（ドパミン量×1）＋（ドブタミン量×1）＋（アドレナリン量×100）＋（ノルアドレナリン量×100）にて計算し、vasopressor dependency index は inotropic score/MAP で計算した。そして、データ解析の段階で 28 日生存の改善に寄与していた inotropic score に注目し、（PMX 治療前 inotropic score－PMX 治療後 inotropic score）＞0 の患者を改善群、（PMX 治療前 inotropic score－PMX 治療後 inotropic score）≦0 の患者を非改善群の 2 群に分けた検討を行った。

＜結果＞

患者背景は、平均年齢 70 歳、78 人中 50 人が男性であった。PMX 治療時間の平均は 1456 分で、感染巣は腹部 27 人、血液 15 人、肺 10 人であった。起因菌はグラム陰性桿菌が最も多く 41 人、グラム陽性球菌が 12 人、グラム陽性桿菌が 2 人であった。inotropic score は PMX 治療前が 18.1、PMX 治療後が 9.9 と有意に改善がみられた（p=0.011）。PaO_2/F_IO_2 ratio は PMX 治療前 201、治療後では 205 と変化は見られなかった。改善群と非改善群を比較検討した結果は、年齢、性別、APACHEⅡ score、SOFA score、ICU 入室時の平均動脈圧、腎機能、PMX 治療時間、PMX 治療前の PaO_2/F_IO_2 ratio、生存期間中央値、治療前後のエンドトキシン濃度などには両群で差を認めなかったが、PMX 治療前の inotropic score は改善群のほうが有意に高かった。すなわち、改善群では PMX 治療前に多量のカテコラミンを要していたことになる。改善群の致死率は 50%であったが、これは APACHEⅡ score から予想される 48.9%とほぼ同等であった。

＜考察＞

inotropic score は vasopressor score として使用されている。我々の検討でもドパミンやノルエピネフリンは昇圧治療として使用されており、患者の半数以上がノルエピネフリンおよびドパミンの併用であった。次いでノルエピネフリン、ドパミン、ドブタミンの 3 剤併用で、ノルエピネフリン単剤で治療した患者はほんのわずかであり、そうした背景から本検討ではノルエピネフリ

ン使用量ではなく inotropic score を採用した。その inotropic score は、PMX 治療前後で有意に改善がみられたため、PMX 治療により必要カテコラミン量が減少できたと考えるが、どのような要因が inotropic score 改善に寄与したかを探るため inotropic score 改善群と inotropic score に改善がみられなかった非改善群に分けて様々な項目を検討した。両群間で全身状態や呼吸状態などほとんどの要素に差は見られなかったが、改善群のほうが PMX 治療前の inotropic score が高く、一方で両群の治療開始前の平均動脈圧は同等であったことから、改善群のほうがより多くのカテコラミンを要する循環動態の悪化した状態であった。また平均動脈圧 1mmHg 上昇させるのに必要なカテコラミン量を示す vasopressor score も改善群で有意に高く、これは改善群のほうが末梢血管がより拡張していたことを示唆する。治療前の循環動態が悪く末梢血管が拡張していたと考えられる改善群では、PMX 治療後 inotropic score の有意な改善を認めた。もちろん低血圧の改善は PMX 治療以外の原因も考えられる。1 つは敗血症誘発性心筋症の状態が改善したことである。ドブタミンを使用した患者は多くなかったが、全例に心エコーを施行したわけではないので、これは完全に否定はできない。またもう 1 つは透過性亢進による血管内脱水の改善であるが、PMX 治療前の中心静脈圧は低値ではなく、治療前に脱水状態であったとは考えにくい。これらから、PMX 治療は末梢血管収縮に効果をもたらした要素の 1 つと考えられる。

PMX 治療により末梢血管が収縮する方向へむかった機序として、エンドトキシンだけでなく、血圧低下を惹起する内因性大麻であるアナンダマイド（ANA）と 2 アラキドニルグリセロール（2-AG）、あるいは一酸化窒素（NO）も PMX により吸着されることが報告されている。ANA と 2-AG はパラクラインメディエーターで、ショック時に末梢血管に分布するカンナビノイドレセプター1（CB1）を介して活性化する。ラット実験で ANA と 2-AG により CB1 レセプターを介した血圧低下をきたすことが複数の論文で報告されており、これらの吸着除去が血圧改善への一助となったと思われる。一方、NO は血管拡張に大きな役割を果たすほか、カテコラミンへの血管の反応を乏しくさせるという特徴があることが知られている。エンドトキシンが NO synthase(NOS)を強く誘導するほか、グラム陽性菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸、あるいは黄色ブドウ球菌の外毒素である toxic shock syndrome toxin-1（TSST-1）などによっても NO は産生される。大量に産生された NO は血管を拡張させショックをもたらす。実際 PMX 治療により最終 NO 分解産物が減少したことが報告されており、この NO の吸着除去による機序も考えられる。

本検討での呼吸状態の指標としての PaO_2/F_IO_2 ratio については、PMX 治療前後で有意な変化は見られなかったが、inotropic score の改善群、非改善群に分けた際の検討では治療後の PaO_2/F_IO_2 ratio は改善群のほうがより高値になっており、PMX 治療と PaO_2/F_IO_2 ratio の改善には全く関連がないわけではないと考える。イタリアで行われた EUPHAS study では PMX 治療により循環動態に加え酸素化も改善したと報告している。また、PaO_2/F_IO_2 ratio と IL-8、好中球エラスターゼといった炎症性メディエーターは負の相関があることを示す報告もあり、また別の報告では PMX により呼吸状態の改善がもたらされたが、それは接着分子や IL-8、好中球エラスターゼ、メタロプロテイナーゼ 9、tissue inhibitor of metalloproteinase 1 の減少と関連するとしている。

本検討は後ろ向き試験であるが、前向きの臨床試験に関しては、2005 年にヨーロッパで行われ

た無作為化試験がある。これは pilot study ではあるものの、PMX 治療により循環動態の改善がもたらされたと結論付けている。また、2009 年にイタリアで行われた多施設無作為化比較対照試験である EUPHAS study では、PMX 治療により呼吸、循環動態、死亡率などに改善がみられた。

今回の検討で問題点があるとすれば、1 つは調査期間が 9 年と長いことである。この間に集中治療の技術が進み、薬剤や医療機器の進歩がある。長期間のデータは検討結果に影響を与えた可能性がある。またもう 1 つはこの検討が後ろ向き試験であることである。日本では 1994 年よりすでに敗血症性ショック患者に PMX 治療は保険適応となっており、PMX 治療をしないという選択肢は倫理的に選びにくい。そのため日本では敗血症性ショックにおける PMX についての study の多くは後ろ向きでかつ control 群をおけない状況となっている。そこで海外での臨床試験に期待したいが、ヨーロッパでは ABDO-MIX 試験が、アメリカでは EUPHRATES 試験が行われ、前者では残念ながら PMX 使用群と使用してない群で死亡率に差を認めなかった。しかしこの試験は血栓で PMX 回路が詰まってしまう率が高かった、などのいくつか問題がある、と指摘されている。EUPHRATES 試験については、今後報告される結果に期待したい。

＜結論＞

敗血症性ショックでは末梢血管が拡張しているため多量のカテコラミンを要し、inotropic score は高くなる。我々の検討において、PMX 治療により敗血症患者の循環動態の改善がみられることが示唆された。特に、末梢血管が過剰に拡張している状態でより効果がみられると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5139　号	杉浦　真貴子
論文審査担当者	主　査　大友 康裕 副　査　槇田浩史、蘇原 映誠	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

エンドトキシン吸着療法（PMX）行った 78 名を対象とし、後方視的に治療前後の状態を比較し、本治療が有効である症例群について検討した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

PMX 治療の敗血症症例に対する有効性を示す数多くの先行研究がある。一方、PMX 治療をしていても恩恵にあずからない患者もおり、PMX がどのような状態の患者に効果をもたらすかは明らかでない。本研究では、PMX の臨床効果について後ろ向きに検討し、治療前の inotropic score が有意に高く、カテコラミンが多量に必要な状態の患者で、PMX 治療による循環改善効果が有意に高いことを、初めて明らかにした点が評価に値するものである。

２）社会的意義

エンドトキシン吸着療法である PMX 治療は、ポリミキシン B 固定化カラムを用いて直接血液灌流を行うことにより血中のエンドトキシンを吸着除去する治療法であり、日本では 1994 年から保険適応となり、敗血症性ショック患者の治療に使用されている。しかし大規模コントロール無作為試験が実施される前の保険収載であったことから、科学的根拠をもって、本治療の適応症例が決められておらず、実臨床の現場において混乱が生じている。本研究の結果は、PMX 治療の明確な適応基準の策定に寄与するものであり、臨床的に極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

2004 年 4 月から 2013 年 7 月までに東京医科歯科大学医学部附属病院の集中治療室に重症敗血症あるいは敗血症性ショックのために入室し、PMX の治療を行った 78 名を対象とした。検討項目は循環動態（平均動脈圧、inotropic score、vasopressor dependency index）、酸素化能（PaO_2/F_IO_2 ratio）、血中エンドトキシン濃度、血清乳酸値、生存期間、微生物学的データ、APACHEⅡ score、SOFA score とした。PMX は重症敗血症あるいは敗血症性ショックと診断後 24 時間以内に開始し、少なくとも 2 時間以上使用した。データ解析の段階で 28 日生存の改善に寄与していた inotropic score に注目し、（PMX 治療前 inotropic score－PMX 治療後 inotropic score）＞0 の患者を改善群、（PMX 治療前 inotropic score－PMX 治療後 inotropic score）≦0 の患者を非改善群の 2 群に分けた検討が行われた。

本研究は十分な集中治療学的知識、統計学的知識の裏付けのもとに遂行されている。

４）考察・今後の発展性

本検討は後ろ向き試験であり、新しいデータを追加して解析することは不可能であり、本研究自体の今後の発展は期待できない。しかし、これまでの大規模な前向き臨床試験である EUPHAS study や ABDO-MIX study などでは明らかにされていない、PMX 治療が有効となる症例群に関して、本研究の結果が、今後実施される大規模な前向き臨床試験の研究計画に反映されることによって、今後の発展につながることが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	木野　智幸
論文審査担当者	主査　吉田　雅幸 副査　澁谷　浩司、横田　隆徳
論　文　題　目	Effect of N-arachidonoyl-L-serine on human cerebromicrovascular endothelium

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

内因性カンナビノイドは生体の恒常性を保つために多くの生理機能に関与していると考えられている。例えば脳虚血や頭部外傷において、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸のシナプスにおける大量放出を抑制する神経保護的な作用や、また障害された脳血管における blood-brain barrier の透過性を減少させる血管保護効果なども報告されている。

N-arachidonoyl-L-serine（ARA-S）は内因性脂質であり、内因性カンナビノイドの一つである N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide)と化学構造および生理作用に類似性がある物質である。ARA-S も血管作動性および神経保護作用を有するが、文献的には古典的カンナビノイド受容体である CB1, CB2 受容体への親和性は低いとされ、他のカンナビノイドと一線を画して“カンナビノイド様物質”などとも呼ばれている。ARA-S による内皮細胞依存性血管拡張作用に関する最初の報告でも、CB1, CB2, TRPV1 受容体に対する各阻害剤によって効果は抑制されなかった。本研究において、ヒト脳毛細血管内皮細胞（HBEC）における CB1, CB2 受容体蛍光免疫染色は ARA-S の投与により増強され、かつその反応は選択的受容体阻害剤により抑制された。また ARA-S は HBEC のアクチン細胞骨格の構造変化を誘導することが確認され、強力な血管収縮物質である endothelin-1 (ET-1)投与下においても同様の効果が認められた。さらに ARA-S は種々のシグナル分子（MAPK, Akt, JNK, c-Jun）を活性化し、アクチン細胞骨格への影響ともども CB1, CB2, TRPV1 受容体を介することが確認された。また ARA-S によるシグナル分子の活性化およびアクチン細胞骨格の構造変化には Rho/Rock 経路と PI3K/Akt/NO 経路が関与していることが示された。MAPK, JNK, c-Jun の活性化は Rho/ROCK 阻害剤である H1152 の投与により抑制された一方 Akt では増強された。今回の研究により ARA-S は Rho キナーゼ活性の調節に重要な作用を及ぼし、その結果内皮細胞における細胞骨格と関連した必須細胞機能である血管拡張作用や増殖、運動などに影響しえると考えられた。

〈緒言〉

内皮細胞は blood-brain barrier における主要な構成要素であり、血管抵抗や脳血流におおきな影響を及ぼしている。また内因性や外因性の血管作動物質に反応して様々な機能を有することが

知られている。内皮細胞は CB1, CB2 受容体を発現しており、2-AG や anandamide など内因性カンナビノイドが結合するとカルシウムイオンの細胞内流入が誘発されアクチン細胞骨格の構造変化が引き起こされる。強力な血管収縮物質である ET-1 投与下でもその反応は同様である。

N-arachidonoyl-L-serine（ARA-S）は脳内で発見された内因性の生理活性脂質の一つであり、内因性カンナビノイドの一つである N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide)と化学構造および生理作用に類似性があることが文献的に報告されている。しかしながら ARA-S は古典的カンナビノイド受容体である CB1, CB2 受容体への親和性は低いとされ、他の内因性カンナビノイドとは対照的に“カンナビノイド様”物質とみなされてきた。

ある文献では ARA-S の作用は GPR55 受容体が関与すると報告されているが、一方で GPR55 受容体は関与していないとする文献もある。

上記文献を踏まえ本研究では“カンナビノイド様”物質とされる ARA-S の、ヒト脳毛細血管内皮細胞（HBEC）におけるアクチン細胞骨格およびシグナル伝達経路への作用を検証した。

〈方法〉

培養ヒト脳毛細血管内皮細胞（HBEC）に、異なるシグナル伝達経路の阻害剤および受容体拮抗薬をそれぞれ単独または ARA-S、ET-1 とともに投与した。Western Blot により各シグナル分子（Akt, MAPK, c-Jun, JNK）のリン酸化を評価した。HBEC における CB-1, CB-2 受容体の評価は特異的抗体を作用させ蛍光免疫染色をおこなった。HBEC のアクチン細胞骨格の評価として F-actin に特異的に結合するファロイジンを用いた。なお蛍光免疫染色はコンフォーカル顕微鏡を用いて撮影し、蛍光強度は ROI を設定して定量を行った。

〈結果〉

ARA-S の CB1, CB2 受容体への効果：

CB1 および CB2 受容体の蛍光免疫染色にて ARA-S を投与した HBEC では、コントロールと比較して細胞質および核において両者とも蛍光強度が増加している（Figure 1）。細胞質における受容体の蛍光様式は均一に広がる顆粒状を呈しており、核周囲はより高密度である。一方で核内では斑状であり、細胞質と比較して分節状かつより明瞭である（Figure 1B, E 参照）。ARA-S 投与により増強された相対的蛍光強度は各受容体の阻害剤により抑制または消去された（Figure1C, F 参照）。

ARA-S の様々なシグナル伝達経路における活性化作用：

HBEC における ARA-S 投与により MAPK のリン酸化率はコントロール群と比較して 2～2.5 倍に増加した（Figure 2A, Table 1A）。c-JUN ではコントロール群よりおよそ 1.5 倍の増加であった（Table 1A）。Akt では 2～2.5 倍であった（Figure 2B, Table 1A）。これらすべてのシグナル分子のリン酸化は、CB1, CB2, TRPV1 受容体の阻害剤を投与した各群において抑制された。各受容体阻害剤における抑制作用に明らかな程度の差は認められなかった。今回の実験で MAPK 以外のシグナル分子のリン酸化は、PI3/Akt キナーゼ阻害剤（LY294002）によりほぼ完全に抑制された（Table 1B）。

ARA-S による MAPK, JNK, c-JUN 各シグナル分子のリン酸化は、Rho/Rock 経路の阻害剤である H1152 を投与した群において抑制された（Table 1B）。興味深いことに、H1152 を投与した場合、Akt のリン酸化は 3 倍以上に増強された（Figure 2B, Table 1B）。ARA-S による活性化は LY294002 により抑制された（Table 1B）。さらに ARA-S による Akt の活性化は eNOS 阻害剤である L-NAME により 50%抑制された。

ARA-S および ET-1 のアクチン細胞骨格における作用：
細胞骨格分子であるアクチンに対する影響を評価した実験で、ARA-S を投与した HBEC における細胞骨格に形態的変化が認められ、その繊維束はコントロール群と比較して不明瞭化していた（Figure 3A, B）。アクチンの蛍光強度における半定量的測定ではコントロールとの間に有意差は認められなかった（Table 2）。ET-1 投与群ではコントロール群と比較してより明瞭な太い繊維束であり、蛍光強度に明らかな有意差を認めた（Figure 3A, C）。ET-1 投与により誘発されたアクチン細胞骨格の構造変化は ARA-S 投与により改変され、繊維束の太さは減少して希薄となり、蛍光強度も減少した（Figure 3D, Table 2）。
ET-1 投与 HBEC における ARA-S 投与効果は、CB1 または CB2 受容体阻害剤で前処置した群で形態的変化がみられた（Figure 3E, F）が、CB-1 阻害剤では ARA-S による ET-1 の蛍光強度増強に対する抑制効果の減少はなかった（Table 2）。一方 CB-2 阻害剤では ARA-S による抑制効果の減少を認めた（Table 2）。PI3K/Akt 阻害剤（LY294002）を投与した群でも同様に抑制効果は減少した（Figure 3G）。これに対して Rho/Rock 阻害剤（H1152）を投与した群では蛍光強度が増加しただけでなく、アクチン細胞骨格は粉砕されたような形態となった（Figure 3H）。L-NAME を作用させた群では PI3K/Akt 阻害剤（LY294002）を投与した群と同様に ET-1 作用に対する ARA-S の抑制的作用は減少した（Figure 3I）。

〈考察〉
以上の実験結果より ARA-S は HBEC においてストレスに関連し、アクチン細胞骨格の構造変化に関係するシグナル伝達経路を活性化することが示された。ARA-S 単独または ET-1 との組み合わせ投与による細胞骨格アクチンへの影響は CB1, CB2, TRPV1 受容体阻害剤または L-NAME により抑制された。ARA-S の投与により上昇したカンナビノイド受容体の蛍光強度が CB-1, CB-2 受容体阻害剤により抑制されたことから、ARA-S の効果は同受容体を介して行われていることがわかる。
ARA-S により誘導された血管拡張作用および血管新生促進作用がカンナビノイド受容体阻害剤により抑制されず、ARA-S が古典的カンナビノイド受容体（CB1, CB2 受容体）と親和性が低いと結論した文献に対して、今回の実験結果は対照的といえる。一方で ARA-S による神経保護作用は CB2 受容体のみを介するという文献や、ニューロン新生促進作用が CB1, CB2 受容体を介するという文献もある。これら実験結果の差異は、用いた細胞が由来する血管、器官、生物種などの違いによるものかもしれない。

毛細血管内皮細胞の細胞質および核におけるカンナビノイド受容体の存在は以前より報告があ

るものの、今回のカンナビノイド受容体蛍光免疫染色で確認された ARA-S による内皮細胞の細胞質および核内受容体の増強効果は、カンナビノイドに対する細胞質のみでなく核の反応性を示唆しており、その意味では初の報告である。

今回の結果で ARA-S に対して核内受容体に反応が見られたことは ARA-S が脂質であり、以前の報告にあるような他の脂質様物質や成長因子が核内受容体に作用することと矛盾しない。脂質により活性化される核内受容体の役割に関しては以前から報告があるが、いまだ完全な理解には至っていない。多くの文献で脂肪酸およびその誘導体であるエイコサノイド、リン脂質、スフィンゴ脂質などが核内受容体を活性化することが報告されており、カンナビノイドに類似した物質も含まれている。ARA-S もこれらの脂質と同じように核内受容体に結合し活性化しているのかもしれない。

ARA-S 単独または ET-1 との組み合わせで誘導される細胞骨格の構造変化は、CB-1, CB-2, TRPV-1 受容体に対する各阻害剤により抑制された（Figure 3, Table 2）ことから、それら受容体を介することが示された。さらに Rho/ROCK および PI3K/Akt/NO 経路も介することが確認された。我々の予備実験において ARA-S は HBEC における Rho キナーゼ活性をコントロールより 30%減少させた。また一方で Akt 活性を 50%増強した。

以前我々は NO, 2AG, ET-1 などの血管作動性物質が HBEC の細胞骨格に影響を及ぼすと報告をした。ET-1 による細胞骨格の構造変化に対する ARA-S の抑制的作用は GTPase を直接的に阻害するのか、間接的に阻害するのかは現在まで明らかになっていない。Rho-GTPase は現在まで広く研究されており、細胞骨格アクチンの安定化に作用している。な RhoA は活性状態になると微小管と微小線維の動的相互作用を調節して細胞の構造を制御している。この作用は下流にある ROCK1 や ROCK2 など特定のイフェクター蛋白に結合し活性化することで行われる。RhoA は ROCK の活性化に引き続き、アクチン細胞骨格のリモデリングやアクチンの安定化、アクチンと細胞膜の結合などにおける制御因子となる。

ARA-S が PI3/ Akt 経路を介して血管拡張作用や血管新生、虚血、外傷などに作用することは実験的に確認されてきたが、RhoA 活性の抑制を介することは現在まで研究されていない。RhoA/Rock 活性の抑制は細胞骨格の変化に影響することは文献的に周知されていることであり、今回の実験でコントロールおよび（血管収縮作用の最も強い物質である）ET-1 を作用させた HBEC において ARA-S によりアクチン細胞骨格が変化したのは、RhoA 活性が抑制されたことによって引き起こされている可能性が最も考えられる。

かつての報告において Rho キナーゼ活性が抑制されることで PI3/Akt 系に影響し、細胞遊走や分化、細胞骨格の再構成などが調節されることが示されている（Figure 4）。また多くの文献で Rho/ROCK 経路の賦活や抑制がこれらの生物作用において主役を演じると結論している。今回の実験で ARA-S による細胞骨格の構造変化は PI3/Akt 経路を介する NO シグナル伝達系の活性化が関与していることが示された(Figure 4)。ARA-S は HBEC において機能的活性を有する

Rho/ROCK 経路のモジュレーターとして作用することが強く示唆された。ARA-S は血管拡張作用など、その特性として血管障害の治療に有用な可能性があると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5140　号	木野　智幸
論文審査担当者	主　査　吉田　雅幸 副　査　澁谷　浩司、横田　隆徳	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本研究では、内因性カンナビノイドに類似したN-arachidonoyl-L-serine（ARA-S）の脳血管内皮細胞に対する影響を検討することを目的とした。内因性カンナビノイドは生体の恒常性を保つために多くの生理機能に関与していると考えられている。例えば脳虚血や頭部外傷において、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸のシナプスにおける大量放出を抑制する神経保護的な作用が報告されている。本研究では培養血管内皮細胞を用いて、ARS-Sを添加した際におこる細胞骨格の変化を検討した。今回の研究によりARA-SはRhoキナーゼ活性の調節に重要な作用を及ぼし、その結果内皮細胞における細胞骨格と関連した必須細胞機能である血管拡張作用や増殖、運動などに影響しえると考えられた。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

N-arachidonoyl-L-serine（ARA-S）は脳内で発見された内因性の生理活性脂質の一つであり、内因性カンナビノイドの一つである N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide)と化学構造および生理作用に類似性があることが文献的に報告されている。しかしながら ARA-S は古典的カンナビノイド受容体である CB1, CB2 受容体への親和性は低いとされ、他の内因性カンナビノイドとは対照的に“カンナビノイド様”物質とみなされてきた。本研究では ARS-S の血管内皮細胞に対する影響を観察するものであり、これまでにない着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究では ARA-S による細胞骨格の構造変化が PI3/Akt 経路を介する NO シグナル伝達系の活性化によることが示され、ARA-S が HBEC において機能的活性を有する Rho/ROCK 経路のモジュレーターとして作用することが強く示唆された。ARA-S は血管拡張作用など、その特性として血管障害の治療に有用な可能性があると考えられる。

３）研究方法・倫理観

培養ヒト脳毛細血管内皮細胞（HBEC）に、異なるシグナル伝達経路の阻害剤および受容体拮抗薬をそれぞれ単独または ARA-S、ET-1 とともに投与した。Western Blot により各シグナル分子（Akt, MAPK, c-Jun, JNK）のリン酸化を評価した。HBEC における CB-1, CB-2 受容体の評価は特異的抗体を作用させ蛍光免疫染色をおこなった。HBEC のアクチン細胞骨格の評価として F-actin に特異的に結合するファロイジンを用いた。なお蛍光免疫染色はコンフォーカル顕微鏡を用いて撮影し、蛍光強度は ROI を設定して定量を行った。人を対象とした検討は行われておらず、

倫理審査の対象ではない。

４）考察・今後の発展性

本研究でみられた ARA-S の作用は興味深く、今後の頭部外傷治療への応用が期待された。

３．その他

特記すべきことなし。

４．審査結果

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5141　号	日比谷　秀爾
論文審査担当者	主　査　小川　佳宏 副　査　山岡　昇司、神奈木　真理	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、大腸上皮細胞のオルガノイド形成法を用いて長期間の腸炎モデルを作製し、長期間の炎症における大腸上皮細胞の形質変化と遺伝子発現変化を検討した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

潰瘍性大腸炎（UC）は長期にわたり腸管に炎症持続をきたす難治性疾患である。従来、腸管上皮細胞のバリア機能低下が病態に関与していることが知られていたが、正常な大腸上皮細胞が長期間炎症に暴露されることによる影響はこれまで不明であった。本研究は、近年確立された腸上皮オルガノイド培養技術を用いて腸炎モデルを構築･解析した先駆的な研究であると考えられる。

２）社会的意義

本研究で確立した腸炎モデルにより、1 年以上にわたって腸管上皮細胞の炎症性変化を経時的に解析することが可能となった。慢性化した炎症により生じる腸上皮細胞の形質変化の一部が UC 患者において認められる形質変化と一致していたことより、本研究は炎症性腸疾患の病態解明に資するものと考えられる。

３）研究方法・倫理観

本研究では、培養マウス初代大腸上皮細胞に炎症誘導分子を添加して 1 年以上にわたって観察し RT-PCR 法・マイクロアレイ法および免疫染色法により、NF-κB シグナルの持続的な活性化、UC の病態に関与する DUOXA2 の発現増幅、炎症誘導分子除去後にも炎症状態が持続すること、慢性炎症による遺伝子変化を見出した。本研究は本学動物実験委員会にも承認されており、倫理上の問題はない。

４）考察・今後の発展性

本研究により、慢性炎症による認められる遺伝子変化は UC の炎症性腸管変化のマーカーになり得る。本研究の腸炎モデルはヒト大腸初代培養細胞にも応用可能であり、長期間の炎症による発癌過程の解析や個別の UC 患者の炎症発癌の危険度の予測に資する可能性がある。

３．その他

特記すべきことなし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	日比谷　秀爾
論文審査担当者	主査　小川　佳宏 副査　山岡　昇司、神奈木　真理
論　文　題　目	Long-term Inflammation Transforms Intestinal Epithelial Cells of Colonic Organoids

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

潰瘍性大腸炎の患者は罹患期間に応じて炎症性発癌の罹患率が高くなることが報告されているが、その機序はいまだ解明されていない。我々の研究室で開発された大腸初代上皮細胞培養法を用い、長期間炎症を惹起することにより起こる形質変化を解析することを目的とした。マウス大腸上皮を培養し、慢性的な炎症状態を模倣するために、サイトカイン・細菌由来成分の混合物を培地内に添加し、1 年以上の期間にわたり培養を継続した。炎症物質による刺激によって、NF-κB シグナルの標的遺伝子の発現が刺激期間により増幅した。マイクロアレイを用いた解析では、NF-κB シグナル関連遺伝子群の活性化を認めた。刺激期間により NF-κB シグナル活性が増強することが示唆された。刺激後にサイトカインを除去することでシグナル活性が解除されるか検討したところ、長期間刺激で増幅した NF-κB シグナル応答は除去後も残存し、長期間の炎症により非可逆的な NF-κB シグナル活性が引き起こされることが明らかとなった。今回の実験結果より、慢性炎症による非可逆的な NF-κB シグナル亢進が炎症発癌の過程の 1 つの現象をみている可能性が示唆された。

＜緒言＞

潰瘍性大腸炎の患者は罹患期間に応じて炎症性発癌の罹患率が高くなることが報告されており、診断から 8～10 年以後に罹患率が増加することが報告されている。潰瘍性大腸炎患者の大腸癌への罹患率は、健常者に比べて 20～30 倍となっている。日本を含むアジア各国では、炎症性腸疾患の罹患率は増加しており、炎症性発癌の患者数が増加することが予想される。炎症発癌は癌の悪性度が高く通常の大腸癌よりも予後不良であり、散発性大腸癌とは性質が異なると考えられる。以前、我々は、大腸癌細胞は炎症の存在による NF-κB シグナルの活性化によって、粘液癌・印環細胞癌に似た粘液形質と癌幹細胞形質を発現し、抗癌剤耐性をもたらすことを報告したが、大腸上皮細胞が炎症発癌に至る機構は解明されていない。また、炎症発癌の実験動物モデルとして、azoxymethane/dextran (AOM-DSS)誘導炎症性発癌マウスが知られており、NF-κB やサイトカインによるシグナルが炎症性発癌に関与していることが報告されているものの、大腸上皮細胞の癌化の過程に解明は至っていない。大腸上皮の初代培養法により、オルガノイドとよば

れる立体構造物を形成した状態で培養の継続が可能となり、長期間にわたる刺激に対する応答の解析をすることが可能となった。本論文の目的は、正常な大腸上皮細胞が長期間の炎症による変化を調べ。その変化の原因となる要素を同定することを目的とした。

＜方法＞

8 週齢 C57BL/6J 雌マウスの大腸上皮を Tokyo Medical and Dental University 法(Nat Med. 2012)を用いて単離、培養した。1 週間ごとに継代により 2 倍に細胞数を増やし実験に用いた。培地(TMDU medium)には既報により関連が示唆されている分子を考慮して、以下にあげる分子を選択し、培地に 1 日おきに添加した：200ng/ml azoxymethane(AOM), 100ng/ml lipopolysaccharide (LPS), 100ng/ml flagellin, 100ng/ml mouse tumor necrosis factor-α (TNF-α), 10ng/ml interleukin-1β (IL-1β) ,10ng/ml interleukin-6 (IL-6)。刺激後のオルガノイドから RNA を抽出しマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。また、cDNA を合成の上定量 PCR による解析を行った。免疫染色により、細胞内の NF-κB p65 の局在を調べた。活性酸素種の存在を調べるため、CellROX® Deep RedStress Reagents (Life technologies) を TMDU medium 内に 1 日間添加した後、共焦点蛍光顕微鏡で解析した。

＜結果＞

大腸培養細胞の炎症関連物質の細胞表面のレセプターの発現を定量 PCR にて解析したところ、IL-1R、TLR5 の発現が低値であった。すべてのリガンドに対応する分子の応答を調べたところ、個々の分子の刺激により NF-κB シグナルの標的遺伝子 IL-8 の発現上昇を認めた。炎症惹起分子すべてを添加して刺激を行ったところ IL-8 の相加的なシグナルの増強を認めた。すべてのサイトカインを混合して添加すると、一番強く NF-κB シグナルが惹起された。

炎症性腸疾患の腸管の慢性炎症を模倣するために、すべての炎症惹起分子を用いてオルガノイドに持続刺激を行った。60 週間の炎症刺激後にマイクロアレイ解析を行ったところ、GSEA を用いた解析法で NF-κB シグナル活性を示す遺伝子セットの上昇を認めた。また、発現上昇した遺伝子の中に NF-κB の標的遺伝子である DUOXA2 を認めた。刺激開始後 3 時間から 60 週までの各段階のオルガノイドを定量 PCR にて解析したところ、DUOXA2 は刺激時間にともない発現が増幅し続けた。また、NF-κB p65 の免疫染色では、長期間炎症刺激を行った群は、短時間刺激の群と比べて強く核内が染色され、サイトカイン刺激の期間により NF-κB シグナル活性が増幅する可能性が示唆された。

持続炎症刺激により NF-κB シグナルが惹起し続けることから、細胞が形質転換しているものと考え、刺激を除去することでシグナル活性化が解除されるか検討した。持続炎症刺激後に炎症惹起分子を除去して培養し、定量 PCR にて DUOXA2 の発現を調べたところ。35 週間の持続炎症刺激後に炎症惹起分子を除去した群では、刺激除去後 11 週も IL-8, DUOXA2 の発現を認めた一方、3 時間のみの炎症刺激後に炎症惹起分子を除去した群では DUOXA2 の発現を認めなかった。NF-κB p65 免疫染色では、刺激除去後 15 週時点でも核内が染色される細胞を認めた。長期炎症持続刺激後のオルガノイドは NF-κB シグナル応答の残存を認め、応答が非可逆である可能性が示唆された。DUOXA2 は炎症発癌に関与する活性酸素を生成する酵素であることから、活

性酸素の状態を CellROX®を用いて観察したところ、刺激除去後 11 週のオルガノイドでも活性酸素が観察された。持続刺激後のオルガノイドの酸化ストレス状態も非可逆であることが示唆された。

最後に、長期間の炎症による細胞変化を調べるために、無刺激、12 週間、60 週間の炎症刺激後のマイクロアレイによる遺伝子発現を比較したところ、0 週から 12 週での変化は乏しい一方で、12 週から 60 週の刺激で発現が変化する遺伝子を認めた。長期間の炎症によりこれらの遺伝子群の変化が惹起されているものと示唆された。

＜考察＞

本研究で確立した in vitro のモデルでは 1 年以上にわたる上皮細胞の変化の過程を解析することが可能となり、特定の炎症惹起分子による長期間の炎症による、大腸上皮細胞の形質変化を示した初めての研究となった。炎症惹起分子の量は一定であるにもかかわらず、大腸上皮細胞の NF-κB シグナルは刺激の時間により増幅することが明らかとなった。特に、DUOXA2 は活性酸素を産生する酵素であり潰瘍性大腸炎の炎症に関与していることが報告されていること、また 60 週間の炎症刺激後の解析でもっとも上昇していた Neurotensin も長期炎症による発癌に関与していることが報告されていることから、本研究での in vitro のモデルは潰瘍性大腸炎を模倣できているものと考えられる。NF-κB p65 が長期間の刺激で強く核内移行する機構は本研究では解明できておらず、NF-κB 経路を今後解析する必要がある。

本研究の in vitro モデルの利点は長期間の遺伝子発現プロファイルの変化を調べることが可能となることである。本研究では、12 週間の刺激では変化が乏しいものの、60 週間の刺激後に劇的に発現が変化した遺伝子を同定可能であった。これらの遺伝子群は、酸化ストレスや発癌に関連が報告されている遺伝子を認めた。これらの遺伝子のさらなる解析により、炎症関連発癌機構の解明に役立つものと考えられる。

長期間の刺激により惹起される NF-κB シグナル活性は刺激除去後も残存することがあきらかとなった。活性酸素の産生も長期間刺激後に残存しており、細胞が形質転換しているものと考えられた。しかしながら、本研究での長期間刺激後のオルガノイドはがん化していないことから、発癌に至るためはさらなる別の因子が必要であることが示唆された。今後、本研究の in vitro モデルを解析していくことで、炎症発癌モデルの確立することが求められる。今回のモデルはヒト大腸初代培養細胞にも使用することが可能であり、長期間の炎症による発癌過程の解析や、潰瘍性大腸炎の個々の患者の炎症発癌の危険度の解析の予測システムの構築に応用が可能となると考えられる。

＜結論＞

本研究の炎症モデルにより、大腸炎の in vivo での環境を模倣した状態を in vitro で構築することが可能となった。本モデルを用いて持続炎症の過程での細胞の変化を詳細に調べることにより、潰瘍性大腸炎における上皮細胞に対する慢性炎症の影響のさらなる解析が可能となると考えられた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	伊豆上　智子
論文審査担当者	主査　河原　和夫 副査　伏見　清秀、川渕　孝一
論　文　題　目	Consumer Perception of Inpatient Medical Services

（論文内容の要旨）

要旨

【背景】医療サービスマネジメントに消費者側の視点を反映する取り組みが浸透しつつあるが、消費者側の視点で医療サービス評価を推進するには医療サービスに対する消費者側の認識を詳細に把握する試みが十分ではない。本研究の目的は、医療サービスの消費者が医療機関で受けた医療サービスをどう認識しているのか、入院医療の場に焦点を当てて記述的に明らかにすることである。

【方法】5 日以上の入院を経験した 10 名の成人に半構成的面接を行って入手した記述データを継続的比較分析した。

【結果】医療サービスの消費者の入院中の認識対象を表す 5 つのカテゴリー、1）医療サービスの行為、2）医療専門職による説明、3）医療サービス提供者の様子、4）身体の感覚、5）自分で見た身体の状態、とこれらの認識対象を認識した後の反応が抽出された。認識対象を認識した後の反応のうち、入院前に予想したことと比較する反応は、医療サービスの消費者が認識した対象を確かめる重要な反応である様子が示された。

【結論】入院医療サービスの認識対象に対する反応から、医療サービスの消費者が様々な認識対象に関心をもちながら医療に参加している様子が明らかになった。入院医療サービスの消費者が認識している入院前の予想は、入院医療サービスの評価に大きく影響する要素である可能性が示された。

緒言

消費者側の視点の重要性は医療サービスマネジメントにも浸透しつつある。医療サービスの消費者である患者やクライエントが、自分の受ける医療サービスを決定するプロセスには、自分の健康状態の判断、選択肢となる医療サービスの種類や内容に関する情報の入手、自分に適した医療サービスの選択が含まれており、このプロセスに含まれる判断や選択には医療に関する高度な専門知識が必要である。一般サービスの消費者の場合は、自身の購買動機や目的に適うサービスを消費者自身が判断し選択できるが、医療サービスのような専門サービスの場合は、サービスを提供する専門職が消費者のサービスニーズを明確化する段階から関わり、消費者のサービス生産

活動への参加を促している。

医療サービスの評価で消費者側の視点を示す臨床指標として普及した患者満足度の調査結果は、医療サービス改善や向上に資する具体的行動を導くことにあまり貢献していないようである。患者満足度は医療の質評価の枠組みのアウトカム評価の指標であるが、医療提供者側の視点で用意した評価項目に対して回答を求めたものが多い。サービスに対する消費者の期待と実際の経験の差を把握する測定尺度 SERVQUAL を用いた医療サービス評価に加え、消費者側の視点として患者の経験や認識に着目した研究が近年増えている。米国の the Hospital Consumer Assessment of Healthcare Providers and Systems (HCAHPS) Hospital Survey は、医療サービス経験直後の消費者の認識に基づきサービスの経験を評価する質問紙調査である。質問紙調査の利点は多いが質問項目以外の内容把握は難しく、医療サービスの消費者の認識を具体的に把握するには、消費者の自由な視点で認識内容を表現してもらう必要がある。

研究目的

本研究の目的は、医療サービスの消費者が医療機関で受けた医療サービスをどのように認識しているのか、入院医療の場に焦点を当てて明らかにすることである。

研究方法

研究対象は 5 日以上の入院(産科、美容形成外科、小児科、精神科の入院と救急搬送入院を除く)を経験した成人とし、日本国内の 2 つの病院での研究参加者を募集した。

データ収集は、研究参加者の属性に関する項目(年齢、性別、入院回数)と、面接実施日の直近の入院で受けた医療サービスに関する項目を含むインタビューガイド(資料 1)に基づく半構成的面接により実施した。

データ分析は、研究参加者 1 名分の逐語録毎に継続的比較分析を行った。

研究参加者の概要は、5 日以上の入院を経験した成人 10 名(男性 6 名、女性 4 名)で、年齢は 28～84 歳（平均年齢 63.5 歳）、入院回数は 1～10 回（平均 4 回）だった。面接は 2015 年 2 月から 2015 年 10 月に実施し、面接時間は 38～93 分(平均 64.5 分)であった。

結果

医療サービスの消費者(以下、結果の文中では消費者)の入院中の認識対象と、認識対象毎の対象認識後の反応を表 1 にまとめた。入院中の認識対象を示すカテゴリーとして、医療サービスの行為、医療専門職による説明、医療サービス提供者の様子、身体の感覚、自分で見た身体の状態後の反応の 5 つが抽出された(以下、{}:認識対象、“ ”:認識対象サブカテゴリー、< >:対象認識後の反応)。

{医療サービスの行為}の“手術”や“内視鏡治療”は、消費者が<抵抗できない心情になり>、<いやな気持ちになる>ことである。今回初めての{医療サービスの行為}では<初めての出来事を体感し>、<入院前の予想と比較する>。過去に同様の{医療サービスの行為}の経験がある場合、今回受ける{医療サービスの行為}を<過去の治療経験と比較>し、<入院前の予想と比較する>。自分が受けた{医療サービスの行為}を<入院前の予想と比較>して、入院前の予想と違うと感じた時、その<

理由を探す>。

{医療専門職による説明}の“治療経過や結果の説明”を受けた消費者は、その内容を<入院前の予想と比較し>、内容によっては<考えないように努める>。消費者にとって入院中に出会った入院前の予想と違うことに関する“治療経過や結果の説明”には<納得できない気持ちになり>、受けた説明の<理由を探す>も<納得出来ない気持ちになることがある。“治療に必要な行動の説明”を受けた消費者は<説明に従って行動する>。過去に同様の{医療サービスの行為}を経験した消費者は、今回受けた“治療に必要な行動の説明”と<過去の治療経験を比較する>。入院前に“治療に必要な行動の説明”を受けていた消費者は、<説明に従って行動し>つつ、<入院前の予想と比較する>。入院前の予想と違うことに出会った消費者は<質問する>。“ナースコールの説明”を受けた消費者の反応のうち<ナースコールを押さない>反応に至った経緯は多様であった(論文中に 3 事例を示した)。

消費者は入院中に出会った{医療サービス提供者の様子}を<観察して>、観察した{医療サービス提供者の様子}の<理由を探す>。

“痛み”を感じた消費者は、その“痛み”の<理由を探し>ながら<入院前の予想と比較する>。過去に同様の{医療サービスの行為}を経験した消費者は、現在の{身体の感覚}を<過去の治療経験と比較し>てその<理由を探し>つつ<入院前の予想と比較する>。“痛み”の<理由を探す>消費者は“痛み”を<入院前の予想と比較し>て、<質問し>て予想と違うことが起きているのか否か確かめようとする。

消費者が{自分で見た身体の状態}では、“医療機器が接続されている身体”に<いやな気持ちになる>。“身体に接続されているチューブの内容物”を心配した消費者は<質問する>。自分の目で見た“手術創”や“出血”を<入院前の予想と比較する>消費者は、予想と違うことが起きている可能性を感じて{自分で見た身体の状態}の<理由を探す>。

考察

医療サービスの消費者が経験した入院医療サービスの認識対象 5 つが本研究により明らかになった。入院医療サービスの認識対象に対する反応を表す各事例には、医療サービスの消費者が様々な認識対象に関心をもって医療サービスの場に参加している様子が示された。“治療に必要な行動の説明”や“ナースコールの説明”は、目的の医療サービスを安全に提供するためのものであり、医療サービスの消費者が説明内容に従い行動する様子は、サービスの共同生産の場面を表している。{医療専門職による説明}に示した原因不明の痛みを感じつつもナースコールを押さない事例では、ナースコールを押すべき状況を消費者側が具体的に把握していない可能性がうかがえた。臨床実践への示唆として、医療サービスの提供者側が医療サービスの消費者に対して期待している行動を説明する場合には、その行動を医療サービスの消費者が確実に達成できるように工夫した説明が必要である。

本研究により、入院医療サービスの消費者の医療サービスに対する期待に相当する認識対象を<入院前に予想したことと比較する>様子が示された。また、本研究の参加者が語った入院前の予想と違うことに出会った場面には、結果に示した全場面で入院中の認識対象を<入院前に予想したことと比較する>した結果、予想と違うと感じる様子が示された。これらの結果に示された入

院医療サービスの消費者の<入院前に予想したことと比較する>の帰結には、消費者側の視点で捉えた入院中の医療サービスの評価が含まれている。この評価はまさしく Donabedian による医療サービスの質評価の枠組みの process 評価に相当する。また、入院前に予想した内容が入院医療サービスに対する消費者の期待を表すことから、<入院前に予想したことと比較する>ことはサービス消費者の期待と実際の経験のギャップを把握してサービス品質を測定する SERVQUAL の測定対象やサービス研究の主張と一致する結果であり、医療サービスに対する消費者の期待が医療サービス評価に影響を与える可能性が示唆された。入院医療サービスの消費者の期待をさらに明らかにするには、医療サービス提供者が医療サービスの消費者の入院前に予想を対象に分析する必要がある。

結論

日本国内で 5 日以上の入院医療サービスを経験した成人 10 名を対象に半構成的面接を実施して入手した記述データを分析した結果、医療サービスの行為、医療専門職による説明、医療サービス提供者の様子、身体の感覚、自分で見た身体の状態が入院中の認識対象に含まれた。また、入院医療サービスの消費者が認識している入院前の予想が、入院医療サービスの評価に大きく影響する要素である可能性が示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5142　号	伊豆上　智子
論文審査担当者	主　査　河原　和夫 副　査　伏見　清秀、　川渕　孝一	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

従来の患者満足度調査が医療サービスの改善に結びついていないことから、質的分析手法であるGTA（Grounded Theory Approach）を用いて患者に面接を行い、得られた回答から言語データを収束化して医療サービスに対する患者の考えや反応を同定した。その結果、医療消費者である患者は、医療サービスの行為、医療専門職による説明、医療サービス提供者の様子、身体の感覚、自身で見た身体の状態が、認識対象であることがわかった。また、入院医療サービスの消費者が認識している入院前の予想が、入院医療サービスの評価に大きな影響を与えている可能性が示唆された。研究成果は従来の患者満足度を主体とする評価体系の問題点を指摘すると共に、真に患者中心の医療を確立するための手法を提起したものである。

２．論文審査

1)研究目的の先駆性・独創性

GTAを用いた患者調査研究は、本邦初であることが高く評価できる。この点に先駆性・独創性が認められる。

2)社会的意義

わが国における医療消費者としての患者の視点に真に立脚した医療の推進に大きく貢献するものである。

3)研究方法・倫理観

GTAを用いて2つの病院に5日以上入院した成人患者10名に対して、半構成的面接を実施し、年齢、性別、入院回数などの患者属性、さらに自身が受けた診察、手術、内視鏡検査などの医療サービス項目に対する認識など、医療専門職の説明に対する反応などを調べた。

倫理審査も受けており、研究も倫理性を担保して進められている。

4)考察・今後の発展性

患者が医療サービスに対して有する認識に関して質的研究手法であるGTAを用いて行なった。患者が有する認識を患者の立場から明らかにしたものである。そして、従来の患者満足度を主体とする評価体系の問題点を指摘すると共に、真に患者中心の医療を確立するための手法を提起したもので、今後、質的研究の普及の契機となると考える。

３．その他

特になし。

４．審査結果

網羅的・総括的な質問等を行ったが、概ね満足が行く回答が得られた。伏見、川渕両副査とも協議のうえ、医学博士の学位授与に相当すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	後藤　文男
論文審査担当者	主査　仁科　博史 副査　田中　雄二郎、澁谷　浩司
論　文　題　目	Bone morphogenetic protein-4 modulates proliferation and terminal differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Bone Morphogenetic Protein-4（BMP-4）は様々な臓器の発生・分化において重要な役割を果たすことが示されてきたが、胎生中期以降の肝幹/前駆細胞（肝芽細胞）の増殖、終末分化における機能は不明であった。今回我々は、BMP-4 のマウス肝芽細胞における機能を解析した。BMP-4 刺激により肝芽細胞は Smad1/5 の活性化を認め、肝芽細胞の colony formation では BMP-4 は容量依存性にコロニー形成を抑制した。肝芽細胞の分化誘導培養において、BMP-4 は胆管様 Cyst 構造の形成を抑制し、肝細胞への成熟化を促進した。BMP-4 は肝芽細胞において、ERK、Akt、CaMKIIα、p38MAPK など肝芽細胞の終末分化に関与する数種類の MAP Kinase の活性化を調節していた。これらの結果より BMP-4 は胎生期肝幹/前駆細胞の増殖を抑制し、肝細胞や胆管細胞への終末分化の制御を行っていることが示された。

＜緒言＞

肝幹/前駆細胞は高い増殖能と二方向性分化能を有する細胞として定義される。胎生期の肝幹/前駆細胞（肝芽細胞）は胎生中期からの肝臓の臓器形成に主要な役割を果たし、増殖しながら、最終的に肝細胞もしくは胆管細胞へと分化し、肝実質細胞を構成する。これまでに、肝幹/前駆細胞分化を制御する分子メカニズムが報告されており、具体的には上皮細胞成長因子（EGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、Oncostatin M などが肝芽細胞の増殖と肝細胞への成熟化を促進し、Notch-Hes-1、TGF-β、Wnt シグナルなどを介した門脈周囲の間葉系及び上皮系細胞から構成される微小環境下での調節によって胆管の管腔構造形成を制御していることが報告されている。BMP-4 は TGF-βスーパーファミリーに属する蛋白質の一つであり、胎生初期の胚形成や肺や腎臓や小腸の臓器形成に重要な役割を果たしている。BMP-4 は肝発生において胎生初期の内胚葉由来細胞から肝芽細胞系譜への分化決定に不可欠の因子であり、多能性幹細胞の誘導に際しても必要な因子であることが報告されている。成体マウス肝臓では部分肝切除後の肝再生を抑制する機能があることが報告されているが、胎生中期以降の肝発生における機能に関しては報告がなく、肝芽細胞の増殖及び終末分化に関する機能は不明であった。

今回の我々は、肝芽細胞の増殖および終末分化における BMP-4 の役割について検討した。そ

の結果、BMP-4 が肝芽細胞の colony formation を容量依存性に抑制しうることから BMP-4 が肝芽細胞の細胞増殖を抑制することを明らかにした。さらに 3 次元培養にて、BMP-4 により胆管様 Cyst 構造の形成の抑制を認め、肝細胞成熟化培養にて BMP-4 は成熟化マーカーを亢進させた。さらに BMP-4 は ERK、Akt、CaMKIIα、p38MAPK など肝芽細胞の終末分化に関与する数種類の MAP Kinase の活性化を調節していた。これらの結果より BMP-4 は胎生期肝幹/前駆細胞の増殖を抑制し、肝細胞や胆管細胞への終末分化の制御を行っていることが示された。

＜方法＞

野生型 C57/BL6 マウスの胎生中期肝臓を取り出して、コラゲナーゼ処理の後に肝幹/前駆細胞表面マーカーである Dlk を用いて MACS もしくは FACS で濃縮した初代培養細胞、及びそれから樹立した肝細胞株（hepatic progenitor cell line：HPPL）を用いて実験を行った。細胞増殖能を検討する colony formation assay では前述の方法で得られた初代肝芽細胞を 6-well collagen coated dish の 1 well に 500 cell/well で播種し BMP-4、Wnt5a を添加して 1 週間培養した後に形成されたコロニーの大きさと数を計測した。コロニーは CK19（胆管細胞マーカー）と Alb（肝細胞マーカー）で免疫染色して評価した。胆管細胞系譜への分化実験では、cell culture insert 内に type I collagen と Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma gel による基質を入れ、HPPL を封入した。そして insert の内外に BMP-4、Wnt5a を添加した胆管誘導培地を入れ、1 週間培養すると、胆管細胞マーカーを発現する Cyst 構造 : cholangiocytic cyst が形成される。形成された cholangiocytic cyst の数と大きさを解析し、免疫染色と定量的 PCR により胆管細胞マーカーの増減を評価した。肝細胞成熟化培養では、初代肝芽細胞を 6-well collagen coated dish の 1 well に 1.0×10^{5}cell/well で播種し、EHS gel など肝細胞成熟化を誘導する因子と BMP-4 を添加して 1 週間培養し、定量的 RT-PCR にて肝細胞成熟マーカーの発現量を評価した。細胞内 MAPK 等の活性化の解析では、初代肝芽細胞を collagen coated dish 上で約 48 時間培養し、その後に 1%FCS 添加培地による starvation 処理を 3 時間かけた後に、BMP-4、Wnt5a を添加し、細胞を回収して抽出した蛋白質を Immunoblot 法にて解析した。

＜結果＞

最初に、胎生中期（E14.5）から成体の野生型マウス肝組織内に発現している BMP-4 を定量的 RT-PCR により解析したところ、BMP-4 発現量は E14.5 から徐々に増加し出生直前の E18.5 に最も発現量が多かった。そして初代肝芽細胞に培養系で BMP-4 により刺激すると既知の BMP-4 下流シグナル分子の一つである Smad1/5 のリン酸化の亢進を認めた。逆に TGF-βの既知の下流シグナルである Smad2/3 のリン酸化は抑制された。

次に BMP-4 が肝芽細胞の増殖における機能を検討するため、肝芽細胞を用いた colony formation assay を行ったところ、BMP-4 添加群にて vehicle 群と比べ、有意に、かつ容量依存性に形成される colony の数が減少した。増殖に関与する因子を Immunoblot にて検討すると、初代肝芽細胞を BMP-4 により刺激すると、PCNA と CyclinD1 の発現が低下した。以上より BMP-4 は肝芽細胞の増殖を抑制することが示された。

さらに、肝芽細胞の終末分化における BMP-4 の機能について検討した。肝芽細胞株である

HPPL を用いて前記の 3 次元培養を行うと、胆管細胞の形質をもつ細胞からなる Cyst 構造: cholangiocytic cyst が形成されることが示されている(Tanimizu et al, 2007)。本培養系で BMP-4 を添加して検討すると、BMP-4 群にて vehicle 群よりも有意に cholangiocytic cyst の数が減少し、cholangiocytic cyst から得られた RNA による定量的 RT-PCR 解析にて胆管細胞マーカー（HNF1β, Notch1, Hes-1）と増殖関連分子（CyclinD1, c-Myc）の発現が有意に減少した。マウス初代肝芽細胞を用いた肝細胞系譜への成熟化誘導を行ったところ、定量的 RT-PCR 解析にて BMP-4 添加群では肝細胞成熟化と関連する、特に代謝系分子（Alb, TO, CPS-1, G6Pase, CYP3A4, CYP7A1）の有意な発現上昇と CyclinD1 発現低下を認めた。以上の結果より BMP-4 は肝細胞成熟化を促進し、胆管細胞系譜への分化を抑制すると考えられた。

最後に BMP-4 が初代肝芽細胞に与える細胞内下流シグナルを Immunoblot にて解析した。BMP-4 刺激にて ERK、Akt、CaMKIIαの活性化を認め、p38MAPK の活性化の低下を認めた。当研究室の既報にて Wnt5a-CaMKIIαシグナルが胆管分化を抑制していることが示されていることから、初代肝芽細胞に対して Wnt5a と BMP-4 の相加作用が認められるかを検討した。Wnt5a 単独刺激の場合、既報通り CaMKIIαの活性化を確認し、BMP-4 投与にて変化を認めた ERK、Akt については変化を認めなかった。さらに BMP-4 刺激と同様に、p38MAPK の活性化の低下を認めた。Wnt5a と BMP-4 の双方で同時に刺激した場合には、各々の単独刺激よりもリン酸化 CaMKIIαの活性化が早期に上昇を認め、total CaMKIIαの安定化（蓄積）を認めた。胆管分化に関して cholangiocytic cyst の形成を評価すると、BMP-4 と Wnt5a の同時刺激にて BMP-4 単独刺激と比べて直径 100μm 以上の large cholangiocytic cyst の数の有意な減少を認め、相加効果が示された。さらに、BMP-4 と Wnt5a の同時刺激にて各々の単独刺激よりも CyclinD1 の有意な発現低下を認めた。初代肝芽細胞を用いた colony formation assay でも BMP-4 と Wnt5a の同時刺激にて BMP-4 単独刺激と比べて colony 数の有意な減少を認め相加効果が示された。

＜考察＞

本研究では、BMP-4 の胎生期肝幹/前駆細胞における機能を解析し、その増殖を負に制御していることを初めて示した。Colony formation assay は増殖抑制の直接的な証拠を示しており、Immunoblot では BMP-4 刺激が CyclinD1 の発現を低下させることを示していた。既報では我々と同様に、成体マウスにおける部分肝切除後残肝で BMP-4 が成体肝細胞増殖を抑制すると報告している。一方で、肝癌由来の細胞株においては逆に BMP-4 が細胞増殖を促進し腫瘍増大に貢献すると報告される。この矛盾はその細胞が発現するレセプター分子 ALK family の発現や、下流分子 Smad の発現の状況に依存する可能性がある。我々のデータでは、初代肝芽細胞では BMP-4 刺激によって Smad1/5 の速やかなリン酸がみられた。BMP-4 は Smad1 のリン酸化レベル、コロニー形成の抑制とも濃度依存的に作用した。既報では ALK3 を肝細胞で欠損させると Smad1 の低下と並行して増殖の亢進がみられている。これらをまとめると、BMP-4 は Smad1/5 の活性化を介して、肝芽細胞で増殖を抑制する効果があり、発生期肝臓では増殖を停止して終末分化細胞として成熟化する過程に寄与していることが示唆される。

次に本研究では、BMP-4 が胆管細胞系譜への分化を抑制するという結果を初めて示した。既報では BMP-4 が胆管細胞分化を制御するとする報告はないが、肝芽細胞由来細胞株を用いた検討

で Smad5 は胆管分化を制御すると報告されている。また胆管細胞分化を促進するとされるTGF-βの下流因子 Smad2/3 は BMP-4 の添加で活性化が減弱した。さらに胆管分化に関わるCaMKIIαの活性化に関してはWnt5a との相加効果が見られた。これらの結果より、BMP-4 は胆管分化がなされる門脈周囲の微小環境下で、TGF-βや Wnt5a など他の因子と協調的に作用しながら、胆管分化を調節している可能性が示された。

本研究では、BMP-4 が肝細胞系譜への成熟化を促進していた。ラット肝芽細胞株を用いた検討でも同様の結果が報告されており、本研究の結果と一致していた。我々のデータでは、初代肝芽細胞では BMP-4 刺激によって ERK や Akt といった EGF シグナル、HGF シグナルの下流分子と考えられる MAPK の活性化が亢進した。これらの結果は、胆管細胞と同様に、BMP-4 はこれらの因子と協調的に作用して肝細胞の成熟化に寄与している可能性を示していた。

生体内の BMP-4 の機能を直接的な証明するために、肝芽細胞特異的に BMP-4 のレセプター分子を欠損するマウスを作成することで、証明が可能かもしれないが、BMP-4 は胚及び肝原器発生初期に非常に重要な役割を果たすことから、そのようなマウスを作成することは困難が予測される。しかし、BMP-4 は成体肝臓で非実質細胞から産生され、肝再生の過程に関与することが報告されていることからも、肝再生に異常をきたす疾患で何らかの病的な役割を担うことが示唆される。今後、成体の肝幹/前駆細胞で BMP-4 の機能を解析することで肝再生に異常をきたす疾患の分子標的を探索できる可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5143　号	後藤　文男
論文審査担当者	主　査　仁科　博史 副　査　田中　雄二郎、澁谷　浩司	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、胎生中期以降のマウス肝幹/前駆細胞（肝芽細胞）の増殖、終末分化制御についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

肝硬変や肝がんの新たな治療法として肝臓の再生医療が期待されている。その基礎的研究において、肝細胞と胆管上皮細胞の双方向へ分化する能力を有する肝芽細胞の分化制御機構の解明は重要な課題である。申請者が着目した Bone Morphogenetic Protein-4（BMP-4）は、成体マウス肝臓では部分肝切除後の肝再生を抑制する機能があることが報告されているが、胎生中期以降の肝発生における機能に関しては不明であった。このような背景の下、申請者は、BMP-4 は、胎生期肝幹/前駆細胞の増殖を抑制すること、胆管様 Cyst 構造の形成を抑制し肝細胞への成熟化を促進することを見出した。成体とは対極にある胎仔の胎生期肝幹/前駆細胞の特性を解明することで、今後、成体の肝再生に異常をきたす疾患を考察しようとする研究態度はユニークであり、先駆性があると評価される。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。胎生中期以降の肝幹/前駆細胞（肝芽細胞）の増殖、終末分化における BMP-4 の機能解明を目的にマウス肝芽細胞を用いて解析を進めた。その結果、BMP-4 刺激により Smad1/5 が活性化すること、colony formation では BMP-4 はコロニー形成を抑制していること、分化誘導培養では BMP-4 は胆管様 Cyst 構造の形成を抑制し、肝細胞への成熟化を促進することを示した。また、BMP-4 は ERK、Akt、CaMKIIα、p38MAPK など肝芽細胞の終末分化に関与する数種類の MAP Kinase の活性化を調節していることを示した。これらの結果より BMP-4 は胎生期肝幹/前駆細胞の増殖を抑制し、肝細胞や胆管細胞への終末分化の制御に深く関与していることを示した。

以上のように申請者は、医学・生物学の研究に多くのメリットのある肝幹/前駆細胞の特性解明に貢献した。医学において有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

研究には、野生型 C57/BL6 マウスの胎生中期肝臓を取り出して、コラゲナーゼ処理の後に肝幹/前駆細胞表面マーカーである Dlk を用いて MACS もしくは FACS で濃縮した初代培養細胞、及びそれから樹立した肝細胞株（hepatic progenitor cell line）を用いて実験を行った。細胞増殖などの細胞生物学的手法に加えて、抗体用いた組織学的手法、ウエスターンブロットなど分子生物学的手法を用いて、適切な解析が行われた。これら手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と倫理観が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究成果から、BMP-4 は成体肝再生に異常をきたす疾患で何らかの病的な役割を担うと考察している。今後の研究の進展として、BMP-4 が関与する肝再生に異常をきたす疾患の解明が期待される。

３．その他

特になし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山添　正博
論文審査担当者	主査　古川　哲史 副査　内田　信一、東田　修二
論　文　題　目	Serum alkaline phosphatase as a predictor of worsening renal function in patients with acute decompensated heart failure

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

急性心不全患者における腎機能増悪（worsening renal function, WRF）は予後不良因子であり、静脈うっ血は WRF の原因となる血行動態として注目されてきている。一方血清アルカリフォスファターゼ（alkaline phosphatase, ALP）の上昇は肝うっ血を示唆する所見として報告されているが、WRF との関連は未だ明らかにされていない。そこで急性心不全患者において ALP が WRF の予測因子であるかどうかを検討した。急性心不全で入院した患者を対象とし、WRF は入院中の血清クレアチニン 0.3 mg/dl 以上の上昇と定義した。ALP を 3 群（<203 IU/L、203–278、>278 IU/L）に層別化し後ろ向きに解析を行った。972 名の患者（平均年齢 73±13 歳、男性 54%）のうち、WRF は 132 名（13.6%）に認められた。多変量ロジスティック解析において、ALP <203 IU/L 群に比べて、WRF 発症の adjusted odds ratio（OR）は ALP 203-278 IU/L 群では 1.69（95% confidence interval [CI] 1.02–2.79, p value = 0.040）、ALP >278 IU/L 群では 1.95（95% CI 1.20–3.21, p value = 0.008）であった。その他ベースラインの慢性腎不全、血清アルブミン値の低下、糖尿病罹患が WRF に関連していた。血清 ALP は急性心不全患者における WRF 発症の独立した予測因子であることが示された。

＜緒言＞

Worsening renal function （WRF）は急性心不全の臨床経過において認められ、独立した予後不良因子であると考えられている。心ポンプ不全、すなわち心拍出量低下により腎障害が進行すると考えられていたが、近年の研究では、腎動脈の灌流不全よりも静脈うっ血が WRF の発症機序に関わるより重要な血行動態として報告されてきている。一方肝うっ血は急性心不全にてよく認められる所見であり、肝障害の種々のマーカーの中でも血清アルカリフォスファターゼ（ALP）は三尖弁逆流症（TR）の重症度や右心系圧と相関することが報告されている。しかしながら、急性心不全患者において ALP と WRF の関連は未だ明らかにされていない。そこで、本研究は ALP が WRF の予測因子となりうるかどうかを検討することを目的とした。

＜方法＞

単施設（聖路加国際病院）に 2003 年 9 月から 2013 年 12 月の間に急性心不全で入院した連続症例 1563 名のうち、入院時の ALP データが利用可能であった者は 1115 名であり、肝疾患の既往歴を有する患者、入院時 eGFR<15 ml/min/m² または維持透析患者を除外した 972 名を解析の対象とした。WRF 発症の定義は、入院中の血清クレアチニン 0.3 mg/dl 以上とした。WRF 発症を目的変数として単変量ロジステイック回帰分析を行い、有意な関連を認めた項目、ならびに年齢、性別、収縮期血圧、brain natriuretic peptide（BNP）を調整因子として多変量ロジステイック回帰分析を行った。さらに入院時の ALP 値に応じて 3 群に層別化を行い（低位, <203 IU/L; 中間位, 203–278; 高位, >278 IU/L）、WRF の発症率、ベースライン特性の比較を行った。3 群間の比較には Kruskal–Wallis 検定を用い、多重検定には Tukey 検定を使用した。

＜結果＞

972 名の解析対象患者の平均年齢は 73 ± 13 歳（男性 54%）で、入院時の平均 eGFR は 50.3 ± 24.2 ml/min/m² であった。WRF 発症者は 132 名（13.6%）であり、非発症者と比べてベースライン eGFR 低値（38.8 ± 17.4 ml/min/m² vs 52.2 ± 24.7 ml/min/m², p value <0.001）、ヘモグロビン低値（10.6 ± 2.0 g/dl vs 11.4 g/dl, p value <0.001）、血清アルブミン低値（3.1 ± 0.5 g/dl vs 3.3 ± 0.5 g/dl, p value <0.001）、という特徴が見られ、有意に糖尿病罹患者が多く含まれていた（71.2% vs 53.6%, p value <0.001）。入院時の収縮期・拡張期血圧、脈拍数や心エコーで計測された左室駆出率（EF）、左室拡張末期径は 2 群間で有意差を認めなかった。ALP は WRF 発症群で有意に高値であった。（median 249 IU/L, inter quartile range [IQR] 209–342 IU/L vs median 236 IU/L, IQR 189–306 IU/L; p value = 0.004）。一方で他の肝機能マーカーである総ビリルビン、aspartate transaminase（AST）、alanine transaminase（ALT）、γ-glutamyltransferase（GGT）は WRF 発症群で有意差はないものの低値の傾向が見られた。

WRF 発症を目的変数とした単変量ロジスティック回帰分析では、肝機能マーカーの中で ALP のみが WRF 発症と関連していた。ALP3 分位間での WRF 発症率はそれぞれ、低位 8.9%、中間位 15.1%、高位 16.6%と統計学的に有意な違いが認められた。多変量ロジスティック回帰分析では、ALP 低位群に比べて、WRF 発症の adjusted OR は ALP 中間位群では 1.69 (95% CI 1.02–2.79, p value = 0.040)、ALP 高位群では 1.95 (95% CI 1.20–3.21, p value = 0.008)であった。その他ベースラインの慢性腎不全（OR 2.46, 95% CI 1.48–4.08, p value <0.001)、アルブミン値（OR 0.52, 95% CI 0.35–0.77, p value = 0.001）、糖尿病罹患（OR 2.07, 95% CI 1.37–3.12, p value <0.001）が WRF 発症と独立して関連していることが示された。

次に、ALP3 分位間で基礎特性の比較を行ったところ、年齢、性別、入院時 eGFR や高血圧、糖尿病など主要なリスク因子に違いは見られなかった。一方でスポット尿検査での尿蛋白量は高位群と低位群間で有意差を認めた（高位, 0.42 g/g・creatinine vs 低位, 0.28 g/g・creatinine, p value = 0.043）。また、心エコー所見にて EF や拡張障害の指標となる E/e'は同様であるものの、平均三尖弁間圧格差(mean TRPG)は高位群では低位群と比較して有意に高値であった（35.9 ± 19.1 mmHg vs 32.2 ± 15.1 mmHg, p value = 0.034）。

＜考察＞

腎臓は循環潅流不全、全身性のうっ血による影響を受けやすい臓器であることから、WRF は心不全で主要な合併症の一つであり、その危険因子を把握し発症を予測することは急性心不全の治療過程において重要である。メタ解析では、年齢、高血圧、糖尿病、ベースラインの慢性腎不全の存在が WRF 発症と関連していることが報告されてきた。今回の研究は、肝障害のマーカーとして知られる ALP が急性心不全患者における WRF 発症の新規の独立した予測因子であることを明らかにした。

ALP と WRF 発症の関連に２つの機序が考えられる。第一に ALP が肝うっ血ならびに腎うっ血の surrogate バイオマーカーであるという可能性である。ALP が心不全での右心系圧と関連することが先行研究で示されている。今回の研究でも、心エコーでの EF や E/e'は ALP と関係していなかったが、TR の重症度、ならびに TRPG は ALP と有意な関連が見られた。また肝機能検査項目の中で、ALP が肝うっ血を反映し、一報で AST と ALT は虚血性肝障害（shock liver）を反映すると考えられている。つまり心不全病態での右心圧上昇による肝うっ血から ALP の上昇をきたすが、同時にそれは腹腔内他臓器のうっ血、腎うっ血をきたしていることを意味する可能性がある。そして、この結果は静脈うっ血が WRF の主要な血行動態的機序であることを示す先行研究を支持するものである。

第二に ALP が subclinical な腎障害を反映している可能性が挙げられる。本研究では、ALP3 分位間でベースラインの eGFR に差は見られなかったにも関わらず、尿蛋白量は ALP と相関を認めた。先行研究においては、ALP が造影剤腎症の発症と関連することや、尿中の ALP が尿中アルブミン量と相関し、糖尿病性腎症の発症を予測できることを示唆した報告が見られる。更に ALP はその生理学的役割としてリン酸エステルの加水分解を触媒する膜アンカー型の酵素であることから、この機序を介して動脈石灰化の促進との関連も指摘されている。すなわち ALP 上昇は腎動脈硬化、糸球体硬化を介して、蛋白尿といった subclinical な障害を生じている可能性が考えられる。

＜結語＞

血清 ALP 上昇は急性心不全患者において WRF 発症の独立した予測因子であることが示された。ALP は肝障害としてのマーカーだけではなく、腎うっ血を意味する surrogate biological マーカーであると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5144　号	山添　正博
論文審査担当者	主　査　古川　哲史 副　査　内田　信一、東田　修二	

【論文審査の要旨】

1. 論文内容

心不全患者では、腎機能増悪（worsening renal function:WRF）を示す患者が一定割合存在し、これがさらに心機能を増悪する心腎連関が注目されている。WRF の機序として、以前は心拍出量低下による低腎還流が示唆されていたが、近年は低還流よりも腎うっ血が主因とする説が提案されている。WRF を示す心不全患者を予測する因子の探索が行われ、ベースラインの腎機能、糖尿病など複数の因子が示唆されている。申請者は、腎うっ血が WRF の原因であるならば、心不全時の肝うっ血のマーカーとして知られている ALP が WRF の予測因子となるのではないか、との仮説を立て後ろ向き研究でこの仮説の検討を行った。972 名の初回発症急性心不全患者で、入院中に WRF(血清 Cr 0.3 mg/dl 以上の上昇)を示した群と示さなかった群で複数の因子の比較を行った結果、ALP は WRF 群で有意に高く、多変量解析においてもコントロールでの WRF の既知の予測因子である慢性腎疾患(CKD)、血清アルブミン値、糖尿病とともに ALP が独立した関連因子であることが判明した。

2. 論文審査

1) 研究目的の先駆性・独創性

心不全患者で、入院時の ALP 値が WRF の予測因子であることを初めて示した点が先駆的である。

2) 社会的意義

心不全の入院患者の 5 年生存率は約 30%ときわめて不良である。心不全患者で WRF が予後と相関することが知られており、WRF の診断と治療の向上が強く望まれている。本研究から、心不全患者入院時に WRF を予測する因子の 1 つとして ALP があることが初めて明らかとなり、WRF 患者の早期診断・予測、ならびにその治療戦略の向上に向上する可能性がある点で社会的意義が高い。

3) 研究方法・倫理観

所属医療機関に 2003 年から 2013 年に急性心不全で入院した患者の電子カルテを後ろ向きに検討した研究であり、所属医療機関で倫理審査委員会の承認を得て行った臨床研究であり、

倫理的な問題はないと考えられる。

4) 考察・今後の発展性

ALP 単独では WRF 発症を予測するのは困難であるが、多変量解析で同定された複数の関連因子からスコア化するなど、WRF 予測精度を上げる研究、さらにこれを前向きに検討する検証研究などを行うことにより、本研究結果が臨床応用につながることがする可能性が期待される。

また、今回の研究で腎うっ血が WRF の機序であることがさらにサポートされたことが示唆される。これをもとに、これを実証する臨床・基礎研究を展開すること、さらにこれに基づきうっ血の改善に焦点を当てた WRF 治療法の是非の検討などへの発展が期待される。

3. その他

特になし。

4. 審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	月精　智子
論文審査担当者	主査　下門　顕太郎 副査　東田　修二、　永井　亜希子
論　文　題　目	A fiber-optic sorbitol biosensor based on NADH fluorescence detection toward rapid diagnosis of diabetic complications

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

糖尿病合併症である細小血管障害は、組織中に蓄積するソルビトールが一因であることが報告されている。本研究では、糖尿病合併症のバイオマーカーとして有効性が示唆されているソルビトールに着目し、光ファイバ式のソルビトール用バイオセンサを開発した。本バイオセンサは、高い基質特異性を有するフラビモナス属の微生物由来ソルビトール脱水素酵素(sorbitol dehydrogenase, SDH)を利用し、酵素反応により生成される還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH: ex. 340 nm, fl. 491 nm)の蛍光強度の変化を検出することで、ソルビトールの測定を行う。本センサシステムは、励起光源(UV-LED)と光電子増倍管(photomultiplier tube, PMT)(もしくは分光器)を二分岐光ファイバで接続し、その先端に SDH 固定化膜を備えた光ファイバプローブを取付けて構築した。作製したバイオセンサの光ファイバプローブを酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)溶液に浸漬し、ソルビトール濃度に伴う蛍光強度の変化を測定した。本バイオセンサは、健常者及び糖尿病患者の血液中および尿中のソルビトール濃度を含む、1.0–1000 μmol/L の範囲でソルビトールの選択的な測定が可能であった。本センサは、糖尿病患者に対する Point of Care Testing(POCT)検査および日常的な健康管理への利用が期待される。

＜緒言＞

世界の糖尿病人口は増加の一途をたどっており、大きな社会問題となっている。糖尿病は高血糖状態が持続する疾患であり、慢性的な高血糖状態は重篤な合併症を引き起こすため、糖尿病治療の主な目的は合併症を予防することにある。糖尿病の合併症は、細小血管障害(腎症、神経障害、網膜症)と大血管障害(冠動脈疾患、末梢動脈障害、脳卒中等)に分類されており、これら合併症の発症メカニズムとして、(1)ポリオール代謝の亢進、(2)ヘキソサミン代謝の亢進、(3)終末糖化産物(advanced glycation end products, AGEs)の増加、(4)プロテインキナーゼ C(protein kinase C, PKC)の活性化、(5)活性酸素種の増加が提唱されており、近年では、これら５つの仮説が密接に関与している可能性が示されている。特に、ポリオール代謝の亢進は糖尿病の初期段階から観察され、他の代謝の起点となると考えられており、ポリオール代謝亢進により増加するソルビトー

ルは糖尿病合併症の１つの指標として考えられている。

既存のソルビトール測定法としては、酵素法、ガスクロマトグラフィ法、高速液体クロマトグラフィ法があるが、臨床検査ではマイクロプレートリーダーを用いた酵素法が使用されている。しかし、POCT 検査や日常的なヘルスケアテストでのソルビトール計測には、小型かつ簡便・迅速、高感度なセンサが求められる。

そこで本研究では、高い基質特異性を有するフラビモナス属の微生物由来 SDH に着目し、酵素反応により生成される NADH の蛍光増加を、光ファイバ型の光学システムにて検出することでソルビトールを測定するバイオセンサを構築し、その特性を評価した。また実際の生体試料として、ラットの血漿に添加したソルビトールを測定し、本センサによる生体サンプル中ソルビトールのバイオ計測の可能性を検討した。

＜方法＞

ソルビトール用バイオセンサの構築

本バイオセンサは、ソルビトールを基質とする SDH の反応生成物である NADH の蛍光を検出することでソルビトールの測定を行う。NADH の蛍光検出システムは、二分岐の光ファイバの両端を「バンドパスフィルタ(band-pass wave length: 330–350 nm)を介した励起光源(UV-LED, λ_p = 335 nm) 」と「ロングパスフィルタ(cut-off wavelength: 400 nm)を介した分光器」に接続し、その先端に光ファイバプローブを取付けて構築した。また、光検出器として PMT を使用することも可能で、その際はバンドパスフィルタ(band-pass wavelength: 480–500 nm)を用いた。ソルビトール測定のバイオセンサは、多孔質の親水性ポリテトラフルオロエチレン膜に、生体適合性を有するポリマー(MPC-co-EHMA, PMEH)を用いて包括固定化した SDH 固定化膜を、光ファイバプローブの先端に装着した。

ソルビトール用バイオセンサの評価方法

まず構築した NADH 蛍光検出システムの評価を行った。300 μL の純水を満たしたキュベットに光ファイバプローブを浸漬させ、NADH 標準溶液を目的濃度になるように滴下し、NADH(蛍光波長：491 nm)の蛍光強度の変化を分光器にて測定した。次に、SDH 及び NAD^+を溶解したトリス塩酸緩衝液に、ソルビトール標準溶液を目的濃度になるように滴下し、蛍光強度変化を分光器にて検出することで、ソルビトールの測定を行った。ソルビトール測定時の NAD^+初期濃度は、100 μmol/L のソルビトール溶液に対する NAD^+溶液(100 μmol/L–100 mmol/L)の蛍光強度を調べ、最適な濃度を選定した。次に、ソルビトール用バイオセンサの特性は、NAD^+を含むトリス塩酸緩衝液を満たしたキュベットにセンサ感応部を浸漬し、ソルビトール標準溶液の負荷による NADH の蛍光出力の変化を分光器もしくは PMT で測定し、評価した。またバイオセンサの選択性評価では、血液等の生体サンプルに含まれ、類似の構造を有する糖アルコール(キシリトール、マンニトール)及び単糖(フルクトース、グルコース)を用い、出力値の比較を行った。

生体試料調整サンプルによるソルビトール計測

生体試料中のソルビトール計測では、ラットのヘパリン加全血の遠心分離により得られた血漿

に、処理後の最終濃度が 100 μmol/L になるようにソルビトールを添加した溶液を生体試料調整サンプルとして用いた。まず、生体試料調整サンプル 100 μL に過塩素酸溶液(1.0 mol/L)100 μL を加えて混合した後、3000 rpm で 10 分間、遠心分離を行うことで血漿中のタンパク質を除去した。その後、得られた上清に水酸化カリウム溶液(1.0 mol/L)60 μL を加えて pH 7–9 に調整した後、5000 rpm で 10 分間、遠心分離を行い、得られた上清をバイオセンサによる計測に供した。

＜結果および考察＞

NADH 蛍光検出システムの特性評価

構築した NADH 蛍光検出システムに NADH 溶液を負荷したところ、491 nm にピーク波長を有する蛍光出力が得られた。また、NADH 濃度の増加に伴い蛍光強度の増加が確認され、分光器を用いたシステムでは 1.0–200 μmol/L の範囲で NADH の定量が可能であることが確認された。なお、UV-LED を利用した励起システムは発熱が少ないため冷却機構を必要とせず、システムの総消費電力が 150 mW と低く、小型化も可能である。

ソルビトール用バイオセンサの最適化

SDH を緩衝液に溶解し、構築した NADH 蛍光検出システムにて溶液中での酵素反応を調べたところ、ソルビトール溶液の負荷後直ちに NADH の蛍光強度の変化が観察された。なお、出力安定値までに要した時間は約 3 分であり、1.0–100 μmol/L の範囲でソルビトールの定量が可能であった(R=0.994)。次に、NAD^+濃度が酵素反応に及ぼす影響を調べたところ、低濃度では酵素反応に時間を要し、蛍光出力も微弱であったが、NAD^+濃度の増加に伴い反応速度が上昇し、蛍光出力は 10.0 mmol/L において最大値を示した。さらに高濃度になるに従い、蛍光出力が漸次減少することが確認されたことから、本センサでの NAD^+の設定濃度を 10.0 mmol/L とし、ソルビトール測定に用いることとした。なお光検出器として、分光器と PMT を比較したところ、分光器に比して SN 比が約 2.6 倍向上することが分かり、PMT の使用によりバイオセンサの高感度化が可能であった。

ソルビトールバイオセンサの性能評価

PMT を用いたシステムにてソルビトール溶液を測定した結果、ソルビトール溶液の負荷に伴い蛍光強度の著しい増加(95%応答 : 4.5 分)が観察され、出力の定常値からソルビトール溶液に対する定量特性を調べたところ、1.0–1000 μmol/L の範囲で高い相関(R=0.989)を得ることができた。また短時間でのソルビトール測定を可能にするために蛍光強度の微分解析処理を施し、蛍光強度変化の最大値からソルビトールに対する定量特性を調べたところ、出力の定常値と同様に、1.0–1000 μmol/L の範囲でソルビトールの定量が可能で、90 秒での測定が可能であった。PMT を用いたバイオセンサの定量範囲は、血液及び尿中ソルビトールの濃度を含んでおり、簡便・迅速な糖尿病合併症の評価への展開が期待される。なお糖質等に対するセンサ出力を比較したところ、微生物由来 SDH を用いたバイオセンサでは、ソルビトールのみ高い蛍光出力を示し、酵素の基質特異性に基づく高い選択性が確認された。

生体試料調整サンプル中のソルビトール計測

ソルビトール溶液を添加した血漿(生体試料調整サンプル)をバイオセンサでの計測に供したところ、緩衝液中ソルビトールに対するセンサ出力(100%)に比して、血漿中ソルビトールでは血漿サンプルの夾雑物の影響と考えられる若干の出力低下(86.7%)が確認されたものの、血液中のソルビトール計測に展開できる可能性が示唆された。

＜結論＞

本論文ではまず、NADH 蛍光検出システムを構築し、1.0–200 μmol/L の範囲で NADH に対する定量性を確認した。次に、酵素反応に必要な NAD^+濃度の最適化を行い、ソルビトール計測時の NAD^+初期濃度を 10.0 mmol/L に設定した。上記の結果を踏まえ、SDH 固定化膜を NADH 蛍光検出システムの光ファイバプローブに装着し、ソルビトール用バイオセンサを構築した。PMT を用いて構築したソルビトール用バイオセンサは、血液及び尿中ソルビトール濃度を含む 1.0–1000 μmol/L の範囲でソルビトールの定量が可能であった。また、蛍光強度変化を微分解析することで 90 秒程度での迅速な測定を実現した。なおソルビトール用バイオセンサの糖類に対する出力を比較したところ、生体サンプル中での選択的なソルビトール計測の可能性が示唆された。本バイオセンサを用いることで、体内における糖代謝解析の一助になり、糖尿病患者に対する合併症評価への利用が期待される。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5145　号	月精　智子
論文審査担当者	主　査　下門　顕太郎 副　査　東田　修二、　永井　亜希子	

（論文審査の要旨）

1. 論文内容

本論文は、糖尿病の細小血管合併症の原因となるソルビトールの測定法にかんするものである。

2. 論文審査

１）**研究目的の先駆性・独創性**：ソルビトールは細胞内のグルコースからアルドース還元酵素（AR)により生成され、細胞内浸透圧を高めたり酸化ストレスを増強したりすることにより糖尿病患者の細小血管合併症を引きおこすとされている。AR 阻害薬の開発が盛んであるが、現存するソルビトールの測定機器は測定に時間がかかるなどの問題があり、薬剤の効果の判定は容易でない。高齢化に伴い糖尿病患者が増加し、合併症予防が喫緊の課題となっている現状を鑑みると、申請者が目指した迅速で高感度の測定法の確立は優れた着眼であるといえる。

２）**社会的意義**：本研究で得られた主な結果は以下の通りある。

① ソルビトールがソルビトール脱水素酵素によりフルクトースに変換される際に生じる NADPH の蛍光を UV－LED により検出するシステムを開発した。

② 種々の UV フィルターを用いることや分光器の代わりにフォトマルを用いることにより、ノイズや励起光の影響を除去し感度をあげることに成功した。

③ 細菌由来のソルビトール脱水素酵素を用いることで特異性を高めた。

④ 糖尿病モデルラットを用いて血液や尿のサンプルで従来の方法よりより迅速にソルビトールが測定できること、さらに糖尿病状態では血清ソルビトール濃度が上昇することを確認した。

申請者が開発した方法を実用化するには、さらに改良が必要であるが、ソルビトールと血管合併症の関係に関する研究や、AR 阻害薬の開発に貢献する重要な研究であるといえる。

３）**研究方法・倫理観**：酵素反応により生じる分子の蛍光を検出するシステムを構築するという医工学的な研究が、オーソドックスな研究手法を用いて行われた。動物実験に際しての倫理的な配慮や手続きも十分である。

４）**考察・今後の発展性**：申請者は患者のベッドサイドで簡便・迅速に測定できる機器の開発を目指しているが、機器の小型化や前処理の簡便化など実用化にはいくつか解決すべき課題が残っている。申請者は現時点で未解決の問題についても、十分な考察を

行った。

3. その他:特記すべきことなし。

4. 審査結果

以上を踏まえ、本論文は本学の博士(医学)を申請するのに十分な価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小林　建太
論文審査担当者	主査　石川　俊平 副査　北川　昌伸、田中　真二
論　文　題　目	Prognostic significance of PAK4 expression in gastric cancer

（論文内容の要旨）

<要旨>

p-21 activated kinase(PAK)ファミリーである PAK4 は成長因子シグナル伝達、細胞骨格のリモデリング、遺伝子転写、細胞増殖、および発癌形質転換などにおいて重要な役割をはたすことが知られている。しかし、胃癌における PAK4 の臨床的意義はまだ十分に解明されていない。本研究では胃癌における PAK4 発現を免疫染色で評価し臨床病理学的因子、および胃癌患者予後との相関について検討した。217 人から得られた胃癌組織を免疫染色し、PAK4 の発現を評価したところ 95 人（43.8%）の胃癌組織が PAK4 高発現を示した。PAK4 高発現は胃癌の進行と相関しており、組織学的深達度、リンパ節転移有り、病理ステージ、遠隔転移・再発と相関していた。単変量解析において PAK4 高発現は胃癌の予後不良因子であった($p<0.001$)。多変量解析において PAK4 は独立した予後不良因子であった(ハザード比 2.5, 95%信頼区間 1.4-4.7, $p=0.003$)。また。ステージ 2, 3 患者においても PAK4 は独立した予後不良因子であった(ハザード比 2.2, 95%信頼区間 1.1-4.5, $p=0.029$)。PAK4 は胃癌患者における新たな予後因子であり、分子標的治療のターゲットの候補となる可能性が示唆された。

<緒言>

胃癌は世界第 3 位のがん死亡原因であり、GLOBOCAN2012 では胃癌罹患数約 95 万人、胃癌死亡者数は約 72 万人と見積もられている。標準術式である D2 郭清をともなう胃切除術後においても 5 年生存率は不良である。Human epidermal growth factor 2(HER2)阻害剤を含む抗がん剤治療は遠隔転移を有する HER2 陽性胃癌患者の予後を向上することが知られている。しかし、胃癌患者のうち HER2 陽性率は 1－2 割程度である。近年では vascular endothelial growth factor receptor 2(VEGFR2)抗体を含む治療が胃癌 2 次治療における予後の上乗せ効果が認められている。HER2, VEGFR2 といったチロシンキナーゼレセプターは分子標的治療の重要なターゲットであり、候補となりうるターゲットの探索は胃癌治療において重要といえる。P-21 activated kinases(PAKs)は分化遊走などの細胞形態機能にさまざまな影響を及ぼすことで知られる Rho ファミリー(cdc42, Rac1, Rho-A)のエフェクター蛋白であり、6 種のアイソフォームが存在している。また、PAKs は mitogen activated protein kinase(MAPK), JUN N-terminal kinase(JNK), ス

テロイド受容体、nuclear factor κβ(NFκβ)といった発癌に関連するシグナル伝達経路の一部である。PAK4 は正常組織にも発現しているが、さまざまな癌細胞株・原発癌において過剰発現が認められている。しかし胃癌における過剰発現と臨床背景との関連については報告が少ない。本研究では胃癌における PAK4 発現と臨床病理学的因子との相関について検討した。

<方法>

2003 年から 2007 年の間に東京医科歯科大学附属病院にてリンパ節郭清をともなう胃切除術を施行された患者 217 名を対象とした。本研究はヘルシンキ宣言に準拠しており、学内倫理審査委員会の承認を得ている。また患者からは研究自由参加の同意、検体採取・保管などの同意を文書で得ている。病期分類は Union for International Cancer Control(UICC)分類を用いている。組織学的分類は日本胃癌学会による胃癌取扱い規約第 14 版に準拠し、乳頭腺癌・管状腺癌は「高分化」として分類、低分化管状腺癌・印環細胞癌・粘液癌は「未分化」として分類した。すべての患者は 3-6 か月ごとに腫瘍マーカー、CT・MRI・上部消化管内視鏡検査・超音波検査を含む画像診断によって経過観察されている。追跡期間中央値は 60 か月（3-111 か月）。75 名は原病死、50 名は再発、11 名は他病死している。再発・遠隔転移患者にたいしては S1 を含む化学療法を施行、また 21 名は S1 単剤による術後補助化学療法をおこなっている。免疫染色ではホルマリン-パラフィン包埋ブロックの薄切検体を用いた。一次抗体としてウサギ・ポリクローナル抗 PAK4 抗体を使用、2 次抗体にペルオキシダーゼポリマー標識抗体を使用した。すべての検体は免疫染色と同時に HE 染色をおこなっている。

染色の評価は intensity-extensity スコアをもちいて定量化した。各 intensity スコアと extensity スコアの和が 4 以上のものを高発現群に振り分けた。評価後、2 人の研究者によって読み合わせをおこなった。

発現と臨床病理学的因子との相関は $\chi 2$ 乗検定で評価した。Disease specific survival(DSS)と relapse-free survival(RFS)をログランク-テストにて単変量解析した。なお RFS においてはステージ 4 患者 18 名を解析から除外した。単変量解析にもちいた因子同士の相関を Spearman's test にて確認した。多変量解析では Cox 比例ハザードモデルにて PAK4 発現および各背景因子の予後因子としての有意性を評価した。ハザードモデルの妥当性は Log-log 曲線をもちいて確認した。

<結果>

PAK4 は主に細胞質で高発現していた。いくつかの標本内では核での発現を認めたが、染色評価は細胞質で評価した。繊維芽細胞、血管平滑筋、粘膜筋板は均一に染色されていた。癌上皮周囲の腸上皮化生上皮においても弱い発現を認めた。癌浸潤部においては表層よりも強く染色される傾向があった。95 例(43.8%)の検体において PAK4 高発現を認めた。また転移リンパ節においても発現を評価したが、原発での発現との関連を $\chi 2$ 乗検定で評価したところ正の相関を認めた($p=0.033$)。PAK4 発現と各臨床病理学的因子との相関を $\chi 2$ 乗検定で評価したところ、PAK4 高発現と腫瘍深部浸潤(T1 vs. T2-T4, $p<0.001$)・リンパ節転移有り(N0 vs. N1-N3, $p<0.001$)・進行したステージ(I vs. II-IV, $p<0.001$)・遠隔転移・再発あり(有り vs. 無し, $p<0.001$)とが有意に相関していた。遠隔転移、再発を有する患者 68 名のうち 51 名(75%)に PAK4 高発現を認めた。組織

学的分化度(未分化 vs 高分化)と PAK4 発現とは有意な相関は認めなかった。生存曲線を用いた単変量解析では PAK4 高発現群は DSS, RFS において有意に予後不良であった(p<0.001, p<0.001)。DSS における PAK4 低発現群の 5 年生存率は 88.6%であったのに対し高発現群では 50.1%であった。DSS において上部胃癌群、未分化型群、T2 以深群、リンパ節転移陽性群は有意に予後不良であった。これらを調節因子とした多変量解析では PAK4 高発現、T2 以深、リンパ節転移陽性は独立した予後不良因子であった(ハザード比 2.5, 95%信頼区間 1.4-4.7, p=0.003　ハザード比 7.3, 95%信頼区間 1.7-31.6, p=0.008　ハザード比 5.2, 95%信頼区間 2.3-11.7, p<0.001)。なお多変量解析を行うにあたっては、各調節因子同士の相関が弱いことを確認している。RFS においても同様に PAK4 高発現、T2 以深、リンパ節転移陽性が独立した予後不良因子であった(ハザード比 2.8, 95%信頼区間 1.4-5.6, p=0.004　ハザード比 6.5, 95%信頼区間 1.5-28.6, p=0.012　ハザード比 5.2, 95%信頼区間 2.2-12.8, p<0.001)。ステージ 2, 3 患者 95 名において単変量解析を行ったところ PAK4 高発現群は DSS, RFS において有意に予後不良であった(p=0.002, p=0.01)。組織型、臨床病期を調節因子とした多変量解析において PAK4 高発現は独立した予後不良因子であった(ハザード比 2.2, 95%信頼区間 1.09-4.54, p=0.029)。

<考察>

本研究の結果から PAK4 高発現は腫瘍増殖、転移、胃癌予後において重要な役割を果たしていることが示された。また PAK4 は有用な予後予測因子になりうるとおもわれる。PAK4 はステージ 2, 3 胃癌患者における独立した予後因子であることから、PAK4 陽性を示すステージ 2,3 胃癌患者に対しては PAK4 阻害剤のような、より効果的な術後補助化学療法が必要となる可能性がある。ヒト胃癌組織や胃癌細胞株での PAK4 発現はいくつかの研究で検討されており（15.17.18)、これらの研究では PAK4 は発癌遺伝子とみなされている。しかし、予後との関連についての報告は少なく、ある報告では PAK4 高発現群は予後不良の傾向を示していたが有意差は認められなかった。(15)　PAK4 は group II PAK として cdc42 のエフェクター蛋白として初めに同定されている。Raf のリン酸化をおこない Ras-Raf-MAPK 経路の一端を担っている。PAK4 の高発現を示す癌細胞においては、p53 のような老化経路の遺伝子に変異をみとめることが多く、それによりむしろ形質転換に向かう性質が示されている。PAK4 は Smad2/3 リン酸化を通じ TGFβ1 パスウェイを障害することで、腫瘍増殖阻害に影響をおよぼす。癌細胞の遊走に関与し PAK4 と β アクチンの重合に必要な DGCR6L は PAK4 と相互作用することで LIMK1 を経由した PAK4 が媒介する胃癌細胞遊走を増強する。PAK4 高レベルの胃癌細胞株は siRNA による PAK4 ノックダウンにてアポトーシスが誘導される。シスプラチン耐性細胞株を PAK4 ノックダウンすることで、もとのシスプラチン細胞毒性感受性を持つようになる。以上のことから PAK4 は分子標的治療の候補になりうると推測した。実際、腫瘍増殖の抑制効果を持つ PAK4 阻害剤がいくつか特定されている。PAK4 の ATP 競合阻害剤である PF-3758309 は肺癌細胞株の遊走および浸潤を抑制する。LCH-7749944 は、胃癌細胞の増殖を抑制し、ヒト胃癌細胞株におけるサイクリン D1 の抑制に関与する細胞周期停止を仲介する。しかし、あいにく PAK4 阻害剤は第 1 相試験で低バイオアベイラビリティーであることが示された。PAK4 と分子標的治療の標的となっている HER2, VEGFR2 などのチロシンキナーゼレセプターとの関連は認められなかった。本研究においても 20 名(9%)

に HER2 高発現を認めたが、PAK4 発現との相関は認められなかった。これより PAK4 阻害剤が HER2 発現からは独立した分子標的治療の標的となりうることが示唆される。胃癌における腫瘍内不均一性は、分子標的治療を複雑にする可能性がある問題の一つである。西田らは胃癌組織のマイクロアレイ標本を用いて腫瘍内表現型不均一性、遺伝子不均一性の両方を示した。本研究では腫瘍浸潤部のほうが表層部より強く染まる傾向を認めた。本研究では遺伝子発現、変化は示されていない。しかし、OncomineTM データベースに、ヒト胃癌のいくつかのデータセットにおいて PAK4 mRNA レベルおよび PAK4 遺伝子のコピー数増加が示されている。臨床検体での PAK4 遺伝子発現についても解明が待たれる。

<結語>

PAK4 は胃癌患者の予後、腫瘍の進行と相関していることが示された。また、PAK4 発現は独立した予後因子であることが示された。これらの結果から PAK4 は胃癌にたいする分子標的治療のターゲットになりうることが示唆される。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5146　号	小林　健太
論文審査担当者	主　査　石川　俊平 副　査　北川　昌伸、田中　真二	

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

本論文は胃癌における PAK4 発現と臨床病理学的因子との相関について詳細に解析した論文である。

2.　論文審査

1）研究目的の先駆性・独創性

申請者は癌に関連する機能を持つことが知られている PAK4 に関して、胃癌における臨床的意義がよくわかっていないことに着目し、胃癌検体を用いてその発現と臨床病理学的因子との詳細な関連解析を行った。そのアプローチは独創的で評価に値する。

2）社会的意義

本研究で得られた結果は、胃癌における PAK4 のメカニズムやその臨床像に与える影響の一反を解明するものであり、難治疾患である胃癌の診断・治療に資するものと考えられる。

3）研究方法・倫理観

申請者は 217 人から得られた胃癌組織を免疫染色し、PAK4 の発現を評価した。PAK4 高発現は胃癌の進行と相関しており、組織学的深達度、リンパ節転移有り、病理ステージ、遠隔転移・再発と相関していた。単変量解析において PAK4 高発現は胃癌の予後不良因子、多変量解析においても PAK4 は独立した予後不良因子であり、ステージ 2, 3 患者においても同様であった。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されたと考えられる。

4）考察・今後の発展性

本研究結果は、PAK4 は胃癌患者における新たな予後因子であり、今後の胃癌の診断・治療に資する可能性が示された。

3.　審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	冨井　翔平
論文審査担当者	主査　北川　昌伸 副査　中田　隆夫、稲澤　譲治
論　文　題　目	Cortical Actin Alteration at the Matrix-Side Cytoplasm in Lung Adenocarcinoma Cells and Its Significance in Invasion

（論文内容の要旨）

<要旨>

アクチンが細胞膜下に形成する皮質アクチン線維はその収縮によってアメーバ型細胞運動を制御すると考えられているが、癌化に伴う細胞内局在の変化、浸潤、転移との相関は不明である。本研究では肺腺癌手術 109 例の臨床病理学的検討、肺腺癌細胞株 A549 のゲル内 3 次元培養を行い、皮質アクチン線維の分布と浸潤との相関を検討した。

気管支上皮・2型肺胞上皮では皮質アクチン線維は内腔側・細胞間細胞膜下に限局するが、浸潤癌では間質側にも集積を認め、基底膜の消失、脈管侵襲、リンパ節転移、予後と相関した。

Ⅰ型コラーゲンゲル内で3次元培養したA549コロニーの間質面に線維状アクチンとリン酸化ミオシン、PI(4,5)P2結合性プローブが集積したが、基底膜物質マトリゲル内では集積は抑制された。超解像蛍光顕微鏡、透過電顕で見るとⅠ型コラーゲン内では細胞膜の屈曲/突出が認められる一方、基底膜物質マトリゲル内では平坦化していた。間質面での線維状アクチンの増加は線維アクチン量自体の増加と細胞膜の屈曲/突出による見かけ上の増加を反映しており、基底膜によるアクチン線維の重合、収縮が制御される機序が考えられた。

ミオシン阻害薬Blebbistatinで間質面の皮質アクチン線維の集積は不明瞭となり、活性型Cdc42、MT1-MMPの遺伝子導入によるゲル内への浸潤は抑制された。また細胞実験と同様に浸潤癌症例でも間質面の細胞膜の屈曲/突出、平坦化が認められ、癌の浸潤・転移に皮質アクチン線維の収縮が関与している可能性が考えられた。

<諸言>

アクチンとミオシンは細胞運動において中心的役割を果たしており、アクチン線維の重合により形成される仮足が 2 次元細胞運動の推進力となる。3 次元細胞では間葉型、アメーバ型、集団型といった多様な細胞運動が関与する。

間葉型細胞運動はアクチン線維の重合により形成された偽足が推進力の主体であるがアメーバ型細胞運動ではアクチン線維の収縮による細胞質の突出が推進力となる。アクチン線維の収縮は集団型細胞運動にも関与するが、先導細胞よりもこれを追走する細胞でアクチン線維が収縮することが重要な役割を担っている。

皮質アクチン線維は細胞膜下に形成されるアクチン、ミオシン、アクチン結合蛋白からなる構造物である。極性の保たれた状態では細胞頂部にアクチン線維が局在し、底部にはほとんど見られないが、扁平上皮癌細胞株や卵巣癌細胞株では間質面に局在が認められ、癌の集団型細胞運動に関与していると考えられている。

我々は以前、肺腺癌症例でアクチン結合タンパク質 actinin1 と cortactin の細胞内局在変化が浸潤・転移と相関することを報告している。そこで癌細胞ではアクチン線維の局在の変化が起こり、浸潤・転移に関与していると考えた。

本研究では肺腺癌手術例を対象として免疫組織学的に皮質アクチン線維の局在を検討し、臨床病理学的に検討した。次に癌細胞株を用いたゲル内 3 次元培養を行い、皮質アクチンの局在と浸潤との関連を検討した。

<方法>

東京医科歯科大学で切除された 109 例の肺腺癌症例を対象に免疫組織化学学的な検討を行った。WHO 分類(2015)に準じて、各組織亜型に分類し、免疫染色結果は半定量化し、統計学的処理を行った。

肺腺癌細胞（A549）はⅠ型コラーゲン、基底膜物質マトリゲルを含むゲル内で 3 次元培養し、免疫組織学的手法で検討した。活性型 Cdc42 と膜型メタロプロテイナーゼ(MT1-MMP)はレンチウイルスを用いて発現させ、2 型ミオシン阻害薬として Blebbistatin、インテグリン β1 受容体阻害薬としてＡⅡB2 を用いた。

培養細胞や浸潤癌の細胞表面構築は超解像蛍光顕微鏡や透過型電子顕微鏡を用いて検討した。

<結果>

免疫細胞染色ではβ-actin 抗体 8H10D10 は線維状アクチンを認識する Lifeact-GFP、phalloidin とほぼ一致した局在を示しており、本研究で用いた β-actin 抗体の染色結果は線維状アクチンの分布を表していると考えられた

浸潤癌では内腔側、細胞間に加えて間質側細胞膜下にも β-actin の局在を認めたが、細気管支上皮細胞、Ⅱ型肺胞上皮細胞では内腔側、細胞間細胞膜下にほぼ限局し、非浸潤癌においても間質側細胞膜下にはほとんど認められなかった。Zo-1 の間質側細胞膜下での局在も見られたが、β-actin アクチンよりも低頻度であった。

間質側に β-actin の局在を示す症例は肺胞上皮内癌、微小浸潤癌よりも浸潤癌に多く、病期、リンパ節転移、脈管侵襲と正の相関を示し、生存期間や無病期間も有意に短かった。

A549 細胞はゲル内で球状コロニーを形成し、Ⅰ型コラーゲンゲル内で間質面に線維状アクチン、リン酸化ミオシン、PI(4,5)P2 結合性プローブが集積したが、マトリゲル内では抑制された。超解像蛍光顕微鏡、透過電顕でⅠ型コラーゲン内では細胞膜の屈曲/突出が認められた一方、マトリゲル内では細胞表面は平坦化していた。Blebbistatin で間質面の線維状アクチンは不明瞭となり、細胞の屈曲/突出は膨化していた。

活性型 Cdc42、MT1-MMP を導入すると球状コロニーからゲル内へ A549 細胞が突出し、鎖状に浸潤した。球状部分では線維状アクチンが増加し、細胞膜の屈曲/突出が見られたが、浸潤部分

では線維状アクチンは減少し、細胞膜は平坦となっていた。A549 細胞の核の位置を指標にコロニーの長軸長を計測すると Blebbistatin でゲル内への突出は有意に抑制された。

<考察>

肺腺癌細胞に認められた間質面の皮質線維状アクチンの増加は超解像蛍光顕微鏡、透過電顕の結果からアクチン線維量の増加、細胞膜の屈曲/突出による見かけ上の増加という 2 つの可能性が考えられた。

肺癌組織の超解像蛍光顕微鏡では平坦な癌細胞の間質面にも線維状アクチンが集積し、アクチン線維量自体が増加していることが考えられた。リン脂質 PI(4,5)P2 は Arp2/3、m-Dia1 などのアクチン重合因子の活性化、cofilin に代表されるアクチン脱重合因子の阻害によりアクチン線維の重合、脱重合を制御する因子の一つである。肺腺癌組織で基底膜物質ラミニンの消失と間質の β-actin の集積が相関したこと、マトリゲル内で A549 細胞の間質面に認められた線維状アクチン、PI(4,5)P2 結合性プローブの集積が抑制されたこと、インテグリン β1 受容体阻害薬 AⅡB2 により間質面の線維状アクチンが増加したことから、ラミニンとインテグリン β1 受容体からの情報伝達が PI(4,5)P2 の変化を介して、間質面のアクチン線維量を制御している可能性が考えられた。PI(4,5)P2 の変化は PI(3,4,5)P3 脱リン酸化酵素 PTEN の局在や PI(4,5)P2 分解酵素 PLC の活性の変化が関与している可能性が推察される。

基底膜物質マトリゲル内で平坦であった A549 細胞の間質側細胞膜には I 型コラーゲン内で細胞膜の屈曲/突出が認められ、間質面での線維状アクチンの増加が細胞膜の屈曲/突出を反映している可能性も考えられた。細胞膜の屈曲は非筋型ミオシンによるアクチン線維の収縮により形成されると考えられている。I 型コラーゲンゲル内で間質面に β-actin とリン酸化ミオシン軽鎖が局在し、Blebbistatin で間質面の線維状アクチンの集積が抑制され、細胞膜の屈曲が膨化したことは、細胞膜の屈曲/突出がミオシンを介したアクチン線維の収縮によって形成されている可能性が考えられた。ラミニンからインテグリン β1 受容体を介した情報伝達が Rho-A、ミオシン軽鎖のリン酸化を抑制することが報告されており、マトリゲル内で間質面の β-actin、リン酸化ミオシン軽鎖の集積が抑制されたことは基底膜が間質面の皮質アクチンの集積を抑制している可能性が示唆される。

β-actin は非浸潤癌で内腔側細胞膜下にほぼ限局していたが浸潤癌では間質側細胞膜下にも局在し、基底膜の消失、リンパ節転移、予後と相関していた。Blebbistatin で間質面の線維状アクチンは不明瞭となり、A549 細胞のゲル内への浸潤は抑制された。これらの結果から間質面に局在した線維状アクチンが癌の浸潤に関与している可能性が考えられた。しかし、間質面に線維状アクチンが集積していても A549 細胞は球状のコロニーを形成し、ゲル内への浸潤は見られなかったことから、その存在のみでは浸潤には不十分であると考えられた。

活性型 Cdc42、MT1-MMP を導入した A549 細胞は球状コロニーからゲル内へ鎖状に浸潤し、間質面の線維状アクチンは球状部分よりも浸潤部分で減少していた。超解像蛍光顕微鏡では浸潤部の細胞表面は平坦となっていて、アクチン線維の収縮が抑制されていると考えられた。集団型

細胞運動の先導細胞でアクチン線維の収縮が抑制されていることは過去に報告されていて、我々の実験モデルにおける浸潤細胞は先導細胞と共通した性質を有している可能性が考えられた。以上のことから癌細胞の浸潤には①間質面のアクチン線維の収縮により細胞集団内の圧力が上昇し、間質方向への局所的な細胞質の突出が起こる。②アクチン線維の収縮により突出した細胞の核が間質方向に移動し先導細胞が形成される。③先導細胞ではアクチン線維の収縮が抑制されることで細胞膜が平坦になりゲル内へ浸潤する。という 3 つの機序が関与していると考えられた。

細胞頂部に局在する tight junction 分子 Zo-1 も浸潤癌では間質面に集積が見られたが、β-actin の集積よりも頻度は低かった。膀胱癌、乳癌、唾液腺癌などの他臓器で微小乳頭型といわれる細胞極性が反転した腫瘍亜型が存在し予後不良なことが知られている。これらの特殊な変化以上に癌化に伴い細胞内局在の変化する分子が存在し、それが癌の浸潤に直性関与している可能性があることを考えている。

間質面での β-actin の局在は浸潤や予後を評価する因子として有用である同時に治療標的にもなり得る可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5147　号	冨井　翔平
論文審査担当者	主　査　北川　昌伸 副　査　中田　隆夫、稲澤　譲治	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は肺腺癌における皮質アクチン線維の役割の検討についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

皮質アクチン線維は気管支上皮や2型肺胞上皮の内腔側･細胞間質細胞膜下に存在することが知られている。本研究は肺の癌化に伴う皮質アクチンの細胞内局在の変化、浸潤、転移との相関を解明する目的で、外科的肺腺癌手術症例109例を用いて臨床病理学的な検討を行った。また、肺腺癌細胞株を用いて皮質アクチンの分布と浸潤との相関を検討した。これまで癌化に伴う皮質アクチンの細胞内局在の変化や浸潤、転移との相関の解析は進んでおらず、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.　浸潤を伴う肺腺癌症例では間質側にも皮質アクチンの集積が認められ、基底膜の消失、脈管侵襲、リンパ節転移、予後と相関した。

2.　肺腺癌細胞株A549を3次元培養した場合、I型コラーゲン内と基底膜物質マトリゲル内では細胞形態や皮質アクチンの分布が異なっていた。

3.　ミオシン阻害薬によって間質面の皮質アクチン線維の集積は不明瞭となり、ゲル内への浸潤形質も抑制された。

以上のように申請者は、肺腺癌における皮質アクチンの分布が癌の浸潤、転移に関与し、予後予測の上で重要な所見であることを明らかにしている。これは臨床的にも極めて意義のある研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では臨床検体に対して詳細な病理組織像の解析が行われ、臨床所見との対応の検討がなされるとともに細胞株を用いた解析も行われた。本研究は十分な病理組織学的診断・解析能力と臨床的知識および実験的手法の理解の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と能力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果について、皮質アクチン線維の収縮が癌の浸潤、転移に関与している可

能性があると考察している。臨床検体での検討と細胞株を用いた解析で得られたこれらの解釈は極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	藤井　悟
論文審査担当者	主査　内田　信一 副査　樗木　俊聡、植竹　宏之
論　文　題　目	PGE_2 is a direct and robust mediator of anion/fluid secretion by human intestinal epithelial cells

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

腸管は生体の体液・電解質バランスを司る極めて重要な臓器である。腸管粘膜上皮からの水分泌は、Cl^-を主体とする陰イオンの分泌に伴って受動的に生じると考えられているが、従来の解析手法ではヒト腸管上皮細胞の水分泌能を直接的に解析することは困難であった。本研究では腸管上皮培養細胞（オルガノイド）を用い、生理的状態および炎症環境においてヒト小腸上皮細胞のCl^-/水分泌能を直接制御する因子の探索と同定を試みた。腸管上皮細胞からのCl^-/水分泌は、当該因子添加によるオルガノイド断面積の変化により判定し、これを 3D スキャナを用いて定量化し、各因子の EC_{50} を算出した。同手法を用いて、下痢を惹起すると考えられているプロスタグランジン E_2（PGE_2）、Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)、アセチルコリン（ACh）、ヒスタミン等の生理活性物質に対するオルガノイドのCl^-/水分泌能を解析したところ、PGE_2が最も強力で持続的な生理活性物質と考えられた。また、PGE_2による腸管上皮細胞からの水分泌は、培地中のCl^-に依存していること、およびCl^-チャネルである CFTR や各種 K チャネルおよびイオントランスポーター等と関連していることが示唆された。一方、TNF-α等の炎症性サイトカインの腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌に対する直接作用は認められず、また PGE_2 の効果を修飾する効果も認められなかった。よって、炎症環境において発現が上昇する様々な因子のうち、PGE_2 がヒト腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌を直接制御する因子として主たる役割を担っていると考えられた。

＜緒言＞

腸管は生体の体液・電解質バランスを司る極めて重要な臓器であり、そのバランスは様々な生体因子によって厳密に調整されている。腸管上皮細胞を介した水の移動は腸管上皮細胞上に発現するイオンチャネルやイオントランスポーター等を介したイオン輸送に付随して起こると考えられている。特に、腸管上皮細胞から管腔側への水の輸送は、Cl^-を主体とする陰イオンの分泌に伴って起こると考えられている。これまで in vitro におけるヒト腸管上皮細胞の Cl^-輸送能および水輸送能の解析は、主に大腸癌細胞株や生検検体を用いた電気生理学的実験によって行われてきた。しかし同方法ではヒト腸管上皮細胞特異的な水分泌能を直接解析することは困難であった。本研究ではヒト小腸生検組織より 3 次元培養法にて樹立した腸管上皮培養細胞(オルガノイド)を用い、

ヒト腸管上皮細胞の水分泌能を直接制御する因子の探索と同定を試みた。

＜方法＞

炎症性腸疾患の診断・治療目的等で小腸内視鏡を実施した患者より同意を取得の上、小腸および大腸から生検組織を採取した。Sato らの報告を基に、生検組織より上皮細胞を単離し、ヒト腸管上皮オルガノイドを樹立した。

ヒト腸管上皮オルガノイドを 96 well プレートに播種し 1 日培養後、種々の生理活性物質やサイトカインを添加した。水分泌応答は当該因子添加によるオルガノイド断面積の変化により判定し、これを 3D スキャナにて定量化し、ヒト腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌能に対する各種生理活性物質、サイトカインの効果を比較検討した。

＜結果＞

ヒト腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌能を、ヒト腸管オルガノイドの断面積変化として高効率に解析可能な手法を、新規の 3D スキャナを用いて確立した。腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌能の促進因子として知られている forskolin を用い、この手法が蛍光色素を用いてオルガノイド断面積変化を解析した既報と同等に腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌能を解析可能であることを確認した。

同手法を用い、生理的状態および炎症状態において、ヒト腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌能の制御に関わると考えられている PGE_2、VIP、ACh、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニンの、ヒト腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌能に対する効果を解析した。これらの生理活性物質のうち、Gs 受容体を介して働く PGE_2 と VIP が最も大きなオルガノイドの膨張率を示し、その効果が持続的であることが明らかとなった。一方、Gq 受容体を介して機能する生理活性物質のうち、ACh、ヒスタミンは軽度のオルガノイド膨張率を示し、セロトニン、ブラジキニンはオルガノイドの膨張効果を示さなかった。また、それぞれの EC_{50} 値を算出したところ、PGE_2 の EC_{50} が最も小さな値となった。よって、これらの生理活性物質の中で、PGE_2 が最も強力で持続的な Cl^-/水分泌の促進因子と考えられた。

次に、ヒト腸管上皮細胞に対する PGE_2 の水分泌促進作用が Cl^-依存的であるかを検証した。オルガノイドの培地を Cl^- free のリンゲル溶液に交換した上で PGE_2 を添加すると、PGE_2 によるオルガノイドの膨張が完全に抑制された。また、そこに Cl^-を添加すると PGE_2 によるオルガノイドの膨張が認められた。以上より、PGE_2 によって引き起こされるオルガノイドの膨張現象には、培地内の Cl^-の存在が不可欠であることが分かった。さらに、培地中の Cl^-濃度を変化させて、PGE_2 の Cl^-/水分泌能を 3D スキャナで解析し比較したところ、PGE_2 の効果は培地中の Cl^-イオン濃度に依存していることが分かった。以上より、PGE_2 によるオルガノイドの膨張現象は、オルガノイドを構成する腸管上皮細胞の Cl^-分泌作用によって起こると考えられた。

腸管上皮細胞には、様々なイオンチャネルやイオントランスポーターが発現し、Cl^-/水輸送を分子レベルで制御していることが知られている。そこで次に、腸管上皮細胞に発現する各種イオンチャネルやイオントランスポーターの阻害剤を用いて、これらのイオンチャネルやイオントランスポーターと、PGE_2 によって誘導されるオルガノイドの膨張現象との関係性を 3D スキャナを用いた手法で解析した。PGE_2 によるオルガノイドの膨張効果は、管腔側に発現する主要な Cl^-チャ

ネルである CFTR、基底膜側に発現する K チャネルである KCNQ1 および KCNN4、基底膜側に発現するイオントランスポーターである NKCC1 の阻害剤によって抑制された。よって、PGE_2 によって引き起こされる腸管上皮細胞からの Cl^-/水分泌は、これらのイオンチャネルやイオントランスポーターを介して行われていると考えられた。

最後に、潰瘍性大腸炎やクローン病などの病態に関与すると考えられている一連のサイトカインが、ヒト腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌能に及ぼす影響を検討した。13 種類のサイトカインをそれぞれオルガノイドに添加し、3D スキャナで Cl^-/水分泌能を解析したが、いずれのサイトカインもオルガノイドの膨張効果を示さなかった。また、オルガノイドを各種サイトカインで 30 分間前処置し、そこに PGE_2 を添加することで、サイトカインが PGE_2 の効果を修飾しうるかを検討したが、いずれのサイトカインも PGE_2 の効果に影響を示さなかった。

＜考察＞

本研究では、腸管上皮細胞の陰イオン/水分泌能を、ヒト腸管上皮オルガノイドの断面積変化として高効率で解析できる手法を確立した。各種生理活性物質のうち、Gs 受容体を介する PGE_2 と VIP が、Gq 受容体を介する ACh、Histamine、Serotonin、Bradykinin よりも強力で持続的な効果を有していると考えられた。この違いは、Gq 受容体が不応期になりやすいことや、受容体の発現ベルの差異などによると考えられた。

PGE_2 によるオルガノイドの膨張は、Cl^- free 環境では完全に抑制された。よって、PGE_2 によるオルガノイドの膨張現象は環境内の Cl^-の存在に依存していることが示された。これは、腸管上皮細胞の水分泌と同時に移動している陰イオンは主に Cl^-であるという考えを支持する結果であった。

各種阻害剤を用いた実験より、PGE_2 による Cl^-/水輸送は、CFTR、NKCC1、KCNQ1、KCNN4 に依存していることが分かった。NKCC1 と KCNQ1 は腸管上皮の陰窩側に優位に発現していることが知られているので、炎症時に間質から分泌されると考えられる PGE_2 が陰窩側から腸管上皮細胞に作用し、NKCC1 や KCNQ1 と共役して水の過剰分泌に関わっていると推定された。

潰瘍性大腸炎やクローン病の炎症粘膜では、PGE_2 の発現が亢進すると共に、様々な炎症性サイトカインの発現も亢進し、これらが病態に関与していると考えられている。本研究では、炎症性サイトカインには腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌作用を促進させる直接作用はなく、また PGE_2 の効果を修飾する作用も認められなかった。よって、炎症状態における腸管上皮細胞の Cl^-/水分泌は主に PGE_2 の濃度によって決定されている可能性が示唆された。

＜結論＞

腸管粘膜の炎症環境において発現が上昇する様々な因子のうち、PGE_2 がヒト小腸上皮細胞の Cl^-/水分泌を直接制御する因子として主たる重要な役割を担っている可能性が示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5148　号	藤井　悟
論文審査担当者	主 査 内田 信一 副 査 樗木 俊聡、植竹　宏之	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、ヒト腸管上皮から培養したオルガノドを用い、その経上皮水・イオン輸送能を３次元スキャナーを使って計測する方法を考案し、輸送を刺激すると想定される各種ホルモン等を添加して実際にどの物質が輸送を刺激するかを検討し、PGE2 が輸送を刺激する事を見いだした論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

今まで腸管上皮による経上皮輸送は、実際の腸管から筋層をはがして材料を用意する方法や癌由来の腸管上皮培養細胞を用いた方法にて評価されてきた。しかしながら、前者はその実験手技の煩雑性があり、後者は正常細胞で無いという欠点があった。本申請者は、所属する研究室が確立した腸管オルガノイドを用いる事で、これらの点を克服し、より生理的な腸管での経上皮輸送を評価できると考えた。また、その輸送を定量化するために、３D スキャナーを使用するという独創的な手法を導入している。

２）社会的意義

炎症性腸疾患では、下痢等を引き起こす腸管上皮での水・電解質輸送の破綻があると推測されている。その原因物質や、治療法の開発に、ヒトの生理的な腸管に近いと思われるオルガノイドを使用して研究する事で、より臨床応用に近い知見が得られる可能性がある。

３）研究方法・倫理観

ヒトの腸管の生検材料を用いた研究であるが、その旨研究計画の承認を受けており問題無いと思われた。

４）考察・今後の発展性

測定系をハイスループットに出来る可能性を秘めており、腸管における水・電解質輸送をリードアウトとした病原物質の解明や創薬に結びつく可能性がある。

３．その他　特になし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	廣瀬　俊輔
論文審査担当者	主査　荒井　裕国 副査　古川　哲史、下門　顕太郎
論　文　題　目	Treatment of in-stent restenosis with excimer laser coronary angioplasty: benefits over scoring balloon angioplasty alone

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

経皮的冠動脈インターベンション(PCI)後のステント内再狭窄(in-stent restenosis (ISR))は通常の病変と比較して再発を繰り返しやすく、PCI の有用性が低下することが知られている。

本研究では、ISR 治療に対する、excimer laser coronary angioplasty（ELCA）治療を有用性と安全性の評価を目的として行われた。

対象となる PCI 後の ISR 患者 23 人とも scoring balloon による治療を行った。１２名の ELCA 群では scoring balloon 拡張の前処置として ELCA を行った。scoring balloon とは、バルーンの外側に沿ってワイヤーや金属製のスコアリングエレメントが数本付いたバルーンである。エレメントが balloon 拡張時に病変に亀裂を入れて拡張する。Non-ELCA 群 11 人は scoring balloon 拡張のみを行った。すべての患者に治療前後に quantitative coronary angiography(QCA)および frequency domain optical coherence tomography (FD-OCT)を用いた評価を行い、ISR 治療から 6 ヶ月後のフォローアップ冠動脈造影で、標的病変再血行再建(target lesion revascularization (TLR))の有無を判定した。なお、FD-OCT とは光ファイバーを用いた走査装置で、病変の詳細な観察、計測が可能である。

患者背景および病変背景には両群間に有意差を認めなかった。6 ヶ月時点では、心臓死、心筋梗塞、ステント血栓症は、両群間で認めなかった。Scoring balloon の拡張圧は ELCA グループで有意に低かった(9.0±3.1 atm vs. 14.9±4.3 atm, p=0.001)。治療 6 ヶ月後のフォローアップ造影では、TLR 率は両群間に有意差はなかったが(16.7% vs. 45.5%, p=0.09)、晩期内腔損失径(late luminal loss)は ELCA 群で有意に低かった(0.7±0.6 mm vs. 1.3±0.7 mm, p=0.03)。

ELCA は ISR 治療に安全に施行可能であった。scoring balloon 単独と比較して、晩期内腔損失径を有意に改善し、有意ではないが相対的に再狭窄率は低い傾向にあった。ELCA を併用することで、scoring balloon の拡張圧を低下させ、血管のダメージを減らせる可能性が示唆された。

＜緒言＞

経皮的冠動脈インターベンション(PCI)後の再狭窄は、ステントの使用頻度が増した昨今では減少傾向にある。しかしながら一旦ステント内再狭窄(in-stent restenosis (ISR))がおこると、標的

病変再血行再建(target lesion revascularization (TLR))率は上がり、PCI は最初の時と比べ有用性が低下する。再狭窄治療にステントの追加植込みは再狭窄を減らすが、金属の重複による懸念などがある。Stent の追加植込みを行わず替わりに、ロータブレーター、scoring balloon および血管内放射線治療などで ISR 治療を行うことは、Stent の追加植込みをしないで ISR 治療を行う治療戦略と考えられてきた。scoring balloon とは、バルーンの外側に沿ってワイヤーや金属製のスコアリングエレメントが数本付いたバルーンである。エレメントが balloon 拡張時に病変に亀裂を入れて拡張する。しかし、これまでにこれらの治療は ISR 治療に対して充分な有効な結果を出せていない。ISR 治療には再狭窄部の血管径をできるだけ大きくすることが重要とされているが、しかしながら従来の治療では十分には拡張できず、再狭窄治療が失敗する原因と考えられてきた。

ELCA 治療は新生内膜の体積を減らすことできる。新生内膜の体積を減らすことで、従来の治療とは異なり再狭窄部の血管径を大きくすることができ有用性が期待できる。ISR に対する ELCA の有用性はこれまでも報告があるが、そのメカニズムに関してはいまだ充分に明らかになっていないのが現状である。本研究では ISR 治療を行う際に、ELCA 治療を行った後 scoring balloon による拡張を行った。それぞれの手技後に定量的冠動脈造影(QCA)および frequency domain optical coherence tomography (FD-OCT)を用いて評価することで、それぞれの段階の詳細なメカニズムを明らかにできると考えた。なお、FD-OCT とは光ファイバーを用いた走査装置で、病変の詳細な観察、計測が可能である。血管壁の状態や新生内膜の体積の計測に使用された。

また治療後 6 ヶ月時点での血管造影上の結果(QCA の比較)および臨床的有用性(心臓死、心筋梗塞、ステント血栓症、標的病変再血行再建（target lesion revascularization (TLR)）の有無)を評価した。

＜方法＞

試験デザイン

本研究は後ろ向き、単施設研究で、2010年4月から2014年7月までに23人が登録された。すべての患者は治療前に1日1回81-100 mgのアスピリン内服及び1日1回の75mgのクロピドグレルあるいはチクロピジン1日2回の100mg内服した。2010年4月から2013年2月までの連続11例はNon-ELCA群に割り付けた(Non-ELCAグループ)。2013年3月から2014年7月までの連続12例はELCA群に割り付けた(ELCAグループ)。Scoring balloonとしてLacrosse® non-slip element (NSE) (Goodman Co., LTD., Nagoya, Japan)を使用した。PCI戦略は術者に委ねられた。ヘパリンは標準的投与をした。Device successは病変をレーザーカテーテルとLacrosse® NSEが通過したときと定義した。治療は拡張が成功して標的病変が50%以下となったら完了とした。残存病変が50%以上あるときには、術者はLacrosse® NSEの拡張圧を上げることができた。治療直後の成績はQCAとFD-OCTで評価した。血管造影の結果から初期獲得内腔径(acute gain)を求めた。acute gainとは治療直後最小血管径(minimal lumen diameter (MLD))と治療前MLDの差で表すことができる。MLDとは、冠動脈造影を行い病変の最少血管内腔の直径のことである。

フォローアップ造影は全患者に行い、血管造影による評価(QCA)と臨床的有用性の評価(心臓死、心筋梗塞、ステント血栓症の発生およびTLRの有無)をおこなった。なお、FD-OCTはPCI時のみ施行された。それに対してQCAデータは治療時およびフォローアップ造影時に測定された。

＜結果＞

年齢、性別、家族歴、冠危険因子、既往歴、左室機能および腎機能などの、患者背景は ELCA 群、Non-ELCA 群で同等であった。血管造影所見、標的血管、留置されているステント径、ステント長および手技成功率などの、病変背景は 2 群間で有意差はなかった。

6 ヶ月時点では、心臓死、心筋梗塞、ステント血栓症は、両群間で 1 例も認めなかった。また TLR 率は、両群間で有意差はなかったが、Non-ELCA 群で高い傾向にあった(16.7% vs. 45.5%, p=0.09)。

QCA

ELCA群では、MLDは、0.6±0.2 mm から 2.2±0.5mmへ増加した。治療後6ヶ月時は1.4±0.5 mmだった。Non-ELCA群ではMLDは0.6±0.3 mm to 2.2±0.4 mm,へ増加した。治療後6ヶ月時は0.9±0.7 mmだった。acute gainに有意差は無かった。

治療後6ヶ月時の晩期ステント内腔損失(late luminal loss)は、ELCA群で有意に小さかった(0.7±0.6 mm vs. 1.3±0.7 mm, p=0.03)。late luminal lossは、治療後6ヶ月時と治療直後のMLDの差で表すことができる。

FD-OCT 所見

新生内膜の体積の減少率は、ELCA 後 2.6%であり、ELCA 群の新生内膜の体積の減少は scoring balloon の拡張によって得られた。また FD-OCT では、治療前後の新生内膜の状態を観察できた。治療後のプラークの亀裂(tear)の数は ELCA 群で有意に少なかった(6.3±1.3 vs. 10.1±4.7, p=0.037)。

＜考察＞

本研究は ISR 治療に ELCA を使用し FD-OCT で詳細に観察した最初の試験である。

西野らは Cutting balloon と ELCA との比較検討を行ったが、本研究では scoring balloon 単独を対照として、ELCA の臨床的有用性を対照試験で評価した。

本研究では、TLR 率は 16.7%であり、これまでの報告（TLR 率は 10－30%）と同等であった。本研究では、Non-ELCA 群に比較して ELCA 群の方が TLR 率は低い傾向にあった(p=0.09)。QCA の分析では、初期獲得内腔径(acute gain)に有意差は無かったが、late luminal loss は ELCA 群で有意に低かった。これまでの報告では、Mehran らは血管内超音波(IVUS)を用いて研究を行い、再狭窄治療にはステントの拡張と新生内膜の押し出しによる血管内腔増加が重要とされている。すなわち acute gain をより大きくすることが、ISR 治療に有用だとされてきたが、本研究では acute gain には両群間に有意差は無かった。しかし一方で、late luminal loss に有意差があり、TLR は ELCA 群で低い傾向にあった。この結果の理由は、治療直後の結果ではなく、治療後の

経過(healing process)が影響していると考えられた。

体積の減少が期待された ELCA 群では、ELCA 後の体積の減少はわずか 2.6%であった。この結果は ELCA による体積減少が ISR 率の改善をもたらしたわけではないことを示している。

また balloon の拡張圧が大きいと血管壁の解離を起こし(血管壁の損傷を起こし)、TLR 率を上げる可能性がいわれている。本研究では ELCA はプラークを柔らかくして、balloon 圧をより低圧にでき血管壁の損傷を少なくすることができることで(tear の数を減らすことができ)、ISR 治療に貢献したと考えた。

＜Limitation＞

後ろ向き、単施設研究である。また Randomization が不十分でサンプル数が少ない。

＜結論＞

ELCA は ISR 治療に安全に施行可能であった。scoring balloon 単独と比較して、晩期獲得内腔径を有意に改善した。有意ではないが相対的に再狭窄率は低い傾向にあった。ELCA を併用することで、scoring balloon の拡張圧を低下させ、血管のダメージを減らせる可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5149　号	廣瀬　俊輔
論文審査担当者	主　査　荒井　裕国 副　査　古川　哲史、下門　顕太郎	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、経皮的冠動脈インターベンション(PCI)後のステント内狭窄に対するエクシマレーザー冠動脈形成術(ELCA)の有効性を臨床例において研究した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

PCI 後のステント内狭窄に対しは Scoring Balloon の使用が一般的であるが、Scoring Balloon 使用に際し、ELCA を併施した臨床研究は行われていない。申請者らは、Scoring Balloon と ELICA の併用による再狭窄防止効果の安全性と有効性を臨床例で解析しており、その着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．　Scoring Balloon の拡張圧及び内膜亀裂発生頻度は、ELCA 群で有意に低かった。

２．　遠隔期のステント内腔損失は ELCA 群で有意に小さかった。

以上のように申請者らは、ELCA による再狭窄防止効果の有効性を明らかにしている。これは、臨床的に有用な研究成果であると考えられる。

３）研究方法・倫理観

本研究は、本学で 2010 年 4 月から 2014 年 7 月までに PCI 後のステント再狭窄に対して再血行再建を施行した 23 例の臨床例において、治療急性期ならびに 6 か月後の冠動脈内膜性状を光干渉断層法(FD-OCT)にて評価した。医学部臨床審査委員会の承認を得て、本研究は周到な準備のもとに実施されている。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者らは、ELCA による再狭窄防止効果は、冠動脈プラークの体積減少よりも病理組織学的な質的変化が主因と考えられると考察しており、今後、レーザー波長と照射時間を変化させることで、より一層治療の有効性を高められる可能性が示された。今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	村井　典史
論文審査担当者	主査　古川　哲史 副査　荒井　裕国、下門　顕太郎
論　文　題　目	The influence of elective percutaneous coronary intervention on microvascular resistance: a serial assessment using the index of microcirculatory resistance

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

冠微小循環の異常は患者の予後に影響を与える因子であることがいままでの研究で報告されているが、percutaneous coronary intervention（PCI）による冠動脈狭窄の解除により最大充血時の冠微小循環にどのような影響を与えるのか未だ明らかになっていない。PCI により冠動脈狭窄病変の治療に成功した安定狭心症患者 7 1 例において、Index of Microcirculatory Resistance（IMR）を冠微小循環の指標として用いて、術前・術後・10 か月後の遠隔期の IMR を経時的に評価し、PCI の冠微小循環への影響を調べた。その結果、IMR は術前、術後、遠隔期でそれぞれ中央値 19.8(四分位範囲 14.6-28.9)、16.2(11.8-22.1)、14.8 (11.8-18.7)であり、治療後に全体として有意に低下を認めた($p<0.001$)。また術前の IMR の値は術後、遠隔期までの IMR の変化のどちらとも相関を認めた(それぞれ $r=0.84$;$p<0.001$、$r=0.93$;$p<0.001$)。遠隔期までに IMR が低下する群の術前の IMR は IMR が上昇する群に比べ有意に高値であり[術前 IMR: 25.4 (18.4-35.5) vs. 12.5 (9.4-16.8); $p<0.001$]、逆に IMR 低下群の遠隔期の IMR は IMR 上昇群に比べて低値であった。[遠隔期 IMR: 13.9 (10.9-17.6) vs. 16.6 (14.0-21.4); $p=0.013$]。さらに IMR の低下は熱希釈法で求めた mean transit time を指標とした冠血流の上昇と関連していた($p<0.001$)。術後・遠隔期の IMR の低下を予測する術前の IMR の値はそれぞれ 16.8 と 17.0 であった。結論として PCI による冠動脈狭窄の解除は冠微小循環に影響を与え、その変化は術前の冠微小循環の状態と関係があった。全体として最大充血時の冠微小循環抵抗は遠隔期までに低下を示し、PCI による冠微小循環抵抗の変化は PCI 後の冠血流に影響を与えること示唆された。

＜緒言＞

冠微小循環の機能的、構造的な異常は冠微小血管抵抗の上昇として示されるが、冠動脈の狭窄のみでなく、冠微小循環の異常も同様に心筋虚血の原因となりうると考えられ、予後不良の予測因子であることが示されている。経皮的冠動脈形成術（PCI）の目的は冠動脈狭窄の解除による冠血流の改善であるが、冠微小循環の改善も冠血流の上昇に影響をもたらすことが予想される。しかしながら、PCI によって冠微小循環が短期的のみでなく、長期的にど

のような影響を受けるのかは未だ明らかでない。我々は冠微小循環に特化した指標として Index of Microcirculatory Resistance（IMR）を用いて、PCI の冠微小循環に対する影響を術前から術直後と治療後 10 か月の遠隔期の経時的に IMR の変化を観察し、PCI による治療が冠微小循環に与える影響を評価し、その変化の予測因子を調査した。また治療による冠微小循環の変化と冠血流の変化の関係についても検討した。

＜方法＞

冠動脈造影にて中等度狭窄病変を有する安定狭心症患者 90 症例を対象とした。PCI による心筋障害（術後トロポニン I ≥1.0 ng/ml）を生じた症例等を除き、PCI 前後、治療後 10 か月で冠動脈の生理学的な評価を施行し得た 71 症例で最終的な解析を行った。冠動脈の生理学的な評価として、0.014inch の圧と温度センサーを備えたワイヤーを冠動脈の病変より遠位部に留置し、最大充血状態での大動脈圧（P_a）、冠動脈遠位圧（P_d）と冠血流の指標として熱希釈法により冠血流の逆数と相関する mean transit time (T_{mn})の測定を行った。今回の研究ではアデノシンの経静脈的投与(140μg/kg/min)により最大充血状態を生じさせた。心外膜狭窄の生理学的な指標として fractional flow reserve (FFR = P_a/P_d)、冠微小循環の指標として IMR（IMR = Pd x T_{mn}）を算出した。

＜結果＞

術前の IMR は中央値 19.8 であり、6.3 から 9 の 9.1 の範囲で分布していた。術後、遠隔期の IMR はそれぞれ中央値で 16.2、14.8 であり、どちらの時点でも術前の IMR から有意に低下していることが確認された[術直後までの IMR の変化：中央値（四分位範囲）3.8 (-1.7–11.3)、遠隔期までの IMR の変化：5.9 (-2.4–13.5)、p<0.001]。一方で術後から遠隔期にかけての IMR は低下傾向を示したが、有意な変化を認めなかった[中央値 1.8 (-2.3–6.6)、p=0.11]。術前から術後、遠隔期までの IMR の変化は、術前の IMR の値と相関を認めた[それぞれ r=0.84（p<0.001）、r=0.93（p<0.001)]。術前に高値を示す IMR は術後・遠隔期に低下を認め、その変化の大きさも術前の値と関係していた。一方で術前に低い IMR を示すものは、逆に PCI による治療により IMR の上昇を認めた。術前から遠隔期までに IMR の低下は 49 例（69.0%）で認められたが、22 例（31.0%）では上昇が認められた。遠隔期までの IMR が低下する群の術前の IMR は、IMR が上昇する群に比べ有意に高値であった[術前 IMR: 25.4 (18.4-35.5) vs. 12.5 (9.4-16.8), p<0.001]。心外膜狭窄病変の重症度の指標である術前の FFR は両群に違いを認めなかった。一方で治療による IMR の低下は冠血流の改善と強い相関が認められた(r=0.95; p<0.001)。ROC 曲線から遠隔期の IMR の低下を予測する術前の IMR の値は 17.0（AUC 0.89; p<0.001）であり、さらに遠隔期までの IMR の改善を予測する多変量ロジスティック解析では術前の IMR が唯一の予測因子であった。

また術後から遠隔期までの IMR の変化は術後の IMR と相関を認め、術後の高い IMR は遠隔期までに IMR の低下を認め、術後の低い IMR は遠隔期には上昇傾向を認めた。

＜考察＞

今回の研究では術前のIMRは幅広く分布しており、PCI直後または遠隔期にかけてのIMRの変化の範囲も広いことが判明し、全体として遠隔期までIMRの低下を認めた。IMRの変化の方向、大きさは術前のIMRと相関があり、術前のIMRが17.0という値を境に、治療によりIMRの低下もしくは上昇が生じることが判明した。術前の高いIMRを示す病変へのPCIは術後にIMRの低下が得られ、さらにIMRの低下は冠血流の増加と関係を認めた。

いままでの報告ではPCIによってIMRで評価される最大充血時の冠微小血管抵抗は変化しないとする報告もあり、我々の結果と異なる。しかし、我々の研究ではIMRの変化は術前のIMRの値によって異なる事が判明した。つまり評価の対象となる冠動脈の術前のIMRの分布の違いが、我々の結果と以前の報告の違いを説明しうる。

[治療後の冠微小循環の急性の変化と遠隔期までの微小血管の適応]

今回我々の研究からPCIによる冠動脈の狭窄の解除により、急性期の冠微小循環の変化と遠隔期にかけての変化が確認された。術前のIMRにより評価される冠微小循環は、冠動脈狭窄による慢性的な冠動脈遠位圧の低下により生じている微小循環のリモデリングと、狭窄の存在下での微小循環のコンディションを合わせて反映していると考えられる。つまり術前の高いIMRは、慢性的な遠位圧の低下による様々な程度の微小循環のリモデリングに加え、灌流圧の低下による微小血管の受動的な拡張の低下を反映していることが示唆される。そのような術前のIMRが高い状態において狭窄の解除により微小循環の灌流圧が回復し、急性期には微小血管の拡張を伴い冠血流が増加したことが考えられた。一方で術前に低い冠微小循環抵抗を示す病変では、狭窄の存在下でもすでに微小血管は十分な拡張が得られており、冠血流は保たれているため治療によっても急性期の冠血流の上昇に寄与しないと考えられる。

術前のIMRとその後の変化と同様の関係が、術後のIMRと遠隔期までのIMRの変化にも認められた。つまり術後に高いIMRは遠隔期には低下を示し、術後の低いIMRは遠隔期には上昇を示した。術後のIMRは慢性的な冠動脈狭窄病変の遠位部で生じていた様々な微小循環の構造的、機能的なリモデリングを反映していると考えられる。術後の高いIMRは、以前に報告されている微小血管の求心性のリモデリングや、血管収縮反応の増強等の微小血管の変化を反映していると考えられる。一方で術後に低いIMRを呈した病変は遠心性の血管のリモデリング等を反映している可能性が考えられる。これら術後直後に顕在化する構造的そして機能的なリモデリングを伴う微小循環の異常な状態のもとでは、心筋の代謝と冠血流の不均衡が生じている可能性が考えられる。PCIにより遠位灌流圧の回復後に遠隔期にかけて、異常な微小循環の状態は適正な状態に近づくように適応していく可能性が考えられた。最終的にPCI後の冠微小循環抵抗の変化は、灌流圧の回復による急性の変化と慢性期の微小循環の適応を反映し、本研究では全体として冠微小循環抵抗は低下したと考えられる。

[PCIによる冠微小循環抵抗の変化の臨床的な意味]

PCIの目的は冠血流を上昇させることであり、PCIにより冠微小循環が影響を受けるかどうかは治療において重要な意味を持つ。我々の研究では治療により術前から遠隔期にかけて

IMR の低下を伴って冠血流は増加を示した。しかしながら PCI により冠微小循環抵抗が上昇したいくつかの病変では冠血流は改善せず、逆に低下するものも認められた。PCI によっても冠血流が改善しない病変が存在するかもしれないとう結果は今後の研究で評価すべき課題である。

FFR は PCI の適応の重要なゲートキーパーであるが、術前の FFR の値は微小循環の変化を予測できなかった。その原因として FFR の測定には微小循環が影響する可能性が以前に報告されており、微小循環障害を伴う病変を予測することは困難であったと考えられる。つまり FFR ≥0.75 や>0.80 を示す FFR ガイドでは治療適応にならない病変には、冠動脈の病変が有意でないものと、冠微小循環障害を伴うことで冠血流が低下しているために心外膜血管の狭窄の重症度を FFR では軽く見積もられている（FFR の値は高く算出される）病変が存在していると考えられている。我々の研究の結果から、特に FFR では評価が困難な冠微小循環障害を伴う病変において、術前の IMR は PCI による冠血流の改善が得られる治療すべき病変を指し示す可能性がある。今回の研究の結果は、冠微小循環の異常の有無により冠動脈狭窄病変を持つ患者を区別する新しい治療戦略を提示しうるかもしれない。我々の結果は PCI による冠動脈狭窄病変の改善による急性期と遠隔期の微小循環の劇的な変化に対する新しい見識を提示した。

＜結論＞

待機的な PCI による心外膜狭窄の改善は最大充血時の冠微小循環抵抗に影響を与え、その変化は治療前の微小循環の値に応じて幅広く分布していた。全体として治療後に微小循環抵抗は明らかに低下を示した。術前の冠微小循環抵抗は、治療直後・遠隔期の冠微小循環の変化を予見し、そして PCI により治療後の冠血流の改善が得られる病変であるのか判別する情報を提供できる可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5150　号	村井　典史
論文審査担当者	主　査　古川　哲史 副　査　荒井　裕国、下門　顕太郎	

【論文審査の要旨】

1. 論文内容

経皮的冠動脈形成術(PCI)による心外膜表面冠動脈の狭窄の解除は、冠微小循環抵抗の改善をもたらした。

2. 論文審査

1) 研究目的の先駆性・独創性

近年カテーテル技術の進歩により冠循環の評価がかなり詳細にできるようになってきている。従来は、冠動脈造影による狭窄の程度により PCI の適応を決めていたが、最近では心外膜表面の太い冠動脈のよりよい指標として FFR(Fractional Flow Reserve)が導入され、これが PCI 適応の基準となっている。一方で、より心筋循環を反映すると考えられる IMR(Index of Microvascular Resistance)の測定もできるが、この意味は議論の残るところである。申請者は、この今まさに研究が行われ、議論が行われている領域で、PCI が心筋循環をよりよく反映すると考えられている IMR が PCI により本当に改善するのか検討を行った。

2) 社会的意義

PCI の施行例が急激に増え、医療費の上昇も含めて、過剰な適応であるとの指摘がなされている。本研究は、PCI により IMR は全体としては有意に改善しており、PCI 施行の妥当性にさらなる根拠を与えた。一方で、FFR が陽性で現行の基準では PCI 施行の適応と判断される症例でも、PCI により IMR の改善が得られない症例があり、その判断には術前の IMR が最もより指標となることも明らかとなった。以上から、過剰な施行が問題となっている PCI で、本当に適応のあるケースとそうでないケースをさらに正確に判断できる材料を提供している点で、社会的意義の高い研究と考えられる。

3) 研究方法・倫理観

冠動脈の中等度の狭窄があり、PCI の適応と判断された 90 例で、PCI 術中の冠動脈狭窄の拡張前・後、および平均 10 か月後の follow-up 冠動脈造影において、FFR と IMR を測定し、これらの経時的変化を観察した。全例治療上の PCI の適応がある患者における治療時のデータ測定であること、全例で informed consent が得られていること、土浦協同病院における倫

理審査の承認を得ていることから、倫理的にも適切な措置が取られた研究といえる。

4) 考察・今後の発展性

まず、今回の結果のメカニズムがなんであるかが、本検討からは不明である。大動物での動物実験や、剖検における組織学的検討などを含めた検討が必要と思われる。また、今回の結果が実臨床で導入されるためには、同一施設および他施設での validation が必要と考えられる。最後に、IMR が心筋循環の指標であるとの前提で行っているが、これが本当に患者の症状や生命予後と相関するのかが検討されていない。これらの長期成績の評価を今後行うことが望まれる。

3. その他

特になし。

4. 審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	菱刈　景一
論文審査担当者	主査　荒井　裕国 副査　古川　哲史、下門　顕太郎
論　文　題　目	ST-Segment Elevation on Intracoronary Electrocardiogram After Percutaneous Coronary Intervention is Associated With Worse Outcome in Patients With Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction

（論文内容の要旨）

導入；

近年、致死的な心疾患である非 ST 上昇型心筋梗塞（NSTEMI）の発症は増加している。1990 年から 2006 年までに発症した 250 万人の心筋梗塞患者についてまとめたアメリカのレジストリーでは、NSTEMI 患者は 1994 年は心筋梗塞患者において 19%であったのに対して、2006 年には 54%にまで上昇していると報告している。NSTEMI の予後は、ST 上昇型心筋梗塞（STEMI）に対して、短期的には良いとされているが、長期的には同等に悪いとの報告もある。そのために、どのような患者の予後が悪いのか、NSTEMI 患者をいち早く、リスク層別化することはとても重要となる。

近年では、単一電極のガイドワイヤーを用いた、病変部位の冠動脈内心電図が、体表 12 誘導心電図よりも、より部分的な心筋虚血を高い感度で反映することが報告されている。そこで我々は、NSTEMI 患者において経皮的冠動脈形成術（PCI）後に、冠動脈内心電図を記録して、冠動脈内心電図の結果と心筋障害の程度及びその予後との相関について検討した。

方法；

研究対象；

我々は、2009 年 11 月から 2011 年 7 月までに NSTEMI の診断で土浦協同病院に入院した 136 人の患者を後ろ向きに検討した。全ての患者は通常通り、入院後 48 時間以内に心臓カテーテル検査を施行された。

136 人の患者のうち、8 人の患者は多枝病変にて除外され、4 人は左冠動脈主幹部病変にて除外され、10 人は有意な冠動脈病変がなく除外され、3 人は PCI 後に主要分枝の閉塞を生じて除外されて、残る 111 人の患者が今回の研究で解析対象となった。

生化学検査；

生化学検査は入院時、PCI 前、PCI1 時間後、6 時間後、12 時間後、18 時間後、24 時間後と、心筋逸脱酵素が上昇する限り、6 時間おきに施行された。

NSTEMI は心筋逸脱酵素の cTnI が、入院時に 0.20ng/mL 以上であることで定義した。

経皮的冠動脈形成術；

全ての患者は術前にアスピリンを 200mg、クロピドグレルを 300mg 導入されて、術後はアスピリン 100mg、クロピドグレル 75mg を毎日維持量として継続した。

責任病変へのステント留置時には、全症例でバルーンによる前拡張を行い、適切なステント径の決定のために血管内超音波を用いた。

標準 12 誘導心電図と冠動脈内心電図；

標準 12 誘導心電図は、入院時、PCI 前、PCI 直後及び 1 時間後、3 時間後に測定された。

冠動脈内心電図は、PCI 後に冠動脈にニトログリセリンを 200μg 注入した後に、冠動脈の責任病変に留置した 0.014 インチのガイドワイヤーの近位部をマルチチャンネルの心電図記録装置に接続して記録された。冠動内心電図の ST 上昇は、QRS の終了から 60ms の部位が等電位線から 0.1mV 以上上昇していることと定義した。

入院中の心血管事象と経過の心血管事象

入院中の心血管事象は、心室性不整脈（心室頻拍及び心室細動）、心不全、心原性ショック及び心臓死とした。

退院後の経過の心血管事象は、致死的不整脈（心室頻拍、心室細動、高度房室ブロック）、心臓死、非致死的心筋梗塞、新規の冠血行再建術及び入院治療を要する心不全とした。

統計解析；

PCI 後に冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群と、認めなかった群で患者背景、体表 12 誘導心電図及び PCI 時の特徴を比較した。

冠動脈内心電図の ST 上昇が入院中の心血管事象を予測する因子として適切か、ロジスティック回帰分析を用いて検討した。

退院後の心血管事象に関して、冠動脈内心電図の ST 上昇を認めた群と認めなかった群をカプランマイヤー曲線で比較し、ログランク検定で解析した。また、冠動脈内心電図の ST 上昇が退院後の経過の心血管事象を予測する因子として適切か、コックス比例ハザード回帰分析を用いて検討した。

結果；

冠動脈内心電図は 111 人、全ての患者で PCI 後に問題なく記録された。PCI を施行した 111 人の NSTEMI 患者の内、36 人で PCI 後に冠動脈内心電図は持続的に ST 上昇を認め、75 人で ST 上昇を認めなかった。

冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群と、認めなかった群の比較；

患者背景において、平均年齢は 68.8 歳で 2 群に有意差は認めず、糖尿病、脂質異常症、高血圧症の割合も 2 群で有意差は認めなかった。入院時の薬剤の使用は、いずれにおいても 2 群で有意差を認めなかった。入院時の心筋逸脱酵素の値は CK、CKMB、cTnI いずれも 2 群で有意差を認

めなかったが、PCI 後の最大の心筋逸脱酵素の値は、CK、CKMB、cTnI いずれも PCI 後に冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群で有意に高値だった。入院時及び経過の体表面心臓エコーにおける左室駆出率は、PCI 後に冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群で有意に低値だった。

入院時の体表 12 誘導心電図において、ST 低下を認めた割合、ST 低下を認めた誘導数、aVR 誘導で ST 上昇を認めた割合、QRS 幅のいずれも 2 群で有意差は認めなかった。

心臓カテーテル検査において、責任病変の部位、病変の複雑さ、病変の血管径、病変長、PCI 施行時の薬剤溶出性ステントの使用割合はいずれも 2 群で有意差を認めなかった。

入院中の心血管事象の予測因子

多変量ロジスティック回帰分析では、入院中の心血管事象を予測する因子として、PCI 後の冠動脈内心電図の ST 上昇（オッズ比, 3.97; 95%信頼区間, 1.06-14.89; P=0.041）、入院時の左室駆出率（オッズ比, 0.92; 95%信頼区間, 0.87-0.98; P=0.005）、推算糸球体濾過量（オッズ比, 0.97; 95%信頼区間, 0.95-1.00; P=0.029）が有意な因子だった。

退院後の経過の心血管事象の予測因子

111 人全ての患者で退院後の経過のフォローがなされた。フォロー期間の中間値は 35 ヶ月で、この期間内に 5 人が心臓血管死を認め、3 人が非致死的心筋梗塞を認め、18 人の患者が再度の冠動脈インターベンションを施行された。経過の心血管事象は 44.1%（111 人中 49 人）で認め、心血管事象からの回避率は冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群で有意に低かった。（ログランク検定 χ 二乗値=10.9; P 値=0.001）。

コックス比例ハザード回帰分析では、退院後の心血管事象を予測する因子として、PCI 後の冠動脈内心電図の ST 上昇（ハザード比, 2.54; 95%信頼区間, 1.38-4.70; P=0.003）、入院時の左室駆出率（ハザード比, 0.97; 95%信頼区間, 0.95-1.00; P=0.039）、推算糸球体濾過量（ハザード比, 0.99; 95%信頼区間, 0.98-1.00; P=0.027）、C 反応性蛋白（ハザード比, 1.09; 95%信頼区間, 1.01-1.17; P=0.034）が有意な因子だった。

考察；

今回の研究によって、NSTEMI 患者において PCI 後に冠動脈内心電図を記録することで、心筋障害がより大きな患者をいち早く見つけることができる可能性が示唆された。心筋障害が大きな患者をいち早く見つけることは、早期に追加的な治療介入をすることで、患者の予後改善につながる可能性がある。更に、PCI 後の冠動脈内心電図の ST 上昇は、入院中及び長期の心血管事象の独立した予後予測因子だった。

PCI 後の心筋逸脱酵素上昇による心筋障害の評価

これまでの臨床研究で、NSTEMI の患者において PCI 後の冠動脈内心電図の所見と心筋障害の関係を報告したものはいまだ存在しない。Uetani 等は、待機的に PCI を施行した安定狭心症患者において、PCI 後の冠動脈内心電図の ST 上昇と心筋障害の相関について報告しており、Wong 等は、STEMI 患者において、PCI 後の冠動脈内心電図の ST 上昇が、心臓 MRI における微小血

管梗塞と心筋梗塞範囲を予測する有用な因子であると報告している。

今回の研究では、111 人の NSTEMI 患者において 36 人（32.4%）で PCI 後に冠動脈内心電図の ST 上昇を認め、心筋障害を反映する PCI 後の心筋逸脱酵素の最大値は、冠動脈内心電図の ST 上昇を認める群で有意に高値だった。NSTEMI 患者において、術後の CKMB 値や cTn 値は予後の予測に極めて重要であると報告されている。Tricoci 等は、約 5000 人の NSTEMI 患者を対象とした研究で CKMB 値と cTn 値は PCI 後 1 年間の死亡率と有意に相関していると報告している。いち早く心筋障害の程度を予測することが出来る冠動脈内心電図を記録することで、心筋壊死範囲を減らすために、アデノシン、β ブロッカー、ニコランジル、ベラパミルを冠動脈へ注入するような追加的な治療ができ、NSTEMI 患者のリスク層別化が可能となるかもしれない。

冠動脈内心電図の ST 上昇と予後の相関

本研究は、NSTEMI 患者において、PCI 後の冠動脈内心電図の ST 上昇が入院中及び退院後の経過の心血管事象に対する重要な予後予測因子であることを示した。入院中の、心室性不整脈、心不全、心原性ショック及び心臓死は冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた患者では 38.9%に生じて、冠動脈内心電図で ST 上昇を認めない患者には 14.7%で生じた（P=0.007）。退院後の経過では、致死的不整脈、心臓死、非致死的心筋梗塞、新規の冠血行再建術及び入院治療を要する心不全は患者全体の 44.1%で生じて、これら心血管事象からの回避率は冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群で有意に低かった。（ログランク検定 χ 二乗値=10.9; P 値=0.001）。冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群における、退院後の心血管事象の発生率は ST 上昇を認めない群と比較すると 2 倍以上に上った。NSTEMI 患者において、冠動脈内心電図は、PCI 後の心筋障害の程度を早期に反映して、入院中及び退院後の長期の心血管事象の発生を予測する重要な方法となる可能性がある。今後、更なる研究を重ねることで、NSTEMI 患者における PCI 施行時の冠動脈内心電図測定の有用性が更に明らかになる可能性がある。

本研究の限界；

本研究は後ろ向き、単施設の研究で症例数は比較的少ないものだった。また、心臓カテーテル検査や心電図の所見は当施設で解析され、中央研究施設で解析されたものではなかった。更に、日本では認可されていないので、グリコプロテインⅡb/Ⅲa 拮抗薬は使用されなかった。

結論；

本研究は、NSTEMI 患者において PCI 後の冠動脈内心電図の ST 上昇が、入院中及び退院後の長期の心血管事象の発生を予測するのに有用な所見であることを示唆した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5151　号	菱刈　景一
論文審査担当者	主　査　荒井　裕国 副　査　古川　哲史、下門　顕太郎	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、非 ST 上昇型心筋梗塞患者の予後予測因子としての経皮的冠動脈形成術(PCI)後の冠動脈内心電図の ST 上昇の有用性についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

近年増加している致死的な心疾患である非 ST 上昇型心筋梗塞（NSTEMI）の短期予後は ST 上昇型心筋梗塞（STEMI）に対して良好とされてきたが、長期的予後は同等に悪いとの報告がある。そこで、長期予後不良な NSTEMI 症例をいち早くリスク層別化することが重要である。申請者らは、NSTEMI 患者において PCI 後に冠動脈内心電図を記録して、心筋障害の程度及びその予後との相関について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は、以下の通りである。

１．NSTEMI 患者の 32.4%で PCI 後に冠動脈内心電図の ST 上昇を認め、心筋障害を反映する PCI 後の心筋逸脱酵素の最大値は、冠動脈内心電図の ST 上昇を認める群で有意に高値だった。

２．NSTEMI 患者の 44.1%で退院後の心血管事象（致死的不整脈、心臓死、非致死的心筋梗塞、新規の冠血行再建術及び入院治療を要する心不全）を認め、冠動脈内心電図で ST 上昇を認めた群は ST 上昇を認めない群に比して 2 倍以上と有意に高かった。

以上のように申請者らは、冠動脈内心電図を用いることで PCI 後の心筋障害の程度が早期に検出されることを示した。これは、臨床的に極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究は、2009 年 11 月から 2011 年 7 月の期間に所属医療機関に訪れた連続 NSTEMI 患者を対象として、心カテーテル検査中に記録された冠動脈内心電図(IC-ECG)における ST 上昇と予後の関係が前向きに検討されている。本手法は、充分な臨床的手法の裏付けのもとに遂行されており、申請者の知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺える。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果より、冠動脈内心電図所見に基づく迅速な追加的治療介入を行うことが患者の予後改善につながる可能性を示唆しており、今後の研究にて更に臨床成績の向上に寄与することが期待される。

３．その他

特記すべきことなし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	高田　亮平
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　宇尾 基弘、永井　亜希子
論　文　題　目	Inhibitory Effect of Zirconium Coating to Bone Bonding of Titanium Implants in Rat Femur

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

チタン (Ti)合金はその優れた強度・生体親和性により、整形外科手術において広く用いられるが、生体骨内における金属表面の骨形成作用はインプラント抜去時の骨折等の合併症や応力遮蔽の原因ともなりうる。Ti 同様高い生体適合性を持つジルコニウム (Zr)を金属表面にコーティングした Zr コーティング Ti 合金は Ti 合金の特性を保ちつつ、擬似体液中において金属表面の骨形成抑制作用をもつことは既に報告されている。しかし、Zr コーティング Ti 合金の生体内での骨形成抑制効果を検討した報告はない。そこで、本研究において Zr コーティング Ti 合金の生体内での骨形成抑制効果を検討した。Ti 合金製の円柱状ロッドを作製し、Zr コーティングの有無でロッドを 2 群に分け、雄ラットの両側大腿骨髄腔内に挿入した。術後 4 週時のロッド引き抜き試験において、Zr コーティング群で有意に引き抜き剪断応力が小さく、抜去ロッドに付着した骨構成元素量も少なかった。一方で、2 群のロッドの表面粗さに差は認めなかった。また、Zr コーティングは引き抜き試験後も金属表面に残存していることが確認された。これらのことから、Zr コーティングにより Ti 合金の生体内骨形成作用は抑制されることが示された。

＜緒言＞

Ti 合金はその優れた強度・生体適合性により、整形外科手術において広く用いられる。生体骨内に埋入された Ti 金属表面にはリン酸カルシウム層が形成され、さらに周囲の新生骨形成が促進される。この特性も Ti 合金が整形外科手術において広く用いられる要因の一つである。一方で Ti 合金表面の骨形成作用はインプラント抜去時の骨折、金属破損等の合併症の原因となり、また人工関節インプラントへの応用においては、予期せぬインプラントと生体骨との結合による近位骨の応力遮蔽、それに伴う骨質の低下、骨折リスクの上昇の原因ともなりうる。Ti 同様整形外科手術に用いられるステンレス材は、Ti と比較して表面の骨形成作用が弱いとされているものの、ステンレス材は Ti 合金と比較して耐食性は明らかに劣ること、毒性の高いニッケルを含むこと、ステンレス材を使用しても同様の合併症がおこりうることが報告されている。そのため、Ti 合金の特性を生かしつつ、表面の骨形成作用を抑制する表面処理法の開発が期待されている。

近年整形外科手術領域においても応用が開始された Zr 合金は Ti 同様、高い生体適合性を持つ

一方で、生体骨内では金属表面にリン酸ジルコニウムを形成することによる骨形成抑制作用を持つことが明らかになっている。我々はこの点に着目し、Zr を Ti 合金表面にコーティングした Zr コーティング Ti 合金を作成し、Ti 合金の特性を保ちつつ、擬似体液中で金属表面のリン酸カルシウム形成を抑制したことを報告した。しかし、Zr コーティング Ti 合金の生体内での骨形成抑制効果はこれまで検討されていなかった。そこで、本研究の目的は Zr コーティング Ti 合金の生体内での骨形成抑制効果を検討することである。

＜方法＞

Ti−6Al-4V 合金製の円柱状ロッド(1.4mm×15mm)を作製した。ロッドの遠位端には引き抜き試験時に糸を通すよう、円孔が作成された。表面のブラスト処理を行い、表面粗さの均一化を計った。Zr コーティングの有無でロッドをジルコニウム群 (Z 群)とコントロール群 (C 群)に分け、両群のロッドの表面粗さを計測した。蛍光 X 線装置 (XRF)を用いて、金属表面の Zr 層の存在を確認した。Z 群と C 群のロッドを生後 11 週の雄ラット (n=5)の両側大腿骨髄腔内にそれぞれ 1 本ずつ逆行性に挿入した。抱水クロラールの腹腔内投与による全身麻酔下・清潔操作下で手術は行われた。下肢を剃毛後、膝蓋骨内側に 2mm の皮切を置き、露出した大腿骨遠位端を 1.1mm 径ドリルで瑞空内に向かって添削し、ロッドを挿入した。皮膚はナイロン糸で閉創した。全例術後感染等の合併症を認めなかった。術後 4 週で屠殺し、両側大腿骨を摘出した。ロッドの円孔周囲の骨軟部組織を慎重に切除し、0.3mm 径ポリエチレン糸を円孔に通し、ロッドの引き抜き試験を施行した。ポリエチレン糸はロッドの垂直方向に 0.1mm/min の速度で遠位方向に牽引され、骨-インプラント結合が破綻する瞬間に最大引き抜き力が観測された。底面を除くロッドの表面積から最大引き抜き剪断応力を算出した。引き抜いたロッドの表面を実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いてロッド表面付着物を観察した。その後、引き抜いたロッド表面付着物の無機元素解析(ICP-AES)を施行し、付着物内のカルシウム(Ca), リン(P), マグネシウム(Mg)の含有量を計測した。統計学的解析に対応のある t 検定を用い、有意水準は $p<0.05$ とした。

＜結果＞

Z 群、C 群の平均表面粗さはそれぞれ 0.50±0.08 μm、0.51±0.05μm で有意差は認めなかった(p=0.33)。Z 群、C 群の最大引き抜き剪断応力はそれぞれ平均 0.09±0.03MPa、0.15±0.05MPa で、Z 群で有意に小さかった (p=0.03)。実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いたロッド表面の観察においては、C 群で新生骨組織と思われる付着物が多く観察された。XRF 解析において、Z 群で引き抜き試験後も金属表面に Zr 層の存在が確認された。ICP-AES 解析において、C 群で Ca、P、Mg の骨構成元素が Z 群と比較してより高濃度に検出された($0.05 < p < 0.1$)。

＜考察＞

Z 群は有意に C 群より最大引き抜き剪断応力が小さく、引き抜いたインプラント表面の元素解析において検出された骨構成元素量も少なかった。一方で、両群のインプラント表面粗さに差は認めなかった。また、引き抜き試験後も Z 群では金属表面に Zr 層が残存していた。これらのことから、Zr コーティング Ti 合金は生体内で金属表面の骨形成抑制作用を持つと考えられた。本

研究はサンプル数が少なく、組織学的解析等による詳細な骨形成抑制作用機序を明らかにしていないものの、Zr コーティング Ti 合金の生体内での骨形成抑制を確認した初めての報告である。Zr 合金同様、Zr コーティング Ti 合金は生体骨内で金属表面にリン酸ジルコニウムを形成することでリン酸カルシウム形成を阻害し、それに続く新生骨形成も阻害されたと考えられた。臨床応用により整形外科手術における抜釘時合併症の減少やインプラント周囲骨量温存に利用できる可能性がある。人工関節領域においては、挿入した人工関節の遠位でインプラントと骨間の結合が起こると、近位部の骨質の低下（応力遮蔽)、それに伴う骨折リスクの上昇等が懸念される。人工関節の遠位部に Zr コーティング処理を行うことで、期待されない骨-インプラント結合を予防できる可能性が考えられる。

＜結語＞

Zr コーティング処理により、生体骨内における Ti 合金の表面骨形成は抑制されることが示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5152　号	高田　亮平

論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　宇尾 基弘、永井　亜希子

【論文審査の要旨】

１．**論文内容**　人工股関節に一般的に用いられているチタン(Ti)合金は骨との親和性が高く、そのため術後長期での大腿骨近位の骨吸収や人工関節抜去時の困難性（時に骨折）という課題を残している。学位申請者はそれらの問題を解決する一つの方法としてチタンをジルコニア(Zr)でコーティンングすることを考案した。力学試験と抜去ロッド付着骨構成元素解析により Zr コーティングにより Ti 合金の生体内骨形成作用が抑制されることを示した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

人工股関節のデザインと材料の組み合わせにより、よりよい関節を実現化することは意義深い。学位申請者のアイデアは独創的で、人工関節のより望ましい力学的環境を形成するために有用な材料となる可能性がある。

２）社会的意義

人工股関節は世界的に治療ニーズが高く、その成績の向上は社会的、経済的にも大きな意義がある。

３）研究方法・倫理観

Ti 合金製の円柱状ロッドを作製し、Zr コーティングの有無でロッドを 2 群に分け、雄ラットの両側大腿骨髄腔内に挿入した。術後 4 週時のロッド引き抜き試験において、Zr コーティング群で有意に引き抜き剪断応力が小さく、抜去ロッドに付着した骨構成元素量も少なかった。

ラットを用いた明快な実験方法であり、実験動物としての倫理的な問題も少ない。

４）考察・今後の発展性

Zr コーティング Ti 合金は生体骨内で金属表面にリン酸 Zr を形成することでリン酸 Ca 形成を阻害し、それに続く新生骨形成も阻害する。臨床応用として整形外科手術における抜釘時合併症の減少やインプラント周囲骨量温存に利用できる可能性がある。人工関節の遠位部に Zr コーティング処理を行うことで、望ましくない骨-インプラント結合を予防し、より理想的な人工股関節大腿骨インプラントの固定を実現できる可能性がある。

３．その他

学位申請者は４年間の大学院在籍中に臨床論文を３編まとめ、英文誌に報告している。このような臨床研究の中で見出した人工股関節の問題点を解決する糸口を比較的明快にまとめた本研究は意義深い。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	井上　牧子
論文審査担当者	主査　大川　淳 副査　上阪　等、淺原　弘嗣
論　文　題　目	Inflammatory cytokine levels in synovial fluid 3, 4 days postoperatively and its correlation with early-phase functional recovery after anterior cruciate ligament reconstruction: a cohort study

（論文内容の要旨）

<要旨>

膝前十字靭帯（Anterior cruciate ligament：以下 ACL）は膝関節内に存在し、大腿骨の後方と脛骨の前方を結んでいる強靭な靭帯であり膝関節の安定性を保つ役割がある。ACL 損傷は膝の外傷の中でも代表的なものである。ACL 損傷はほとんどの症例でスポーツ時に起こっている。ACL 再建術後の関節内の状態を探るために、術前および術後 3～4 日目関節液を採取し、サイトカイン濃度を測定した。受傷後から再建術までの期間がより長かった群（受傷後 60 日以降）では、短かった群（受傷後 60 日以内）に比して、関節液中のサイトカイン濃度（IL1-β、IL6、IL10、IFN-γ）の増加を認めた。また同群は術後早期の運動機能回復程度においても低値を示した。この報告は臨床的指標である運動の回復程度と生化学的指標である関節液中のサイトカイン濃度に関連があることを示した最初の報告である。

<緒言>

膝 ACL は膝関節内に存在し、大腿骨の後方と脛骨の前方を結んでいる強靭な靭帯であり膝関節の安定性を保つ役割がある。ACL 損傷は膝の外傷の中でも代表的なものである。ACL 損傷はほとんどの症例でスキー、バスケット、バレーボール、ラグビー、柔道などのスポーツ時に起こっている。

ACL の標準的な再建方法は関節内への腱移植である。移植された腱は壊死、炎症性細胞浸潤、再血管化、組織再構築、成熟化などを含む複雑な過程で生着する。治癒過程には患者によって差があるため、術者にとって、手術後の回復を評価することが重要となってくる。患者の術後の関節の状態を知ることは適切な術後管理につながると考えられる。

前述のとおり、ACL はスポーツの際に損傷することがほとんどであるが、患者全員が満足できるレベルでのスポーツへの復帰を行えていないのが現状である。過去の報告によると ACL 再建術後の 81%の患者がスポーツに復帰しているが、術前のレベルまで復帰出来ているのは 65%に留まる。

術後のアウトカムには複数の因子が影響するとされており、例えば、手術時の年齢が高年齢であるほど復帰が困難になる。術後のアウトカムに関係する因子の内、受傷時から手術までの期間

（術前期間）については多くの報告があるがはっきりした結論は出ていない。早期手術群と晩期手術群の術後アウトカムを比較した複数論文のレビューでは、術後早期の手術が勧められると結論付けられているが、差がないとしている論文も多い。損傷から手術までの期間に、半月板や関節軟骨がダメージを受けているという報告もあるが、術後の関節内の状態について包括的な情報が提供されているとは言いがたい。

そこで今回我々は ACL 再建術の術前および術後の関節液を採取し、ACL 再建術後の関節内の状態をモニタリングした。過去に ACL 損傷後、再建術後において関節液中の関節軟骨の変性マーカーが上昇するという報告もあり、関節液は関節内の状態をよく反映していると考えられる。Bigoni らは ACL 損傷後早期に前炎症性サイトカイン（IL6、IL8）が上昇し、それは関節軟骨の変性に伴うものであると報告している。我々も以前、関節液中のオステオポンチン濃度が ACL 断裂後の関節の痛みと軟骨の変性の重症度と関連していることを報告した。

また術後 3 ヶ月にどの程度運動に復帰できているかを評価を行った。さらに関節液中サイトカインと運動への復帰程度の相関を調べることにより、関節液中の炎症の程度が術後の回復に関係してくるかどうかを検討した。

<方法>

対象は 2013 年 1 月から 2014 年 4 月までの東京医科歯科大学附属病院で ACL 再建術を受けた患者であった。今回の研究は当院の倫理委員会の承諾を得ており、患者にはインフォームドコンセントを行った。関節液は術直前および、術後 3 日目または 4 日目に採取された。女性 40 名、男性 39 名、12～62 歳（中央値 19 歳）、平均 Tegner スコアは 7.0+/-0.9 であった。受傷から手術までの期間は 13 日間から 291 日間で、中央値は 80 日間であった。3 名は対側の膝にも何らかの損傷の受傷歴があった。すべての手術および経過観察は当院整形外科の医師が行った。

手術は解剖学的二重束再建術によって行われ、移植腱としては半腱様筋靭帯が用いられた。術後リハビリとして、術後 2 日目から膝関節への荷重、3 日目から膝関節の運動を開始させた。副木および松葉杖は術後 4 週間までに終了させた。2.5 ヶ月目よりジョギングを許可した。さらに患者が復帰を希望しているスポーツに対応したリハビリテーションを行った。

運動回復程度は ACL 再建術後 3 ヶ月目に外来にて評価した。走行可能であれば 5、ジョギング可能であれば 4、階段昇降可能であれば 3、歩行可能であれば 2、歩行困難であれば 1 とした。

関節液中のサイトカイン濃度の測定は ELISA 法によって行った。TNF-α、IL1-β、IL2、IL6、IL8、IL10、IFN-γ の濃度を測定した。

患者を受傷時から手術までの期間が 30 日以内の早期手術群、30 日以降の晩期手術群にわけ、運動回復程度と、関節液中のサイトカインの濃度の比較を行った。

<結果>

3 ヶ月後の運動回復程度について、早期手術群（平均 3.4）が晩期手術群（平均 3.1）に比べ有意に回復していることがわかった。またこの 2 群間において、年齢、性別、術前の運動レベルを示す Tegner スコア、半月板損傷の有無に差はなかった。受傷時から手術までの期間が早いほうが 3 ヶ月後の運動回復程度が良いことがわかった。

術前の関節液量は患者によっては採取が困難であったため、全員からは採取できなかった。術後は関節液量の増加が認められ平均 27+/-12.5 ml であった。すべてのサイトカインにおいて ACL 再建術術後 3〜4 日目の関節液中のサイトカイン濃度は術前に比べ有意に増加していた。関節液中のサイトカインについて早期手術群、晩期手術群間で比較したところ、TNF-α および IL10 において、術前の濃度は差が認められなかったにもかかわらず術後 3〜4 日目の濃度は晩期手術群が有意に高かった。

また、術後 3〜4 日目のサイトカイン濃度が術後 3 ヶ月の運動回復程度がどの程度関連があるのかを調べた。運動回復程度が 4、5 である患者を早期回復群、1〜3 である患者を通常回復群とし、各サイトカインについて比較を行ったところ IL1-β において通常回復群が有意に高値であり、Jonckheere- Terpstra のトレンド検定を行ったところ、IL6、IL10、IFN-γ において回復程度が良いほど低値である傾向が認められた(p=0.08)。

<考察>

今回の報告は臨床的指標である運動の回復程度と生化学的指標である関節液中のサイトカイン濃度に関連があることを示した最初の報告である。今回の研究においては、晩期手術群に比して早期手術群術後の運動機能の回復が良かったことと、関節液中の TNF-α および IL10 の濃度が受傷後から手術までの期間がより長かった晩期手術群において高値であることを示した。また早期回復群に比して通常回復群のほうが複数のサイトカインの濃度（IL1-β、IL6、IL10、IFN-γ）において高いということを示した。ACL の受傷から手術までの期間が長引くと術後急性期の関節の炎症程度が増すことが示唆され、また、術後急性期の炎症の程度が、術後の回復程度に強く影響することが示唆された。

以前より移植腱の状態、再建術式、受傷後から再建時までの期間（術前期間）などの様々な因子が術後の回復に影響をあたえることが報告されている。術前期間に関しては多くの報告があるものの、一致した結論は未だ得られていない。これは、報告者により、「早期に手術した群」の定義が様々であることが一因と考えられる。今回の研究では受傷後から 60 日以内に再建術を行った患者を早期手術群と設定した。我々の経験によると、ACL 損傷後歩行や階段昇降が可能になるのは約 60 日であり、60 日以前に再建を行うことを早期手術とするのは合理的であろうと考えられる。

今回の研究では、術後 3 ヶ月と比較的早期の運動機能の回復程度を評価している。晩期手術群の術後 3 ヶ月の回復程度は早期手術群に比して有意に低い。受傷後 2 週から 12 週までに手術を行った群と 12 週から 24 週に手術を行った群を比較し、前者のほうが 2 年後の運動機能が有意に良かったとする Andernord らの報告を、今回の報告は支持するものである。また彼らは受傷後晩期手術群において、半月板損傷が関節の不安定性の原因となっていることを報告している。

術前期間や術後の回復程度にかかわらず術後急性期に関節液中のサイトカインは術前に比べ有意に増加した。また、晩期手術群において炎症性サイトカインである TNFα の有意な増加を認めた。さらに、早期回復群に比して、通常回復群では術後 3〜4 日目の炎症性サイトカイン（IL1-β、IL6、IFN-γ）の濃度が有意に高かった。晩期手術群の患者において炎症性サイトカイン濃度が高値となる仕組みについては未だ明らかでないが、術後急性期の関節内における炎症の程度が、治

癒過程にある術後 3 ヶ月時点での回復程度に影響していることが示唆された。

術後 3～4 日目の関節液中において、前炎症性サイトカインである TNFα、IL1-β、IL6、IFN-γに加え、抗炎症性サイトカインである IL10 も第 2 群の患者において有意に高値となった。また、通常回復群においても早期回復群にくらべ IL10 の高値が認められた。IL10 は急性の炎症反応に反応して分泌されるサイトカインのひとつであるが、機能には不明な点が多い。IL10 は主に T 細胞やマクロファージに作用し、炎症性サイトカインの産生を抑制することがわかっており、また、今回の報告と同様に外傷後に IL10 の上昇が認められることは以前から報告されている。

<結論>

ACL 損傷受傷後から再建術までの期間がより長かった群において、関節液中のサイトカイン濃度（IL1-β、IL6、IL10、IFN-γ）の増加をみとめた。また同群は術後早期の運動機能回復程度においても低値を示した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5153　号	井上　牧子
論文審査担当者	主　査　大川　淳 副　査　上阪　等、淺原　弘嗣	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

膝前十字靭帯損傷から前十字靭帯再建術までの期間が長期化するほど、術後急性期の関節液中の炎症性サイトカイン濃度が上昇し、術後の回復に影響することを明らかにした論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

膝外傷のなかで前十字靭帯損傷は膝不安定感をもたらし、その後のスポーツ活動に大きな影響を与える。そのため、活動性の高いアスリートに対しては、靭帯再建手術を行うことが一般的であるが、手術直後の炎症性反応と予後の関連性を明らかにした論文はこれまでなく、多数の手術例を用いてこれを明らかにした点において本研究の先駆性、独創性は高いと考えられる。

２）社会的意義

膝前十字靭帯再建術を受けた 79 名を対象に、術前および術後 3～4 日で採取された関節液中の各種サイトカイン濃度を ELISA により測定した。3 か月目に外来受診した際のパーフォーマンスとサイトカイン濃度との関連性、背景因子の影響を検討した。その結果、術前期間がより長かった群で術直後サイトカインが高く、術後 3 か月のパーフォーマンスは低いことが判明した。

本論文の成果に基づいた手術管理が、高頻度ながら選手生命を左右する本外傷の長期予後の改善につながる可能性があり、スポーツ整形外科における臨床的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

本研究はスポーツ整形外科領域において長年にわたり議論のあった手術の至適時期を明らかにしたもので、周到な準備と計画に基づき行われた研究である。測定は自ら行うなど基礎的な実験手法に習熟したことがうかがわれた。

４）考察・今後の発展性

抗炎症性サイトカインも上昇見られたことから、術後の炎症をコントロールする生体反応全体が活性化していた。こうした反応を臨床的にコントロールすることで、手術結果を向上させる糸口になると考えられた。

３．その他

４．審査結果

術前期間に関する対象の群分けに関して基準が判然としなかったためにレポートが課せられたが、設定された期間が妥当なものであることが ROC 解析によって明らかにされた。レポートの内容を踏まえ、申請者は博士（医学）の学位授与の資格があると判断された。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	樋口　京子
論文審査担当者	主査　石川　俊平 副査　田中　真二、明石　巧
論　文　題　目	Cadherin 5 expression correlates with poor survival in human gastric cancer

（論文内容の要旨）

要旨

胃癌は、全世界において約 952000 人が罹患し約 723000 人が死亡する今なお予防、治療共に難渋する疾患である。根治的治療は現在も外科的治療であることに変わりはないものの、局所コントロールと生存率の改善に関してはもはや限界の域と言え、胃癌の浸潤や転移におけるメカニズムの解明と、分子標的治療を行うためのバイオマーカーの発見が望まれるところである。また、細胞接着分子として Epithelial Cadherin として知られているカドヘリン 1(CDH1)は癌進行の抑制に重要な役割を果たしており、CDH1 の低発現と胃癌の生存率の高さの関連性もすでに報告されている。一方で、カドヘリンスーパーファミリーの一つである Vascular Endotherial Cadherin (CDH5)は細胞間の接着阻害に関与されるとされており、乳癌や悪性黒色腫の細胞株で正常細胞と比較して腫瘍細胞で高発現し、腫瘍細胞の増殖を促進するとの報告がされている。また、ヒト癌細胞において CDH5 の mRNA やタンパクの高発現も報告されているが、胃癌に関しての報告はまだない。本研究では、胃癌における免疫組織学的な CDH5 の高発現と臨床病理学的特徴を検討した。

方法

患者

2003 年 1 月～2007 年 12 月の 5 年間の間で東京医科歯科大学消化管外科において胃切除術を施行し、分化型胃癌と診断された 102 人について検討を行った。胃癌の評価は第 14 版胃癌取扱い規約に基づいて行った。乳頭腺癌や管状腺癌の分化度などは世界保健機構の組織学的分類に基づいて評価した。全ての患者に対し、十分な研究についての情報を提供し、書面によるインフォームドコンセントを得られており、また、本研究はヘルシンキ宣言に基づいており、東京医科歯科大学の倫理委員会に承認されている。再発評価は腫瘍マーカー、画像診断を 3～6 ヶ月ごとに行い、必要に応じて PET-CT や骨シンチグラフィーも行い評価した。観察期間の中央値は 63 か月(4-111 か月)であった。計 28 症例(27%)が原病死、22 症例(22%)が再発、6 症例(6%)が他病死した。再発や遠隔転移が認められた患者に対しては S-1(大鵬薬品工業株式会社、テガフール、ギメラシル、オテラシルカリウムを含むフッ化ピリミジン系経口薬)を単独又は併用して化学療法を行った。9 症例に対しては S-1 を使用して術後補助化学療法を施行した。

免疫組織学的手法

本研究ではポリクローナルウサギ抗体である ab71285®を CDH5 抗体として用いた(Abcam 社)。ヘマトキシリンエオジン染色したスライドを検討し、各患者における最適なパラフィンブロックを選択した。パラフィン組織は 4μm の切片とし、キシレンで脱パラフィンした後にエタノールで再水和させた。Permeabilization は 10mmol/l のクエン酸緩衝液(pH6)を用いて 98℃のマイクロウェーブ内で 20 分間行った後、固定した。一次抗体は 1:100 で希釈した後、4℃で 16 時間反応させた。2 次抗体は、0.1%Tween 20/PBS で 3 回洗浄した後、ペルオキシターゼ標識抗ウサギまたは抗マウス抗体(ニチレイバイオサイエンス社、シンプルシステイン Max PO)を用いて室温で 30 分間反応させた。ペルオキシターゼ活性はジアミノベンジジン(ニチレイバイオサイエンス社、DOB)を用いて検出した。最後に 1%マイヤーヘマトキシシリンで対比染色した。ポジティブコントロールは染色条件に伴うバイアスを軽減するために、強陽性であった検体をインナーコントロールとして使用し、ネガティブコントロールは一次抗体なしで染色した。

免疫組織学的評価

染色した検体はスライド内の全癌細胞をカウントした。散見した癌細胞の評価は浸潤部を最低 3 視野で評価した。Gabber らによる CDH1 染色のための評価方法を一部修正して用いた。膜染色範囲の評価として 3+(>60%)、2+(30-60%)、1+(<30%)、0(0%)として評価し 2+または 3+を高発現とした。膜染色強度は評価に寄与しなかった。これらの評価は独立した 2 人の研究者で行った。

統計学的分析

CDH5 発現と臨床病理学的因子との関連性を $\chi 2$ 検定で評価した。疾患特異的生存率(DSS)と CDH5 発現の関連性の評価にはカプランマイヤー曲線をログランク検定を用いて比較した。多変量解析においては有意差は得られなかった。全ての統計学的分析は IBM SPSS 統計バージョン 22(IBM 社)を用いて行い、p 値は 0.05 を統計学的に優位とみなした。

結果

CDH5 の膜発現は(図 1)のように観察された。一部の高発現は細胞質や血管内皮細胞でも認められたが本研究においては膜発現のみを評価の対象とした。CDH5 の発現は非癌組織内の血管内皮細胞には認めるが、非癌上皮細胞には認められなかった。全 102 症例中 62 症例(61%)に CDH5 高発現を認めた。深達度(T1 vs T2-T4,p=0.012)、静脈浸潤(p=0.013)、リンパ管浸潤(p=0.001)、リンパ節転移(N0 vs N1-N3,p=0.009)、進行度(ステージ I vs II-IV,p=0.008)、遠隔転移再発(p=0.009)において有意差を得た。乳頭腺癌と管状腺癌の間で有意差は認められなかった(p=0.14)(表 1)また、5 年 DSS は CDH5 高発現群は 75%と、低発現群の 90%と比較して優位に低かった。(p=0.021)(図 2)単変量解析において、乳頭腺癌、深達度、リンパ節転移陽性が DSS の低さと関連していると言えた。(表 2)多変量解析においては深達度、リンパ節転移の有無については独立した因子として有意差を得たが(HR 8.7,95% CI 1.1 to 71,p=0.043 ;HR 4.3,95% CI 1.4 to 14 ,p=0.012)、CDH5 の発現に関しては有意差は得られなかった。(HR 1.8,95% CI 0.6 to 5.4,p=0.32)

考察

本研究においては、分化型胃癌における CDH5 タンパク高発現が、腫瘍の進行と生存率の低下

において有意に相関することが示された。現在までに、CDH5 と胃癌の研究は、RyuKH らによって唯一行われているのみである。この研究は CDH5 の mRNA の発現と分化型と未分化型の両方の胃癌に対して行われているものであり、臨床病理学的特性との間には有意な相関は認められなかったが、mRNA 発現が、リンパ管浸潤とリンパ節転移を有する症例において、有さない症例と比較して高い傾向にあることを示している。この研究はまた、CDH5 の免疫組織学的発現は胃癌内の血管内皮細胞のみに発現し、腫瘍細胞には発現していないと示している。我々の今回の研究においては、胃癌内の血管内皮細胞のみならず腫瘍細胞にも明らかに発現しており、染色パターンは癌の組織型によって異なるようにも見えた。また、他報告においては CDH5 の発現はヒト乳癌における腫瘍細胞の細胞質で発現を示しており、HCC における研究では類洞様毛細血管構造の内皮細胞上で発現したと報告しており、CDH5 の発現パターンは癌によっても異なる様に思われた。また、先の研究においては低分化型 HCC の方が、中分化型 HCC と比較して高発現であった。また、神経膠腫においては、悪性度と低い生存率が、CDH5 の mRNA の発現レベルと相関した。CDH5 の欠如は内皮細胞のアポトーシスを誘導し、VEGFR2、β カテニン、PI3 キナーゼとの複合体形成を減少させることで血管内皮増殖因子である VEGF-A によるシグナル伝達経路を遮断すると言われている。従って、CDH5 の過剰発現は、VEGFR2 シグナル伝達経路を調節することで内皮細胞の活性促進も可能であり、腫瘍血管新生にも重要な役割を担っていると言える。

今回の我々の研究は分化型腺癌に限られた研究であった。先の RyuKH らの研究では CDH5 の mRNA 発現について腫瘍細胞及び内皮細胞の両方で検討を行っているが、発現量に関しては胃癌の組織型における有意差は認められなかった。しかしながら、例えば VEGF などの他のバイオマーカーのタンパク発現は分化型腺癌で高発現しており、印環細胞癌では低発現など組織型によって異なるものもある。癌ゲノムアトラスは、胃癌における組織型ごとの遺伝子異常を公表したが、CDH5 の遺伝子異常は明らかではなかった。CDH5 と未分化型胃癌の関連性についても検討するのが、今後の我々の課題であろう。結果として、本研究においては CDH5 の高発現は分化型胃癌における腫瘍の進行と予後の悪さと相関しており、CDH5 を抑制することが、今後の分化型胃癌の分子標的治療となり得るかもしれない。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5154　号	樋口　京子
論文審査担当者	主　査　石川　俊平 副　査　田中　真二、明石　巧	

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

本論文は胃癌におけるCDH5の発現を免疫組織学的手法によって評価し臨床病理学的因子との関係について解析した論文である。

2.　論文審査

1）研究目的の先駆性・独創性

申請者は癌に関連する機能を持つことが知られているCDH5に関して、胃癌における臨床的意義がよくわかっていないことに着目し、胃癌検体を用いてその発現と臨床病理学的因子との詳細な関連解析を行った。そのアプローチは独創的で評価に値する。

2）社会的意義

本研究で得られた結果は、胃癌におけるCDH5高発現が臨床像に与える影響の一反を解明するものであり、難治疾患である胃癌の診断・治療に資するものと考えられる。

3）研究方法・倫理観

申請者は分化型胃癌と診断された１０２名の検体について胃癌細胞の膜発現を評価の対象として免疫組織学的解析を行った。１０２症例中６２症例(６１%)にCDH5高発現を認め、深達度、リンパ管浸潤、リンパ節転移、進行度、遠隔転移、再発において有意差を得た。またCDH5高発現は疾患特異的生存率と有意に相関した。多変量解析においてはCDH5発現に関しては有意差が得られなかった。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されたと考えられる。

4）考察・今後の発展性

本研究結果はCDH5高発現が胃癌における新たな予後因子であることを示し、今後の胃癌の診断・治療に資する可能性がある。

3.　審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小林　正典
論文審査担当者	主査　三木　義男 副査　田中　真二、稲澤　譲治
論　文　題　目	The ubiquitin hybrid gene *UBA52* regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ユビキチンは細胞内の重要な翻訳後修飾分子として多様な機能が報告されている．ユビキチンは 4 種の遺伝子から発現するが，それぞれの機能は明らかではない．今回，ユビキチンとリボソームタンパク質 RPL40 の融合分子である UBA52 の欠損マウスが胎生致死となることを発見した．ヒト大腸癌細胞株において，UBA52 si RNA を用いた発現抑制を行うと，ユビキチンの総量は減少しないがタンパク質合成能は低下し，Cylin D が減少した結果，細胞周期が抑制されることを発見した．さらに，これらの細胞で UBA52 を過剰発現させると細胞周期を回復させたが，RPL40 のみの過剰発現では Cyclin D の発現回復には十分ではなく, UBA52 が切断されてユビキチンと RPL40 を生じることがタンパク質翻訳・合成に何らかの機能を有している可能性が示唆された．さらに，RPL40 が UBA52 から生じたユビキチンとリボソーム複合体を形成することを確認し，UBA52 は RPL40 と同時にユビキチンもリボソームへ動員していることを発見した．本研究では UBA52 がユビキチンをユビキチンプールへ供給するためだけの遺伝子ではなく，リボソーム機能を制御する分子である可能性を明らかにした．これらの事実は，ユビキチンによるタンパク質翻訳や胎生発達における新たな制御機構を示すものである．

＜諸言＞

ユビキチン化は翻訳後修飾系として広く働いている．ユビキチンは 7 つのリジン残基もしくはメチオニンと共有結合をつくり，種々のユビキチン鎖を作って機能している．異なるユビキチン鎖は異なる機能を持ち，タンパク質分解や NF-κB のシグナル伝達，細胞周期など多くの重要なシグナル伝達に関与する．ユビキチンは UBA52，UBA80，UBB，UBC の 4 つのコード遺伝子から発現する．UBB，UBC はユビキチンが直鎖に連なる構造をしており，また UBA52，UBA80 はリボソームタンパク質(RP)との融合タンパク質で，タンパク質翻訳後に切断されてユビキチンを生じる(Fig.1A)．ユビキチンは，これらの遺伝子からの発現やユビキチン鎖から脱ユビキチン化されることで細胞内にプールとして蓄えられ様々な状況に応じて厳密にコントロールされていると考えられているが，これらの遺伝子の機能的な違いはわかっていない．

これまでに UBB 欠損マウスは出生後に神経変性疾患が出現することが報告され，一方で UBC

欠損マウスは胎生 12.5 日から 14.5 日で胎生致死となることが報告されている．また，UBA52 と UBA80 は肝癌細胞株のアポトーシスで過剰発現することが報告され, UBA52 は糖尿病性腎症や大腸癌との関係が示唆されているが，その機能はいまだ明らかになっていない.

リボソーム合成やタンパク質翻訳は細胞の状態に応じて厳密に制御されている．いくつかのリボソームタンパク質の欠損は致死的であることが報告され，またリボソーム合成不全は発達障害や発癌と関連していることも示唆されている．さらにユビキチン化を介したリボソーム機能制御も近年報告されつつあるが，詳細は不明であり UBA52 との関連も指摘されていない.

本論文ではユビキチンと RPL40 の融合タンパク質である UBA52 に着目し *in vivo* での機能解析のため UBA52 の欠損マウスを作成し，さらに *in vitro* で UBA52 がリボソーム機能を制御する新規関係を明らかにした.

＜方法＞

EUCOMM(European Conditional Mouse Mutagenesis Program)から購入した ES 細胞を使用して UBA52 欠損マウスを作成し，挿入遺伝子配列を southern blot，long-Range PCR で確認した．出生マウスおよび胎生 13.5 日の胎児の遺伝子型を PCR で解析し，また 3 週令の UBA52 ヘテロ欠損マウスで，腎臓，脾臓，小腸，大腸の UBA52 mRNA を qRT-PCR で評価した.

In vitro では主に大腸癌細胞株の DLD-1 細胞を使用した. UBA52 si RNA による発現抑制がユビキチン総量に与える変化を qRT-PCR で評価した．FLAG-UBA52-GFP ベクターとその塩基置換によってユビキチンと RPL40 の分離耐性ベクターを作成し，導入後に western blot，蛍光顕微鏡観察で挙動・分布を確認した．また，超遠心で細胞質と細胞内小器官を分離し，western blot で RPL40 の局在を確認した．また，O-propargyl puromycin (OPP)を使用してタンパク質合成を蛍光可視化し，DLD-1 細胞，Hela 細胞でリボソーム機能を評価した．UBA52 の発現抑制後，細胞数の変化を ATP ルシフェラーゼ発光にて測定し，さらに，Flow cytometry (FCM)で細胞周期を解析した. 発現抑制後の CyclinD　mRNA の変化を qRT-PCR で, タンパク発現は western blot で評価した. さらに Cyclohexamide 投与後の CyclinD の変化を western blot で確認した. RPL40 と CDK6 の結合を免疫沈降，proximity ligation assay (PLA)で解析した．si RNA に耐性の UBA52 ベクターを si RNA と共導入して FCM，western blot の変化を検討した．FLAG-UBA52-GFP ベクターを用いて, FLAG, GFP のそれぞれで免疫沈降を行い, Western blot で結合分子を確認した．さらに同ベクターの過剰発現，および UBA52 の発現抑制後に超遠心を行い，リボソームでのこれらの分子の関わりを western blot で確認した.

＜結果と考察＞

UBA52 の生理機能解析のため UBA52 欠損マウスを作成し, 変異遺伝子配列が目的部位に組み込まれていることを確認した(Fig.1B, Fig.1C)．UBA52 欠損マウスが胎生致死であったことから(Fig.1E)，UBA52 が胎生期から重要な役割を担っていることが推測された．ヘテロ欠損マウスでは腎臓，脾臓，小腸，大腸の UBA52 の遺伝子発現に差を認めなかった(Fig.1D).

UBA52 欠損マウスが胎生致死となったのは，UBC 欠損マウスが胎生致死であったようにユビキチン量が減少したためである可能性を考えた．そこで，DLD-1 細胞を用いて UBA52 si RNA

で発現抑制を行なったが,ユビキチン mRNA の総量に変化を認めなかった(Fig.2A). 次に, RPL40 の細胞内での挙動や機能を解析することとし， FLAG-UBA52-GFP ベクターを導入し行った. western blot では，FLAG と GFP の抗体で共通に認識されるバンドはなく，FLAG 抗体では高分子のスメアが観察された(Fig.2B, Fig.2C)). つまり UBA52 はタンパク合成後すぐに分離してユビキチンと RPL40 となることがわかった．同ベクターを導入して蛍光顕微鏡で観察すると RPL40-GFP は細胞質に均一に分布していた(Fig.2D)．超遠心による比重分離ではリボソーム分画だけでなく，細胞質分画にも多くの RPL40 が存在していた．UBA52 si RNA で発現抑制を行うとリボソーム分画の UBA52 も徐々に減少することともに(Fig.2E)，リボソーム機能が減弱することを確認した(Fig.2F)．この現象は DLD-1 細胞だけでなく，Hela 細胞でも確認することができた(Fig.2G). 以上のことから，UBA52 の欠損マウスが胎生致死となったのはユビキチンの減少が原因ではなく，リボソーム機能の低下が原因と考えられた.

リボソーム機能の低下は細胞周期の抑制を来すことが報告されているが，その機序については不明な点も多い．DLD-1 細胞で UBA52 の発現抑制を行うと，やはり ATP ルシフェラーゼ発光で生細胞数が増えず(Fig.3A)，FCM では細胞周期が G1/S 期で静止することを確認した(Fig.3B). さらに，si RNA 耐性の UBA52 ベクターを導入することで細胞周期が回復することを発見し(Fig.3C)，UBA52 が細胞周期を制御している可能性が示唆された．そこで，G1/S 期に働く主要な分子の CyclinD について検討を行なった. UBA52 の発現抑制を行うと CyclinD mRNA には変化なかったが，タンパク質は減少していた(Fig.3D, Fig.3E)．CyclinD の減少に UBA52 が特異的に機能している可能性を考え，CyclinD と複合体を形成する CDK6 に着目して PLA を行うと，細胞質で共局在していることを発見した(Fig.3F)．さらに FLAG-UBA52-GFP ベクターを導入し，GFP で免疫沈降すると，DLD-1 細胞でも HEK293T 細胞でも RPL40 は CDK6 と結合していた(Fig.3G)．以上から，RPL40 は CDK6 と結合して CyclinD の安定化に関与し，細胞周期を制御している可能性が示唆されたが，一方で，CyclinD は Cycloheximide の投与で，速やかに減少することも確認され(Fig.3H)，タンパク質合成能の低下で CyclinD が減少しただけの可能性もある．今後詳細な検討が必要であるが，いずれにしても UBA52 は CyclinD のタンパク発現を調節し，細胞周期を制御していることが確認された.

さらに UBA52 がどのようにタンパク質合成を制御しているかを si RNA 耐性，分離耐性ベクターを用いて検討した．UBA52 の発現抑制細胞に UBA52，ユビキチン単独，RPL40 単独，ユビキチンと RPL40 の両者，さらに分離耐性 UBA52 をそれぞれ過剰発現させると，UBA52 を過剰発現させたときにのみ CyclinD の発現を回復させることが可能であった(Fig.4A)．このことから，RPL40 のみがリボソーム機能を制御しているのではなく，UBA52 から RPL40 が分離される機構もしくは UBA52 由来のユビキチンの局在などがリボソーム機能に影響していることが示唆された．そこで，FLAG-UBA52-GFP ベクターを用いて，GFP で免疫沈降を行うと，FLAG ユビキチンのスメアが観察され，UBA52 由来のユビキチンでユビキチン化された分子と結合していることが確認された(Fig.4B)．また，FLAG の免疫沈降では，UBA52 由来のユビキチンがリボソーム関連分子をユビキチン化していることも確認された(Fig.4C)．さらに FLAG-UBA52-GFP ベクターを過剰発現させて超遠心を行うと，リボソーム分画で FLAG ユビキチンのスメアと GFP の発現の両者が観察され(Fig.4D)，UBA52 の発現抑制ではリボソーム分

画のユビキチンが減少していることが確認された(Fig.4E)．以上から，UBA52 は RPL40 だけではなく，ユビキチンもリボソームに供給し，リボソームの機能を制御していることが明らかになった．

＜結論＞

UBA52 欠損マウスを作成し胎生致死であったことから，UBA52 が胎生期に重要な役割を果たしていることを発見した．さらに，UBA52 のリボソームタンパク質である RPL40 がリボソームに組み込まれるのと同時に UBA52 由来のユビキチンがリボソーム構成分子をユビキチン化し，タンパク質合成を制御していることが明らかとなった．これらの発見はユビキチンによるタンパク質合成制御の新たな機構である．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5155　号	小林　正典
論文審査担当者	主　査　三木　義男 副　査　田中　真二、稲澤　譲治	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文はユビキチンとリボソームタンパク質 RPL40 の融合分子である UBA52 が、タンパク質合成制御の新たな機構に関与することを明らかにした論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ユビキチンは細胞内の重要な翻訳後修飾分子として多様な機能が報告されている。ユビキチンは4種の遺伝子から発現するが、それぞれの機能は明らかではない。このような背景の下、申請者はユビキチンの1つUBA52の機能をin vitro, 及びin vivoで解析し明らかにしており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. UBA52 欠損マウスが胎生致死であったことから、UBA52 が胎生期に重要な役割を果たしていることを示した。
2. UBA52のリボソームタンパク質であるRPL40がリボソームに組み込まれるのと同時にUBA52由来のユビキチンがリボソーム構成分子をユビキチン化し、タンパク質合成を制御していることを明らかにした。

以上のように申請者は、ユビキチンによるタンパク質翻訳や胎生発達における新たな制御機構を示した。これは基礎・臨床両面において有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では、まず、ノックアウトマウスを作製、胎生致死であることから細胞株を用いた解析を積極的に進め、高度な細胞生物学及び生化学的な知識と解析技術を駆使し遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果がユビキチンによるタンパク質合成制御の新たな機構の解明につながると考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	木原　まり
論文審査担当者	主査　安原　眞人 副査　窪田　哲朗、小池　竜司
論　文　題　目	Use and effectiveness of tocilizumab among patients with rheumatoid arthritis: an observational study from the British Society for Rheumatology Biologics Register for rheumatoid arthritis

（論文内容の要旨）

<要旨>

目的： UK の臨床現場で tocilizumab (TCZ)を使用した関節リウマチ(RA)患者の特徴を分析し、TCZ と腫瘍壊死因子(TNF)阻害薬の実臨床の場での有効性を比較する。過去の生物学的製剤使用歴、methotrexate (MTX)の併用が TCZ の有効性に与える影響を分析する。

方法: UK で生物学的製剤を開始する RA 患者を集めた前向きコホートスタディ(British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis)を用い、ベースラインの患者特徴と 6 ヶ月時での治療効果、1 年間の治療継続率を 1 剤目の生物学的製剤として TCZ を開始した患者と TNF 阻害薬を開始した患者、TCZ を 1 剤目の生物学的製剤として開始した患者と 2 剤目以降の生物学的製剤として開始した患者、MTX を併用して TCZ を使用した患者と併用しなかった患者で比較した。

結果：UK では TCZ は主に 2 剤目以降の生物学的製剤として使用されていた。1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した患者は TNF 阻害薬使用患者よりも併存症を有する割合が高かった。1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した患者は 6 ヶ月時で TNF 阻害薬を開始した患者よりも DAS28 寛解を達成しやすかったが、その他の有効性の指標では両群に差は見られなかった。2 剤目以降の生物学的製剤として TCZ を使用した患者と 1 剤目の生物学的製剤として使用した患者では、背景因子の差を調整したところ治療反応性に有意差は見られなかった。MTX の併用の有無で治療効果の差は認めなかった。

結論：TCZ は UK で主に 2 剤目以降の生物学的製剤として使用されている。1 剤目の生物学的製剤として使用された場合、治療効果は TNF 阻害薬と比べて差を認めなかった。

<緒言>

生物学的製剤は、関節リウマチ（RA）の病態に関与するサイトカインの働きを抑制し、従来の疾患修飾性抗リウマチ薬に対して治療抵抗性のある RA 患者の治療効果を改善する。TNF 阻害薬に続いて IL-6 受容体抗体である tocilizumab (TCZ)が RA に対して使用できるようになり、生物学的製剤を用いた治療の選択肢は拡大した。しかし、実臨床の場での TCZ の選択、TNF 阻害薬と比べた TCZ の治療効果に関する情報は乏しく、TCZ を有効に使用するためのエビデンスは未

だ不十分である。

本研究は下記を目的として施行した。（１）UK の臨床現場で TCZ を使用した RA 患者の特徴を分析する。（２）1 剤目の生物学的製剤としての TCZ と TNF 阻害薬の実臨床の場での有効性を比較する。（３）過去の生物学的製剤使用歴、MTX の併用が TCZ の有効性に与える影響を分析する。

<方法>

British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis は RA 患者を対象とした UK 国家規模での前向きコホートスタディである。本研究では 2010 年 1 月 1 日から 2014 年 5 月 31 日までの間に TCZ を 1 剤目の生物学的製剤もしくは 2 剤目以降の生物学的製剤として開始した患者、TNF 阻害薬を 1 剤目の生物学的製剤として開始した患者について解析を行った。

ベースラインでの患者の特徴と 6 ヶ月時での治療効果を(1)1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した患者群 対 TNF 阻害薬を使用した患者群 (2) TCZ を 1 剤目の生物学的製剤として使用した患者群 対 2 剤目以降の生物学的製剤として使用した患者群 (3) TCZ 使用患者のうち、MTX 併用群 対 非併用群で比較した。

EULAR response と DAS28 寛解率について治療間で Regression model を用いて比較した。Regression model は(1)性、年齢 (2) propensity score により調整を行った。Propensity score はベースラインで有意差が得られた因子、治療効果に影響を与えることが予測される因子を用いて算定した。1 年間の治療継続率は Kaplan-Meier 曲線を用いて表し、Log-rank test を用いて比較した。欠損値は multiple imputation を用いて補正を行った。

<結果>

期間中 217 人の患者が TCZ を、2419 人の患者が TNF 阻害薬を 1 剤目の生物学的製剤として開始し、777 名の患者が TCZ を 2 剤目以降の生物学的製剤として開始していた。

(1))1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した患者群と TNF 阻害薬を使用した患者群の比較

ベースラインで)1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した患者群で TNF 阻害薬を使用した患者群よりも有意に肺線維症、悪性腫瘍の既往を有する割合が高かった。6 ヶ月時で first-line TCZ cohort で DAS28 寛解を達成した患者の割合が有意に高く、背景因子で調整後も有意差は変わらなかった。EULAR response では両群の差は認めなかった。DAS28 の各構成項目に関する比較では TCZ cohort で ESR の減少が有意に大きかったが、その他の項目のでは有意な差を認めなかった。治療継続率でも両群に統計学的な有意差を認めなかった。

(2) TCZ を 1 剤目の生物学的製剤として使用した患者群と 2 剤目以降の生物学的製剤として使用した患者群の比較

2 剤目以降の生物学的製剤として使用した患者群では、1 剤目の生物学的製剤として使用した患者群と比べ、疾患罹患期間が長く、疾患活動性が高く、身体機能の低下を認めた。6 ヶ月時での EULAR response、DAS28 寛解率の比較では、2 剤目以降の生物学的製剤として使用した患者群は有意に劣っていたが、propensity score を用いて背景因子を調整後、両群で差は認めなかった。

治療継続率でも両群に統計学的な有意差を認めなかった。

(3) TCZ の有効性に対する MTX 併用の影響
TCZ cohort のうち MTX 併用群は非併用群と比べて若く、併存症が少なく、コルチコステロイドの使用率が少なかった。EULAR response と DAS28 寛解率では MTX 併用群と非併用群で 1 剤目の生物学的製剤として使用した患者、2 剤目以降の生物学的製剤として使用した患者とも、差を認めなかった。しかし、特に 1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した群では、患者数が少なく広い信頼区間を示した。治療継続率でも両群に統計学的な有意差を認めなかった。

<考察>
本研究は、実臨床の場で TCZ を 1 剤目の生物学的製剤として使用した患者の特徴を分析し、その有効性を 1 剤目の生物学的製剤として、2 剤目以降の生物学的製剤として検討した初めての研究である。多くの TCZ 使用患者は 2 剤目以降の生物学的製剤としてこれを使用していたが、これには UK での適応承認のタイミングも影響していると考える。
1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した患者では TNF 阻害薬を使用した患者と比べ、疾患活動性に差はなかったが、併存症、特に肺線維症の有無、悪性腫瘍の既往の有無に大きな差をみとめた。近年の研究では TNF 阻害薬の使用は肺線維症や悪性腫瘍発症のリスクとならないことが示唆されているが、それ以前の研究では TNF 阻害薬の使用が肺線維症や悪性腫瘍発症のリスクを増加させると示唆されていたため、これらの併存症をもつ患者で TCZ が選択される傾向があった可能性が考えられる。
本研究では、これまでの報告と同様、1 剤目の生物学的製剤として使用された場合、TCZ は TNF 阻害薬に比べ有意に高い DAS28 寛解率を達成することを示唆した。しかしながら、DAS28 による指標での比較では TCZ の急性期反応物質の抑制効果により ESR が有意に低下していたことの影響をうけている可能性が示唆される。TCZ は 2 剤目以降の生物学的製剤として使用した場合、1 剤目の生物学的製剤として使用した場合よりも背景因子調整前の有効性比較では劣っていたが、背景因子調整後の比較では有意差を認めなかった。これは罹患期間や疾患特性の差によるものと考えられる。
いくつかのこれまでの研究と同様に、本研究では MTX 併用は TCZ の有効性に影響を与えなかった。本研究では特に 1 剤目の生物学的製剤として TCZ を使用した患者数は少なく、有意差を検出できなかった可能性も示唆され、さらなる研究が必要である。
本研究の限界として、TCZ の急性期反応物質の抑制効果の影響を受ける DAS28 を治療効果の指標として用いたこと、ESR を用いて算出した DAS28 と CRP を用いて算出した DAS28 を区別しえなかったこと、multiple imputation を用いて補完を行ったものの 20%の患者で 6 ヶ月時での治療効果指標に欠損を認めたこと、治療効果は比較したものの有害事象の比較を行っていないことが挙げられる。

<結論>
UK の臨床現場での TCZ の使用とその有効性について解析を行った。TCZ は UK で主に 2 剤

目以降の生物学的製剤として使用されている。1 剤目の生物学的製剤として使用された場合、治療効果は TNF 阻害薬と比べて劣らないことが示唆された。生物学的製剤の使用歴のある患者に TCZ を使用した場合、使用歴のない患者に使用した場合よりも、有効性は劣ったが、背景因子の違いによる可能性が考えられた。MTX 併用は TCZ の有効性に関する影響を示さなかったが、本研究では1剤目として TCZ を使用した患者の数が少ないために有意差を検出できなかった可能性が考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5156　号	木原　まり
論文審査担当者	主　査　安原　眞人 副　査　窪田　哲朗、小池　竜司	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、実臨床における生物学的製剤 tocilizumab（TCZ）の使用状況を英国の関節リウマチ（RA）患者を対象とした前向きコホート研究により検討したものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

腫瘍壊死因子（TNF）阻害薬に続いて IL-6 受容体抗体である TCZ の開発は、RA に対する生物学的製剤による治療の選択肢を拡げたが、実臨床におけるその有効性が十分に評価されているとは言えない。申請者は、英国の RA 患者登録制度に基づく国家規模の前向きコホート研究により、実臨床における TCZ の使用状況を TNF 阻害薬と比較して検討した点が高く評価できる。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 期間中、116 人の患者が TCZ を、1627 人の患者が TNF 阻害薬を、それぞれ 1 剤目の生物学的製剤として使用し、589 人の患者が TCZ を 2 剤目以降の生物学的製剤として開始していた。

2. TCZ が 1 剤目の生物学的製剤として使用された場合、治療効果は TNF 阻害薬と比べて差を認めなかった。

英国において TCZ が 2 剤目以降の生物学的製剤として使用されていることが明らかとなったが、これは英国における薬事承認取得時期や RA 治療ガイドラインの影響によるものと考えられた。本研究の成績は、日本を含めた英国以外の RA 診療状況とも対比可能で、臨床的にも有用な研究成果と評価される。

３）研究方法・倫理観

研究には、British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis のデータを用い、倫理審査委員会の承認の下、全登録患者から文書によるインフォームドコンセントを得ている。解析は、十分な統計的知識と臨床家としての経験の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

臨床研究において回避できないバイアスや制限など、本研究の限界や研究デザインの特性を深く理解した考察がなされており、今後の大規模臨床研究への展開が期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	長谷川　久紀
論文審査担当者	主査　神奈木　真理 副査　樗木　俊聡、横関　博雄
論　文　題　目	Direct suppression of autoaggressive CD8+ T cells with CD80/86 blockade in CD8+ T cell-mediated polymyositis models of mice

（論文内容の要旨）

CD80/86 阻害による CD28 への補助刺激阻害は、CD4+T 細胞のアロ反応を阻害するが、CD8+T 細胞のアロ反応は阻害しない。一方、抗原非特異的な刺激下では、CD28 補助刺激は CD8+T 細胞による細胞傷害を増強する。そこで我々は、CD80/86 阻害が CD8+T 細胞依存性多発性筋炎(PM)モデルマウスに対して有効性を示し、その有効性が自己反応性 CD8+T 細胞の直接抑制によるかを評価した。

C 蛋白をマウスに皮内注射し、C 蛋白誘導性筋炎(CIM)を誘導した。また、C 蛋白由来の CD8+T 細胞エピトープペプチドを提示させた樹状細胞(DC)をマウスに静脈内注射し、CD4+T 細胞非依存的に活性化した CD8+T 細胞による C 蛋白ペプチド誘導性筋炎(CPIM)を誘導した。免疫したマウスを CTLA4-Ig または抗 CD80/86 抗体で治療し、C 蛋白免疫後 21 日目に CIM マウスの、DC 移入後 7 日目に CPIM マウスの筋を組織学的に評価した。CTLA4-Ig または抗 CD80/86 抗体は、免疫時からの予防的投与、筋炎発症後からの治療的投与のいずれの場合でも CIM を抑制し、さらに CTLA4-Ig は、DC 移入時からの投与で CPIM を抑制した。

CD80/86 阻害は多発性筋炎モデルマウスに有効であり、CPIM の改善は、CD80/86 阻害が直接、自己反応性 CD8+T 細胞を抑制したことを示唆した。以上より、CTLA4-Ig は、CD4+T 細胞だけでなく CD8+T 細胞も直接抑制し、PM や他の CD8+T 細胞依存性疾患に対して有効な治療薬に成り得ると考えられた。

＜背景＞

PM は近位筋優位の筋力低下を呈する慢性の自己免疫性疾患である。種々の研究から筋傷害の主病態は細胞傷害性 CD8+T 細胞が担うと推定されているが、PM の治療には、非特異的な免疫抑制作用をもつ高用量副腎皮質ステロイドとアザチオプリンやメトトレキサートなどの免疫抑制剤が使用される。最近では、B 細胞を除去するリツキシマブの PM に対する臨床応用も増えてきている。しかし、これらの治療に抵抗性または副作用を示す PM 患者もおり、重大な副作用なしに自己反応性 CD8+T 細胞を直接抑制する薬剤は、PM に対して特異的で安全な治療に成り得る。

CTLA4-Ig は、T 細胞の CD28 よりも強く抗原提示細胞の CD80/86 へ結合し、CD28-CD80/86 補助刺激を阻害して T 細胞機能を抑制する。そして、IgG の Fc 領域が改変されたヒト CTLA4-Ig のアバタセプトは、関節リウマチ(RA)への有効性と安全性が示されている。近年、治療抵抗性の PM2 例と皮膚筋炎(DM)1 例にアバタセプトが有効であったと報告され、自己反応性 CD8+T 細胞による組織傷害に CTLA4-Ig が有効であることが示唆された。そこで、PM と病態が類似した C 蛋白誘導性筋炎(CIM)を CTLA4-Ig で治療すれば、CD8+T 細胞依存性の組織傷害を CD80/86 阻害が抑制するか検証可能と考えた。

CTLA4-Ig はヒトとマウスの CD4+T 細胞のアロ反応を阻害するが、CD8+T 細胞のアロ反応は阻害しないと報告されている。一方、抗 CD3 抗体による抗原非特異的刺激下では、CD28 補助刺激が CD8+T 細胞による細胞傷害を増強する。よって、自己反応性 CD8+T 細胞の活性化には CD28-CD80/86 補助刺激が重要である可能性があり、重要でない場合は、PM/DM への CTLA4-Ig の治療効果は、CD8+T 細胞の分化を促進させる CD4+T 細胞の抑制のみに起因すると考えられる。

我々は、骨髄由来の樹状細胞(BMDC)に C 蛋白由来の CD8+T 細胞エピトープペプチドを提示させ、その BMDC を静脈内投与することで誘導される C 蛋白ペプチド誘導性筋炎(CPIM)を開発している。CPIM は CD8+T 細胞除去マウスでは誘導されず、CD4+T 細胞除去マウスでは誘導されることから、CPIM は CD4+T 細胞非依存的に活性化した自己反応性 CD8T+細胞によって誘導されると考えられ、自己反応性 CD8+T 細胞を直接抑制する治療法の開発に適している。よって、CIM に加え、CPIM を CTLA4-Ig で治療し、CD80/86 阻害が自己反応性 CD8+T 細胞を直接抑制するかを検証することとした。

＜方法＞

CIM は、完全フロイドアジュバンド(CFA)と混合した骨格筋蛋白の C 蛋白を 8 週齢の C57BL6(B6)マウスの尾根部と後肢足底に皮内注射し、同時に百日咳毒素を腹腔内投与して誘導した。CPIM の誘導のため、まず、B6 マウスの骨髄由来の白血球を GM-CSF で DC へと分化させた。次に、得られた DC を LPS で活性化し、C 蛋白由来の CD8+T 細胞エピトープペプチドをパルスした後、200 万個を 2 回、8 週齢の B6 マウスに静脈より移入し、初回移入時に足底に CFA を皮内注射することで、CPIM を誘導した。それぞれのマウスに、CTLA4-Ig(アバタセプト) 1000 μg または抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体(抗 CD80/86 抗体)250 μg ずつを投与した。対照にはそれぞれ bovine serum albumin (BSA)とラットポリクローナル IgG を使用した。CIM マウスには 3 日に 1 回、計 4 回、CPIM マウスには 3 日に 1 回、計 3 回、薬剤を投与した。CIM マウスは C 蛋白免疫の 21 日後に、CPIM マウスは DC 移入の 7 日後に、大腿四頭筋と大腿屈筋の組織学的変化を観察し、筋壊死を伴う単核球細胞浸潤の程度により筋炎の重症度をスコア化した。

＜結果＞

CD80/86 阻害が CIM を改善するかを評価するため、CTLA4-Ig または対照の BSA を CIM マウスに投与した。まず、予防的プロトコールによる効果を評価するため、C 蛋白免疫の日

から薬剤投与を開始し、その後マウスの筋炎を組織学的に評価した。BSA 投与群では、筋組織内に単核球細胞浸潤と筋線維壊死を伴う筋炎病変を複数認めたが、CTLA4-Ig 投与群では CIM の重症度と発症率が抑制された。次に、CIM を発症したマウスへの CTLA4-Ig の治療効果を評価するため、組織学的に CIM の発症が確認される免疫 7 日後から、治療的プロトコールとして薬剤投与を開始した。治療的プロトコールでも、CTLA4-Ig は筋炎の重症度を抑制した。

CIM での CD80/86 阻害効果を別の方法で評価するため、CIM マウスに治療的プロトコールで抗 CD80/86 抗体または対照のラットポリクローナル IgG を投与したところ、抗 CD80/86 抗体は CIM の重症度を抑制した。

一般的に、CD8+T 細胞の分化は CD4+T 細胞ヘルプを要し、CIM でも CD4+T 細胞を除去したマウスでは筋炎の発症が抑制されたことから、CIM に対する CTLA4-Ig と抗 CD80/86 抗体の効果は、CD4+T 細胞の免疫応答阻害による可能性も考えられた。CPIM は、C 蛋白由来の CD8+T 細胞エピトープペプチドを提示する DC が、CD4+T 細胞非依存的に、自己反応性 CD8+T 細胞を活性化させて誘導される筋炎であるので、CPIM を用いて、CD8+T 細胞に対する CD80/86 阻害の直接的効果を評価することとした。マウスに DC を移入した日から CTLA4-Ig または BSA を投与したところ、CTLA4-Ig を投与したマウスの筋組織で CPIM の重症度が抑制されていた。

＜考察＞

CD28-CD80/86 補助刺激阻害は、PM モデルマウスに対し治療効果を示した。CPIM では CD4+T 細胞非依存的に自己反応性 CD8+T 細胞が活性化するので、CD80/86 阻害が直接、CD8+T 細胞を抑制することが示された。CTLA4-Ig(アバタセプト)は、CD4+T 細胞と CD8+T 細胞の両細胞群を抑制し、PM や他の CD8+T 細胞依存性疾患の新規治療薬に成り得る。

CTLA4-Ig と抗 CD80/86 抗体が治療的プロトコールで CIM を改善したことや、治療抵抗性の PM/DM 症例で病状発症数年後からの投与で CTLA4-Ig が治療効果を示したことから、CD80/86 阻害は、自己反応性 CD28+CD8+T 細胞の持続的な免疫応答と後続する筋傷害を抑制して PM/DM を改善したと考えられる。CD28 に着目した場合、PM/DM 患者の筋組織では CD8+T 細胞の約 60～70%が CD28 - CD8+T 細胞であり、また、患者由来の CD28 - CD8+T 細胞は自己の筋組織に対して細胞傷害能を示すと報告されている。CD28 - CD8+T 細胞は、CD80/86 からの反復刺激により CD28+CD8+T 細胞から分化するため、PM/DM への CTLA4-Ig の治療効果は、CD28+CD8+T 細胞の活性化抑制と CD28 - CD8+T 細胞の発生防止から得られると考えられる。事実、RA 患者では、CTLA4-Ig 治療後に末梢血中の CD28 - CD8+T 細胞数が減少したと報告されている。

既報の症例報告では、CTLA4-Ig はカルシニューリン阻害剤にも抵抗であった PM/DM 患者に対して有効であった。TCR と CD28 を介したシグナルは CD4+T 細胞と CD8+T 細胞の細胞傷害能を誘導するが、シクロスポリンはその細胞傷害能、特に CD8+T 細胞の細胞傷害能を部分的にしか抑制できない。よって、既報の症例では、CTLA4-Ig が CD80/86 阻害により、カルシニューリン阻害剤抵抗性の T 細胞の細胞傷害能を抑制し、筋傷害を抑制したと考

えられる。

アバタセプトはIgGのFc領域が改変されているため、補体と結合せず、Fc受容体もCD64にわずかに結合するのみで、補体依存性細胞傷害や抗体依存性細胞傷害を誘導しない。一方、PM/DMと同様にCIMに対して有効であるヒト免疫グロブリン製剤はFc領域に変異を有さない。PM/DMに対する免疫グロブリンの作用機序は未解明だが、IgGのFc領域が重要な役割を担うと提案されているので、我々は、アバタセプトの対照として、補体やFc受容体にも、CD80/86にも結合しないBSAを使用することとした。また、我々の研究では、ラットポリクローナルIgGがCIMを改善しなかったのに対し、ラット抗CD80/86抗体がCIMを改善し、このことは、CIMやCPIMに対するアバタセプトの効果がアバタセプトのFc領域を介していないことを支持した。

CIMやCPIMの筋力を再現性よく測定する方法はまだ確立しておらず、CIMマウスで上昇するクレアチニンキナーゼも運動を制限できない対照マウスでも時々上昇するため、薬剤の治療効果の評価に適していない。よって、筋の組織学的スコアリングが現段階では最も実践的な評価方法であるため、CIMやCPIMに対するCTLA4-Igや抗CD80/CD86の治療効果は組織学的スコアリングで行った。

今回、CD80/86阻害が自己反応性CD8+T細胞を直接抑制し、PMのモデルマウスに有効であったことを示した。現在進行中のCTLA4-IgのPM/DMに対する臨床試験第Ⅱ相の無作為試験の結果が、PMに対するCTLA4-Igの有効性の更なるエビデンスを与えてくれることを期待している。

＜結論＞

自己反応性CD8+T細胞を直接抑制するCTLA4-Igは、CD4+T細胞とCD8+T細胞の両細胞群を直接抑制し、PMやCD8+T細胞依存性疾患の新規治療薬に成り得る。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5157　号	長谷川　久紀

論文審査担当者	主　査　神奈木　真理 副　査　樗木　俊聡、横関　博雄

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、CD8 陽性 T 細胞依存性の多発性皮膚筋炎マウスモデルにおいて、アバタセプト（CTLA4/I g 融合蛋白）が治療効果を持つことを示した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

関節リウマチ等の治療に使われているアバタセプト（CTLA4/I g 融合蛋白）は CD80/CD86 と結合することにより、CD28 を介した T 細胞活性化を抑制する。CD28 からの共刺激は CD4 陽性 T 細胞の活性化に重要な役割を果たすが、CD8 陽性 T 細胞の活性化には必須ではないとされている。申請者は、自己応答性の CD8 陽性 T 細胞が優位に働く多発性皮膚筋炎マウスモデルを用いてアバタセプトの効果を検討した。

２）学術および社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. C蛋白と完全フロインドアジュバントの免疫により誘導された筋炎は、アバタセプトを免疫前あるいは免疫後に投与した群のどちらにおいても対象群より有意に抑制された。
2. 同様の筋炎抑制効果はCD80抗体/CD86抗体の治療的投与でも認められた。
3. CD8陽性T細胞エピトープ部位のオリゴペプチドを添加した成熟樹状細胞を免疫して誘導した筋炎もアバタセプトにより有意に抑制された。

３）研究方法・倫理観

筋炎の評価は、C蛋白免疫によるモデルでは21日後に、C蛋白ペプチド免疫によるモデルでは7日後に、大腿四頭筋と大腿屈筋の組織学的スコアにより評価した。

４）考察・今後の発展性

本研究により、自己応答性のCD8陽性T細胞に対してもアバタセプトが抑制効果を示すことが示唆され、既に使用されている関節リウマチに加え、CD8陽性T細胞優位の自己免疫疾患に対しても有効である可能性が示された。

３．その他特記すべき事項無し

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	柳澤　克昭
論文審査担当者	主査　大川　淳 副査　上阪　等、淺原　弘嗣
論　文　題　目	Weekly injections of Hylan G-F 20 delay cartilage degeneration in partial meniscectomized rat knees

（論文内容の要旨）

<要約>

ヒアルロン酸(hyaluronan:HA)関節内注射が軟骨変性を抑制するかに関して、いまだ臨床ではevidence が乏しい。半月板切除後の外傷性関節症は良く知られているが、半月板切除モデルに対する HA の効果を検討する報告は少ない。今回、ラット内側半月板前方 1/2 切除モデルで、Hylan G-F20 関節内注射の軟骨変性抑制効果について検討した。ラット両膝内側半月板前方 1/2 を切除し、1 週後から片膝に Hylan G-F20 を、毎週 1 回関節内注射、反対膝は PBS を同様に毎週 1 回関節内注射した。切除後 2、4、8 週で、関節軟骨・滑膜を肉眼・組織学的評価した。切除後 2 週ですでに、対象群で早期から軟骨の変性を認めた。肉眼所見をスコアと変性面積 を評価すると、全期間で HA 群が対象群よりも良好であった。対象群は 2 週間後からサフラニン-O 染色で軟骨基質の低下、軟骨変性を認めた。組織所見をスコアで評価すると、HA 群が対象群よりも 4、8 週の時期で良好であった。滑膜細胞の増生は両群間に差はなかった。しかし、Hylan G-F20 群では滑膜内にヒアルロン酸の fragment と考えられる、周囲に CD68 陽性細胞の集積が認められる無構造の部位が認められた。内側半月板前方 1/2 切除モデルは、低侵襲で再現性よく施行でき、軟骨変性の程度も強いが半月板の自然治癒が見られる。このモデルで、Hylan G-F20 の毎週投与は半月板の再生を促進しなかったが関節軟骨変性進行を抑制した。

<緒言>

変形性関節症(osteoarthritis:OA)は関節痛や生活の質の低下の原因として、最も一般的な疾患である。世界で約 1 億人の罹患患者がおり、罹患人口は年齢が増すとともに増加する。OA の治療として様々な治療法があるが、進行を抑制するものとして未だ確立した治療法はない。

ヒアルロン酸は軟骨や滑液で産生され、関節ホメオスタシスの維持に重要な関節の潤滑において主要な役割を持つ。OA では、滑液内のヒアルロン酸粘性が低下し、濃度が減少する。それゆえ、ヒアルロン酸関節内注射は OA 患者の減少したヒアルロン酸粘性、濃度を改善する可能性がある。正常関節の滑液中のヒアルロン酸分子量は約 7000kDa と報告されている。Hylan G-F 20 は 80%の高分子である Hylan A と、20%の不溶液であるゲルで構成されており、その分子量は 6000kDa である。膝 OA に対して正常と同等の分子量のヒアルロン酸注射を投与する治療法は生物学的に

合理性がある。

臨床では、Hylan G-F 20 関節内注射が OA 患者において疼痛を抑制した報告がある。また、Hylan G-F 20 が OA の進行を抑制したとの報告もあるが、それに否定的な報告もある。Hylan G-F 20 関節内注射が、軟骨変性の進行を抑制するか否かに関して、いまだ臨床では evidence が乏しい。既存の研究では、変形性関節症を発症させる動物モデルとして、ウサギ前十字靭帯切離モデルにおいて OA の進行を抑制した報告などされているおり、大部分の OA モデルは ACL 切離により発症させるモデルである。関節症発症の要因として、機械的ストレスによる一次的な関節軟骨変性とその後の軟骨・骨反応、そして軟骨細片の貪食による二次性滑膜炎メカニカルストレスや炎症が誘因と考えられている。半月板切除後の二次的な関節症は良く知られている。半月板切除モデルに対する HA の効果を検討する報告は少ない。我々は、ラットの内側半月板前方 1/2 切除モデルでは半月板の自然再生傾向と同時に進行する軟骨損傷が認められ、半月板の再生の程度により軟骨損傷の進行が変化する点で軟骨と半月板の 2 つの要素が影響する OA モデルである。本モデルに対する Hylan G-F20 関節内注射の軟骨変性抑制、半月板再生への効果について検討した。

<方法>

30 匹 Wild type 雄 Lewis ラットの両膝の内側半月板前方 2 分の 1 切除を施行し、OA モデルを作成。内側半月板切除 1 週後から左膝に Hylan G-F20 (分子量; 6000 kDa) 50μl を、毎週 1 回関節内注射した。右膝は対象群として phosphate buffered saline (PBS)を同様に毎週 1 回関節内注射した。内側半月板切除後 2、4、8 週で、脛骨内側軟骨を肉眼・組織学的に、膝関節滑膜を組織学的に定量評価した。肉眼的評価として、肉眼的スコアリングと軟骨欠損面積を測定。組織学的評価として脛骨軟骨をサフラニン-O 染色、免疫学的評価としてコラーゲンタイプⅡ染色を施行し、膝関節滑膜は HE 染色を施行した。各切片でスコアリングを施行し、各群で評価した。滑膜炎の評価を行うために免疫学的染色を施行した。

<結果>

肉眼的評価では、対象群で切除 2 週後すでに早期から軟骨変性を認め、4・8 週では陽性面積の増悪を認めた。Hylan G-F 20 群では、軟骨変性は認められたが、それぞれの期間で対象群と比較して変性面積は小さかった。定量的解析では、Hylan G-F 20 群は明らかにコントロール群と比較して全ての週で軟骨変性面積が抑制された。スコアリングでも同様に、Hylan G-F 20 群の方がスコアは低かった。骨棘スコアでは両群間に有意差はなかった。組織学的評価では、サフラニン-O 染色で 2・4 週群では染色性の低下を認め、8 週では軟骨の欠損を認めた。Hylan G-F 20 群では軟骨変性の程度が抑制されていた。滑膜細胞の増生は、HE 染色において滑膜細胞数・滑膜炎スコアで両群間に差はなかった。しかし、Hylan G-F 20 群では滑膜内にヒアルロン酸の fragment が認められ、周囲にマクロファージの指標である CD68 陽性細胞の集積が認められた。

<考察>

我々は、Hylan G-F 20 関節内注射がラット内側半月板 1/2 切除 OA モデルで軟骨変性を抑制す

ることを検討した。 Hylan G-F 20 は、異なる Hylan ポリマーが 2 種類混合したものであり、関節内注射により Lubrication の改善を目指した合成製剤である。

既存の研究では、HA の膝関節注射により抗炎症性作用が示されている。 Smith らは、雌ヒツジ半月板切除術モデルで 500-700kDa HA を関節内注射し、線維化が抑制したと報告している。また、Tang らは、ラットランニングによる炎症モデルにおいて、800kDa HA 関節内注射により抑制されると報告した。 本研究において、Hylan G-F 20 は半月板切除術によって誘発された滑膜炎を抑制しなかった。本結果は、Hylan G-F 20 が抗炎症作用によるものではなく、Lubrication の補充により軟骨変性を抑制したことを示唆する。

既存の研究で、小林らがウサギ半月板切除術モデルにおいて、800kDa HA 関節内注射が半月板サイズを増加させると報告があり、我々は Hylan G-F 20 が半月板再生を促進すると想定した。我々の予想に反して、Hylan G-F 20 と対照群では内側半月板の大きさの相違はなかった。しかし既存の研究では、マウスの半月板切除において軽度再生したと報告している。Hylan G-F 20 の注射は本モデルの半月板再生を促進しなかったと考えられる。

臨床において、Hylan G-F 20 のプロトコールは毎週計 3 回注射される。 我々のプロトコールでは、Hylan G-F 20 は 8 週で評価するために毎週計 7 回注射した。これは臨床で推奨されるプロトコールと異なるが、我々が数種類の HA と同じモデルと治療のプロトコールで比較するため、通常のプロトコールと異なる方法で施行した。

Hylan G-F 20 関節注射の副作用として、Hylan B（不溶性ジェル）は関節滑膜によって取り込まれ、滑膜炎を局所で惹起することが報告されている。この副作用は他の動物研究で以前に報告され、臨床においても同様に報告されている。我々は、不溶性のゲルが滑膜によって取り込まれ、2、4 と 8 週に ED1 陽性のマクロファージによって貪食されることを示し、臨床において時に認められる関節炎の背景として不溶性のゲルの fragment に対する異物反応が示唆された。

本研究の限界として第 1 に、半月板切除して軟骨変性がまだ起こらない 1 週後から Hylan G-F 20 を注射し、その反復注射は軟骨変性を抑制した。しかし、OA モデルで多く使用されている前十字靭帯断裂モデルでは軟骨変性抑制効果があるかは施行しなかった。我々は、今後の実験において検討する必要があると考える。 第 2 に、軟骨保護効果の分子学的検討は、我々の研究では確認しなかった。軟骨変性を増悪させると考えられている滑液の炎症は、Hylan G-F 20 関節内注射によって軽減されなかった。しかし、その分子学的検討も施行していない。さらに、我々は本研究において若いラットを使用したため本研究の結果を人に適用する際には考慮しなければならない。

<結語>

Hylan G-F 20 は、ラット半月板前方 1/2 切除術後の軟骨変性を抑制した。 半月板切除術により誘発される関節滑膜炎は、Hylan G-F 20 関節内注射によって改善されなかった。また半月板再生も促進しなかった。Hylan G-F 20 の fragment が滑膜で観察された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5158　号	柳澤　克昭
論文審査担当者	主　査　大川　淳 副　査　上阪　等、淺原　弘嗣	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

変形性骨関節症に適応を持つ市販薬 hylan G-F 20（サイビスク）の効果機序について、ラット内側半月板切除モデルを用いて軟骨変性を抑制することを明らかにした論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ヒアルロン酸(hyaluronan:HA)関節内注射が軟骨変性を抑制するかに関して、いまだエビデンスが乏しい。関節症発症の要因として、機械的ストレスや炎症が誘因と考えられているが、ヒト変形性膝関節症により近い動物モデルで作用機序を研究した論文は少ない。

２）社会的意義

変形性膝関節症は、超高齢社会を迎えた我が国において 7-800 万人が罹患する普遍的な疾患であるが、すでに薬剤として認可され臨床的に汎用されているヒアルロン酸(hyaluronan:HA)の関節注射の作用機序を解明する意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

ラット両膝内側半月板前方 1/2 を切除し、1 週後から片膝に Hylan G-F20 毎週 1 回関節内注射した。切除後 2、4、8 週で、関節軟骨・滑膜を肉眼・組織学的に評価した。その結果、本動物モデルは、低侵襲で再現性よく施行できる変形性膝関節症モデルであり、的確な研究方法と判断された。スコアリングで評価した肉眼所見、組織所見とも Hylan G-F20 の毎週投与は関節軟骨変性進行を抑制した。

本研究は臨床的課題を十分に検討したうえで遂行されており、周到な準備の上に行われてきたことが窺われた。結果からみて、ヒアルロン酸(hyaluronan:HA)関節内注射が軟骨変性を抑制することが実験的にも明らかになり、臨床的にも重要な研究成果といえる。

４）考察・今後の発展性

今後生物的な効果を実証することで、さらに変形性関節症の薬物治療の進歩に寄与することが期待される。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に十分価値があると判断された。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大原　敏之
論文審査担当者	主査　淺原　弘嗣 副査　田賀　哲也、赤澤　智宏
論　文　題　目	Hypoxia enhances proliferation through increase of colony formation rate with chondrogenic potential in primary synovial mesenchymal stem cells

（論文内容の要旨）

<要約>

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells：MSCs)の中でも滑膜 MSCs は軟骨分化能が高く関節軟骨や半月板の再生医療に有用である。初代滑膜 MSCs は継代 MSCs より染色体異常が少ないなど臨床的に安全性や準備期間、コストの面から優れている。低酸素環境が MSCs の増殖能に与える影響について一定の見解はなく、初代滑膜 MSCs の報告は皆無である。我々は今回低酸素が初代ヒト滑膜 MSCs の増殖を促進するか検討するため、人工膝関節置換術を施行する患者の膝滑膜を用い、低酸素で 14 日培養した細胞と通常酸素で 14 日培養した細胞のコロニー数と細胞数、表面抗原、ミトコンドリア活性、電子顕微鏡所見、軟骨分化能について検討した。さらにディッシュへの接着能に対する低酸素の影響を評価するため最初3日間のみ低酸素培養を行った群と14日間通して通常酸素培養を行った群を比較した。最後に低酸素が接着能を除いた増殖能に与える影響を評価するため、最初 3 日間通常酸素培養を行いその後 11 日間低酸素培養を行った群と、14 日間通して通常酸素培養を行った群を比較した。低酸素は有意に細胞数とコロニー数を増加したが、1 コロニー当たりの細胞数や表面抗原、ミトコンドリア活性、細胞形態、軟骨分化には影響を与えなかった。最初 3 日間のみ低酸素培養とした群ではコロニー数、細胞数ともに差は認めなかったが、最後 11 日間を低酸素培養とした群では有意にコロニー数、細胞数ともに増加した。

低酸素環境での培養はコロニー形成率を上昇させ軟骨分化能を維持したまま細胞増殖を促進することが分かった。

<緒言>

滑膜 MSCs は高い増殖能・軟骨分化能のため、関節軟骨や半月板損傷等の再生医療における細胞の供給源として期待されている。我々はこれまでウサギとブタで滑膜 MSCs 移植が軟骨再生の促進を、ラット、ウサギ、ブタで滑膜 MSCs 移植が半月板再生の促進をすることを示してきた。さらにヒトで膝関節軟骨欠損に対し関節鏡視下自家初代滑膜 MSC 移植が臨床成績を改善することを示し、現在初代滑膜 MSCs を用いた半月板再生の臨床試験を施行している。

近年、低酸素環境での培養は細胞の増殖能を増強するとして注目を集めている。低酸素が骨髄 MSCs や脂肪組織 MSCs、臍帯 MSCs、歯髄 MSCs の増殖能を増強するという報告は散見されるが、

低酸素が MSCs の増殖能には影響を与えないという報告や、逆に増殖能を低下させるという報告も存在する。

初代 MSCs を用いるメリットとして、初代 MSCs は継代 MSCs より染色体異常が少なく臨床的に安全性の面から優れており、また十分な量の初代 MSCs を準備できれば、複数回継代した細胞の準備に比べ期間もコストも削減できる点がある。低酸素が継代滑膜 MSCs の増殖能を促進したという報告は一つだけあるが、初代滑膜 MSCs において増殖能を促進したとの報告はない。一方継代した滑膜 MSCs は一定して CD44, CD73, CD9, CD105 が高発現、CD34, CD45 が低発現なことが知られているが、滑膜から採取されたばかりの有核細胞には繊維芽細胞とマクロファージがあり、初代滑膜 MSCs は継代滑膜 MSCs より不均一であるといえる。

今回、低酸素がヒト初代滑膜 MSCs の増殖能を促進するか、低酸素が初代滑膜 MSCs の性質に何らかの影響を与えるかについて調べた。

<方法>

東京医科歯科大学倫理委員会の承認のもと、全ての患者からインフォームドコンセントを得た。ヒト滑膜は変形性膝関節症の患者 33 症例(76±9 歳)より人工膝関節置換術の際に採取された膝滑膜組織を使用した。滑膜は細かく切り刻んだのちコラゲナーゼ溶液で分解、デブリを取り除き得られた有核細胞をディッシュに播種、培養液には 10%FBS 含有αMEM を使用した。コロニー数、細胞数計測のため有核細胞は 60 ㎠ディッシュ 12 枚に 1000 細胞ずつ播種し、6 枚は 21%O2 濃度(通常酸素)のインキュベーター、残りの 6 枚は 5%O2 濃度(低酸素)のインキュベーターでそれぞれ 14 日間培養した。うち 3 枚はクリスタルバイオレット染色でコロニー数カウント、残り 3 枚は細胞数をカウントした。表面抗原解析は 14 日間通常酸素と低酸素それぞれで培養した 100,000 細胞を適切な抗体で標識後、フローサイトメトリーで CD44, CD73, CD90, CD105, CD140b, CD45 の蛍光強度計測を行った。ミトコンドリア活性評価は 10 日間それぞれの環境で培養した細胞を Mitotracker Deep Red で染色しフローサイトメトリーで蛍光強度を計測した。細胞形態は電子顕微鏡で評価を行った。軟骨分化能は各環境で 14 日間前培養した 125.000 細胞を通常酸素で 21 日間 Pellet culture を行い、湿重量とマクロ所見、切片作成した後サフラニン O 染色を行い Bern score で評価した。

<結果>

初代ヒト滑膜細胞は 14 日間通常酸素で培養後、コロニーを形成した。またコロニー形成細胞は軟骨分化、脂肪分化、骨分化を呈した。

低酸素で 14 日間培養した細胞群では 1 ディッシュ当たりのコロニー数は有意に増加した。1 ディッシュ当たりの細胞数も有意に増加した。しかし 1 コロニー当たりの細胞数では有意な差はなかった。

表面抗原解析では低酸素でも通常酸素と同様に CD44, CD73, CD90, CD105, CD140b は高発現を認め、CD45 は低発現だった。

ミトコンドリア活性の検討でも低酸素と通常酸素培養の間に明らかな差は認めなかった。

電子顕微鏡で培養後の初代滑膜 MSCs の形態を評価したが、いずれの細胞も楕円形の核と小胞

体、リボソーム、脂肪滴、ミトコンドリアからなる細胞小器官を有しており、ミトコンドリアの数や形態には明らかな違いは認めなかった。

14 日間各酸素濃度で前培養を行ったのち、軟骨分化培地で 21 日間 Pellet culture を行ったが、肉眼所見や湿重量では明らかな差はなく、Bern Score でも組織所見に明らかな差は認めなかった。

低酸素が接着能に与える影響の検討で最初3日間のみ低酸素とした群と14日間通常酸素とした群の間には、1ディッシュ当たりのコロニー数と細胞数、1コロニー当たりの細胞数に有意な差はなかった。さらに接着能の影響を除いた増殖能の検討として、最後 11 日間のみ低酸素とした群と、14 日間通して通常酸素とした群の比較を行ったところ、1ディッシュ当たりのコロニー数と細胞数は最後 11 日間のみ低酸素とした群で有意に増加していたが、1コロニー当たりの細胞数に有意な差はなかった。

＜考察＞

MSCs の定義は未だ定まっていないが、最小限の基準として 2006 年に発表された、ディッシュに接着してコロニーを形成し、3 系統に分化し、かつ特徴的な表面抗原パターンを呈することが一般に支持されている。本研究でも、滑膜由来コロニー形成細胞は適切な条件で培養することで軟骨分化や脂肪分化、石灰化することができ、CD44, CD73, CD90, CD105, CD140b は高発現、CD45 は低発現と同様のパターンを呈していた。よって我々は今回用いた細胞を MSCs とした。

低酸素環境による培養で、1ディッシュ当たりのコロニー数と細胞数は増加したが、1コロニー当たりの細胞数は変わらなかった。これは低酸素環境がコロニーを大きくするのではなく、コロニーの形成率を上げることで細胞数を増加させることを示している。次に低酸素が滑膜 MSCs のディッシュへの接着に与える影響を調べるため、接着が行われる最初の 3 日間のみ低酸素環境で培養を行った。その結果、最初 3 日間のみの低酸素培養では、コロニー形成率は変わらなかった。さらに細胞接着の影響を除外して細胞の増殖能を調べるため、最初 3 日間はどちらも通常酸素、最後 11 日間を一方は低酸素培養、もう一方は通常酸素培養として比較した。最後 11 日間を低酸素として培養した群は、有意に 1ディッシュ当たりのコロニー数と細胞数が多かった。以上より、低酸素環境は細胞接着に影響は与えず、接着した細胞のコロニー形成率を上昇させることで細胞数を増やしていることが分かった。

低酸素環境によって初代滑膜 MSCs の表面抗原の発現に明らかな変化は認めなかった。本結果はこれまでに報告されていた臍帯や脂肪組織、骨髄由来ＭＳＣｓに関するものと同様であるが、低酸素が継代した骨髄 MSCs の CD90 発現を低下させるという報告もあった。我々は先の研究で CD90 発現は滑膜 MSCs の軟骨分化能と相関すると報告しており、本研究で低酸素培養により CD90 陽性率は必ずしも低下しておらず、軟骨分化能が低下していなかったこととも相違しない。

低酸素が骨髄由来 MSCs のミトコンドリア活性を低下させるとする報告は散見されるが、本研究では低酸素は滑膜 MSCs のミトコンドリア活性に影響を与えなかった。本研究との違いは、殆どの報告で MSCs は複数継代低酸素に晒されていたことから初代 MSCs と継代 MSCs との違いや、滑膜と骨髄など組織の違い、低酸素への暴露時間の違いなどから生じている可能性が考えられた。

低酸素が軟骨分化に与える影響について、骨髄や脂肪組織、滑膜由来 MSCs の軟骨分化を促進するという報告がある一方、骨髄、滑膜由来には影響を与えないとする報告もある。滑膜 MSCs

の軟骨分化と低酸素について述べた論文としては、P7 ヒト胎児滑膜 MSCs において Sox9 と Col2 の mRNA 発現が強くなったとするものや、P4 ブタ滑膜 MSCs で軟骨分化能は変わらないとした報告がある。本研究は初代ヒト滑膜 MSCs の軟骨分化に対する低酸素の影響について述べた最初の報告であり、今後関節軟骨や半月板再生の臨床応用に重要となると考える。

低酸素とコロニー形成能についての報告として、Lennon らは低酸素が初代骨髄 MSCs のコロニー形成率を上げると報告した。初代滑膜 MSCs で、我々は初めてコロニー形成率が低酸素により上がることを示した。初代滑膜 MSCs のコロニー形成率がなぜ低酸素で上がるのかまで本研究では明確にできなかったが、先の報告から低酸素が G2/S/M 期の細胞を増やすことや、血漿中の成長因子に対する感受性を増加させることが予想された。

<結語>

低酸素培養は初代ヒト滑膜MSCsの軟骨分化能を維持してコロニー形成率を上昇させ増殖を促進することが分かった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5159　号	大原　敏之
論文審査担当者	主　査　淺原　弘嗣 副　査　田賀　哲也、赤澤　智宏	

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells : MSCs)の中でも滑膜 MSCs は軟骨分化能が高く関節軟骨や半月板の再生医療に有用である。初代滑膜 MSCs は継代 MSCs より染色体異常が少ないなど臨床的に安全性や準備期間、コストの面から優れている。低酸素環境が MSCs の増殖能に与える影響について一定の見解はなく、初代滑膜 MSCs の報告は皆無である。我々は今回低酸素が初代ヒト滑膜 MSCs の増殖を促進するか検討するため、人工膝関節置換術を施行する患者の膝滑膜を用い、低酸素で 14 日培養した細胞と通常酸素で 14 日培養した細胞のコロニー数と細胞数、表面抗原、ミトコンドリア活性、電子顕微鏡所見、軟骨分化能について検討した。さらにディッシュへの接着能に対する低酸素の影響を評価するため最初 3 日間のみ低酸素培養を行った群と 14 日間通して通常酸素培養を行った群を比較した。最後に低酸素が接着能を除いた増殖能に与える影響を評価するため、最初 3 日間通常酸素培養を行いその後 11 日間低酸素培養を行った群と、14 日間通して通常酸素培養を行った群を比較した。低酸素は有意に細胞数とコロニー数を増加したが、1 コロニー当たりの細胞数や表面抗原、ミトコンドリア活性、細胞形態、軟骨分化には影響を与えなかった。最初 3 日間のみ低酸素培養とした群ではコロニー数、細胞数ともに差は認めなかったが、最後 11 日間を低酸素培養とした群では有意にコロニー数、細胞数ともに増加した。

低酸素環境での培養はコロニー形成率を上昇させ軟骨分化能を維持したまま細胞増殖を促進することが分かった。

2.　論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

近年、低酸素環境での培養は細胞の増殖能を増強するとして注目を集めており、低酸素が骨髄 MSCs や脂肪組織 MSCs、臍帯 MSCs、歯髄 MSCs の増殖能を増強するという報告は散見されるが、まだ結論には至っていない。今回、低酸素がヒト初代滑膜 MSCs の増殖能を促進するか、低酸素が初代滑膜 MSCs の性質に何らかの影響を与えるかについて調べて、十分な成果を上げている。

２）社会的意義

間葉系幹細胞を用いた臨床研究は本学において世界をリードして行われており、その基礎研究として意義深いものである。

３）研究方法・倫理観

間葉系細胞の分化系を用いた分子生物学的および発生学的な解析は、現在求められる研究レベルとして必要かつ十分なレベルであると考えられる。また動物倫理的にも十分な配慮がなされている。

3.　考察・今後の発展性

本研究での知見が、医学に資することは明らかであり、その応用や方向性においては、より深い洞察が求められる。本人は現在、海外の研究室において研究を展開しており、今後更なる研究の発展が期待される。

4.　その他

審査発表において、研究背景のさらに深い理解を今後の課題とされた。

5.　審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	中田　徹
論文審査担当者	主査　田賀　哲也 副査　樗木　俊聡、東田　修二
論　文　題　目	Indispensable role of Notch ligand-dependent signaling in the proliferation and stem cell niche maintenance of APC-deficient intestinal tumors

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

腸上皮の恒常性維持には Dll1 及び Dll4 分子による Notch シグナルの活性化が重要な役割を担っている。一方、消化管腫瘍は腸上皮幹細胞を起源として発生し、その増殖・維持に於いても Notch シグナルの活性化が重要である事が知られているが、同腫瘍組織における Notch リガンド分子の発現やその機能的な役割については全く明らかとなっていない。本研究ではまずマウス腸上皮幹細胞における APC 変異により発生する腫瘍において発現する Notch リガンドの同定を行い、次にその分子を欠損させた場合におこる腫瘍の細胞構築の変化と増殖について解析した。具体的には腸上皮幹細胞特異的に CreERT を発現するマウスと $APC^{fl/fl}$ マウスを交配することにより、Tamoxifen（TX）誘導性の消化管腫瘍モデルを作製した(LGR5-Cre; $APC^{fl/fl}$ マウス)。TX 誘導後 21 日目に腸管組織の解析を行ったところ、小腸および大腸に LGR5 陽性細胞及び Lysozyme 陽性細胞で構築される腫瘍の発生を認めた。同腫瘍の組織学的解析の結果、1) LGR5 陽性細胞に一致して Hes1・Ki67 の発現を認め、2) Dll1, Dll4 と比較し、Jag1 の発現頻度が高い、ことが判明した。そこで Jag1 欠損腫瘍について解析するために LGR5-Cre; $Jag1^{fl/fl}$; $APC^{fl/fl}$ マウスを作製し、組織学的解析を行った。非欠損時と比較し腫瘍組織内の Hes1 及び Ki67 の発現が著明に低下した。また同腫瘍において、LGR5 陽性細胞の減少、Lysozyme 陽性細胞の著明な増加をきたすことも分かった。一方 Notch canonical pathway の主要転写因子である RBPJ を欠損したマウス（LGR5-Cre; $RBPJ^{fl/fl}$; $APC^{fl/fl}$）においては、RBPJ 非欠損時の腫瘍と表現型に変化を認めなかった。以上より腸管腫瘍の幹細胞ニッチおよび増殖には Notch リガンドを介する RBPJ 非依存性の Notch シグナルの活性化が重要であることが明らかとなった。

＜緒言＞

腸上皮は 3−4 日という非常に短期間で再生を繰り返すダイナミックな組織であり、その原動力が陰窩底部に存在する LGR5 陽性幹細胞である。正常腸管幹細胞の維持には幹細胞と隣接する Paneth 細胞からの Wnt シグナル、Notch シグナル、EGF シグナルや間質からの BMP シグナルなどが重要である。一方 LGR5 陽性幹細胞特異的に APC 変異をきたして発生する腫瘍においても、正常腸管と同様に LGR5 陽性腫瘍と Lysozyme 陽性細胞とが互い違いに隣接することでニッ

チを構成し、腫瘍増殖が維持されることが近年報告された。しかし腫瘍において Lysozyme 陽性細胞が出現するメカニズムについてはよく分かっていない。Notch シグナルは幹細胞維持に欠かせないシグナルであり、様々な種で広く保存されている機構である。Notch シグナルが、正常腸管における幹細胞維持および前駆細胞の運命決定に重要な役割を果たしていること、リガンド分子としては Dll1 と Dll4 の両方が恒常性維持に重要であること、腸炎により損傷した粘膜の再生に重要であることが知られている。また腸管腫瘍においては、恒常的な Notch 活性化が腫瘍増殖を促進すること、Notch 阻害剤(DBZ)により APC^{min} マウスに発生する腫瘍のごく一部で増殖低下および分泌系細胞への形質転換が起こること、APC^{min} 腫瘍において Jag1 をヘテロ欠損した腫瘍ではやや増殖が低下すること、Villin-CreERT マウスにおける APC 変異腫瘍において Notch canonical 経路の重要な転写因子である RBPJ を欠損させても腫瘍増殖に変化がないことなどが報告されている。しかしながら、APC 変異腫瘍に発現している Notch リガンド分子やその機能についてはその詳細は明らかとされていない。本研究では LGR5-Cre マウスを使用し、APC 変異腫瘍組織において発現している Notch リガンドを同定し、**腸管腫瘍の幹細胞ニッチの形成および増殖において** Notch リガンドを介した非 RBPJ 依存的経路（Notch non-canonical pathway）が重要であることを明らかにした。

＜方法＞

腸管幹細胞特異的に APC を欠損したマウスを作製するために、(1) LGR5-CreERT マウス, (2) APC-flox14 マウス, (3) ROSA26-LACZ マウス, (4) ROSA26-tdTomato マウスを用意した。(1), (2), (3) あるいは(1), (2), (4)を掛け合わせて LGR5-Cre; $APC^{fl/fl}$ マウスを作製した。TX 2mg を 5 日間腹腔内投与し、誘導後 21 日目の小腸と大腸腫瘍を組織免疫染色にて解析した。同様に腸管腫瘍幹細胞特異的に Notch シグナルを欠損した場合の影響を解析するために LGR5-Cre; $APC^{fl/fl}$ マウスに Jag1-floxed マウスあるいは RBPJ-floxed マウスを交配したマウスも作製し同様に小腸・大腸腫瘍を組織免疫染色にて解析した。また LGR5-Cre; $APC^{fl/fl}$ マウスの大腸腫瘍から腫瘍オルガノイドを樹立し、腫瘍オルガノイドにおける Notch リガンドの発現について定量 PCR を用いて評価した。Notch 阻害における腫瘍増殖への影響を解析するために、腫瘍オルガノイドを single cell 化した後、DBZ を投与し、オルガノイドの増殖および遺伝子発現変化について増殖アッセイおよび半定量 PCR にて評価した。

＜結果＞

まず LGR5-Cre; $APC^{fl/fl}$ マウスの腸管腫瘍について解析を行った。TX 誘導にて小腸および大腸に LGR5 陽性細胞と Lysozyme 陽性細胞から構成される腫瘍が形成された。同腫瘍の組織学的解析の結果、1) LGR5 陽性細胞に一致して Hes1、Ki67 の発現を認め、2) Dll1、Dll4 と比較し、Jag1 の発現頻度が高いことが判明した。以上より腸管腫瘍幹細胞において Notch シグナルが活性化していることが分かった。Notch シグナルを阻害した場合の腫瘍増殖への影響を解析するため、LGR5-Cre; $APC^{fl/fl}$ マウスの大腸腫瘍より、腫瘍オルガノイドを樹立した。腫瘍オルガノイドにおける Notch リガンドの発現について定量 PCR を行ったところ、Jag1 が Dll1, Dll4 に比べて有意に発現が高いことが確かめられた。次にオルガノイドを単一細胞レベルにまで分散し、翌

日に DBZ1μM あるいは DMSO を投与し Day6 まで培養した。Day6 に各オルガノイドを回収し、遺伝子発現の変化について半定量 PCR にて解析を行った。その結果、DBZ 投与群では、幹細胞マーカー(LGR5, Ascl2)の発現は維持されるが、Hes1 の発現が著明に低下し、Atoh1 と Lysozyme の発現が著明に上昇することがわかった。また DBZ 投与群では、Day4 以降オルガノイドのサイズが有意に小さくなり細胞増殖も抑制されることが分かった。以上より APC 変異腫瘍では、S3 cleavage 以下の Notch シグナルを遮断すると Lysozyme 陽性細胞などの分泌系細胞への分化が促進され、腫瘍の増殖が低下することが示唆された。

そこで Notch canonical pathway の重要な転写因子である RBPJ を欠損した腸管腫瘍を解析することとした。結果、RBPJ 欠損腫瘍は非欠損時と比較し、腫瘍組織内の Hes1、Ki67 の発現に差がなく、既報と同様の結果となった。一方、Jag1 欠損腫瘍においては、腫瘍の形成は認めるものの非欠損時と比較し腫瘍組織内の Hes1 及び Ki67 の発現が著明に低下した。また LGR5 陽性細胞の減少、Lysozyme 陽性細胞の著明な増加をきたし腫瘍ニッチの形成が障害されていた。

＜考察＞

正常腸管では Dll1 と Dll4 の両方が恒常性の維持に重要であるが、APC 変異腸管腫瘍では、Jag1 の単独リガンド欠損により、腫瘍増殖の低下、Hes1 の発現低下をきたすことが分かった。腫瘍においては Notch リガンドの依存度が高く、腫瘍の発生初期の段階では、Notch リガンドを介した持続的な刺激が腫瘍幹細胞ニッチの維持および増殖に必要である可能性が考えられる。RBPJ 欠損腫瘍では非欠損時と腫瘍に変化をみとめなかったことから、腫瘍における Notch 活性化の機構は、RBPJ を介さない Notch リガンド依存的な経路(Notch non-canonical pathway あるいは非 Notch シグナル経路)によるものである可能性が考えられた。APC 変異腫瘍を治療する上で、Jag1 などの Notch リガンドや non-canonical pathway の下流が有望な標的分子となりうると考えられる。

＜結論＞

腸管腫瘍における幹細胞ニッチおよび増殖維持において、Notch リガンドを介した non-canonical pathway が重要な機能的役割を担っている。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5160　号	中田　徹
論文審査担当者	主　査　田賀　哲也 副　査　樗木　俊聡、東田　修二	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、腸管幹細胞特異的に Cre リコンビナーゼを働かせ APC 遺伝子を欠失変異させて発生する腸管腫瘍モデルマウスを用いて、腸管腫瘍幹細胞の維持に必要な微小環境（ニッチ）因子として、Notch リガンドが重要な役割を担っていることを報告するとともに、その臨床的意義を論じたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

APC 遺伝子変異腸管腫瘍の病態解明についてモデルマウスを駆使して取り組み、腸管腫瘍幹細胞のニッチ因子として Notch リガンド Jag1 の重要性を明らかにした点で、本研究の目的は先駆性・独創性のいずれにおいても高い。

２）社会的意義

モデルマウスを用いて腸管腫瘍幹細胞維持における Notch シグナルの重要性を明らかにしたことは、分子標的治療法の開発につながるものであり、社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

モデルマウスを適切に用い、また、倫理的は考察もなされている。

４）考察・今後の発展性

本論文は今後の臨床応用についてもその開発的研究へ展開できる可能性を示唆するものであり、今後の発展が期待される。

３．審査結果

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	平野　史生
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　大川　淳、安原　眞人
論　文　題　目	Achieving simplified disease activity index remission in patients with active rheumatoid arthritis is associated with subsequent good functional and structural outcomes in a real-world clinical setting under a treat-to-target strategy

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Treat-to-target（T2T：目標に向けた治療）は定期的な疾患活動性の評価を行い、臨床的寛解を達成するよう治療を最適化する関節リウマチ（RA）の治療戦略である。Simplified disease activity index (SDAI）は T2T で用いられる疾患活動性の指標の一つであるが、T2T 実施コホートにおいて SDAI による寛解が、良好な構造的、機能的アウトカムの予測因子であるかは証明されていない。我々は中等度～高疾患活動性の RA 患者を対象に、T2T 治療戦略を 72 週間実施し、Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI) による機能的アウトカムの評価、van der Heijde-modified total Sharp score (vdH-mTSS）による構造的アウトカムの評価を行った。多重代入法を用いた多変量ロジスティック解析を行い、24 週時の SDAI 寛解が 72 週時の良好な機能的アウトカム（HAQ 寛解；HAQ-DI≦0.5)、良好な構造的アウトカム(ΔvdH-mTSS＜smallest detectable change）の独立した予測因子であることを示した。

＜緒言＞

関節の炎症を抑制し、関節構造変化、身体機能の低下を防ぐという RA 治療の目標達成のため、治療薬の開発だけでなく、治療戦略にも進歩が見られている。RA 専門家で構成された国際的なタスクフォースにより発表された T2T (目標に向けた治療) はこの中でも特に重要な戦略である。T2T は定期的な疾患活動性の評価を行い、臨床的寛解の達成を目指して治療を最適化する戦略である。T2T で推奨されている疾患活動性の指標はいくつかあるが、その一つとして simplified disease activity index (SDAI）が挙げられる。SDAI による寛解（SDAI 寛解）の定義（SDAI≦3.3）は RA 患者集団の経時的データを用いて、良好なアウトカムと関連する閾値として設定された。SDAI 寛解と良好なアウトカムの関連は、RA 治療薬の臨床試験やその他のコホート研究のデータを用いても同様に示された。しかし、臨床試験の対象患者は高度に選択された集団であり、またこれらのコホート研究は T2T 発表前にデータが収集され、T2T は実施されていなかった。T2T がすでに広く浸透した現在の実臨床の状況において、良好なアウトカムに対する SDAI 寛解の予測能の一般化可能性を示すには、 T2T 実施コホートのデータを解析する必要がある。

＜方法＞

この研究は多施設共同の前向きコホート研究である。以下の組み入れ基準を満たす活動性 RA 患者のうち、従来型の疾患修飾性抗リウマチ薬（csDMARDs）の開始、追加、変更のいずれか、あるいは生物学的製剤開始により治療強化する症例を対象とした。組み入れ基準は以下の通りである；(1) 20 歳以上、(2) 2010 年米国リウマチ学会／欧州リウマチ学会による関節リウマチ分類基準満たす、(3) SDAI もしくは clinical disease activity index (CDAI) による中等度疾患活動性以上、(4) 2 ヵ所以上の腫脹関節かつ 2 ヵ所以上の圧痛関節を有する、(5) 生物学的製剤の使用歴がない、(6) 書面によるインフォームドコンセントが得られる患者。これらを満たす患者を対象に 12 週毎に SDAI もしくは CDAI による疾患活動性評価を行い、SDAI、CDAI いずれかによる寛解（それぞれ≦3.3、≦2.8）もしくは低疾患活動性（それぞれ≦11、≦10）を目標とする治療を行った。治療内容については規定しないが、主治医は「12 週毎に治療目標が達成されているか」、「非達成の場合は治療を強化したか」に回答し、治療目標が非達成でありながら治療を強化していない場合はその理由を記載した。登録時から 24 週毎に手足の単純レントゲンを撮像し、vdH-mTSS に基づき、2 名の評価者により構造的変化をスコア化した。身体機能は HAQ-DI により、12 週毎に評価を行った。統計解析は R version 3.0.3 を用いて行った。多変量ロジスティック回帰分析により 24 週時の SDAI 寛解と、良好な機能的アウトカム（72 週時 HAQ 寛解(HAQ-DI ≦0.5)）、および良好な構造的アウトカム（Δ vdH-mTSS(登録時から 72 週時までの vdH-mTSS の変化)＜smallest detectable change(SDC)）との関連を調べた。欠損値は多重代入法により補完し、解析、結果の統合を行った。共変量は単変量ロジスティック回帰分析の結果に基づき候補を選定し、さらに多重代入法の過程で生成した 5 つのデータセットを用いた多変量ロジスティック回帰分析によって決定した。多重検定における有意水準については Benjamini-Hochberg 法により False Discovery Rate を制御した。

＜結果＞

318 例の登録症例中、72 週までフォローできたのは 271 例であった。解析はこの 271 例を対象とした。24 週時では 34%、72 週時では 51%が SDAI 寛解を達成した。登録時 28%が HAQ-DI ≦0.5 であったが、72 週時では 62%が HAQ-DI≦0.5 であった。72 週時Δ vdH-mTSS が評価できた 264 例の SDC は 2.98 であり、264 例中 205 例（78%）がΔ vdH-mTSS＜SDC であった。多変量ロジスティック回帰分析の結果、72 週時 HAQ 寛解の有意な予測因子[オッズ比(95%信頼区間), P 値]は 24 週時 SDAI 寛解[2.99(1.42-6.28), P=0.004]、登録時 HAQ-DI[0.28(0.18-0.45), $P=1.3\times10^{-7}$]、登録時 vdH-mTSS[0.986(0.976-0.996), P=0.009]であった。72 週時Δ vdH-mTSS ＜SDC の有意な予測因子は 24 週時 SDAI 寛解[3.53(1.62-7.71), P=0.002]であった。

＜考察＞

我々は T2T 実施コホートにおいて、治療強化 24 週時に 34%の患者が SDAI 寛解を達成し、24 週時の SDAI 寛解が 72 週時の良好な機能的、構造的アウトカムの独立した予測因子であることを示した。これまで主に臨床試験あるいは T2T 発表前のコホート研究で示されてきた SDAI 寛解と良好なアウトカムの関連性を、T2T 実施コホートにおいて初めて示した研究である。

SDAI 寛解と良好なアウトカムの関連性を示したいくつかの観察研究のうち、交絡因子を考慮した解析を行っているのは Ruyssen-Witrand らのみである。我々は多変量ロジスティック回帰分析により、交絡因子を調整した解析を行った。さらに多重代入法を用いて欠損値を補完することにより、収集したデータを最大限利用することができた。

T2T では症例によって、低疾患活動性を治療目標にしてもよいとしている。我々は SDAI 寛解のかわりに SDAI による低疾患活動性とアウトカムの関連を調べる解析も行った（論文の Supplementary table 3, 4 参照）。これらの解析において、SDAI 寛解の方が低疾患活動性よりも良好なアウトカムを達成するオッズ比の点推定値が大きく、より優れた予測因子であることが示唆された。このことは、臨床的寛解が低疾患活動性よりも優れたアウトカムと関連することを示した既報の結果とも一致する。T2T の根拠となっている臨床試験は低疾患活動性を目標とした治療戦略の通常治療に対する優越性を示してはいるが、機能的、構造的アウトカムにおいても優越性を示した試験は少数である。機能的、構造的アウトカムの観点から、特に低疾患活動性との比較における寛解の有用性はさらなる研究にて検討されるべきである。

＜結論＞

T2T 実施コホートにおいて、治療強化後 24 週時の SDAI 寛解は 72 週時の良好な機能的、構造的アウトカムの独立した予測因子であった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5161　号	平野　史生

論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　大川　淳、安原　眞人

【論文審査の要旨】

１．論文内容

Treat-to-target（T2T：目標に向けた治療）は定期的な疾患活動性の評価を行い、臨床的寛解を達成するよう治療を最適化する関節リウマチ（RA）の治療戦略だが、本研究ではこれまでその有用性を証明されていなかった Simplified disease activity index (SDAI) を評価法に用いた T2T 実施コホートにおいて、SDAI による 24 週時の SDAI 寛解が 72 週時の良好な機能的アウトカムと良好な構造的アウトカムの独立した予測因子であることを示した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究は疾患活動性の指標の一つである SDAI を用い、T2T 実施コホートにおいて SDAI による寛解が、一般的なコホートにおいて RA の良好な構造的、機能的アウトカムの予測因子であることを証明することを目的とした前向き研究を行うことは、今後の RA 治療の向上を目指すうえで重要であり、独創的、先駆的な研究である。

２）社会的意義

SDAI がこれまで証明されていない一般コホートに対しても良好な構造的、機能的アウトカムの予測因子であることを証明したことは、今後 SDAI を評価法として用いた T2T を RA 治療で広める臨床科学的な基盤となる研究として社会的な意義がある。

３）研究方法・倫理観

RA の治療の開始にあたって、倫理的に考慮されたコホートを用いて、倫理審査を経たのちに、患者に十分にその意義を説明し、ヘルシンキ宣言を尊重してすすめられた。保存治療の選択も T2T の概念に基づいて、治療担当者が最適と判断した市販薬を選択して進められた。

４）考察・今後の発展性

本論文の目的は RA における T2T 治療法に基づいて、一般的なコホートで SDAI が良好な構造的、機能的アウトカムの予測因子であることが分かったが、治療開始後 24 週までに臨床的寛解の方法については別の考察が必要である。本研究では 24 週で 70%の患者に寛解が得られているが、この寛解到達割合は通常の治療成績よりもはるかに優れ、本コホートの治療内容を検討して

より良い治療法を検討する必要がある。また本研究では T2T 治療がこれまでの治療法に比して優れていることを証明しているわけではなく、今後日本でのその点の検討も必要である。

３．その他

申請者は RA における全般的な臨床的問題をよく理解していた。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	中山　菜央
論文審査担当者	主査　三宅　智 副査　森尾　友宏、田上　美千佳
論　文　題　目	Factors associated with posttraumatic growth among parents of children with cancer

＜要旨＞

[目的] 小児がん患者の親に心理的なつらさがあることが報告されているが、一方で、心的外傷後成長(posttraumatic growth, PTG) を経験することが報告されている。本研究では、治療中と治療後の小児がん患者の親の PTG に関連する要因を検討することを目的とした。

[方法] 小児がん患者の親を対象とし自己記入式質問紙を用いた調査を行った。最終的には 119 名の小児がん患者の親（母親 71 名、父親 48 名）を分析対象者とした。質問紙は Posttraumatic Growth Inventory (PTGI), Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D), State-Trait Anxiety Inventory (STAI), Impact of Event Scale-Revised (IES-R) を用いた。人口統計学的データと子どもの臨床的データも収集した。重回帰分析を用いて PTG に関連する要因の検討が行われた。

[結果] 参加者の平均年齢は 41.4 ± 6 歳であった。小児がん患者の親のより高い PTG と関連がみられた要因は、親のより低い特性不安、親の性別（女性）、子どもの治療状況（治療中と比較して治療後 12 か月以内）、手術を経験している、晩期合併症がある、であった。

[結論] 小児がん患者の親の PTG には、子どもの臨床的特徴や、親の性別や不安が関連していた。小児がん患者の親の PTG を扱う際には、親の心理的特徴や、子どもの臨床的特徴を考慮する必要があることが示唆された。特に、特性不安の高い親に対しては、PTG を扱う前に不安に対処することが大切であることが示唆された。

＜緒言＞

子どもが小児がんに罹ることは両親にとってショックで混乱する出来事であり、小児がんの治療状況に応じて様々なストレスがある。小児がん患者の親には、抑うつや不安などが見られることが報告されている。また、親のうける精神的負担は大きく、それらが心的外傷後ストレス症状(posttraumatic stress symptoms, PTSS)として現れることが報告されている。一方で、子どもが小児がんになった経験から、心的外傷後成長(posttraumatic growth, PTG) として知られている、精神的な成長がみられることがある。PTG は非常に困難な出来事をきっかけとして苦しみもがく中から経験される心理的な成長のことであり、様々な困難な体験をした人々から報告されている。先行研究では、がん患者における PTG と心理的な適応との間に関係があることが示されている。

したがって、小児がん患者の親の PTG の関連要因について検討し理解することは、親の適応に役立つのではないかと考えられる。

小児がん患者の親の PTG の関連要因を探る量的な横断研究がいくつかみられるが、それらは、治療中の子どもの親のみを対象としているものや、治療後の子どもの親のみを対象としている研究であり、治療中と治療後の親を含めたうえで、PTG の関連要因を探る研究がみられない。また、PTG と治療状況（治療中、治療後）との関連は十分に検討されていない。したがって、本研究では治療中と治療後の小児がん患者の親を対象として、子どもの治療状況や、親の PTSS、抑うつ、不安を含めて PTG の関連要因を探ることを目的とした。

＜方法＞

本研究は、1 施設における横断的な質問紙調査である。対象者は東京都立小児総合医療センター血液・腫瘍科の小児がん患者の親で、調査協力について同意の得られた親を対象とした。適格基準は、①2 歳から 18 歳の小児がんと診断されている子どもの親、②子どもが小児がんであることが告知されている親、③研究協力について同意が得られた親である。除外基準は、①当該調査に耐え得る精神的、身体的状態にない親、②重篤な認知障害を有する親、③担当医師が本調査への参加が適切でないと判断した親である。調査は倫理委員会の承認後、2012 年 9 月～2013 年 1 月に行われた。

質問紙は、PTG については Posttraumatic Growth Inventory (PTGI)、抑うつについては Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D)、不安については State-Trait Anxiety Inventory (STAI)、PTSS については Impact of Event Scale-Revised (IES-R)の日本語版をそれぞれ使用した。人口統計学的データと子どもの臨床的データも収集した。子どもの治療状況に関しては治療中、治療後 12 か月以内、治療後 13 か月以上の 3 群に分けた。なお、治療後に関しては、先行研究を参考にして分類した。単回帰分析、重回帰分析を用いて小児がん患者の親の PTG に関連する要因の検討を行った。

＜結果＞

270 名の親に質問紙を配布し、最終的に 119 名の親(母親 71 名、父親 48 名）が分析対象者となった。親の平均年齢は 41.4 ± 6 歳であり、子どもの平均年齢は 9.4 ± 4.8 歳であった。子どもの治療状況は、39 名(32.8%)が治療中、16 名(13.4%)が治療後 12 か月以内、そして 64 名(53.8%)が治療後 13 ヶ月以上であった。親の PTGI の平均点は 53.9 ± 23.1 点であった。重回帰分析の結果、親の特性不安がより低いこと、親の性別（女性）、子どもの治療状況（治療中と比較して、治療後 12 か月以内）、手術あり、晩期合併症ありが統計学的に有意に親の PTGI と関連していた($F = 3.543$, $p < 0.001$, adjusted $R^2 = 0.205$)。

＜考察＞

本研究の特筆すべき点は、子どもの治療状況や親の抑うつ、不安、PTSS を検討要因に含めて、治療中と治療後の小児がん患者の親の PTG に関連する要因を探った点である。

特性不安の高い人は、様々な場面で不安になりやすいと言われており、また、不安な気分状態

では脅威刺激に注意が向きやすいと言われている。小児がんにおいては不安になりやすい場面が多いため、特性不安の高い親は様々な脅威刺激に注意が向きやすくなる可能性があり、さらに広い範囲の刺激を脅威的と感じていることが推測される。それゆえに、彼らは慢性的に不安を感じている可能性があり、その不安が PTG 生起につながる認知的プロセスに抑制的に働き PTG の生起を妨げているのではないかと推測される。医療従事者は親が不安を表出しやすい環境を作ったり、親に適切で十分な情報を提供することが必要であろう。今後は、不安と PTG の関係において因果関係等の存在を検証するためにも、縦断的な研究が必要である。

母親であることが PTG と関係していた。小児がんにおいては、父親と比較して母親が子どもの診察や治療に付き添うことが多く、様々なトラウマティックな場面に遭遇していることが予想される。したがって、母親がより PTG を経験しやすいことが推測される。また、女性は言語的な表出をより使用すると言われており、他者からのサポートを受けやすいことが推測される。PTG モデルによると、他者からのサポートは PTG の生起に影響を及ぼすといわれており、従って、女性と PTG が関連していたと推測される。

治療状況では、治療後 12 か月以内が治療中と比較して PTG と関連がみられた。治療後 12 か月以内は診断や治療が終了し、トラウマティックな出来事から心理的に幾分かの距離があり、心理的なバランスをとりもどしつつある時期であることが推測される。したがってこの時期は、トラウマティックな出来事について能動的に思いを巡らせることが比較的可能であることが考えられ、PTG 生起に関連があるといわれている起こった出来事から意味を見出そうとするタイプの意図的な反すうが発達しやすい時期であることが考えられる。

手術を経験していることと PTG との関連が示された。手術は、ある一時点での大きなストレスであり、それを乗り越える経験が PTG を予測するのではないかと推測される。手術は、両親との分離、痛みや麻酔などがあり、子どもにとっては恐怖の体験となり、その子どもに付き添う親にとっても大きなストレスとなり得るため、PTG 生起へとつながっていることが推測される。今後は、手術とそれ以外の治療法との負担度の違いについても検討する必要がある。

晩期合併症があることが PTG と関連していた。晩期合併症の治療は、がんの診断や治療よりも衝撃の度合いは低いかもしれないが、がんの経験を呼び起こし感情に影響を与える可能性があり、それが PTG 生起へとつながっていることが推測される。本研究では、晩期合併症のある子どもの数が少なかったため、サンプル数を増やして引き続き件討する必要がある。

本研究の限界について述べる。一番目に、 横断的研究であるため、因果関係については言及できない。二番目に、サンプルサイズが比較的小さい。したがって今後はより大きいサンプルでの縦断的研究が必要である。三番目に、選択バイアスがある可能性がある。子どもの年齢範囲は広く乳児が含まれていない、参加者と非参加者のデモグラフィックデータや医療情報を比較することができなかった、血液性のがんの子どもの割合が日本の小児がんの分布と比較すると多かった、そして、晩期合併症のある子どもの数が先行研究に比べ少なかったなどが挙げられる。したがって、本研究結果を解釈する際にはこれらの要因を注意深く検討する必要がある。四番目に、本調査は日本の一施設のみで行われているため、施設バイアスや文化的なバイアスも関係しているかもしれない。

＜臨床的示唆＞

小児がん患者の親の PTG には子どもの治療状況や親の特徴などの要素が関与していることが示された。このことから、小児がん患者の親の PTG を扱う際には、医療従事者はそれぞれの状況に応じて柔軟に対応する必要性が示唆される。特に、特性不安の高い親には、まず不安を和らげることが重要である。これらの示唆は小児がん患者の親のケア方法を考案する上で、大切な点であると考えられる。

＜結論＞

小児がん患者の親の PTG には、親の特性不安がより低いこと、親の性別（女性）、子どもの治療状況（治療中と比較して治療後 12 か月以内）、手術、そして晩期合併症が関連していることが示された。小児がん患者の親の PTG を扱う際には、親の特徴と子どもの臨床的特徴を視野にいれる必要性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5162　号	中山　菜央
論文審査担当者	主　査　三宅　智 副　査　森尾　友宏、田上　美千佳	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本研究は、小児がん患者の親の心的外傷後成長(posttraumatic growth, PTG) をもたらす要因として、親のより低い特性不安、親の性別（女性）、子どもの治療状況（治療中と比較して治療後 12 か月以内）、手術を経験している、合併症があることを明らかにしたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

小児がん患者の親には心理的なつらさがあるが、一方では、PTG も経験することが報告されていた。しかし、PTG をもたらす要因については不明な点が多く、本研究では自己記入式質問紙を用いた調査によって、その要因を明らかにした。

２）社会的意義

小児がん患者の親の PTG を扱う際には、親の心理的特徴や、子どもの臨床的特徴を考慮する必要があることが示唆された。特に、特性不安の高い親に対しては、PTG を扱う前に不安に対処することが重要であると考えられる。

３）研究方法・倫理観

119 名の小児がん患者の親を対象に、患者背景および質問紙法による調査を行った研究であり、統計学的解析法、倫理的配慮についても十分検討されている。

４）考察・今後の発展性

今回の研究では、主に血液疾患の患児の親が対象であったが、今後は多施設、様々ながん腫での検討や親の高い PTG が患児に及ぼす影響など、今後の発展が望まれる。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

以上を踏まえ、申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐々木　真理
論文審査担当者	主査　西村　栄美 副査　横関　博雄、藤井　靖久
論　文　題　目	Sulforaphane promotes murine hair growth by accelerating the degradation of dihydrotestosterone

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ジヒドロテストステロン（DHT）はヒトの頭頂部の毛包を後退させ、男性型脱毛をひきおこす。スルフォラファンは、は 3α-HSD など、DHT 分解酵素の発現を増加させるため男性型脱毛を改善する可能性がある。スルフォラファンの毛髪の成長への影響を確認するため、ob/ob マウスにスルフォラファン 10mg/kg を 6 週間腹腔内投与し DMSO を投与したコントロール群と比較した。さらに 3α-HSD である aldo-keto reductase1c21 と dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 の発現を in vitro, in vivo 両方で確認した。スルフォラファンは ob/ob マウスにおいて有意に毛髪の発育を促進させた。またスルフォラファンを投与したマウスでは、血漿テストステロンと DHT 濃度がコントロール群と比較して低下していた。スルフォラファンは ob/ob マウスの肝臓および培養マウス肝細胞 Hepa1c1c7 細胞の aldo-keto reductase1c21 と dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 のmRNA とタンパク量を増加させた。

これらの結果から、スルフォラファンは肝臓での 3α-HSD の発現を増加させ DHT の分解を亢進させることにより、DHT による毛髪成長の抑制を阻止する可能性が示唆された。

<諸言>

DHT は、もっとも一般的な毛髪の喪失である男性型脱毛（Androgenetic alopecia）において重要な役割をもつ。DHT は毛包のアンドロゲン受容体に作用し、成長期を短縮し、休止期を延長することで、未熟な毛髪を増加させ、新しい毛髪を減少させる。

近年では、テストステロンを DHT への変換を抑制する 5α 還元酵素阻害薬が男性型脱毛の治療に使用されているが、DHT 分解酵素の毛髪育成に対する効果は明らかになっておらず、臨床的にも試されていない。DHT は肝臓で合成される、3α-HSD、3β-HSD、17β-HSD といった Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)により主に分解される。3α-HSD には aldo-keto reductase (AKR) と short-chain dehydrogenase/reductase (SDR)の 2 種類の superfamily がある。AKR は DHT に結合して dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)存在下で 3-ketosteroid reductase として作用する。SDR は還元型 NADPH が多い条件で DHT を 3β,17β-androstanediol (3β-diol)に変換する。AKR はよく研究されてきたが、SDR は知見に乏し

い。

スルフォラファンはブロッコリーから単離されたイソチオシアネートであり、DHT 分解に関与する可能性がある。スルフォラファンは nuclear factor erythroid2 (NF-E2)-related factor2 (Nrf2)経路の活性化による抗酸化作用で知られている。スルフォラファンは、ヒト培養細胞で AKR1C1 や AKR1C2 といった DHT 分解酵素を産生する。さらに、glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked (G6pdx)など NADPH 産生遺伝子を誘導することで、NADPH 産生を促進する。これらのことから、スルフォラファンは NADPH を増加させることにより HSD の活性を上げる可能性がある。

これらの報告から、スルフォラファンは肝臓での 3α-HSD 産生を誘導し血中 DHT 濃度を低下させ、毛髪の成長につながるのではないかと仮説を立てた。スルフォラファンが DHT 分解酵素を誘導し、DHT 濃度を低下させ、毛髪成長につながるという報告は今までにない。実験にはレプチンが欠損し、血漿テストステロン濃度が高く、休止期の延長と第 2 毛周期への移行が阻害される ob/ob マウスを使用した。

＜材料・方法＞

8 週齢のオス ob/ob マウスに除毛クリームを用いて背部の体毛を除去した。スルフォラファン 10mg/kg 体重もしくは対照としてジメチルスルフォキシド（DMSO）の腹腔内投与を隔日で 6 週間行い、定期的に写真撮影し経過を追った。再生した体毛は NIH ImageJ1.50b software program を用いて定量化した。スルフォラファン注射の 18 時間後に、マウスの肝臓を回収した。Aldo-keto reductase 1c21 (Akr1c21), short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family member9 (Dhrs9)を標的とした TaqMan プローブでリアルタイム PCR を行った。マウス血漿テストステロンと DHT 濃度を ELISA キットにて測定した。ウエスタンブロット法で、Akr1c2、Dhrs9 のタンパク発現を定量した。また培養マウス肝細胞 Hepa1c1c7 にスルフォラファンを作用させ、Akrl21 および Dhrs9 の発現に対する影響を調べた。

＜結果＞

スルフォラファン投与した ob/ob マウスでは毛髪再生が促進された。除毛後 3 週間でコントロール群では発毛は見られなかったが、スルフォラファンを投与した群では発毛が見られ、除毛後 6 週間でもスルフォラファン投与群での発毛は有意に促進されていた。

6 週間のスルフォラファン投与を行った ob/ob マウスでは、対照群と比較して有意にテストステロンおよび DHT 濃度が低下していた。

DHT を~~から~~5α-androstane-3α,17β-diol へ分解する 3α-HSD のアイソザイムである Akr1c21 と Dhrs9 の、肝臓中 mRNA とタンパクの量を評価した。mRNA 量はスルフォラファンを投与した ob/ob マウスにおいて増加傾向を示し、タンパク量は有意に増加していた。

マウスの肝細胞 Hepa1c1c7 においても Akr1c21 と Dhrs9 の mRNA・タンパク量は、スルフォラファンを投与した細胞で用量依存性に有意に増加していた。

<考察>

スルフォラファンの投与により、ob/ob マウスの毛髪再生を促進することを示すことができた。毛髪再生の促進は血漿 DHT 濃度の低下も伴っていた。さらに、スルフォラファンにより Akr1c21 や Dhrs9 のような 3α-HSD のタンパク発現量の増加が ob/ob マウスの肝臓でも Hepa1c1c7 細胞でもみとめられ、スルフォラファンが 3α-HSD の誘導により血中 DHT 濃度を低下させ、毛髪の成長を促進するという仮説を支持する結果であった。

レプチンが欠損した ob/ob マウスは、除毛後の毛髪の再生がワイルドタイプのマウスと比較して 10 週以上も遅れるため、育毛剤の試験に適したモデルである。ob/ob マウスにおける休止期の延長と成長期の阻害の機序は十分に解明されていないが、いくつか仮説が立てられる。一つは、ob/ob マウスの DHT 高値によるものが考えられる。近年、ob/ob マウスでは血症テストステロン値が高値であることが報告されており、DHT がアンドロゲン受容体を介してマウスの毛髪育成を阻害することも示されている。これらのことから、DHT 濃度の高値が休止期を延長している可能性がある。本研究においても、スルフォラファンによる毛髪再生は、DHT 濃度の低下によるものであることが示唆される。

ob/ob マウスの毛髪育成障害についての他の可能性としては、レプチンの直接的な作用と参加ストレスが挙げられる。レプチンは Jak/Stat 経路を活性化し、成長期への誘導をする物質と考えられ、毛周期には必須である。このためレプチンが欠損した ob/ob マウスと、レプチン受容体が欠損した db/db マウスでは休止期の延長がおこる。レプチンはさらに脂肪細胞を介して、成長期にあるマウスの鼻毛の成長阻害に関わる。メタボリック症候群の患者と同様に、ob/ob マウスは皮膚において高度の参加ストレスを受ける。酸化ストレスはマウスの毛包において鉱質コルチコイド受容体を誘導するが、鉱質コルチコイド受容体の過剰は 5α 還元酵素を誘導し、後天性の脱毛症を引き起こす。そのため、酸化ストレスが ob/ob マウスの成長期への移行を阻害している可能性が考えられる。スルフォラファンがこれらの 2 つの機序に矛盾しないかどうか、さらなる検討が必要である。

DHT は主に肝臓で 3α-HSD により分解される。スルフォラファンは Nrf2 の活性化因子であり、Nrf2 が抗酸化応答配列を活性化することで AKR1C2 を誘導する。本研究でみられたスルフォラファンによる Akr1c21 の誘導も先行研究と矛盾しない。本研究では、スルフォラファンによりマウス由来の培養肝細胞 Hepa1c1c7 だけでなく、ob/ob マウスの肝臓でも Akr1c21 の発現が誘導されたことを示した。さらにスルフォラファン投与によりもう一つの 3α-HSD アイソフォームである Dhrs9 についても、in vivo と in vitro ともに発現が増えることを示した。Dhrs9 は、Nrf2 に結合する NE-F2 結合部位をプロモーター領域にいくつか持っている。また、スルフォラファン自体も Nrf2 を誘導することが知られている。このため、スルフォラファンが Dhrs9 を誘導するのも Nrf2 経路が関与しているようである。

スルフォラファンを介した DHT 分解の機序は、他に NADPH の産生が考えられる。スルフォラファンは G6pdx などの NADPH 産生遺伝子を誘導して NADPH を増加させる。また NADPH は NADPH を補酵素として必要とする HSD を活性化するこれらのことから、スルフォラファンは DHT 分解酵素の誘導だけでなく、分解酵素の機能を活性化することにも働く可能性がある。スルフォラファンにより誘導された 3α-HSD はわずかであったのに、血漿 DHT 濃度の低下が著

明であったことはこれで説明できる。しかし、この可能性についてもさらなる検討が必要である。

＜結論＞

スルフォラファンの腹腔内投与により、ob/ob マウスの毛髪再生が促進されることを示した。これは、スルフォラファンが肝臓での 3α-HSD 発現を誘導し、血中 DHT 濃度を低下させたことによると考えられた。スルフォラファンは男性型脱毛治療につながる可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5163　号	佐々木　真理
論文審査担当者	主　査　西村　栄美 副　査　横関　博雄、藤井　靖久	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、マウスにおいてスルフォラファンがジヒドロテストステロンの分解を亢進し、マウスの毛髪の成長を促進することを示したものである。ジヒドロテストステロン（DHT）はヒトの頭頂部の毛包を後退させ、男性型脱毛症をひきおこすことが知られている。申請者は、スルフォラファンが 3α-HSD など DHT 分解酵素の発現を増加させることから、脱毛症を改善する可能性について検証した。ob/ob マウスにスルフォラファンを投与し DMSO を投与したコントロール群と比較したところ、ジヒドロテストステロンの分解を亢進し、マウスの毛髪の成長を促進すことが判明した。またスルフォラファンを投与したマウスでは、血漿テストステロンと DHT 濃度がコントロール群と比較して低下していること、マウスの肝臓および培養マウス肝細胞において aldo-keto reductase1c21 と dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 のｍRNA とタンパク量を増加させた。以上の結果から、スルフォラファンは肝臓での 3α-HSD の発現を増加させ DHT の分解を亢進させることにより､DHT による毛髪成長の抑制を阻止することが示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本論文は、スルフォラファンが男性型脱毛症の新規の薬剤となる可能性をはじめて示したもので、臨床的に有用な研究成果であり、その着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

男性型脱毛症は、成人男性において非常に成人男性の外見に大きく影響することから、成人男性の大半において QOL の低下に繋がっていると言われている。本研究は、ルフォラファンが男性型脱毛症の新規の薬剤となる可能性について検証したものであり、社会的意義のある研究であると言える。

３）研究方法

7 週齢のオス ob/ob マウスの背部の除毛を行い、スルフォラファン 10mg/kg 体重もしくは対照としてジメチルスルフォキシド（DMSO）の腹腔内投与を隔日で 6 週間行い、定期的に写真撮影し経過を追った。再生した体毛は NIH ImageJ1.50b software program を用いて定量化した。スルフォラファン注射の 18 時間後に、マウスの肝臓を回収し、Aldo-keto reductase 1c21

(Akr1c21), short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family member9 (Dhrs9)の発現を検証し、マウス血漿テストステロンと DHT 濃度を ELISA キットにて測定した。さらに培養マウス肝細胞 Hepa1c1c7 にスルフォラファンを作用させ、Akrl21 および Dhrs9 の発現に対する効果を検証した。

４）考察・今後の発展性

本研究では、マウスにおいてスルフォラファンが、ジヒドロテストステロンの分解を亢進し、マウスの毛髪の成長を促進することを示したものであり、ヒトの男性型脱毛症において有効である可能性を示唆するものである。スルフォラファンを投与したマウスでは、血漿テストステロンと DHT 濃度がコントロール群と比較して低下することから、ヒトにおいて発生しうる副作用についても考慮する必要性が示唆された。マウスの肝臓および培養マウス肝細胞において aldo-keto reductase1c21 と dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 のｍRNA とタンパク量を増加させたことからから、スルフォラファンは肝臓での 3α-HSD の発現を増加させ DHT の分解を亢進させることにより、DHT による毛髪成長の抑制を阻止することが示唆された。今後、スルフォラファンが男性型脱毛症の治療薬として有効である可能性についてさらなる検証が進むことが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	壹岐　美紗子
論文審査担当者	主査　横関　博雄 副査　神奈木　真理、樗木　俊聡
論　文　題　目	Basophil tryptase mMCP-11 plays a crucial role in IgE-mediated, delayed-onset allergic inflammation in mice

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年、好塩基球がアレルギーや生体防御において重要な役割を担うことが明らかになってきた。好塩基球は肥満細胞と同様、ヒスタミンや各種プロテアーゼを顆粒内部に貯蔵し、脱顆粒により放出することが知られている。しかしながら、好塩基球が産生するプロテアーゼの生理的機能は、肥満細胞のそれと比べよくわかっていない。そこで本研究では、好塩基球に選択的に発現するトリプターゼ mouse mast cell protease-11 (mMCP-11)に着目し、その生体内における機能を明らかにするため、mMCP-11 欠損マウスを作製し解析を行った。mMCP-11 欠損マウスに IgE 依存的慢性アレルギー炎症（IgE-CAI）を誘導すると、野生型マウスに比べ耳介皮膚の腫脹、血管透過性亢進、炎症性細胞浸潤が半減した。また、組換え型 mMCP-11 を野生型マウスの耳介に皮内投与すると、酵素活性依存的に耳介腫脹や炎症性細胞浸潤が惹起された。加えて *in vitro* の系で、mMCP-11 が好塩基球や好酸球、マクロファージに対して遊走活性を持つことが示された。興味深いことに、mMCP-11 は血清蛋白質を分解し、その分解産物が G 蛋白質共役受容体（GPCR）に作用することで、標的細胞を遊走させることが示唆された。以上のことから、好塩基球トリプターゼ mMCP-11 は IgE 依存的慢性アレルギー炎症を誘導する鍵分子であることが明らかになった。本研究により、好塩基球由来のプロテアーゼが生体内で重要な役割を果たすことが初めて明らかとなった。

＜緒言＞

好塩基球は末梢血白血球の約 0.5%を占めるに過ぎない希少な顆粒球であり、これまで積極的な研究対象となることはなかった。好塩基球は肥満細胞と類似した特徴を持つが、最近の研究により免疫応答における好塩基球固有の役割が明らかになってきた。

好塩基球と肥満細胞はともにヒスタミンやプロテアーゼなどを好塩基性顆粒内に貯蔵し、脱顆粒により放出する。これまでマウス肥満細胞において 10 種類のセリンプロテアーゼが同定され、これらは 6 つのキマーゼ（mMCP-1, -2, -4, -5, -9, -10）と 4 つのトリプターゼ（mMCP-6, -7, -11, mTMT）で構成される。その中で mMCP-11 は、最も近年同定されたプロテアーゼである。以前当研究室は、mMCP-6 や mMCP-7 が肥満細胞特異的に発現する一方、mMCP-11 は肥満細胞よりむしろ好塩基球に高発現することを明らかにした。その選択的な発現分布から、mMCP-11 が

好塩基球固有の機能を特徴づける分子である可能性が示唆された。加えて、組換え型 mMCP-11 を耳介に皮内投与すると耳介皮膚の腫脹と血管透過性亢進が惹起されることから、mMCP-11 は炎症の誘導に関わる分子であることが示された。一方当研究室は以前、マウス慢性アレルギー皮膚炎症モデル IgE-CAI の誘導に好塩基球が必須であることを明らかにしたが、その分子メカニズムは不明であった。

本研究では、生体内における mMCP-11 の生理的機能を明らかにするため mMCP-11 欠損マウスを作製し、好塩基球の関与するアレルギー炎症に焦点を置き解析を行った。興味深いことに、mMCP-11 欠損マウスに IgE-CAI を誘導すると野生型マウスに比べ炎症兆候が半減した。また *in vitro* の系において、mMCP-11 が標的細胞に直接作用するのではなく、mMCP-11 による血清蛋白質の分解産物が GPCR に作用して炎症性細胞を遊走させることを見出した。これらの結果から、好塩基球トリプターゼ mMCP-11 によるアレルギー炎症の新しい誘導メカニズムが明らかとなった。

＜方法＞

従来法により *Mcpt11* 遺伝子のエクソン１、２、３を含む塩基配列をマウスゲノムから欠失させ、mMCP-11 欠損マウスを樹立した。mMCP-11 欠損マウスあるいは野生型マウス由来の骨髄細胞を IL-3 存在下で培養し、骨髄由来好塩基球（Bone marrow-derived basophil：BMBa）を作製した。BMBa の分化・機能をフローサイトメトリーやリアルタイム PCR、ウエスタンブロット、ELISA を用いて解析した。TNP 特異的 IgE を静脈内投与し、翌日マウスの耳介に TNP-OVA または OVA を皮内投与して IgE-CAI を誘導した。IgE-CAI 誘導後、耳介厚を経時的に測定し、皮膚組織における血管透過性亢進を Evans blue 色素の漏出、炎症性細胞浸潤をフローサイトメトリーで評価した。また、活性型と非活性型の組換え型 mMCP-11 を作製してマウスの耳介に２４時間毎３回皮内投与し、皮膚における炎症性細胞浸潤をフローサイトメトリーで解析した。BMBa、IL-5 誘導性腹腔好酸球、骨髄好中球、あるいはチオグリコレート誘導性腹腔マクロファージに対する mMCP-11 の遊走活性を細胞遊走アッセイ（Transwell migration assay）で評価した。

＜結果＞

mMCP-11 欠損マウスにおける好塩基球の各組織における絶対数、分化や機能（脱顆粒、サイトカイン産生能、遊走能）を調べたところ野生型マウスと同等であった。

興味深いことに、mMCP-11 欠損マウスに IgE-CAI を誘導すると、野生型マウスと比べ皮膚の腫脹・血管透過性亢進が半減した。また、耳介に COX-2 阻害剤を塗布し IgE-CAI を誘導すると、野生型マウスでは耳介の腫脹や血管透過性亢進が抑制されるのに対し、mMCP-11 欠損マウスでは抑制効果が得られなかった。このことから、好塩基球由来の mMCP-11 は COX-2 を介して耳介の腫脹や血管透過性亢進を誘導することが示唆された。さらに IgE-CAI における皮膚組織へ炎症性細胞浸潤をフローサイトメトリーで解析すると、好塩基球や好酸球、好中球、単球・マクロファージといった炎症性細胞の浸潤数が mMCP-11 欠損マウスで著減していたことから、mMCP-11 は炎症性細胞浸潤を促進する機能を持つことが示唆された。実際、組換え型 mMCP-11 を耳介に頻回皮内投与すると、投与局所における炎症性細胞の浸潤が観察された。一方、非活性

型 mMCP-11 の皮内投与では炎症性細胞浸潤が誘導されないことから、この現象に mMCP-11 のトリプターゼ活性が必須であることが示された。

次に mMCP-11 による炎症性細胞浸潤の誘導メカニズムを明らかにするため、*in vitro* での細胞遊走アッセイを試みた。２層のチャンバーのうち、上層チャンバーにおいて好塩基球、好酸球、好中球、あるいはマクロファージを培養し、下層チャンバーに組換え型 mMCP-11 を添加すると、好中球以外の細胞が mMCP-11 の存在する下層へと遊走した。このことから、mMCP-11 に細胞遊走活性が存在することが判明した。同様の現象は非活性型 mMCP-11 では認められないことから、mMCP-11 の遊走活性はトリプターゼ活性に依存的であることが示された。さらに、上層の細胞を百日咳毒素で前処理すると、mMCP-11 による細胞遊走が抑制されることから、mMCP-11 は GPCR を介して細胞遊走を引き起こすことが示された。

次にセリンプロテアーゼ阻害剤であるナファモスタットを追加投与して同様の細胞遊走アッセイを行った。培養液中においてナファモスタットと mMCP-11 を同時添加し、あらかじめ mMCP-11 の活性を阻害しておくと細胞遊走は著しく抑制された。一方興味深いことに、mMCP-11 を培養液に加え 2 時間３７℃で保温し、その後、ナファモスタットで mMCP-11 を失活させた培養液を用いて同様のアッセイを行った場合は細胞遊走が惹起された。また、この場合の細胞遊走は、細胞を百日咳毒素で前処理しておくと再び著しく阻害された。さらに、血清非存在下で細胞遊走アッセイを行うと、ケモカインによる好塩基球の遊走は保たれる一方、mMCP-11 による遊走は著しく抑制された。以上のことから、mMCP-11 は何らかの血清蛋白質を分解し、その分解産物が GPCR を介して細胞遊走を促進することが示唆された。特筆すべきは、mMCP-11 の添加で観察されたこれら細胞遊走現象は、ヒトβ-トリプターゼを添加した系においても同様であった。

＜考察＞

mMCP-6 や mMCP-7 は肥満細胞に特異的に発現し、これらは細菌や寄生虫感染防御において重要な役割を果たすことが報告されている。一方、mMCP-11 は好塩基球に選択的に発現するが、その生体内における生理的機能に関してはよくわかっていなかった。本研究により、mMCP-11 が IgE-CAI の誘導に関与する鍵分子であることが明らかとなった。

mMCP-11 欠損マウスに IgE-CAI を誘導すると、皮膚炎症局所における腫脹や細胞浸潤数は野生型マウスに比べ半減した。アレルギー炎症局所に浸潤した好塩基球は IgE と抗原による刺激で mMCP-11 を放出し、mMCP-11 の作用により好塩基球、好酸球、マクロファージなどの炎症性細胞浸潤がさらに促進され、炎症が拡大していく可能性が考えられる。

組換え型 mMCP-11 を皮内投与した場合と異なり、*in vitro* での細胞遊走アッセイでは mMCP-11 による好中球の遊走は認められなかった。組換え型 mMCP-11 を投与した皮膚では好中球浸潤を誘導するケモカインの発現に上昇傾向を認めたが、mMCP-11 による好中球浸潤メカニズムの詳細は現時点で不明である。

mMCP-11 のヒト相同遺伝子は hSPL-4 遺伝子とされているが、これは酵素活性を持たない機能欠失型変異体である。一方、マウスとヒトの好塩基球はいずれもトリプターゼを発現しており、マウスでは mMCP-11、ヒトではα-やβ-トリプターゼを好塩基球の顆粒内に貯蔵している。本研

究により、β-トリプターゼは *in vivo* と *in vitro* のどちらにおいても mMCP-11 と同様のメカニズムで細胞浸潤を誘導することが判明した。このことから、β-トリプターゼはヒト好塩基球における mMCP-11 の機能的相同体である可能性が考えられる。

＜結論＞

mMCP-11 欠損マウスを作製・解析することにより、好塩基球 mMCP-11 が血管透過性亢進や炎症性細胞浸潤を促進し慢性アレルギー皮膚炎症 IgE-CAI の誘導に重要な役割を果たすことが明らかになった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5164　号	壹岐　美紗子

論文審査担当者	主　査　横関　博雄 副　査　神奈木　真理、樗木　俊聡

（論文審査の要旨）

１、論文内容

好塩基球がアレルギーや生体防御において重要な役割を果たすことが明らかになってきている。しかし、好塩基球が産生するプロテアーゼの炎症などにおける役割はまだ明らかでない。

申請者は、好塩基球に選択的に発現するトリプターゼ mouse mast cell protease-11 (mMCP-11)の機能を明らかにするため、mMCP-11 欠損マウスを作製し解析を行った。mMCP-11 欠損マウスに IgE 依存的慢性アレルギー炎症（IgE-CAI）を誘導すると、野生型マウスに比べ耳介皮膚の腫脹、血管透過性亢進、炎症性細胞浸潤が半減した。また、組換え型 mMCP-11 を野生型マウスの耳介に皮内投与すると耳介腫脹や炎症性細胞浸潤が惹起された。加えて *in vitro* の系で、mMCP-11 が好塩基球や好酸球、マクロファージに対して遊走活性を持つことが示された。さらなる解析の結果、mMCP-11 は血清蛋白質を分解し、その分解産物が G 蛋白質共役受容体（GPCR）に作用することで、標的細胞を遊走させることが示唆された。以上のことから、好塩基球トリプターゼ mMCP-11 は IgE-CAI を誘導する重要な分子であることが明らかになった。本研究により、好塩基球由来のプロテアーゼが生体内で重要な役割を果たすことが初めて明らかとなった。

申請者は自らの言葉で研究の背景と目的、研究方法、結果の解釈と意義、今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の高度な研究能力とその基礎となる豊富な学識に基づき実践されたものであることが確認された。

２、論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

好塩基球に選択的に発現するトリプターゼ mouse mast cell protease-11 (mMCP-11)の生体内における機能を明らかにした点で非常に有意義な研究と考えられ独創的で評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は

１．　好塩基球トリプターゼ mMCP-11 は IgE-CAI を誘導する重要な分子であることが明らかになった点は有意義でありトリプターゼをターゲットとした治療法の開発が期待できる。

２．　好塩基球トリプターゼ mMCP-11 は炎症のマーカーにもなり重症度の診断可能に有用である可能性があり臨床的に意義のある研究と考えられた。

３）研究方法・倫理観

好塩基球に選択的に発現するトリプターゼmouse mast cell protease-11 (mMCP-11)の生体内における機能を明らかにするため、mMCP-11欠損マウスを作製しmMCP-11欠損マウスにIgE-CAIを誘導し比較検討した。本手法は十分な免疫学的知識と遺伝子学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

３、審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	八木　洋輔
論文審査担当者	主査　稲澤　譲治 副査　石川　欽也、淺原　弘嗣
論　文　題　目	Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

マイクロ RNA (miRNA)、特にヒト体液中に含まれる miRNA は各種疾患のバイオマーカーとしての有用性が示唆されている。各種の体液の中で、脳脊髄液 (CSF)は神経疾患の診断、あるいは疾患活動性のマーカーとして有望であることが示されている。しかしながら、これまでに報告されている CSF 中の RNA プロファイルに関する網羅的な解析研究の数は限られており、特に CSF エクソソーム中の miRNA に関するプロファイルはいまだ報告されていない。以上のことから、我々は同一ドナーから得られた CSF および血清を用いて、各体液のエクソソーム分画および上清分画について次世代シークエンサー (NGS)による miRNA を含むスモール RNA の網羅的解析を行った。解析により、CSF においても血清においてもエクソソーム分画により多くの miRNA が存在していること、CSF と血清とではエクソソーム中 miRNA のプロファイルが異なることが明らかとなった。また、データベース上の脳組織の miRNA 発現プロファイルと我々の解析結果を比較したところ、脳に発現しているとされる miRNA のうち約 50%が CSF エクソソーム分画に存在することが明らかとなった。特に、miR-1911-5p の発現は脳に特異性が高いとされているが、我々の解析でも miR-1911-5p は CSF に特異的に発現し、血清には存在しないことが確認された。本研究により、CSF エクソソーム分画中の miRNA は、主として脳に由来し、中枢神経系の病態生理を反映し得ることが示唆された。

＜緒言＞

体液中 miRNA のプロファイル解析は、特に腫瘍の分野においてバイオマーカーとしての有用性が報告されている。血清や血漿中の miRNA に関する研究が数多く報告されているが、CSF 中の miRNA は神経疾患のバイオマーカーとして主要な研究対象となっている。体液中に含まれる細胞外小胞であるエクソソームは細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしていることが示唆されており、エクソソーム中の miRNA は疾患バイオマーカーとして有用と考えられている。

これまでに報告されている CSF 中の RNA プロファイルに関する網羅的な解析研究の数は限られており、特に CSF エクソソーム中の miRNA にフォーカスしたプロファイルはいまだ報告されていないことから、我々は同一ドナーから得られた CSF および血清を用いて、各体液のエクソソ

ーム分画および上清分画について次世代シークエンサー (NGS)による miRNA を含むスモール RNA の網羅的解析を施行した。

＜方法＞

3 人のドナーを対象とし、脳脊髄液は腰椎穿刺により採取後に、細胞成分を除いた上で凍結保存した。同時に血清を採取し、同様に凍結保存した。各体液検体は超遠心法によりエクソソーム分画と上清分画とに分離し RNA 抽出を行った。スモール RNA ライブラリーは TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina 社)を用いて作製し、PCR 15 サイクルで増幅後、HiSeq 2500 (Illumina 社)を用いて 50 base single end read のシークエンシングを実施した。スモール RNA シークエンスデータは BWA (version 0.5.9)を用いて human reference genome (hg19)にマッピング、スモール RNA クラスターの miRNA へのアノテーションには miRbase (version 20)を用いた。また、miRdeep2 package (version 2.0.0.7)の‘quantifier.pl’スクリプトを用いたデータ処理、解析もあわせて施行した。また、NGS に供したものとは別のドナー由来の検体を用いて、CSF や血清に特異的に発現していると考えられた miRNA について、デジタル PCR (dPCR)による検証実験を行った。さらに、NGS 解析の結果から CSF に特異的に発現していると考えられた miRNA について、TargetScan 7.1 と RNA22v2.0 を用いたターゲット予測を行い、予測されたターゲット遺伝子について DAVID Bioinformatics Resource 6.7 によるパスウェイ解析を行った。

＜結果＞

CSF あるいは血清から分離したエクソソーム分画については、電子顕微鏡、ウェスタンブロット法や NTA (Nano Tracking Analysis)により検証した。

スモール RNA 中の miRNA の比率は分画により異なっており、上清分画よりもエクソソーム分画で、また CSF よりも血清で miRNA の比率が高かった。CSF、血清いずれにおいても miRNA はエクソソーム分画により多く発現していた。

階層的クラスタリングでは、miRNA の発現プロファイルはまず CSF か血清かで大きく分類され、さらにその中でエクソソーム分画と上清分画とに分類され、さらにドナーごとに分類されることが示された。さらに、今回解析した 4 つの分画には特異的に発現している miRNA と他の分画にも共通している miRNA が存在し、また発現のプロファイルは各々に異なっていた。

miRNA プロファイルの解析から CSF や血清に特異的に存在すると考えられた miRNA について dPCR による検証を行い、NGS の結果から CSF 特異的と考えられた miRNA のうち miR-1911-5p、miR-34b-3p、miR-34c-3p、miR-204-3p、miR-449b-5p について CSF に特異的であることを確認した。また、血清特異的な miRNA については miR-17-5p、miR-15b-3p、miR-550a-3p、miR-150-3p、miR-18a-5p で結果が確認された。

脳組織の miRNA 発現プロファイルと我々の CSF エクソソーム分画に関する解析結果を比較したところ、脳に発現しているとされる miRNA のうち 50.2%は CSF エクソソーム分画にも発現しており、また CSF エクソソーム分画に発現している miRNA のうち 97.7%は脳組織にも発現していた。また、両者の発現プロファイルは互いに異なっていた。

CSF に特異的と考えられた miRNA についてのパスウェイ解析からは、ターゲット遺伝子が癌や神経系の機能あるいは免疫系に関与するパスウェイに多く含まれていることが判明し、特に神経系に関与するパスウェイとしては neurotrophin signaling pathway、glioma、long-term potentiation、axon guidance、calcium signaling pathway 等が含まれていた。

＜考察＞

我々は NGS による CSF および血清のスモール RNA プロファイルを行った。特筆すべきこととして、miRNA は CSF においても血清においてもエクソソーム分画に豊富に存在したが、CSF では特にエクソソーム分画に豊富であり、上清分画に含まれる miRNA は非常に少なかった。このことから、CSF 中の miRNA のプロファイルは主としてエクソソームのプロファイルを反映しているものと考えられた。体液上清中に含まれる miRNA の一部は高比重リポタンパク（HDL）粒子に含まれることが報告されている。CSF 中では血清に比してコレステロールの濃度が 0.5%未満と低く、また血清では HDL 粒子の主成分が小分子 RNA の運搬に関与するとされるアポリポ蛋白 A-I であるのに対して、CSF では HDL 粒子の主成分がアポリポ蛋白 E であることなどが、CSF 上清分画で検出される miRNA が少ないことの原因である可能性が考えられた。

エクソソーム分画と上清分画とを区別していない先行研究では、血清と CSF の miRNA プロファイルが異なることが報告されている。一方で、エクソソームは血液脳関門（BBB)を通過し得ることが報告されており、エクソソーム分画に着目した場合に血清と CSF の miRNA プロファイルが異なるかどうかは重要な関心事であると考えられた。本研究の結果からは、生理的な状態では血清と CSF のエクソソーム分画の miRNA プロファイルはやはり異なっていることが示され、また血清と CSF では発現量の多い miRNA の内訳も異なっていることから、エクソソーム分画中の miRNA であっても血清と CSF の間を交通するとこは稀であると考えられた。ただし、本研究は BBB を障害するような疾患を有しない生理的な状態での検討であるので、病的な状態において血液と CSF のエクソソーム分画中の miRNA の関係性が変化し得る可能性は否定できない。

脳に発現しているとされる miRNA の約半数が CSF エクソソーム分画にも発現しており、また CSF エクソソーム分画に発現している miRNA のほとんどは脳組織にも発現していると考えられることから、CSF エクソソーム分画の miRNA はそのほとんどが脳組織に由来することが示唆された。

＜結論＞

CSF エクソソーム分画中の miRNA プロファイルを示すこと、および同分画に発現している miRNA が脳に由来し得ることを示唆したことにより、本研究は神経疾患の miRNA バイオマーカー探索の基礎となる知見を提示した。さらに、本研究は生理的状態では血液と CSF のエクソソーム分画中の miRNA の交通が稀であることも示唆した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5165　号	八木　洋輔
論文審査担当者	主　査　稲澤　譲治 副　査　石川　欽也、淺原　弘嗣 公開審査　：　平成 29 年 1 月 31 日	

（最終試験の結果の要旨）

１．論文内容

本論文は次世代シークエンサーを用いて脳脊髄液ならびに血清のエクソソーム中に内包されたスモール RNA の網羅的発現解析を行い、そのデータをもとにマイクロ RNA（miRNA）の発現パターンを比較することで、脳脊髄液エクソソームに内包された miRNA が中枢神経系の病態生理を反映するバイオマーカーとしての有用である可能性を示唆した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者の研究以前に、脳脊髄液エクソソーム中のマイクロ RNA の発現プロフィールを明らかにした研究報告はない。特に、同一ドナーの脳脊髄液ならびに血清のエクソソーム内包 miRNA の網羅的発現情報の比較解析は申請者らにより初めて実施された先駆的なの研究であり独創的な結果を得た。

２）社会的意義

申請者らの研究により、脳脊髄液エクソソーム分画の miRNA のほとんどが脳組織由来であることが示唆され、その成果は、神経疾患のバイオマーカー探索と新たな診断ツール開発の可能性を期待させるものである。

３）研究方法・倫理観

研究には次世代シークエンサーなど先端的ゲノム・生化学的手法が用いられてデータが取得され、それら情報は適切な統計学的手法により処理された。また、申請者は高い倫理観のもと、科学者の行動規範を遵守して研究を遂行したことがうかがわれた。

４）今後の発展性

今回の研究で得られた成果は脳脊髄液中のエクソソームと内包 miRNA の中枢神経疾患診断バイオマーカー応用へと発展する可能性が高く期待を抱かせるものである。

３．その他

申請者の神経内科医としての臨床経験を基板に実施された研究成果といえる。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	古川　佑介
論文審査担当者	主査　田邊　勉 副査　杉原　泉、泰羅　雅登
論　文　題　目	Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

抑制性神経伝達物質 γ-アミノ酪酸(GABA)は、脳発達において重要な役割を演じていることが知られている。よって、脳発達期における GABA 受容体(GABA-R)を介するシグナル伝達の撹乱は、脳発達に影響し、持続的な脳機能不全を生じさせる恐れがある。 本研究では、GABA-R シグナルの異常刺激による脳発達への影響を調べるために、GABA-R シグナルを活性化する 2 種類の睡眠導入薬の、ベンゾジアゼピン(BZD)系の Triazolam (TZ)と、非 BZD 系の Zolpidem (ZP)をマウスへ単回強制経口投与し、オープンフィールド試験(OF)、明暗往来試験(LD)、高架式十字迷路試験(EP)、条件付け学習記憶試験(FZ)、驚愕反応抑制試験(PPI)の 5 つの試験からなるバッテリー式の行動解析を行った。その結果、幼若期に TZ を投与した群において学習記憶障害が生じる事を見いだした（FZ による）。一方で、ZP においては、いずれの投与群においても行動変化は認められなかった。次に、GABA-R シグナル刺激により生じる成長後の海馬への影響を Western Blot により検討した結果、TZ の幼若期投与群において、記憶機能に重要とされる AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプの GluR1, GluR4 の発現低下が認められた。なお、ZP については、いずれの投与群においても影響が認められなかった。次に、TZ と ZP の投与影響が異なる理由を調べるために、幼若期に両物質を投与して 8 時間後に海馬における神経活動の指標とされている初期応答遺伝子(IEG)の mRNA 発現を調べた。その結果、TZ 投与によって IEG の発現が有意に低下していることが認められた。なお、ZP 投与は IEG の発現に影響は認められなかった。以上から、脳発達期の TZ の投与は、GABA-R シグナルを介して IEG 発現低下を受けて学習記憶障害を誘発する事が示唆された。これらのことから、TZ など BZD 系の睡眠導入薬は、脳発達への影響を踏まえた慎重な使用が必要と考えた。

＜緒言＞

発達過程の脳は、適切な神経シグナルの強さ、作用する領域やタイミングによる精妙な制御によって正常な脳機能を獲得する。抑制性の神経シグナル伝達の代表的なものとして γ-アミノ酪酸受容体(GABA-R)を介したシグナル伝達系があげられる。この GABA-R シグナル伝達系は、神経細胞の増殖や移動、神経回路の構築・再編成において重要な役割を持つ事が知られている。すな

わち、発達期における化学物質などの外的要因による、GABA-R シグナルの撹乱は、正常な脳発達を阻害し、脳機能への不可逆的な影響を及ぼす事が予想される。GABA-R シグナルに影響を与える化学物質として GABA-R 作動性の睡眠導入薬や抗不安薬があげられ、小児においても希に処方されるケースが想定されるが、その脳発達への影響は未知の部分が多い。そこで本研究では、脳発達期において GABA-R シグナルを TZ と ZP を用いて刺激し、成長後の脳機能への影響を行動バッテリー試験によって調べた結果を報告する。両物質の作用機序は、GABA(A)-R への結合を介した Cl^-の細胞内流入に伴う過分極の誘発による興奮性神経活動の抑制であり、GABA-R シグナルを刺激することにより睡眠誘導作用を示す。

＜方法＞

全ての動物実験は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会の承認のもと実施した。妊娠 11 日目のマウス C57BL/6NCrSlc を購入し、プラスチックケージで自由に飲水と摂餌できるようにして 12 時間の明暗サイクルで飼育した。TZ 1mg/kg と ZP 50mg/kg を 0.5%(w/v) Methyl cellulose(0.5%(w/v) MC)に懸濁しマウスに強制経口投与した。Vehicle 群: 0.5%(w/v) MC を幼若期(生後 14 日齢)、成熟期(11 週齢)に投与を行った。幼若期投与群: TZ (TZ-P14)もしくは ZP (ZP-P14)を 14 日齢で投与し、11 週齢で 0.5%(w/v) MC を投与した。成熟期群: 0.5%(w/v) MC を 14 日齢で投与し、TZ (TZ-11w)もしくは ZP (ZP-11w)を 11 週齢で投与した。その後、12 週齢時からオープンフィールド試験(OF), 明暗往来試験(LD), 高架式十字迷路試験(EP), 条件付け学習記憶試験(FZ:条件付け(FZ1), 場所記憶試験(FZ2), 音連想記憶試験(FZ3)), プレパルス驚愕反応抑制試験(PPI)の順にバッテリー式の行動試験を実施した。行動解析後に生化学的解析を行うために海馬を採取した。また、TZ もしくは ZP を 14 日齢に投与 8 時間後に海馬における IEG の mRNA 発現を定量 RT-PCR により調べた。

＜結果＞

行動解析の結果、OF において、TZ-11w で中央滞在時間と移動時間の延長が認められた。LD と EP において、いずれの投与群においても、投与による有意な行動変化はなかった。FZ において、FZ1 において警告音と嫌悪刺激を共に 3 回繰り返し提示した結果、TZ-P14 では freezing%は上昇しなかったが、それ以外の投与群は繰り返しに伴い freezing%が上昇した。FZ2 において、TZ-P14 で有意な freezing%の低下を認めたが、それ以外の投与群は有意な差は認められなかった。FZ3 において、TZ-P14 以外の投与群は警告音に対し即座に freezing 反応を示し 50%以上に達するが、TZ-P14 では freezing 反応の遅れとともに freezing%の低下が認められた。ZP では、FZ に有意な差は見られなかった。PPI においては、いずれの投与群においても有意な変化はなかった。次に、TZ-P14 における学習記憶機能低下について調べるために、海馬における複数種のタンパク発現の変化を western blotting によって検討した。TZ-P14 において、GluR1 と GruR4 の発現が減少傾向にあること、MAP2 が発現増加傾向にあることが認められた。TZ-P14 以外の投与群には有意な変化は認められなかった。TZ と ZP の影響が異なる理由を調べるために、それぞれを P14day に投与 8 時間後に海馬における IEG の mRNA 発現を調べた結果、TZ-P14 において Arc, c-Fos, Nr4a1 の発現が有意に低下していたが、ZP-P14 では有意な差は認められなかっ

た。

＜考察＞

この研究では、TZ と ZP をそれぞれ、幼若期(生後 14 日齢:TZ-P14, ZP-P14), 成体期(11 週齢:TZ-11w, ZP-11w)のマウスに強制経口投与し、12 週齢時に行動バッテリー試験を実施した。FZ の FZ1 において、TZ-P14 以外の他の群では Freezing 反応が上昇したが、TZ-P14 では freezing 反応の上昇が起こらなかった。これは、把握した状況に反応する短期的な記憶機能の障害を反映するものではないかと考えられる。また、FZ2 においても freezing 反応の低下が示され、場所関連記憶機能の低下が示唆された。FZ3 においても、警告音に対する freezing 反応の遅れが認められ、音連想記憶機能の低下が示唆された。これらの結果から、OF において TZ—11w で活動性の亢進が生じたが、TZ-P14 のみにおいて成長後の学習記憶機能低下が生じる事が明らかとなった。

学習記憶機能に関わる成長後の海馬における影響を調べる為に、タンパク質発現を比較したところ、TZ-11w および ZP 投与群においてタンパク質発現変化は認められなかったが、学習記憶機能低下を生じた TZ-P14 において MAP2 の発現増加と、GluR1, GluR4 の発現減少が認められた。MAP2 は神経細胞樹状突起に特異的に発現するタンパク質であり、神経線維構造の安定化に関わっている。神経線維や樹状突起の減少や変性を伴った症例としてアルツハイマー病やパーキンソン病の報告はあるが、これらの発現増加を伴う障害や GABA-R シグナル刺激による変化に関する報告は無く、TZ 投与との関係の詳細は不明であるが、学習記憶機能低下に対応するものと考えられる。GluR1, GluR4 は AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプに属し、海馬における長期増強及びシナプス可塑性において必要とされ、学習記憶機能へ関与している事が知られている。よって、TZ-P14 において、GluR1, GluR4 の発現低下を伴う後シナプス機能に影響が生じ、成長後の学習記憶機能低下が生じている可能性がある。TZ と ZP の影響が異なる理由を調べるために、幼若期に両物質を投与 8 時間後に神経活動の指標である複数の IEG の海馬における mRNA 発現を比較した。その結果 TZ-P14 において、Arc, c-Fos, Nr4a1 が有意に発現低下し、ZP-P14 においては有意な発現変化が認められなかったことから、幼若期マウスの海馬における神経活動抑制が成長後の学習記憶障害への要因の一つと示唆された。

＜結論＞

BZD 系睡眠導入薬の TZ は幼若期マウスの海馬に対し不可逆的な影響を及ぼすこと、非 BZD 系の ZP では海馬機能発達への影響が少ないことが示唆された。幼若期における生後発達期の神経回路及びシナプス再編を活発に行う過程において、TZ により GABA-R シグナルを介し IEG 発現低下を受け、成長後の学習記憶機能の低下が生じ、神経回路構築に影響することが示唆された。発達期における BZD 系睡眠導入薬による GABA-R シグナルへの刺激は、持続的な海馬機能障害につながる恐れがあり、成長後の学習記憶障害が生じうる危険性が示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5166　号	古川　佑介
論文審査担当者	主　査　田邊　勉 副　査　杉原　泉、泰羅　雅登	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は幼若期マウスへのベンゾジアゼピン系睡眠導入剤が成長後のマウスに及ぼす影響を調べたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

脳発達期における GABA 受容体を介するシグナル伝達の撹乱は脳発達に影響し、持続的な脳機能不全を生じさせる恐れがある。そこで本研究ではその危険性を検証するため幼若期マウスへ GABA 受容体作動薬であるベンゾジアゼピン系睡眠導入薬 triazolam(TZ)あるいは非ベンゾジアゼピン系睡眠導入剤 zolpidem(ZP)を導入し、それが成長後のマウスに及ぼす影響を調べた。

２）社会的意義

TZ あるいは ZP を、生後 2 週齢及び 11 週齢のマウスに投与した影響を検討した本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 2 週齢 TZ 投与マウスの 13 週齢目における嫌悪学習行動試験において、その習得の遅れ、場所記憶の低下、音連想記憶の低下が認められた。

2. 2 週齢 TZ 投与マウス海馬において、投与 8 時間後の最初期遺伝子 Arc, c-FOS, Nr4a1 の発現低下、13 週齢目における海馬 GluR1、GluR4 の発現低下、MAP2 の発現上昇が認められた。

3. 2 週齢 ZP 投与、13 週齢 TZ, ZP 投与マウスは正常マウスと差が認められなかった。

以上のように、申請者は幼若期マウスへのベンゾジアゼピン系睡眠導入薬投与が成長後のマウスの学習行動の低下を引き起こす可能性を示唆した。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究においては様々な行動学的解析、遺伝子発現、蛋白発現の解析が用いられており、申請者の研究方法に対する技術力は高いと考える。

４）考察・今後の発展性

申請者らの実験結果は、申請者らの仮説を肯定するものであるが、結論付けるにはまだ詰めなければならないところが多く残されている。しかし重要な第一歩を踏み出したといえる。

３．その他　　特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	金　小海
論文審査担当者	主査　田中　真二 副査　植竹　宏之、沢辺　元司
論　文　題　目	Prognostic Impact of Cancer Stem Cell-Like Phenotypes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

（論文内容の要旨）

Abstract

To investigate the expression of cancer stem cell-like phenotypes in invasive pancreatic ductal adenocarcinoma, we analyzed the correlation between the expression status of stemness markers and minichromosome maintenance2 (MCM2), and clinicopathological characteristics; we also evaluated the prognostic significance of cancer stem cell-like features. We defined frequent positive stemness markers (number of highly expressed markers >3, at CD133, CD44, ALDH1, EpCAM) and/or a low expression of MCM2 phenotypes as the representative pattern of a cancer stem cell-like phenotype. The cancer stem cell-like phenotype was identified as an independent factor of overall survival by univariate (P = 0.03) and multivariate analysis (hazard ratio, 2.763%; 95% confidence interval, 1.121–6.813; P = 0.0273). The cancer stem cell-like phenotype could be involved in therapeutic resistance, resulting in worse overall survival. The cancer stem cell-like phenotype can be an indicator of recurrence in cases of invasive pancreatic ductal adenocarcinoma.

Introduction

Pancreatic cancer has the most aggressive character of any cancer, with a median survival of less than 6 months and a 5-year survival rate of less than 5%. Thus, pancreatic cancer remains a difficult disease to cure, and novel strategies for its treatment should be elucidated. In the present study, we used immunohistochemistry to investigate the expression of stemness markers—CD133, CD44, ALDH1, and EpCAM—in samples of PDAC tissues. In addition, we estimated the frequency of the expression of minichromosome maintenance 2 (MCM2) in tumor cells of the samples, which is known to reflect the cellular proliferative potential/status. We expected that the combination of stemness marker expression and MCM2 expression would more precisely demonstrate the cancer stem cell-like phenotype in tumor tissues from patients with pancreatic cancer. Then, we analyzed the correlation between the cancer stem cell-like phenotype and clinicopathological features as well as

prognostic factors of patients with invasive PDAC.

Materials and methods

The entire sections were evaluated via immunohistochemistry. MCM2 staining was judged as positive when an immunoreaction was observed in the nucleus. In contrast, positive CD133, CD44, ALDH, and EpCAM expression was confirmed when a definite membrane/cytoplasmic immunoreaction was observed. The expression extent of MCM2 was evaluated as follows: low when <30% of positive tumor cells were detected and high when >30% of positive tumor cells were detected.

All statistical analyses were conducted with the EZR software. For the analysis of OS and RFS, survival curves were generated by the Kaplan-Meier method and were compared by the log-rank test. A Cox proportional hazards model was used for the univariate and multivariate analyses of OS and RFS. For all statistical analyses, a P-value <0.05 was considered significant.

Results

For CD133, 17 of 44 cases were positive. For CD44, 12 of 44 cases were positive. For ALDH1, 36 of 44 cases were positive. For EpCAM, 21 of 44 cases were positive. MCM2 was localized to the nucleus, and the positivity ranged 10%–70%. In double immunostaining, among the positive cases of stemness markers, EpCAM tended to co-localize with MCM2. In contrast, CD133, ALDH1, and CD44 tended to be exclusively positive with MCM2.

To evaluate the frequency of stemness positivity in each case and clinicopathological findings, a stemness scoring system was established, patients with a high stemness score tended to have a worse clinical course with respect to OS and RFS.

We then investigated the correlation between the expression of stemness markers and MCM2 and clinicopathological findings. Interestingly, there was a tendency for patients determined as stemness marker positive with low expression of MCM2 to have a worse prognosis than those with a high expression of MCM2.

We defined a high stemness score and a low expression of MCM2 phenothpes as the stem cell-like phenotype. The group with stem cell-like phenotype, with high MCM2 and a stemness score of 1 or 2, had a significantly worse OS (P = 0.030) and RFS (P = 0.019). In the univariate analysis, tumor size (P = 0.027), tumor stage (P = 0.0083), and stem cell-like phenotype (P = 0.030) were significantly associated with worse overall survival. In the multivariate Cox regression model, tumor stage (P = 0.0144) and stem cell-like phenotype (P = 0.0273) remained independent predictors of poor prognosis.

Discussion

Regarding the stemness markers of pancreatic cancer, the strong expression of CD133,

CD44, ALDH1, and EpCAM in cancer cells did not correlate with patient prognosis (RFS and OS). These results were not necessarily consistent with those of previous studies, probably due to the differences in numbers and characteristics of patients with PDAC in the present study.

Having cancer cells with a higher expression of MCM2 was associated with a better prognosis in the present study. In other cancers, MCM2 expression correlates with increased cancer proliferation as well as poor prognosis. Usually, cancer stem cells are expected to have low proliferative activity and pluripotent activity of cell differentiation. Thus, in pancreatic cancers, the characteristic of stemness in cancer cells with high MCM2 expression might be associated with a worse prognosis. This would be consistent with the chemo- and/or radio-therapy-resistant nature of cancer stem cells. Furthermore, we showed that stemness phenotype, defined as a stemness score of 3 and 4 or a score of 1 and 2 with low expression of MCM2, represented a poor prognosis for pancreatic cancer patients. This combination of phenotypes might more precisely evaluate the cancer stem-like feature of cancer cells in the pathological samples of pancreatic cancers.

In addition to the stemness marker phenotype, several phenotypes of pancreatic cancers have been shown to be associated with patient survival. They include epithelial mesenchymal transition (EMT)-associated markers, WNT signal-associated markers, microRNAs, mucin markers, p53, and Ki-67. The interaction between stemness markers and previously defined prognostic factors should be clarified to further analyze the phenotype-specific character of cancer cells in relation to the biological behavior of pancreatic cancer.

A limitation of this study was the small number of pancreatic cancer cases. Further studies using a larger cohort are necessary for the precise estimation of the effect of cancer stemness markers/MCM2 expression on the prognosis of patients with pancreatic cancer.

【要旨】

膵臓癌は、予後が非常に悪い癌として知られており、日本では年間約2万5000人が膵臓癌と診断され、年間約2万6000人が亡くなっている。また、近年、癌幹細胞が癌の再発、転移や薬剤耐性に関与していることで注目されている。本研究では、膵臓癌における癌幹細胞マーカーと細胞増殖やアポトーシスに関与するMCM2タンパク発現について検討し、患者予後とどのような関係性があるのかを臨床病理学的に検証した。

浸潤性膵管癌症例44検体を用いて検討を行った。膵臓癌の癌幹細胞マーカーとしてCD133、ALDH-1、CD44、EpCAM、MCM2に対する免疫染色を施行し、それぞれ高発現型と低発現型に分類した。癌幹細胞マーカーとMCM2の二重染色ではEpCAMのみMCM2との共局在傾向がみられた。各癌幹細胞マーカーの高発現の有無で予後に有意な違いは認められなかったが、癌幹細胞マーカーの高発現数が多い症例では予後不良傾向を示した。MCM2と各癌幹細胞マーカーの高発現の有無での予後検討では、MCM2が低発現症例で予後不良傾向が得られた。そこで、3種以上の癌幹細胞マーカーが高発現する症例群および癌幹細胞マーカーが2種以下かつMCM2が低発現

の群を癌幹細胞表現型と定義し検討したところ、この群がそれ以外の症例よりも統計学的に予後不良であり、多変量解析にて浸潤性膵管癌の独立予後不良予測因子である(hazard ratio, 2.763%; 95%confidence interval, 1.121-6.813;p=0.0273)ことが示された。

膵癌において癌幹細胞マーカーの発現により、癌幹細胞が有する治療抵抗性がもたらされている可能性がある。また、一般に癌幹細胞は増殖能が低いとされており、MCM2が低発現の群にて予後不良傾向がみられたことは、癌幹細胞マーカーの高発現とともに癌幹細胞様の表現型を反映していることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5167　号	金　小梅
論文審査担当者	主　査　田中　真二 副　査　植竹　宏之、沢辺　元司	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は膵癌における癌幹細胞マーカーと MCM2 タンパク発現と臨床病理学因子、予後との関連についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

膵癌の癌幹細胞マーカーとして CD133、ALDH1、CD44、EpCAM、細胞増殖やアポトーシスに関与するタンパクとして MCM2 について、浸潤性膵管癌症例 44 検体における免疫組織学的発現と臨床病理学因子、予後との関連について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 癌幹細胞マーカーと MCM2 の二重染色では EpCAM のみ MCM2 との共局在傾向がみられた。
2. 各癌幹細胞マーカーの高発現の有無で予後に有意な違いは認められなかったが、癌幹細胞マーカーの高発現数が多い症例では予後不良傾向を示した。
3. MCM2 と各癌幹細胞マーカーの高発現の有無での予後検討では、MCM2 が低発現症例で予後不良傾向が得られた。
4. 癌幹細胞マーカー高発現が 3 種以上の症例群および癌幹細胞マーカー高発現が 2 種以下かつ MCM2 が低発現の症例群は、それ以外の症例よりも統計学的に予後不良であった。
5. 癌幹細胞マーカー高発現が 3 種以上の症例群および癌幹細胞マーカー高発現が 2 種以下かつ MCM2 が低発現の症例群は、多変量解析にて浸潤性膵管癌の独立予後不良予測因子であることが示された(hazard ratio, 2.763%; 95%confidence interval, 1.121-6.813;p=0.0273)。

以上のように申請者は、癌幹細胞マーカーおよび MDM2 低下が膵癌の生存率の独立規定因子であることを明らかにしている。これは臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には本学医学部附属病院で根治切除がなされた浸潤性膵管癌症例 44 症例が用いられ、切

除標本の CD133、ALDH1、CD44、EpCAM、MCM2 免疫染色所見と予後の相関を調べている。十分な病理組織学的知識、技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。また、本学医学部倫理審査委員会の承認を得ており、本研究が十分な準備の上に行われてきたと考えられる（1458：癌の進展・増殖に関与する細胞周期関連分子の病理学的解析）。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によって癌幹細胞マーカーおよび MCM2 発現が膵癌の予後予測バイオマーカーのひとつとなる可能性を考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に値する十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	安藤　史顕
論文審査担当者	主査　澁谷　浩司 副査　畑　裕、前嶋　康浩
論　文　題　目	Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

先天性腎性尿崩症は、腎臓の尿濃縮力が低下する疾患である。多尿は QOL を著しく低下させ、水腎症や腎機能障害などの合併症を引き起こす。尿の濃縮は、腎臓集合尿細管において vasopressin type 2 receptor (V2R) からの刺激が aquaporin-2 (AQP2) 水チャネルを活性化し、水の再吸収が増加することで起こる。V2R の機能喪失型 (loss-of-function) 変異が先天性腎性尿崩症の一番多い原因として知られており、治療のためには V2R を介さずに AQP2 水チャネルを活性化することが重要である。

我々は、Wnt5a が AQP2 のリン酸化・膜輸送・タンパク発現量増加に関わることを発見した。Wnt5a は、マウス皮質集合管の灌流実験において水透過性を上昇させ、尿崩症モデルマウスにおいても尿浸透圧を上昇させた。Wnt5a は calcineurin の活性化を介し、既存の vasopressin シグナルとは異なる機序で AQP2 を制御していた。Calcineurin を直接活性化するアラキドン酸も vasopressin 様効果を持ったことから先天性腎性尿崩症における calcineurin 活性化薬の重要性を確認した。

＜諸言＞

先天性腎性尿崩症患者は、尿濃縮力の低下により脱水症状を繰り返すため身体・精神発達遅滞となる危険性が高い。さらに、高度多尿は水腎症や腎機能障害などの合併症を引き起こす。合併症予防のため頻回の水分摂取や排尿を推奨しているが、著しく QOL を損なうことが問題となっている。先天性腎性尿崩症の原因として vasopressin type 2 receptor (V2R)の機能喪失型変異が知られている。V2R からの刺激が aquaporin-2 (AQP2) 水チャネルを活性化し、腎臓での水の再吸収が増加することで尿は濃縮される。よって、V2R 遺伝子異常患者の治療戦略は、V2R を介さずに AQP2 水チャネルを活性化することが重要となるが、根治的治療法は開発されていない。本論文は、Frizzled receptors のリガンドである Wnt5a が vasopressin とは異なる機序で尿濃縮力の改善に有効であることを明らかにしたものである。

＜方法＞

mpkCCD$_{cl4}$ 細胞（皮質集合管細胞）をフィルターに播き 5 日間培養した後、serum と hormone を含まない培養液へ変更し 12 時間培養した。Wnt5a や vasopressin を basolateral 側へ投与し、AQP2 の動態を観察した。

灌流実験は、マウスの腎臓から皮質集合管を単離し行った。管腔側の灌流液に、水の再吸収量を測定するマーカーとして 0.5 mM fluorescein isothiocyanate-dextran (10,000 MW) を用いた。灌流液を 5-10 nl/min の速さで流し、Wnt5a や vasopressin の刺激を行った後に、dextran の濃縮量の変化を測定した。

尿崩症モデルマウスは、tolvaptan を 2 日間皮下持続静注し作成した。Wnt5a を腹腔内へ注入し、尿浸透圧の変化や AQP2 の動態を解析した。

＜結果＞

内因性に AQP2 と Frizzled receptors を発現する mpkCCD 細胞において、Wnt5a は vasopressin と同様に AQP2 の Ser261 を脱リン酸化し、Ser269 をリン酸化した。Wnt5a はカルシウムシグナルを活性化するリガンドとして報告されており、カルシウムシグナルが AQP2 のリン酸化に関与しているかを検討した。Fluo4 を用いて mpkCCD 細胞内のカルシウム動態を観察したところ、Wnt5a 投与後に細胞内カルシウムが上昇した。次に、カルシウムが制御する下流の分子と AQP2 のリン酸化との関わりをカルシウムシグナルの阻害剤を用いて解析した。Calmodulin の阻害剤（W7）と calcineurin の阻害剤（Cyclosporin A）は濃度依存性に Wnt5a による AQP2 のリン酸化を阻害した。Wnt5a が calcium /calmodulin /calcineurin の活性化を介し AQP2 のリン酸化を制御していることが明らかとなった。

Ser269 がリン酸化された AQP2 は apical membrane へ集積することが知られており、Wnt5a により AQP2 の細胞内局在が変化するかを解析した。Wnt5a は apical membrane の AQP2 を増加させ、W7 / Cyclosporin A は Wnt5a による AQP2 の細胞内局在の変化を抑制した。

Wnt5a は、AQP2 の mRNA とタンパク発現量も増加させた。AQP2 mRNA の増加は W7 / Cyclosporin A により抑制されており、Wnt5a / calmodulin / calcineurin が、AQP2 のリン酸化だけではなく膜輸送や発現量にも寄与することを明らかにした。

Wnt5a と既存の vasopressin signalling pathway の関係を評価するため、cAMP assay / PKA kinase assay を行った。Vasopressin は、cAMP / PKA を活性化したが、Wnt5a は活性化せず、Wnt5a による AQP2 の制御メカニズムは vasopressin と異なることが明らかとなった。

Wnt5a が尿濃縮へ寄与することを示すため、マウス腎臓から皮質集合管を単離し灌流実験を行った。Wnt5a は水透過性を上昇させ、vasopressin の約 54 %もの効果を発揮した。腎性尿崩症モデルマウスにおいても Wnt5a は尿管腔側の AQP2 発現量を増やし、尿浸透圧を上昇させた。

以上の結果より calcineurin は AQP2 の主要な制御因子と考えられた。Calcineurin を直接活性化することで知られるアラキドン酸も Wnt5a と同様に皮質集合管細胞において vasopressin 様効果を持ったことから、calcineurin 活性化薬が腎性尿崩症治療の標的となり得ることを確認した。

＜考察＞

Wnt5a は、AQP2 のリン酸化、膜輸送、タンパク発現量を制御していた。Wnt5a/ calcium/ calmodulin/ calcineurin シグナルは新しい AQP2 の制御機構であり、既存の vasopressin/ cAMP シグナルを活性化しないことから、腎性尿崩症治療の新規標的として有力である。

Wnt5a の尿濃縮への効果を検証するため、本研究では細胞実験と尿崩症モデルマウスの実験に加え、灌流実験を行った。マウス皮質集合管における Pf (水透過性)の報告はなかったが、1 nM の vasopressin 投与後の Pf (949±209 μm/s) は、ラットの報告に近い値であった。ラット皮質集合管の灌流実験では、220 pM の vasopressin 投与後に Pf は 800±141 μm/s へと上昇していた。ポジティブコントロールである vasopressin の実験から、マウス皮質集合管の Pf を正しく評価できていると判断した。Wnt5a はコントロールと比較し有意に Pf (478±120 μm/s) を上昇させており、管腔側の水が集合管細胞を通過して再吸収されていることが明らかとなった。

Wnt5a/ calcium/ calmodulin/ calcineurin シグナルによる AQP2 制御機構の解明から、Wnt5a と calcineurin の腎臓における生理的意義が推察された。Wnt5a の血中濃度は敗血症や肥満で上昇することが知られている。Wn5a は、敗血症における有効循環血漿量低下の代償や、肥満・メタボリックシンドロームにおける体液貯留に寄与している可能性がある。Calcineurin の腎臓における活性化機序は不明な点が多いが、脳の calcineurin は抗精神病薬により活性化することが知られている。抗精神病薬は syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH)の主要な原因であり、腎臓における calcineurin の活性化が SIADH の病態に関与している可能性がある。

＜結論＞

Wnt5a/ calcium / calmodulin /calcineurin シグナルが既存の vasopressin/ cAMP シグナルとは異なる機序で AQP2 の水透過性を制御していることが明らかとなった。Calcineurin は AQP2 の主要な制御因子であり、腎性尿崩症の新たな治療戦略として calcineurin 活性化薬のスクリーニングが有用であると期待される。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5168　号	安藤　史顕

論文審査担当者	主　査　澁谷　浩司 副　査　畑　裕、前嶋　康浩

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、腎臓における尿濃縮重要なアクアポリン２の Wnt5a による活性化制御に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

先天性腎性尿崩症は腎臓の尿濃縮力が低下する疾患であり、その原因として vasopressin type 2 receptor (V2R)の機能喪失型変異が知られている。V2R 遺伝子異常患者の治療戦略は V2R を介さずに aquaporin-2 (AQP2)水チャネルを活性化することが重要となるが、根治的治療法は開発されていない。このような背景の下、申請者は Frizzled receptors のリガンドである Wnt5a による AQP2 水チャネルを活性化制御機構について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．AQP2 と Frizzled receptors を内因性に発現する皮質集合管細胞において、Wnt5a が AQP2 のリン酸化、膜輸送、蛋白発現量増加に関わること。

２．Wnt5a は calcium/ calmodulin/ calcineurin の活性化を介し AQP2 を制御しており、calmodulin の阻害剤 W7 と calcineurin の阻害剤 Cyclosporin A は Wnt5a の効果を完全に阻害すること。

３．マウス腎臓から皮質集合管を単離した灌流実験により Wnt5a は水透過性を上昇させ、vasopressin の約 54 %もの効果を発揮すること。

４．腎性尿崩症モデルマウスにおいても Wnt5a は尿管腔側の AQP2 発現量を増やし、尿浸透圧を上昇させること。

以上のように申請者は、calcium/ calmodulin/ calcineurin signaling pathway が AQP2 の水透過性を制御していることを明らかにしている。これは腎性尿崩症の新たな治療戦略においても極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、生化学的および分子生物学的解析、さらに蛍光顕微鏡を用いた解析が適切に行われ、さらに Wnt5a が尿濃縮へ寄与することを示すため、マウス腎臓から皮質集合管を単離し灌流実験

を構築した。これら手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究成果によって、Calcineurin が AQP2 の主要な制御因子であり、腎性尿崩症の新たな治療戦略として calcineurin 活性化薬のスクリーニングが有用である可能性を考察している。これは先行研究と照らし合せても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	LIU Lian
論文審査担当者	主査　村松　正明 副査　角田　達彦、平尾　見三
論　文　題　目	Genetic Variants Associated With Susceptibility to Atrial Fibrillation in a Japanese Population

（論文内容の要旨）

Introduction:

Atrial fibrillation (AF), the most common sustained arrhythmia encountered in clinical practice, affects millions of people worldwide. In addition to well-established clinical risk factors for AF, such as advancing age, male sex, body-mass index (BMI), and heart failure, evidence for genetic associations with AF has been extensively reported. Genome-wide association studies (GWASs) have identified 17 independent variants at 14 genomic loci associated with AF susceptibility.

Methods:

5461 participants of Japanese ancestry were collected in two stages: stage 1, n = 2159 (non-AF, 581; AF, 1578; November 2011 to July 2013) and stage 2, n = 3302 (non-AF, 1304; AF, 1998; August 2013 to January 2016), from Tokyo Medical and Dental University and seven associated facilities. 11 previously reported AF-related loci were genotyped with invader assay. The association of SNPs with susceptibility to AF was evaluated by logistic regression analysis. Comparisons of mean risk allele numbers and mean genetic risk scores (GRSs) between AF patients and controls were assessed using unpaired t tests. Chi-square tests were employed to compare the distributions of total risk allele numbers between AF cases and controls. Kaplan-Meier curves were constructed to determine the effects of carrying different numbers of risk alleles on disease development and age at disease onset. Weighted genetic risk scores (GRSs) were computed for each individual by multiplying risk allele dosages weighted with the respective natural logarithm of odds ratio (OR) derived from the previous GWAS in Japan. All the subjects were ordered from low to high GRS and then partitioned into four groups with the same total number of individuals per group. ORs for AF were calculated by comparing individuals in each quartile with the first quartile using a Chi-square test. The differences between AF patients and control population distributions in quartiles were assessed by Fisher’s exact tests. Receiver operating characteristic (ROC) curve

analysis was performed to determine their ability to predict AF.

Results:

Six out of eleven SNPs, rs593479 (1q24 in *PRRX1*), rs1906617 (4q25 near *PITX2*), rs11773845 (7q31 in *CAV1*), rs6584555 (10q25 in *NEURL*), rs6490029 (12q24 in *CUX2*), and rs12932445 (16q22 in *ZFHX3*) ($P < 1.9 \times 10^{-5}$), were confirmed as associated with AF. Of the six loci, five had modest effect sizes on susceptibility to AF (OR, 1.20–1.49), consistent with the majority of variants associated with complex disease, while rs1906617 at 4q25 had a relatively high OR of 1.82 (1.68–1.98). AF cases have larger total numbers of risk alleles, while controls carry fewer. The mean values of total numbers of risk alleles were significantly higher for AF patients than for the control population ($P < 0.0001$). Patients with a high total number of risk alleles (9–12) had a younger median age of onset of AF (58 years, 95% confidence interval [CI]: 55–60 years) than those with a low total number (1–4) (63 years, 95% CI: 61–64 years) ($P = 0.0015$). The mean GRS of AF cases was significantly higher than that of controls. We observed a 4.38-fold (95% CI, 3.69–5.19) difference in risk of AF between individuals with scores in the top and bottom quartiles of the GRS. Receiver operating characteristic (ROC) analysis indicated an area under the ROC curve (AUC) of 0.641 (95% CI, 0.628–0.653, $P < 0.0001$). The optimal point showed a sensitivity of 59.8% and a specificity of 61.1%. The genetic variants explained 4.2% of the phenotypic variance, as the age- and gender-specific AF prevalence was calculated to be 1.48% in our study sample, referring to an epidemiological study of AF in Japan.

Discussion:

We replicated association of six of 11 SNPs previously reported as associated with AF. The other five loci, identified in European GWASs, failed to reach genome-wide significance in our study, suggesting genetic heterogeneity among races. The result is also consistent with the finding that AF prevalence varies among populations and underscores the significance of performing GWASs in non-European populations. Although the locus on 4q25 close to *PITX2* (pituitary homeobox 2) has been repeatedly reported to be the region most significantly associated with AF, it remains unsure whether and how *PITX2* contributes to the development of AF. We observed that the median age of onset of patients with a high total number of risk alleles was 5 years younger than that of patients with a low total number of risk alleles. To our knowledge, this is the first study to report that the age of onset of non-familial late onset AF (which develops alongside cardiovascular complications) is affected by the genotypes of common SNPs identified by GWASs. We found that individuals in the top quartile of the GRS had a 4.38-fold increased relative risk of AF compared with those in the bottom quartile, which is a reasonable OR from six variants, relative to those reported for coronary artery disease or ischemic stroke. ROC curve analysis also revealed a significant and relatively good

predictive value (AUC = 0.641, 95% CI, 0.628–0.653), despite the use of only six variants, comparable to those for other complex diseases. However, the sensitivity (59.8%) and specificity (61.1%) of the optimal point were modest and unsatisfactory. The combination of the six confirmed SNPs explained 4.2% of the phenotypic variance of AF risk, which is comparable to the values of several other complex diseases, such as coronary artery disease and myopia. However, this represents a small portion of AF heritability, which has been estimated at 62% (95% CI, 55–68%). We believe that the major contributors to AF heritability are ion channels, transcription factors, and gap junctions. Further research to identify other common, rare, and structural susceptibility variants, and gene-gene interactions, should enhance the explanation of AF heritability.

Conclusions: Six loci were validated as associated with AF in a Japanese population. This study suggests that a combination of common genetic markers modestly facilitates discrimination of AF, and is the first report to demonstrate that the age of onset of AF is affected by common risk alleles. A 4.38-fold (95% CI, 3.69–5.19) difference in risk of AF was observed between individuals with scores in the top and bottom quartiles of the GRS. ROC analysis indicated an AUC of 0.641 (95% CI, 0.628–0.653, P < 0.0001).

要約

＜緒言＞

心房細動は日常診療で最も頻繁にみられる持続性不整脈であり、日本だけでなく多くの罹患者が認められる。その危険因子として、加齢や性別（男性）、体格指数（BMI）、心不全などの既往歴のほか、遺伝的関連について多く報告されるようになった。心房細動に関するゲノムワイド関連研究（GWAS）によってこれまで 14 の遺伝子座が同定されている。

＜方法＞

我々は東京医科歯科大学及び 7 つの関連施設で 5461 人の日本人研究対象者をリクルートした。ステージ 1 は 2011 年 11 月から 2013 年 7 月にかけて集めた心房細動症例 1578 人、および非心房細動症例 581 人であり、ステージ 2 は 2013 年 8 月から 2016 年 1 月にかけて集めた心房細動症例 1998 人、非心房細動症例 1304 人である。欧米人を対象とした GWAS ですでに同定されている遺伝子多型（SNP）のうち、11 の遺伝子多型についてインベーダー法を用いて解析を行った。SNP 解析にはロジスティック回帰検定を用い、リスクアリルの数、および遺伝リスクスコア（GRS）の平均についてはそれぞれカイ自乗検定、スチューデント T 検定で比較した。またこれらのリスクアリルの数や遺伝リスクスコアの有効性について評価するために、カプラン・メイヤー曲線を作成した。遺伝リスクスコアは GWAS で既に得られているオッズ比で重み付けをして、それぞれの SNP のリスクアレルの数を乗じて計算した。全ての症例を GRS の数字で並べ、4 つのグループに分け、

グループ間の心房細動のオッズ比について、Fisher 精確検定を用いて調べた。また心房細動予測の可能性を決定するために受信者操作特性(ROC)曲線を調べた。

＜結果＞

GWAS のメタ解析で有意であった 11 SNP のうち日本人でも有意差を認めた 6 SNP($P < 1.9 \times 10^{-5}$), rs593479 (1q24、*PRRX1*), rs1906617 (4q25、*PITX2*), rs11773845 (7q31、*CAV1*), rs6584555 (10q25、*NEURL*), rs6490029 (12q24、*CUX2*), rs12932445 (16q22、*ZFHX3*)について、心房細動との関連について確認した。これら 6 遺伝子座のうち、5 つの SNP の効果サイズはそれほど大きくなかったが(オッズ比 1.20-1.49)、もっとも効果サイズの大きい SNP は 4q25 遺伝子座の rs1906617 であった(オッズ比 1.68-1.98)。そこでこれらの SNP を組み合わせて解析したところ、心房細動症例はリスクアレルの数を有意に多く持っていた($P < 0.0001$)。多くのリスクアレルを持つ患者 (9-12)は心房細動発症年齢の平均は 58 歳 (95% CI 55-60 歳) であり、少ないリスクアレルを持つ患者(1-4)に比べ若い年齢で発症していた (63 years, 95% CI: 61-64 years) ($P = 0.0015$)。GRS を計算したところ、スコアの高い患者は低い患者より、4.38 倍心房細動のリスクが高かった (95% CI, 3.69-5.19)。ROC 曲線解析では AUC が 0.641 (95% CI, 0.628-0.653, $P < 0.0001$) であり、感受性 59.8%、特異性 61.1%であった。また心房細動の表現バリアンスのうち、遺伝的バリアンスは 4.2%を説明していた。

＜考察＞

我々はまず欧米人の GWAS の結果の確認を行い、6 つの遺伝子座について再現性が得られた。そのうち特に 4q25 については心房細動への病態メカニズムについては不明であるが、繰り返し関連が確認されている。リスクアレルを多く持つ心房細動患者の発症年齢が 5 年若いことや、GRS の大きい症例で心房細動の発症頻度が 4.38 倍高いことから、遺伝子多型アレルを組み合わせる方法は疾患リスクを評価するのに有効と考えられた。特にリスクアレルの数による発症年齢の評価は本研究が初めてである。ROC 曲線から本法の感受性・特異性を評価したが、それぞれ 59.8%、61.1%であり、今後の更なる評価が必要と考えられる結果であった。最後にこの 6 つの SNP の遺伝的バリアンスをみたところ、全体の 4.2%であった。これまでの双生児解析などで 62%と推定されており、まだ同定されていない SNP や構造的な変異、エピスタシスなどの解析を進める必要があると考えられた。

＜結論＞

本研究では、6 つの SNP について日本人における心房細動との関連や、これらの SNP の結果を組み合わせたリスクアレル数、遺伝リスクスコア解析の有効性が示された。これらが臨床で応用されるには更なる精度の向上が必要であると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5169　号	Liu Lian
論文審査担当者	主　査　村松　正明 副　査　角田　達彦、平尾　見三	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

心房細動においてゲノムワイド関連解析（GWAS）で明らかにされた疾患感受性遺伝子多型の日本人での検証研究および遺伝リスク関数作成に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

心房細動の感受性遺伝子が多く明らかにされているが、これらを用いて日本人を対象に心房細動の遺伝リスク関数を作成した着眼点は評価に値するものがある。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. 心房細動感受性遺伝子を日本人集団で検証したこと。
2. 心房細動発症の遺伝的リスク関数を作成したこと。

以上のように複数の感受性遺伝子が相加的・相乗的に関わっていることを明らかにしており、臨床的にも極めて有用な研究である。

３）研究方法・倫理観

研究には共同研究先において収集した患者サンプルが用いられ、臨床データ及びゲノム DNA を用いて遺伝子多型解析を行った。本手法は循環器病学的・遺伝学的知識の裏付けの元に遂行されており、研究方法に対する知識と技術力が高く、周到な準備の元に行われたことが伺える。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は本研究結果において、遺伝的リスク関数が今のままでは不十分であることも考察している。これは先行研究と照らし合わせても妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	増冨　裕文
論文審査担当者	主査　畑　裕 副査　田賀　哲也、中田　隆夫
論　文　題　目	Induction of Peptidylarginine Deiminase 2 and 3 by Dibutyryl cAMP via cAMP-PKA Signaling in Human Astrocytoma U-251MG cells

（論文内容の要旨）

【序論】

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ（PAD）は、タンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基に脱イミノ化するカルシウム（Ca）依存性の翻訳後修飾酵素である。シトルリン残基に修飾されたタンパク質は、シトルリン化タンパク質と総称される。塩基性アミノ酸のアルギニンから中性アミノ酸のシトルリンへの修飾は、タンパク質の高次構造や機能に影響を及ぼす。PAD には、5 つのアイソフォーム（PAD1-4、6）が存在し、その発現組織は異なる。中枢神経系では、PAD2、PAD3、PAD4 の発現が報告されており、中でも PAD2 の発現が最も高い。また、PAD2 は神経細胞やミクログリア、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなどのグリア細胞で発現が認められる。

アストロサイトは、神経細胞に栄養を供給するなど脳の恒常性維持に働く。脳が酸化ストレス、炎症、虚血などにより障害を受けると、アストロサイトは反応性アストロサイトへと細胞の性質を変える。しかし、その詳細な変換機構は明らかではない。*In vitro* 実験において、初代培養アストロサイトは、サイトカインであるインターロイキン、腫瘍壊死因子α、インターフェロンγの添加によって、細胞の性質を変化させる。また、細胞内透過性の cAMP の類似体であるジブチリル cAMP（dbcAMP）の添加は、ラット C6 グリオーマ細胞とラット初代培養アストロサイトを反応性アストロサイトへ変化させる。反応性アストロサイトのマーカータンパク質として、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）が知られている。

PAD の増加とシトルリン化タンパク質の発現は、アルツハイマー病（AD）、プリオン病、パーキンソン病、多発性硬化症といった神経変性疾患で認められている。我々は、以前に AD 患者脳において、シトルリン化タンパク質の異常な蓄積及び PAD2 タンパク質の増加を明らかにしている。また、シトルリン化タンパク質陽性細胞の多くは反応性アストロサイトであり、GFAP がシトルリン化していることも明らかにしている。反応性アストロサイトにおいて、シトルリン化タンパク質の異常な蓄積と PAD2 の亢進は、AD の発症や進行に関係していると考えた。そこで本研究では、ヒトアストロサイトーマ U251MG 細胞を用いて、dbcAMP による PAD の発現誘導を検討した。

【方法】

ヒトアストロサイトーマ U-251MG 細胞は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより購入した。U-251MG 細胞において dbcAMP による PAD の発現誘導を検討するために、dbcAMP の最終濃度が 0.05 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mM、5 mM、10 mM、25 mM となる培地を調製した。U-251MG 細胞は、調製した dbcAMP 培地で 72 時間培養し、細胞内 cAMP 濃度、PAD mRNA 及びタンパク質の発現量、PAD の細胞内局在、酵素活性を解析した。cAMP 濃度は酵素免疫測定法、mRNA 発現量は定量的 PCR 法（qPCR）、タンパク質発現量はウエスタンブロット法、細胞内局在は免疫組織染色法、酵素活性は比色定量法で解析した。

抗 PAD3 抗体は、ヒト組換え PAD3 タンパク質を抗原として、BALB/c マウスに免疫して作製した。すなわち、免疫した BALB/c マウスの脾臓を摘出し、マウス P3U1 ミエローマ細胞とハイブリドーマを形成した。抗 PAD3 マウスモノクローナル抗体を 9 クローン得て、そのうちの一つを選定し、ウエスタンブロット法及び免疫組織染色法に用いた。

PAD とシトルリン化タンパク質の細胞内局在の検討では、PAD の発現を誘導するため、U-251MG 細胞を 5 mM dbcAMP 培地で 72 時間培養した。その後、細胞内の Ca 濃度を上昇させるため、細胞を 1 mM イオノマイシンを含む培地で 1 時間培養し、免疫組織染色法で解析した。PAD2、PAD3 は、抗 PAD2 及び抗 PAD3 マウスモノクローナル抗体を用いて検出した。シトルリン化タンパク質は、シトルリンを化学修飾法で標識し、抗化学修飾シトルリン化ウサギポリクローナル抗体を用いて検出した。

細胞内情報伝達経路の検討では、U-251MG 細胞を、cAMP 依存性タンパク質キナーゼ（PKA）の特異的阻害剤である KT5720 を加えた 5 mM dbcAMP 培地で 24 時間培養した。その後、PAD mRNA 発現量を、qPCR で測定した。

【結果】

U-251MG 細胞において、dbcAMP の添加が細胞内の cAMP 濃度を上昇させるのか検討した。10 mM、25 mM dbcAMP 培地で培養した細胞内の cAMP 濃度は、cAMP 添加なし（CT）と比べて 4,273 倍、25,555 倍と高かった。

次に、定常状態の U-251MG 細胞において、PAD 遺伝子発現を qPCR で解析した。U-251MG 細胞には、PAD2 及び PAD3 遺伝子が発現し、一方で PAD1、PAD4、PAD6 遺伝子は発現しないことが明らかになった。さらに細胞内の cAMP 濃度の上昇が、PAD2 及び PAD3 mRNA 発現量を増加させるのかを解析した。5 mM、10 mM、25 mM dbcAMP 培地で培養した細胞の PAD2 mRNA 発現量は、CT と比べて 7.8 倍、13.0 倍、19.7 倍に増加していた。10 mM、25 mM dbcAMP 培地で培養した細胞の PAD3 mRNA 発現量は、CT と比べて 169.3 倍、297.3 倍に増加していた。また、ウエスタンブロット法解析の結果、10 mM、25 mM dbcAMP 培地で培養した細胞の PAD2 タンパク質発現量は、CT と比べて 13.4 倍、18.2 倍に増加していた。10 mM、25 mM dbcAMP 培地で培養した細胞の PAD3 タンパク質発現量は、CT と比べて 133.4 倍、204.0 倍に増加していた。加えて、5 mM dbcAMP 培地で発現誘導した PAD2 及び PAD3 は、いずれも細胞質に発現していた。

さらに、cAMP による PAD 酵素活性の変動を解析した。10 mM、25 mM dbcAMP 培地で培養した細胞の PAD 酵素活性は、CT と比べて 60.3 倍、65.1 倍と高かった。

Ca イオノフォアであるイオノマイシンは、細胞内の Ca 濃度を上昇させることで、PAD を活性化することが知られている。PAD とシトルリン化タンパク質の細胞内局在の解析では、PAD の発現を誘導するために U-251MG 細胞を 5 mM dbcAMP 培地で培養した後、1 mM イオノマイシンを含む培地で 1 時間培養し、免疫組織染色法で解析した。PAD2 及び PAD3 は、細胞質でシトルリン化タンパク質と共局在することを明らかにした。

cAMP は細胞内情報伝達の二次情報伝達物質として知られ、cAMP-PKA 経路を活性化する。そこで、cAMP による PAD の発現誘導は、PKA を介するのかを PKA 阻害剤である KT5720 を用いて、qPCR で解析した。10 μM KT5720 を含む 5 mM dbcAMP 培地で培養した細胞の PAD2、PAD3 mRNA 発現量は、dbcAMP 5 mM 培地と比べて 66%、69 %少なかった。

【考察】

本研究により、ヒトアストロサイトーマ U-251MG 細胞において、dbcAMP による PAD2 及び PAD3 の発現誘導は、cAMP-PKA シグナル伝達を介することを初めて明らかにした。

我々の研究室では、以前にラット新生児ケラチノサイトを用いて、レチノイン酸添加が PAD2 mRNA 及びタンパク質の発現量を増加させることを明らかにした。また、ヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いて、1α,25-ジヒドロビタミン D3 添加により PAD4 mRNA 及びタンパク質の発現量も増加させることを報告している。しかし、U-251MG 細胞では、レチノイン酸及び 1α,25-ジヒドロビタミン D3 の添加により PAD2 や PAD4 の発現誘導は認められなかった。これは、PAD2 及び PAD4 の発現誘導が細胞特異的な情報伝達系を介しており、遺伝子への直接作用でないことを示唆している。

PAD3 は、主に皮膚、卵巣、毛包に発現する。また神経系では、ヒト及びラットのシュワン細胞で PAD3 の発現が報告されている。しかし、アストロサイトにおいて PAD3 発現の報告は未だない。本研究では、U-251MG 細胞において PAD3 の発現が誘導されることを初めて明らかにした。

DbcAMP は、細胞質の脱アシル化酵素により切断されて cAMP となる。事実、本研究においても添加した dbcAMP の濃度増加に依存して細胞内 cAMP 濃度が増加した。また、細胞内の cAMP 濃度増加は、PKA を活性化する。そこで、本研究では、dbcAMP による PAD2 及び PAD3 の発現誘導が cAMP-PKA シグナル伝達を介するかを PKA 阻害剤である KT5720 を用いて調べた。KT5720 は dbcAMP による PAD2 及び PAD3 の発現誘導を抑制した。すなわち、U-251MG 細胞において、dbcAMP による PAD2 及び PAD3 の発現誘導は、cAMP-PKA シグナル伝達を介していることを明らかにした。

我々は、以前に AD 患者脳において、シトルリン化タンパク質の異常な蓄積及び PAD2 タンパク質の増加を明らかにしている。また、シトルリン化タンパク質陽性細胞の多くは反応性アストロサイトであり、GFAP がシトルリン化していることも明らかにしている。これらの知見より、AD 患者脳でのシトルリン化タンパク質の異常な蓄積及び PAD2 タンパク質の増加は、細胞内 cAMP 濃度の増加による cAMP-PKA シグナル伝達を介した PAD2 の発現誘導によるものと考えられ、AD の発症や進行にも関与している可能性が示唆される。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5170　号	増冨　裕文
論文審査担当者	主　査　畑　裕 副　査　田賀　哲也、中田　隆夫	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

ヒトアストロサイトーマ細胞において、cyclic AMP-A キナーゼ経路を介して蛋白のシトルリン化を司るペプチジルアルギニンイミナーゼ 2 と 3 が誘導されることを明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

蛋白のシトルリン化は蛋白の性状に大きな変化を与え、アルツハイマー病など種々の神経疾患でシトルリン化蛋白の蓄積が観察されるので、シトルリン化の制御機構の解明は、神経疾患の病態理解に重要と想定される。本研究はシトルリン化を担う酵素の発現を制御するシグナルの解明にとりくんだ先駆的、独創的研究である。

２）社会的意義

シトルリン化蛋白の蓄積が、例えばアルツハイマー病の発症、進行に重要な役割を担うのであれば、シトリン化酵素の抑制が新しい治療法になる可能性が期待される

３）研究方法・倫理観

ヒトアストロサイトーマ U-251MG 細胞に dbcAMP を投与して細胞内の cyclic AMP の上昇を引き起こし、ペプチジルアルギニンイミナーゼ 2 と 3 の発現が mRNA レベル、蛋白レベルが高まること、ペプチジルアルギニンイミナーゼ酵素活性も高まることを観察した。細胞内カルシウム濃度を高めて、ペプチジルアルギニンイミナーゼを活性化すると、細胞内にシトルリン化された蛋白が検出され、ペプチジルアルギニンイミナーゼ 2 と 3 と局在が一致することも観察した。最後に、A キナーゼ阻害剤を投与すると dbcAMP によるペプチジルアルギニンイミナーゼ 2 と 3 の mRNA 上昇が起こらなくなることを示した。

４）考察・今後の発展性

シトルリン化蛋白の蓄積が神経疾患の発症、進行に重要であるならば、本研究の成果をもとに、ペプチジルアルギニンイミナーゼの発現を抑制する治療法の開発に道が開かれるかもしれない。

３．その他

特記事項はない。

４．審査結果

審査会では種々の質問が行われたが、申請者はいずれにも適切な回答を行い、自立した研究者としての資質を示した。よって、本学博士（医学）の学位に値すると判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	堀口　華代
論文審査担当者	主査　東　みゆき 副査　横関　博雄　　安達　貴弘
論　文　題　目	Real-time imaging of mast cell degranulation *in vitro* and *in vivo*

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

マスト細胞はアレルゲンなどの刺激により、細胞内の分泌顆粒に貯留している多様なメディエーターを放出し、即時型のアレルギー反応を誘導する。現在用いられているマスト細胞の脱顆粒評価方法は、脱顆粒によって放出されたメディエーターを検出する手法が主であり、これらの手法では個々の細胞や生体内における脱顆粒を観察することは困難である。そこで我々は、*in vitro* だけでなく *in vivo* の条件下でもリアルタイムで脱顆粒の様子を可視化することのできる新規ツールを開発することにした。本研究で考案した脱顆粒検出ツール（immuno-pHluorin、略称 impH）は、マスト細胞の分泌顆粒に発現する膜タンパク質に pH 感受性の蛍光タンパク質が融合された人工遺伝子であり、pH が酸性の環境下では蛍光を発せず、中性環境下では強い蛍光を放つ性質を持つ。実際に impH をマスト細胞に発現させると、impH が集積する分泌顆粒内は酸性に保たれているため定常状態では蛍光を発さないが、ひとたび脱顆粒が起きると、顆粒内が細胞外に露出することで pH が上昇し、強い蛍光を発することが分かった。さらに、このツールは顆粒が放出される様子をリアルタイムで観察することができるため、アレルゲンの存在する方向に顆粒が放出されているという事実を突き止めた。また、マスト細胞に impH を発現させたマウスを作製し、即時型皮膚アレルギー炎症を誘導したところ、炎症を起こしている部位のマスト細胞で蛍光が観察され、impH は生体内でも機能することを証明した。以上のことより、impH は *in vitro* と *in vivo* のどちらにおいてもマスト細胞の脱顆粒を観察することのできる有用なツールであり、脱顆粒を抑制する薬剤や物質の探索に役立つことが示唆された。

＜緒言＞

マスト細胞は自然免疫、獲得免疫の両方において中心的な役割を担っており、特にアレルギーや寄生虫からの感染防御において重要な働きをしている。マスト細胞はアレルギーに関与する事が知られている、高親和性イムノグロブリン E（IgE）受容体を発現しており、アレルゲンとの架橋刺激によって、ヒスタミン、セロトニン、プロテアーゼ、脂質メディエーター、サイトカイン、ケモカインなど、さまざまな炎症反応を誘発するエフェクター分子を放出する。マスト細胞のメディエーターの放出経路は大きく分けて 2 種類存在し、一般的なエクソサイトーシスにあた

る分泌小胞の放出の他に、ヒスタミンなど、あらかじめ合成されて分泌顆粒に蓄えられていた分子を即座に放出する経路があり、これを脱顆粒と呼ぶ。マスト細胞の脱顆粒メカニズムを解明することはアレルギー研究において重要であり、抗アレルギー薬を開発するために欠かせない情報となるはずであるが、既存の脱顆粒を検出する手法では未だ十分に寄与することができない。例えば、一般的な脱顆粒解析手法は、分泌顆粒から放出されたヒスタミンやβ-ヘキソサミニダーゼを定量する方法や、電子顕微鏡や免疫染色法による形態学的変化を検出する手法であり、これらの方法ではリアルタイムで、かつ、個々の細胞の脱顆粒を検出する場合には用いることが出来ない。さらに、どの解析法においても *in vitro* でのみ解析可能であり、生体内での脱顆粒の観察には適していない。

そこで本研究では、こうした問題をクリアする新たな脱顆粒検出手法の開発を試みた。脱顆粒は、分泌顆粒膜と細胞膜の融合によって小胞の内容物を細胞外に放出する細胞の分泌機構であり、小胞膜に存在する v-SNARE と細胞膜に存在する t-SNARE が会合することで引き起こされる。分泌顆粒内は、定常状態では常に pH が低く（pH = 5 以下）保たれているが、脱顆粒時には酸性から細胞外と同じ中性に直ちに変化する。我々はこの pH 変化に着目し、pH < 6 では蛍光を発しないが、pH = 7 付近で強い蛍光を発するという特性を持った GFP 変異体である pHluorin を用いれば、生体内でも機能するタンパク質ベースの脱顆粒インディケーターを開発できるのではないかと考え、今回開発した immuno-pHluorin (impH)の *in vitro* および *in vivo* におけるマスト細胞の脱顆粒を可視化するツールとしての有用性を検討した。

＜方法＞

マスト細胞の脱顆粒を可視化するために、分泌顆粒に発現する v-SNARE である VAMP-8 の C 末端側（分泌顆粒の内腔側）に pHluorin を融合させ、impH を作製した。そして impH 遺伝子をマウス骨髄由来マスト細胞（BMMC）に遺伝子導入し、impH 発現マスト細胞を作製した。その後、impH が脱顆粒インディケーターとなりうるのか調べるために、共焦点顕微鏡を用いてリアルタイムイメージングを行いながら、impH を発現する BMMC に IgE とアレルゲンによる架橋刺激で脱顆粒を誘導し、蛍光強度の変化を観察した。同時に、その際に観察された impH の蛍光が、脱顆粒によって放出された顆粒を反映しているのかを判別するため、分泌顆粒内に高発現することが知られている CD63 と impH の共局在の有無を調べた。また、マスト細胞はどういった方向に顆粒を放出するのかを解析するため、アレルゲンを可視化させた状態で脱顆粒を誘導し、impH とアレルゲンの局在関係を観察した。さらに、impH の *in vivo* における有用性を検討するために、impH を発現するマスト細胞を有したマウスを作製し、生体イメージング法を用いてマウス耳介の皮下を観察しながら即時型皮膚アレルギー炎症（PCA 反応）を誘導し、アレルギー炎症時の impH の蛍光を観察した。

＜結果＞

VAMP ファミリーのうち、マスト細胞には VAMP-2, 3, 7, 8 が高発現していることが知られている。その中でも VAMP-8 はノックアウトマウスの解析から、脱顆粒において主要な働きをしていることが報告されており、脱顆粒のインディケーターとして最も有用な候補であることが示唆

されている。そこで、VAMP-8 の C 末端側（分泌顆粒の内腔側）に pHluorin を融合させ、impH を作製した。impH 遺伝子を BMMC に遺伝子導入し、impH の局在について調べたところ、分泌顆粒に存在するセロトニンと共局在することが確認された。一方、分泌小胞に存在する VAMP-3 や細胞膜に存在する SNAP23 とはほとんど共局在しないことが確かめられた。また、impH 発現細胞における分泌顆粒の数や局在、細胞表面の高親和性 IgE 受容体の発現、脱顆粒能は、コントロールとほぼ同等であり、impH を強制発現させたことによる影響は軽微であることが示唆された。

次に、IgE であらかじめ感作させておいた impH 発現マスト細胞に脱顆粒を誘導したところ、アレルゲンを投与してから 10 分以内に強い蛍光強度の増加が認められた。画像解析の結果、この impH の蛍光は細胞表面のみに存在することが明らかとなった。さらに、脱顆粒誘導後の細胞表面の発現を解析したところ、impH は CD63 と共局在することが確認された。また、アレルゲンを 3 μm のビーズに結合させた可視化アレルゲンを用いて脱顆粒を誘導したところ、impH の蛍光は可視化抗原と接触している細胞表面に限局して観察された。

最後に、impH 発現細胞をマウスの耳介に移植し、移植した細胞の生着後に PCA 反応を誘導したところ、アレルゲン投与後数分で impH の蛍光強度が上昇した。一方、高親和性 IgE 受容体欠損マウス由来の BMMC に impH を遺伝子導入し、発現細胞を移植した場合では蛍光強度の増加は認められなかった。

＜考察＞

これまで、マスト細胞の脱顆粒を検出する方法としては、ヒスタミンやβ-ヘキソサミニダーゼを定量する手法が広く用いられてきた。これらの方法は簡便で、細胞全体の脱顆粒を評価することはできるが、個々の細胞の脱顆粒をリアルタイムで検出することはできない。それを解決する手法として着目されたのが、細胞内 Ca^{2+}の濃度変化をモニターする Ca^{2+}インディケーターである。これは IgE とアレルゲン刺激による脱顆粒が細胞内 Ca^{2+}濃度の増加を伴うことから用いられたのだが、実際には Ca^{2+}の上昇と脱顆粒が必ずしも相関しているわけではないため、本来の目的とはそぐわないものであった。本研究により開発した impH は、脱顆粒と impH の蛍光強度の増加に相関性が見られ、impH の蛍光が放出された顆粒を反映していることが明らかとなった。さらに、脱顆粒は生じないが分泌小胞の放出が誘導される、IL-33 や LPS などを用いた刺激では impH の蛍光が観察されないことも確認できた。以上のことから、impH はサイトカインなどが放出される分泌小胞の開口放出は反映せず、脱顆粒現象のみを可視化するインディケーターであることが示唆された。

また、impH はタンパク質ベースの検出ツールあるため、*in vitro* だけでなく *in vivo* におけるマスト細胞のリアルタイムイメージングが可能になった。これは、生体内における脱顆粒の観察に関しては impH が唯一のツールであり、世界で初めての報告である。将来、マスト細胞特異的に impH を発現するマウスが樹立されれば、*in vivo* においてマスト細胞と病原体との相互作用をリアルタイムで観察することができるようになり、生体内におけるマスト細胞の脱顆粒メカニズムの解明が期待される。さらに、impH の蛍光強度変化を指標にすることで、マスト細胞の脱顆粒を抑制する薬剤の *in vitro* におけるスクリーニングや *in vivo* における効能評価が可能になるだ

ろう。

＜結論＞

impH によって *in vitro*、*in vivo* におけるマスト細胞の脱顆粒の可視化が可能になった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5171　号	堀口　華代
論文審査担当者	主　査　東　みゆき 副　査　横関　博雄　　安達　貴弘	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、即時型アレルギー応答において重要な働きをしているマスト細胞の脱顆粒をリアルタイムかつ細胞レベルで可視化する新規技術開発に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

マスト細胞の脱顆粒は、これまでは顕微鏡での形態観察あるいは放出物質の同定で行なわれてきた。申請者は、分泌顆粒が脱顆粒時に pH 変化することに着眼し、 pH の変化に伴い蛍光が変化するタンパク質 immune-pHluorine (impH)と分泌顆粒に発現する VAMP-8 遺伝子を融合させマスト細胞に遺伝子導入することで、マスト細胞の脱顆粒の可視化に初めて成功した。その着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた成果は以下である。

１．impH 遺伝子導入培養マスト細胞で、セロトニンと共局在していることから、分泌顆粒に発現できていることが確認でき、IgE 感作 impH 発現マスト細胞にアレルゲンを添加すると緑色蛍光を発する脱顆粒が細胞表面で同定できた。

２．アレルゲンをビーズ標識し、脱顆粒とアレルゲンを同時に同定できるようにしその方向性を検討したところ、脱顆粒は抗原が存在する側で顕著に起こっていた。

３．impH 発現マスト細胞を耳介に移入し　IgE 感作後にアレルゲンを投与し皮膚アナフィラキシーを誘導したところ、緑色蛍光の発現が野生型マウスにおいて検出でき、IgE 受容体欠損マウスでは認められなかった。

以上のように申請者は、脱顆粒の *in vitro* および *in vivo* における可視化に初めて成功し、脱顆粒とアレルゲンの位置関係などのこれまで確認できていなかった点を実証した。この技術開発は、将来への展開の可能性を含めて非常に意義ある研究であると言える。

３）研究方法・倫理観

脱顆粒により分泌顆粒の pH が変化することに目をつけ、新規蛍光たんぱく質を脱顆粒の検出に応用した研究ツール開発は、申請者の研究方法に対する十分な知識と技術力によって遂行されたことが伺え、本研究が周到な準備の上に行なわれてきたことが窺える。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果を正しく評価し考察しており、本研究による脱顆粒リアルタイムイメージングは、脱顆粒を抑制できる新規薬剤開発や効果判定の有用なツールとして役立つ可能性を示唆しており、今後の応用展開が期待される。

３．その他

特記すべきことなし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	安藤　聡美
論文審査担当者	主査　樗木　俊聡 副査　山岡　昇司、三浦　修
論　文　題　目	HTLV-1 Tax-Specific CTL Epitope–Pulsed Dendritic Cell Therapy Reduces Proviral Load in Infected Rats with Immune Tolerance against Tax

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)感染によって引き起こされる極めて予後不良な $CD4^+$T 細胞の悪性腫瘍である。ATL 発症の危険因子の一つは、高い持続感染量(プロウイルス量；PVL)である。我々は以前、HTLV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)の主要認識ウイルス抗原である Tax タンパクに対する CTL の機能が、一部の無症候性キャリアで減退していることを報告した。また、CTL 応答は PVL と逆相関する傾向があったことから、減弱した HTLV-1 特異的 CTL 応答は PVL の増加に関与していると考えられる。さらに、我々が今まで行ってきた動物実験による研究結果から、主要感染経路である経口感染は、他の感染経路と比べて PVL が高いことを示してきた。

本研究では、経口感染ラットの Tax 特異的 $CD8^+$T 細胞は、一部の無症候性キャリアで示されたように、検出することはできるが、それらの機能は著しく損なわれていることを突き止めた。また、Tax 特異的 CTL エピトープパルス樹状細胞療法は、Tax に対する免疫応答の低い経口感染ラットであっても増殖能および IFNγ 産生能を保持する Tax 特異的 $CD8^+$T 細胞を誘導し、PVL を減少させた。さらに、我々はほとんどの感染者から単球由来樹状細胞(MoDCs)が誘導でき、*in vitro* で自己の CMV 特異的 CTL を増殖刺激する能力を保持していることが明らかになった。このことは、我々の樹状細胞療法がほとんどの感染者で適用可能であることを示唆している。

以上より、ペプチドパルス樹状細胞免疫療法は、HTLV-1 特異的 CTL 応答が減弱し高い PVL を保持する感染者に対して、機能的な HTLV-1 特異的 CTL を誘導し、結果的に、ATL 発症危険因子の一つである高い PVL を減少させる有用なワクチン療法であると考えられた。

＜緒言＞

成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)は、極めて予後不良の $CD4^+$T 細胞の悪性腫瘍であり、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-1)感染によって引き起こされ、その持続感染量(プロウイルス量；PVL)の多さが ATL 発症危険因子の一つとなっている。HTLV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)は、感染細胞の増殖を制御する重要な免疫細胞のひとつである。しかしながら、我々は以前、一部の無症候性キャリアやほとんどの ATL 患者において、CTL の主要認識抗原である Tax タンパ

クに対する CTL が機能不全になっていることを報告した。さらに、感染者では CTL を誘導・活性化する樹状細胞(DC)が質的にも量的にも低下していることが知られている。このような減弱した CTL 応答は、感染細胞の生存・増殖を許し、その結果、がん化の可能性を高めていると考えられる。

また、我が国の大規模な疫学的調査により、ほとんどの ATL 発症者は母乳を介して乳幼児期に感染していたことが報告されている。さらに、我々は以前、HTLV-1 を経口感染させたラット(PO ラット)で、ウイルス特異的 T 細胞応答が低く、PVL が高いことを報告した。この結果は、粘膜感染が ATL 発症に関与していることを示唆している。

本研究では、PO ラットにおける Tax 特異的 $CD8^+$T 細胞の機能が非常に減弱していることを明らかにした。また、CTL エピトープペプチド DC ワクチンを用いて、PO ラットに認められる減弱した CTL 応答の再賦活化を試み、抗ウイルス効果を検討した。さらに、臨床応用を視野に入れて、感染者の末梢血単球より *in vitro* で誘導した単球由来 DC(MoDC)が自己の CMV 抗原特異的 CTL を増殖刺激できるか否かを検討した。

＜方法＞

ラット(F344/N-Jcl rnu/+)に、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 MT-2 を経口(PO)または腹腔内(IP)投与し感染させた。非感染および PO ラットへのワクチン接種では、エピトープペプチド(Tax180-188)を提示させた骨髄細胞由来 DC(BMDC) $1x10^6$ 個を 1 週間に 1 回ずつ計 3 回皮下投与した。Tax 特異的 CTL の解析には MHC-I 拘束性 tetramer を用い、増殖試験では HTLV-1 感染ラット T 細胞株である FPM1-V1AX を mitomycin C 処理したのちに、抗原として用いた。また、抗原刺激で増殖した tetramer 陽性細胞を PMA/Ionomycin 処理し IFNγ 産生をフローサイトメトリーを用いて検出した。脾細胞中の感染量は定量 PCR で測定した。また、感染者から単球由来 DC(MoDC)を誘導し、CMV 特異的 CTL エピトープペプチドを提示させ、自己の CMV 特異的 CTL への増殖刺激能を確かめた。

＜結果＞

PO ラットの Tax 特異的 CTL は IP ラットと比べて抗原刺激に対して有意に低い増殖能や IFNγ 産生能を示していた。非感染および PO ラットから誘導した BMDC にエピトープペプチド(Tax180-188)を提示させたのち、非感染ラットへ免疫すると、非感染ラット体内に増殖能および IFNγ 産生能を保持する Tax 特異的 $CD8^+$T 細胞が誘導された。非感染ラットおよび PO ラットから誘導した BMDC の CTL 誘導効率や誘導された CTL の機能に有意な差は認められなかった。次に、PO ラット由来の BMDC に Tax180-188 を提示させ PO ラットへ免疫したところ、ワクチン投与した PO ラットで増殖能および IFNγ 産生能を持つ Tax 特異的 CTL を検出できた。また、ワクチン接種群では、ワクチン未接種群に比べ有意に感染量が低かった。興味深いことに、ワクチン接種群の中で、増殖能が高い CTL を保持する半数の個体では PVL は検出感度以下であった。また、残りの半数の個体では、CTL の増殖能は低かったが、未接種群の CTL では認められなかった IFNγ 産生応答が観察された。

さらに、ATL 患者を含むほとんどの感染者の末梢血から MoDC を誘導することができた。ま

た、CMV 特異的 CTL のエピトープペプチドを提示させた感染者由来 MoDC は、*in vitro* で自己の CMV 特異的 CTL を増殖させた。

＜考察＞

PO ラットは、Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞を保持しているが、増殖能や IFNγ 産生能が低かったことから、PO ラットの Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞は免疫寛容状態にあることが示唆された。この状態は、ATL 発症危険群であると考えられる ACs やほとんどの ATL 患者の Tax 特異的 CTL の状態と類似していることが示唆された。

また、PO ラット由来の BMDC は非感染ラット由来の BMDC と同等の抗原提示能を保持しており、免疫抑制状態を示す PO ラット体内に機能的な Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞を誘導し、その結果、PVL を下げたと考えらえる。興味深いことに、増殖能が高い Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞を示すワクチン接種 PO ラットは、PVL が検出感度以下であった。また、増殖能が低い Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞を有するワクチン接種 PO ラットにおいても、PVL はワクチン未接種群の PVL と比べて低い傾向を示していた。注目すべきことに、この個体群の Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞の増殖能は低いにもかかわらず、IFNγ を産生する能力を有していた。このことから、この個体群では Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞の頻度は低いものの、未接種群の Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞とは質的に異なる機能的な Tax 特異的 $CD8^+T$ 細胞がワクチン接種により誘導されたと考えられた。

さらに、ほとんどの感染者由来 MoDC が自己の抗原特異的 CTL の増殖を誘導したことから、感染者由来の MoDC は抗原特異的 CTL を十分に刺激できる能力があり、DC 療法のツールとして使用可能であることが示唆された。

＜結論＞

本研究により、エピトープペプチドパルス DC 療法は、CTL 応答が低下している一部の無症候性キャリアやほとんどの ATL 患者に対して実施可能であると考えられ、本療法は機能的な CTL の誘導を介して、発症・再発の危険因子である高い PVL を低下させることの期待できる有用な ATL 発症予防、治療法となる可能性が考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5172　号	安藤　聡美

論文審査担当者	主　査　　樗木　俊聡 副　査　　山岡　昇司、三浦　修

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、HTLV-1 Tax 抗原特異的ペプチドパルス DC ワクチン療法が、非感染ラットだけでなく免疫寛容感染ラットに同抗原特異的 CTL 活性化を誘導し､プロウィルス量を減少させることを示した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

成人 T 細胞白血病（ATL）は難治性悪性疾患であり、発症危険因子の１つに当該ウィルスの持続感染量（PVL）があるが、多くの ATL 患者では Tax 抗原特異的 CTL が機能不全を示し、CTL 誘導に重要な DC が質量共に低下している。これらの背景下､HTLV-1 経口感染ラット（PO ラット）への HTLV-1 Tax 抗原特異的ペプチドパルス DC ワクチンにより、CTL の賦活化と PVL の低下を試みた。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．非感染および PO ラット骨髄から誘導した DC に Tax ペプチドをパルスシして非感染ラットに免疫すると、Tax 特異的 CTL が誘導された。

２．PO ラット骨髄から誘導した DC に Tax ペプチドをパルスシして PO ラットに免疫した場合、個体差を示したが、Tax 特異的 CTL が誘導された群に関しては PVL も低下した。

３．ATL 患者から DC を誘導し、CMV 抗原ペプチドをパルスして T 細胞と共培養することによって CMV 特異的 CTL の誘導に成功した。

これらの結果は、抗原特異的 DC ワクチンが PO ラットで有効なことを示唆している。さらに HTLV-1 無症候性キャリアや ATL 患者で有望な治療法になる可能性を期待させる。

３）研究方法・倫理観

PO ラットは、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株（MT-2）をラットに経口投与し作製した。DC ワクチンは、骨髄から誘導した DC に Tax ペプチドをパルスして、$1x10^6$ 個を３週間（１回／週）投与した。また、患者末梢血から DC を誘導し CMV 特異的 CTL の誘導を行った。

４）考察・今後の発展性

本研究で示した DC ワクチンが、CTL 機能の低下した HTLV-1 感染者に有効な治療法になる可能性が期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	筒井　英充
論文審査担当者	主査　横関　博雄 副査　樗木　俊聡、東　みゆき
論　文　題　目	The Basophil-specific Protease mMCP-8 Provokes an Inflammatory Response in the Skin with Microvascular Hyperpermeability and Leukocyte Infiltration

（論文内容の要旨）

【要旨】

mMCP-8 (mouse mast cell protease-8)は、好塩基球特異的に発現するセリンプロテアーゼの一つである。その特異性から、これまで mMCP-8 は好塩基球のマーカーとして広く利用されてきたが、生理的機能に関してはほとんど分かっていない。そこで本研究では、組換え型 mMCP-8 を作成しその機能を解析した。マウスの耳介に mMCP-8 を皮内投与した結果、Cyclooxygenase (COX)依存的に皮膚の腫脹と血管透過性亢進が惹起された。加えて、皮膚投与局所におけるケモカインの発現上昇、ならびに好中球やマクロファージ、好酸球といった炎症性細胞の浸潤が観察された。以上の結果から、mMCP-8 は好塩基球の関連する皮膚炎症において、重要なエフェクター分子として機能することが示唆された。

【緒言】

好塩基球は末梢血白血球の 0.5%を占めるに過ぎない稀少な顆粒球で、これまで積極的な研究対象となることはなかった。しかし近年の研究により、アレルギー炎症や寄生虫感染防御などの免疫反応において好塩基球がユニークかつ重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。以前当研究室は、好塩基球が IgE 依存的慢性アレルギー炎症（IgE-CAI）を引き起こす責任細胞であることを突き止めた。しかしながら、好塩基球が炎症を誘導する際の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。

好塩基球とマスト細胞はその類似した特徴から、しばしば混同されることが多い。例えば、両者はともにヒスタミン、プロテアーゼなどを分泌顆粒内に貯蔵しており、IgE と抗原による刺激で脱顆粒し、顆粒成分を細胞外に放出することで炎症を誘導する。一方興味深いことに、近年、好塩基球とマスト細胞の貯蔵するセリンプロテアーゼの種類に違いがあることが報告された。特筆すべきは、それらの一つ mMCP-8 が好塩基球に特異的に発現していることである。この特異性を利用して、今日まで mMCP-8 は好塩基球のマーカーとして汎用されてきた。しかしながら、mMCP-8 自体の持つ生理的機能は未解明のままであった。

そこで本研究では、好塩基球による炎症誘導機構の一端を明らかにするため、好塩基球特異的プロテアーゼ mMCP-8 の機能解析を行った。

【方法】

組換え型 mMCP-8 は Sf9 細胞を用いたバキュロウイルス発現システムにより作製した。プロペプチド直後に FLAG ペプチドを付加した組換え型 mMCP-8 を、Sf9 細胞の培養上清から抗 FLAG 抗体ビーズを用いて精製した。エンテロキナーゼ処理により FLAG ペプチドを除去した組換え型 mMCP-8 を最終産物として実験に用いた。mMCP-8 のコントロール蛋白として Bovine serum albumin (BSA)、あるいは 95℃で 1 時間熱処理した mMCP-8 を使用した。NIH3T3 細胞株の細胞溶解液と mMCP-8 を反応させ、α-tubulin の分解産物を Western blot 法により検出した。mMCP-8 あるいはコントロール蛋白をマウスの耳介に皮内投与した後、皮膚の腫脹を経時的に測定し、血管透過性を Evans blue 色素の滲出量で評価した。また、同様の系をインドメタシン塗布群あるいはエタノール溶媒塗布群（対象群）の二群に分けて実施した。耳介皮膚からコラゲナーゼ処理によって細胞を単離し、炎症性細胞浸潤をフローサイトメトリーで評価した。mMCP-8 の細胞遊走活性を Transwell migration assay により検討した。また、耳介におけるケモカインの遺伝子発現を Q-PCR 法により測定を行った。

【結果】

mMCP-8 のプロテアーゼ活性について NIH3T3 細胞株の細胞溶解液を用いて検討した結果、α-tubulin を分解する活性を持つことが判明した。またこの活性は、mMCP-8 の熱処理により失われた。野生型マウスの耳介に mMCP-8 を皮内投与し、耳介厚を経時的に測定したところ、mMCP-8 投与後 4 時間をピークとした一過性の皮膚腫脹を認めた。この皮膚腫脹は mMCP-8 の濃度依存的に誘導され、mMCP-8 の熱処理により消失した。血管内投与した Evans blue 漏出により皮膚に　おける血管透過性を評価したところ、mMCP-8 投与後 4 時間において血管透過性亢進が観察された。加えてこの現象は、Indomethacin の前処置（塗布）により有意に抑制された。mMCP-8 投与後 6 時間の耳介皮膚における炎症性浸潤細胞浸潤をフローサイトメトリーで評価した。その結果、mMCP-8 による有意な炎症性細胞浸潤は認めなかった。このため、24 時間毎 3 回、mMCP-8 を連続投与したところ、3 回目の投与後 6 時間において有意な炎症性細胞浸潤（好中球、マクロファージ、好酸球）が認められた。mMCP-8 による炎症性細胞浸潤機構を検証するため、in vitro における Transwell migration assay を試みた。しかしながら、好中球、マクロファージ、好酸球に対する mMCP-8 の直接的な遊走活性は認められなかった。そこで、mMCP-8 を投与した耳介におけるケモカインの遺伝子発現を Q-PCR 法で測定した。その結果、炎症性細胞の遊走に関わる *Cxcl1*、*Ccl2*、*Ccl24* などの遺伝子発現が上昇していることが明らかになった。

【考察】

以前より mMCP-8 は好塩基球特異的な分子であることが報告されてきた。このため、好塩基球を同定するためのマーカーとして、あるいは好塩基球特異的な遺伝子改変マウスを作製する際の標的遺伝子として用いられてきた。一方、mMCP-8 の生理的機能に関しては未解明であった。本研究で、mMCP-8 に確かにプロテアーゼ活性が存在し、皮膚において血管透過性亢進や炎症性細胞浸潤を誘導し炎症を引き起こす機能があることが初めて明らかになった。慢性皮膚アレルギー炎症や寄生虫感染防御における好塩基球の生理的役割を考慮すると、好塩基球特異的プロテア

ーゼ mMCP-8 が、これらの炎症反応において重要なエフェクター分子として機能することが示唆される。

mMCP-8 によって誘導される皮膚の腫脹ならびに血管透過性亢進は、インドメタシンの前処置により抑制されたことから、Cyclooxygenase (COX)がこれらの病態形成に関与していることが示唆される。また、mMCP-8 を 1 回皮内投与した場合、細胞浸潤は認めず皮膚の腫脹と血管透過性亢進のみが観察された。一方、3 回投与した場合は炎症性細胞浸潤を認めた。従って、mMCP-8 により誘導される血管透過性亢進は、mMCP-8 による皮膚組織への炎症性細胞浸潤に必ずしも必要ではないと考察される。過去の報告で、Human chymase や mMCP-4 に白血球に対する直接的な遊走活性能が存在することが示されている。mMCP-8 においても、Transwell migration assay を用いて検討したが、好中球、マクロファージ、好酸球に対する mMCP-8 の直接的な遊走活性を認めなかった。従って、mMCP-8 による炎症性細胞浸潤は、他の細胞（皮膚常在細胞など）、あるいは何らかの液性因子や細胞外基質に mMCP-8 が作用した結果生じる間接的な現象である可能性が示唆された。実際、mMCP-8 を投与した耳介皮膚においてケモカインの発現上昇を認めたことから、mMCP-8 は皮膚常在性細胞にケモカインを産生させることで、間接的に炎症性細胞浸潤を引き起こしている可能性がある。

本研究では、好塩基球特異的プロテアーゼ mMCP-8 が、血管透過性亢進、炎症性細胞浸潤を伴う皮膚炎症を引き起こす機能的分子であることを明らかにした。mMCP-8 の好塩基球に限局した発現から、mMCP-8 が好塩基球を特徴づける分子であることが示唆される。今回新たに分かった mMCP-8 の炎症誘導作用を考慮に加えると、好塩基球由来の mMCP-8 がアレルギー炎症や寄生虫感染防御において、重要なエフェクター分子として機能している可能性が高い。

【結論】

好塩基球特異的分子 mMCP-8 の機能解析を行った結果、mMCP-8 に確かにプロテアーゼ活性が存在し、マウスおいて血管透過性亢進、炎症性細胞浸潤を伴う皮膚炎症を誘導することを明らかにした。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5173　号	筒井　英充
論文審査担当者	主　査　横関　博雄 副　査　樗木　俊聡、東　みゆき	

（論文審査の要旨）

１、論文内容

好塩基球特異的に発現するセリンプロテアーゼである mMCP-8 (mouse mast cell protease-8) は好塩基球のマーカーとして使用されていたが、生理的機能に関しては明らかにされていない。申請者は､組換え型 mMCP-8 を作成し mMCP-8 の機能と皮膚炎症反応における役割を解析した。まず、mMCP-8 はα-tubulin を基質としたとき強い蛋白分解活性があることを明らかにした。さらに、マウスの耳介に mMCP-8 を皮内投与した結果、Cyclooxygenase (COX)依存的に皮膚の腫脹と血管透過性亢進が惹起された。さらに、mMCP-8 をマウスに皮内投与して耳介皮膚のケモカインの遺伝子発現を Q-PCR 法で解析した結果その発現が増強しさらに好中球やマクロファージ、好酸球といった炎症性細胞の浸潤が認められた。以上の結果から、mMCP-8 は好塩基球の関連する皮膚炎症において、重要なエフェクター分子として機能することが示唆された。

申請者は自らの言葉で研究の背景と目的、研究方法、結果の解釈と意義、今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の高度な研究能力とその基礎となる豊富な学識に基づき実践されたものであることが確認された。

２、論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

好塩基球特異的に発現するセリンプロテアーゼである mMCP-8 (mouse mast cell protease-8)の皮膚炎症における機能を明らかにした点で非常に有意義な研究と考えられ独創的で評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は

１．　mMCP-8 は好塩基球の関連する皮膚炎症において、重要なエフェクター分子として機能することが示唆された点は有意義であり mMCP-8 をターゲットとした新規治療法が期待できる。

２．　mMCP-8 は炎症のマーカーにもなり重症度の診断可能に有用である可能性があり臨床的に意義のある研究と考えられた。

３）研究方法・倫理観

好塩基球に選択的に発現する mMCP-8 の皮膚炎症における機能を明らかにするため、組換え型 mMCP-8 は Sf9 細胞を用いたバキュロウイルス発現システムにより作製した。mMCP-8 を皮内投与した耳介皮膚から細胞を単離し、炎症性細胞浸潤をフローサイトメトリーで評価した。mMCP-8 の細胞遊走活性を Transwell migration assay によりまた、耳介におけるケモカ

インの遺伝子発現を Q-PCR 法により測定を行った。

本手法は十分な免疫学的知識と遺伝子学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

３、審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	森丘　千夏子
論文審査担当者	主査　田賀　哲也 副査　岡澤　均、寺田　純雄
論　文　題　目	Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on periventricular leukomalacia-like brain injury in neonatal rats

（論文内容の要旨）

要旨

脳室周囲白質軟化症（PVL）は早産児に認められる合併症であり、脳性麻痺の原因となる。本研究では、炎症による実験的脳室周囲白質損傷モデルに対して臍帯由来間葉系幹細胞（MSC）とその培養上清(MSC-CM)の効果を検討した。まず日齢 4 の新生仔ラットに LPS を腹腔内投与し白質損傷モデルを作製した。次に白質損傷ラットに MSC、MSC-CM を腹腔内投与し、培地のみを投与したコントロールと比較した。脳室周囲白質量は脳切片の Myelin Basic Protein（MBP）免疫組織染色を定量し、脳組織の炎症性サイトカインレベルは RT-PCR 法にて測定した。MBP 陽性領域は、LPS 投与により有意に減少し、MSC 投与により改善が認められたが、MSC-CM 投与では改善を認めなかった。脳の IL-1β は LPS 投与により有意に上昇し、MSC 投与により有意に低下した。また、新生仔ラットの血清中で上昇していた IFN-γ に着目し、IFN-γ で刺激した MSC-CM を投与したところ、白質量の改善が認められた。*in vitro* の実験において、MSC への IFN-γ 投与により TNF-stimulated gene 6（TSG-6)、indoleamine 2,3-dioxygenase（IDO）の発現が上昇し、抗炎症作用が増強すると考えられた。

緒言

PVL は主に早産児の脳室周囲白質が減少する疾患で、脳性麻痺に至るため早産児の予後に重大な影響を与える。頻度は早産児の 2-4%と多いにも関わらず、有効な治療法が未だ確立されていない。原因として子宮内感染、神経細胞や血管の未熟性、虚血と再灌流、サイトカインによるマイクログリアの活性などが複合的に加わり、オリゴデンドロサイトの前駆細胞が障害をうけ、髄鞘の形成不全がおこる。

一方、MSC は骨髄、脂肪などの成体組織から採取し、*in vitro* で増殖可能な、自己複製能と多分化能を有する間葉系幹細胞である。最近、MSC が外胚葉系である神経細胞にも分化が可能であることが示され、さらに *in vitro* ではアストロサイト、オリゴデンドロサイトにも分化するという報告もでている。一方、移植した MSC は移植部にほとんど生着していないことが報告され、損傷した組織細胞への MSC の分化による組織修復に加えて、MSC が産生、分泌するパラクラインファクターによる免疫調節、炎症制御、組織修復促進、抗アポトーシス、血管新生などが機序とし

て報告されている。

近年、低酸素性虚血性脳症や脳梗塞などの虚血性疾患において、MSC の投与による再生治療が報告されているが、炎症性の脳損傷においてはまだ治療効果の報告は少ない。本研究では、LPS 投与による実験的白質損傷ラットモデルを作製し、臍帯由来 MSC および MSC-CM の治療効果を検討した。MSC は白質損傷を軽減することが示されたが、MSC-CM では治療効果を認めなかった。また、*in vitro* において MSC を IFN-γ で刺激したところ、TSG6 や IDO の発現が増強しており、白質損傷ラットモデルに IFN-γ で刺激した MSC-CM を投与したところ白質損傷は軽減した。

方法

ラットの日齢 4 はヒトの妊娠 26 週前後に相当するため、日齢 4 の新生仔ラットに LPS（15mg/kg）を腹腔内投与し、脳室周囲白質の損傷を脳切片の MBP 免疫染色と caspase-3 により確認した。MSC は promo Cell 社から購入した臍帯由来 MSC と東大医科学研究所より提供された臍帯由来 MSC を使用した。MSC-CM は、無血清培地に交換し 48 時間培養後 20 倍濃縮して用いた。

日齢 4 に LPS を腹腔内投与し、同日に MSC を投与（10^6 個/匹）、また同日から連日 4 日間 MSC-CM（100μL）または IFN-γ で刺激した MSC-CM（100μL）を投与した。無血清の培地のみを治療群のコントロールとして同様に投与した。

脳組織を日齢 6 と 12 に採取し、日齢 6 に RT-PCR によるサイトカインの解析、日齢 12 に組織切片の免疫染色により白質障害を評価した。

また、*in vitro* において MSC にリコンビナント IFN-γ（10 ng/ml）を投与し、TSG-6 や IDO の発現を RT-PCR 法を用いて無刺激の MSC と比較した。

結果

LPS を投与したラットでは血清中の IFN-γ が上昇しており、脳組織中の IL-6、TNF-α、IL-1β、MCP-1 は有意に上昇した。また、LPS 投与により脳の MBP 免疫染色に対する反応性の低下と caspase-3 陽性細胞の増加が認められた。MSC は、脳組織中の IL-1β の発現を有意に抑制し、LPS によって減少した MBP 陽性領域を増加させた。MSC-CM は、LPS によって減少した MBP 陽性領域を増加させなかったが IFN-γ で刺激した MSC-CM では MBP 陽性領域を有意に増加させた。IFN-γ で刺激した MSC では、TSG-6、IDO の発現が著明に上昇した。

考察

本研究の目的は、炎症を主体とした PVL モデルに対し MSC が治療効果を有するかを確認することであった。私達は、オリゴデンドロサイトの前駆細胞が脳室周囲に増えると言われている日齢 4 に高用量の LPS を投与し PVL モデルを作製した。またこのモデルに投与した MSC は有意に白質量を増加させた。またこのとき、MSC は LPS 投与による脳組織中の IL1-β の上昇を有意に抑制した。虚血に起因する PVL モデルに対する MSC の治療効果が Zhua らにより 2014 年に報告され、他の虚血性脳損傷モデルにおいても MSC の治療効果は報告されている。しかし、炎症による脳損傷に対する MSC の治療効果の報告は少ない。今回私たちは MSC が炎症に起因した PVL に対し治癒効果をもつことを示し、MSC の効果の機序の一つに抗炎症効果があることを示した。

次に私達は、MSC 投与による脳の白質量減少の抑制効果が、MSC が分泌する液性因子によるものかどうかを検討するために、MSC 培養上清を用いて同様の実験を行った。驚いたことに、MSC 培養上清では明らかな白質量の改善を認めなかった。全身投与された MSC は障害部位にはほとんど生着せずにパラクラインファクターが炎症や免疫反応を制御することにより治癒効果を発揮しているとの報告がある。私達の実験では、少なくとも治療効果のあった MSC と同等量の MSC が分泌した培養上清では治療効果を示さなかった。

Duijvestein は、MSC は IFN-γ などの炎症刺激に暴露されていると抗炎症効果を発揮すると報告している。私達は、MSC と MSC 培養上清の治癒効果の違いは IFN-γ に MSC が暴露されたかどうかによるのではないかと考えた。IFN-γ で刺激した MSC の培養上清は刺激なしの培養上清と比較し MBP レベルを改善させることを示した。また、*in vitro* では MSC のもつ強力な抗炎症作用として最近注目されている TSG-6 と IDO の発現が、IFN-γ 刺激 MSC において増強していた。このことは IFN-γ の前処理は MSC の治療効果を増強させることを示唆している。これまでに、MSC を前処理することで治療効果を増強させうるという報告はいくつかある。Chen らは、放射線障害小腸モデルにおいて MSC を放射線照射した小腸細胞と共培養した後の培養上清は、治療効果を増強することを示している。また、TNF-α、IL-1β、Nitric oxide により前処理した MSC の培養上清もより効果的であることを示している。*In vitro* においても、IFN-γ によって前処理された MSC は強力な免疫調節作用を示すことが報告されている。私達の結果はこれらの報告と矛盾していない。

今回の結果では、脳組織中の IL-1β などの炎症性サイトカインは MSC-CM 投与においても抑制傾向にあったので、MSC と MSC-CM の効果の違いにおいて、抗炎症効果以外にも抗アポトーシス、細胞の分化促進などについて検討する必要がある。今後これらの因子を検討し、さらに MSC の効果の機序について探求していきたいと考えている。

結論

私達は新生仔ラットに LPS を腹腔内投与することにより PVL 様の脳障害が引き起こされ、MSC 投与は白質損傷を改善させることを示した。また IFN-γ で刺激した MSC の培養上清は刺激なしの培養上清と比較し有意に白質損傷を改善させることを示した。このことは炎症環境にある MSC の方がより治療効果的な因子を放出することを示唆している。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5174　号	森丘　千夏子
論文審査担当者	主　査　　田賀　哲也 副　査　　岡澤　均、寺田　純雄	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、LPS 腹腔内投与ラットを脳室周囲白質軟化症（PVL）モデルとして用い、間葉系幹細胞の腹腔内投与による PVL 様病態の改善という知見および、IFNγ 刺激間葉系幹細胞における炎症抑制性因子群の発現増強という知見について報告するとともに、その臨床的意義を論じたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

PVL の病態解明について LPS 腹腔内投与ラットを工夫して取り組み、間葉系幹細胞投与による改善効果を見出し、また間葉系幹細胞から産生される炎症抑制性因子群の関与を示唆した点で、本研究の目的は先駆性・独創性のいずれにおいても高い。

２）社会的意義

モデルラットを用いて PVL における間葉系幹細胞による改善効果および関与する因子群を示唆したことは、今後治療法の開発につながる可能性があり、社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

モデルラットおよびヒト間葉系幹細胞を適切に用いた研究方法を組み立てており、また、倫理的な考察もなされている。

４）考察・今後の発展性

本論文は今後、開発的研究へ展開できる可能性を示唆するものであり、発展が期待される。

３．審査結果

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	岩田　乃理子
論文審査担当者	主査　田中　真二 副査　石野　史敏、明石　巧
論　文　題　目	Clinical Significance of Methylation and Reduced Expression of the Quaking Gene in Colorectal Cancer

（論文内容の要旨）

（要旨）

DNA メチル化は癌抑制遺伝子の不活化に関与し、大腸癌においてもその役割は大きいことが知られている。我々はマイクロアレイ網羅的解析手法を用いて DNA メチル化により発現低下していると思われる候補遺伝子を抽出した。その中で、複数の癌種で発現低下が報告され癌抑制遺伝子と考えられている QKI(RNA-binding protein quaking)に着目した。大腸癌患者 156 例において QKI メチル化と遺伝子発現、またその臨床病理学的特徴について調べた。

大腸癌患者の 32.1%に QKI メチル化を認め、メチル化が見られた症例において正常組織と比較し癌組織の mRNA の発現低下を認めた(p=0.049)。

また、免疫染色を用いて大腸癌における QKI の発現を調べたところ、47.7%が QKI 低発現であった。臨床病理学的因子との相関を調べたところ、低発現群で有意に術後再発が多いことが分かった。(p=0.004) さらに、多変量解析を行ったところ Stage Ⅰ-Ⅲにおいて QKI 低発現は術後再発の独立した危険因子であった。また高発現群と比較し低発現群は Relapse-free survival (p=0.007)および Overall survival(p=0.042)ともに有意に予後不良であった。Stage Ⅱ-Ⅲでも同様の結果であった。

QKI 低発現は術後再発を予測する上で有用なバイオマーカーとなりうることが示唆された。

（背景）

大腸癌は日本のみならず世界的にも死因の上位を占め　近年　診断や治療法の進歩により死亡率の改善に貢献してきた。しかし一方で発がんメカニズムやその成り立ちについて生物学的機序の解明はいまだ不十分である。DNA メチル化は癌抑制遺伝子の不活化に重要な役割を果たしていることが知られている。最近の報告では網羅的メチル化解析により遺伝子のメチル化がアポトーシスのコントロールや細胞周期の制御など行っていることが知られている。また、発癌メカニズムに関わる可能性のある遺伝子の同定において　ある特定の遺伝子の Promoter methylation は異なる癌種の hallmark となったり診断や癌の分類などに役立ったり可能性がある。たとえば大腸癌においては CIMP(CpG Island Methylator Phenotype)や BRAF 遺伝子の変異などに代表される。

本研究では網羅的解析手法を用いてメチル化で発現低下したと考えられる癌抑制遺伝子をスクリーニング抽出することを目的とした。そこで我々は大腸癌で発現低下が報告されている RNA binding protein quaking(QKI)に注目し、大腸癌における発現とその臨床病理学的意義について調べた。

（方法）

脱メチル化(DAC)処理を行う前後の 5 つの cell line(RKO HCT116 HT29 colo320DM SW480)から抽出した RNA と、17 の大腸癌患者から抽出した癌組織および正常組織から抽出した total RNA を用いてオリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイ解析のデータを基に、cell line の RKO(CIMP)で少なくとも DAC 処理後に 2 倍以上発現上昇しているもので、かつ 17 の臨床検体で正常組織に比べて癌組織で 1.5 倍以上発現低下している遺伝子を抽出した。最終的に抽出された 11 遺伝子の中から RNA binding protein quaking(QKI)に着目した。156 の大腸癌患者臨床検体を用いて total RNA c DNA gDNA を抽出、Real-time PCR を用いて mRNA 発現を測定、また Methylation-specific PCR(MSP)にてメチル化解析を行った。遺伝子発現は免疫染色を用いて Intensity grade および Extensity grade を用いて解析した。

（結果）

32.1%の大腸癌患者に QKI メチル化を認め、これらの患者において mRNA 発現を調べたところ正常組織に比べて有意に癌組織での発現低下を認めた(p=0.049)。一方でメチル化が見られなかった症例において発現差は明らかでなかった(p=0.397)。

免疫染色によって大腸癌における QKI 遺伝子発現を調べたところ低発現群は 75 例、高発現群は 81 例であった。これらの結果と臨床病理学的因子との相関について単変量解析を行ったところ、低発現群で有意に術後再発が高かった(p=0.004)。また stage Ⅰ-Ⅲにおいて QKI 発現と術後再発について単変量・多変量解析を行ったところ、QKI 低発現は独立した術後再発の危険因子として抽出された(p=0.015)。stage Ⅱ-Ⅲでも同様の結果であった。(p=0.025)また Relapse-free survival および Overall survival で比較検討したところ、低発現群で有意に予後不良であった(p=0.007)(p=0.042)。

（考察）

QKI(RNA binding protein quaking)は RNA family 蛋白のシグナル伝達や活性化に関わる RNA 結合蛋白として知られており、多形膠芽腫や統合失調症で発現低下していることが報告されている。また複数の癌腫で発現低下が報告されており、細胞周期や分化 アポトーシス、細胞運命決定や発達 血管新生などに関わってのではといわれている。大腸癌での発現低下も報告されており、QKI 発現低下は β カテニンや p27kip1 シグナルなどの異常制御に関わっているのではといわれている。

我々の研究では、大腸癌患者の 47.4%で QKI 低発現が見られ、またこれら患者は有意に術後再発が多いことが分かった。また多変量解析によると、stage Ⅰ-Ⅲおよび stage Ⅱ-Ⅲにおいて独立

した再発リスク因子であることがわかった。さらに RFS および OS においても QKI 低発現群は高発現群に比べて有意に予後不良であった。この結果から QKI 発現は大腸癌において予後予測因子になりうる可能性が示せた。

QKI プロモーター領域のメチル化が見られた患者群では、正常組織と比較し癌組織での QKImRNA 発現低下を認めた。一方でメチル化が見られなかった患者群では明らかでなかった。このことから QKI メチル化は mRNA レベルでの QKI 発現低下に関わっている可能性が示唆された。

大腸癌では stageⅢ患者に対する補助化学療法は予後改善を期待できるスタンダードな治療であるが、stageⅡ患者の特にハイリスク患者に対する補助化学療法の効果は未だ議論の余地がある。我々の研究では、stageⅡ-Ⅲ大腸癌患者において QKI 発現群は、有意に術後再発が多く予後不良であり補助化学療法のよい適応となるのではと考える。またメチル化が QKI 発現に関わっている可能性が示唆され、脱メチル化剤の治療応用も期待できると考える。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5175　号	岩田　乃理子
論文審査担当者	主　査　田中　真二 副　査　石野　史敏、明石　巧	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は大腸癌における RNA-binding protein quaking (QKI)発現低下と臨床病理学因子との関連についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

大腸癌において DNA メチル化によって mRNA 発現抑制を認める QKI について、切除症例 156 例における免疫染色所見と臨床病理学因子、予後との関連について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 大腸癌組織の 32.1%に QKI DNA メチル化を認め、メチル化が見られた症例において正常組織と比較し癌組織の mRNA の発現低下を認めた(p=0.049)。
2. 免疫染色を用いて大腸癌における QKI の発現を調べたところ、47.7%が QKI 低発現であった。
3. 臨床病理学的因子との相関を調べたところ、低発現群で有意に術後再発が多いことが分かった(p=0.004)。多変量解析を行ったところ StageⅠ-Ⅲにおいて QKI 低発現は術後再発の独立した危険因子であった。
4. 高発現群と比較し低発現群は relapse-free survival(p=0.007)および overall survival(p=0.042)ともに有意に予後不良であった。StageⅡ-Ⅲでも同様の結果であった。

以上のように申請者は、QKI 低発現は大腸癌術後再発を予測する有用なバイオマーカーとして示唆されることを明らかにしている。これは臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には本学医学部附属病院で根治切除がなされた大腸癌症例 156 症例が用いられ、切除標本の QKI 免疫染色所見と予後の相関を調べている。十分な病理組織学的知識、技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。また、本学医学部倫理審査委員会の承認を得ており、本研究が十分な準備の上に行われてきたと考えられる

（831 消化器癌および乳癌の発生と進展、治療効果、予後に関わる因子の解析）。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によって QKI 低発現が大腸癌術後再発を予測する有用なバイオマーカーのひとつとなる可能性を考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に値する十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	陳　悦
論文審査担当者	主査　西村　栄美 副査　尾林　聡、小川　佳宏
論　文　題　目	Physiological and functional changes in the stratum corneum restored by oestrogen in an ovariectomized mice model of climacterium

（論文内容の要旨）

＜要約＞

閉経期以降に皮膚の「乾燥」が生じることは広く知られ、ホルモン補充療法で回復するためエストロゲンの欠乏が閉経期以降の乾燥症の原因と考えられている。しかし、エストロゲンの欠乏によって「乾燥」が生じるメカニズムはほとんど明らかにされていない。我々は、閉経期モデルとして卵巣摘出マウスを用い、乾燥症に関連する表皮の角質機能として角質水分量、皮膚バリア機能回復能、角質強度を検討した。卵巣摘出マウスでは角質水分量、皮膚バリア機能回復能、角質強度のいずれも悪化し、刺激性皮膚炎が増強することが明らかになった。卵巣摘出に伴うこれらの異常はエストロゲン投与により回復した。閉経期以降の「乾燥」と認識されている変化は、表皮においては単純な乾燥ではなく、角質の機能異常として認識する必要があり、更年期での掻痒や被刺激性亢進を誘導していると考えられる。また、卵巣摘出やエストロゲンの投与は真皮の細胞外マトリックスの増減と関連し、表皮、特に角質の構造および機能的な変化と連動して、皮膚の「乾燥」を印象づけると考えられる。

＜緒言＞

更年期は女性にとって身体的、精神的に大きな変動をもたらす。ホットフラッシュ、外陰部萎縮、骨粗鬆症などに加えて、いわゆる皮膚の「乾燥」も主要な症状であり、掻痒や被刺激性などの不快感や細かい皺の形成に関連する。

更年期のいわゆる「乾燥」のメカニズムは明らかでない。角質水分量は額面通り角質に含まれる水分量であり、直接「乾燥」を反映すると言える。しかし、ヒトでの研究ではホルモン補充療法による角質水分量上昇は報告されているが、更年期での角質水分量低下は明らかではない。一方、皮膚の最外層にある角質は常に様々な刺激にさらされ、皮膚バリア機能の破壊と修復を繰り返している。この様な刺激に対する防御能や破壊からの回復力は皮膚バリア機能の恒常性維持に重要な役割を有しており、その障害は角質や皮膚の異常に直結し、一般に感じる「乾燥」につながる。これらの角質機能を評価し、卵巣摘出マウスでの角質異常とエストロゲン投与によるその回復を明らかにしたので報告する。

＜方法＞

マウス：HR-1（ヘアレス）マウス、C57BL/6 (B6) マウスと BALB/c マウスの雌、7 週齢を用いた。有毛マウスでは剃毛が必要であり、角質水分量と経表皮水分喪失が正常に復す 1 週間後に角質機能評価を行った。

卵巣摘出術とその検証：背部皮膚からのアプローチで卵巣を摘出した。Sham 手術を行ったマウスを対照として用いた。性周期に一致した膣スメア像の変動が消失することで卵巣摘出の成否を確認した。膣スメアは 5 μl の PBS で膣を洗浄して細胞を採取し、ギムザ染色を行った。連続する 5 日間膣スメアを作製し、有核、無核の角化細胞、白血球の比率により性周期を確認した。

角質機能評価方法：

①急性皮膚バリア破壊モデル：経表皮水分喪失量（transepidermal water loss：TEWL)は Tewameter® TM 300 (Courage and Khazaka, Cologne, Germany)で計測した。D-squame™ テープを用いてテープストリッピング行い、TEWL が 80-100 g/m²h に達するまで皮膚バリア破壊を行った。

②角質水分量：Corneometer CM 825 PC (Courage and Khazaka, Cologne, Germany) で測定した。

③バリア回復能：バリア破壊前、直後、3 時間、7 時間、24 時間後に、TEWL を測定した。バリア回復率は以下の算式に従って計算した。1-(破壊直後 TEWL －時間点 TEWL)/(破壊直後 TEWL－破壊前 TEWL) ×100%

④角質 integrity 及び cohesion：テープストリッピング前と 2 回のテープストリッピング毎に TEWL を測定し角質強度 integrity を評価した。テープストリッピングに用いた D-squame™ テープに付着した角質蛋白を 1M NaOH で抽出し、BCA Protein Assay Kit (TaKaRa, Japan) で定量した（cohesion)。

エストロゲン補充療法：60 日間持続的に Estradiol-17β（E2）を徐放するように設計された徐放性 E2 錠（0.12 mg)（Innovative Research of America 社）を卵巣摘出と同時にマウス背部皮下に埋入した。

エストラジオール血中濃度：卵巣摘出、エストロゲン補充術 6 週間後に HR-1 マウスの尾から静脈血を採取し、血清を-20℃で保存し、Mouse/Rat Estradiol ELISA kit（Calbiotech, Spring Valley, USA)で E2 濃度を測定した。

刺激性皮膚炎： 0.5%または 1%クロトンオイル 20 μl を BALB/c マウスの右耳介の内外側に塗布した。外用前、外用後の 30 分、1 時間、6 時間、9 時間、24 時間に耳介の厚さを micrometer (Mitsutoyo)で測定した。

＜結果＞

卵巣摘出の確認と血中 E2 濃度

膣スメアによる性周期消失により卵巣摘出を確認した。血清中の E2 濃度は卵巣摘出マウスと対照マウスでは測定限界以下であったが、E2 投与マウスの血清中 E2 濃度は平均 654±334 pg/mL であり、ヒト性周期中の最高値（排卵期）の約 3 倍であった。

角質水分量
HR-1 マウスでは、対照マウスと比較して卵巣摘出 1、4 週間後は差が無く、6 週間後に角質水分量が有意に低下した。B6 マウスでは卵巣摘出 1 週間後には差が無く、6 週間後に角質水分量が有意に低下した。
皮膚バリア回復能
B6 マウスでは卵巣摘出 1 週間後には卵巣摘出マウスの皮膚バリア破壊 3、7、24 時間後の皮膚バリア機能回復が遅れ、卵巣摘出 6 週間後には皮膚バリア破壊 3、7 時間後の回復が遅れた。HR-1 マウスでは卵巣摘出 6 週間後に皮膚バリア破壊 24 時間後の皮膚バリア機能回復が遅れた。
角質 integrity と cohesion
HR-1 マウスで実験を行い、卵巣摘出 1 週間後では対照マウスと integrity にほとんど差がなかったが、卵巣摘出 4 週後には 6 回、8 回のテープストリッピング時の TEWL が上昇し、卵巣摘出 6 週間後には 6 回、8 回、10 回のテープストリッピング時の TEWL が有意に上昇した。卵巣摘出 6 週間後に cohesion を測定し、4 回、6 回、8 回のテープに付着した蛋白量が対照マウスより有意に多かった。
エストロゲン補充療法
HR-1 マウスを用いて実験を行った。卵巣摘出マウスへのエストロゲン補充により、卵巣摘出 6 週間後に観察された角質水分量の低下はコントロールマウスと同等以上であり、低下した皮膚バリア機能回復能はコントロールマウスと同等であった。角質 integrity の脆弱化は消失し、むしろ角質強度が増していた。
刺激性皮膚炎
卵巣摘出 6 週間後の卵巣摘出 BALB/c マウスでは、1%クロトンオイルによる刺激性皮膚炎が外用 24 時間に対照マウスより強く、エストロゲン補充マウスは外用 0.5，1，3，6，9、24 時間後に卵巣摘出マウスより炎症が抑制された。0.5%クロトンオイルによる刺激性皮膚炎は、卵巣摘出マウスは外用 3，6，24 時間後に対照マウスより増強され、エストロゲン補充マウスでは 3，6，9，24 時間後に卵巣摘出マウスより炎症が抑制された。

＜考察＞

本研究は卵巣摘出による閉経期マウスモデルにおいて、角質水分量低下、皮膚バリア機能回復障害、角質の脆弱性を明らかにした世界初の報告である。また、エストロゲン補充療法によりこれらの異常が回復することからエストロゲン欠損が最も大きな原因であることが推測された。

いわゆる「乾燥」は更年期の主要な臨床徴候の一つであり、蟻走感、掻痒、被刺激感、細かいシワなどの症状に強く関連すると考えられている。本研究では、卵巣摘出マウスで角質水分量低下が明らかとなったが、ヒト更年期と更年前期の比較では皮膚の乾燥を直接的に反映する角質水分量の減少を示した報告はない。急激な卵巣摘出と比較し、慢性に経過する卵巣機能低下とヒトでの個体差によるバラツキが明確な差を見出しにくくしている可能性がある。

角質は皮膚の最外層にあり常に洗浄、擦過などの物理的外力に晒されており、セラミドなどの角質細胞間脂質が最も重要な役割を担う。皮膚バリア機能は破壊と速やかな回復とのバランスで維持され、その回復能は内因性とも言えるストレスや炎症によっても低下する。皮膚バリア機能

障害は異物の侵入を容易にするばかりでなく、刺激による皮膚の炎症を強くすることが知られており、角質機能異常のみならず皮膚への悪影響を誘導する。本研究の成果は卵巣摘出が皮膚バリア機能回復障害の一因となることを明らかにした。

さらに、卵巣摘出マウスでは角質強度が減弱することが明らかとなった。剥離蛋白の増加とリンクするため、角質細胞の接着が減弱していると推測される。角質強度は外力からの防御に直結し、その異常は角質剥離による皮表の粗造化や炎症につながる。デスモグレイン１，デスモコリン１、コルネオデスモゾームなどが角質細胞の接着に関与し、これらの分子の分解酵素とその inhibitor である LEKT1 などのバランスで角質細胞接着が制御されている。卵巣摘出によるエストロゲン低下によりこのバランスが変化したものと思われる。

本研究で明らかとなったように、角質水分量の低下以外の異常を併せて考えた方が更年期のいわゆる「乾燥」が理解しやすい。さらに、更年期だけでなく卵巣摘出術を受けた更年期前の患者に生じる更年期角化腫は、荷重部に高度な角化を生じることが知られおり、角質強度の低下で説明しやすい。

刺激性皮膚炎の炎症が更年期モデルで増強することは更年期の被刺激性などを反映している可能性がある。また、卵巣摘出マウスで観察された角質異常が炎症を増強する質的異常を含有していることを示している。角質異常による刺激物質の侵入増加や表皮細胞の炎症性サイトカイン、ケモカイン産生がエストロゲンの低下によって増強されることなどがそのメカニズムと考えられる。

本研究では卵巣摘出で生じた異常がエストロゲンで回復した。これはエストロゲンが角質機能と外的刺激からの刺激に保護的に作用することを示している。更年期だけでなく、性周期の中でエストロゲン低下時にアトピー性皮膚炎の症状が増悪するような現象とも関連する可能性がある。また、エストロゲンは外用ステロイドによる真皮の細胞外マトリックス分解にも阻止的に作用することが知られ、角質保護作用と抗炎症作用を有するため、乳がんや子宮体がん、血栓などの副作用を克服できれば、貴重な炎症性皮膚疾患治療薬となりえる可能性がある。

＜結論＞

卵巣摘出による更年期マウスモデルでは、角質水分量低下、皮膚バリア機能回復能障害、角質強度低下、刺激性皮膚炎の増強が観察され、いずれもエストロゲンで回復した。これらは更年期における角質異常の新たな知見である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5176　号	陳　悦
論文審査担当者	主　査　西村　栄美 副　査　尾林　聡、小川　佳宏	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、閉経に伴う皮膚の乾燥のメカニズムを明らかにするために、マウスを用いて卵巣摘出、およびエストロゲン補充を行い、皮膚角質の構造変化、角質水分量およびバリアー機能の低下､易刺激性とエストロゲン補充によるこれらの回復についてはじめて明らかにしたものである。閉経後の皮膚の乾燥や乾皮症の発症機構およびその対策に関して、臨床的にも有用な成果であると言える。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ヒトでの研究においてホルモン補充療法による角質水分量上昇は報告されているものの、更年期における皮膚バリアー機能の低下や角質の変化については明らかではなく、そのメカニズムについては明らかにされてこなかった。本研究においては、皮膚の角質の機能や成分を評価し、卵巣摘出マウスでの角化異常とこれに基づくバリアー機能の低下および易刺激性、そしてエストロゲン投与によるその回復をはじめて明らかにしたものであり、その着眼点や独創性は評価に値する。

２）社会的意義

更年期の女性においては、ホットフラッシュ、外陰部萎縮、骨粗鬆症などに加えて、いわゆる皮膚の「乾燥」も主要な症状であり、掻痒や被刺激性などの不快感や細かい皺の形成、乾皮症などを引き起こす。とくに皮膚において乾皮症はじめ、皮膚の乾燥に伴い外界からの刺激に反応しやすくなり種々の炎症性皮膚疾患への罹患頻度が増加する。閉経とこれらの皮膚疾患の発症を繋ぐ重要な研究成果であると言える。

３）研究方法

本研究においては、卵巣摘出マウスを用いて皮膚の角質の機能や成分を評価し、角化異常とこれに基づくバリアー機能の低下および易刺激性、そしてエストロゲン投与によるその回復を明らかにしたものであり、本手法は十分な内分泌学的、皮膚科学的、組織学的な知識と技術の裏付けのもとに遂行されたものであり、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが窺える。

４）考察・今後の発展性

本研究で明らかとなったように、エストロジェン不足による角質水分量の低下やバリアー機能の低下、さらに補充による回復を考えあわせると、更年期の皮膚の乾燥やそれに伴う皮膚疾患の発症機構が容易に理解出来るようになる。また刺激性皮膚炎において見られる炎症が、マウスの閉経モデルで増強することは更年期皮膚の易刺激性を反映している可能性がある。さらに、更年期だけでなく、性周期の中でエストロゲン低下時にアトピー性皮膚炎の症状が増悪する現象とも関連する可能性がある。エストロゲンは、このように皮膚のバリアー機能の強化と抗炎症作用を有するため、乳がんや子宮体がん、血栓などの副作用を克服できれば、更年期の皮膚乾燥のみならず、炎症性皮膚疾患の治療においても有効かもしれないと妥当な考察がなされている。今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	鈴木　一史
論文審査担当者	主査　三浦　修 副査　清水　重臣、東田　修二
論　文　題　目	Antimyeloma activity of bromodomain inhibitors on the human myeloma cell line U266 by downregulation of MYCL

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ブロモドメイン阻害薬は c-MYC を発現制御することで抗腫瘍効果を発揮することが知られている。ヒト骨髄腫細胞株 U266 は MYC ファミリーのうち c-MYC ではなく主に MYCL を発現している。そこで、MYCL を高発現する U266 細胞におけるブロモドメイン阻害剤の有効性と作用機序を解明する目的で以下の実験を行った。まず、U266 細胞に対して２種類のブロモドメイン阻害薬である I-BET151、JQ1 を暴露したところ、MTS 分析にて細胞増殖を抑制することがわかった。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析では、G1 停止を認めたがアポトーシスの誘導は認められなかった。U266 細胞に対して I-BET151 を暴露した細胞と非暴露の細胞集団から抽出した RNA を試料としてマイクロアレイ解析、及び定量リアルタイム PCR による比較検討を行ったところ、I-BET151 暴露により MYCL1 遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。c-MYC 遺伝子は I-BET151 の暴露の有無によらず低発現であった。遺伝子セット濃縮分析では MYC 遺伝子セットの発現が有意に減少した。パスウェイ解析では、細胞周期に関連する経路に関する遺伝子群の発現低下を認めた。これらの結果は、c-MYC を高発現するヒト骨髄腫細胞株 KMS11 に I-BET151 を暴露した場合と同様の結果であった。以上より、ブロモドメイン阻害薬は c-MYC ではなく MYCL を高発現するヒト骨髄腫細胞株 U266 に対しても、MYCL の発現制御を介して G1 停止を誘導することで抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。このことは、MYCL を高発現する種々の固形腫瘍に対してもブロモドメイン阻害薬が抗腫瘍効果を持つ可能性を示唆しており、有意義な知見と考えられた。

＜緒言＞

多発性骨髄腫は形質細胞を由来とする造血器腫瘍であり、最近ボルテゾミブ、レナリドマイド、サリドマイドなどの新規薬剤により治療成績が改善したが、治癒が期待できない疾患である。ブロモドメインはクロマチンの読み込みに関連するタンパクであり、多発性骨髄腫の 60%以上の患者で高発現し、細胞増殖に重要な役割を果たしている転写因子である MYC を調整する。ブロモドメイン阻害薬は MYC 遺伝子の転写を抑制することで c-MYC を発現するヒト骨髄腫細胞株に対して、G1 停止を介した増殖抑制効果を示す。MYC ファミリーには cMYC、N-MYC、L-MYC の

3 種類が存在するが、c-MYC を発現せず、MYCL を高発現するヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞に対するブロモドメイン阻害薬の抗腫瘍効果については知られていない。今回我々は、cMYC を発現していない U266 細胞に対するブロモドメイン阻害薬の抗腫瘍効果について検討した。

＜方法＞

ヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞と MYC を高発現しているヒト骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞、MM1S 細胞、KMS11 細胞に対して、2 種類のブロモドメイン阻害薬である I-BET151 と JQ1 をそれぞれ 100nM から 4μM を 72 時間、96 時間暴露し、MTS 分析を用いて細胞増殖を解析した。U266 にブロモドメイン阻害薬を 48 時間、72 時間、96 時間暴露した細胞をエタノール固定した後 PI 染色してフローサイトメトリーを用いて細胞周期の変化を解析した。アポトーシスの誘導については、PI-AnnexinV 二重染色を用いたフローサイトメトリーを用いて解析した。U266 細胞と KMS11 細胞に対して I-BET151 500nM を 24 時間暴露した細胞より RNA を抽出し、RNA マイクロアレイ解析を実施した。マイクロアレイ解析の結果を用いて遺伝子セット濃縮解析、およびパスウェイ解析を実施した。U266 細胞、RPMI8226 細胞、MM1S 細胞、KMS11 細胞に対して I-BET151、JQ1 それぞれ 500nM を 24 時間暴露した細胞より RNA を抽出し、cMYC、MYCL、MYCN 遺伝子の発現についてリアルタイム PCR にて比較検討した。

＜結果＞

ヒト骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞、MM1S 細胞、KMS11 細胞に対して、I-BET151 と JQ1 を 72 時間、96 時間暴露した際の IC_{50} は 250−750nM であった。一方、U266 細胞に対して I-BET151 と JQ1 をそれぞれ 500nM を 72 時間、96 時間暴露した場合、61.5%と 54.0%、および 53.5%と 56.4%の細胞増殖を抑制した。U266 細胞にブロモドメイン阻害薬を 48 時間、72 時間、96 時間暴露した細胞を PI 染色してフローサイトメトリーを用いて細胞周期の変化を解析した結果、I-BET151 500nM を暴露した場合、G 1 期に存在する細胞の割合が 54.9~59.7%から 65.7~70.9%に増加し、S 期に存在する細胞の割合が 17.7~24.3%から 8.4~10.5%に低下した。JQ1 500nM を 48 時間、72 時間、96 時間暴露して実施した細胞周期の検討においても同様に G1 期に存在する細胞割合が増加し、S 期に存在する細胞割合が低下した。U266 細胞に対する I-BET151 500nM と JQ1 500nM のアポトーシス誘導効果について PI-AnnexinV 二重染色を用いたフローサイトメトリーにて解析した結果、遅発期アポトーシスを示す二重陽性細胞集団の割合はそれぞれ 6.0%と 9.5%であり、アポトーシスの誘導を認めなかった。U266 細胞に対して I-BET151 500nM を 24 時間暴露した細胞より抽出した RNA を試料として実施したマイクロアレイ解析の結果、MYCL1 遺伝子の発現が 61.6%減弱した。c−MYC、MYCN 遺伝子は I-BET151 の暴露の有無によらず発現を認めなかった。また、KMS11 細胞に対して I-BET151 500nM を 24 時間暴露した細胞より抽出した RNA を試料として実施したマイクロアレイ解析の結果、c-MYC 遺伝子の発現が 65.9%減弱したが、MYCL1、MYCN 遺伝子は I-BET151 の暴露の有無によらず発現を認めなかった。マイクロアレイ解析の結果を用いた遺伝子セット濃縮解析では、U266 細胞、KMS11 細胞ともに I-BET151 は MYC 関連遺伝子セットの発現を制御した。マイクロアレイ解析の結果を用いてパスウェイ解析を行ったところ、U266 細胞と KMS11 細胞において同様に、細

胞周期に関わる遺伝子、すなわち E2F、ORC、MCM、Cdc6、Cdc45 の発現減弱を認めた。U266 細胞、RPMI8226 細胞、MM1S 細胞、KMS11 細胞に対して I-BET151、JQ1 それぞれ 500nM を 24 時間暴露した細胞より RNA を抽出し、cMYC、MYCL、MYCN 遺伝子の発現についてリアルタイム PCR にて比較検討したところ、U266 細胞では I-BET151 暴露した場合、MYCL 遺伝子の発現が有意に低下したが、I-BET151 の暴露の有無によらず c-MYC、MYCN の発現を認めなかった。RPMI8226 細胞、MM1S 細胞では I-BET151 暴露した場合、c-MYC 遺伝子の発現が有意に低下したが、I-BET151 の暴露の有無によらず MYCL、MYCN の発現を認めなかった。KMS11 細胞では I-BET151 暴露した場合、c-MYC、MYCN 遺伝子の発現が有意に低下したが、I-BET151 の暴露の有無によらず MYCL の発現を認めなかった。

＜考察＞

ブロモドメインはヒストンのアセチル化リジン残基を認識して、制御性タンパク質を集めてクロマチン構造や遺伝子発現を制御する機能を有したタンパクである。ブロモドメイン繰り返し配列、及び特異的末端配列を持つ BET ファリミーとして BRD2、BRD3、BRD4、BRDT が知られている。ブロモドメイン阻害薬は、ブロモドメインとヒストンのアセチル化リジン残基との結合を阻害することで、がんの増殖を抑制する。具体的には、転写開始および転写伸長に重要な役割を果たしている BRD4 がブロモドメイン阻害薬の主な標的である。多発性骨髄腫においてがん遺伝子 c−MYC は過剰発現しており、ブロモドメイン阻害薬は c−MYC の RNA ポリメラーゼによる転写伸長を阻害することで、ヒト骨髄腫細胞株の細胞増殖を抑制する。MYC ファミリーには c-MYC、MNCL、MYCN が存在する。c-MYC と MYCN は類似の構造であるのに対して、MYCL は異なる構造を有する。形質細胞を由来とする悪性腫瘍として、意義不明なタンクローン性ガンマグロブリン血症、無症候性骨髄腫、多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、ヒト骨髄腫細胞株へと病期が進行するに従い、MYC が高発現する。MYCL は肺がん、胃がん、大腸がん、甲状腺がんなどの固形腫瘍の病態に関与し、とくに胃がんでは MYCL の高発現は予後不良であることが報告されている。ブロモドメイン阻害薬の c-MYC、MYCN を標的とした抗腫瘍効果は多く報告されているが、我々の知る限り MYCL を標的としたブロモドメイン阻害薬の抗腫瘍効果についての過去の報告は存在しない。

＜結論＞

ブロモドメイン阻害薬は、c-MYCを発現していないU266細胞を含む４種類のヒト骨髄腫細胞株の細胞増殖を抑制した。ブロモドメイン阻害薬はヒト骨髄腫細胞株に対するc−MYCを発現制御を介した細胞増殖の抑制と同様、U266細胞においてもMYCLの発現制御を介して、G1期休止を誘導することで細胞増殖を抑制した。MYCL高発現の骨髄腫細胞は稀であるが、c-MYCではなくMYCLを発現する種々の固形腫瘍に対して、ブロモドメイン阻害薬が抗腫瘍効果を持つ可能性を示唆しており、有意義な知見と考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5177　号	鈴木　一史
論文審査担当者	主　査　三浦　修 副　査　清水　重臣、東田 修二	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文はL-Mycを高発現する多発性骨髄腫細胞株U266に対するブロモドメイン阻害薬の細胞増殖抑制効果と *MYCL* 発現抑制とが関連することを示したものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

これまでにブロモドメイン阻害薬はc-Myc等の発現抑制を介して、造血器腫瘍を含め多くの腫瘍細胞に増殖抑制やapoptosisを誘導することが知られているが、本研究ではc-Mycの発現をほとんど認めずL-Mycを高発現する多発性骨髄腫細胞株U266に着目して、その効果を検討したことに独創性と新規性が認められる。

２）社会的意義

c-Mycの発現をほとんど認めない多発性骨髄腫細胞株U266において、ブロモドメイン阻害薬が *MYCL* のmRNAの低下と供に細胞増殖の抑制を生じる事を見出した本論文は、造血器腫瘍のみでなく、L-Mycを高発現する肺癌などの固形癌に対しても治療効果を示す可能性を示唆するもので、その社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

種々の多発性骨髄腫細胞株を用いて、ブロモドメイン阻害薬の細胞増殖や種々の遺伝子発現を主にRT-PCR法を用いて分析を行ったもので、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が十分な血液病学に関する知識に裏付けられて行われたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

更に申請者は、本研究結果についてL-Mycの発現抑制がブロモドメイン阻害薬によるU266細胞の細胞増殖抑制の主因であろうと考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに詳細な機序が明らかにされる事が期待される。

３.審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に充分な価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	木原　淳
論文審査担当者	主査　宮坂　尚幸 副査　沢辺　元司、田中　真二
論　文　題　目	SLUG expression is an indicator of tumour recurrence in high-grade endometrial carcinomas

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

高悪性度子宮体癌（Grade 3 類内膜癌、漿液性癌、明細胞癌）における上皮間葉移行誘導因子の SLUG および SNAIL の意義を明らかにするため、それらの発現と臨床病理学的特徴や予後との関連性を検討した。高悪性度子宮体癌 52 例の手術材料を用いて免疫組織化学を行ったところ、SLUG は 13 例（25%）で高発現（50%を越える癌細胞に陽性）を示した。SNAIL は全例で低発現だった。SLUG 高発現は再発（$P = 0.020$）および p53 の aberrant expression（$P < 0.001$）と有意に関連していた。遺残なき切除例を対象とする単変量解析では、全例（$n = 46$）、FIGOⅢ/Ⅳ期例（$n = 14$）、術後補助療法施行例（$n = 28$）の各解析で SLUG 高発現群が無再発生存期間の有意な短縮を示した（各々$P = 0.003$、$P = 0.015$、$P < 0.001$）。多変量解析では、SLUG 高発現（ハザード比 5.94、95%信頼区間 1.25 - 28.2、$P = 0.025$）と FIGOⅢ/Ⅳ期が無再発生存の独立因子であった。以上より、高悪性度子宮体癌においては SLUG 発現と *TP53* 遺伝子変異の関与が示唆された。SLUG の発現は高悪性度子宮体癌の治療後再発の指標となり、再発や治療抵抗性に関与している可能性がある。

＜緒言＞

子宮体癌は女性の癌腫として世界における患者数は 5 番目であり、日本を含めて世界で増加傾向にある。子宮体癌のうち高悪性度とされる Grade 3 類内膜癌、漿液性癌および明細胞癌は、低悪性度の Grade 1 および Grade 2 類内膜癌よりも予後が悪い。子宮体癌の予後向上のために、特に高悪性度群の性質の解明や新規治療法の開発を要する。

SNAIL および SLUG は上皮間葉移行の誘導因子であり、E-cadherin など細胞接着分子の発現を抑制する。PI3K/AKT 経路を含む種々のシグナル伝達系により両者の発現が誘導される一方で、p53 と MDM2 によるユビキチン化を経て速やかに分解される。変異型 p53 はユビキチン化を誘導できず、SNAIL や SLUG は細胞内に蓄積する。肺癌、食道癌、乳癌、大腸癌など種々の癌腫で SNAIL や SLUG の発現が臨床病理学的に検討され、予後不良因子であると報告されている。子宮体癌における SNAIL や SLUG の発現について、p53 発現や再発との関連まで含めて検討した報告はない。

本研究では、高悪性度子宮体癌における SNAIL および SLUG の発現の意義を明らかにするため、免疫組織化学により両者を評価し、臨床病理学的特徴および予後との関係を検討した。

＜方法＞

（1）対象症例の収集と詳細

東京医科歯科大学医学部附属病院で 2000 年から 2014 年までに施行された子宮体癌手術例 226 例を病理診断データベースから抽出した。病理標本を検鏡し、2014 年度発刊の WHO 分類に則り組織分類を行った。54 例が高悪性度子宮体癌に該当し、その内訳は Grade 3 類内膜癌 34 例、漿液性癌 8 例、明細胞癌 11 例、漿液性内膜上皮内癌（serous endometrial intraepithelial carcinoma、 SEIC）1 例であった。再手術例 1 例（漿液性癌）と SEIC の 1 例は評価可能病変が極めて小さいため除外し、最終的に 52 例を検討した。年齢平均値は 62.5 歳（37～87 歳）、FIGO 分類の内訳は、IA 期 20 例、IB 期 8 例、Ⅱ期 5 例、ⅢA 期 5 例、ⅢB 期 1 例、ⅢC 期 9 例、ⅣB 期 5 例であった。

（2）患者情報や予後情報の収集

臨床情報や予後情報は診療録を参照して収集した。全生存期間（overall survival、OS）は手術日から死亡日とした。無再発生存期間（recurrence-free survival、RFS）は手術日から再発日とし、遺残なき切除とされた 46 例を評価した。観察期間中央値は 1765 日（16～5494 日）で、観察期間中の死亡は 8 例、再発は 8 例であった。

（3）免疫組織化学とその評価

52 例の代表切片を各 1 個ずつ選択し、SNAIL、SLUG、estrogen receptor（ER）、progesterone receptor（PR）、E-cadherin、p53、Ki-67 に対する各抗体を使用し、酵素抗体法にて免疫組織化学を行った。SNAIL、SLUG、ER、PR は、核に陽性を示す癌細胞が 50%を越える場合に高発現、50%以下の場合を低発現と分類した。E-cadherin は細胞膜に明瞭な陽性を示す癌細胞が 50%を越える場合に高発現、50%以下の場合を低発現とした。p53 は核に強陽性を示す癌細胞が 50%以上、あるいは完全に陰性の場合を aberrant expression とし、それ以外を normal expression とした。Ki-67 は最低 1000 個の癌細胞を母数として核陽性率を計測した。

（4）統計学的解析

名義変数間の解析には Fisher 検定、連続変数の群間比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。Kaplan-Meier 法で OS と RFS の生存曲線を描出し、その比較を log-rank 検定で行った。生存期間の多変量解析には Cox 比例ハザード回帰分析を用いた。いずれの解析も P 値が 0.05 未満の場合に統計学的有意と判定した。

＜結果＞

（1）SNAIL と SLUG の発現

SNAIL に関しては、52 例全例が低発現を示した。SLUG に関しては、52 例中 13 例（25%）が高発現を、39 例（75%）が低発現を示した。

（2）SLUG 発現と臨床病理学的因子との関連

遺残なき切除例（$n = 46$）にて、再発群の 63%（5/8）、無再発群の 15%（7/38）を SLUG 高

発現が占めた。SLUG 高発現と再発に有意な関連が認められた（P = 0.020）。年齢、組織型、FIGO 分類、T 分類、筋層浸潤の程度、頚部浸潤、リンパ節転移、遠隔転移、脈管侵襲、腹腔洗浄細胞診、E-cadherin 発現の各要素と SLUG 発現の間に有意な関連は認められなかった。

（３）SLUG 発現と p53、ER、PR 発現との関連

p53 の aberrant expression 例の 60%（9/15）、normal expression 例の 11%（4/37）が SLUG 高発現を示した。p53 の aberrant expression と SLUG 高発現に有意な関連が認められた（P < 0.001）。非漿液性癌（45 例）、漿液性癌（7 例）に分けた解析でも同様の関連が認められた（各々 P = 0.028、P = 0.029）。ER や PR の発現と SLUG 発現の間に有意な関連はなかった。

（４）SLUG 発現と OS

全例（n = 52）および術後補助療法施行例（n = 34）の単変量解析（log-rank 検定）で、SLUG 高発現群は低発現群よりも OS の有意な短縮を示した（各々 P = 0.033、P = 0.010）。FIGOⅢ/Ⅳ期の進行例（n = 20）では SLUG 高発現群が OS の短縮傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった（P = 0.13）。

（５）遺残なき切除例の SLUG 発現と RFS

単変量解析（log-rank 検定）では全例（n = 46）、FIGOⅢ/Ⅳ期の進行期例（n = 14）、術後補助療法施行例（n = 28）のいずれも、SLUG 高発現群が RFS の有意な短縮を示した（各々 P = 0.003、P = 0.015、P < 0.001）。多変量解析にて FIGOⅢ/Ⅳ期と SLUG 高発現は独立した予後因子であった（SLUG: ハザード比 5.94、95%信頼区間 1.25 - 28.2、P = 0.025）。

＜考察＞

本研究では、SLUG 高発現を示す高悪性度子宮体癌は全生存期間および無再発生存期間の有意な短縮を示した。特に無再発生存期間は FIGO 分類とは独立した予後因子であった。SLUG には p53 依存性および非依存性のアポトーシス経路を抑制する働きが報告されている。子宮外に進展した FIGOⅢ/Ⅳ期の SLUG 高発現例では、臨床的には完全切除としても既に他臓器に転移した微小病変が術後補助療法に抵抗して再発に至る可能性が考えられる。

SLUG 高発現は p53 の aberrant expression と関連しており、*TP53* 変異が SLUG 高発現を導く可能性が示唆された。類内膜癌の約 9 割、漿液性癌の約 4 割は PI3K/AKT 経路を活性化する遺伝子変異を有している。PI3K/AKT 経路は SLUG や SNAIL を含む上皮間葉移行誘導因子の発現を増加させる。しかし、本研究では特に Grade 3 類内膜癌で SLUG 高発現が一部にしか認められなかった。SLUG の高発現には遺伝子発現の亢進よりも、*TP53* 変異に伴う SLUG 分解抑制が重要な機序と推察される。なお、SNAIL と SLUG には類似した発現制御機構が報告されているが、本研究ではそれらの発現態度が乖離していた。この理由は不明であるが、両者間の異なる発現制御機構の存在が考えられる。

高悪性度子宮体癌における SLUG 発現の臨床的意義として次の二点が考えられる。一点目は、進行例や術後補助療法施行例を含めて SLUG 発現が治療後再発の指標になり得る点である。二点目は、SLUG が術後再発を予防するための治療標的の候補となりえる点である。

本研究の主たる limitation は解析症例数が少ないことである。SLUG の高発現が治療後再発の信頼しうる指標であるかについて、より多数例での解析が望まれる。

＜結論＞

高悪性度子宮体癌において、SLUG 発現における *TP53* 変異の関与が示唆された。SLUG 高発現は高悪性度子宮体癌の治療後再発の指標となりえる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5178　号	木原　淳
論文審査担当者	主　査　宮坂　尚幸 副　査　沢辺　元司、田中　真二	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は高悪性度子宮体癌において、上皮間葉転換に関連する SLUG および SNAIL の発現と p53、estrogen receptor、progesterone receptor、E-cadherin、Ki-67 との関連性、さらにこれらが臨床経過に与える影響を検討した臨床病理学的な研究である。高悪性度子宮体癌 52 例中 13 例で SLUG が高発現しており p53 aberrant expression と有意に関連していること、一方 E-cadherin とは有意な関連が認められないことが判明した。また SLUG 高発現群において全生存期間および無再発生存期間の有意な短縮を認め、多変量解析の結果、SLUG 発現と臨床進行期が高悪性度子宮体癌の独立した予後規定因子であることを初めて明らかにした。以上から SLUG は、高悪性度子宮体癌治療の指標となると同時に、今後の分子標的薬開発のターゲットとなる可能性が示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

大腸癌や肝細胞癌で予後不良因子として知られている SLUG、SNAIL の発現を、高悪性度子宮体癌に応用し、p53 発現との関連性、臨床的予後に与える影響を明らかにした初めての研究。

２）社会的意義

近年本邦において子宮体癌が急増しており、新たな診断・治療法の開発が望まれている。本研究の成果は、高悪性度子宮体癌の中でも特にハイリスクな症例を特定することを可能とし、さらに今後の分子標的薬開発の方向性を示唆している点で、臨床的、社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

ヒトを対象とした後方視的検討であり、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を得た上で行われている。研究方法についても明確であり、統計的解析も正確に行われている。

４）考察・今後の発展性

今回のデータをもとに、多施設共同で前方視的な追跡研究をすることで（婦人科腫瘍学会との協働など）新たな知見が得られる可能性がある。それにより高悪性度子宮体癌の新たな治療戦略の開発に役立つことが期待される。

３．その他

スライド、口頭発表ともよく準備され、わかりやすい内容であった。質疑応答においても満足すべき解答が得られた。

４．審査結果

申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断される

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	戚　鈺
論文審査担当者	主査　荒井　裕国 副査　内田　信一、森尾　友宏
論　文　題　目	Perioperative Elevation in Cell-Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction

（論文内容の要旨）

Abstract:

This study aimed to determine the perioperative change in serum double-strand DNA (dsDNA) as a marker potentially neutrophil extracellular trap concentration in samples from patients undergoing cardiac surgery, and to analyze a relationship between serum dsDNA concentrations and perioperative renal dysfunction.

Serum dsDNA concentrations in samples that were collected during previously conducted, prospective, multicenter, observational study was measured. Eighty patients undergoing elective cardiac surgery were studied. Serum samples were collected at baseline, immediately after surgery, and the day after surgery (POD-1).

In patients undergoing cardiac surgery, serum dsDNA levels are elevated postoperatively. Activation of neutrophils might contribute to the mechanism of this elevation. Prolonged elevation in dsDNA levels are correlated with perioperative renal dysfunction.

Introduction:

Cell free double-strand DNA (dsDNA) is thought to be one of danger associated molecular patterns, and its plasma concentration can be elevated in patients with sepsis and multiple trauma. Among multiple sources of cell free dsDNA including necrotic cells and apoptotic cells, neutrophil might be an important source, because activated neutrophils release dsDNA-based structures, called neutrophil extracellular traps (NETs), which forms fibrous structures to trap circulating microorganisms, and kills them by antimicrobial proteins that are derived from neutrophil granules and the cytoplasm. However, excessive release of NETs into plasma results in endothelial injury, which may result in tissue injury in major organs. Previous studies have shown that circulating free dsDNA concentration reflects the amount of NET formation in the blood, and in patients with multiple trauma, circulating free dsDNA concentration reflects the severity of injury. Major surgery has some common characteristics with trauma, including tissue damage, inflammation, and activation of the endothelium and immune cells. However, the perioperative change in dsDNA

concentration and its contribution to perioperative organ dysfunction have not been determined yet.

Methods:

Clinical data and biological samples for the current study were obtained from patients who were enrolled in a multicenter, observational study to evaluate perioperative serum levels of sRAGE as a biomarker for respiratory failure after cardiac surgery. Eighty patients undergoing cardiac surgery were studied and serum samples were collected at baseline, immediately after surgery, and the day after surgery (POD-1).

Serum double strand DNA (dsDNA) levels were measured as a marker reflecting NETs levels and S100A12 levels were measured as a marker reflecting neutrophil activation. Commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to measure serum levels of Deoxyribonuclease (DNase) activity, DNase-1 antigen, anti-nucleosome antibody, perinuclear anti-neutrophil cyloplasmic antibody (pANCA) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL).

Data for postoperative serum interleukin-8 (IL-8), NT-proBNP and troponin-T were obtained from the same samples of 80 patients from the results of the original study.

Results:

Fifty one patients underwent on-pump surgery (19 patients underwent aortic surgery, 32 patients underwent valve surgery), and 29 patients underwent off-pump coronary artery bypass grafting surgery. The characteristics of the study cohort were approximately the same as those of previous studies.

In the current study, serum dsDNA levels were significantly increased from baseline to immediately after surgery, and they were reduced by the day after surgery (POD-1). And we measured serum activity of DNase as a factor that could explain this perioperative kinetics of dsDNA, serum DNase activity was reduced in all of the patients immediately after surgery.

Levels of dsDNA were significantly correlated with S100A12 levels, a marker of neutrophil activation. Meanwhile, the current study showed that there was a significant negative correlation between S100A12 and DNase activity, which suggests that activation of neutrophils results in an inhibitory effect on the activity of serum DNase.

In this study, post-operative serum NGAL levels were significantly correlated with serum creatinine levels on POD-1, and patients diagnosed as acute kidney injury showed significantly higher value in the serum NGAL levels immediately after surgery. And the difference in serum creatinine levels between baseline and POD-1 were correlated with dsDNA levels on POD-1.

Discussion:

We found that circulating dsDNA concentration was elevated postoperatively, and fell by POD-1. These kinetics were similar to previously reported results from patients with multiple trauma. Tissue damage, systemic inflammation, bleeding and activation of hemostatic reactions are common characteristics of major surgery and trauma. Furthermore, recently published data showed that plasma histone levels were elevated both after severe trauma and after pediatric cardiac surgery using cardiopulmonary bypass, which suggested that nucleosome components could be released immediately after cardiac surgery or trauma.

We found that serum free dsDNA concentration was significantly correlated with the neutrophil activation marker S100A12. This finding suggests a major contribution of neutrophil-derived dsDNA to elevation in serum dsDNA concentration, supporting our use of dsDNA concentration as a marker of NET release. Immediately after surgery, a wide range of dsDNA concentration was observed in the context of low DNase activity, possibly reflecting a large variation in NET formation.

With regard to degradation of dsDNA, we found that serum DNase activity was reduced immediately after surgery, but there was no change in the antigen concentration of DNase-I. There was a negative correlation between dsDNA concentration and DNase activity. These findings suggest that postoperative elevation in circulating dsDNA concentration could be partially explained by the reduction in DNase activity.

The perioperative incidence of AKI was 27.5% in our cohort; all patients with AKI exhibited an elevation in serum creatinine concentration of >0.3 mg/dL from baseline to POD-1. These patients showed a significant elevation in PostOp serum NGAL concentration compared with patients without AKI. The perioperative change in serum creatinine concentration showed a moderate association with serum dsDNA concentration on POD-1. Additionally, serum dsDNA concentration on POD-1 was a significantly contributing factor to perioperative AKI in our corhort.

Although the exact mechanism could not be determined by the current study design, several mechanisms could be associated with this result. First, histone is one of the components of NETs, as well as dsDNA, and it could damage kidney tissue via toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4. Second, granular antimicrobial proteins from neutrophils, including neutrophil elastase and myeloperoxidase, are also components of NETs, and they can damage endothelial tissue. Third, impairment of NET degradation is associated with renal dysfunction in some diseases, including systemic lupus erythematosus and anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Nevertheless, based on the results of current study, further research will be necessary to study whether cell-free DNA or NETs induce kidney injury in more simplified experimental models, and to illuminate the underlying pathophysiologic mechanisms.

Conclusions:

Serum dsDNA concentration is elevated after cardiac surgery, which might be explained by activation of

neutrophils. Prolonged elevation in circulating dsDNA concentration was associated with perioperative renal dysfunction. These results could help identifying dsDNA as a new biomarker for post-operative risk assessment of patients with cardiac surgery. Further large-scale prospective studies will be needed to illuminate the relationship between circulating dsDNA concentration and perioperative renal dysfunction, and the potential pathophysiologic mechanisms that might be responsible.

＜要約＞

炎症により好中球が活性化されると、DNA 成分を好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼとともに細胞外に放出し、バクテリアなどの外敵を捕捉し、攻撃する自然免疫機構を好中球細胞外トラップという。本研究では、心臓手術を受ける患者で好中球細胞トラップが形成されるとの仮説をたて、好中球細胞外トラップの定量のための指標として、血清細胞外 2 重鎖 DNA 量を定量し、周術期の臓器障害との関係について検討した。

研究方法として、2008 年 2 月から 2009 年 7 月までに心臓手術(オンポンプ手術 51 例/オフポンプ手術 29 例)における I 型肺胞上皮傷害のバイオマーカーに関する検討で集められた血清サンプル 80 検体を再検討する形で、血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度を定量し、(1)血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度の周術期を通じての変化(2)血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度と S100A12(好中球活性化のバイオマーカー)や DNase 活性との相関(3)血清クレアチニン値の変化と血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度の相関について検討を行った。

結果の概要としては、①術直後には DNase 活性が低下し、血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度が上昇する②血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度と好中球活性化の指標である S100A12 濃度は有意に相関する③血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度と術前から術後 1 日目のクレアチニンの上昇度の間に有意な相関関係が明らかになった。今後、前向き観察研究等のデザインで、心臓手術における急性腎障害の発生メカニズムの機序に、血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度の上昇がどのようにかかわっているかを検討する一つのきっかけとして位置づけられると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5179　号	戚　鈺
論文審査担当者	主　査　荒井　裕国 副　査　内田　信一、森尾　友宏	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、心臓手術患者における周術期の血清中の二重鎖 DNA 濃度を定量し、周術期の臓器障害との関連を研究した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

炎症により好中球が活性化されると、DNA 成分が細胞外に放出され好中球細胞外トラップが形成される。申請者らは、心臓手術に際しても手術侵襲によって好中球細胞トラップが形成され術後の臓器障害に関連するとの仮説を立てた。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．　術直後には DNase 活性が低下し、血清細胞外 2 重鎖 DNA 濃度が上昇する。

２．　血清細胞外２重鎖 DNA 濃度と好中球活性化の指標である S100A12 濃度は有意に相関する。

３．　血清細胞外２重鎖 DNA 濃度と術後１日目の血清クレアチニン上昇度が相関する。

以上のように申請者らは、心臓手術後の２重鎖 DNA 濃度の上昇が術後急性腎障害と関連すると結論づけている。これは表層的な関連づけであり、何ら機序を解明するものではないが、今後の臨床研究のきっかけになる可能性はある。

３）研究方法・倫理観

本研究は、本学を含む３つの大学病院で 2008 年 2 月から 2009 年 7 月までに心臓手術（人工心肺を使用したオンポンプ手術 51 例・人工心肺を使用しないオフポンプ手術 29 例）において、血清細胞外２重鎖 DNA 濃度を定量し、S100A12 や DNase 活性との相関や血清クレアチニン値との相関を検討した。臨床審査委員会の承認を得て、本研究は周到な準備のもとに実施されている。

４）考察・今後の発展性

申請者らは、好中球細胞外トラップの指標である血清細胞外２重鎖 DNA 濃度の上昇が S100A12 濃度の上昇と相関し、さらに血清クレアチニン濃度の上昇度と相関するため、三段論法的に、心臓手術の侵襲により形成された好中球トラップが術後の急性腎障害に関与すると結論づけてい

る。この推論には若干飛躍があるものの、心臓手術時に起こる一過性の腎機能低下のメカニズム解明に血清細胞外２重鎖 DNA 濃度の測定を関連づけた点では独創性があり、心臓手術と臓器障害の関連に関する今後の研究のきっかけとなる可能性は期待できる。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士の学位を申請するに足る価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	兵頭　甲子太郎
論文審査担当者	主査　宗田　大 副査　秋田　恵一、柳下　和慶
論　文　題　目	Hip, knee, and ankle kinematics during activities of daily living: a cross-sectional study

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

動作中の関節角度データは、リハビリテーションにおける患者への介入や日常生活動作の指導を行う上で重要である。これらのデータが得られることにより、客観的な基準値を用いて、関節角度の目標値設定や人工股関節置換術後の患者など動作制限を強いられる患者への指導が行える。そこで、今回は 3 次元位置・角度測定装置を使用し、26 名の健常成人を対象として動作中の下肢 3 関節の最大関節角度の平均値と股関節最大屈曲時の内・外転、内・外旋角度の平均値を算出した。計測を行った動作は、更衣動作 7 種類、トイレ動作 2 種類、入浴動作 10 種類、床の物を拾う動作 2 種類、しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作の計 22 種類の動作とした。計測の結果、動作中の最大関節角度の平均値は股関節屈曲では 101°（しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作）、膝関節屈曲では 149°（しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作）、足関節では背屈 28°（しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作、利き足での浴槽からの立ち上がり動作）であった。また、人工股関節置換術後の脱臼の危険があるとされる過屈曲時の内転・内旋運動は生じていないという結果となった。これらの結果は、患者の予後や関節角度の目標値の設定、動作指導の再考を行う上での客観的なデータとなりうる。

＜緒言＞

下肢の関節可動域は、関節症や骨折などの整形疾患やその術後など様々な患者において制限される。下肢の関節可動域制限は歩行や立ち上がりといった基本動作だけでなく、更衣動作や入浴動作といった様々な日常生活動作の遂行を妨げる。

関節可動域に制限が生じた患者の問題点を明らかにするためには、比較対象として動作中の健常者の関節角度データが必要となる。健常者の関節角度データは、患者がその動作を遂行する上でどの程度の関節角度を獲得すべきかといった客観的な指標となる。このことから、健常者を対象とした歩行や立ち上がりなどの基本動作中の関節角度の計測が行われてきたが、更衣動作や入浴動作、トイレ動作といった日常生活動作の計測はほとんど行われていない。これら身辺動作の遂行が困難になる患者は多く、これらの動作についての関節角度データを明らかにすることは重要である。

また、関節角度の制限は動作の遂行を困難にするだけでなく、人工股関節置換術後の患者などの動作を制限させる要因ともなる。人工股関節置換術後の患者は、脱臼を予防するために股関節が大きく屈曲している際に内転、内旋を行わないよう指導される。そのため、しゃがみ込み動作などいくつかの動作を実施しないよう指導されるが、これら動作中に股関節屈曲・内転・内旋がどの程度生じているかは明らかとなっておらず、客観的なデータに基づく指導となっていない。患者は過度に動作の制限をされている可能性もあり、これら複合的な関節角度のデータを明らかにする必要がある。

今回は、過去に報告がない動作を中心に 22 種類の動作中の最大関節角度と最大股関節屈曲時の内・外転、内・外旋角度を明らかにすることを目的に研究を行った。

＜方法＞

対象者は過去に整形学的、神経学的既住がない 26 名（平均年齢：20±1 years、平均身長：168±7 cm 平均体重：60±7 kg）とした。利き足のみの計測を行ったが、対象者の利き足はすべて右側であった。

計測には磁気式 3 次元位置・角度測定装置（3 space FASTRAK, Polhemus Inc, Colchester, VT, USA）を使用した。課題動作は更衣動作 7 種類、トイレ動作 2 種類、入浴動作 10 種類、床の物を拾う動作 2 種類、しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作の計 22 種類の動作とした。更衣動作では、①座位で利き足をズボンに通す動作、②立位で利き足をズボンに通す動作、③立位で非利き足をズボンに通す動作、④足を組んだ肢位で靴を履く動作、⑤利き足の踵を膝にのせた肢位で靴を履く動作、⑥利き足の靴紐を結ぶ動作、⑦非利き足の靴紐を結ぶ動作の 7 種類とした。トイレ動作では、①座位で右手を使用して殿部を拭く動作、②座位で左手を使用して殿部を拭く動作の 2 種類を実施させた。入浴動作では 40 ㎝と 50 ㎝の 2 種類の高さで、浴槽に対して正面を向いた状態で利き足・非利き足からそれぞれ跨ぐ動作と浴槽に対して横を向いた状態で跨ぐ動作を実施させた。また、合わせて長座位から浴槽の縁をつかみ利き足・非利き足それぞれを使い浴槽から立ち上がる動作を実施させた。床の物を拾う動作では①座位で右足の横にある物を拾わせる動作と②左足の横にある物を拾わせる動作の 2 種類とし、しゃがみ込んだ肢位で体幹を最大限回旋させる動作を実施させた。対象者には各課題動作を連続 3 回実施させ、3 回の連続動作を判別しやすいように動作の最終肢位で 5 秒間静止させた。

関節角度の計測は国際バイオメカニクス学会の推奨する定義に従い行った。3 回の連続動作の内、2 施行目のデータを用いて解析を行い、股関節（屈曲・伸展、内・外転、内・外旋）、膝関節（屈曲、伸展）、足関節（底・背屈）の最大値を求め、26 名の対象者での平均値と標準偏差を算出した。また、同様に 2 施行目のデータを用いて股関節最大屈曲時の内・外転、内・外旋角度を計測し、平均値と標準偏差を算出した。

＜結果＞

22 の課題動作での最大角度の平均値は、股関節屈曲 101°（しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作）、伸展 8°（50 ㎝台の跨ぎ動作、非利き足から）、内転 17°（足を組んだ肢位での靴の着脱動作）、外転 31°（50 ㎝台の跨ぎ動作、非利き足から）、内旋 39°（しゃがみ込んだ肢位での体

幹回旋動作)、外旋 61°（踵を反対側の膝の上にのせた肢位での靴の着脱動作）であった。膝関節では屈曲 149°（しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作)、足関節では背屈 28°（しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作、利き足での浴槽からの立ち上がり動作)、底屈 37°（座位・立位でのズボンの着脱動作）であった。

股関節最大屈曲時の内・外転、内・外旋の平均角度の最大値は、内転では 14°（足を組んだ肢位での靴の着脱動作)、外転では 16°（利き足での浴槽からの立ち上がり動作、50 ㎝台の跨ぎ動作、非利き足から)、内旋では 21°（しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作)、外旋では 39°（踵を反対側の膝の上にのせた肢位での靴の着脱動作）であった。また、平均値の結果みると股関節最大屈曲時に内転と内旋が同時に生じている動作はなかった。

＜考察＞

過去に関節可動域制限に関する報告が数多く出されている。人工関節置換術後や関節リウマチ、脊髄損傷など多くの疾患で可動域に制限が生じると報告されており、関節可動域制限は多くの疾患で問題となる重要な事項である。また、関節可動域の制限は歩行や階段昇降、立ち上がりといった基本動作だけでなく、更衣動作や入浴動作などの身辺動作の遂行にも影響を及ぼすと指摘されている。

今回、過去に報告がない更衣動作やトイレ動作、入浴動作といった身辺動作を中心に下肢の関節角度の計測を実施した。これにより、健常者がこれらの動作を行う上でどの程度の関節角度が必要となるかが明らかとなった。リハビリテーションでは患者の動作遂行能力を向上させることが重要な課題である。関節可動域制限を有する患者に対しては、遂行が困難となっている動作でどの程度の関節角度が必要となるかを考慮した上で、患者の獲得すべき目標角度の設定を行っていく。歩行や階段昇降、立ち上がりといった基本動作に関しては多くの報告があり、基準値が存在するが、更衣動作や入浴動作といった身辺動作では、これら基準となる関節角度の報告がなかったため、客観的なデータに基づく目標値の設定が行われていなかった可能性がある。今回、これらの動作においての基準値が得られたことで、より明確な目標値の設定が可能となると考えている。

また、関節可動域の制限は人工股関節置換術後の患者の日常生活動作を妨げる要因となりうる。しゃがみ込み動作や浴槽の跨ぎ動作、更衣動作などいくつかの動作では、術後脱臼を引き起こす危険性があると考えられている股関節の過度な屈曲と内転・内旋が同時に生じる危険性があり、動作の制限や動作手順の変更といった指導が行われる。そのため、患者は日常生活を制限されることとなり、患者の QOL が低下するといった指摘がされている。しかし、これらの動作で実際にどの程度の関節角度が生じているかは検討がされておらず、客観的なデータに基づく指導となっていないのが現状である。そこで、今回 1 つの指標となるべく、動作中に股関節の屈曲が最も生じた時点での内・外転と内・外旋の角度を計測した。これらの結果が得られたことにより、どの動作で内・外転、内・外旋が最も生じているか、またその時どの程度の関節角度が生じるかが整理された。今回の結果では、最も危険があると考えられている内転・内旋が同時に生じる動作はなく、今まで危険があると考えられていた動作でもこれらの関節運動は起こっていない可能性が指摘された。ただし、今回は健常者による計測であることや、数名の対象者では内転・内旋が

観察されたこと、動作中の一部の時点での検討となっているため、今後より一層の検討が必要となる。

＜結論＞

今回の計測により、更衣動作、トイレ動作、入浴動作、床の物を拾う動作、しゃがみ込んだ肢位での体幹回旋動作といった 22 の動作での下肢 3 関節の詳細な関節角度データが得られた。これにより、リハビリテーションの現場でより一層の客観的なデータに基づく指導が可能となる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5180　号	兵頭　甲子太郎
論文審査担当者	主　査　宗田　大 副　査　秋田　恵一、柳下　和慶	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

ROM 制限により日常生活動作の遂行が困難となっている患者の問題点を分析し、客観的なデータに基づく動作指導を行うために、比較対象となる健常人の関節角度データを、磁気式 3 次元位置・角度測定装置を使って、22 の日常生活動作で計測した。しゃがみ込み、靴の着脱動作、入浴動作などで大きな関節角度が計測された。一方人工股関節殿脱臼肢位となる内転・内旋の動きはほとんど認められなかった。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

これまで歩行や立ち上がり、階段昇降での下肢関節角度の解析が行なわれているが、セルフケアなどに関する報告は少ない。今回の研究はこれまでほとんど検討されていないトイレ動作を含め、下肢の各関節に大きな関節角度を必要とすると考えられる 22 という数多くの動作を解析したことは独創的で、正常人のデータとして貴重である。

２）社会的意義

特に人工股関節（THA）後の脱臼のリスクとその予防を考えた場合には、正常人の動きを解析することは意義があり、今後の標準的な値となりうる価値がある。

３）研究方法・倫理観

正常若年成人を対象として、非侵襲的に体表に装置をつけて、実験を施行した。所属大学の倫理審査の承認を受けており、署名による参加の同意を得て、十分な倫理的配慮がされていた。

４）考察・今後の発展性

今回得られた 22 の動作のうち、股関節の大きな角度を要する動作はしゃがみこみであり、入浴動作、靴の着脱なども大きな角度を必要としていた。しかし 22 の動作のすべてで人 THA 後の脱臼危険肢位となる内転・内旋を必ず生じる動作はなかった。これらの結果は今後術後の肢位制限や注意点を変更するきっかけとなる可能性がある。

３．その他

今回の結果の真の意義について疑問が投げられた。すなわち、正常人に合わせる必要性がどれくらいあるのか。代償動作の方が有用であり、その関連について今回の研究がどれくらい寄与できるのか。一つの動作のいろいろな時点でそれぞれ最大の関節角度を求めているのは、動作の評価として適切か、などについて、本研究の真の目的と臨床的貢献についてさらに考察を深めることをレポートして課した。レポートでは個々の動作について、正常人間でのばらつきと、最少必要角度、他の関節での代償の可能性などについて詳細に再検討され、本研究に対する意義と限界について考察が深められた。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	木村　遥
論文審査担当者	主査　清水　重臣 副査　安原　眞人、吉田　雅幸
論　文　題　目	Increased MFG-E8 expression and its implications in the vascular pathophysiology of cocaine abuse

（論文内容の要旨）

【要旨】

コカインの毒性が人体の心血管系に及ぼす様々な影響については既に多数の報告がある一方、細胞毒性についての詳細な分子機構に関してはまだ理解が乏しい。平滑筋にはリモデリングという機構があり、短期的にはストレス環境下で細胞保護的に働くが、長期に及ぶと血管障害を起こす可能性が指摘されている。コカイン曝露時の平滑筋細胞においてリモデリングが起こっている可能性を検討し、更にリモデリング制御に関係があるとされるオートファジーと増殖因子 MFG-E8 (Milk Fat Globular protein EGF-8) の変動を調べ、相関性を検証した。

ラット大動脈平滑筋由来細胞 A7r5 を用いて、高濃度・短期間 (3 mM, 24 h) および低濃度・長期間 (0.3 mM, ～7 days) のコカイン曝露による細胞への影響を形態観察・ウェスタンブロット等により検討した。その結果、高濃度・短期間曝露では核の凝縮やカスパーゼ 3 活性化を認め、アポトーシスが起こることを確認できた。その一方で、低濃度・長期間曝露では MFG-E8 の増加を確認でき、また、同条件でリモデリングの特徴である細胞増殖能の亢進も確認できた。オートファジー機構に関しては活性マーカー (LC3-Ⅱ) の減少を認め、予想に反しコカイン曝露により障害されていることが明らかとなった。コカイン低濃度曝露によるこれらの結果は、コカイン投与ラット(50 mg/kg、2 日間、 腹腔内投与)の心臓・胸部大動脈での検証でも同様であった。

以上から、コカイン曝露により in vivo ・in vitro いずれにおいても MFG-E8 を介した平滑筋細胞のリモデリングが起こっていることが示唆された。その一方でオートファジーの誘導は見られず、むしろ抑制されていた。これらの変化が平滑筋におけるコカイン毒性に関与していると考えられる。

【目的】

コカインとは南米原産コカノキ科コカ属植物に含まれるアルカロイドである。主な作用として、中枢神経を興奮させ急性期には瞳孔の散大、血圧・心拍・呼吸・体温の上昇、慢性的使用では鼻の粘膜に潰瘍をつくる危険性が、また感覚神経の興奮を抑制することによる局所麻酔の効果があげられる。その他臓器毒性として、急性作用では血管収縮や不整脈、慢性作用では心筋炎や動脈硬化といった心臓や血管への毒性作用が知られている。臓器毒性のこれらの作用に関して臨床的

な報告は多数あるが、細胞毒性の分子機構に関してはまだ不明な部分が多い。これまでに心筋細胞、平滑筋細胞にコカインを曝露することでアポトーシスが誘導されるという報告があり、本研究室でもラットの胎児心筋由来の培養細胞 H9c2 への曝露でアポトーシスが誘導されることを明らかにしている。本研究ではコカインによる急性作用機構と、慢性作用のなかの動脈硬化発症の機構に焦点をあてた。

動脈硬化の分子機構については詳しく解明されており、血管中膜にある平滑筋細胞が性質を換え内膜へと移行・増殖することで内膜肥厚を形成することが知られている。このとき平滑筋細胞に起こる変換を平滑筋リモデリングといい、通常収縮型を示している平滑筋細胞が、外的ストレスによって未分化な合成型へと変換する現象のことである。短期的にはストレス環境下で細胞保護的作用があるが、長期的には血管障害を起こす可能性が指摘されており、動脈硬化を含む慢性疾患への関与を示唆する報告もある。この変換の促進機構としてオートファジー、促進因子として MFG-E8 (Milk fat globule epidermal growth factor-VIII)、PDGF (Platelet-Derived Growth Factor、血小板由来成長因子）等が報告されている。オートファジーは細胞内のタンパク質や細胞小器官を分解する機構の一つである。また MFG-E8 はアポトーシス細胞と食細胞とを橋渡しする細胞接着タンパク質として同定され、加齢と共に血管壁に蓄積しリモデリングを促進するとの報告が近年なされている。

以上を背景として、急性作用・慢性作用を想定したコカイン曝露時の平滑筋細胞における細胞毒性機構の解明、特に慢性曝露時にリモデリングが起こっている可能性を検討し、さらに関連するオートファジーと MFG-E8 の変動を調べ、リモデリングとの相関性を検証した。

【方法】

ラット大動脈平滑筋細胞 A7r5 に短期間（24 時間）・高濃度（3mM）のコカインを曝露し形態変化の観察およびウェスタンブロットによる細胞内のシグナル伝達分子の活性化の検討を行った。長期間（～7 日間）・低濃度（0.3mM）のコカイン曝露モデルでは、ウェスタンブロットを用いて LC3、p62、MFG-E8、細胞増殖マーカーの変動を測定した。次に 8 週齢雄性 SD ラットにコカインを投与し（50 mg/kg、2 日間、腹腔内投与）摘出した心臓と胸部大動脈を使用して上記のウェスタンブロットに加えて、免疫染色により MFG-E8 および Ki67 の変化について検討を行った。

【結果】

まず A7r5 細胞に短期間・高濃度のコカインを曝露した際、急性作用として細胞死が起こるか否かの検討を行った。3mM のコカインを曝露した細胞の核をヘキストで染色し蛍光顕微鏡で観察したところ、アポトーシスの特徴である核の凝縮を観察できた。またアポトーシスのマーカータンパク質であるカスパーゼ 3 の活性化をウェスタンブロットにて測定したところ、濃度・時間依存的に活性型が増加していることが分かった。LDH 放出率により細胞障害を評価したところ、同様に濃度依存的な増加を認めた。これから、平滑筋細胞において高濃度コカイン曝露によりアポトーシスが誘導されていることが確認できた。

次に、長期間・低濃度コカイン曝露時には慢性作用の兆候の一つとして平滑筋リモデリングが

起こるか否かの検討を行った。リモデリング促進機構とされるオートファジーの活性化マーカーLC3 および基質 p62 の発現量を測定したところ、濃度依存的な LC3-Ⅱ（活性型 LC3）の減少及び p62 の増加が検出され、オートファジーが抑制されていることが示唆された。コカイン濃度を 0.3mM にしたうえで、リモデリング促進因子の MFG-E8 及び細胞増殖マーカーCDK4、PCNA、Cyclin D1 の経時的発現変動を測定したところ、曝露日数経過に伴い増加の傾向を示し MFG-E8 の発現上昇及び細胞増殖能亢進を確認できた。以上のことから、平滑筋細胞へのコカイン長期曝露により MFG-E8 を介したリモデリングの発生が示唆された。

以上の培養細胞での結果を踏まえ、動物サンプルでも同様に MFG-E8 の発現量を測定したところ、心臓では差がなかったが胸部大動脈ではコントロール群に比べてコカイン投与群での有意な増加を認めた。さらに胸部大動脈において PCNA、CDK4 を測定したところ、CDK４においてはコカイン投与群での有意な増加を認めた。さらにラット胸部大動脈組織に対して MFG-E8 と、増殖マーカーである Ki67 の免疫染色を施し局在を検証したところ、コカイン群において血管内膜での Ki67 および MFG-E8 の発現上昇を認めた。

以上の結果から、平滑筋細胞への低濃度・長期間のコカイン曝露によりリモデリング制御因子とされる MFG-E8 の発現上昇、細胞増殖マーカーCDK4、PCNA の増加が確認でき、リモデリングの特徴を捉えることができた。同じことはラットにコカインを投与した際のウェスタンブロット・免疫染色の結果からも言え、平滑筋細胞のリモデリングを in vivo と in vitro の両方で確認することができた。一方でオートファジーマーカーの変動から、実験時の条件では in vivo, in vitro いずれにおいてもオートファジーは誘導されておらず、先行研究の報告に反してリモデリングへの関与は否定的という結果になった。

コカイン曝露により in vivo ・in vitro いずれにおいても MFG-E8 を介した平滑筋細胞のリモデリングが起こっていることが示唆された一方でオートファジーの誘導は見られずむしろ抑制されていたことは、コカイン毒性の一つとして細胞保護機構であるオートファジーの阻害を示唆しているとも考えられる。

【考察】

コカインによる心血管系への障害については毎年多くの報告があり疫学的データは豊富だが、細胞レベルでの毒性についてはほとんど研究が進んでいなかった。今回培養細胞及び動物を用いての研究によってその機構の一端を捉えることができた。コカイン短時間・高濃度曝露では細胞死が起こっており、これは先行研究の結果とも合致している。一方、長期間曝露により MFG-E8 の発現上昇、さらに各細胞増殖マーカータンパク質の増加傾向を確認でき、平滑筋リモデリングに続いて内膜肥厚が起こる可能性が示唆され、これらの変化が慢性コカイン毒性の引き金となる可能性が本研究で示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5181　号	木村　遥
論文審査担当者	主　査　清水　重臣 副　査　安原　眞人、吉田　雅幸	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、コカインの心血管系に及ぼす毒性の機序を、平滑筋由来培養細胞やラット個体を用いて解析したものである。コカインを高濃度曝露した際にはアポトーシスが誘導されること、低濃度曝露した際には細胞増殖が促され動脈硬化の一因となりうることが示された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

コカインの心血管系に及ぼす影響に関しては充分な解析が為されていない。そこで申請者は、平滑筋由来培養細胞株やラット個体を用いて、その解析を行なった。本研究は、コカインの心血管毒性を知る上で必要な研究であり評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

1. 高濃度のコカインをA7r5細胞（平滑筋由来培養細胞）に投与すると、アポトーシスが誘導された。
2. 低濃度のコカインを投与した際には、PCNAやCDK4などの細胞増殖マーカーや細胞リモデリングに関わると報告されているMFG-E8が上昇した。一方、オートファジーは誘導されなかった。
3. コカインを投与したラットの心血管においても、同様に細胞増殖マーカーやMFG-E8が上昇した。

以上のように申請者は、コカインの心血管細胞に及ぼす影響を明らかにしており、評価できる研究成果である。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、毒物学、細胞生物学などの知識が必要であり、申請者の知識と技術力は概ね評価に値する。

４）考察・今後の発展性

コカインの投与量や観察期間を種々に変えて検討を行うことにより、ヒトのコカイン中毒に近

い状態を模倣できるものと思われる。このような状況で、細胞生物学的解析を行うことにより、コカイン毒性の本態を明らかにできるものと思われる。MFG-E8の動態や役割の解析に関しても、より明快になることが期待できる。

３．その他　なし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山口　徹雄
論文審査担当者	主査　古川　哲史 副査　木村　彰方、下門　顕太郎
論　文　題　目	Prognosis of super-elderly healthy Japanese patients after pacemaker implantation for bradycardia

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

高齢化に伴いペースメーカー植込み術を施行される85歳以上の超高齢者は増加しているが、その予後については明らかではない。今回2011年1月1日から2013年6月30日までに武蔵野赤十字病院にて徐脈性不整脈に対し初回のペースメーカー植込みを行った患者894名のうち、自立歩行が可能で植込み時に1年以上の余命が見込まれた868名に対し、超高齢群(85歳以上、201名)と若年群(85歳未満、667名)の2群間比較を行った。中央値で1285日の経過観察後、累積死亡率は2群間で有意差を認めなかった。植込みの原因となった疾患名・洞調律か否か・ペーシングモードやペーシングの位置によって死亡率に差は見られなかった。多変量解析では高血圧・糖尿病・心筋梗塞の既往・脳梗塞の既往が独立した予後規定因子であった。以上より、健康な日本人超高齢ペースメーカー植込み患者の予後は若年者と同等であった。予後は原因疾患や植込み手技によらず、もともとの合併疾患によって規定されることが示された。

＜緒言＞

徐脈性不整脈に対するペースメーカー植込みは広く行われており、本邦においても年間5-6万件におよぶ。人口の高齢化に伴いペースメーカー植込み術を施行される85歳以上の超高齢者は増加しているが、その予後については明らかではなく、日常臨床において超高齢者に対しペースメーカー植込みを行うか否かの難しい選択を迫られることがある。また日本は世界有数の高齢化社会であり、本邦のペースメーカー植込みを行った超高齢患者の予後を検討することは有用であると考える。

＜方法＞

2011年1月1日から2013年6月30日までに武蔵野赤十字病院にて徐脈性不整脈に対し初回のペースメーカー植込みを行った患者894名のうち、自立歩行が可能で植込み時に1年以上の余命が見込まれた868名に対し、超高齢群(85歳以上、201名)と若年群(85歳未満、667名)の2群間比較を行った。また若年群についてはさらに65歳から84歳までと65歳以下に分けて生存解析を追加した。この研究は武蔵野赤十字病院内倫理委員会の承認を受け、その内容は病院のホームページ上に掲載されている。カルテより年齢・性別・身長・体重・既往歴・植込みの原因疾患(洞不全症候群または房

室ブロック)・植込み当初の心調律(洞調律または心房細動)・ペーシングのモード(DDDまたはVVI)・リード先端の位置(心尖部または心室中隔)などのデータを抽出した。全ての患者は植込み一週間後・三か月後・一年後に外来受診し、以後は一年ごとに外来で経過観察された。死亡原因は心臓死(心不全死・心筋梗塞による死亡または不整脈死と定義)・感染症・悪性腫瘍・その他と分類し、外来通院記録または電話による生存調査を行った。

＜結果＞

中央値で1285日の経過観察後、累積死亡率は2群間で統計学的に有意差を認めなかった(高齢群対若年群: 16.4% 対 14.2%, log-rank p=0.56)。65歳以下の若年群とそれ以外の群では累積死亡率に有意差を認めたが、85歳以上と65歳から84歳の比較ではやはり累積死亡率に差を認めなかった。植込みの原因疾患・洞調律または心房細動・ペーシングモードやペーシングの位置によって死亡率に差は見られなかった。多変量解析では高血圧・糖尿病・心筋梗塞の既往・脳梗塞の既往が独立した予後規定因子であった。

2015年の生命表より計算した一般市民の生存率と本研究のコホートを比較したところ、超高齢者においては一般市民より有意に3年間の累積生存率が高かった(本研究対一般市民: 0.87 対 0.70, p<0.001)。

＜考察＞

台湾からの報告によると、90歳以上のペースメーカー植込み患者の1年後の生存率は、年齢・性別・合併疾患をマッチさせた一般市民の生存率と差がなかった。またドイツからの報告では、平均76歳の他の心疾患の合併のないペースメーカー植込み患者の平均5.8年間の生存率は、年齢・性別をマッチさせた一般市民の生存率と差がなかった。これら2つの報告から、合併心疾患の影響を除けば、ペースメーカー植込み患者の生存率は一般市民と比較して、超高齢者では1年、高齢者では5年間同等であることが示されている。一方で本邦の超高齢者の平均余命は85歳時点で男性6.3年、女性で8.4年であり、前述2つの試験の結果は本邦の超高齢者に対し新規にペースメーカーを植え込むに当たり十分なデータとは言えないと思われる。

今回の研究からは中央値3.5年の経過観察において、ペースメーカー植込みを行った健康な日本人超高齢者の生存率は若年者と同等であることが示された。本研究の超高齢者は自力歩行が可能で、植込み時点で1年以上の余命が見込まれる健康な患者群であり、また定期的に病院に通院することも一般市民より平均余命が長かったことに寄与していると考えられる。本研究の結果より、植込み時点で1年以上余命が見込まれる自力歩行が可能な超高齢者に対するペースメーカー植込みは許容されると考える。

＜結論＞

植込み時点で自力歩行が可能で1年以上の余命が認められる健康な日本人超高齢ペースメーカー植込み患者の予後は若年者と同等であった。予後は原因疾患や植込み手技によらず、もともとの合併疾患によって規定されていた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5182　号	山口　徹雄
論文審査担当者	主　査　古川　哲史 副　査　木村　彰方、下門　顕太郎	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

2006 年 1 月 1 日から 2013 年 6 月 30 日の期間に徐脈性不整脈が原因でペースメーカを植え込んだ連続 894 名で、超高齢者（85 歳以上）、高齢者（65 歳～85 歳）、若年者（65 歳以下）で生命予後を比較した。ペースメーカを植え込んだ超高齢者と高齢者間に生命予後に有意差がなく、人口統計からみた超高齢者の生命予後と比較するとペースメーカを植え込んだ超高齢者の方が、生命予後が良かった。また、生命予後の予測因子は植え込み時の慢性腎疾患、高血圧、糖尿病、心筋梗塞の既往、脳卒中の既往であり、基礎にある疾患が生命予後の予測因子であった。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

超高齢化社会を迎えた日本では、高齢者にペースメーカを植え込むことが少なくないが、ペースメーカ植え込みを行った超高齢者の予後に関する検討は少ない。台湾やヨーロッパでは論文発表があるが、わが国では全くないことから、本研究は先駆的・独創的と考えられる。

２）社会的意義

超高齢者に対するペースメーカ植え込みが生命予後に良い影響を与えることが明らかになったことは、医師がペースメーカ植え込みを考える際に重要な示唆を与える。また、超高齢者に植え込む場合、植え込み後短期間で死亡することもあることから、医療経済的にも意義のある検討と考えられる。

３）研究方法・倫理観

研究は後ろ向き研究、非介入研究である。通常診療として行った行為をカルテから抽出したものであり、倫理的には問題のない臨床研究である。

４）考察・今後の発展性

相対的適応の患者で、ペースメーカ植え込みを行ったものと行わなかったものがいることから、この両者で生命予後を比較する研究を展開することが期待される。今回は生命予後のみに関する検討であったが、QOL 特に認知機能への影響などを今後検討することが望まれる。

３．その他

特記事項なし。

４．審査結果

最終審査では、結果の解釈、特にペースメーカ植え込み適応に自立歩行ができ１年以上の生命予後が認められることが含まれることから、人口統計との比較にはバイアスがかかっている可能性、超高齢者と高齢者で予想外に生命予後に差がなかった考えられる理由、など多岐にわたる質問が行われたが、すべてに満足のいく回答が得られた。副査の木村教授、下門教授との合議の上、博士（医学）の授与に値する学識を有すると判断する。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山邊　将史
論文審査担当者	主査　清水　重臣 副査　安原　眞人、北川　昌伸
論　文　題　目	Novel synthetic compounds with endoperoxide structure damage juvenile stage of *Schistosoma mansoni* by targeting lysosome-like organelles

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

新規合成化合物 N-89 は抗マラリア候補物質であり、幼虫期の住血吸虫に対しても殺虫効果を持っている。N-89 がどの様に虫体を殺滅するのか調べるため、同様の抗マラリア活性を持ち、蛍光標識が可能な N-89 の誘導体である N-251 を実験に用いた。N-251 は、*in vitro* の実験下において、幼虫期のマンソン住血吸虫に対し強い殺虫効果を示した。また、電子顕微鏡による N-251 処理虫体の超微細形態解析を行い、リソソーム様オルガネラと穿刺腺（acetabular gland）の崩壊が虫体内で生じ、細胞質溶解が引き起こされることを観察した。加えて、ローダミンを標識した N-251 とオルガネラマーカーを用いて、N-251 が酸性オルガネラに集積することも観察した。最後に、N-251 処理を行った虫体において、酸性オルガネラを染色する LysoTracker のシグナルが経時的に減少し、リソソーム特異的なカテプシン B の活性も同様に減少することを確認した。これらの結果より、本研究で用いた新規合成化合物はリソソーム様オルガネラの機能不全・崩壊を誘導し、虫体を殺滅したと考えられる。

〈緒言〉

住血吸虫症は顧みられない熱帯病（NTD）の一つであり、*Schistosoma* 属（マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、ビルハルツ住血吸虫等）によって引き起こされる。現在 7 億 7900 万人が感染のリスクに曝されており、少なくとも 2 億 5800 万人が治療を必要としている。住血吸虫の感染幼虫は、皮膚を貫通し体内に侵入、その過程でシストソミュラと呼ばれる幼虫に変化する。その後、循環系を通り肝臓の門脈に到達、雄成虫と雌成虫が抱合することで産卵を開始する。産下された虫卵が人に対し病原性を持っており、虫卵性肉芽種を形成し、臓器の線維化を引き起こす。

プラジカンテルは、過去数十年に渡り住血吸虫症の第一選択薬である。しかしながら、効果が主に成虫に限られており、幼虫期を殺滅できる薬剤の開発が求められてきた。

近年、環状過酸化構造を有する抗マラリア薬であるアルテミシニンとその誘導体が幼虫期を含む住血吸虫に効果を発揮することが報告されてきた。しかしながら、アルテミシニンを作製するためには、天然植物からの抽出工程が必要であり、安価な大量生産に課題がある。

そこで、環状過酸化構造を有する新規合成化合物である N-89・N-251 等が開発され、*in vivo*、

in vitro において、高い抗マラリア活性を有することが報告されてきた。また、近年我々は N-89 が幼虫期のマンソン住血吸虫に対し殺虫効果を示し、雌成虫の産卵抑制効果を有することを示してきた。

以上より、本研究では新規合成化合物が幼虫期の虫体をどのように殺しているのか（幼虫期虫体に対する N-89・N-251 の作用機序）を調べることを目的とし、解析を行なった。

〈方法〉

in vitro の実験系において、マンソン住血吸虫のシストソミュラを用いて化合物（N-89, N-251）の活性を評価した。次に N-251 による超微細構造の変化を調べるため、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて、N-251(50 μM)処理後のシストソミュラを経時的に観察した。また、ローダミンを標識した N-251 と各種オルガネラマーカーを用いて、化合物の取り込みと集積箇所の特定を行った。N-251 の酸性オルガネラへの影響及び、具体的なオルガネラを特定するために LysoTracker（酸性オルガネラ指示化合物）と Magic Red Cathepsin B（カテプシン B の活性測定化合物）を用いて、蛍光シグナルの経時的観察を行った。

〈結果〉

N-89 及び N-251 は、*in vitro* の実験下で共に強い殺虫効果を示した。また、この効果は濃度依存的であった。両化合物とも、50 μM の濃度で 3 日以内に全ての虫を殺虫可能であり、25 μM の濃度では、N-251 のみがほぼ全ての虫体を殺滅できた。しかしながら、25 μM の N-89 では、約 60%の虫しか殺滅できなかった。投与 3 日目の EC_{50} 値はそれぞれ 31.1 μM（N-89）と 15.7μM（N-251）であり、投与 7 日目は 19.9 μM（N-89）と 12.9 μM（N-251）であった。また、アーテメーサーの効果を評価したところ、投与 7 日目の EC_{50} 値で 174.9 μM であった。以上より、N-89/N-251 は、*in vitro* においてアーテメーサーよりも著しく効果が高いことがわかった。

次に、N-251 による虫体への傷害を形態学的に観察するため、TEM を用いて実験を行った。N-251 処理 2 時間後の虫体観察からは、虫体に顕著な変化は見当たらなかった。一方で 6 時間後では、穿刺腺の崩壊と細胞質の変性が観察された。更に、16 時間後の N-251 処理虫体においては、同構造物の崩壊及び特にリソソーム様オルガネラの傷害を観察することができた。しかしながら、外被の構造に顕著な崩壊は観察されなかった。以上から N-251 は、穿刺腺等を傷害することで細胞質変性を誘導し、虫体を殺滅することが示唆された。

次に、N-251 の挙動を解析するために、ローダミン標識 N-251 を用いて経時観察を行った。その結果、N-251 は速やかに細胞質全体に広がり、投与 2 時間後より明白な集積を確認することができた。さらにオルガネラマーカーも加え、N-251 の集積場所を探索したところ、リソソームに代表される酸性オルガネラに集積することが観察された。

酸性オルガネラに N-251 が集積したことから、N-251 によるリソソーム様オルガネラへの影響を評価するために、LysoTracker 及び Magic Red Cathepsin B の蛍光シグナルを経時定量した。実験の結果、LysoTracker 及び Magic Red Cathepsin B の蛍光シグナルが N-251 処理 2 時間後に著しく上昇することが観察された。一方で、6 時間後には、両シグナルが著しく減少したが、死細胞染色試薬（Propidium Iodide）や形態学変化と動きによる生死判定を行った結果、処理虫

体は依然として生存していることがわかった。以上より、N-251 処理により虫体死が生じる以前に酸性オルガネラが傷害され、リソソーム特異的なカテプシン B の活性が著しく低下していることがわかった。

〈考察〉

N-251 は N-89 と同様に *in vitro* において非常に強い抗住血吸虫作用を発揮した。更に N-251 は N-89 よりも即効性・殺虫効果ともに高い結果を観察できた。これは、N-251 の側鎖に水酸基が付加されている構造に起因する可能性が考えられた。また、N-251/N-89 共にアーテメーサーよりも高い効果を発揮した。通常アーテメーサーは赤血球由来のヘミンがあることでその効果が増強されることが知られているが、N-89/N-251 は、ヘミン非依存的に強い効果を発揮できることがわかった。このことから、N-89/N-251 とアルテミシニン誘導体は作用機序が異なることが考えられた。

次に、TEM を用いた N-251 処理虫体の超微細構造の変化を観察した結果、6 時間後には、既にリソソーム様オルガネラを含む穿刺腺が傷害されている像を観察できた。また、LysoTracker 及び Magic Red Cathepsin B 試薬を用いた実験から、N-251 処理 6 時間後には、酸性オルガネラの減少とリソソーム特異的なカテプシン B の活性の減少も見られている。6 時間後の時点では、虫体死が誘導されていなかったことから、リソソーム様オルガネラが N-251 の直接の標的となっており、その崩壊の結果、虫体が死ぬものと推測される。一般的に、リソソームは消化機能を有し、分子のリサイクルに関わっている。そして、リソソームの崩壊はプロテアーゼの放出を伴い、細胞死を引き起こすことが知られている。また、カテプシン B がマンソン住血吸虫セルカリア（シストソミュラに変形する前の感染幼虫）の穿刺腺に存在していることが報告されている。以上の情報と我々の結果と合わせて考えると、N-251（N-89）は穿刺腺に含まれているリソソーム様オルガネラ傷害し、これによりカテプシンなどの内因性の酵素の異常な流出を引き起こし、虫体にとって致死的に働いていることが考えられた。また、リソソーム様オルガネラ傷害の後に、虫体死が誘導されることも本研究の中で観察されたことから、N-251 によるリソソーム様オルガネラの減少及び活性の低下は、虫体死によって引き起こされたものではないことがわかった。即ち、このリソソーム様オルガネラを含む穿刺腺の傷害、中でもリソソーム様オルガネラの傷害が N-251 の効果の起点となっている可能性が示唆された。

〈結論〉

幼虫期のマンソン住血吸虫において、N-251（N-89）は、酸性オルガネラに集積し、リソソーム様のオルガネラを傷害することで虫体を殺滅すると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5183　号	山邊　将史
論文審査担当者	主　査　清水　重臣 副　査　安原　眞人、北川　昌伸	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、マンソン住血吸虫の幼虫に対する殺虫剤として、環状過酸化構造化合物 N-89 ならびにその 1-ヘキサノール誘導体である N-251 の解析を行なったものである。申請者は、これらの化合物が in vitro において強い殺虫効果を示すこと、その作用機序として虫体の穿刺腺に含まれるリソソーム様オルガネラの傷害が関与していることを明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

マンソン住血吸虫に対しては、効果的に作用する薬剤が乏しく、新規薬剤の開発が求められている。本研究は、新規化合物N-89ならびにN-251の、マンソン住血吸虫に対する薬剤としての有用性、その作用機序を解析したもので、高く評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

1. 新規化合物N-89とN-251は、in vitroにおいて、既存薬に比して強い殺マンソン住血吸虫効果を示した。また、N-251はN-89の約２倍の活性であった。
2. N-251処理虫体では、穿刺腺におけるリソソーム様オルガネラの傷害が顕著であった。
3. 詳細な解析の結果、N-251はリソソーム様オルガネラに集積し、このオルガネラを傷害することで、細胞質溶解を促しているものと考えられた。

以上のように申請者は、マンソン住血吸虫に対する殺虫剤として、２種類の新規化合物の有用性ならびにその作用機序の一端を明らかにした。これらは、高く評価できる研究成果である。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、寄生虫学、細胞生物学、微細形態学などの知識が必要であり、申請者の高い学識と技術力が伺える。

４）考察・今後の発展性

今後、in vivoでの殺虫効果の検証や安全性試験などを行うことにより、臨床に応用できる新たな抗住血吸虫薬の開発ができるものと思われる。

３．その他　なし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	西川路　武人
論文審査担当者	主査　石川　俊平 副査　北川　昌伸、三宅　智
論　文　題　目	Oncogenic roles of the SETDB2 histone methyltransferase in gastric cancer

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ヒストン H3 の 9 番目のリジン(K)をメチル化する SETDB2 は遺伝子の発現抑制に関与しているが、SETDB2 とがん発症の関連は知られていない。本研究では胃がんにおける SETDB2 の発現異常と機能解析を行った。免疫組織化学染色法を用いて胃がん組織の SETDB2 タンパク質の発現を調べた結果、72 症例中 30 症例 (41.7%)で高発現が観察された。更に、進行胃がんにおける SETDB2 の発現は早期胃がんよりも高く($P<0.05$)、予後不良であった($P<0.05$)。胃がん細胞株を用いて SETDB2 のノックダウンおよび強制発現を行った結果、SETDB2 は細胞増殖、遊走能および浸潤能を促進することが示唆された ($P<0.05$)。また SETDB2 の発現抑制により、H3K9 のトリメチル化 (H3K9me3)レベルが減少した。SETDB2 の発現抑制後のマイクロアレイ解析では、がん抑制遺伝子 *WWOX* と *CADM1* の発現亢進が認められた。クロマチン免疫沈降解析の結果、*WWOX* と *CADM1* のプロモーター領域の H3K9me3 レベルは SETDB2 の発現を抑制すると減少し、過剰発現させると増加していた。さらに、これらプロモーター領域に SETDB2 タンパク質がリクルートされることが明らかになった。以上より、胃がんにおいて SETDB2 は *WWOX* と *CADM1* の発現を負に制御しており、SETDB2 の過剰発現は胃がんの進行に関与していることが示唆された。

＜緒言＞

ヒストンメチル化酵素は保存された SET ドメイン(SuVar3-9, enhancer of Zeste, Trithorax)を持ち、機能的にクロマチン構造の変化や遺伝子の発現制御において重要な役割を果たしている。ヒストン H3 のリジン(K)メチル化は遺伝子発現と密接に関わっており、H3K4 トリメチル化(me3)は遺伝子の活性化、H3K9me3 と H3K27me3 は遺伝子発現抑制に働いている。ヒストン修飾を触媒する酵素は複数存在しており、それらをコードする遺伝子の過剰発現、発現低下やメチル化異常が様々ながんで報告されている。

ヒストンメチル化酵素の中で、SETDB1 と SETDB2 は bifurcated SET ドメインとメチル化 CpG 結合ドメインの両方のドメインを持つ H3K9 メチル化酵素である。SETDB1 は複数の腫瘍で過剰発現していること、およびがん促進的機能を持つという知見は数多い。一方、SETDB2 は

胚発生の段階で背部形成域と内臓や神経システムの左右非対称性を制御していること。さらに、SETDB2 は H3K9 トリメチル化を介して、クロマチン凝縮に関連しているという報告がある。しかし、SETDB2 の遺伝子発現抑制における分子メカニズムやがんにおける役割は不明である。本研究では、胃がんにおける SETDB2 の発現異常と機能の解析を行った。

＜方法＞

72 症例の胃がん組織における SETDB2 タンパク質を免疫組織化学染色法で解析し、臨床病理学的諸性状との関連を調べた。更に、胃がん細胞株 13 株の SETDB2 タンパク質の発現を Western blot 法で調べた。次に SETDB2 発現陽性胃がん細胞に SETDB2 siRNA、陰性胃がん細胞に SETDB2 発現ベクターを導入し、それぞれ SETDB2 の発現抑制と強制発現を行った。siRNA または発現ベクター導入後、5 日間の細胞増殖を WST-8 法で検討した。また、導入 48～72 時間後の遊走能と浸潤能について Transwell migration/invasion assays で調べた。SETDB2 発現抑制後の MKN74 細胞において、cDNA マイクロアレイ解析により SETDB2 の標的遺伝子を探索した。次に、抗 H3K9me3 抗体または抗 SETDB2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP：Chromatin immunoprecipitation)法を行い、発現変化した遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾状態と SETDB2 の関与を調べた。

＜結果＞

胃がん組織における SETDB2 の発現を免疫組織化学染色で調べた結果、71 症例中 30 症例(41.7%)の胃がん組織の核で SETDB2 発現が認められた。一方、非がん部胃粘膜上皮での SETDB2 発現は検出されなかった。SETDB2 と胃がんの臨床病理学的諸性状の関連性を検討した結果、早期胃がんに比べて進行胃がんで有意に発現亢進しており、SETDB2 高発現群の予後が悪いことが明らかになった($P<0.05$)。Western blot 解析では、胃がん細胞 13 株中 4 株で SETDB2 発現が認められた。SETDB2 発現抑制を行った胃がん細胞 2 例(MKN74 と MKN45)では、細胞増殖能、遊走能および浸潤能が Negative control siRNA 導入細胞に比べて有意に減少した（$P<0.05$）。一方、SETDB2 を強制発現した細胞株(AGS と NUGC3)では細胞増殖能、遊走能、浸潤能が増加した（$P<0.05$）。また、SETDB2 発現を抑制すると胃がん細胞内の H3K9me3 タンパク質量が減少したが、H3K9me2 と H3K9me1 の量的変化は認められなかった。

SETDB2 発現を抑制した MKN74 細胞では、合計 185 個の遺伝子が発現亢進し、335 個は低下した。これら標的遺伝子群より、がん関連遺伝子として既に報告されている遺伝子をそれぞれ 3 個ずつ（発現亢進群：*WWOX, CADM1/TSLC1, CCDC80*；発現低下群：*NDRG1, CA9, FZD9*）選び、その発現変化を RT-PCR で検証した。*FZD9* を除く調べた 5 つの遺伝子発現の変化は SETDB2 発現抑制後の MKN45 細胞でも検出された。SETDB2 は転写抑制に働く H3K9me3 に関わっていたことから、SETDB2 のノックダウンで発現亢進した 3 つの遺伝子を対象とし、ChIP 解析を行った。その結果、SETDB2 を発現抑制すると、*WWOX* と *CADM1* のプロモーター領域の H3K9me3 レベルが減少した。一方、SETDB2 を強制発現すると、これらの領域の H3K9me3 レベルは増加した。また、SETDB2 タンパク質は、*WWOX* と *CADM1* の遺伝子プロモーター領域に結合することが明らかになり、SETDB2 がこれらの領域にリクルートされることが示唆され

た。H3K9me3 変化および SETDB2 の結合は *CCDC80* の遺伝子プロモーター領域では検出されなかった。

WWOX の発現を抑制させた胃がん細胞株は、SETDB2 が発現亢進させた細胞と同様に、細胞増殖、遊走能と浸潤能が亢進した。

＜考察＞

様々な腫瘍でヒストンメチル化関連遺伝子の発現異常が報告されている。特に、H3K9 メチル化に関わる SETDB1 や Suv39H1 の過剰発現が肺がんや肝がんなど多くの腫瘍で認められている。これらの過剰発現は、細胞増殖、浸潤能に関与すること、Setdb1 はトランスジェニックゼブラフィッシュモデル実験でメラノーマの形成を促進することが知られている。本研究の結果、SETDB2 は胃がん組織のがん部位で過剰発現し、機能的にも SETDB1 や Suv39H1 と同様に細胞増殖、浸潤能を促進した。従って、SETDB2 はがん促進的機能を有し、SETDB2 の過剰発現が胃がんの進行に関与していることが示唆された。

H3K9 メチル化酵素関連遺伝子は、K9 をグローバルにトリ、ジ、モノメチル化するばかりでなく、下流遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域の K9 を特異的にメチル化する。胃がん組織ではグローバルな H3K9me3 がタンパク質レベルで亢進していることが報告されている。本研究で、SETDB2 はグローバルな H3K9me3 を特異的に亢進したことから、胃がんにおける H3K9me3 レベルの亢進は SETDB2 の過剰発現に起因する可能性が考えられた。

本研究により、がん抑制遺伝子 *WWOX* と *CADM1* が SETDB2 の直接的な標的遺伝子であることが明らかになった。即ち、SETDB2 は H3K9me3 をグローバルに亢進するだけでなく、*WWOX* と *CADM1* のプロモーター領域にリクルートされ、その領域の H3K9 を特異的にトリメチル化することがわかった。胃がんや多くの腫瘍で、WWOX と CADM1 はプロモーター領域の DNA メチル化異常によって発現消失していることが既に報告されている。今回調べた胃がん細胞株 13 株は全て WWOX の DNA メチル化は認められなかったが、6 株には CADM1 のメチル化が認められた。これら 2 つのがん抑制遺伝子の発現抑制には DNA メチル化ばかりでなく、SETDB2 高発現も重要であることが示唆された。

以上より、SETDB2 は胃がん組織と細胞株で高発現しており、機能的に細胞増殖、遊走能と浸潤能を亢進していた。更に、WWOX などのがん抑制遺伝子のプロモーター領域の H3K9 をトリメチル化することで、それら標的遺伝子の発現を負に制御していることが明らかになった。

＜結論＞

本研究により、SETDB2 は胃がんで発現亢進し、がん促進的機能も持つことを明らかにした。SETDB2 を抑制することが、胃がんにおける治療戦略につながるということが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5184　号	西川路　武人
論文審査担当者	主　査　石川　俊平 副　査　北川　昌伸、三宅　智	

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

本論文は胃癌におけるヒストンメチル化酵素のひとつであるSETDB2の意義について臨床献体及び細胞株を用いて検証した論文である。

2.　論文審査

1）研究目的の先駆性・独創性

申請者はヒストンメチル化酵素 SETDB2 の持つ癌に対する意義が未だ不明なところが多いことに着目し、臨床胃癌検体を用いて SETDB2 の発現と臨床病理学的因子との詳細な関連解析を行うとともに、細胞株を用いた実験的手法により SETDB2 の機能的な検証も行った。そのアプローチは独創的で評価に値する。

2）社会的意義

本研究で得られた結果は、胃癌における SETDB2 の意義の一端を解明するものであり、難治疾患である胃癌の診断・治療に資するものと考えられる。

3）研究方法・倫理観

申請者は臨床胃癌検体を用いて SETDB2 の発現と臨床病理学的因子との詳細な関連解析を行い胃癌の一部で SETDB2 が高発現すること、また予後因子と相関することを見いだした。また細胞株を用いた実験的手法により SETDB2 が、癌細胞の増殖・移動・浸潤に正に寄与することを示し、また発現解析を組み合わせことにより重要な下流遺伝子としてWWOX,CADM1を見いだした。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されたと考えられる。

4）考察・今後の発展性

本研究結果は SETDB2 が胃癌において癌遺伝子としての役割をはたすことを示し、今後の胃癌の診断・治療に資する可能性がある。

3.　審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	孫　忠良
論文審査担当者	主査　杉原　泉 副査　西川　徹、前原　健寿
論　文　題　目	Inhibiting NADPH oxidase protects against long-term memory impairment induced by neonatal sevoflurane exposure in mice

（論文内容の要旨）

<Abstract>

Background: Neonatal exposure to anesthetics, such as sevoflurane, has been reported to induce neuronal apoptosis and produce behavioral deficits in rodents. Recent studies have demonstrated that the co-administration of a non-selective antioxidant with anesthetics protects rodent neonates against long-term cognitive impairment and neuronal apoptosis. This suggests that reducing oxidative stress is crucial for preventing memory impairment produced by neonatal anesthetic exposure.

Superoxide, which is generated from molecular oxygen, is a precursor of several highly reactive oxygen species, and therefore, it is necessary to fully understand its role in oxidative stress and neuronal pathologies. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase is one of the most important sources of superoxide. Previous studies have shown that superoxide production by NADPH oxidase underlies cognitive impairment after cerebral ischemia and traumatic brain injury. It is not known whether targeting NADPH oxidase during anesthesia protects the neonatal brain from long-term memory deficits. In the present study, we investigated whether the NADPH oxidase inhibitor apocynin protects against long-term memory impairment produced by neonatal sevoflurane exposure in mice.

Methods: Postnatal day six C57BL/6 mice were exposed to 3% sevoflurane in 40% oxygen for 6 h. For the experimental treatments, the pups from the same litter were randomly divided into four groups; (1) non-anesthesia (NA group, control mice), (2) NADPH oxidase inhibitor treatment (apocynin) group where mice received intraperitoneal apocynin, 50 mg kg^{-1}, in a total injection volume of 10 µl, (3) 3% sevoflurane exposure (SEVO group, where mice received 3% sevoflurane for 6 h), and (4) apocynin in combination with sevoflurane (apocynin+SEVO group, where mice received 3% sevoflurane for 6 h in addition to intraperitoneal apocynin, 50 mg kg^{-1}).

After 6 h sevoflurane exposure, mice from each group were sacrificed for superoxide detection in the brain by DHE fluorescence assessment; after 18 h after treatment, mice were

sacrificed for histopathological evaluation of apoptosis in the brain or evaluation of NADPH oxidase subunits expression, mitochondrial function and apoptosis in the brain by western blot analysis. To assess long-term cognitive impairment induced by sevoflurane exposure, male mice in each experimental group underwent behavioral testing in adulthood (11–13 weeks of age).

Results: The 6 h neonatal sevoflurane exposure increased concentrations of superoxide in the brain, and the NADPH oxidase inhibitor apocynin abolished this effect of the anesthetic. Neonatal sevoflurane exposure increased expression of the NADPH oxidase subunit p22phox in the brain, and apocynin abolished this increase. However, gp91phox, another NADPH oxidase subunit, remained unchanged in all experimental groups. The 6 h neonatal sevoflurane exposure significantly increased concentrations of cytochrome c in the brain, and simultaneously increased concentrations of cleaved caspase-3, and concentrations of another apoptosis marker, PARP. Apocynin reduced concentrations of cytochrome c and apoptosis in the brains of these mice. Neonatal sevoflurane exposure significantly reduced the freezing response in the contextual fear conditioning test and in the cued fear conditioning test. Co-administration of apocynin abrogated this decline in long-term memory function. These results indicated that co-administration of apocynin could suppress impairment of memory subsequent deficits caused by neonatal sevoflurane exposure.

Discussion: In this study, co-administration of apocynin prevented mitochondrial damage and apoptosis by abolishing oxidative stress, and further preserved long-term memory function induced by neonatal sevoflurane exposure. Consistent with previous studies, neonatal sevoflurane exposure increased concentrations of superoxide and the oxidative stress marker 4-HNE. It also simultaneously increased mitochondrial damage and apoptosis in the brain. Neonatal sevoflurane exposure produced an approximately 40% reduction in subsequent freezing responses in the contextual and cued fear conditioning tests. These results suggest that inhibiting NADPH oxidase protects against long-term memory impairment induced by neonatal sevoflurane exposure by alleviating oxidative stress-induced neuronal damage and dysfunction.

We found that neonatal sevoflurane exposure increased expression of the NADPH oxidase membrane subunit p22phox in the brain, suggesting that increased NADPH oxidase activity underlies the oxygen free radical overproduction caused by the anesthetic. Previous studies in animal models of ischemic and degenerative brain injury have also reported a role for superoxide production resulting from NADPH oxidase activation. Another anesthetic, ketamine, has been reported to induce schizophrenia-like behavior via NADPH oxidase activation in adult mice. These results strongly suggest that activation of NADPH oxidase is a major cause of cerebral malfunction. In previous studied in rodent neonates, 3% sevoflurane exposure did not cause hypoxia and hypoventilation. The mechanisms through which anesthetics activate NADPH oxidase in the neonatal brain remain to be clarified.

Our findings are in agreement with previous studies demonstrating that the co-treatment with a non-selective antioxidant, such as EUK-134, along with i.v. or volatile anesthetics, protects rodent neonates against neuronal apoptosis and long-term cognitive impairments, Our findings suggest that the inhibition of NADPH oxidase is crucial for alleviating memory impairment in newborn animals subjected to anesthetic insult, and that such non-selective antioxidants may be neuroprotective via decreased oxidative injury. The present findings, however, do not permit the conclusion that apocynin protects against anesthetic toxicity in neonatal brain solely through effects on superoxide. The sevoflurane exposure augmented protein expression of p22phox, but not gp91phox (NOX2), in the current study. The NADPH membrane subunit p22phox interacts with the NOX1, NOX2, NOX3 and NOX4 homologues, stabilizing the enzyme complex.

Interestingly, Coyoy and colleagues found that continuous daily administration of apocynin to rats from postnatal days induced a significant change in cerebellar foliation and an alteration in motor behavior, suggesting that NADPH oxidase is indispensable for proper brain development. In comparison, in the present study, apocynin alone did not affect long-term memory function, although it prevented memory impairment caused by neonatal sevoflurane exposure. These conflicting reports indicate the importance of the timing of apocynin administration.

Conclusions: We demonstrate in this study that apocynin prevents long-term memory impairment in mice neonatally exposed to sevoflurane anesthesia by decreasing superoxide concentrations through inhibition of NADPH oxidase. These findings suggest that NADPH oxidase inhibitors may have therapeutic potential for protecting against cognitive dysfunction resulting from neonatal anesthesia in animals and humans. Further studies are needed.

<要旨>

背景： 全身麻酔において汎用されているセボフルランの投与により脳神経細胞のアポトーシスおよび成長後の記憶障害、学習障害が引き起こされることが報告されている。近年の研究により、抗酸化剤により超酸化物(superoxide)を除けば発達期の脳への吸入麻酔薬の影響が抑えられる可能性が示唆される。そこで我々は活性酸素の元の一つである NADPH oxidase に注目した。

方法： 6 日齢の C57BL/6 マウスを３％セボフルランに６時間曝露、治療として麻酔前３０分に NADPH oxidase 阻害薬 apocynin（50 mg kg^{-1}）を腹腔内注射した。セボフルラン曝露した後、脳内の超酸化物、ミトコンドリア機能、アポトーシスと NADPH oxidase サブユニット発現を分析した。さらに、長期記憶を評価するため、麻酔曝露後、成獣になってから恐怖条件付け学習テストを行った。

結果： 対照群と比較してセボフルラン群においては脳内の超酸化物、NADPH oxidase サブユニット p22phox の発現、ミトコンドリア障害のマーカーcytochrome c 発現とアポトーシスが有意に増加していることを確認した。Apocynin の前投与によりセボフルラン暴露により引き起こ

される超酸化物の増加、ミトコンドリア障害、NADPH oxidase サブユニット p22phox の発現増強およびアポトーシスを抑制できることを認めた。
また、長期記憶を評価するための恐怖条件付け学習テストにおいて、セボフルラン暴露により引き起こされる長期記憶障害も apocynin の前投与により改善できた。
結論： 以上の結果により、NADPH oxidase 阻害により、幼若期マウスの脳に対するセボフルランの神経毒性、及び成長後の長期記憶障害が予防できることを確認した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5185　号	孫　忠良
論文審査担当者	主　査　杉原　泉 副　査　西川　徹、前原　健寿	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、マウスの幼若期におけるセボフルラン麻酔が脳に及ぼす細胞障害と長期的な認知機能障害に関して、NADPH oxidase 阻害薬の保護効果を明らかにしたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

臨床的に小児の全身麻酔には、成人と同様にセボフルランが通常使用される。しかし、小児の神経系は成人のものと異なって可塑性が強く、その時期における影響は、長期的に脳機能に影響を及ぼす可能性があるが、これまでほとんど注目されていなかった。その点に注目し、幼若マウスを用いて、セボフルランの影響が酸化ストレスのマーカーの発現の変化や長期記憶の障害として現れることを明らかにし、さらに、それらを指標として、NADPH oxidase 阻害薬の保護効果を示した。

２）社会的意義

小児において全身麻酔薬による障害が発生することもあるなかで、現在通常に使用される麻酔薬セボフルランの小児に対する問題点を動物実験のレベルで明白に示したこと、そして、それの解決につながる予防薬の開発の方向性を示したことは、臨床的にも非常に意義の高い成果である。

３）研究方法・倫理観

本研究では、マウス 5 日齢での 6 時間のセボフルラン麻酔という条件に限定しているが、これは予備実験で最も効果的ということが分かった条件である。この条件に限局して研究したため、システマティックな解析を行うことができた。解析内容は、(1)超酸化物の指標である dehydroethidium の蛍光の増強、(2)活性酸素供給源である NADPH 酸化酵素 p22phox サブユニットの増加、(3)ミトコンドリア障害マーカーの cytochrome c の発現増加、(4)アポトーシスの指標となる capase-3 の発現増加と、多くの酸化ストレス関連の指標の値をシステマティックに調べており、さらに、成長後の行動レベルへの影響を恐怖条件付けテストによって観察している。多種類の実験に必要な知識や技術を十分に備えて、適正な研究を行っている。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究によって明らかになった麻酔薬による障害とその予防の可能性を、臨床現場で応用できるようにしたいということを考察している。予防のための薬物として、本研究で用いた NADPH oxidase 阻害薬を水素に代えるなど、そのための方策をも考察している。それらの発展が期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	藤原　立樹
論文審査担当者	主査　大友　康裕 副査　古川　哲史、井上　芳徳
論　文　題　目	Optical Dynamic Analysis of Thrombus Inside a Centrifugal Blood Pump During Extracorporeal Mechanical Circulatory Support in a Porcine Model

（論文内容の要旨）

【背景と目的】

重症心不全および呼吸不全の患者に対するECMOやVADといった体外補助循環は近年目覚ましい進歩を遂げている。しかし、体外循環で懸念される重篤な合併症のひとつは血栓塞栓症であり、それを回避するために抗凝固療法が行われるが、過剰な抗凝固療法は出血合併症の原因となる。

臨床現場における血栓モニタリングの現状は、医療従事者がポンプ・人工肺・回路チューブなどに光を当てて目視で血栓を観察し、音や振動の違い、遊離ヘモグロビン(Hb)、LDH, D-dimer, TATなど採血検査によるデータの推移、ポンプの流量や消費電力等を確認し、血栓の有無・回路の安全性を判断している。しかし回路チューブや人工肺などは表面からの観察が可能であるが、ポンプ内部は観察が難しい。

勿論、これまでに数多くのポンプ内血栓形成を推測する手法が試みられてきたが、依然としてポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングはいまだに達成されていない。

我々はポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングの達成を目標に研究を行ってきた。そしてポンプ内の血液凝固状態を観察可能な可視近赤外分光イメージング装置を開発し、模擬回路実験ではポンプ内血栓検出に成功した。

しかし実臨床で生じている現象をよりリアルに捉えるには、大型動物実験で検証する必要がある。本研究の目的は、開発した血栓イメージング装置を用いて、生体と接続した体外循環中のポンプ内で血栓が形成される過程を詳細に観察することである。これまで誰も達成できていない、ポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングを試みた。

【方法】

本研究は、東京医科歯科大学の動物実験倫理委員会審査にて承認を得て行った（承認番号：0170149A）。

産総研で開発した動圧浮上遠心血液ポンプを使用した。このポンプを本研究に使用した理由は、ポンプ底面から内部が観察しやすいためである。

本研究では45kgのSPFブタを6頭使用した。ブタを使用した理由は、血液の赤血球凝集や凝

固因子や血小板の振る舞いがヒトにかなり近いためである。

本研究では静脈血モデルと動脈血モデルの 2 種類の動物モデルを作成し、それぞれ 3 頭ずつを割り当てた。理由は、臨床現場では静脈血・動脈血のどちらを用いた体外循環も行われており、酸素飽和度や拍動性に左右されることなく、本装置がポンプ内血栓を検知できるかを検証したかったためである。

＜静脈血モデル＞

全身麻酔下、ブタを仰臥位とし、両側頚部に小切開を加え、両側頸静脈に送脱血管を挿入した。本モデルは V-V ECMO を模したものであるが、人工肺は使用しなかった。本研究はポンプのイメージングが目的であり、人工肺を回路に加える必要はないと判断した。

＜動脈血モデル＞

ブタを側臥位とし、第 6 肋間にて左肋間開胸を加えた。送血管は下行大動脈に、脱血管は左室心尖部に挿入した。送脱血管は静脈血モデルと同じものを使用した。本モデルは LVAD を模したものである。

抗凝固療法は送脱血管の挿入時のみに Heparin を投与し、ポンプ流量が安定した後に速やかに Protamine を投与した。本研究の趣旨は、ポンプ内血栓の形成過程を観察することであり、持続的な抗凝固療法は行わず、血栓が出来やすい状況を作成した。

＜Imaging method＞

これまでの我々の研究で、血液ポンプ内の血栓形成領域において、Hb による吸光度は、周囲全血の吸光度と比べて減少していることが確認された。すなわち、フィブリンが生成されたときに赤血球がフィブリンにトラップされるが、流体力により捕捉されて赤血球が離脱する。そのため、フィブリン生成域の赤血球密度が低下し、Hb による吸光度が減少したと考えられる。この現象は、血栓と周囲全血の Hb 濃度を測定し比較することで証明した。

本研究では、分光光度計と CCD カメラを搭載した Hyperspectral (HS) カメラを用いる Hyperspectral Imaging (HSI)というイメージング手法を用いた。HS カメラは画像の各 pixel における波長情報を取得することができる。HSI はこれまでに細胞組織や腫瘍内の酸素飽和度やヘモグロビンの集中を量的に調べるために使われている。

波長は 608～752nm を選択した。ポンプ内は血液で満たされているため、肉眼や既存の RGB カメラでは内部の様子を観察することは難しい。波長 608～752nm の可視・近赤外光はヘモグロビンや水による吸収及び散乱の影響が小さいため、血液ポンプの深部を可視化することが可能になる。更に、血栓形成域での Hb 濃度の低下という現象を利用して、HS カメラでは血栓と全血の光学特性の違いを画像としてとして捉えることができる。波長 608～752nm（分解能 4nm）の分光イメージングを行い、最終的に各波長の画像を積算することによって一つの画像を作成した。

HS カメラは単波長であれば 300ms の時間分解能を有する。しかし撮影波長を広げると各波長の画像取得時間が積算されることになるため、撮影に要する時間が長くなる。そのため一般的に

は動いているものの撮影に対しては使われていない。そこで我々はストロボスコープを用いた工夫を行った。ポンプの回転周波数と同じ周波数のフラッシュライトで照射することで、ストロボ効果により高速回転するポンプ内の静止画像を得ることが可能となった。

また、ポンプ内部の回転数の揺らぎのため撮影した各波長画像の位相がそろわないことがある。これをプログラミングによる回転処理を施し、全ての波長画像におけるインペラ位相角を統一することで、鮮明なイメージング画像を取得することに成功した。

体外循環が安定した後に、HS カメラによるポンプの撮影を開始した。撮影された画像は動画としてモニターに表示された。ポンプ内に血栓が観察されても、すぐには循環を停止せず、血栓の変化の様子を可能な限り撮影した。

実験終了のタイミングに関しては、1) ポンプ内血栓が揺らぎ始めてポンプ外へ飛びそうな時、2) 血栓形成によりポンプ流量が著しく減少した時、これら 2 項目とした。実験終了後、ポンプの前後に遮断鉗子をかけて回路を切断し、ポンプを取り出した。丁寧にポンプ内の血液を生理食塩水で置換し、写真撮影をした。動物は塩化カリウムを静注して安楽死させた後に解剖し、主要臓器（心臓、肺、腎臓、脾臓等）の観察を行った。

【結果】

全 6 頭の動物実験において循環開始後 24 時間以内に血栓が検出された。更にポンプ内で血栓が形成される過程を詳細に観察することに成功した。HS カメラの血栓領域と実際の血栓の形は一致していた。以下、例を挙げて血栓成長の様子を説明する。

静脈血モデルの 1 例では、循環開始 98 分後よりイメージング画像で 2 時方向に暗色領域が出現し、徐々に拡大した。300 分まで撮影を行い、実験を終了とした。動脈血モデルの 1 例では、循環開始 496 分後に糸のような血栓がポンプ内に飛んできた瞬間を確認した。この血栓がポンプ中心で回転し、急速かつ急激に増大した。ポンプ流量低下を示すようになったため、510 分で実験を終了とした。

ポンプ内血栓検知までの循環時間は静脈モデル：394±353 分、動脈モデル：461±42 分で有意差は認めなかった(P=0.384)。動脈血と静脈血のどちらの場合でも血栓の検出に優劣を感じなかった。このような大きな血栓を作る前に、小さな塞栓子がポンプ内に飛来して、すぐに飛んでいく様子が時折モニターで観察された。

採血結果に関して、ポンプ内血栓形成検出時に関連する有意な変化は認められなかった。解剖では主要臓器に粗大な梗塞所見は認めなかった。毎回の実験で、左心室内脱血管の周り(Wedge thrombus)、チューブとポンプの接続部に糸のような血栓を認めた。

【考察】

近年の重症心不全治療では、遠心ポンプを用いた左心補助の有用性が認められ、積極的に行われているが、ポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングはいまだに達成されていない。

本研究では、動物実験ではあるが、生体に装着したポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングに初めて成功した。本装置は、血栓がポンプ外から飛んできたのか、ポンプ内で形成されたのか判別することが可能であり、また血栓が成長する様子を観察することが可能である。

実験結果より、ポンプ内血栓の出来方には大きく分けて二種類のタイプがあることが分かった。ポンプ内に小さな血栓が形成されて徐々に拡大していくタイプと、ポンプ上流で形成された血栓がポンプ内に流入して急速に拡大していくタイプである。ポンプ上流の血栓形成部位として、左室内の脱血管周囲の wedge thrombus や回路チューブとポンプ入口部の接続部が実験で確認された。臨床でもこれらは血栓好発部位と報告されている。

従って本研究結果から、ポンプ内血栓の予防には、ポンプの抗血栓性を高めるのみならず、送脱血管や回路の接続部の抗血栓性も重要であることが分かる。

採血検査ではポンプ内血栓形成を反映する変化を認めなかった。ポンプ内血栓は、動物の全血液量と比較すれば体積が小さく、そのため検査結果に有意な変化を及ぼさなかった可能性がある。つまり採血検査のみでポンプ内の小さな血栓を検出するには限界があると示唆された。

今後の展望として、血栓形成による血液光学特性の変化をシンプルなアルゴリズムとして捉える手法へ集約することで、血栓モニタリングをオートメーションセンサー化することや、より多くのポンプ駆動装置の形態に対応した撮影方法へ変えていくことを検討している。

本研究にはいくつかの Limitation がある。一つ目は、N 数の少ない動物実験であること。二つ目は、特殊なカメラを使用した限定された条件下でのポンプ内血栓の観察であるということである。しかし我々は、本装置の臨床応用を考えているわけではない。生体に装着したポンプの内血栓を近赤外分光でリアルタイムモニタリングすることに初めて成功したこと、ポンプ内血栓に関連する様々な現象が観察できたことが大きな意義であると考えている。

【結語】

大型動物実験においてポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングに成功した。本研究は安全な体外循環の実現に貢献すると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5186　号	藤原　立樹
論文審査担当者	主　査　大友　康裕 副　査　古川　哲史、井上　芳徳	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

体外補助循環中の遠心血液ポンプ内血栓の形成過程を、高度先進的な光学的動態解析手法を用い、大型動物実験にて検証した研究である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

体外補助循環で懸念される重篤な合併症の一つは血栓塞栓症であり、これまでに数多くの手法が試みられてきたが、ポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングはいまだに達成されていない。申請者は産業技術総合研究所と共同して、ポンプ内の血液凝固状態を観察可能な可視近赤外分光イメージング装置を開発し、模擬回路実験でポンプ内血栓検出に成功した。これにより、これまで誰も達成できていないポンプ内血栓のリアルタイムモニタリングを可能とした。

２）社会的意義

本邦の体外補助循環は急激に普及・拡大している。臨床の現場では体外補助循環中の血栓塞栓症の発生と出血性合併症との間で、適切な抗凝固療法を確立することに難渋している。体外補助循環中のポンプ内血栓をリアルタイムにモニタリング可能となれば、大きなブレイクスルーとなる。申請者等は、産業技術総合研究所と共同で開発した hyperspectral imaging を用いた血栓検出法を、特許出願中である。

３）研究方法・倫理観

産業技術総合研究所で開発したポンプ底面から内部が観察しやすい動圧浮上遠心血液ポンプを使用した。45kg の SPF ブタ 6 頭を静脈血モデルと動脈血モデルのそれぞれ 3 頭ずつを割り当てた。

静脈血モデルは V-V ECMO を模したものであり、動脈血モデルは LVAD を模したものである。

本研究では、分光光度計と CCD カメラを搭載した Hyperspectral (HS) カメラを用いる Hyperspectral Imaging (HSI)というイメージング手法が用いられた。さらにストロボスコープを用いた工夫を施し、ポンプの回転周波数と同じ周波数のフラッシュライトで照射することで、ストロボ効果により高速回転するポンプ内の静止画像を得ることが可能となった。

また、ポンプ内部の回転数の揺らぎのため撮影した各波長画像の位相がそろわないことに対しては、プログラミングによる回転処理を施し、全ての波長画像におけるインペラ位相角を統一することで、鮮明なイメージング画像を取得することに成功している。

本研究は、東京医科歯科大学の動物実験倫理委員会審査にて承認を得て行われた（承認番号：

0170149A）。

４）考察・今後の発展性

本研究の先進的なポンプ内血栓のリアルタイムモニタリング技術を用いた研究に関して、数多くの科学研究費を獲得している。また現在市販され、臨床で使用されている遠心ポンプのポンプ内血栓センサーの開発を開始している。今後、大きな発展が見込まれる。

３．その他

申請者らの、これらの研究成果に対して東京医科歯科大学内での学長裁量等の優秀研究賞を２回受賞している。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	藤井　祐介
論文審査担当者	主査　畑　裕 副査　北川　昌伸、稲瀬　直彦
論　文　題　目	Hydrogen sulfide donor NaHS induces death of alveolar epithelial L2 cells that is associated with cellular shrinkage, transgelin expression and myosin phosphorylation

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

硫化水素（H_2S）は高濃度曝露されると死に至る有毒な気体である。H_2S は肺胞上皮および他の組織を介して体内に吸収される。本研究の目的は、高濃度 H_2S 吸入により引き起こされる急性肺傷害の分子機構を解明することである。ラット肺胞上皮由来 L2 細胞を H_2S ドナーNaHS に 2～4mM で 1～6 時間曝露したところ、カスパーゼ活性化を伴わずに細胞の収縮および細胞死が引き起こされた。NaHS 応答タンパク質を検索したところ、アクチン結合タンパク質トランスゲリンが同定された。NaHS はミオシン軽鎖リン酸化を増加させ、細胞の収縮性/運動性が NaHS 曝露後に増加した。更に、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤 ML-7 の投与は NaHS 曝露による細胞死を促進した。以上の観察から、NaHS 曝露に応答するミオシン軽鎖リン酸化の増加は NaHS に対する細胞保護反応であると結論づけた。トランスゲリンの発現およびアクトミオシンの収縮性/運動性のような平滑筋細胞特性の NaHS による増強は、NaHS 曝露後の細胞生存に寄与していると推察された。

＜諸言＞

硫化水素（H_2S）は有毒物質であり、温泉、火山など天然に生成される場合、石油精製の過程や下水処理場など人為的に精製される場合がある。H_2S は無色であるが、腐った卵に似た強い臭いを持ち人体に吸収されやすく、空気よりも重い気体である。H_2S は 500～1000ppm 以上の濃度での急性吸入は致死的であると推定されている。H_2S の細胞傷害性は、シトクロム C オキシダーゼに対するその強力な阻害効果およびミトコンドリア呼吸の重度の障害に起因しており、これは細胞のエネルギー生産を低下させる。一方で人体では低濃度で内因的に H_2S を生成しており、血管恒常性の調節に重要な役割を果たす事が知られている。

肺胞上皮は、呼吸器系のガス交換部位であり、H_2S を吸収する主要な部位の 1 つである。肺胞上皮細胞はタイトジャンクション（TJ）の形成を介して互いに接続され、透過性は厳密に制御されている。 TJ は細胞内フィラメント状アクチン（F-Actin）に連結しており、肺胞上皮のバリア機能はアクチン細胞骨格のリモデリングにより調節されている。平滑筋細胞と同様、上皮細胞におけるアクチンの動態はアクチン依存性 ATPase 複合体である II 型ミオシン（ミオシン II）によ

って調節されている。アクトミオシン系は、細胞の収縮、運動および浸潤に必須の役割を果たす。ミオシン活性はその調節性ミオシン軽鎖（MLC）のリン酸化を介して増加することが示されている。ミオシン軽鎖のリン酸化は、ミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK)、Rho キナーゼ（ROCK)、およびミオシン軽鎖ホスファターゼ（MLP）によって調節される。 アクトミオシン系はアクチン動態を調節する様々なアクチン結合タンパク質によっても制御されている。トランスゲリンはアクチン結合タンパク質の一つであり平滑筋細胞への分化の最初期マーカーの一つであることが示されている。

本研究では、終濃度 2mM 以上の H_2S ドナーNaHS に曝露された肺胞上皮細胞が収縮および細胞死に至たる事を発見した。MLCK を介してミオシンが活性化され、この活性化が NaHS 曝露後の細胞死に対する保護に必須の役割を果たすことが判明した。また、トランスゲリンが NaHS 誘導性タンパク質として同定され、NaHS に応答する筋細胞表現型の増強も示唆された。

＜方法＞

ラット肺胞上皮由来 L2 細胞を用い、H_2S ドナーとして NaHS を使用した。細胞死の形態観察として、Hoechst33342 と PI で染色し蛍光顕微鏡下で観察を行った。アポトーシスの評価として、Western blotting により Caspase3, PARP, α-Fodorin の抗体を用いてタンパク質分解を観察、また TUNEL 染色を用いて核の変性の観察を行った。MALDI-TOF/MS 解析によりトランスゲリンが変動タンパク質として検出され、抗トランスゲリン抗体を用いてタンパク質量の時間経過による変化を観察、更にトランスゲリンの細胞内局在の観察のため抗トランスゲリン抗体とローダミン・ファロイジンを用いて免疫蛍光観察を行った。細胞収縮を生化学的に証拠づけるために MLC のリン酸化を Western blotting により評価した。MLC リン酸化と細胞死との関連の評価を行うため、MLCK 阻害剤 ML- 7 を感作させた細胞に NaHS を曝露した。まず Western blotting によりリン酸化 MLC を定量し ML-7 の有効性を確認した。その後、細胞内外の LDH 活性を測定することにより細胞死を評価した。

＜結果＞

まず、L2 細胞に NaHS を 2～4mM の最終濃度で 1 時間曝露した。核の凝縮は 3mM 以上の NaHS に曝露した細胞の 50%以上で観察される一方、細胞膜の崩壊した PI 陽性細胞は 2～4mM の NaHS 曝露後 5%未満でしか観察されなかった。さらに L2 細胞に 3～4mM の NaHS を 6 時間曝露すると 80%以上が PI 陽性になり、細胞膜の崩壊が示唆された。次に Caspase3 の活性化を Western blotting を用いて評価すると、2～4mM NaHS 曝露では Caspase3 の活性化は観察されなかった。Caspase3 の基質タンパク質である PARP、α-Fodrin においても分解は見られず、Caspase3 活性化の欠如が確認された。また、Caspase3 活性化の欠如と合致して、NaHS に曝露された L2 細胞は TUNEL 染色でも陰性を示した。次に NaHS 曝露後における細胞内タンパク質の変動を CBB 染色で検討し、変動タンパク質の中で濃度および時間依存的に変動が見られたバンドを切り出し MALDI-TOF-MS 分析を行ったところ、トランスゲリンが同定された。トランスゲリンの誘導を Western blotting により検証したところ、3mM NaHS では発現の時間依存的増加が見られた。ミオシン活性の指標である MLC リン酸化を調べると、3mM の NaHS 曝露は MLC

のリン酸化の増加をもたらし、曝露 3 時間後にピークが観察された。NaHS がトランスグリンの細胞局在に影響を及ぼすかを評価するために 3mM NaHS を 1～3 時間曝露しトランスグリン, F-actin, 核をそれぞれ抗トランスグリン抗体、ローダミン・ファロイジン、DAPI を用いて免疫蛍光染色を行った。NaHS 非曝露細胞では、細胞質内トランスグリンはアクチン線維に付随した局在を示し、アクチン結合タンパク質としての機能と合致していた。NaHS 曝露細胞でも同様であった。最後に、NaHS による細胞死にアクトミオシンによる細胞収縮が関与しているか否かを検証するため、MLCK 阻害剤 ML-7 の効果を検討した。 ML-7 が MLCK 活性を抑制することはリン酸化ミオシン軽鎖の減少により確認された。NaHS による細胞死は ML-7 によって促進され、MLCK を介したミオシンの活性化が細胞死からの保護の役割を果たすことが示された。

＜考察＞

本研究で NaHS が L2 細胞において核の凝縮を 1 時間以内に誘導し、その後 1～6 時間以内に細胞膜崩壊を誘導することが示された。しかし Caspase3 の活性化も、その基質である PARP、α-fodrin の分解も観察されなかった。よって高濃度の NaHS（3～4mM）曝露による L2 細胞の細胞死はネクローシスであると判断した。TUNEL 染色においても陰性でありネクローシスの特徴を示している。しかしながらアポトーシスの特徴である核の凝縮は観察された事から、カスパーゼ非依存性アポトーシスと推定することも可能であると考える。

急速な核変性に伴って細胞収縮、MLC リン酸化、トランスグリン発現の増加も観察された。これらは NaHS 曝露中の細胞収縮性または運動性の増加を示す。また、MLCK 阻害剤 ML-7 の投与が NaHS 処理した L2 細胞の細胞死を促進させた。これはミオシンの MLCK 依存的活性化が、NaHS 誘導細胞死に対して細胞保護に働くことを示唆している。

細胞・基質間接着または細胞間接着の喪失による上皮細胞死はアノイキスと呼ばれ、カスパーゼ依存性アポトーシスで実行される。上皮細胞はしばしば上皮間葉移行（EMT）と呼ばれる間葉系細胞への表現型変化を遂行する事でアノイキスから回避する事が知られている。 EMT 後の平滑筋細胞などの間葉系細胞は、上皮細胞と比較して接着性に依存せずに生存が可能であるためである。トランスグリンは EMT マーカータンパク質でもあるため、NaHS が EMT 様の表現型変化を誘発し、細胞をより細胞死に耐性な平滑筋様細胞に転換することも考えられる。過去の報告においても、肺胞上皮細胞において TGF-β-Smad3 経路の活性化による EMT 誘導の際にトランスゲリンが誘導され、細胞移動に必須の役割を果たしていることが報告されている。

本研究において、MLCK 依存性の MLC リン酸化が、H_2S ドナーNaHS によって誘発される毒性に対して L2 細胞を保護することが示された。また NaHS に曝露された肺胞上皮由来の L2 細胞において平滑筋マーカーであるトランスゲリンが誘導されることも見出された。これらの結果は、非常に危険な環境毒性ガスである H_2S の細胞毒性機序の理解の一助になるものと考える。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5187　号	藤井　祐介

論文審査担当者	主　査　畑　裕 副　査　北川　昌伸、稲瀬　直彦

【論文審査の要旨】

１．論文内容

硫化水素がラット肺胞上皮細胞にカスパーゼ非依存的に細胞死を起こすこと、そのさい、ミオシン軽鎖のリン酸化が起こり細胞保護的に働くことを明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

細胞傷害に応答してミオシン軽鎖のリン酸化が起こり、細胞保護的に働くという観察は、従来知られていなかった発見であり、今後、さらに興味深い発見につながる可能性が期待される。

２）社会的意義

硫化水素は自殺目的に使用される。硫化水素が引き起こす細胞反応は、法医学の見地から興味深い。

３）研究方法・倫理観

ラット肺胞上皮 L2 細胞を硫化水素ドナーNaHS に曝露してカスパーゼ 3 非依存的に細胞死が起こることを観察した。NaHS に曝露された細胞で発現が増える蛋白として transgelin を同定した。Transgelin はアクチン制御に関係すると想定されているので、ミオシン軽鎖のリン酸化の変化を解析し、NaHS によりミオシン軽鎖のリン酸化が起こること、ミオシン軽鎖キナーゼを阻害すると NaHS による細胞死が増強することを確認し、ミオシン軽鎖のリン酸化は細胞保護的に働くのでないかと考察した。

４）考察・今後の発展性

ミオシン軽鎖のリン酸化が細胞保護的に働くという仮説については、更に慎重な解析が必要であるが、この仮説が証明されるならば、細胞傷害における細胞死を防ぐ新しい方法の開発につながる可能性がある。

３．その他

特記事項はない。

４．審査結果

審査会では種々の質問が行われたが、申請者はいずれにも適切な回答を行い、自立した研究者としての資質を示した。よって、本学博士（医学）の学位に値すると判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Kaung Si Thu
論文審査担当者	主査　木村　彰方 副査　田中　敏博、稲瀬　直彦
論　文　題　目	Association of polymorphisms of the transporter associated with antigen processing (TAP2) gene with pulmonary tuberculosis in an elderly Japanese population

（論文内容の要旨）

The prevalence of tuberculosis (TB) has increased worldwide in recent years. TB represents a widespread health issue that causes about 2 million deaths annually, and it is the second leading cause of death from an infectious disease worldwide, after the human immunodeficiency virus. Nearly one-third of the world's population is infected with ***Mycobacterium tuberculosis*** without exhibiting any clinical symptoms. In fact, only 5%–10% of those who are infected become ill. According to the Annual Report of TB surveillance in Japan,

There were 63 newly notified cases of childhood (0–14 years) TB in 2012, corresponding to a notification rate of 0.38 per 100 000 people. Since 1999, the notification rates for TB in Japan have been consistently higher in patients aged 85 years and older compared to those aged 65–84 years. Indeed, the proportion of TB patients aged 65 years and older has increased progressively, reaching 62.5% in 2012; notably, the proportion of TB patients older than 80 years has increased to 34.0% of all TB cases. Susceptibility to TB has a strong genetic component, as evidenced by the higher concordance rate of TB in monozygotic vs dizygotic twins. Indeed, many studies of candidate genes, as well as genome wide association studies, have been conducted to investigate such genetic factors.

The transporter associated with antigen processing (TAP) gene, which has been studied as a candidate gene for TB susceptibility, is located within the MHC class II region of chromosome 6 between the HLA-DP and HLA-DQ loci. The TAP protein plays a critical role in the processing and presentation of intracellular antigens. Specifically, TAP proteins transport antigenic peptides into the lumen of the endoplasmic reticulum; the proteins are then loaded onto MHC class I molecules and presented on the cell surface to cytotoxic T lymphocytes. Proteins derived from ***Mycobacterium tuberculosis*** also undergo cytosolic proteasomal degradation, subsequent TAP transportation, and antigen presentation. TAP1-deficient mice show increased susceptibility to TB, greater bacterial burden, severe tissue pathology, and decreased survival rate. Polymorphisms in the TAP2 gene have been evaluated in a number of gene association studies that looked at rheumatoid arthritis, insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), hepatitis C infection, and sarcoidosis. Moreover, studies in different ethnic groups have shown that TAP2 polymorphisms are associated with susceptibility to

TB. In this study, we investigated the association between TAP polymorphisms and the presence of TB granuloma in autopsy samples from the lungs of elderly Japanese patients.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The Japanese SNP Database for Geriatric Research (JGSNP), which contains a total of 1850 consecutive autopsy cases from the Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital from 1995 to 2006, was used for the study.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from the renal cortex using standard methods. Analysis of exomic variations was performed using the Infinium Human Exome Bead Chip array version 1.1.

The statistical analyses were performed using IBM SPSS version 19.0 and PLINK software version 1.07 was used for haplotype analysis allele association testing.

RESULTS

Initially, there were a total of 1850 subjects, 20 of whom were excluded because they were related and 12 of whom were excluded because their clinical history was unavailable or their genotype was undetermined. Finally, 289 TB cases and 1529 controls were included in the study. There were a total of 24 SNPs in the TAP2 region that were polymorphic in our sample. Initially, allelic association testing was performed for these SNPs. The following showed nominally significant ($p < 0.05$) differences between TB cases and controls: rs4148871, rs4148876 (R651C), rs241449 (V697V), rs241448 (X687Q), rs241447 (T665A), rs2857103, rs2857101, rs241455, rs241439, rs241438, rs241433, and rs241429 (Table S1). Of these 12 SNPs, 3 SNPs, namely rs2857103, rs4148876, and rs4148871, still showed significant associations with TB susceptibility after Bonferroni's correction ($p < 0.002$). We performed genotype association tests for these SNPs and found that the associations of 2 SNPs, rs2857103 and rs4148871, remained significant in the dominant allele model of logistic regression analysis after adjustment for age, sex, and smoking (Table 2). After Bonferroni's correction, the associations for rs2857103 and rs4148871 remained significant (adjusted OR = 1.65; 95% CI, 1.22–2.24; $p = 0.001$, corrected $p < 0.002$ for both). We then performed haplotype analysis to infer the structures of haplotypes that were reported previously. In this analysis, we used rs2228396, rs4148876, rs241447, and rs241448 to construct haplotypes according to the WHO nomenclature. TAP2 haplotype frequencies inferred from the genotypes were as follows: *0101 allele, 50.3%; *0201 allele, 27.2%; *0103 allele, 16%; and *0102 allele, 6.5%. The TAP2 *0103 allele showed a significantly increased frequency in pulmonary TB patients as compared to controls (20.90% vs 15.1%), while the TAP2 *0201 allele was less frequentin cases than in controls (22.39% vs 28.0%). The results from the haplotype association analysis showed that the TAP2 *0103 allele conferred an

increased TB risk (OR = 1.48, p = 0.0008), while the TAP2 *0201 allele was protective against TB (OR = 0.73, p = 0.007). This association remained after Bonferroni's correction ($p < 0.0125$). The TAP2 *0101 allele and the TAP2 *0102 allele showed no significant association with TB.

DISCUSSION

This study analyzed the association of TAP2 polymorphisms and genetic susceptibility to TB and found that rs414871 and rs2857103 showed significant associations with TB susceptibility. Haplotype analysis showed that the TAP2 *0103 allele increased the risk of susceptibility to TB, while the TAP2 *0201 allele was protective.

A member of the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters, the TAP2 gene is located 7 kb telomeric of ABCB2, which is a member of the same gene family. TAP2 transports various molecules across extra- and intracellular membranes. The TAP2 and ABCB2 proteins form a heterodimer and transport antigenic peptides from the cytoplasm to the endoplasmic reticulum, a mechanism that is involved in antigen presentation. ***M. tuberculosis*** bacilli are engulfed by macrophages, and the intracellular infectious agents are processed into peptides that interact with the TAP2-ABCB2 complex and are loaded onto MHC class 1 molecules. Cell surface expression of MHC class I molecules is disrupted when TAP gene function is lost. Notably, TAP-dependent antigen processing induces the cytotoxic T lymphocyte response to TB infection. Since TB infection depends on an individual's immune response, which is influenced by genetic components, including both the innate and adaptive immune systems, it is tempting to speculate that differences in TAP2 function may lead to different susceptibilities to TB.

The TAP2 gene is located in the HLA region, and variations in HLA genes have been associated with TB susceptibility in previous studies. For example, the HLA-DRB1*08:03 allele was shown to be associated with TB susceptibility, and this allele is tightly linked to the TAP2* Bky2 allele in Koreans. In this study, we could not perform an association analysis of HLA-DRB1 with TB. Thus, our association may be independent of the HLA-DRB1*08:03 allele or could be associated in combination with the HLADRB1* 08:03 allele.

This study has several limitations. The subjects were consecutive autopsy cases of patients registered in geriatric hospital. The autopsy rate in this particular hospital is about 40%, and there was limited clinical information available for the patients' autopsy samples. Diagnoses using autopsy finding would not differentiate between primary infection and reinfection or relapse. Furthermore, to increase the power of the study, it would have been better to prioritize cases of severe disease, familial disease, earlier onset disease, and controls according to the effects of the disease, but this was not possible in this study. In addition, there was no functional studies of TAP2 that could validate the observed associations of polymorphisms with TB susceptibility. In summary, our findings indicated that TAP2 polymorphisms are associated with TB susceptibility in an elderly Japanese population. Additional larger studies are needed to validate these findings.

＜要約＞

Transporter associated with antigen processing gene 2 (TAP2)は抗原提示反応を司る細胞内パスウェイを構成することにより、結核菌の免疫反応に関連していることが知られている。TAP2の遺伝子多型が結核と関連している報告が、インド、コロンビア、韓国からあるが、日本ではまだない。本研究では、（都）健康長寿医療センターが運営している JG-SNP にある連続剖検例（n=1850）のデータベース及びサンプルを用いて調べた。剖検時の結核肉芽種を持つものは 289 人、持たないものは 1529 人いた。TAP２領域の単一塩基多型（SNP）を 24 個の DNA チップ法（イルミナ Human Exome Beads Chip Array）で解析したデータを用いた。24 個の SNP のうち rs4148871, rs4148876 (R651C), および rs2857103 が粗解析で有意な相関を認め、優性モデルにおいて、性・年齢・喫煙の有無で調整後も有意を認めた。ハプロタイプ解析を行ったところ、TAP2* 0103 アレルは肺結核のリスクを上げ（OR=1.48, 95%CI, p = 0.0008）TAP2*0201 アレルは肺結核のリスクを下げる（OR=0.73, 95%CI, p = 0.0007）ことが解った。以上のことより TAP2 遺伝子多型は日本人の肺結核と関連していることが示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5188　号	Kaung Si Thu
論文審査担当者	主　査　木村　彰方 副　査　田中　敏博、稲瀬　直彦	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、肺結核と TAP2 遺伝子多型との関連解析結果についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

肺結核は発展途上国では主な死因となる感染症であり、わが国においてもいまだ根絶されていないが、その感染感受性には遺伝的な要因が関わると考えられている。感染症に関連する遺伝的要因を探索するために、免疫応答に関わる HLA 領域内遺伝子群の多型解析が多く行われているが、それらは主に HLA 遺伝子の研究に留まっており、その他の遺伝子についての解析は少ない。肺結核についても、HLA クラス I 分子による抗原ペプチドのトランスポート機能を担う TAP2 遺伝子の解析がインド、コロンビア、韓国から報告されているが、我が国における解析の報告はない。このような背景のもと、申請者は日本人高齢者連続剖検例(1850 例)を対象として TAP2 遺伝子内の 24 個の SNP についての関連解析を行っており、その着眼点は評価できる。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．24 個 SNP 中３個の SNP が多重検定を補正後も肺結核病変の存在と有意な関連を示した。

２．これらの３つの SNP との関連は、優性モデルによく合致し、性、年齢、喫煙を考慮した上でも有意であった。

３．TAP2 の 4 つの SNP の連鎖不平衡から TAP2 対立遺伝子を推定して関連解析を実施したところ、TAP2*0103 は肺結核のリスクを上げ、TAP2*0201 はリスクを下げることが判明した。

以上のように申請者は TAP2 多型と肺結核との間に統計学的に有意な関連があることを明らかにした。今後これらの関連の分子機序を解明することにより、肺結核への新たな感染制御の方法が見出される可能性があり、本研究の知見は臨床的にも有用であると言える。

3）研究方法・倫理観

研究には、高齢者連続剖検例の組織から抽出した DNA が用いられ、TAP2 遺伝子内の 24 個の SNP について、オリゴヌクレオチドプローブが固相化されたチップを用いたハイブリダイゼーションによるタイピングが行われた。また、遺伝子タイピング結果と剖検所見を含めた臨床情報との関連についての統計学的解析が実施された。さらに、個々の例についての遺伝子タイピング結果から TAP2 遺伝子型を推定し、それに基づく臨床情報との関連解析が行われた。これらの解析は、遺伝子多型解析と関連解析に関する十分な遺伝学的知識と技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力の高さが示されるとともに、本研究が周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について、国外からの先行研究結果との一致点や相違点を検討し、その要因について患者集団の遺伝的背景や遺伝子解析範囲や病態等を考察している。それらの考察は妥当であり、今後さらに分子レベルまで踏み込んだ研究が行われることにより、肺結核の感染における TAP2 遺伝子の関わりの医学的意義が解明されると考えられる。

3．その他

申請者は TAP2 遺伝子領域の連鎖不平衡について、論文では公的データベースの情報を用いているが、申請者ら自身のデータについても連鎖不平衡解析を実施し、これが公的データベースにおけるデータとよく合致することを示した。また、先行研究の結果と合わせたメタ解析を実施し、申請者が得た結果が矛盾なく説明できるものであることを示した。

4．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	飯塚　真
論文審査担当者	主査　吉田　雅幸 副査　下門　顕太郎、平尾　見三
論　文　題　目	Is there a differential impact of parity on factors regulating maternal peripheral resistance?

（論文内容の要旨）

【要旨】

周産期管理において初産婦は経産婦より妊娠合併症発症リスクが高い。妊娠経験の有無により妊産中の循環動態に違いがあるとの報告がある一方で、末梢血管抵抗調節因子それぞれについて妊娠経験による差異はほとんど検討されていない。本研究では末梢血管抵抗調節に影響する合併症や投薬がない妊産婦 127 人（初産婦 78 人、経産婦 49 人）に対し、妊娠中の循環動態、血管内皮機能(m-FMD; modified flow-mediated dilation)、血管硬性(Arterial compliance, Brachial artery pulse wave velocity (bPWV))自律神経活動（heart rate variability, power spectral, DFA; detrended fluctuation analysis）を妊娠経験の有無で時期ごとに評価した。正常帰結妊婦同士の比較であっても、妊娠中の拡張期血圧は初産婦で経産婦に比べ有意に高値であり、それは妊娠後期(28-40 週)において特に顕著であった(初産;59.7 mmHg vs 経産;56.9 mmHg, $P < 0.05$) 。また自律神経活動も初産婦と経産婦で異なっており、副交感神経活動を示す HF; high-frequency power は妊娠経過とともに低下し妊娠後期では経産婦が初産婦より有意に低値であった(初産; 2.15ms^2 vs. 経産; 1.84ms^2, $p<0.05$)。一方、交感神経活動を示す LF/HF ratio は妊娠経過とともに上昇していく傾向を認めたが、妊娠経験による差異は認めなかった。また DFA value, α2 は、初産婦では経産婦より有意に低値であった(初産; 1.02 vs. 経産; 1.22, $p<0.05$) 。他方、m-FMD 及び血管硬性に妊娠経験による差異は認めなかった。妊娠中の循環動態は妊娠経験の有無により異なり、調節因子として自律神経活動に有意な差異を認めた。初産婦と経産婦では妊娠という特殊な循環動態状態に対しての自律神経活動順応が異なる可能性が示唆された。

【諸言】

妊娠中は循環動態が大きく変化する。心拍出量、循環血漿量が増加する一方で、末梢血管抵抗が低下する事で、血圧は一般に収縮期・拡張期ともに妊娠中期まで非妊娠時に比べ低下傾向を示し、妊娠後期にかけて非妊娠時の状態へと回復する。この特殊な循環動態への適応がうまく行われない妊婦では合併症の発症が多いとされており初妊婦がリスク要因となる疾患に母体・胎児に重篤な病態を生じる妊娠高血圧症候群等がある。正常帰結妊婦において初産婦では経産婦に比べ血圧が高い傾向にあると報告されている事から非妊婦から妊婦へ循環動態が順応していく過程で、妊

娠経験が影響を及ぼしている可能性は高いと考えられる。血圧規定因子のうち、末梢血管抵抗は主に血管内皮機能、血管硬性、自律神経活動、内分泌的因子などにより調節される。妊娠中での変化を報告する論文は散見できるが、妊娠経験の有無による詳細な検討報告は未だない。この研究ではこれら末梢血管抵抗調整因子に対し、時期別の変化及び妊娠経験の有無に注目し前向き検討を行う事で、妊娠経験が循環調節に与える影響の有無を明かにする事を目的とした。

【方法】

循環動態へ影響する基礎疾患や投薬がなく、妊娠中の合併症も認めなかった正常帰結妊婦 127 人(初産婦 78 人、経産婦 49 人; 年齢に有意差なし) に対し、妊娠 3 半期間毎に末梢血管抵抗調節因子を測定した。同じ対象が同一 3 半期間内に 2 回以上計測した場合、データを平均化し解析を行った。①血管内皮機能(mFMD):前腕を一定時間駆血した後に開放すると血管内へ急激に血液が流れ shear stress が増加し血管内皮細胞が刺激され NO 分泌され血管弛緩反応が生じる。この反応を超音波検査で評価する手法である。実際の測定は仰臥位にて 5 分間安静にした後に血圧・上腕動脈の安静時ベース血管径測定を行い前腕 5 分間駆血後、解除し 2 分間での最大血管拡張径を計測後にベース径から変化を算出し評価するのが一般的な FMD 測定となるが、妊娠中は循環血漿量が非妊娠時の 1.5 倍に増量し生理的水血症になる為、ベース径が時期で異なり一定ではなく評価が困難である。従って、今回は FMD より再現性や機能評価性に優れるとされている駆血後の最少血管径をベース値とし算出する mFMD を用いて評価した。②血管硬性(Arterial compliance, bPWV) : Arterial compliance は収縮期と拡張期での血管断面積と脈圧との関連性を評価する方法であり、bPWV は、心臓からの拍動が伝わる速度から、血管硬性を評価する手法である。③自律神経活動: 安静仰臥位での心電図 R-R 間隔変動より a.時空間解析（root mean square of the successive differences (RMSSD) ; 副交感神経活動）、b.周波数解析（high frequency (HF, 0.03–0.5 Hz) ; 副交感神経活動、the ratio of low frequency (LF, 0.03–0.15 Hz) power to HF power (LF/HF) ; 交感神経活動、The total (0.03–0.5 Hz) power (TP) ; 総自律神経活動）及び c.非線形解析（detrended fluctuation analysis(DFA);自律神経活動を示すが、臨床的意義づけは未確定)を用いて評価した。また血圧測定は仰臥位安静にて測定し、統計学的処理は SPSS III for Windows を用いて、Student's t-test 及び Two-way ANOVA (妊娠経験及び妊娠 3 半期を主因子)で行い post-hoc analysis は Turkey’s multiple comparison を用いて評価し $p<0.05$ をもって有意差ありとした。

【結果】

収縮期血圧は妊娠後期まで変化は認めず、妊娠経験による差も認めなかった。一方拡張期血圧は妊娠期間を通じ初産婦が経産婦よりも有意に高値となっており、それは妊娠後期で顕著であった(初産;59.7 mmHg vs 経産;56.9 mmHg, $P < 0.05$)。心拍数は妊娠初期から中期にかけて有意な増加を認めたが、妊娠経験による差異は認めなかった。Arterial compliance は妊娠初期から中期にかけて増加し妊娠中は有意な血管軟化傾向を示したが、い、妊娠経験による有意差は認めなかった。血管径は駆血後最少ベース径、及び最大径ともに妊娠経過に伴い有意な拡張傾向を示し、算出される m-FMD は妊娠中に著変を認めず、妊娠経験による有意差も認めなかった。自律神経活動では線形解析における RMSSD が妊娠初期から後期にかけて妊娠経過とともに有意に低下した。ま

た妊娠後期では有意に経産婦が初産婦より低下していた(初産;1.35ms vs. 経産;1.17ms, $p<0.05$)。HF で妊娠中 RMSSD と同様の傾向を示し妊娠後期で経産婦が初産婦より有意に低値であった(初産; 2.15ms^2 vs. 経産; 1.84ms^2, $p<0.05$)。また、LF/HF ratio は妊娠経過に伴い有意な上昇傾向を示したが、妊娠経験による差異は認めなかった。TP は妊娠経過に伴い有意に低下したが、妊娠経験による差異は認めなかった。非線形解析 DFA は α1 及び α2 ともに妊娠経過に伴い上昇傾向を示し α2 は妊娠後期に初産婦が経産婦に比べ有意に低値を示した(初産; 1.02 vs. 経産; 1.22, $p<0.05$) 。

【考察】

今回の検討では妊娠中は循環動態と調節因子が大きく変化し、それは妊娠経験により異なり、特に拡張期血圧及び自律神経活動が妊娠経験に影響するが明らかとなった。自律神経活動は妊娠中変化するが、経過に伴い低下を認める RMSSD や HF が経産に比べ初産で低下せず、妊娠中に増加を認める α2 が初産では経産に比べ上昇してこない等妊娠経験によって異なっていた。すなわち、初産では経産に比べ、妊娠に対する自律神経系のダイナミックな適応が不十分な状態になっている可能性が示唆された。特に有意差があった妊娠後期は妊娠高血圧症群の好発時期と一致している。今回の結果から妊娠経験による自律神経活動の差が妊娠高血圧症候群の発症リスク原因に関与している可能性が示唆された。妊娠中の血圧変化について過去にも 8377 人に対する cohort study で今回の結果と同様拡張期血圧が初産婦で経産婦に比べ高値である事が報告されており、我々の結果を肯定する内容であった。自律神経活動について、過去に妊娠中は総自律神経活動が低下し、交感神経優位な状態へシフトする事が報告されている。今回の検討の特徴は R-R 間隔変動を用いた解析の中でも非線形解析を用いた検討を行っている事である。非線形解析は従来の線形解析に比べより複雑な事象に対する解析能に優れている医療工学分野で近年注目されている新しい解析手法である。今回 α1 及び α2 は妊娠中に有意な上昇傾向を示し、α2 は妊娠経験によって異なる事を初めて報告した。α2 は過去に心臓移植後患者に対する生命予後因子として有用であるとの報告されており、妊娠経験と循環動態との関連性が示唆された。血管硬性は過去の報告と同様に非妊娠時に比べ妊娠中は有意に低下を認めたが、妊娠経験で差異を認めなった。しかし、45 歳から 84 歳を対象とした妊娠経験の有無による血管硬性の比較をした結果経産婦では未経産婦に比べ、有意に血管硬性低値を示した報告から妊娠経験は血管硬性に影響はするが、時間がかかる事が示唆された。妊娠中は血流増加に伴い shear stress が増加し血管内皮細胞刺激が増す事で Nitric oxide が盛んに行われている状態とされている。Williams らは手背血流測定による検討で妊婦に NO 阻害薬を服用させ、非妊婦より妊婦で有意に血流が阻害された報告をしている。FMD が妊娠中でも NO 分泌能反映しているのなら妊娠中に測定された FMD 結果も上昇する結果で一致すると思われるが、過去報告された妊娠中 FMD 検討結果は様々で一定の結論は得られていない。FMD は非浸襲的に血管内皮細胞からの NO 分泌能力を検討する優れた方法であるが、評価には安静時ベース径がある程度一定である必要があると考えられる。しかし、妊娠中は循環血漿量の増加により安静時でも常に血管内皮への刺激がされている特殊な状態であり、安静ベース径であっても既に拡張した径である可能性があり結果も安定しない為妊娠中 FMD の測定は有用とは言えない可能性があると考えられた。今回はベース径の変化が少なくなるよう駆血後血管径から最大径までの血管拡張を評価する mFMD による検討を行ったが、駆血後最少ベース径でさえも妊娠経

過と共に同じように拡張しており血流増加の影響を受けている事が明らかになった。

【結論】

妊娠中の循環動態の変化に自律神経系による調節が大きく関与しているが、この調節機能に妊娠経験の有無が影響していることが明らかとなった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5189　号	飯塚　真
論文審査担当者	主　査　吉田　雅幸 副　査　下門　顕太郎、平尾　見三	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、妊娠中の循環動態に着目し、初産婦と経産婦におけるその差異を検討する内容である、本論文の解析によって、妊娠による循環動態の変化には自律神経活動の反応性は差異が関与している可能性が示された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

これまで、妊娠中の循環動態の変化については、心拍出量および心泊数の増加、や末梢血管抵抗の減弱など妊娠期間の推移によって変化することが広く知られている。また、妊娠の合併症の一つである妊娠高血圧症候群は経産婦よりも初産婦で多く、妊娠高血圧症候群の 3 分の 2 は初産時に発症するといわれている。しかし、これまで妊娠経験と循環動態について調べて研究はみられず、本研究ではこれまでにない着眼点を有している。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は、（１）初産と経産では妊娠後期の拡張血圧が異なること、（２）妊娠経験は血管局所因子や内皮機能には影響を与えないが、自律神経活動には影響をあたえること　である。これはこれまでの妊娠高血圧症候群と妊娠経験の関連の原因解明につながる重要な知見であり、臨床的にも有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

今回の研究では、本学を受診した妊婦（初産婦 78 名、経産婦 49 名）を対象として、妊娠期間中の血管局所因子（血管コンプライアンス、PWV）、血管内皮機能（modified-FMD）、及び自律神経活動として心電図の RR 感覚変動の時空間解析および周波数解析を行った。本研究は医学部倫理審査委員会の承認（1008 番）の元に実施されており、倫理的な問題はない。

４）考察・今後の発展性

本研究でみられた妊娠経験と自律神経活動との関連は興味深く、今後の妊娠高血圧症候群の臨床への応用が期待された。

３．その他

特記すべきことなし。

４．審査結果

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	田村　夏子
論文審査担当者	主査　上阪　等 副査　神奈木　真理、吉田　雅幸
論　文　題　目	Profiles of serum cytokine levels in Takayasu arteritis patients: Potential utility as biomarkers for monitoring disease activity

（論文内容の要旨）

【要旨】

背景：高安動脈炎は原因不明の全身性血管炎である。非特異的炎症マーカーである CRP や ESR が病勢を反映する指標として古くから用いられているが、再発を繰り返す症例が多く、非特異的炎症性マーカーでは病勢の判断が困難であることも多いため、病勢を反映する新たな指標が求められている。そこで我々は当院通院中の 21 名の高安動脈炎の患者において、治療前後で CRP、ESR に加えて TNF-α、IL-6、IL-12、IL-23 の 4 つのサイトカインを測定し、比較検討した。

方法と結果：17 名の高安動脈炎の患者において、発症時または再燃時の活動期と治療後症状改善時の非活動期に CRP、ESR、TNF-α、IL-6、IL-12、IL-23 を測定した。活動期には CRP、ESR、TNF-α、IL-6 の平均値は正常値より上昇していたが、IL-12 と IL-23 の平均値は基準値内であった。非活動期では CRP、ESR、TNF-α、IL-6 の平均値は活動期と比較して有意差を持って低下していた。一方で、IL-12、IL-23 は非活動期も変化せず、いずれも基準値内であった。

結語：TNF-α、IL-6 は CRP や ESR と同様に高安動脈炎の病勢を反映するのに有用である。

【緒言】

高安動脈炎は自己免疫性の全身性血管炎であるが、その原因はほとんど分かっていない。疫学的には約 9 割が女性で、好発年齢は 10 歳から 40 歳であること、アジア地域に多いという特徴がある。本邦における年間の発症率は約 150 名である。発症部位は大動脈とその分岐で、鎖骨下動脈は好発部位である。炎症は進行性で全身の血管に病変が及びうる疾患である。

HLA（HLA-Bw52、HLA-B39、HLA-B67）の一塩基多型が高安動脈炎の関連遺伝子であることが知られていたが、最近、我々は日本の高安動脈炎患者で行ったゲノムワイド関連解析で、HLA-B だけでなく IL12B の一塩基多型が関連遺伝子であることを見出した。

高安動脈炎の病勢を反映するバイオマーカーとしては赤沈や CRP が、画像評価では CT や MRI が広く用いられている。しかし、特に再燃の患者では、症状があるのにも関わらず、赤沈や CRP が有意に上昇せず、診断に苦慮する症例がある。赤沈や CRP は非特異的炎症マーカーであるため、免疫抑制剤（副腎皮質ステロイドやメソトレキセート、アザチオプリン、抗 TNF-α 薬であるインフリキシマブ、抗 IL-6 抗体であるトシリズマブを含む）を投与している患者ではなおさら、

再発を的確に判断することが難しくなることがある。近年、FDG-PET/CT が再発性の高安動脈炎の診断に有用であることを報告されたが、FDG-PET/CT を行うことができる施設は非常に限られており、高安動脈炎の病勢を有効に反映するバイオマーカーが求められている。

そこで我々は、インフリキシマブのターゲットである TNF-α、トシリズマブのターゲットである IL-6、ゲノムワイド関連解析で示された一塩基多型 IL12B 遺伝子の産物である IL-12 と IL-23 について、高安動脈炎の病勢を反映する新たなバイオマーカーになりうるか、患者の活動期と非活動期で測定し、赤沈や CRP と比較した。

【方法】

2007 年から 2014 年に東京医科歯科大学に通院している 21 名の高安動脈炎患者について、インフォームドコンセントを行った上で、血中の赤沈、CRP、TNF-α、IL-6、IL-12、IL-23 を測定し比較検討した。

全ての結果はウィルコクソンの順位和検定で統計を行い、５％を有意差とした。閾値は ROC カーブにおいて最も左上隅に位置する値とした。

【結果】

21 名中男性は 2 名、女性は 19 名、平均年齢は 36.6 歳であった。全ての患者は副腎皮質ステロイドを投与されており、活動期の平均投与量は 32.1mg/day、非活動期の平均投与量は 16.0mg/day であった。非活動期の副腎皮質ステロイドの投与量は活動期の投与量と比較して有意差を持って低下していた（$p<0.001$）。21 名中、9 名は副腎皮質ステロイド以外の免疫抑制剤を併用していた。また、21 名中 4 名については副腎皮質ステロイドと免疫抑制剤に加えてインフリキシマブを投与していた。また、21 名中 2 名が炎症性腸疾患を合併していた。

21 名中 17 名について活動期と非活動期の赤沈、CRP、TNF-α、IL-6、IL-12、IL-23 を測定した。赤沈と CRP は活動期で正常値より有意差を持って上昇しており、非活動期には有意差を持って低下した（赤沈：49.08 vs 11.80mm/hour $p<0.01$, CRP：1.24 vs 0.29mg/dl $p<0.01$）。同様に TNF-α、IL-6 も活動期で正常値より上昇し、非活動期で有意差を持って低下した（TNF-α：3.50 vs 1.02pg/ml $p<0.001$、IL-6：11.54 vs 3.38pg/ml $p<0.05$）。これらの結果から、赤沈や CRP だけでなく TNF-α や IL-6 が高安動脈炎の病勢を反映するバイオマーカーであることが示された。感度は CRP が最も高い（94.1）が、特異度は CRP が最も低い（70.6）という結果であった。IL-12 と IL-23 は活動期と非活動期の値はほとんど変化しておらず、いずれも正常範囲内の値であった。

次に 21 名中４名のインフリキシマブを投与した患者について、インフリキシマブ投与前後で血中の CRP、TNF-α、IL-6 を測定した。これらの結果については４名での検討であるためいずれも有意差は出なかったが、CRP と IL-6 はインフリキシマブ投与後に低下する傾向が見られた。一方で、TNF-α は投与後に上昇する傾向が見られた。

インフリキシマブ投与した 4 例はすべて再発症例であり、副腎皮質ステロイドに加えて免疫抑制剤を投与しても寛解せず、インフリキシマブの投与に至った。インフリキシマブ投与前の症状が安定しない病状で数回にわたり測定した CRP、TNF-α、IL-6 について傾向を見たところ、4 例中 1 例においては、症状があるにも関わらず CRP の上昇が乏しかった。一方で TNF-α、IL-6 に

ついては我々が設定した閾値（TNF-α > 1.3pg/ml、IL-6 > 5.4pg/ml）より上昇していた。

【考察】

赤沈、CRP と同様に TNF-α、IL-6 は高安動脈炎の病勢を判断するのに有効なバイオマーカーであった。一方で、IL-12 と IL-23 は高安動脈炎の病勢を反映しなかった。

我々の検討では IL-6 の特異度（82.4）は CRP の特異度（70.6）より高かった。IL-6 は高安動脈炎患者において、免疫細胞からだけでなく、血管平滑筋や内皮細胞などの大動脈組織からも分泌されることが報告されている。また、高安動脈炎患者に抗 IL-6 抗体であるトシリズマブを投与し有効であったとの報告が多くされている。トシリズマブ投与後に血中 IL-6 濃度が上昇することも知られており、これは血中トシリズマブ／sIL-6 受容体複合体の上昇により sIL-6 受容体の半減期が延長し IL-6 受容体による IL-6 の消費が低下するためであると報告されている。トシリズマブと作用機序は異なるが、興味深いことに本研究でもインフリキシマブ投与後に TNF-α 上昇が見られている。これについてはインフリキシマブとサイトカインの複合体による妨害のため生じるとの報告がある。

ROC カーブから最も左上隅の点を閾値として設定し、感度、得意度を計算すると、赤沈、CRP、TNF-α、IL-6 の 4 つのバイオマーカーの内、CRP は感度が最も高く（94.1）、赤沈は得意度が最も高かった（100）。つまり、CRP と赤沈を組み合わせることにより最も的確に高安動脈炎の病勢を判断できるという結果であった。一方で、我々は赤沈や CRP がそれほど上昇しない例外的な症例が存在していることを示した。インフリキシマブ投与群の 4 名中 1 名は再燃しているのにも関わらず、赤沈と CRP の上昇が乏しく、TNF-α と IL-6 は我々が設定した閾値より明らかに上昇していた。TNF-α と IL-6 はこのように赤沈や CRP が上昇しない症例に対して非常に有用であることが示された。

また、IL-12 と IL-23 についてはゲノムワイド関連解析で見出された一塩基多型 IL12B の産物である IL12p40 をサブユニットとして持つ構造をしているため、高安動脈炎患者の血中で上昇していることが推測されたが、活動期、非活動期いずれにおいても正常範囲内で変化も認めなかった。IL12B の一塩基多型は乾癬患者でも関連遺伝子として報告されている。さらに、乾癬においては、血中の IL-12 濃度がリスクアレルを有する患者で上昇しており、抗 IL12p40 抗体であるウステキヌマブが乾癬に対して有効であると報告されている。しかし、高安動脈炎については血中 IL-12 濃度が正常であることから効果が低いのではないかと我々は推測している。

【結語】

TNF-α と IL-6 は高安動脈炎の病勢を反映するバイオマーカーとして有用であり、これらのサイトカインをターゲットとするインフリキシマブ、トシリズマブは高安動脈炎に対して有用であることが示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5190　号	田村　夏子
論文審査担当者	主　査　　上阪　等 副　査　　神奈木　真理、吉田　雅幸	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、高安動脈炎の CRP と臨床所見で規定する疾患活動性と、CRP、赤血球沈降速度、血清インターロイキン（IL）-6、12、23 と腫瘍壊死因子（TNF）α との相関、抗サイトカイン薬治療前後の変化を報告するとともに、その臨床的意義を論じたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

疾患活動性を鋭敏に反映するマーカーや画像所見のない高安動脈炎に関し、新たなバイオマーカーを探索することは有意義である。特に、ゲノムワイド関連研究で疾患感受性遺伝子と同定された遺伝子の産物が構成する IL-12、23 に注目したことは先駆的で独創的である。

２）社会的意義

CRP と臨床症状で規定した疾患活動性に CRP が関与することは予想範囲内であるが、CRP 産生を規定する IL-6 や TNFα の関与も確認できた。IL-12、23 は活動性にかかわらず低値であり、今後、病態を考察する上で社会的意義がある。

３）研究方法・倫理観

患者検体を適切に用いた手法により一連の研究を進めていた。方法論的な考察は試問時になされ、倫理的な考察は予めなされていた。

４）考察・今後の発展性

本研究は高安動脈炎診療における疾患活動性マーカー研究を一歩進めるものであり、今後の研究に寄与するものである。

３．審査結果

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に値するものであると結論した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	鈴木　雅仁
論文審査担当者	主査　古川　哲史 副査　荒井　裕国、吉田　雅幸
論　文　題　目	The Efficacy of Isochronal 3D Mapping-Based Ablation of Ventricular Arrhythmia Running head: isochronal mapping, ablation

（論文内容の要旨）

<要旨>

心室性不整脈、特に心室性期外収縮のアブレーション治療では心室最早期興奮部位の焼灼を行うことにより根治可能であるが、その成功通電部位における心電図の QRS onset からの局所電位の先行度は症例によって異なり、先行度の良い部位での焼灼でも治療できない症例がある。心室性期外収縮の起源が心筋深部にある場合、カテーテル先端にまで到達する時間は遅くなり、同時相で興奮する領域は大きくなることが推定される。我々は先行度を等時線で表記し、その最早期興奮部位から 5ms 遅れた領域までの面積を測定することにより、その面積がアブレーションによる心室性不整脈治療成功指標となりえるかを検討した。今回の研究ではその面積が 0.7cm^2 以下である場合、感度 87.5%、特異度 85.6%でアブレーションによる心室性不整脈治療成功指標となることが明らかになった。心室性不整脈に対するアブレーションの成功指標に、等時線表示を用いた 3 次元マッピングによる面積測定が、局所電位の先行度以外の指標として有用と考えられた。

<諸言>

心室性期外収縮は実臨床において遭遇しやすい心疾患の一つであるが、過去の報告では PVC の数が多いほど心室筋の収縮不全に関連することが知られており、有症候性の多発する心室性期外収縮はカテーテルアブレーション治療の適応と考えられている。カテーテル先端の局所電位を指標にアブレーションを行うが、心室性期外収縮時の 12 誘導心電図における QRS onset からの局所電位の先行度が大きいほど、心室性期外収縮の起源に近いことが推定され、同部位の通電により焼灼がうまくいく症例が多い。ただし、Heeger らは左室流出路起源、特に冠尖起源の心室性期外収縮では、心室性期外収縮時の 12 誘導心電図の QRS onset からの先行度は 30ms から 100ms と症例によって幅があることを報告している。心室性期外収縮に対する成功通電指標としての「局所電位の先行度」は、非成功群とのオーバーラップが大きく、症例によりばらつきがあるため、時に有用な指標とはならない。

先行度が良い領域であっても通電による消失が得られない理由として、焼灼部位と不整脈の起源の間に距離があるものと考えられる。深部にその不整脈起源を有する場合には、表面からの焼灼では同部位への焼灼効果は得られない。

不整脈起源の深遠を推定する方法としては、マッピングした領域において、広範な領域にほぼ同時相で興奮が伝わる場合には、不整脈起源はマッピング面から遠いことが推測される。等時線表示を用いた 3 次元マッピングを行うことは右室流出路起源の心室性不整脈に対して過去に試みられているが、その他の起源を含めた心室性不整脈に対するアブレーションの成功指標として評価した論文はない。今回様々な領域に起源を有する心室性期外収縮を標的に、その等時線表示させた領域の面積とアブレーションの成功有無について評価した。

<方法>

2013 年 11 月から 2015 年 11 月にかけて、心室性期外収縮または特発性心室頻拍を有する 29 名(平均 54±16 歳、男性 13 名)を前向きに評価した。すべての抗不整脈薬はカテーテル手技 1 週間前より中止とした。今回の 3 次元マッピングを行うにあたり、Biosense Webster 社の CARTO3 ナビゲーションシステムを用いた。カテーテルは3.5mmチップのイリゲーションカテーテルを用いた。心室性期外収縮のマッピングにあたっては、心室性期外収縮出現時の術前 12 誘導心電図から右室または左室起源かを推定し、術前診断をした領域においてマッピングを行った。

最早期興奮部位を注意深くマッピングしたのちに、最大 40W までの高周波通電を行った。冠動脈近傍の焼灼にあたっては、冠動脈に対する障害を避けるため、術前に冠動脈造影を行い、少なくとも 5 ㎜以上離れた領域の通電にとどめた。入室後に心室性期外収縮が出現しなくなった症例に対してはイソプロテレノールの持続投与を行った。30 秒以上高周波通電しても心室性不整脈消失に至らない場合には通電をいったん中止し、場所を再確認したのちに再度通電を行った。最初の 30 秒にて心室性不整脈の減少・消失が確認された場合には、通電をさらに 60 秒から 90 秒まで延長した。通電による心室性不整脈の消失が確認されたのち、薬物負荷により心室性期外収縮の再発がないかを確認した。すべての患者は心室性期外収縮の再発有無を術後 12-24 時間モニターにて監視した。

<結果>

成功群と非成功群の 2 群に分けて評価をおこなった。29 名のうち 21 名(72.4%)がアブレーションにより心室性期外収縮の消失に成功した。21 例の心室性期外収縮消失の成功部位の内訳は、右室流出路起源が 8 例、左室流出路が 9 例、僧帽弁輪が 2 例、三尖弁輪が 1 例、左室心内膜起源が 1 例であった。8 例の心室性期外収縮消失の非成功例のマッピング部位は 4 例が左室流出路、2 例が右室流出路、1 例が三尖弁輪、1 例が僧帽弁輪であった。左室のマッピングおよび右室のマッピング間に成功率の差は認めなかった(左室マッピングにおける成功率 66.7%、右室マッピングにおける成功率 81.8%；p= 0.37)。

心室性期外収縮時の 12 誘導心電図の QRS onset からの先行度は成功群にて 36ms、非成功群では 30ms であり有意差を認めなかった(p=0.07)。

最早期興奮部位から 5ms 遅れた領域までの面積は成功群で 0.2 ㎝^{2}であったのに対し、非成功群では 0.95 ㎝^{2}であった(p<0.01)。その面積が 0.7cm^{2}以下である場合、感度 87.5%、特異度 85.6%でアブレーションによる心室性不整脈治療成功指標となった。

<考察>

今回の研究では心室性期外収縮時における心内局所電位の先行度は成功群と非成功群の間でオーバーラップを認めること、最早期興奮部位から 5ms 遅れた領域までの面積は高い感度・特異度でアブレーションの成功指標となることが分かった。

過去の報告ではHerczkuらは右室流出路において最早期興奮部位から10ms遅れた領域までの面積の評価により、右室流出路起源か左室流出路起源かを推定する報告をしている。同様に Acosta らも右室流出路における最早期興奮部位と肺動脈弁の距離との関係により右室流出路起源か左室流出路起源かを推定する報告をしている。これらの論文は、流出路起源の心室性不整脈の評価にとどまり、また実際のアブレーションの成否に関わる因子を述べたものではない。

また上記報告における最早期興奮部位から 10ms 遅れた領域までの面積評価では、5ms 遅れた領域までの面積評価と比べ、より広範な領域をマッピングする必要があり、心室性不整脈の QRS onset からの先行度の低い領域を含めた面積評価が必要であることが実臨床では不向きな点である。

今回の手法の制約としては、マッピング中に心室性期外収縮の出現が減少ないし消失してしまう症例では十分な評価ができない可能性がある。Azegami らは右室流出路起源の心室性期外収縮の症例において、最早期興奮部位から 10ms 遅れた領域までの面積と、同領域内のペースマップの一致率に正の相関があることを示しており、最早期興奮部位を評価することが困難な心室性不整脈の治療には、ペーシング時の 12 誘導波形と実際の心室性不整脈との一致率をみてアブレーションを行う必要があるかもしれない。

<結論>

等時線表示を用いた 3 次元マッピングによる心室性期外収縮のアブレーション成否を検討した。最早期興奮部位から 5ms 遅れた領域までの面積は高い感度・特異度でアブレーションの成功指標となった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5191　号	鈴木　雅仁
論文審査担当者	主　査　古川　哲史 副　査　荒井　裕国、吉田　雅幸	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

背景に心疾患を持たない心室期外収縮は治療対象とならないことが多いが、頻度が多い場合（具体的には全心拍の 5%以上）は心機能低下をもたらすことから、抗不整脈薬やカテーテルアブレーションにより治療を行うことが推奨される。カテーテルアブレーションでは、体表面 12 誘導心電図の QRS 波に先行する心内電位を探し、最も先行する部位で焼灼を行うのがこれまでの方法であるが、一定の割合で不成功例がみられる。期外収縮の興奮伝搬の等時線図を描いたとき、最早期興奮部位の面積が小さいときは期外収縮起源が心内表面に近く、大きいときは心内表面から遠いことが予想され、最早期興奮部位面積が先行電位により優れた指標となる可能性が考えられる。そこで、申請者は心室期以外収縮でカテーテルアブレーション対象となった連続 29 例で、従来の方法で焼灼を行い、その時最早期興奮部位面積との相関を調べた。その結果、期外収縮消失例で有意に最早期興奮部位面積が狭く、0.7 mm^2 をカットオフポイントに取ると、感度は 87.5%、特異度 86.5%でアブレーションの成否を予測できることが示された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

最早期興奮部位面積を指標とするカテーテルアブレーションは右室流出路に限った研究で行われているが、本論文は部位を限定せずすべてのカテーテルアブレーション適応の心室期外収縮に対して行った点で先駆性がある。

２）社会的意義

カテーテルアブレーションは、一定の頻度で合併症が起こること、患者への身体的負担が一定程度あることから、その成功確率をあげることは社会的に重要と考えられる。この点に関して、一定の示唆を与える結果を得ていることから、社会的に意義のある研究であると思われる。

３）研究方法・倫理観

研究方法は、患者の同意を得たものに行っており、所属医療機関内の倫理審査の承認を得たもとで行っている。検査時間の若干の延長を認めるものの、それ以上患者に不要な負担を強いるものでもないことから、倫理的に問題ないものと考える。

４）考察・今後の発展性

最早期興奮部位面積以外にも複数の因子がアブレーションの成否に関係することが考えられる。例えば、心内膜面とカテーテルとのコンタクト、などが考えらえる。これに関しては、コンタクト力をモニターするカテーテルが市販になっており、今後はこれを用いることにより精度をさらに向上させることが期待される。

また、バリデーションのスタディーが行われていないので、今回の症例にのみ適するカットオフポイントが抽出されている可能性がある。従来の方法と今回の方法をランダムに振り分けるバリデーションスタディーを行うことが期待される。症例も少ないことから、多施設研究で行い治療指針とすることが期待される。

３．その他

特記事項なし。

４．審査結果

最終試問では、データの解釈、リミテーション、臨床応用の展望、など多岐にわたる質問を行ったが、すべてに満足のいく回答が得られた。副査の荒井教授、吉田教授との協議の上、申請者は博士（医学）の授与に値する十分な学識を有すると判定する。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	柳下　敦彦
論文審査担当者	主査　荒井　裕国 副査　古川　哲史　吉田　雅幸
論　文　題　目	Improvement in the Quality of Life and Exercise Performance in Relation to the Plasma B-Type Natriuretic Peptide Level After Catheter Ablation in Patients With Asymptomatic Persistent Atrial Fibrillation

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

心房細動（Atrial fibrillation / AF）患者に対する、肺静脈電気的隔離術（Pulmonary vein isolation / PVI）をはじめとしたカテーテルアブレーション（経皮的カテーテル心筋焼灼術）治療は症候性の患者において有効であることは知られており、ガイドラインでも推奨されている一方で、無症候性の持続性 AF（1 週間以上 AF が持続している）患者における効果については十分な検討がなされていない。本研究において、我々は無症候性の持続性 AF の患者に対して、PVI を行う前後で Quality of like(QOL)、運動耐用能（Exercise performance: EP）、さらに血中 BNP 値を評価した。

無症候性の持続性 AF を有する 34 名の連続症例（男性 27 名、平均年齢 60 歳、1 年以上の長期持続例 15 名）において、アブレーションの前後（術前と 6 ヶ月後）で、QOL は包括的 QOL 評価法（Short Form-36: SF-36）と心房細動特異的 QOL 評価法（Atrial Fibrillation Quality of Life Questionnaire: AFQLQ）を用いて評価を行い、トレッドミル検査（Bruce 法）によって EP を評価し、BNP 値の関連を検討した。その結果、術後再発なく洞調律を維持した 30 名（88%）において、術後は術前よりも、SF-36 の 8 項目中 5 項目、AFQLQ の 3 項目すべてにおいて有意な改善を示した。一方、再発を認めた 4 名の患者ではいずれの項目においても改善は認めなかった。再発なく経過した患者では、運動強度（10.2±2.3 から 11.6±2.3METs、 P<0.0001）、また最大運動時間（476±144 から 605±143 秒、P<0.0001）、更に血中 BNP 値の低下（146.6±124.3 から 33.8±35.6 pg/dl、P<0.0001）を認め、運動時間の改善と血中 BNP 値の低下との間に相関が認められた（R=0.620、P<0.0001）。

この結果から、無症候性 AF に対してのカテーテルアブレーション後に洞調律を維持することで QOL、EP、血中 BNP 値は改善し得るため、今後こうした患者においてもカテーテルアブレーションは選択肢となり得る。

＜諸言＞

AF は本邦で頻度が増加している不整脈疾患であり、合併症として心不全、脳梗塞を発症し、患者 QOL や EP を著しく低下させ、これは症候性か無症候性かにかかわらず報告がなされてい

る。PVI は特に症候性の AF に対しての治療として、その有効性が知られているが、無症候性 AF に足しての効果については十分な検討がなされていない。また血中 BNP 値は心不全の指標として知られているが、AF 患者においても上昇し、PVI 後に低下することが報告されている。しかし、無症候性 AF に対しての PVI 後の QOL、EP の変化、更に血中 BNP 値との関連については不明であり、本研究では無症候性 AF 患者における術前後でのこれらの変化についての検討を行った。

＜方法＞

無症候性 AF に対して PVI を行った 34 名の連続症例を対象とした。無症候性の持続性 AF は、診断の契機が動悸や倦怠感など AF に基づく症状ではなく、健診などでの心電図などで偶発的に診断された 1 週間以上持続する AF と定義した。術前に心室レートをコントロールするためにベータ遮断薬などは使用したが、抗不整脈薬の投与は行わなかった。術前と術後 6 か月の時点で QOL、EP、さらに血中 BNP 値を評価した。QOL は包括的 QOL 評価法（Short Form-36: SF-36）と、心房細動特異的 QOL 評価法（Atrial Fibrillation Quality of Life Questionnaire: AFQLQ）の 2 種の質問状を用いて評価を行った。SF-36 は、以下の 8 つの健康概念からなり（身体機能:PF、身体的日常役割機能:PR、体の痛み:BP　、全体的健康感:GH、活力:VT、社会生活機能:SF、精神的日常役割機能 RE、心の健康:MH）、36 項目から構成されている。SF-36 が包括的な尺度であるのに対して、疾患特異的な尺度である AFQLQ は我が国で開発された評価法で、3 項目（26 質問：満点 136 点）より構成されており、スコアが高いほど QOL が高く評価される（AFQLQ1: 発作頻度に対する感受性、AFQLQ2: 症状の重症感、AFQLQ3: 日常生活と精神面の障害度）。EP はトレッドミル検査（Bruce 法）で評価し、安静時と最大負荷時の脈拍数、運動強度（metabolic equivalent of task: METs）、最大運動時間を比較した。PVI は、ヘパリン投与で ACT を 300-350 秒で調節し、心房中隔穿刺でアプローチした左心房内にリング状カテーテルで肺静脈電位を確認しながら、アブレーションカテーテルを用いて、肺静脈電位の消失を治療目標として、左右両側行った。PVI 後、すべての患者で抗不整脈薬のベプリジル 100 ㎎を併用し、再発の有無は心電図、Holter 心電図によって評価し、30 秒以上持続する AF が記録された場合、再発と定義した。治療前後での各項目の比較は、対応のある t 検定、最大運動時間と血中 BNP 値との関連はスピアマンの順位相関を用いて行った。

＜結果＞

対象患者 34 名の内訳は、男性が 27 名、平均年齢 60±9 歳、1 年以上の長期持続例は 15 名、平均の AF 持続期間は 21±21 か月であった。34 名の患者のうち、30 名の患者（88%）で洞調律が維持された。AF の再発がなかった患者では、SF-36 の 8 項目のうち 5 項目で有意な改善が見られた（PF：89.0±11.0 から 93.0±7.3、 P=0.026、BP: 86.7±18.0 から 94.7±12.2、P=0.006、GH: 61.2±15.8 から 71.5±16.1、 P<0.0001、VT: 67.9±19.5 から 78.1±12.1、P=0.004、MH: 72.8 ± 17.4 から 83.7 ± 11.5、 P = 0.002)。さらに、AFQLQ は 3 項目すべてで改善が認められた（AFQLQ1:　18.2±5.0 から 22.6±2.4、P<0.0001、AFQLQ2: 14.4±3.1 から 16.8±1.8、P<0.0001、AFQLQ3: 44.1±9.0 から 49.2±5.2、P=0.0001）。一方で、再発した 4 名では、SF-36 、AFQLQ

いずれもすべての項目で改善は認められなかった。

EP については、再発なく経過した患者では、運動強度が 10.2±2.3 から 11.6±2.3METs へ改善し（P<0.0001)、最大運動時間が 476±144 から 605±143 秒に増加し（P<0.0001）、更に血中 BNP 値の低下（146.6±124.3 から 33.8±35.6 pg/dl、P<0.0001）を認め、運動時間の改善と血中 BNP 値の低下との間に相関が認められた（R=0.620、y=0.066x+0.842、P<0.0001)。

<考察＞

本研究は、無症候性の持続性 AF 患者に対しての PVI 後に洞調律を維持すれば、QOL、EP や血中 BNP 値の改善を得ることを示した。興味深いことに、最大運動時間の増加と血中 BNP 値の低下は相関関係にあった。過去の研究では、一つだけ同様の研究が報告されているが、我々の検討は、疾患特異的な QOL の指標を用いて評価を行った点、血中 BNP 値を評価し、それが最大運動時間と関連している点を明らかにした点で異なっている。血中 BNP 値は左心機能の低下を反映し、心不全の指標として知られている一方で、AF 患者においても上昇することが報告されており、カテーテルアブレーション後に洞調律を維持する例で改善することが知られている。これは、AF によって心房の同期性が失われることによる心拍出量の低下と心室拡張期圧の上昇が、洞調律の復することで改善されるためと考えられる。同期性の回復は、心拍出量を上昇させ、それにより運動筋における酸素摂取を改善すると考えられ、その意味で血中 BNP 値と運動時間の改善との間に相関関係が見られたことは理解し得る現象と言える。

＜結論＞

無症候性の持続性 AF の患者において、カテーテルアブレーション後の洞調律の維持は、QOL、EP、更に血中 BNP 値を改善させ、EP と血中 BNP 値の改善には相関関係が見られた。カテーテルアブレーションは、このような事前に認識されていなかった QOL と EP の低下を有する無症候性の持続性 AF 患者に対しての重要な治療選択肢となり得る。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5192　号	柳下　敦彦
論文審査担当者	主　査　荒井　裕国 副　査　古川　哲史　吉田　雅幸	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、無症候性心房細動(AF)に対してのカテーテルアブレーション治療の有用性についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

AF 患者に対する、肺静脈電気的隔離術（Pulmonary vein isolation / PVI）をはじめとしたカテーテルアブレーション（経皮的カテーテル心筋焼灼術）治療は症候性の患者において有効であることは知られており、ガイドラインでも推奨されている一方で、無症候性の持続性 AF（1 週間以上 AF が持続している）患者における効果については十分な検討がなされていない。申請者らは、無症候性の持続性 AF の患者に対して、PVI を行う前後で Quality of like(QOL)、運動耐用能（Exercise performance: EP）、さらに血中 BNP 値を評価することで治療の有効性について解析しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は、以下の通りである。

１．術後再発なく洞調律を維持した 30 名（88%）において、術後は術前よりも、SF-36 の 8 項目中 5 項目、AFQLQ の 3 項目すべてにおいて有意な改善を示したが、再発を認めた 4 名の患者ではいずれの項目においても改善は認めなかった。

２．再発なく経過した患者では、運動強度（10.2±2.3 から 11.6±2.3METs、 P<0.0001)、また最大運動時間（476±144 から 605±143 秒、P<0.0001）、更に血中 BNP 値の低下（146.6±124.3 から 33.8±35.6 pg/dl、P<0.0001）を認め、運動時間の改善と血中 BNP 値の低下との間に相関が認められた（R=0.620、P<0.0001)。

以上のように申請者らは、無症候性 AF に対してのカテーテルアブレーション後に洞調律を維持することで QOL、EP、血中 BNP 値は改善し得るため、無症候性 AF 患者においてもカテーテルアブレーションは選択肢となり得ることを示した。これは、臨床的に有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究は、本学関連病院における無症候性の持続性 AF を有する 34 名の連続症例に対して、アブレーションの前後（術前と 6 ヶ月後）で、包括的 QOL 評価法（Short Form-36: SF-36)と心房細動特異的 QOL 評価法（Atrial Fibrillation Quality of Life Questionnaire: AFQLQ）を用いて QOL 評価を行い、トレッドミル検査（Bruce 法）によって EP を評価し、BNP 値との関連が検討されている。本手法は、充分な臨床的手法の裏付けのもとに遂行されており、申請者の知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が周到な準備の上に行われてきたことが窺える。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果より血中 BNP 値と運動時間の改善との間に相関関係が見られたことは、心拍調律の同期性の回復が、心拍出量を上昇させ、それにより運動筋における酸素摂取を改善させたと推論している。カテーテルアブレーションによる洞調律の維持は、事前に認識されていなかった QOL と EP の低下を有する無症候性の持続性 AF 患者に対しての重要な治療選択肢となり得ることを示唆しており、今後の研究にて更に臨床成績の向上に寄与することが期待される。

３．その他

特記すべきことなし

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	髙畑　辰郎
論文審査担当者	主査　山岡　昇司 副査　玉村　啓和、石野 史敏
論　文　題　目	Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase

（論文内容の要旨）

<要旨>

インテグラーゼ(IN)は、ヒト免疫不全ウイルス I 型(HIV-1)を始めとしたレトロウイルスの感染過程において、逆転写酵素(RT)によって合成された二本鎖 DNA を感染細胞の染色体に組み込む役割を持つウイルス酵素タンパク質である。IN は組み込みを行う酵素であるが、IN に特定の点変異を導入すると、ウイルス感染過程の組み込み以外の部分に異常をきたし、致死的な影響を及ぼす事が以前より我々および他の複数のグループより報告されてきた。また、近年 Allosteric integrase inhibitor（ALLINI）と呼ばれる新規の HIV 感染を阻害する低分子化合物が報告された。この化合物は IN に結合し、組み込みのみならずウイルス粒子形成に影響を与え、ウイルスの感染能を著しく損なわせる事が報告されている。これらの事から、IN にはその酵素活性に依存しない何らかの重要な機能、非酵素的機能がウイルス感染過程において存在する事が示唆されてきた。

HIV-1 IN は全長 288 アミノ酸から成り、構造上 N terminal domain(NTD), Central catalytic domain（CCD）, C terminal domain（CTD）の三つのドメインから成る。我々は NTD に存在する高度に保存された 15 番目のチロシン（Y15）の点変異がウイルス感染過程において逆転写産物の著しい減少を引き起こすという事を発見していた。本研究では、この Y15 残基に着目し、IN の逆転写反応以前の役割における構造と機能の相関のより詳細な解明を試みた。

Y15 をアラニン（A)、ヒスチジン（H)、フェニルアラニン（F)、トリプトファン（W）に置換した変異体を用いて解析を行った結果、F に置換した変異体以外のウイルスの感染性は損なわれ、逆転写産物の著しい減少が観察された。この事から F 置換変異体以外では非酵素的機能が損なわれていると考えられた。これら変異体 IN の組み換えタンパク質を用いて解析を行った結果、逆転写産物の減少が確認された変異体では IN の多量体化能に影響が生じている事が分かった。F に置換した変異体では WT との差はなく、Y15 側鎖はベンゼン環を有する芳香族アミノ酸である事が非酵素的機能上重要である事が示唆された。

また、RT と IN を欠損したウイルスに対して Vpr と RT もしくは IN、RT-IN の融合タンパク質を用いた complementation アッセイでは、IN と RT は融合した前駆体タンパク質の形で非酵素的機能に寄与している事を示唆する結果を得た。

これらの結果および既存の知見から、RT-IN 前駆体タンパク質にはウイルス粒子形成過程でウイルス RNA との相互作用があると推測され、ウイルス RNA をコア内に正常に配置するという、正常なウイルス粒子形成に寄与していると考えられる。

本研究は IN の Y15 残基の非酵素的機能への関与を示すとともに、RT-IN 前駆体の多量体化が非酵素的機能へ関与する事を示唆し、新たな HIV-1 複製阻害剤開発において新たな知見を示すものである。

<緒言>

HIV-1 はレトロウイルス科レンチウイルス属に属するウイルスである。マイナス一本鎖 RNA をゲノムとしてもち、後天性ヒト免疫不全症候群（AIDS）を引き起こす。感染の過程において、細胞に侵入したウイルスは、自らの RNA ゲノムを自らの持つ RT と呼ばれる酵素により DNA へ変換する。その後、DNA を核内へ移行させ、IN で細胞の染色体 DNA へ組み込むことにより感染を成立させる。IN の組み込みを行う酵素としての機能は研究が進んでおり、現在 IN の酵素活性を阻害する薬剤、Integrase strand transfer inhibitor（INSTI）が HIV 感染治療の現場で広く利用されている。IN はウイルス DNA の組み込みを担う酵素であるが、IN の点変異がウイルスの感染過程において組み込み以外の部分に影響を与える事が以前より報告されており、IN には組み込み以外の何らかの役割がウイルス複製過程において存在すると考えられてきた。IN の酵素活性に影響を与える変異をクラスⅠ変異、酵素活性以外の部分に影響を与える変異をクラスⅡ変異と呼び区別している。

近年、新たな抗 HIV-1 活性を有する物質として ALLINI と呼ばれる化合物が報告された。この化合物はウイルスにクラスⅡ変異様の異常を引き起こし、ウイルス複製を阻害する事が報告された。ALLINI はウイルス粒子内におけるウイルスゲノム RNA のコア内への正常な配置を阻害している事が報告され、IN がウイルス粒子形成過程において何らかの機能を有する可能性が示されている。

本論文では、我々がクラスⅡ変異の表現形を示す事を発見していた、高度に保存された IN の Y15 に着目し、置換変異体を作成、生化学的、ウイルス学的解析を行った。

<方法>

HIV-1 の分子クローンに点変異を導入し、複数の IN 変異体ウイルスを作成した。これらの変異体を細胞に感染させ、ウイルスの感染性をレポーター遺伝子の発現により検討した。また、感染細胞より DNA を抽出し、リアルタイム PCR および Alu-PCR を用いてウイルスの逆転写過程および組み込み過程への変異の影響を検討した。

変異によるウイルス感染過程の各段階への影響を検討するべく、ウイルス粒子を精製し、ウエスタンブロットによりウイルス粒子内タンパク質のプロファイルおよび、電子顕微鏡を用いてウイルス粒子の形態の観察を行った。加えて endogeneous RT アッセイや *in situ* capsid uncoating アッセイにより感染細胞内における脱殻への影響やウイルス粒子内逆転写酵素の活性に関わる検討を行った。

既知となっている IN の部分断片の立体構造を検討した結果、Y15 は IN の多量体化に寄与して

いる事が推測されたので、変異を導入した組み換えタンパク質を作成し、変異による多量体化への影響を検討した。

続いて、ウイルス粒子成熟過程における IN の役割を明らかにするべく、ウイルス粒子内に取り込まれるタンパク質である Vpr と IN および RT、RT-IN 前駆体タンパク質との融合タンパク質を作成し、RT と IN を欠損したウイルス粒子に取り込ませ、complementation アッセイを行った。その結果、RT-IN 融合タンパク質を取り込ませた場合に顕著な感染性の回復がみられた。その結果より RT-IN が非酵素的機能において重要な役割を担っていると考えられ、RT-IN 融合タンパク質における変異の影響を検討した。

<結果>

Y15 残基は HIV において高度に保存されている事が判明した。変異を導入した HIV-1 の感染性を検討した結果、Y15F を除くすべての変異体で著しい感染性の低下と逆転写産物の減少が観察された。組み換え IN タンパク質を用いてこれら変異体の酵素活性を検討した結果、F と W 変異体は酵素活性を有している事が判明した。ウイルス粒子内タンパク質をウエスタンブロットにより検討した結果、IN のデリーションによりウイルス粒子内 RT に影響が生じる事が明らかとなったが、Y15 変異による影響はないことが判明した。ウイルス粒子の形態に関して、非酵素的機能に影響が生じている Y15A 変異体および ΔIN 変異体では未成熟ウイルス粒子が多く見受けられたが、WT との明らかな差は認められなかった。Endogeneous RT アッセイを行ったが、WT と比較して有意な差はなく、ウイルス内の逆転写開始に必要なコンポーネントには変異の影響はないと考えられた。また感染、細胞内におけるウイルスコアの動態を比較したが、有意な差は見られなかった。

変異を導入した組み換え IN を作成し、多量体化能を検討した結果、非酵素的機能を損なっていた Y15A、H、W 変異体では IN の多量体化能が損なわれており、非酵素的機能に影響のない Y15F 変異では WT と同程度の多量体が検出された。

既知の IN の部分立体構造を元に、Y15 残基は NTD-CCD 間の相互作用に関わると推測し、多量体を形成した際に Y15 近傍に位置する、相互作用に関わると推測される CCD 側残基および Y15 近傍の NTD の残基に変異を導入した変異体を作成、各種検討を行った結果、Y15 変異と同様に非酵素的機能の失われた変異体を得た。

ウイルス粒子成熟過程における IN の役割を検討するべく、Vpr と IN、RT、RT-IN の融合タンパク質を用いた complementation アッセイの結果、ウイルス粒子に RT および RT と IN が取り込まれた場合には殆ど非酵素的機能の回復が見られないのに対して RT-IN 融合タンパク質が取り込まれた場合、顕著に感染性が回復する事が判明した。この結果より非酵素的機能に RT-IN 前駆体タンパク質が関連している可能性が示唆された。

RT-IN 融合タンパク質の多量体化能を検討した結果、非酵素的機能を有している WT、D116G、Y15F 変異体では二量体以上の多量体が観察されたのに対して非酵素的機能を失っている Y15A、Y15H、Y15W 変異体では二量体以上の多量体が検出されなかった。

<考察>

本論文では、IN の Y15 残基の RT-IN 前駆体を介した非酵素的機能における新たな知見を示した。Y15 の側鎖のベンゼン環が IN もしくは RT-IN の多量体形成において鍵となる部分である事、RT-IN の多量体化がウイルス粒子内における正常な RNP 複合体の形成およびその後の逆転写反応において重要である可能性を示した。Y15 側鎖のベンゼン環の意義について、既知の立体構造情報では、Y15 近傍に位置する W131 および F185 に変異が導入されているため、正確なところは不明であるが、Y15 近傍に位置すると考えられる CCD 側残基は芳香族環を有するアミノ酸が多く存在する為、それらとの疎水性相互作用や π-π 相互作用等を介し、多量体化に寄与していると推測される。IN の点変異や ALLINI がウイルス粒子内の RNP の配置に影響を与える事が複数報告されてきたが、IN と RNA の間にどういった相互作用があるのか、長らく不明であった。最近 IN とウイルス RNA の間に相互作用が存在する事を示す報告がなされた。我々は Vpr を用いた complementation アッセイよりプロセシングを受けた RT および IN では非酵素的機能を殆ど回復させることができないという結果を得ており、ウイルス成熟の過程で存在する RT-IN において IN を介した RNA との相互作用が存在し、正常なウイルス粒子の形成に関わっているのではないかと考えている。

<結論>

IN Y15 残基は側鎖ベンゼン環を介して多量体化に寄与している。IN の多量体化は非酵素的機能に寄与している。非酵素的機能において RT-IN 前駆体タンパク質の多量体化が重要である可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5193　号	髙畑　辰郎
論文審査担当者	主　査　山岡　昇司 副　査　玉村　啓和　　石野 史敏	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、ヒト免疫不全ウイルス１型(HIV-1)の組み込み酵素(IN)の組み込み反応以外における作用を解析した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

HIV-1 の複製を阻害する治療薬の開発と多剤併用療法の進展により AIDS 発症を予防することがより現実的となったが、治療薬の副作用、潜伏感染など多くの問題が未解決であり、新たな視点からの薬剤開発が必要とされている。申請者らは早くから HIV-1 のゲノム組み込み酵素(IN)の組み込み以外の作用がウイルス複製に重要であることに着眼し、その機能解析を行って独創的な研究成果をあげてきた。

２）社会的意義

本研究で IN と逆転写酵素との融合タンパク質が、ウイルス粒子内で HIV-1 ゲノム RNA がコアと呼ばれるカプシド多量体に適切に収納されために重要な働きをしていることが明らかとなった。ゲノム RNA を収納するコアの形成に異常があることで感染後の逆転写反応が妨げられることもわかった。このように、本来組み込みに関わる IN がはるか前段階である感染性粒子形成において別の重要な役割を果たしていることは、新たな治療標的の可能性を示唆するものであり、社会的意義の高い重要な研究成果であると言える

３）研究方法・倫理観

綿密に練られた研究計画の上になされた多くの実験は、当該領域における申請者の深い知識と高い技術を表している。申請者は、法令、学内規則等にもとづいた組換え DNA 技術を駆使し、病原体の扱いについても学内規則を遵守していることが窺える。

４）考察・今後の発展性

IN と逆転写酵素との融合タンパク質がどのようなメカニズムでゲノム RNA のコアへの適切な収納をサポートするのかが明らかになれば、今後ウイルス粒子の感染性を標的とする新たな薬剤開発に貢献する可能性があるであろう。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は本学博士（医学）の学位を申請するのにじゅうぶんな価値があると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉﨑　幸
論文審査担当者	主査　澁谷　浩司 副査　畑　裕、中西　啓
論　文　題　目	Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

WNK1、WNK4、KLHL3、Cullin3 の変異は偽性低アルドステロン症Ⅱ型(PHAⅡ)の原因遺伝子である。WNK4 は NCC を活性化し、腎臓での Na 再吸収を増加させる。KLHL3 は Cullin3-based E3 ユビキチンリガーゼのアダプター蛋白であり、近年 WNK と結合し分解することがわかった。インスリンやバソプレッシンは WNK シグナルを強力に活性化することがわかっているが、今回我々は、インスリンやバソプレッシンの下流である Akt と PKA の、KLHL3 に対する働きについて研究した。質量分析で KLHL3 の S433 がリン酸化することを同定し、リン酸化特異的抗体を用いてリン酸化 KLHL3 と WNK4 の結合が外れることを証明した。S433 は Akt と PKA のリン酸化モチーフであり、in vitro kinase assay で Akt と PKA が KLHL3 S433 をリン酸化することがわかった。HEK293T 細胞では、PKA 活性化剤であるフォルスコリンを作用させると KLHL3 S433 のリン酸化が起こり、WNK4 との結合が阻害され WNK4 の蛋白発現量が増加した。インスリンはまた、mpkDCT 細胞上で KLHL3 S433 をリン酸化した。

＜諸言＞

PHAⅡは、高血圧・高 K 血症・代謝性アシドーシスをきたす病気であり、WNK1 や WNK4 の変異が原因遺伝子であるといわれている。WNK は OSR1 や SPAK、NCC をリン酸化する。$WNK4^{D561A/+}$ノックインマウスモデルの解析では、常に WNK-OSR1/SPAK-NCC を活性化させ、腎臓で NCC を介する Na 再吸収を増加させることが示され、これが PHAⅡの病態の本質である。また、これに加え KLHL3 と Cullin3 も PHAⅡの原因遺伝子として同定され、KLHL3-Cullin3 E3 リガーゼ複合体は WNK を基質としている。KLHL3 の repeat domain は WNK との結合部位で、WNK のユビキチン化と分解を促す。WNK4 や KLHL3 に変異があると KLHL3 と WNK4 の結合を阻害し、ユビキチン化できなくなるため WNK の蛋白量が増加し、PHAⅡの原因となる。WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードには様々な制御因子があり、例えば腎臓において、WNK はアルドステロンやアンジオテンシンⅡにより制御されており、インスリンもまた強力な活性化因子である。PKA 活性化ホルモンであるバソプレッシンは、腎臓で WNK シグナルを活性化することで知られているが、インスリンやバソプレッシンがどのように WNK シグナルカスケ

ードを活性化させるのかはわかっていない。最近アンジオテンシンⅡが PKC を介して KLHL3 S433 をリン酸化し、WNK4 の分解を抑制するという報告があったが、Akt や PKA が KLHL3 をリン酸化するかはわかっていない。そこで、我々は Akt と PKA がどのように KLHL3 リン酸化を介して KLHL3-Cullin3 E3 リガーゼ複合体による WNK のユビキチン化を制御するのかについて研究した。

＜方法＞

KLHL3 のリン酸化サイトを同定するために質量分析を施行した。蛍光相関分光法(FCS)を用いて WNK4 の TAMRA ラベル化ペプチドと、WT および KLHL3 S433G 変異の GST 融合蛋白を用意し、両者の結合を調べた。その後、KLHL3 リン酸化特異抗体を作成した。そして、HEK293T 細胞を用いて FLAG-WNK4 と Halo-KLHL3 を強制発現させてフォルスコリンを 3 時間反応させて免疫沈降を行った。また、PKA や Akt の kinase assay では両者に活性があるかを調べた。その後、WNK4 stable cell を用いて 24 時間 Halo-KLHL3 を強制発現させ、フォルスコリンを投与し KLHL3 リン酸化や WNK4 の発現を確認した。mpkDCT 細胞でも、インスリンを作用させ KLHL3 リン酸化を確認した。

＜結果＞

KLHL3 のリン酸化部位を同定するため質量分析を施行したところ、候補として、既報のある S10、T295、S433 の他、T375、S376 が挙げられた。S433 は Kelch repeat domain にあり、WNK4 と結合後 WNK4 蛋白を分解する。S433G 変異はヒトにおいて、PHAⅡの原因として知られる他、KLHL3 R528H 変異(Kelch domain の変異)は、ユビキチン化を阻害し WNK4 蛋白の分解を減少させ、WNK4 との結合を減弱させる KLHL3 の変異である。また、KLHL3 S433E 変異が共免疫沈降法により WNK4 と結合しないことを示した報告があり、今回 WNK と KLHL3 S433 変異間での結合が外れることを調べるに至った。そこで、我々は FCS を用い、TAMRA ラベル化 WNK4 と WT KLHL3 および KLHL3 S433G の GST 融合の結合解離曲線を示すこととした。WT KLHL3 の GST 融合蛋白の濃度が上がると並進拡散時間が延長するのに対し、KLHL3 S433G の GST 融合蛋白は濃度を変えても並進拡散時間は変化がなかった。これは、S433 が KLHL3 と WNK4 の結合において生理的に重要な意味を持つことを示している。さらに、S433 は PKA や Akt のリン酸化モチーフでもあるため、我々は KLHL3 S433 リン酸化特異的抗体を作成し、それが KLHL3 S433 のリン酸化を検出することを確かめた。次に、pKLHL3 S433 が WNK4 によって免疫沈降されることを示し、総 KLHL3 蛋白量を同じにして、cell lysate の pKLHL3 S433 と WNK4 による免疫沈降で得られた pKLHL3 S433 を比較すると、後者は結合が弱いことが示された。これは、KLHL3 S433 のリン酸化により KLHL3 と WNK4 の結合が外れることを示している。さらに、S433 は PKA のリン酸化モチーフであるため、生理的リン酸化の活性を調べるために GST-KLHL3 蛋白とリコンビナント PKA を用いて in vitro kinase assay を施行した。すると PKA は KLHL3 S433 をリン酸化することが示され、pKLHL3 S433 は KLHL3 と WNK4 間での結合が外れる原因となることや、PHAⅡにおいて WNK4 の分解を抑制し WNK4 の蛋白量を増やすことが示された。PKA 活性化剤であるフォルスコリンを投与すると、KLHL3 S433 が

リン酸化し、WNK4 の分解の抑制が起きることで WNK4 蛋白量が増加した。HEK293 stable cell line を用い、Flp-in T-Rex システムで転写を止めた状態で WNK4 が常に発現している状態とすると、フォルスコリン投与下で明らかに pKLHL3 S433 が増加した。これは、細胞で PKA が KLHL3 S433 をリン酸化したことを示しており、pKLHL3 S433 と WNK4 の結合が外れることで WNK4 の分解が減少することも示唆した。同様に Akt の in vitro kinase assay でも、Akt が KLHL3 S433 をリン酸化することが示された。Akt はインスリンでリン酸化され活性化されるため、インスリンが KLHL3 S433 をリン酸化するかどうかを mpkDCT 細胞を用いて検証したところ、インスリン投与で明らかに pKLHL3 S433 が増加した。

＜考察＞

WNK シグナルのメカニズムを明らかにすることは、PHAⅡに対する理解を深めるばかりでなく腎臓での塩分排泄機構を研究する上で極めて重要である。我々は以前、WNK シグナルがアルドステロンにより強力に制御されていることを示し、アンジオテンシンⅡが NCC のリン酸化を制御することを発見した。レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系以外で、NCC リン酸化の生理的制御因子としてはインスリンやバソプレッシンが近年報告されている。バソプレッシンは腎臓で WNK シグナルを活性化し、遠位尿細管で PKA を活性化するホルモンであることは知られており、インスリンもまた WNK シグナルを強力に活性化し、Akt がインスリンと WNK を結びつけている。しかし、Akt と PKA が腎臓で WNK シグナルを活性化するかどうかはわかっていない。本研究で、我々は Akt と PKA が KLHL3 にどう作用するかに焦点をあてた。我々は、Akt と PKA の両方共 in vitro で KLHL3 S433 リン酸化することを示した。pKLHL3 S433 が WNK4 と KLHL3 の結合を外すため、pKLHL3 S433 は WNK4 の分解を抑制する。実際、細胞で PKA の活性化が起きると KLHL3 S433 がリン酸化し、WNK4 の分解抑制を反映して WNK4 の蛋白発現量が増加する。同様に、Akt を活性化させるインスリンを投与しても、KLHL3 S433 がリン酸化することを発見した。これは、インスリンやバソプレッシンが WNK シグナルを活性化する 1 つのメカニズムとなり得ると考える。これらに加え、最近 PKC を介してアンジオテンシンⅡが KLHL3 S433 をリン酸化し、WNK4 の分解を抑制するということが報告された。我々は Akt と PKA が、PKC と同様に KLHL3 S433 をリン酸化することを示した。本研究により PKA が KLHL3 と WNK4 の結合を外すことで KLHL3 S433 をリン酸化し、WNK4 の分解が抑制することを示した他、インスリンや Akt が KLHL3 をリン酸化することも示した。これは、インスリンやバソプレッシンが、どのように腎臓で WNK シグナルを生理的に活性化するかを示している可能性がある。

＜結論＞

今回我々は、Akt と PKA が KLHL3 S433 をリン酸化し、PKA による KLHL3 のリン酸化は WNK4 の分解を減少させることを発見した。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5194　号	吉﨑　幸
論文審査担当者	主　査　澁谷　浩司 副　査　畑　裕、中西　啓	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は､WNK4 と KLHL3 の結合への PKA と Akt によるリン酸化制御に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

WNK1、WNK4、KLHL3、Cullin3 の変異は偽性低アルドステロン症Ⅱ型(PHAⅡ)の原因遺伝子であり、Cullin3-based E3 ユビキチンリガーゼのアダプター蛋白である KLHL3 は WNK と結合し分解することが知られている。WNK シグナルはインスリンやバソプレッシンにより活性化されるが、どのように WNK シグナルカスケードを活性化させるのかはわかっていない。このような背景の下、申請者はインスリンやバゾプレッシンの下流因子である Akt と PKA による KLHL3 に対するリン酸化制御機構について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．質量分析により KLHL3 の S433 がリン酸化されること。

２．リン酸化特異的抗体を用いた解析からリン酸化 KLHL3 と WNK4 の結合が外れること。

３．S433 は Akt と PKA のリン酸化モチーフであり､in vitro kinase assay により Akt と PKA が KLHL3 S433 をリン酸化すること。

４．PKA 活性化剤である forskolin を作用させると KLHL3 S433 リン酸化が起こり、WNK4 と KLHL3 との結合が阻害され WNK4 の蛋白発現量が増加すること。

以上のように申請者は、Akt と PKA が KLHL3 S433 をリン酸化し、WNK4 の分解を減少させることを明らかにしている。これは PHAⅡの新たな治療戦略においても極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、生化学的および分子生物学的解析、さらに質量分析計を用いた解析が適切に行われ、さらに WNK4 と KLHL3 の結合能を示すため、蛍光相関分光法を遂行した。これら手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに行われており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分

に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究成果によって、PKA や Akt が KLHL3 の主要なリン酸化制御因子であり、PHAII の新たな治療戦略としてリン酸化を標的とした薬剤スクリーニングが有用である可能性を考察している。これは先行研究と照らし合せても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	三宅　健介
論文審査担当者	主査　木村　彰方 副査　樗木　俊聡、上阪　等
論　文　題　目	Trogocytosis of peptide–MHC class II complexes from dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Th2 型免疫応答は寄生虫感染に対する防御やアレルギーの誘導に重要な役割を果たしている。しかしながら、どのような細胞が Th2 細胞への分化に関わっているのかについては、不明な点が数多く残されている。好塩基球は Th2 分化を誘導するサイトカインである IL-4 を刺激に応じて大量に産生することで知られる。さらに、好塩基球は IL-4 の産生だけでなく、MHC クラス II (MHC-II) を発現して抗原提示を行うことで Th2 分化を導くことが報告されている。しかしその後、これと相反する結果も報告されており、好塩基球が Th2 分化の際に抗原提示細胞として働きうるのかについては、一定の結論は得られていない。本研究では好塩基球の MHC-II の発現メカニズムを検証する目的で、様々なサイトカイン刺激下で好塩基球の MHC-II の発現を解析した。その結果、好塩基球はタンパク質レベルでは MHC-II を発現するが、転写レベルでは発現は認められないことを発見した。さらなる解析により好塩基球は樹状細胞とのトロゴサイトーシスによって、樹状細胞表面からペプチド・MHC-II 複合体を獲得することを見出した。さらに、樹状細胞よりペプチド・MHC-II 複合体を獲得した好塩基球が抗原提示を行うことで、抗原特異的な T 細胞の増殖と Th2 細胞分化を導くことが示された。以上から、好塩基球は樹状細胞とのトロゴサイトーシスにより抗原提示能を獲得することが明らかになった。

＜緒言＞

好塩基球は末梢血白血球中のわずか 0.5%ほどしか存在しない、稀少な細胞集団である。最近の解析により、好塩基球は慢性アレルギー炎症の誘導や寄生虫感染防御などに好塩基球が重要な役割を持つことが明らかになってきた。さらに好塩基球は獲得免疫反応の調節、とくに Th2 細胞分化にも重要であることも報告されている。

ナイーブ T 細胞から Th2 細胞への分化には、T 細胞が抗原提示と IL-4 の両方の刺激を受けることが重要である。好塩基球はさまざまな刺激により大量の IL-4 を産生できるため、Th2 細胞への分化の際に好塩基球が IL-4 を提供すると考えられてきた。実際に、パパイン投与の系では、好塩基球が一過性にリンパ節へと流入し、IL-4 を産生することで Th2 分化に寄与することが報告されている。このため、Th2 分化には樹状細胞による抗原提示と、リンパ節に流入した好塩基球に

よる IL-4 が重要な役割を担うと考えられてきた。

しかしその後、好塩基球自身も MHC-II や共刺激分子を発現し、抗原提示細胞として働きうることが報告された。これらの報告においては、樹状細胞の除去は Th2 分化に影響を及ぼさず、好塩基球を除去した場合にのみ Th2 分化が起こらなくなる。このため、Th2 分化に重要な抗原提示細胞は、樹状細胞ではなく好塩基球であると提唱された。この好塩基球の抗原提示モデルは同時に異なる 3 つの論文で発表され大きな話題を呼んだが、現在では多くの批判も存在している。

とくに、好塩基球の除去方法に対する懸念があげられている。喘息モデルでは、FcεRIαを発現する一部の樹状細胞が Th2 分化に重要であることが報告されており、この樹状細胞は好塩基球除去抗体(抗 FcεRIα抗体)の投与で除去されることが示された。さらに、好塩基球は抗原のプロセシングに重要な遺伝子の発現が極めて低く、MHC-II 自体の発現も他の抗原提示細胞と比べて極めて低い。このような問題点もあり好塩基球が実際に抗原提示能を持ち Th2 分化に寄与しうるのかについては、一定の結論は出ていない。

本研究ではこの命題を解決する目的で、好塩基球の MHC-II の発現のメカニズムを解析した。その結果、好塩基球は樹状細胞より MHC-II 分子自体を獲得することにより、MHC-II を発現し抗原提示細胞として働くようになることを証明した。本研究により好塩基球の MHC-II 発現機構が解明され、好塩基球の抗原提示能に関する過去の研究結果の不一致が説明できるようになると期待される。

＜方法＞

マウスの骨髄細胞をさまざまなサイトカイン(特に IL-3 や GM-CSF)の存在下で 5 日間培養したのちに、好塩基球($CD200R3^{+}CD49b^{+}cKit^{-}$)における MHC-II の発現をフローサイトメトリーや定量的 PCR によって解析した。また、好塩基球と樹状細胞の共培養実験では、C57BL/6J マウスの骨髄細胞より骨髄由来樹状細胞を誘導し、BALB/c マウスの骨髄細胞より骨髄由来好塩基球を誘導した。好塩基球を CellTrace™ Violet にて染色したのち、樹状細胞と 12 時間共培養し、フローサイトメトリーや共焦点顕微鏡にて解析した。好塩基球の抗原提示能を解析する際には、抗原(OVA ペプチド)でパルスした樹状細胞と好塩基球を共培養したのち、好塩基球のみをセルソーターにて単離する。同時に、OT-II マウス由来のナイーブ T 細胞を単離し CellTrace™ Violet にて染色する。単離した好塩基球とナイーブ T 細胞を 5 日間共培養しフローサイトメトリーにて解析した。生体モデルでは、ビタミン D3 誘導体である MC903 を 6 日間連続で耳に塗布してアトピー性皮膚炎様の炎症を引き起こし、耳や所属リンパ節、脾臓の好塩基球における MHC-II の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

＜結果＞

好塩基球は、定常状態では MHC-II を発現していなかった。このため、骨髄細胞をさまざまなサイトカインで刺激して好塩基球における MHC-II の発現が誘導されるかを検討した。その結果、GM-CSF と IL-3 の存在下で誘導した好塩基球において、MHC-II の発現亢進が認められた。しかし、このとき mRNA レベルでは MHC-II の発現上昇は認められなかったことから、好塩基球が他の細胞より MHC-II 分子を獲得している可能性を考えた。

GM-CSF と IL-3 の存在下で骨髄細胞を培養すると、GM-CSF 受容体を発現している樹状細胞が増殖してくることから、樹状細胞が MHC-II 分子を受け渡している可能性が高いと考えた。実際、樹状細胞を除去した状況で同様の培養を行うと、好塩基球における MHC-II の発現亢進は見られなくなった。さらに、好塩基球と樹状細胞を共培養すると、樹状細胞由来の MHC-II が好塩基球において発現することを見出した。以上から、好塩基球は樹状細胞より MHC-II 分子を獲得することが明らかになった。さらなる解析から、MHC-II 分子の移動は好塩基球と樹状細胞の細胞接触に依存して起こること、MHC-II だけでなく樹状細胞の膜成分の移動を伴うこと、さらに共培養開始後 15 分ほどで移動が完了することを発見した。これらの特徴から、好塩基球と樹状細胞の間の MHC-II 分子の移動はトロゴサイトーシスを介することが示唆された。

さらに、ペプチド MHC-II 複合体を認識する抗体である Y-Ae を用いた解析により、ペプチド・MHC-II 複合体自体が樹状細胞から好塩基球へと移動していることが示された。好塩基球は定常状態でも共刺激分子である CD86 を発現していることから、トロゴサイトーシスによりペプチド・MHC-II を獲得した好塩基球は、抗原提示能を持つことが示唆された。実際 OVA ペプチドでパルスした樹状細胞と共培養した好塩基球を、OT-II 由来のナイーブ T 細胞とともに培養すると、著しい T 細胞の増殖が誘導された。また、このとき T 細胞において IL-4 の発現も誘導されていた。

最後に生体内の好塩基球における MHC-II の発現を、アトピー性皮膚炎モデル（MC903 連続塗布モデル）にて検討した。このモデルでは、所属リンパ節に好塩基球の流入が認められ、好塩基球において比較的高いレベルの MHC-II の発現が認められた。樹状細胞特異的 MHC-Ⅱ欠損マウスにこのモデルを施行したところ、炎症局所の所属リンパ節における好塩基球の MHC-II 発現が消失することを確認した。さらに、リンパ節内では好塩基球と樹状細胞が共局在している様子がイメージングにより観察された。以上から *in vivo* でも *in vitro* と同様に MHC-II 分子が移動していることが示唆された。

＜考察＞

本研究により、好塩基球は自身ではほとんど MHC-II を産生せず、樹状細胞からトロゴサイトーシスにより MHC-II 分子を獲得して抗原提示を行うことが明らかになった。以前の報告では、好塩基球が Th2 分化における抗原提示細胞として機能しうるという報告と、好塩基球は抗原提示細胞として機能しないという報告の双方が存在していた。本研究の結果から、好塩基球が樹状細胞とトロゴサイトーシスをどれだけ起こしたかによって、好塩基球の MHC-II の発現量が変化し、好塩基球が抗原提示細胞として働きうるかが異なるという可能性が示唆された。これにより、以前の研究結果の不一致が説明できると考えられる。

本研究から、樹状細胞より MHC-II を獲得した好塩基球は、IL-4 を産生するとともにナイーブ T 細胞に抗原提示を行うことで Th2 分化に寄与することが示唆された。好塩基球と T 細胞が相互作用すると、T 細胞から IL-3 が産生され、好塩基球における IL-4 の産生が向上することが報告されている。さらに MHC-II を発現した好塩基球が抗原提示を行うことで、IL-4 が抗原提示細胞自体から提供され、より効率的に Th2 分化を誘導できるのではないかとも考えらえる。また、T 細胞受容体のシグナルが弱い方が、Th2 分化を導きやすいということも報告されている。以上か

ら、樹状細胞より MHC-II を獲得した好塩基球は Th2 分化を効率的に誘導する性質を持つと考えられる。

トロゴサイトーシスは、細胞接触に依存的に、2 つの細胞間で細胞表面タンパク質を受け渡すメカニズムの一つであり、タンパク質以外に細胞膜の移動を伴い、数分間という短時間のうちに起こるという特徴を持つ。T 細胞や NK 細胞といったリンパ球ではトロゴサイトーシスを起こすことがよく知られていたが、好塩基球のトロゴサイトーシスについては本研究が最初の報告である。好塩基球は定常状態で CD86 を発現しているため、MHC-II を獲得すると T 細胞に刺激性に作用し、自身の産生する IL-4 と協働して Th2 分化に寄与すると考えられる。本研究により、好塩基球と樹状細胞が相互作用を起こすことが Th2 型免疫応答において重要な役割を果たすことが強く示唆された。

＜結論＞

in vitro あるいは *in vivo* において、好塩基球は樹状細胞より MHC-II 分子を獲得し、T 細胞に抗原提示を行うことが明らかになった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5195　号	三宅　健介
論文審査担当者	主　査　木村　彰方 副　査　樗木　俊聡、上阪　等	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、好塩基球における MHC クラス II 分子の発現メカニズムとその機能的な意義に関する論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

Th2 型免疫応答には、寄生虫や病原微生物に対する感染防御や外来抗原に対するアレルギー反応の誘導に重要な役割を果たしているが、どのような細胞が Th2 細胞の分化誘導を促しているのかについては不明な点が残されている。一方、好塩基球は、活性化すると Th2 細胞の分化誘導に関わる IL-4 を産生することや、MHC クラス II 分子を発現していることが知られているが、その機能的意義については研究者間で見解が一致していない。このような背景のもと、申請者はマウスの細胞株や骨髄細胞を用いて、生化学的、細胞生物学的手法により、好塩基球の表面における MHC クラス II 分子の発現メカニズムとその機能的意義を解析しており、その独創的な着眼点は高く評価されるものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．好塩基球に発現する MHC クラス II 分子は樹状細胞とのトロゴサイトーシスによる。

２．トロゴサイトーシスでは細胞膜とともに MHC—ペプチド複合体として移転する。

３．好塩基球に発現する MHC—ペプチド複合体は T 細胞を Th2 細胞に分化誘導する。

以上のように申請者は、好塩基球が樹状細胞から転移した MHC—ペプチド複合体によって、効率的に Th2 細胞の分化誘導を促すことを明らかにした。本知見は、マウスにおける現象であるが、ヒトにおいても類似する現象があることから、基礎医学研究として高く評価されるのみならず、臨床医学面でも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究にはマウスの細胞株や骨髄細胞が用いられており、主に細胞生物学的な手法による *in vitro* での発現解析や FACS 解析が行われている。本手法は、免疫学的な知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に関する知識と技術力が極めて高いことが示され

ると同時に、本研究が精緻かつ周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。また、遺伝子組換え実験や動物実験は本学の規程に沿って適切に行われている。

4）考察・今後の発展性

申請者は、本研究で得られた結果から、好塩基球が Th2 型免疫反応を誘導する立役者であると考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察である。今後、この現象がヒトにおいても実証されることで、アレルギー疾患の治療戦略に繋がるメカニズムの解明とその応用に発展することが期待される。

3．その他

特記すべき事項はない。

4．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Khin Thet Thet Zaw
論文審査担当者	主査　田中　敏博 副査　北川　昌伸、吉田　雅幸
論　文　題　目	Association of ZFHX3 gene variation with atrial fibrillation, cerebral infarction, and lung thromboembolism: An autopsy study

（論文内容の要旨）

Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia; it affects more than 30 million people worldwide. The overall prevalence of AF is 0.56%, but it increases with aging. The prevalence is <0.1% in adults under 55 years old and 8% in adults 80 years and above. Additionally, among men and women over 80 years old, the prevalence is 4.4% and 2.2%, respectively. The prevalence of AF has increased in Japan, as the population has aged, similar to the phenomenon in Western countries. The accumulating number of patients with AF is projected to be 1.03 million in 2050, with an overall prevalence of 1.09%. A Danish twin study estimated that the heritability of AF was 62%. That finding indicated that genetic factors should play a substantial role in the risk of AF. A number of genes that confer AF susceptibility were identified in genome wide association studies (GWAS). One of the major AF susceptibility-conferring genes was a transcription factor, ZFHX3, which was initially found by scanning with the polymorphism SNP, rs2106261, in a Caucasian population. This finding was subsequently replicated in other populations. The current study aimed to replicate the finding that rs2106261 had an effect on AF in a Japanese population. We took advantage of autopsy samples and employed a phenome scan with the rs2106261 probe. In addition to AF, we found signs that rs2106261 was positively associated with both cerebral infarctions (CIs) and lung thromboembolisms (LTs).

Method: We retrieved consecutive autopsy data (n= 2433, mean age = 80) from the Japanese SNP database for geriatric diseases (JG-SNP). Clinical data, including an AF diagnosis, were collected from medical charts. Genotyping was performed with the DNA chip method. We also analyzed 42 pathological and 26 clinical phenotypes, including cerebral infarctions (CIs) and lung thromboembolisms (LTs), diagnosed by macroscopic inspection during the autopsy.

Result: Among the 2433 patients with available data, 18.6% had AF, 29.4% had CI, and 4.9% had LT phenotypes. The A allele of the rs2106261 SNP was significantly associated with AF, after adjusting for age, sex, diabetes, hypertension, and smoking (AA+AG/GG, OR = 1.51,

95%CI: 1.16~1.97, p = 0.002). In the entire cohort, CI was not associated with rs2106261 (p = 0.14). However, among patients under 80 years old, rs2106261 was significantly associated with CI (AA+AG/GG, OR = 1.57, 95%CI: 1.09~2.26, p = 0.01). LT was also associated with rs2106261 (AA+AG/GG, OR = 1.99, 95%CI: 1.31~3.01, p = 0.001). Associations between rs2106261 and CI and LT remained positive after adjusting for the presence of AF, which indicated that this SNP variant might serve as an independent risk marker.

Discussion

ZFHX3 was initially identified as ATBF1, a transcription factor that encoded four homeobox domains and 23 zinc-fingers. ZFHX3 was shown to be involved in suppressing alpha-fetoprotein transcription. It was identified as a candidate tumor suppressor gene for prostate, breast, and gastric cancers, which acted by inducing cell cycle arrest. ZFHX3 was also found to function in neuronal differentiation in the developing brain, and it was involved in cardiac development by regulating myogenic differentiation. In cell signaling, ZFHX3 interacts with a protein that specifically inhibits signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). This protein inhibitor of activated STAT 3 (*PIAS3*) is activated by ZFHX3. Interestingly, in pacing-induced AF models, tachypacing induces a decrease in ZFHX3 expression, which then activates STAT3 signaling via the reduction in PIAS3 activity. Thus, inflammatory processes in atrial tissues that arise with the down-regulation of ZFHX3 may affect atrial arrhythmogenesis. Indeed, elevations in the inflammation marker, C-reactive protein, predict the presence and the future development of AF (16). These lines of evidence may explain, at least in part, the contribution of ZFHX3 to the occurrence of AF in humans.

We have replicated the finding that the ZFHX3 polymorphism, rs2106261, affected AF in a Japanese population. We showed that the risk allele was the same as that shown in previous reports. However, because the ZFHX3 polymorphism, rs2106261, is in the intron, the mechanism underlying these SNP effects on AF has not been well established. One previous study examined the effect of ZFHX3 SNPs on ZFHX3 expression, but they found that rs2106261 did not affect the expression. In contrast, other SNPs did affect ZFHX3 expression. Those authors suggested that the effect of an intronic SNP might be specific to cardiac tissue.

AF is one of the most common types of sustained cardiac arrhythmias. AF is well known to cause CI, a kind of ischemic stroke. AF increases the risk of stroke by two fold over the stroke risk without AF. AF also causes cardio-embolic stroke, due to irregular cardiac muscle contractions, which lead to blood pooling in the atria, mainly the left atrial appendage. Blood stasis is associated with increased concentrations of fibrinogen, D-dimer, and von Willebrand factor. These factors contribute to a prothrombotic state, which in turn, predisposes to thrombus formation with the consequential increase in the rate of cerebral embolization. On the other hand, the relationship between LT and AF appears to be highly complex. It has been suggested that the link between AF and LT is pathophysiological. Acute LT increases

pulmonary vascular resistance and right ventricular afterload, by obstructing the pulmonary arteries and triggering the release of vasoconstrictive mediators. Consequently, the increases in right ventricular and atrial pressures elicit stretch injuries that, in turn, can trigger AF.

In the present study, our phenome scanning showed that the rs2106261SNP was associated with CI (for patients aged <80 y) and, even more strongly, with LT. A logistic regression analysis adjusted for the presence of AF revealed that the rs2106261 variant was associated with CI (for patients aged <80 y) and LT, independently. Thus, the rs2106261 may have substantial pleiotropic effects on AF and other AF-related traits through a common mechanism. We speculated that this mechanism could involve inflammatory acceleration through the ZFHX3-PIAS3-STAT3 pathway.

Although acute LT is a well-known phenotype, which typically follows deep vein thrombosis, the phenotype of chronic LT is not well known. We know that AF causes blood stasis in the atrium, which enhances platelet aggregation and coagulation. Therefore, it logically follows that direct embolization in the right atrium precedes LT. In fact, LT has been shown to be a rare complication of AF. Nevertheless, our observations suggested that a common ZFHX3 genotype is a risk factor for AF and LT independently, which suggested that LT might be a risk factor for AF. However, this study was limited by the small sample size; therefore, the results may not be widely generalizable; they should only be considered useful for generating hypotheses.

Conclusion: We showed that the ZFHX3 polymorphism, rs2106261 (A allele), was a risk marker for AF and AF-related phenotypes. The roles of this variant in the development of AF and its related phenotypes warrant further investigation.

＜要約＞

ZFHX３遺伝子の SNP rs2106261 は心房細動のリスク多型としてゲノムワイド関連解析（GWAS）により見出された。本研究ではこの SNP の再現性及びフェノーム解析を、高齢者連続剖検例である JG-SNP データーベース及びサンプルを用いて行った。タイピングは DNA チップを用い、年齢・性・喫煙等を調整因子とし、多重ロジティック解析を行った。その結果、rs2106261 と心房細動との関連の再現性を確認する事が出来た（OR=1.51, 95%CI:1.16~1.97, p=0.02）。さらに４２の病理診断及び２６の臨床診断を用いたフェノーム解析においては、８０歳未満の脳梗塞（OR=1.57, 95%CI:1.09~2.26, p=0.01）、及び全年齢における肺塞栓（OR=1.99, 95%CI:1.31~3.01, p=0.001）との関連を新たに見出した。心房細動は脳梗塞の原因として良く知られている一方、肺梗塞は心房細動の稀な原因として報告されている。今回、統計モデルによる因果解析を行ったところ、この三つの形質はいずれも独立して遺伝子多型と関連していることが示唆された。ZFHX3 が免疫細胞の転写因子パスウェイ上にあることを考えると、三つの形質に共通した炎症性の基盤がある可能性が考えられた。今後さらに ZFHX3 及び心房細動、脳梗塞、肺塞栓の関連を研究する必要がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5196　号	Khin Thet Thet Zaw
論文審査担当者	主　査　田中　敏博 副　査　北川　昌伸、吉田　雅幸	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は連続剖検症例をコホートとして、遺伝情報と心房細動、脳梗塞、肺梗塞との関連を解析したものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

心房細動のリスクに関連する遺伝子は 10 種類程度同定されているが、それらの遺伝子と心房細動の関連疾患である脳梗塞や肺梗塞との関連については十分な研究がなされていない。申請者は連続剖検症例を用いて脳梗塞、肺梗塞との関連を心房細動の有無で調整した形でゲノムワイドに関連解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．ZFHX3 遺伝子内の一塩基多型 (SNP)が心房細動と関連した。

２．心房細動の有無で調整したところ、上記の SNP は 80 歳未満の脳梗塞や全年齢に亘る肺梗塞でも独立して有意に遺伝学的関連を示した。

以上のように、申請者は ZFHX3 遺伝子と脳梗塞、肺梗塞との関連を明らかにしている。これは今後の更なる病態解明に道を拓くものであり、極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究にはゲノムワイド関連解析の手法が用いられ、臨床情報と SNP 情報との関連が検索された。この手法は疾患遺伝学研究領域においては確立されており、妥当な研究方法であるといえる。また、ヒト試料を用いることから高い倫理観が必要であるが、当該指針に基づき、該当するすべての施設において倫理審査委員会での研究計画の承認を得る等、本研究は周到な準備の上に行われてきたと考えられる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は本研究結果について ZFHX3 タンパクが免疫細胞の転写因子パスウェイ上にあることを考慮し、心房細動、脳梗塞、肺梗塞に共通した炎症基盤の存在を考察している。この考察は新規性が高く、検証ができれば大きな発展につながることが期待される。

３．その他

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	福島　啓文
論文審査担当者	主査　堤　　剛 副査　岡崎　睦、原田　浩之
論　文　題　目	Indwelling Voice Prosthesis Insertion After Total Pharyngolaryngectomy With Free Jejunal Reconstruction

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

咽頭喉頭全摘、遊離空腸再建術は、下咽頭癌症例でしばしばおこなわれている術式である。治療後は失声となり、QOL を著しく低下させる要因となる。今回の研究では、遊離空腸再建後のボイスプロテーゼによるシャント発声 130 例の効果と安全性について検討した。下方まで癌の切除を十分おこない、放射線治療をおこなった症例でもボイスプロテーゼによる音声の獲得は可能であった。遊離空腸再建症例においてボイスプロテーゼを用いた音声獲得は有効であることが示唆された。

＜緒言＞

下咽頭癌や頸部食道癌の治療で下咽頭、頸部食道を全周切除し、その後に空腸で咽頭再建することは、広くおこなわれている。癌治療の一環であるが声を失うことは、身体的、精神的側面から重大な問題であり、QOL 低下の最大の要因である。このため根治治療終了後には音声獲得が必要となる。喉頭摘出後の音声獲得方法には、食道発声、電気式人工喉頭、気管食道シャント発声の３つの方法が知られている。本邦ではこれまで、保険適応などの問題もあり、食道発声や電気式人工喉頭による音声獲得が普及してきた。単純喉頭全摘のように残存咽頭粘膜を縫縮した場合と比較し、咽頭を全周性に切除し空腸による再建をおこなった場合、食道発声の音声獲得率は低く、電気式人工喉頭もしくは筆談によるコミュニケーションに頼っているのが現状である。1980 年からボイスプロテーゼを用いた気管食道シャント発声が欧米を中心に行われるようになり、徐々に本邦でも増加している。ボイスプロテーゼを用いたシャント発声は欧米では、単純喉頭全摘術を中心におこなわれ、その効果や安全性に関する報告が既に行われている。一方で、遊離空腸再建後のシャント発声に関する報告は殆ど知られていない。このため遊離空腸再建後のボイスプロテーゼ挿入の効果と安全性に関して証明されていないのが現状である．この論文では、遊離空腸再建後のボイスプロテーゼによるシャント発声 130 例の効果と安全性を検討した。

＜方法＞

2005 年 6 月から、2015 年 5 月に咽頭喉頭全摘遊離空腸再建症例に 2 期的シャント形成術を

おこない、ボイスプロテーゼを挿入した 130 例を対象とした。使用したボイスプロテーゼは Atos Medical 社製の Provox®2（8mm、 10mm、 12.5mm、 15mm)と Provox®Vega (12.5mm) を用いた。ボイスプロテーゼの挿入は気管内チューブと軟性ファイバースコープを使用した方法でおこなった。検討した項目は、音声獲得率、合併症率、初回挿入のサイズについて検討した。音声獲得の評価は Head and Neck Cancer Understandability of Speech Subscale.（PSS-HN） を使用した。(100：常に理解できる。75:ほぼ理解できるが、時々繰り返す必要がある。; 50:顔を突き合わせての会話でほぼ理解できる。25：理解は難しい。0:全く理解できない。筆談が必要。) 合併症の詳細項目は、ボイスプロテーゼを挿入する位置の違い（空腸か頸部食道か）と放射線治療の有無について検討をおこなった。

＜結果＞

経過観察期間は 2 か月から 9 年 8 か月、平均観察期間は 57 ヶ月であった。年齢は 38 歳から 80 歳まで、平均年齢は 61.3 歳であった。性別は男性 113 例、女性 17 例。原疾患は下咽頭癌 120 例、頸部食道癌 5 例、喉頭癌 5 例であった。穿刺部位は、空腸が 43 例、食道が 87 例で、食道穿刺の方が多かった。合併症は 20 例（15.4%）に認め、局所感染が最も多い合併症であった。挿入部位別では、空腸穿刺の方が頸部食道穿刺よりも合併症が少なく、放射線治療の有無に関しては、合併症に差は認めなかった。入院期間と無音声期間については 13.4 日と 14.6 か月であった。空腸穿刺症例で入院期間が短い傾向にあった。音声評価については、PSS-HN スコアーを使用した。症例全体を通してみると、100 および 75 が 130 例中 102 例（78.4%）を占め殆どのケースでボイスプロテーゼは有効に用いられていることが分かった。更に穿刺部位ごとに、音声評価をしてみると空腸穿刺では 55 例中 36 例 78.2% が 100 または 75 であった．また、食道穿刺では、84 例中 66 例（78.6%)で 100 または 75 であり、穿刺部位により音声評価には差がなかった。一方、照射の影響では、照射なしでは 32 症例中 26 症例（81.1%）で 100 または 75 であったのに対して、照射あり群でも 54 症例中 41 症例（76.0%）が 100 または 75%と大きな変化は認めなかった。このため穿刺部位や照射の有無は大きな影響をボイスプロテーゼの音声機能に影響を与えないものと思われた。

＜考察＞

今回、すべての症例で Provox を 2 期的に挿入した。１期的挿入はすぐに発声ができるというメリットはあるが、再建手術と同時におこなうことは、大きな合併症である縦隔炎や瘻孔をひきおこす危険が報告されている。また、単純喉頭全摘症例において 1 期的、2 期的挿入の成功率（合併症、音声獲得率）は同等であるとされているが、遊離空腸再建症例にボイスプロテーゼの効果と安全性について十分な検討はされていない。特に下咽頭癌や頸部食道癌は進行癌が多く、切除範囲が広範囲になり、食道切除が切離した気管膜様部よりも下方に及ぶことや術後放射線治療が必要になることが多く認められる。今回、下方切除の影響や放射線治療がボイスプロテーゼにどのようかかわってくるのか検討をおこなった。今回の研究では 78.4%が音声を獲得した。これは報告されている単純喉頭全摘症例の場合と同等であった。このことから、遊離空腸再建でのボイスプロテーゼは有効であることが示唆された。また、放射線治療による音声回復率への影響はみ

とめなかった。
広範囲切除の影響については、空腸穿刺群と食道穿刺群の２群に分けて検討した結果、音声獲得に関しては２群間では大きな違いは認めなかった。入院期間関して、放射線治療群と食道穿刺群に有意に入院期間の延長を認めた。合併症に関して、空腸穿刺症例で食道穿刺症例に比べて有意に少なかった。このことは、下咽頭癌の進行癌では気管傍郭清積極的におこなうことにより、残存食道粘膜の血流は低下していると推察される。一方移植した空腸の血流は血管を再吻合しているため、十分な血流があり合併症が少なかったと考えられる。

＜結論＞
　咽喉食摘後の遊離空腸再建症例で十分な切除をおこない、放射線治療をおこなった症例でもボイスプロテーゼによる音声獲得は可能であった。ボイスプロテーゼを用いた音声獲得は遊離空腸再建症例でも有効であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5197　号	福島　啓文
論文審査担当者	主　査　堤　　剛 副　査　岡崎　睦、原田　浩之	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

咽頭喉頭全摘、遊離空腸再建術は、下咽頭癌症例でしばしば行なわれている術式である。治療後は失声となり、QOL を著しく低下させる要因となる。学位申請者は、この問題を解決する新しい手法として、近年喉頭全摘症例に広く適用されつつあるボイスプロテーゼに着目した。咽頭喉頭頸部食道摘出、遊離空腸再建後のボイスプロテーゼによるシャント発声を行なった 130 例の効果と安全性について検討している。下方まで癌の切除を十分おこない移植した空腸に装用した場合や、放射線治療をおこなった症例でも、ボイスプロテーゼによる音声獲得は可能であることを示した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

従来喉頭を摘出した症例は通常の発声が不能となり、その対応策として、電気式人工喉頭や食道発声に加え、1980 年からボイスプロテーゼを用いた気管食道シャント発声が欧米を中心に行なわれ、本邦でも普及しつつある。一方で咽頭喉頭全摘・遊離空腸再建後の症例では食道発声は困難で、電気式人工喉頭に頼っている現状であるが、ボイスプロテーゼを用いたシャント発声についてはその効果・安全性を含め、少数例での報告しかなく検証されていない。申請者らは、極めて多数の本術式を施行する high volume center の利点を生かし、130 例という多数例における本手技の有用性・安全性についての検討を世界で初めて行なっている。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. 本術式に対するボイスプロテーゼによる音声獲得は極めて有効な手法であった。
2. 合併症として最も多いのは局所感染（15.4%）で、重篤な合併症は認めなかった。
3. 放射線治療の有無による音声回復率への影響は見られなかった。
4. より下方まで大きく切除し、ボイスプロテーゼを遊離空腸に穿刺した場合でも、食道に穿刺した場合と音声獲得に差は見られなかった。
5. 放射線治療群と食道穿刺群において有意に入院期間の延長を認めた。
6. 空腸穿刺群で食道穿刺群に比べ有意に合併症が少なかった。

これらの結果は、下咽頭癌の拡大手術後の音声獲得に大きく道を開くものであり、術後のQOLの向上に資するところは極めて大きい。

3）研究方法・倫理観

2005年6月から2015年5月の10年間に咽頭喉頭全摘遊離空腸再建症例に2期的シャント形成術をおこない、ボイスプロテーゼを挿入した130症例を対象とし、その音声獲得や合併症を後方視的に検討している。音声評価はこれまで確立された手法（PSS-HNスコア）を用いており、評価を申請者以外の人間も行なうなど、客観性の保持にも留意されている。

4）考察・今後の発展性

本研究から示唆されるより効果的な穿刺部位などについても考察がなされており、今後の研究にてさらなる臨床成績の向上に寄与することが期待される。

3．その他

特記すべきこと無し。

4．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	北澤　萌恵
論文審査担当者	主査　宮坂　尚幸 副査　沢辺　元司、金井　正美
論　文　題　目	Severe damage to the placental fetal capillary network causes mid- to late fetal lethality and reduction in placental size in *Peg11/Rtl1* KO mice

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Peg11/Rtl1 KO マウスは胎生中期から後期にかけて致死を示すか、胎生後期から成長遅延を引き起こし新生仔致死となる。致死の表現型は遺伝背景（ジェネティックバックグラウンド）に依存し、C57BL/6 (B6)に戻し交配するにつれて重篤となる。以前、私たちはこの致死と成長遅延の原因が胎盤ラビリンス層の胎仔毛細血管の深刻な欠損であることを示唆した。今回、KO 胎仔と胎盤を再解析することで、胎仔毛細血管の深刻な目詰まりが胎仔の胎生中期から内出血を伴った致死に関連していることを確認した。さらに、胎仔毛細血管の中でも、根元（臍帯）側の方がより損傷が大きく、これらは胎生後期に起こる、ラビリンス層の拡張の阻害や胎盤の過少形成を導くと考えられる。また、マイクロアレイ解析を行うと、*Tmem100*, *Meox2*, *Lyve1* の発現が減少していることから、これらの遺伝子が胎仔の発生時期において *Peg11/Rtl1* とともに胎仔毛細血管の維持に関わっていると考えられる。

＜背景＞

胎盤は妊娠期間中の胎仔の成長に必須な、哺乳類（真獣類と有袋類）のみが有する特別な器官である。中でも真獣類は長期の妊娠期間を可能にする絨毛膜尿膜胎盤を獲得した。マウスの胎盤の構造は、胎仔側からラビリンス層、それを取り囲むスポンジオトロフォブラスト層、最も子宮側のトロフォブラストジャイアント細胞層の 3 つの層に分けることができる。ラビリンス層は胎盤において必須な部位であり、胎仔母体間で栄養やガスを交換している。

これまでに、遺伝背景が B6 に近づくにつれて致死率が上昇すること、胎盤ラビリンス層の胎仔血管内皮細胞の異常が胎生後期致死や成長不良を引き起こすことを報告している。本研究では *Peg11/Rtl1* KO マウスの胎盤の異常を詳細に解析し、胎仔毛細血管の異常が胎生中期から後期致死だけでなく、発生後期の胎盤過少形成の原因になっていることを示した。

＜材料と方法＞

解析には、当研究室で作製した *Peg11/Rtl1* KO マウスを使用した。*Peg11/Rtl1* KO マウスは 129SvEv の ES 細胞から作製したため、KO の雄を B6 の雌に掛け合わせることで維持した。

組織染色には d14.5, 16.5, 19.5 の胎盤を用い、4 % PFA で固定、OCT compound に包埋後、10 µm 凍結切片スライドを作製した。ヘマトキシリン・エオジン重染色（HE 染色)と免疫染色を行い観察した。免疫染色は anti-cytokeratin 抗体あるいは anti-DBA lectin biotin conjugate 抗体反応後に BCIP/NBT により発色反応させ、Nuclear first red で核染色を行った。

マイクロアレイ解析に使用した RNA は d10.5 と d12.5 の胎盤から精製し、Cy3 でラベル化した。スキャン後、qspline 法により正規化し、d10.5 と d12.5 で共通して 2 倍以上変動した遺伝子のみ RT-qPCR にて発現を調べた。

MicroCT 解析には固定、造影した d18.5 の胎仔を撮影し、OsiriX software にて解析を行った。

＜結果＞

Peg11/Rtl1 **KO マウスの致死に対するジェネティックバックグラウンドの影響**

Peg11/Rtl1 KO マウスの致死性はジェネティックバックグラウンドに依存する。129SvEv の ES 細胞から作成した KO マウスを B6 と交配していくと、F1 (B6 x 129SvEv)では正常に生まれ、致死性は見られなかったが、ジェネティックバックグラウンドがほぼ B6 になった F10 では KO の致死率は 100%となり、すべての個体は出生後 1 日以内に死亡した。

次に、F1, 5, 10 世代目の妊娠マウスを、発生段階を追って比較した。F1-like（129 の卵と F9 *Peg11/Rtl1* KO マウスの精子を使って IVF を行った）では致死性が見られなかった。F5, 10 マウスでも WT では胎児期致死も新生児致死もなかったが、d14.5, 16.5, 19.5 (P0)の致死率を比べると、それぞれ F5 に比べ、F10 は上昇していた。

F10 での胎仔と胎盤の発生を解析すると、F10 *Peg11/Rtl1* KO でも d12.5 までは WT と差がなかった。d14.5 から胎仔期致死が始まるが、正常に見える個体と死にかけの個体で胎仔重量には差はなかった（KO は WT の 94%)。d16.5 では死んでいる、あるいは内出血を伴い死にかけている個体が現れ、この時、一見正常に見える個体でも 15%の成長遅延を示した。生き延びた個体も新生仔までに約 20%の成長遅延を引き起こし、すべて出生後 1 日以内に致死となることが観察された。胎盤も d14.5 から成長不良の傾向にあるが、d19.5 のみ優位に重量低下が見られた（78.5%)。

Peg11/Rtl1 **KO 胎盤の胎仔毛細血管の深刻な損傷は胎仔期中期致死と胎盤ラビリンス層の減少を引き起こす**

Peg11/Rtl1 KO の胎盤の異常を調べるために、 F10 d14.5 の胎盤をサイトケラチン抗体（トロフォブラスト細胞のマーカー）と DBA レクチン抗体（胎児血管内皮細胞のマーカー）で免疫染色を行うと、ラビリンス層の成長不良が原因で胎盤が小さいことが観察された。サイトケラチンで染色を行うと、d19.5 では明らかに小さくなっていた。特にサイトケラチンにより濃く染まったラビリンス層は非常に薄く、半分の厚さしかないことが観察された（スポンジオトロフォブラスト層では差がない)。そこで、d19.5 の胎盤を HE 染色したところ、F10 KO のみでラビリンス層にエオジンで濃染される部分が見られた。

次に、WT、異常の少ない KO、異常の深刻な KO の 3 個体の胎盤を比較した。WT の胎盤では DBA レクチン陽性範囲とサイトケラチン陽性範囲はラビリンス層全体に満遍なく広がっていた。一方、異常の少ない KO と死にかけている KO では、DBA レクチンが観察できない部分でサイ

トケラチンが強く発現していることが観察できた。これは KO の胎盤ラビリンス層にはシンシチオトロフォブラスト細胞のみが存在し、胎仔血管内皮細胞がないことを示している。これらのことより、胎仔毛細血管の損傷が胎児期中期致死の主原因であると考えられる。

さらに、胎盤の根元（臍帯）側と末梢（母親）側の胎仔毛細血管を比較すると、異常の深刻な個体はどちらの血管も損傷が大きかった。しかし、異常の少ない個体では根元側の毛細血管は損傷が広がっていたが、末梢側の毛細血管は損傷が少ないことが観察された。胎仔毛細血管のネットワークの形成は d8.5 から始まり、臍帯側から母親側に向かって広がっていく。主要な構成は d12.5 までに完成するが、その後も出生前まで成長は続く。KO の胎盤では d14.5 の時点ですでに胎仔毛細血管のネットワークの崩壊が始まっているため、胎仔毛細血管のネットワークの拡張が乏しいことにより、ラビリンス層の薄い胎盤しか作ることができない。

***Peg11/Rtl1* KO マウス胎盤の遺伝子発現解析**

WT と KO でまだ大きさに差のない d10.5 と 12.5 の胎盤を用いてマイクロアレイ解析を行うと、ほとんどの胎盤細胞特異的マーカー遺伝子の発現に変化が見られないにもかかわらず、いくつかの遺伝子において変動が見られた。d10.5 と d12.5 の胎盤で共通して 2 倍以上差のあった遺伝子は、発現上昇：*Gnai2* のみ、発現低下：*Tmem100*、*Meox2*、*Lyve1* の 3 個だった。RT-qPCR により、これらの発現を確認すると、Gnai2 は差が見られなかったが、*Tmem100*、*Meox2*、*Lyve1* は KO の胎盤で発現が減少していた。

***Peg11/Rtl1* KO マウスは生後も成長遅延を示す**

生き残ったマウスについて、WT と KO マウスの出生後の体重を比較したところ、胎仔胎盤成長遅延に引き続き、出生後も成長遅延を示した。新生仔は WT の 80%ほどの大きさで生まれてくるが、生後 1 週目には 60%まで差が広がる。しかし、離乳までには 80%、成体では 90%まで回復し、その後 30 週齢まで測定したがその差を維持し続ける。一方、体長を測定すると、離乳後には 90%となり、成体では WT に追いつくことが観察された。このことより、KO マウスは体長においては WT に追いつくが、痩せ続けていることが示された。

Micro-CT により d18.5 胎仔の臓器の体積を比較した。体重において KO は WT の 70 %ほどであり、それに伴い胸腔、腎臓も 70 %前後、さらに背側の褐色脂肪、肝臓は 53 %ほどしかなく、体重の差以上に体積は減少していた。ほとんどの KO 臓器で明らかに体積が減少していたが、心臓のみは 91 %と WT と比べ優位に小さくはならなかった。なぜ心臓のみが他の臓器より大きいのかは不明であるが、胎盤異常の二次的な影響の可能性が考えられる。

＜考察＞

Peg11/Rtl1 KO マウスは戻し交配を行うにつれ、新生仔致死だけでなく、胎生致死も上昇した。胎盤胎仔毛細血管の深刻な損傷の度合いと内出血を伴った胎仔期中期致死が対応していることから、胎仔—胎盤間の血液循環の崩壊による高血圧に加え、胎盤（母親）からの酸素や栄養の欠乏が KO マウスの胎仔期致死の原因と考えられる。どちらの場合も *Peg11/Rtl1* の欠損による、胎仔毛細血管の維持機構の崩壊が胎生致死と胎仔成長遅延の主な原因であると結論付けられる。

胎仔毛細血管のネットワークの崩壊は、血管形成がより早い時期から始まる根元側の毛細血管から始まり、その後の成長を妨害していると考えられる。よって、d19.5 に見られる KO 胎盤のラビリンス層の過少形成は、すでに d14.5 から始まっていると言える。また、マイクロアレイ解析と RT-qPCR 法により d10.5 と 12.5 に共通して、KO の胎盤で発現が減少している遺伝子が 3 つ見つかった。1 つ目の *Tmem100* は動脈管の内皮細胞の分化と血管形態形成に必須であり、卵黄嚢の血管形成と初期の胎盤形成に重要な遺伝子である。2 つ目の *Lyve1* はリンパ管の内皮細胞で発現し、ヒトの胎盤では、マウスのラビリンス層にあたる、絨毛核内皮細胞とシンシチオトロフォブラスト細胞で発現している。3 つ目の *Meox2* もヒトの胎盤のシンシチオトロフォブラスト細胞で発現しており、いい候補ではあるが、*Meox2* KO マウスで胎生致死は観察されないと報告されている。少なくとも、*Tmem100* と *Lyve1* は *Peg11/Rtl1* と相互作用することで胎仔毛細血管内皮細胞の維持に機能している可能性が高い。

新生仔致死、生後の成長遅延のように、胎盤だけでなく胎仔や新生仔への *Peg11/Rtl1* の直接的な機能解析がまだ課題として残されている。胎盤異常の二次的な影響も否定できないが、*Peg11/Rtl1* が生後の成長に関わる遺伝子（摂食行動や代謝に関わる脳、消化器官、ホルモン）と相互作用している可能性もある。*Peg11/Rtl1* KO マウスの表現型はマウス mUPD12 やヒト upd(14)mat に、*Peg11/Rtl1* 過剰発現マウスの表現型はマウス pUPD12 やヒト upd(14)pat に類似していることから、*Peg11/Rtl1* は両者の主原因であると以前結論付けている。*Peg11/Rtl1* が胎盤に加え、胎仔や新生仔の発生、成長に直接関わっているかどうかを調べることは、LTR レトロトランスポゾン由来の真獣類特異的遺伝子 *Peg11/Rtl1* の役割を知る上でとても重要である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5198　号	北澤　萌恵
論文審査担当者	主　査　宮坂　尚幸 副　査　金井　正美、沢辺　元司	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

哺乳類の胎盤は、胎児と母体間の物質交換の場となる哺乳類の胎生に必須な臓器であり、哺乳類が進化の過程で独自に獲得したものである。申請者の所属する研究室ではレトロトランスポゾン由来の遺伝子である *Peg11/Rtl1* が、胎生後期の胎盤で重要な役割を担っていることを発見し報告している。また *Peg11/Rtl1*　KO マウスの表現型は遺伝的背景に依存しており、C57BL/6 マウスに戻し交配を行うと、世代の進行に伴って重篤化し致死的となる。申請者らは、*Peg11/Rtl1* KO マウスの胎仔および胎盤を再解析し、その致死性の原因が妊娠後期の胎盤における胎仔毛細血管の閉塞と胎仔の内出血に関連していることを解明した。さらにマイクロアレイ解析により、*Tmem100*、*Meox2*、*Lyve1* の発現が低下していることを突き止め、これらの遺伝子が胎仔発生時期において *Peg11/Rtl1* とともに胎仔毛細血管の維持に関わっていることを明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

これまで胎盤形成の初期段階で必要となる遺伝子に関する研究は数多くあるが、胎児と母体間におけるガス交換が活発に行われる胎生後期に必要となる遺伝子については知られていなかった。その点において *Peg11/Rtl1* の発見は胎盤の進化を理解する上で極めて重要な遺伝子であり、またその機能を解明したことは、極めて先駆的、独創的と判断される。

２）社会的意義

哺乳類の進化と密接に関係している胎盤の進化メカニズムを解明すると同時に、*Peg11/Rtl1* KO マウスはヒトにおける 14 番染色体の母性ダイソミーと父性ダイソミーの疾患モデルでもあることから、臨床的・社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

動物を用いた研究であり、東京医科歯科大学実験動物センターにて適切な審査を受けて行われた研究であり、倫理的な問題は認められない。また研究方法も適切であり、その解釈、考察も妥当である。

４）考察・今後の発展性

今後 *Peg11/Rtl1*　KO マウスの新生仔、母体の解析を進めることで、ヒト臨床における様々な異常妊娠の病態生理を解明し、新たな治療方法を開発する礎となることが期待される。

３．その他

スライド、口頭発表ともよく準備され、わかりやすい内容であった。質疑応答においても満足すべき回答が得られた。

４．審査結果

申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断される。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	中村　玲奈
論文審査担当者	主査　古川　哲史 副査　荒井　裕国、吉田　雅幸
論　文　題　目	Life-Threatening Ventricular Arrhythmia and Brugada-Type ST-Segment Elevation Associated With Acute Ischemia of the Right Ventricular Outflow Tract

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

右室流出路の急性虚血により、Brugada 型心電図へ変化することが動物実験で示されているが、臨床的には症例報告のみであり、心室性不整脈の出現との関連性は明らかとされていない。今回、当院で 10 年間に心臓カテーテル検査中に右室流出路の急性虚血をきたした 13 症例を対象として、心電図変化や不整脈出現の要因について検討した。結果は、13 例中 9 例に Brugada 型心電図を認め、特に男性に有意に好発した。また 9 例中、検査前から右室流出路の血流低下（虚血）を認めなかった 4 例に致死的心室性不整脈が出現した。

男性に高率に認めたことは I_{to} の性差が影響していると考えられ、また右室流出路の虚血に対する preconditioning の有無がその後の心室性不整脈の出現に関係していることが示唆された。

＜緒言＞

Brugada 症候群は、12 誘導心電図 V1-3 の特徴的な ST 上昇(Brugada 型心電図)を示し、心室細動からの突然死をきたすリスクが高い疾患である。Brugada 症候群の病態、つまり J 波および ST 上昇の機序は再分極および脱分極異常説が提唱されている。前者は動脈灌流右室心筋切片を用いた Brugada 症候群モデルより右室流出路領域における心内膜細胞と心外膜細胞の活動電位波形が異なることが関与し、心内膜細胞と心外膜細胞の活動電位の勾配が起因しており、後者は右室流出路における心内膜細胞と心外膜細胞の活動電位波形の差異ではなく、右室流出路における伝導遅延のみが起因していると結論づけている。

一方、このような Brugada 型 ST 上昇はイヌの実験モデルにおいて右室流出路の急性虚血によっても認めることが報告されており、同部位の心内膜と心外膜活動電位の不均一性が原因と考えられている。臨床的には症例報告のみであり、Brugada 型心電図と致死的心室性不整脈の出現との関連性については明らかとされていない。

＜方法＞

当院で 2006 年から 2016 年の 10 年間において、心臓カテーテル検査中に右室流出路の急性虚血をきたした 13 症例について後ろ向きに検討した。右室流出路の急性虚血は同部位を灌流して

いる円錐枝もしくは右室枝の新規の狭窄・閉塞と定義した。対象例を Brugada 型心電図変化の有無で 2 群に分け、臨床背景や心電図および冠動脈所見について比較し、さらに、右室流出路の心筋虚血に伴い出現した心室頻拍・心室細動の誘因について検討した。なお、検査前には Brugada 型心電図を示した既往のある例は除外した。

＜結果＞

13 症例中 9 症例において、右室流出路の心筋虚血により Brugada 型心電図をきたし（Br 陽性群）、残り 4 例は心電図変化を示さなかった（Br 陰性群）。虚血原因としては、円錐枝もしくは右室枝の冠攣縮やカテーテルの直接挿入による閉塞、同部位を含む病変への冠動脈血行再建であった。Br 陽性群は Br 陰性群に比較し、有意に男性に好発し(100% vs. 25%, P<0.01)、T 波の頂点から基線までの時間($T_{p\text{-}e}$)が延長していた。両群において、その他の臨床背景や心電図、冠動脈所見には有意な差は認めなかった。心筋虚血中に心室頻拍(1 症例)・心室細動(3 症例)をきたした症例は全て Br 陽性群であり、Br 陰性群では心室性不整脈は認めなかった。また、心室頻拍・心室細動を示した 4 例全例において検査前から右室流出路の血流低下（虚血）を認めなかった。一方、同不整脈を示さなかった例では、検査前より、右室流出路の虚血の原因となる器質的冠動脈病変を高率に認めた（0% vs. 80%, P=0.03)。

＜考察＞

Brugada 症候群における特徴的な ST 上昇の病態として、再分極異常と脱分極異常が唱えられている。再分極異常説は、細胞生理学的には、右室流出路領域における心内膜細胞と心外膜細胞の活動電位の勾配に起因すると考えられており、心内膜細胞と心外膜細胞の活動電位波形が異なることが関与している。つまり、心外膜細胞では、最初のスパイクの後に一過性外向き K＋電流（Ito）の増強に伴い、深いノッチが形成されるが、右室流出路の心内膜細胞では、Ito の分布が少ないため、ノッチは認めない。そのため、活動電位の初期相において心外膜細胞と心内膜細胞の間に貫壁性の電位勾配が生じ、心電図上の J 波形が形成される。心外膜細胞において、Na 電流（INa）や L 型 Ca 電流（Ica-L）などの内向き電流の減弱や Ito を含む外向き電流の増強により、心外膜細胞の活動電位におけるノッチはさらに増強し、貫壁性の電位勾配が一層強くなり、ST 上昇は著明となる。さらに、心外膜細胞と心内膜細胞間の貫壁性の再分極時間や近接する心外膜細胞領域における再分極時間の不均一性をきたし、最終的に第 2 相リエントリー（Phase 2 reentry）が生じ、心室細動に移行すると考えられている。

一方、心筋虚血は I_{Na} や I_{CaL} を抑制し、外向き電流である $I_{K\text{-}ATP}$ を促進することが知られており、再分極異常の観点からすると、このようなイオンチャネルの働きにより心外膜活動電位のノッチ形成・活動時間短縮に影響し、ST 異常や phase 2 reentry を引き起こすと考えられる。それに加え、心外膜に多数の I_{to} が存在すると、このような心電図変化がより起こりやすくなる。男性では特に I_{to} 発現が多いことから、本研究での心電図変化の性差との関連が示唆される。また、$T_{p\text{-}e}$ は心室筋の再分極の不均一性を示しており、Brugada 型心電図変化を示した群では虚血に至る前から $T_{p\text{-}e}$ が長いことから、これらも既存の I_{to} 発現の差に関与すると考えられる。

脱分極異常説は、Brugada 症候群では右室流出路の伝導遅延があり、これが ST 上昇や心室細

動を引き起こす要因となっている。これについては、臨床的に Brugada 症候群の右室流出路の心外膜に記録された異常電位部位を高周波で通電することにより、ST 変化の改善や心室細動を抑制できたとの報告もある。心筋虚血は、上述の通り I_{Na} や I_{CaL} の抑制や $I_{K\text{-}ATP}$ の促進することで同部位の伝導遅延を引き起こし、Brugada 症候群と同様な ST 異常や心室細動のトリガーとなる機序が起こりやすいと考える。

Brugada 型心電図を呈しても、すべてが心室頻拍・心室細動を引き起こすわけではなく、本研究では、右室流出路灌流枝への器質的病変の有無が要因となっているが明らかとされた。つまり、右室流出路の虚血に対する preconditioning が不整脈の出現に関係しており、動物実験で示されているごとく、preconditioning 自体が心外膜の第一相の活動電位を低下させ、phase 2 reentry の抑制につながるものと考えられた。

＜結論＞

右室流出路の急性虚血により Brugada 型心電図をきたしやすく、心室細動出現に関与した。Brugada 型心電図は男性に好発し、虚血の preconditioning の有無が心室細動出現の要因と考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5199　号	中村　玲奈
論文審査担当者	主　査　古川　哲史 副　査　荒井　裕国、吉田　雅幸	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

ブルガダ症候群は、右側胸部誘導（V1～V3）の ST 上昇とこれに心室頻拍/心室細動を合併する突然死症候群である。一般的には、心筋イオンチャネルの遺伝子異常で起こるとされているが、右冠動脈流出路の虚血でもブルガダ様心電図を呈し、心室頻拍/心室細動を呈することが症例報告として発表されている。ところが、その頻度等は分かっていない。申請者は、冠動脈造影検査中に右冠動脈流出路を還流する円錐枝あるいは右室枝からの分枝にスパスムを起こした 13 例を集め、ブルガダ様心電図の出現と心室頻拍/心室細動の発生頻度を検討し、これらの出現と関係する因子の検討を行った。13 例中の 9 例でブルガダ様心電図波形を呈し、4 例で心室頻拍/心室細動を呈した。心室頻拍/心室細動を呈したのはすべてブルガダ様心電図を呈した症例であった。ブルガダ様心電図を示し、心室頻拍/心室細動を呈さなかった 5 例では右冠動脈起始部に狭窄があることから、虚血プレコンディショニングがかかっていた可能性があり、これが心室頻拍/心室細動の発生の有無に関与した可能性が示唆された。以上から、右冠動脈流出路の虚血により高頻度(約 70%)にブルガダ様心電図が出現し、その 44%に心室頻拍/心室細動が出現することが判明した。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

右冠動脈流出路の虚血でもブルガダ様心電図、心室頻拍/心室細動を呈することは症例報告としては発表がすでにあるが、13 例を集めその発生頻度などを明らかにしたことに独創性がある。

２）社会的意義

ブルガダ症候群は、壮年期の働き盛りの男性が突然死する、社会的にインパクトの高い疾患であるが、その発生機序に関してまだ不明な点が多く残されている。心筋ナトリウムチャネル遺伝子 SCN5A に遺伝子異常が見つかることが多いが、同遺伝子変異を持つ人でもブルガダ症候群を発生するのは数割にとどまり、プラスアルファの因子があることが示唆されている。その 1 つとして右室流出路を還流する冠動脈のスパスムが示唆されることを明らかにした点で、ブルガダ症候群の発症メカニズムとその治療・予防対策に新たな展開をもたらす点で社会的意義がある。

３）研究方法・倫理観

過去に治療目的で冠動脈造影を行った患者の情報の後ろ向き回析であり、倫理的な問題はない。

一方で、研究としてはその点が limitation と考えられる。

４）考察・今後の発展性

右室流出路を還流する冠動脈のスパスムがブルガダ症候群類似の表現型を呈することは明らかとなったが、実際にブルガダ症候群発症にどの程度関与するのかがまだ明らかでないので、この点の解明が望まれる。

３．その他

特記事項なし。

４．審査結果

最終試問では、ブルガダ症候群発症との関連性、臨床的意義、今後の展開、などに関する質問を行った。すべてにおいておおむね満足のいく回答が得られた。副査の荒井教授、吉田教授との協議の上、申請者は博士（医学）授与に値する学識を有すると判定する。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	王　文茜
論文審査担当者	主査　西村　栄美 副査　前原　健寿、畑　裕
論　文　題　目	Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation

（論文内容の要旨）

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are dominantly responsible for tumor progression and chemo/radio-resistance, resulting in tumor recurrence. 5-aminolevulinic acid (ALA) is metabolized to fluorescent protoporphyrin IX (PpIX) specifically in tumor cells, and therefore clinically used as a reagent for photodynamic diagnosis (PDD) and therapy (PDT) of cancers including gliomas. However, it remains to be clarified whether this method could be effective for CSC detection. Here, using fluorescence activated cell sorting (FACS)-based analysis, we report that side population (SP)-defined C6 glioma CSCs (GSCs) displayed much less 5-ALA-derived PpIX fluorescence than non-GSCs. Among the C6 GSCs, cells with ultralow PpIX fluorescence exhibited dramatically higher tumorigenicity when transplanted into the immune-deficient mouse brain. We further demonstrated that the low PpIX accumulation in the C6 GSCs was enhanced by deferoxamine (DFO)-mediated iron chelation, but not by reserpine-mediated inhibition of PpIX-effluxing ABCG2. Finally, we found that gene expression of heme oxygenase-1 (HO-1), a heme degradation enzyme, was higher in GSCs, which was further upregulated when treated with 5-ALA. Our results provide important new insights into 5-ALA-based PDD of gliomas, particularly photodetection of GSCs by iron chelation based on their ALA-PpIX-heme metabolism.

Introduction

CSCs are known to be responsible for tumor initiation and resistance to conventional therapeutic treatments, resulting in recurrence. Thus, effective detection and elimination of CSCs are critical for complete eradication of cancers. 5-ALA-based PDD and PDT are the cutting edge technologies for detection and treatment of cancers, especially malignant gliomas. 5-ALA is a key precursor in the heme biosynthesis pathway and metabolized to an intermediate photosensitizing substance PpIX. PpIX is preferentially accumulated in tumor cells after administration of 5-ALA in comparison to their normal counterparts, which

provides the basis for 5-ALA-based PDD and PDT methods in oncology. Although 5-ALA has been used in clinical trials, its widespread applications are limited because of insufficient and heterogeneous PpIX accumulation in cancer cells. Thus, various strategies have been proposed to overcome these limitations, including enhancement of PpIX synthesis, reduction of PpIX conversion and inhibition of PpIX efflux. However, the relationship between PpIX accumulation and GSC properties and strategies to enhance PpIX accumulation in the GSCs remain unknown.

Here, we report that GSCs exhibit lower PpIX fluorescence intensity, and proposed an improved method for 5-ALA-based detection of GSCs.

Methods

GSCs and non-GSCs were isolated from the rat C6 glioma cell line. When C6 cells were stained with Hoechst 33342 dye, there exist a small number of Hoechst-effluxing cells, called side population (SP) cells and a majority of Hoechst-retaining main population (MP) cells. SP cells are defined as GSCs due to their greater tumorigenic activity, while MP cells are defined as non-GSCs. The levels of PpIX accumulation in cells treated with 5-ALA was assessed with a FACS Aria II using 488 nm laser and a 660/20 nm band-pass filter and fluorescence microscope equipped with a QD625 filter cube. The fluorescent metabolites from 5-ALA were verified in the lysates of sorted fluorescence(+) cells by high-performance liquid chromatography (HPLC) separation and fluorospectrometer (excitation at 404 nm, detection at 624 nm) analysis. The tumorigenicity of SP cells with low and high fluorescence of PpIX was assessed by intracranial tranaplantation into the striatum of NOD/SCID mice, and weekly observation by in vivo imaging system. An iron chelator deferoxamine (DFO) was used to improve 5-ALA-based PDD. Gene expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR analysis and by bioinformatic analysis using GlioVis (http://gliovis.bioinfo.cnio.es/).

Results

To assess whether FACS-based detection can evaluate PpIX accumulation, we first treated C6 cells with 5-ALA and analyzed by FACS. The percentage of fluorescence(+) cells and mean fluorescence intensity were significantly increased by 5-ALA treatment, but approximately 17.5±10.6% of cells remained at low fluorescence. When fluorescence(-) and (+) cells were sorted and analyzed by HPLC analysis, the presence of PpIX was detectable only in the fluorescence(+) cells. To compare PpIX accumulation between GSCs and non-GSCs, FACS-sorted C6 SP and MP cells were cultured for 2 days, and subjected to 5-ALA treatment and FACS analysis. When treated with 5-ALA, 68.1±12.6% of MP-derived cells were positive for PpIX fluorescence, while only 34.9±5.4% of SP-derived cells were positive, suggesting that GSCs possess less ability to accumulate PpIX than non-GSCs. Consistent with these results, fluorescence microscopic analysis verified that fluorescence(-) cells were very rare in

MP-derived cells when treated with 5-ALA. In contrast, more fluorescence(-) cells were observed in SP-derived cells, suggesting that a subset of GSCs most likely escapes from detection and resection by 5-ALA-based PDD. To further clarify whether such a subset of escaping GSCs possess tumorigenicity, we transplanted PpIX fluorescence ultralow and ultrahigh SP cells into the immune-deficient mouse brain, and found that fluorescence ultralow SP cells exhibited dramatically higher tumorigenic activity and much more rapid progression of tumors than fluorescence ultrahigh SP cells, suggesting that SP cells are heterogeneous in their tumorigenicity and that a subset of escaping GSCs possibly cause failure of resection and leading to cancer recurrence.

Next, to develop a strategy to overcome the escape of GSCs from PDD, the mechanisms of poorer PpIX accumulation in SP cells were explored. ABCG2 inhibitors reserpine showed no enhancing effect on PpIX accumulation in SP cells. Because ferrous iron is a substrate for the conversion of PpIX to heme and elimination of iron may restore PpIX accumulation by suppressing this process. Based on this hypothesis, 2-day recultured SP and MP cells were treated with 5-ALA in the presence or absence of an iron chelator DFO, and analyzed by FACS for PpIX fluorescence intensity. DFO treatment significantly increased the percentage of PpIX fluorescence(+) cells in SP treated with 5-ALA. Microscopic observation of PpIX fluorescence further confirmed that the addition of DFO distinctly decreased the frequency of cells with poor PpIX accumulation.

Finally, to find the potential cause of poor PpIX accumulation in GSCs, we focused on *HO-1* gene encoding a rate-limiting enzyme for heme degradation. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that expression of *HO-1* gene was higher when examined with 2-day recultured SP cells (compared to MP cells), which was further increased by 5-ALA treatment. By using publicly available gene expression datasets, we further found that *HO-1* gene is significantly upregulated in human GBM tissues compared with non-tumor tissues and that higher *HO-1* expression correlates with poorer prognosis in GBMs, indicating close association of HO-1 with human glioma malignancies.

Discussion

As far as we know, this is the first report to demonstrate that SP-defined GSCs have an ability to escape from 5-ALA-based PDD. This work provides an important implication for the 5-ALA-based PDD to detect GSCs present in glioma patients. For instance, it is currently not possible to surgically resect cancer cells, particularly GSCs, in the invasive front, where the presence of GSCs has been reported. We hope that further clinically oriented investigation of 5-ALA-based PDT in combination with an iron chelator will facilitate the elimination of invasive GSCs for eradication of cancer.

In addition, we propose that an iron chelator DFO contributes to the enhancement of PpIX accumulation in GSCs. DFO is the only iron chelating drug approved by the Food and Drug

Administration and has been used in clinical treatment for over a period of time with no significant side effects. Thus, we believe that this improved method could quickly be translated into clinical application.

Previous studies demonstrated that high expression of HO-1 protects tumor cells from PDT, and inhibition of its enzymatic activity could enhance the cytotoxic effects of PDT in colon adenocarcinoma and melanoma cells. Therefore, HO-1 enzyme could be also a reasonable target to enhance 5-ALA-based PDD and PDT in GSCs. Further examination with an iron chelator and HO-1 targeting in PDD and PDT could establish the novel therapeutic strategies to eradicate GSCs.

Conclusion

This study demonstrates that lower PpIX accumulation in SP-defined GSCs is most likely responsible for resisting to PDD, and proposes that an iron chelator DFO may well be used to improve 5-ALA-based PDD of SP-defined GSCs.

和文要旨

癌幹細胞は化学療法や放射線療法に抵抗性を有することから、外科手術後に残存する癌幹細胞は再発の原因となる。それ故、癌幹細胞を高効率に検出し、除去することが癌の根治にとって重要である。5-アミノレブリン酸（5-ALA）は細胞内で代謝・生成される赤色蛍光産物プロトポルフィリン IX （PpIX） が腫瘍細胞で特異的に蓄積することから、悪性脳腫瘍などの外科手術時における光線力学的診断（PDD）薬として頻用されている。しかしながら、癌幹細胞の検出における 5-ALA の有用性は十分に検討されていない。本研究は悪性神経膠腫（グリオーマ）細胞株 C6 を用いて、5-ALA 処理時の PpIX 蓄積が癌幹細胞で低いことを見出した。免疫不全マウスの脳内移植実験では、特に低い PpIX 蛍光を有する癌幹細胞が高い腫瘍形成能を有することが確認された。また、癌幹細胞における PpIX の蓄積が鉄キレート剤デフェロキサミン（DFO）の処理によって劇的に亢進することを見出し、さらに癌幹細胞では細胞内 5-ALA 代謝経路のうち PpIX からヘムへの変換後に位置するヘム分解酵素 HO-1 の遺伝子発現が高いことが明らかとなった。以上の結果は、癌幹細胞が 5-ALA による PDD を回避して外科的切除を免れていること、および鉄キレートや HO-1 阻害によってその検出が可能となることを示唆しており、5-ALA による悪性脳腫瘍の PDD 効率の向上と根治に大きく貢献するものと考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5200　号	王　文茜
論文審査担当者	主　査　西村　栄美 副　査　前原　健寿、畑　裕	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、ラット神経膠芽腫（グリオーマ）C6細胞株を用いて、そのグリオーマ幹細胞集団(SP細胞)は、5−アミノレブリン酸（５－ALA）代謝によるprotoporphyrin IX (PpIX)の蛍光による光線力学的診断（PDD）を免れることを示した。さらにPpX蛍光が低い細胞集団を免疫不全マウスへと移植すると高い腫瘍形成能を持つことが示された。さらに、５－ALAに加えて鉄のキレーターを組み合わせて使用すると、これらの細胞においてもPpIX蛍光の蓄積を認め、脳組織中で蛍光を発するグリオーマの検出効率が高まることを示した。これらの結果は、ヒトにおけるグリオーマ細胞の検出効率の向上や光線力学的療法へと繋がると考えられた。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究は、がん幹細胞の特性の解明のみならず、グリオーマの診断や治療へと繋がるものであり、その着眼点や独創性は評価に値する。

２）社会的意義

グリオーマは悪性脳腫瘍のなかでも代表的な腫瘍であるが、なかでもグリオブラストーマは悪性度が高く、浸潤性に拡大し正常な組織との境界が不鮮明なことが多く、治療に苦渋する。その手術において、５－ALA を用いて腫瘍の可視化が行なわれているが、がん幹細胞集団においてはPpIX が集積しないことが示唆された。鉄のキレーターを組み合わせて用いると PpIX からヘムへの転換を阻害されて PpIX の蓄積が高まることで、腫瘍の可視化効率が高まることが明らかになった。さらに、これらの知見は、光線力学的療法（PDT）へと応用される可能性も示唆された。以上のことから、本研究の社会的意義は大きいといえる。

３）研究方法

本研究においては、がん幹細胞研究や腫瘍の診断技術や治療に用いられる試薬を用いて、幹細胞生物学、および腫瘍生物学なアプローチがなされている。具体的には、がんラット神経膠芽腫C6 細胞に 5-ALA を投与して PpIX に由来する蛍光を FACS で検出し、Hoechst 33342 を効率よく排出する side population の細胞集団は、PpIX に由来する蛍光レベルが全体に低く、脳内への移植実験により、腫瘍形成能力が高いことを明らかにした。次に、PpIX の輸送を担う ABCG2

の阻害剤 reserpine や verapamil を用いてもシグナルが増強されることはなかったが、鉄のキレーターによって、ヘムへの転換を阻害すると顕著な PpIX の蓄積が見られた。ヘムへの転換が高まる原因として、マイクロアレイによる遺伝子発現解析結果から side population の細胞群で *HO-1* の発現が高いことを見出し、HO-1 の発現がグリオブラストーマの予後と相関することを明らかにした。本研究は腫瘍学やがん幹細胞の生物学に関する知識と技術の裏付けのもとに遂行されたものであり、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが窺える。

４）考察・今後の発展性

本研究では、グリオーマの幹細胞が、５−ALA による PDD を回避し、可視化されなくなっている可能性が示唆された。同時に、鉄のキレーターを使いて PpIX を蓄積させることで、腫瘍の可視化効率が高まることが明らかになった。以上のことから手術時の腫瘍境界領域の可視化技術の向上と、光線力学的療法（PDT）への応用へと繋がる成果であると言える。今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特になし。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	宇都宮　雅子
論文審査担当者	主査　稲瀬　直彦 副査　窪田　哲朗、安原　眞人
論　文　題　目	Optimal regimens of sulfamethoxazole-trimethoprim for chemoprophylaxis of *Pneumocystis* pneumonia in patients with systemic rheumatic diseases: results from a non-blinded, randomized controlled trial

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

背景：スルファメトキサゾール・トリメトプリム（SMX/TMP）は、全身性リウマチ疾患の治療におけるニューモシスチス肺炎（PJP）予防の標準薬である。我々は同薬の有効かつ中断率の低い投与方法・投与量を検討するべく、52 週間にわたる非盲検ランダム化比較試験を実施した。

方法：全身性リウマチ性疾患に対してプレドニゾロン（PSL）換算 0.6mg/kg/日以上を開始した成人患者を、通常量 single strength 群（SS、SMX/TMP 400/80mg/日）、半量 half strength 群（HS、200/40mg/日）、および漸増群（ES、40/8mg/日で開始、200/40mg/日まで段階的に漸増）に無作為割付した。主要エンドポイントは、24 週目の PJP の非発生率とし、24 週までのデータを解析した。

結果：上記 3 群に 1：1：1 の割合で無作為に割り付けられた 183 例のうち、SS58 例、HS59 例、ES55 例が SMX/TMP を開始した。24 週まで PJP は発症しなかったが、exact confidence interval を用いた post-hoc 解析にて 200/40 mg で開始または同量まで漸増した患者群（HS＋ES）の 24 週までの PJP の推定非発症率は 96.8-100%であった。全薬剤中止率は HS で SS と比較し有意に低かった（p=0.007）。有害事象による中止率は SS と比較し HS（p=0.006）および ES（p=0.004）で有意に低かった。SMX/TMP の減量を要した有害事象（p=0.009）および今回特に注目した有害事象（p=0.003）において 3 群間で有意差を認め、SS 群が他の 2 群よりも高かった。

結論：PJP の発生例は認めなかったが、通常量の半量を内服する HS 群と ES 群を合わせた PJP の非発生率は十分に高く、両群とも SS と比較し安全性に優れていた。実現可能性および薬物中止率の観点から、全身性リウマチ疾患の患者における PJP の予防において通常量の半量が最適である可能性が示唆された。

＜諸言＞

ニューモシスチス肺炎（PJP あるいは PCP）は、*Pneumocystis jirovecii* による日和見感染症であり、時に重篤化し死亡に至る。リウマチ性疾患全体の PJP の発生率は約 2%と報告され、そのリスクは中等度から高用量の副腎皮質ステロイド剤と併用する免疫抑制薬の使用、併存疾患に

よってさらに増加する。日本での PJP の発生率は米国と比較して高く、HIV 陰性患者では HIV 陽性患者に比べ PJP の発症がより急かつ死亡率が高いことも報告されている。

PJP に対する最も一般的かつ効果的な予防法は低用量スルファメトキサゾール・トリメトプリム（SMX/TMP）の経口投与であるが、高い有効性にもかかわらず、様々な有害事象（AE）により同薬を中止せざるを得ないことも多い。リウマチ性疾患患者は長期間に渡り免疫抑制療法を必要とするため、継続率が高くかつ有効な予防内服法が強く望まれる。

竹中らは、連日 SMX/TMP400mg/80mg 内服および同量まで漸増する投与法の有効性および安全性を後ろ向きに比較し、PJP に対する予防効果に有意差がなく、漸増法の継続率が従来の投与法より良好であることを示した。しかし、HIV 陰性患者における PJP 予防の最適な用量用法は未だ定まっていない。

我々は、用量漸増を伴う 200mg/40mg の SMX/TMP（漸増群 ES）が連日 400mg/80mg（通常量群 SS）よりも良好な薬剤継続率を有し、結果、良好な予防率を有すると仮説を立てた。漸増法の煩雑さを考慮して、連日 200mg/40mg 群（半量群 HS）も設定し、PSL 換算 0.6mg/kg/日以上の副腎皮質ステロイド剤を開始する全身性リウマチ性疾患患者 183 人を対象に、上記 3 レジメンの有効性、安全性および治療中止率を比較する非盲検ランダム化比較試験（RCT）を 52 週間実施した。24 週までの結果を報告する。

＜方法＞

患者

この研究は日本の 5 大学病院と 10 市中病院で実施された。組み入れ基準は 1）20 歳以上、2）新規発症または再発性の全身性リウマチ性疾患の治療目的で入院中の患者 3）書面によるインフォームド・コンセントが得られること、4）免疫抑制薬併用の有無とは無関係に 0.6mg/kg/日以上の経口 PSL または同等の副腎皮質ステロイド剤を開始すること、5）SMX/TMP、ペンタミジン、ダプソンの投与歴がないこと、6）血清クレアチニン値が施設の正常範囲内であること。除外基準は 1）同意の撤回、2）SMX/TMP の禁忌があること、3）生物学的薬剤の使用、4）PJP の既往、5）コントロール困難な合併症を有すること、6）体重 40kg 未満、7）妊娠中または授乳中の女性、8）24 週間以内に妊娠を計画していること、9）PSL の開始から 10 日以内に SMX/TMP を開始できないこと、とした。

研究デザイン

ブロック化ランダム法を使用し、コンピュータベースで SS 群、HS 群、および ES 群へ 1 : 1 : 1 の比率で動的に中央割り付けが行われた。SS 患者は通常量（400mg/80mg）で同剤を開始し 24 週間同用量を継続、HS 患者は通常量の半量（200mg/40mg）で開始し 24 週間同用量を継続、ES 患者は通常量の 10%（40mg/8mg）で開始、200mg/40mg まで毎週 10%ずつ増量、24 週まで継続した。24 週まで継続例の 24 週以降、および 24 週未満での中止例の中止以降の予防投与は主治医の裁量で行われた。観察期間は患者が除外基準に抵触しない限り 52 週までとした。この研究は、東京医科歯科大学病院および各参加機関の倫理委員会の承認を得た。

エンドポイント

主要エンドポイントは、第 24 週の PJP の非罹患率（予防率）とした。副次的エンドポイント

は、52 週目の PJP 非罹患率、治療中止率、AE とした。

統計分析

この試験の患者の full analysis set: FAS は、本試験に登録され、組み入れ基準を満たし、除外基準を満たさず、少なくとも 1 回の SMX/TMP 投与を受け、薬剤開始後少なくとも 1 回のフォローアップがされた患者を対象とした。有効性、安全性、および治療中止率の分析には FAS を用い、有効性については intention-to-treat 解析を実施した。

ES の薬剤中止率がより低く、非発症率がより高くなると仮定し、SS の PJP 非発症率を 93%、ES の発症率を 98%とした。非劣性限界 5%、片側 α 0.05、β 0.20、無作為化後に FAS 基準を満たさないことが判明した患者（FAS 除外患者）の割合を 5%と仮定し、必要症例数は各群 55 例、合計 165 例と計算された。試験開始後 FAS 除外患者が 5%以上であったため、FAS 除外率を 10%に修正し、各群 58 人、計 174 人に変更した。

統計解析には SPSS（ver.20）を使用した。SS と ES との差の 95%信頼区間の下限が-5%よりも大きい場合、非劣性が証明されると解釈した。Kaplan-Meier 法と Log-rank 検定で非発生率と薬剤中止率を、Fisher の正確確率で有害事象の発生率を分析した。

＜結果＞

患者の内訳

183 人の患者を SS（n=62）、HS（n=61）、ES（n=60）に無作為に割り付けた。 SS の 4 例、HS の 2 例、ES の 5 例は FAS 除外患者に該当し、SS 患者 58 人、HS 患者 59 人、ES 患者 55 人が SMX/TMP を開始した。 SS の 2 人、HS の 2 人、ES の 3 人は、別の病院への転院または死亡のために 24 週までに研究を中止した。SS の 24 人、HS の 11 人、ES の 14 人は、AE、処方間違い、医師の裁量により 24 週までに SMX/TMP を中止または減量した。

患者のベースライン

平均年齢は各群で約 60 歳であった。基礎疾患の罹患期間中央値は 2～4 ヶ月であった。間質性肺疾患を有する患者の割合は 3 群でほぼ差がなかった。登録前の副腎皮質ステロイド剤使用率（13.3-15.5%）および SMX/TMP 開始時の PSL 開始（増量）量（0.94-0.97mg/kg/日）は、3 群でほぼ同じであった。第 24 週の PSL の投与量は、各群とも約 10mg/日であった。

有効性および薬物中止率

24 週目まで PJP の症例は報告されなかったため、post-hoc 解析として exact confidence interval を用いて計算した SS、HS、ES の PJP 推定非発生率はそれぞれ 93.8-100%、93.9-100%、93.5-100%であった。HS および ES の患者は、各々24 週間および 19 週間に渡り 200mg/40mg の SMX/TMP を 1 日 1 回投与されているため、2 群を合わせた PJP の非発生率を計算した結果、96.8-100%（n=114）であった。

Kaplan-Meier 曲線を用いた薬剤累積中止率の分析では、SS と HS の間に有意差を認めた（p=0.007）。AE による薬剤中止率に関しては、SS と ES（p=0.004）、SS と HS（p=0.006）との間に有意差が認められた。

安全性

全 AE および重症 AE の発生率には有意差は認めなかった。SMX/TMP の減量を必要とする AE

（p=0.009）、および今回特に注目した AE（p=0.003）患者の割合は、3 群で有意に異なり、SS で他 2 群よりも高かった。

＜考察＞

本研究では、PSL0.6mg/kg/日以上を投与開始した全身性リウマチ疾患の PJP 予防投与における SMX/TMP の最適用量・用法を決定するために、SS、HS、および ES の PJP 非発生率、薬剤中止率および安全性を比較した。

PJP 発症は認めなかったが、参加施設はいずれもリウマチ専門施設で PJP 予防意識が高く、非発生率に影響を与えたと考えられる。割り付け量での SMX/TMP を継続できなかった 49 例のうち、その後予防投与を受けなかったのは 0～12 週の 6 例、12～24 週の 10 例のみであり、予防投与のないリウマチ性疾患患者の PJP の発生率は 7.5-9.0%と報告があることを考慮すると、少なくとも 24 週目までは PJP が発症しなかった理由が説明できる。

我々は exact confidence interval を用いて HS と ES を合わせた群（n=114）の PJP の非発症率を 96.8-100%と推定した。1 日 200mg/40mg の投薬量で SMX/TMP を投与された 114 人の患者における PJP の非発生率は SS 群と同様に高く、臨床的に有意な予防効果を示唆すると考えられた。

治療中止率は SS と比較して HS で有意に低かった。AE による治療中止率は、SS と比較し HS および ES において有意に低かった。これらのデータは、この HS または ES の投与法が、SS と比較して、安全性・継続率に優れていることを示唆する。ES の 3 名の被験者で処方間違いがあり、実臨床ではよりシンプルな HS が現実的であると考えられた。

この研究の限界として、第 1 に参加機関がリウマチ専門施設であることに関する施設バイアスの可能性、第 2 に、非盲検であるため検出バイアスが存在した可能性、第 3 に、主要評価項目の観察期間が 24 週と短いこと、第 4 に除外基準による選択バイアスの可能性、第 5 に報告された AE と SAE の質のばらつきを考慮する必要がある。最後に、この試験は PJP の一次予防に焦点を当てており、二次予防に関するデータとしては使用することはできない。

＜結論＞

どの群にも PJP は発症しなかったが、200mg/40mg の SMX/TMP を連日または漸増投与すると、PJP に対する臨床的に有意な予防効果があり、かつ AE による中止率は通常量よりも有意に低かった。有効性、安全性および実現可能性の観点から、全身性リウマチ疾患の患者における PJP の予防において通常量の半量が最適である可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5201　号	宇都宮　雅子
論文審査担当者	主　査　稲瀬　直彦 副　査　窪田　哲朗、安原　眞人	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は全身性リウマチ性疾患のニューモシスチス肺炎合併におけるスルファメトキサゾール・トリメトプリムの予防効果に関する非盲検ランダム化比較試験の結果を示したものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

リウマチ性疾患全体のニューモシスチス肺炎の合併予防薬としてスルファメトキサゾール・トリメトプリム（SMX/TMP）が使用されるが、最適な用量用法は定まっていない。申請者は３つの投与法に関する非盲検ランダム化比較試験を実施しており、独創的な研究と評価できる。

２）社会的意義

本研究により全身性リウマチ疾患の患者におけるニューモシスチス肺炎の予防には通常量の半量の SMX/TMP が最適である可能性が示唆され、臨床において有用な研究成果と考えられる。

３）研究方法・倫理観

通常量群、半量群、漸増群の３群に１：１：１の割合で無作為に割り付けられ、前向きに検討された価値ある研究と考えられる。また、本研究は東京医科歯科大学病院および各参加機関の倫理委員会の承認を得ている。

４）考察・今後の発展性

通常量の半量の SMX/TMP によりニューモシスチス肺炎が予防できることが示唆され、副作用の軽減という観点でも今後の臨床応用が期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	外山　扇雅
論文審査担当者	主査　横関　博雄 副査　東　みゆき、神奈木　真理
論　文　題　目	Human eosinophils constitutively express a unique serine protease, PRSS33

（論文内容の要旨）

<要旨>

好酸球はアレルギー性炎症反応の最も重要な細胞の一つであり、中でも気道リモデリングにおいて様々な顆粒タンパクやサイトカイン、ケモカインやプロテアーゼを産生することで重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、好酸球におけるプロテアーゼ産生に関しては不明な部分が多く残されている。そこで本研究では、好酸球特異的なプロテアーゼの産生をトランスクリプトーム解析により調べた。その結果、ヒト好酸球は、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)25 やディスインテグリンメタロプロテアーゼ(ADAM)8、ADAM10、ADAM19、セリンプロテアーゼ 33（PRSS33）を高発現していることが明らかとなった。この中でも PRSS33 は最も好酸球特異的に高発現し、局在は顆粒膜内であった。またこの発現は好酸球活性化サイトカインの刺激でも変化せず、好酸球脱顆粒時にも放出されなかったが、細胞表面の発現が増加した。ヒト線維芽細胞をリコンビナント PRSS33 で刺激をすると、PAR-2 を介し、コラーゲンやフィブロネクチン等の発現が増加した。以上のことから、好酸球の活性化により細胞表面に発現した PRSS33 が、PAR-2 を介して線維芽細胞の細胞外マトリックスたんぱく合成を誘導し、気道リモデリングに関与する可能性が示唆された。

<諸言>

喘息はウィルス感染や抗原の曝露などによる 2 型炎症の増悪を繰り返すことが特徴のアレルギー性疾患の一つである。慢性 2 型炎症の再発は気道リモデリングと呼ばれる杯細胞の過形成や基底膜の肥厚、平滑筋の肥大や過形成、組織線維化など肺における構造の変化が誘導される。この気道リモデリングはステロイド非感受性で、肺の機能の低下を引き起こすことから、気道リモデリングを予防することが喘息患者の QOL を向上させる重要なポイントである。

好酸球は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)やトランスフォーミング増殖因子(TGF)-β1、アンフィレグリンを産生、放出することで喘息の病態形成、中でも気道リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。

プロテアーゼも PAR-2 の活性化を介して気道平滑筋の増殖に関与していることが知られており、MMP9 や MMP17 は好酸球から産生されることが報告されている。近年、anti-IL-5 および

anti-IL-5R モノクローナル抗体を使用し、好酸球をターゲットにした喘息治療が行われるなど、好酸球が産生するプロテアーゼについて、より詳しく解析することが望まれている。

そこで本研究では、ヒト好酸球におけるすべてのプロテアーゼの発現プロファイルをトランスクリプトーム解析により調べた。

<方法>

ヒト好酸球およびその他の細胞は末梢血から免疫磁気ビーズを用いて分離した。好酸球が発現および放出するプロテアーゼの評価は、好酸球を活性化サイトカインおよび脱顆粒促進物質にて刺激する前後にマイクロアレイおよび qPCR、ELISA、フローサイトメトリー、免疫染色にて行った。また、バキュロウィルスシステムにて作成したヒトリコンビナント PRSS33 を用いてヒト健常線維芽細胞を刺激した後、細胞外マトリックスタンパクの mRNA を qPCR にて測定した。

<結果>

マイクロアレイ解析の結果、ヒト好酸球は MMP25 および ADAM8、ADAM10、ADAM19、PRSS33 を高発現していた。なかでも PRSS33 が最も好酸球に高発現しており、これは qPCR および ELISA でも再現が取れた。PRSS33 タンパクは培養上清中にも放出されず、PRSS33 mRNA も好酸球が活性化した際に発現量は変化しなかったが、細胞表面上の発現は増加した。また、蛍光免疫染色により、PRSS33 の局在は好酸球顆粒タンパクである ECP と共局在することから、その局在は好酸球顆粒膜内であることが明らかとなった。バキュロウィルスにて作成したリコンビナント PRSS33 を用いてヒト健常線維芽細胞を 24 時間刺激後の遺伝子発現を測定したところ、コラーゲンやフィブロネクチン、ベルシカン等炎症性細胞外マトリックスタンパクの mRNA の発現が増加し、これらはプロテアーゼ阻害剤および PAR-2 アンタゴニストによって阻害された。

<考察>

ヒト好酸球特異的なプロテアーゼは喘息における気道リモデリングの治療標的となり得る為、今回本実験では血球細胞の mRNA 発現プロファイルを網羅的に調べた。その結果、MMP25 や ADAM8、ADAM10、ADAM19、PRSS33 が好酸球に高発現していることが明らかとなった。

MMP25 は喘息患者の喀痰中に発現誘導されることが知られているが、今回の結果から、好中球にも高発現しており、好酸球特異的ではなかった。

ADAM8 もまた喘息モデルにおいて 2 型炎症や気道過敏性を誘導することが知られているが、ADAM8 もまた好酸球以外の血球細胞にも高発現しており、好酸球特異的ではなかった。

ADMA10 はアルツハイマー病の発症や喘息モデルにおいて重要な役割を果たしていることが知られているが、これもまた好酸球以外の血球細胞にも高発現しており、好酸球特異的ではなかった。

ADAM19 は慢性肺疾患に関与する報告があるが、今回の私たちの検討では好酸球特異的とは言えなかった。

PRSS33 はマクロファージに発現すると報告されているセリンプロテアーゼであるが、他の血球細胞と比して好酸球に 10 倍以上発現しており、好酸球特異的に発現するプロテアーゼとして

今回私たちは注目し、解析を行った。

qPCR や ELISA によってマイクロアレイ解析の結果が確認され、さらに元々報告のあったマクロファージと比して 20000 倍とはるかに好酸球の方が mRNA を高発現していた。これらの結果から、好酸球が PRSS33 の主な産生細胞だと示唆された。

好酸球活性化サイトカインにて好酸球を刺激したところ、PRSS33 の発現には変動はなく、また培養上清中にも検出されなかった。また好酸球を透過処理した後の免疫染色により、PRSS33 の局在は好酸球顆粒タンパクの一つである Eosinophilic cationic protein (ECP)と共局在した。

好酸球活性化サイトカインにて好酸球を刺激した際、細胞内 ECP の発現は減少する一方で、PRSS33 は細胞表面上の発現が増加した。以上のことから、PRSS33 は好酸球顆粒膜内に発現し、脱顆粒時に細胞表面に発現することが示唆された。

PRSS33 はこれまでその機能に関する報告が全くされていないが、哺乳類に広く保存されていることから、生体内で重要な役割を果たしていることが考えられる。NCBI BLAST により相同性分子の検索を行ったところ、マスト細胞に発現していることが知られているトリプターゼγと相同性が高いことが明らかなった。マスト細胞に発現するトリプターゼもまた PAR-2 の活性化を介して 1 型コラーゲンを産生し、線維芽細胞を活性化することが知られている。そこでヒト PRSS33 がヒト線維芽細胞に作用し、コラーゲン産生を誘導するかどうかを検討した。その結果、PRSS33 は PAR-2 の活性化を介してコラーゲン 1A1(Col1A1)や Col8A1、フィブロネクチンやベルシカンの発現を誘導した。

以上のことから、PRSS33 はヒト好酸球顆粒膜内に特異的かつ恒常的に発現し、好酸球活性化の際には細胞表面の発現は増加するが、放出はされないことが明らかとなった。また PRSS33 は線維芽細胞の PAR-2 活性化を介して 2 型炎症における気道リモデリングに関与することが示唆された。

今後は PRSS33 をノックアウトしたマウスを用いてさらに機能を明らかにしていく必要がある。

<結論>

好酸球の活性化に伴い顆粒膜内の PRSS33 が表出し、cell to cell contact により線維芽細胞に作用して細胞外マトリックスタンパクの遺伝子発現を誘導していることが明らかとなった。またこの一連の作用は PAR-2 を介しており、喘息における気道リモデリングの発症の一助を担っている可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5202　号	外山　扇雅
論文審査担当者	主　査　横関　博雄 副　査　東　みゆき、神奈木　真理	

（論文審査の要旨）

１、論文内容

好酸球はアレルギー性炎症反応にて重要な役割を果たすと考えられているが、好酸球のプロテアーゼ産生機序と喘息の気道リモデリングにおける役割に関しては明らかになっていない。

申請者は、好酸球特異的なプロテアーゼの産生に関してトランスクリプトーム解析を用いて検討した。その結果、ヒト好酸球は、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)25 やディスインテグリンメタロプロテアーゼ(ADAM)8、ADAM10、ADAM19、セリンプロテアーゼ 33（PRSS33）を強く発現することが明らかになった。特に PRSS33 は最も強く好酸球特異的に発現し、顆粒膜内で局在した。またこの発現は好酸球活性化サイトカインの刺激でも変化せず、好酸球脱顆粒時にも放出されなかったが、細胞表面の発現が増加した。ヒト線維芽細胞をリコンビナント PRSS33 で刺激をすると、PAR-2 を介し、コラーゲンやフィブロネクチン等の発現が増加した。以上のことから、好酸球の活性化により細胞表面に発現した PRSS33 が、PAR-2 を介して線維芽細胞の細胞外マトリックスたんぱく合成を誘導し、気道リモデリングに関与する可能性が示唆された。

２、論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者は、好酸球特異的なプロテアーゼの産生に関して解析して PRSS33 が、線維芽細胞の細胞外マトリックスたんぱく合成を誘導し、気道リモデリングに関与することを明らかにした点は独創的で評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は

１．好酸球の活性化により細胞表面に発現した PRSS33 が、PAR-2 を介して線維芽細胞の細胞外マトリックスたんぱく合成を誘導し、気道リモデリングに関与する可能性が示唆いた点で優れた研究である。PRSS33 をターゲットとした喘息の治療法が期待できる。

２．好酸球が特異的に PRSS33 を発現することを明らかにした点は有意義で今後、好酸球のマーカーとして臨床的に使用できる点で優れている。

３）研究方法・倫理観

研究には血液から好酸球を分離しトランスクリプトーム解析をしてPRSS33が特異的に発現すること分泌形態の解析とその役割に関して線維芽培養細胞を用いて解析している。本手法は

十分な生理学的および解剖学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

３、審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	片桐　健太
論文審査担当者	主査　田賀　哲也 副査　淺原　弘嗣、上阪 等
論　文　題　目	Fibrous Synovium Releases Higher Numbers of Mesenchymal Stem Cells Than Adipose Synovium in a Suspended Synovium Culture Model

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

変形性膝関節症、前十字靭帯損傷、半月板損傷患者の関節液中には滑膜間葉系幹細胞と類似する間葉系幹細胞が、正常膝よりも多い。また滑膜組織を自己関節液で組織培養すると、間葉系幹細胞を増殖させることが可能である。これらは、関節内組織損傷時に滑膜から関節液中に滑膜由来間葉系幹細胞が動員されることを示唆するが、滑膜から関節液中に間葉系幹細胞が動員される現象は証明されていない。また間葉系幹細胞の関節液中への動員に線維性滑膜と脂肪性滑膜で違いがある可能性がある。本研究では膝関節内を模倣したモデルを作成し解析を行った。

34 人の変形性膝関節症患者の全人工膝関節置換術後に得られる滑膜を利用した。①浮遊滑膜モデルの作成：滅菌ボトル内に培養用ディッシュを置き、培養液で満たし約 1g の滑膜をディッシュに接触しないように浮遊させ、7 日間培養器内で維持し、ディッシュ内の細胞を解析した。②2 種の滑膜の比較：膝蓋上嚢滑膜(線維性滑膜)と膝蓋下脂肪体(脂肪性滑膜)を浮遊させ、7 日後に比較した。

①28 人の滑膜組織を用いて解析を試みて、すべての滑膜から、紡錘形の細胞から構成される多数のコロニーをボトル内のディッシュ上に認めた。このコロニー形成細胞は CD44(+)73(+)90(+)105(+)であり、軟骨・骨・脂肪分化能を有した。②6 人のドナーすべてで、膝蓋上嚢滑膜(線維性滑膜)は、膝蓋下脂肪体(脂肪性滑膜)よりも、多くのコロニーを形成した($p<0.05$ by Wilcoxon signed rank test)。

浮遊滑膜モデルにより、滑膜から関節液中に間葉系幹細胞が直接動員される可能性を初めて示した。このモデルでは、線維性滑膜は脂肪性滑膜よりも多くの間葉系幹細胞を動員することが示された。

＜緒言＞

間葉系幹細胞はコロニー形成能を有し、軟骨、脂肪、骨分化を有することが知られており、外傷や病気で失われた組織の修復に関与し、組織の恒常性に寄与している。また、間葉系幹細胞は関節外組織である骨髄や、関節内組織である滑膜の両方から採取することができる。

最近の研究では、正常膝関節液には間葉系幹細胞はほとんど存在しないが、前十字靭帯損傷、

半月板損傷などの外傷や変形性関節症の進行ともに、関節液内の間葉系幹細胞が増加することが知られている。これらの患者では、細胞形態や遺伝子情報から、間葉系幹細胞の由来は骨髄より滑膜であるということが推測されている。外傷や炎症などにより、滑膜からの間葉系幹細胞の動員が促進されると考えられるが、滑膜から直接関節液に間葉系幹細胞の動員がされることの証明はなされていない。

滑膜は関節内に存在する薄い層状の組織であり、通常は滑膜下組織の違いで、特徴付けられる。変形性膝関節症膝では、膝蓋上嚢の滑膜下組織は主に線維性組織で構成されており、膝蓋下脂肪体の滑膜下組織は主に脂肪組織で構成されている。

この研究の第一の目的は、滑膜から培養液を通して直接接していないディッシュ上に間葉系幹細胞が動員されることを確認できる、浮遊滑膜モデルを作成することであり、第二に線維性滑膜と脂肪性滑膜のどちらが多くの間葉系幹細胞を動員するかを調べることである。

＜方法＞

変形性膝関節症に対する全人工膝関節置換術を行った 34 名から滑膜を採取した。外傷性の変形性膝関節症や感染や再置換術などは除外した。採取した滑膜を約 1g の大きさにし、PBS でよく洗浄したのち、ナイロン糸で滑膜を縫合。100ml の滅菌ボトル内に 35mm 培養ディッシュを入れ、40ml の培養液（αMEM（10%FBS、1%ペニシリン・ストレプトマイシン含有））を満たし、ナイロン糸で滑膜を培養液内にディッシュに接しないように吊るすことにより滑膜浮遊モデルを作成。37 度で 7 日間培養後、ディッシュを取り出し、Crystal violet 染色によりコロニーの形成を調べた。表面抗原や多分化能の確認のため、2 週間培養後細胞を取り出し、継代し使用した。線維性滑膜と脂肪性滑膜の比較では、同条件で両者を浮遊、7 日間培養し、形成されたコロニーの数を比較した。

＜結果＞

浮遊滑膜モデルにおいて、28 人から得た滑膜の全てでコロニーの形成が認められた。表面抗原は CD44,73,90,105 で陽性、CD34,45 で陰性であり、軟骨分化、脂肪分化、骨分化が認められ、間葉系幹細胞の特徴と一致した。

膝蓋上嚢から得られた滑膜と、膝蓋下脂肪体から得た滑膜は形態的に異なっていた。肉眼的には膝蓋上嚢滑膜は白色であり、膝蓋下脂肪体滑膜は黄色であった。組織学的には膝蓋上嚢滑膜は主に Masson’s trichrome 染色で染まる線維で構成されており、脂肪性滑膜は主に脂肪で構成されていた。滑膜浮遊モデルにおいて、コロニー形成数は脂肪性滑膜と比較し、線維性滑膜で優位に多かった。

＜考察＞

この実験での最も重要な発見は浮遊滑膜が培養液を介して接触していないディッシュに間葉系幹細胞を動員していることを証明できたことである。浮遊滑膜モデルを作成し、中におかれたディッシュ上にコロニーの形成がみられ、その細胞は間葉系幹細胞の特徴と一致した。

我々は以前、培養ディッシュに直接滑膜を留置し培養することで、滑膜周囲から間葉系幹細胞

が動員されていくことを報告したが、滑膜とディッシュが接触しているため、滑膜が関節液中に直接滑膜幹細胞を動員することの証明にはならなかった。それゆえ、今回の滑膜浮遊モデルにより、滑膜から直接間葉系幹細胞が培養液に動員されることが証明された。

浮遊滑膜モデルにより、生理条件下で滑膜が関節液中に間葉系幹細胞を動員する可能性が示された。滑膜組織は間葉系幹細胞を貯蔵し、関節内組織の損傷により動員され、修復に寄与する可能性がある。間葉系幹細胞を関節内に投与することにより、ウサギの軟骨、ラット、ウサギ、ブタの半月板の修復が促進したことを報告し、ラットにおいて、変形性関節症の進行を抑えたことも報告した。これらのことは、間葉系幹細胞が関節内組織の修復に寄与することを示すが、実際には修復には十分な量がないと考えられる。

間葉系幹細胞が外傷を受けた膝の中でどのように修復を促すかに関して、損傷初期と後期の 2 つのメカニズムが考えられる。初期には、前十字靭帯損傷、軟骨損傷、半月板損傷時に周囲の組織からの出血が起こり、サイトカインやケモカインの産生を促進し、間葉系幹細胞の動員が起こると考えられる。その後、軟骨変性が起こると、機械的刺激が常に関節にかかり、軟骨損傷が起こり、間葉系幹細胞が動員されると考えられる。これらのメカニズムはまだ不明なことが多く、浮遊滑膜モデルが解明に役立つ可能性がある。

現在、臨床では軟骨や半月板再生に対して、滑膜から得た間葉系幹細胞の移植を行っている。ただ、移植用の間葉系幹細胞の準備には労力が必要であり、もしあるサイトカインや薬剤により、間葉系幹細胞を関節内に動員できるのであれば、細胞移植にとってかわる可能性がある。今回の滑膜遊走モデルを縮小化することにより、サイトカインや薬剤のスクリーニングに有用になると考える。

この研究における 2 番目の目的は線維性滑膜と脂肪性滑膜のどちらが滑膜浮遊モデルにおいて、多くの間葉系幹細胞を動員するかということである。我々は以前、線維性滑膜と脂肪性滑膜の比較で組織の質量に対する有核細胞の数が線維性滑膜の方が多かったという結果を報告しており、線維性滑膜の方がより多くの間葉系幹細胞を動員すると考えた。正常膝では、膝蓋上嚢の滑膜下組織は疎性結合組織であるが、変形性膝関節症になると、滑膜は厚くなり、滑膜下組織は線維化が始まる。今回の研究では、膝蓋上嚢滑膜下組織は、Masson's trichrome 染色で青く染まる線維性組織で主に構成されていた。一方、膝蓋下脂肪体の滑膜下組織は主に脂肪で構成されていた。このことより、変形性膝関節症の膝では、膝蓋上嚢の滑膜を線維性滑膜、膝蓋下脂肪体の滑膜を脂肪性滑膜とした。滑膜浮遊モデルにおいて、線維性滑膜は脂肪性滑膜より多くの間葉系幹細胞を動員することが証明された。線維性滑膜は臨床治療において、以下の 3 つの点で有用と考える。①軟骨・半月板再生における、コラゲナーゼ処理した間葉系幹細胞の供給源として、②ラスピングにより、関節液に間葉系幹細胞を動員する点、③滑膜を移植することにより、縫合後の半月板の治癒を促進する点。

＜限界＞

この研究には 3 つの限界が存在する。1 つ目は、全人工膝関節置換術を受ける変形性膝関節症の高齢者のみを対象としていることである。屍体を使用すれば正常膝との比較が可能であるが、日本においては不可能である。2 つ目は、培養液の成分が関節液と一致していないことがあげら

れる。40ml の関節液をそれぞれの対象から得るのは不可能であり、また関節液中には細胞が含まれているため、標準化するのが難しいと考える。3 つ目に、実際の膝の環境と浮遊滑膜モデルでは異なることがあげられる。そのため、線維性滑膜が関節内の間葉系幹細胞の主要な供給源であるということは、今回の研究から推測されることである。

＜結論＞

浮遊滑膜モデルを作成し、滑膜から関節液中に間葉系幹細胞が直接動員される可能性を初めて示した。このモデルでは、線維性滑膜は脂肪性滑膜よりも多くの間葉系幹細胞を動員することが示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5203　号	片桐 健太
論文審査担当者	主　査　　田賀　哲也 副　査　　淺原　弘嗣、上阪 等	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は浮遊滑膜培養系を用いて、線維性滑膜と脂肪性滑膜中の間葉系幹細胞の培養液への動員を比較し、線維性滑膜がより多くの間葉系幹細胞を動員させることを報告するとともに、その臨床的意義を論じたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

軟骨あるいは半月板再生において間葉系幹細胞が修復に寄与することから、その動員について明らかにするべくユニークな比較検討を行い新たに興味深い知見を得た点で、研究目的の先駆性と独創性はいずれにおいても高い。

２）社会的意義

モデル培養系を用いて線維性滑膜からの間葉系幹細胞の動員が多いという発見および、そもそもモデル培養系で間葉系幹細胞の動員を定量するという点において、今後、間葉系幹細胞動員増加薬開発が期待され、社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

研究サンプルを適切に用いた手法により一連の研究を進めており、また、倫理的な考察もなされている。

４）考察・今後の発展性

本研究は今後の臨床応用に向けて開発的研究へ展開する可能性を示唆するものであり、今後の発展が期待される。

３．審査結果

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Sarkar Aradhan
論文審査担当者	主査　田中　真二 副査　仁科　博史、三木　義男
論　文　題　目	Domain analysis of Ras-association domain family member 6 upon interaction with MDM2

（論文内容の要旨）

Summary

Tumor suppressor RASSF6 has a Ras-association domain (RA) and a coiled-coil structure named Salvador/RASSF/Hippo domain (SARAH). RASSF6 antagonizes MDM2, stabilizes p53, and induces apoptosis and cell cycle arrest. We previously demonstrated the interaction between RASSF6 and MDM2, but did not determine how both proteins interact with each other. We have shown here that N-terminal, RA, and SARAH domains of RASSF6 interact with MDM2 at distinct regions. RA binds to the RING-finger region of MDM2, stabilizes p53, and induces apoptosis and senescence, while SARAH interacts with RA and blocks the binding of RA to MDM2. In the presence of an active KRas, the interaction between RA and MDM2 is recovered. In this way, the intramolecular interaction of RASSF6 is important for Ras-mediated regulation of p53.

Introduction

RASSF6 is a member of Ras-association domain family. RASSF6 harbors a Ras-association (RA) domain, a Salvador/RASSF/Hippo (SARAH) domain, and a PDZ-binding motif. RASSF6 expression is suppressed by CpG island methylation in acute and chronic lymphocytic leukemia, neuroblastoma, malignant melanoma, and gastric cancer. The low expression of RASSF6 correlates with disease progression in gastric cancer and pancreatic cancer.

RASSF6 regulates apoptosis and cell cycle to play a tumor suppressor role. We previously reported that RASSF6 induces caspase-dependent and caspase-independent apoptosis. We also revealed that RASSF6 and mammalian Ste20-like kinases (MST), the components of the tumor suppressive Hippo pathway, form a complex under the basal condition and that MST kinases suppress RASSF6-induced apoptosis, whereas RASSF6 blocks MST kinase activation. When cells are exposed to stress, RASSF6 and MST kinases are dissociated, so that RASSF6-mediated apoptosis is triggered and the Hippo pathway is activated. In this way RASSF6 co-operates with the Hippo pathway.

The underlying mechanism by which RASSF6 induces apoptosis is not yet fully understood. RASSSF6 interacts with modulator of apoptosis-1 and activates Bax. RASSF6 induces the nuclear translocation of

apoptosis-inducing factor and endonuclease G. In human colon cancer HCT116 cells, ultraviolet (UV) exposure enhances p53 expression to induce apoptosis and cell-cycle arrest, while RASSF6 depletion reduces UV-induced increase of p53. The additional depletion of MDM2 or the treatment with nutlin-3, an inhibitor of MDM2, recovers p53 expression. These findings suggest that RASSF6 regulates p53 expression *via* MDM2. As a matter of fact, RASSF6 interacts with MDM2. However, the molecular determinant of the interaction between RASSF6 and MDM2 and the mechanism how RASSF6 protects p53 from MDM2-mediated degradation are still unclear. In this study, we have analyzed the details of the interaction between RASSF6 and MDM2.

Materials and Methods

- ***DNA constructions*** were conducted by conventional molecular biology techniques.
- ***Antibodies and reagents*** were obtained from commercial sources.
- ***HEK 293, HCT116, and TIG-3 cells*** were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10%(v/v) fetal bovine serum and 10 mM Hepes-NaOH pH7.4 under 5% CO_2 at 37°C. Exogenous protein expression was performed by transfection with Lipofectamine 2000 or infection with retrovirus vectors.
- ***Co-immunoprecipitation experiments*** were performed with anti-DYKDDDDK-tag beads or anti-GFP antibody pre-fixed on protein G sepharose 4 fast flow beads.

Results

Molecular determinants involved in the interaction between RASSF6 and MDM2.

We prepared various deletion constructs of RASSF6 and MDM2 and performed the co-immunoprecipitation experiments in HEK293 cells. The N-terminal region and RA domain of RASSF6 bind the middle region and C-terminal region of MDM2, respectively. The SARAH domain of RASSF6 does not bind either the N-terminal, middle, or C-terminal region of MDM2 but interacts with MDM2-N+M, suggesting that the border between the N-terminal and middle regions may be important.

The RA domain is important for the stabilization of p53

We expressed various FLAG-tagged RASSF6 deletion proteins with Myc-tagged p53 to examine which regions of RASSF6 enhance p53 expression. RASSF6-N and RASSF6-del N enhanced p53 expression but RASSF6-del RA did not. When p53 was expressed in HEK293 cells and the cells were treated with cycloheximide, p53 underwent degradation in a time-dependent manner. But the RA domain stabilized p53, even when MDM2 was co-expressed. We hypothesized that RASSF6 might inhibit the interaction between MDM2 and p53. However, in the presence of the RA domain, the interaction between p53 and MDM2 was rather strengthened. These findings support that the RA domain, which binds to the RING-finger domain of MDM2, blocks p53 degradation in the complex of p53 and MDM2.

The SARAH domain negatively regulates the RASSF6-mediated stabilization of p53

RASSF6-del C more remarkably enhanced p53 expression than the full-length of RASSF6. This finding prompted us to hypothesize that the SARAH domain functions as an auto-inhibitory region. The SARAH domain is known to form oligomers, but the SARAH domain also bound RASSF6-del C and RASSF6-RA, both of which lack the SARAH domain. More importantly, the SARAH domain inhibited the interaction of MDM2 with RASSF6, RASSF6-del C and RASSF6-RA. These findings suggest that the SARAH domain interferes with the interaction of the RA domain with MDM2, so that it attenuates the inhibitory effect of the RA domain on the MDM2.

Ras signaling recovers the interaction of the RA domain and MDM2 under the co-expression of the SARAH domain.

We examined the effect of KRas on the stabilization of p53 and on the molecular interaction. Co-expression of the SARAH domain canceled the RA domain-dependent enhancement of p53 expression. However, when active KRas was further co-expressed, p53 expression was enhanced again. We reasoned that the active KRas might release the RA domain from the inhibition by the SARAH domain. To address this question, we examined the interaction of RASSF6 with MDM2 under the co-expression of RASSF6-SARAH alone or with KRas. The SARAH domain inhibited the interaction of MDM2 with RASSF6-full and RASSF6-RA, but the active KRas recovered the interaction. Based on this finding, we further hypothesized that the active KRas might inhibit the binding of the SARAH domain to the RA domain and release the RA domain from the auto-inhibitory regulation by the SARAH domain. Contrary to our expectation, the interaction between the RA domain and SARAH domains was still observed in the presence of the active KRas. Even so, the amount of the SARAH domain co-immunoprecipitated with FLAG-MDM2 increased in the presence of the active KRas. This finding implies that upon KRas activation, the complex composed of the SARAH and RA domains is not dissociated and more tightly binds to MDM2.

The RA domain induces apoptosis and senescence and enhances p53-target genes.

We examined the effect of RASSF6-RA on apoptosis, senescence, and p53-target gene expression. RASSF6-RA induced apoptosis in HCT116 cells, whereas RASSF6-del RA did not. zVAD-FMK and p53 knockdown attenuated RASSF6-RA-induced apoptosis. RASSF6 and RASSF6-RA induced senescence in human fibroblast TIG-3 cells, and p53 knockdown blocked it. qRT-PCR data indicated that RASSF6-RA up-regulated the expression of p53-target genes such as *BTG2* and *CDKN1A*, whereas RASSF6-del RA did not. These findings support that the RA domain is important for caspase-dependent apoptosis and p53-dependent events.

Discussion and Conclusion

We have revealed the multifaceted interaction between RASSF6 and MDM2. The RA domain stabilizes

p53 to induce apoptosis and senescence. The SARAH domain interacts with the RA domain and compromises the inhibitory effect of the RA domain. Active KRas recovers the effect of the RA domain on MDM2, even though the RA domain interacts with the SARAH domain. The mechanism, by which KRas triggers the tight simultaneous binding of the RA and SARAH domains to MDM2, needs to be clarified.

日本語訳

腫瘍抑制分子 RASSF6 は分子の中央部分に Ras 結合領域を、C 末端に SARAH 領域と呼ばれる蛋白相互作用領域を持つ。RASSF6 の腫瘍抑制機能の分子機序に関して、私の所属研究室は、RASSF6 が MDM2 に結合して MDM2 よる p53 の分解を抑制し、細胞周期を止め細胞死を引き起こすことを明らかにした。しかし、RASSF6 と MDM2 がどのように相互作用するかの詳細は未解明だった。本研究で RASSF6 の N 末端が MDM2 の中央部分に、RA 領域が MDM2 の E3 リガーゼ領域に、SARAH 領域が MDM2 の N 末端と中央部分にまたがる領域に結合することを確認した。RASSF6 の RA 領域は MDM2 による p53 分解を抑制し、p53 依存的に細胞死、細胞老化を起こすことも確認した。SARAH 領域は分子内で RA 領域に結合して、RA 領域の MDM2 に対する作用を抑制するが、活性型 Ras の存在下では、SARAH 領域による抑制作用が解消され p53 分解が再び抑制されることも明らかにした。本研究を通じて、ヒトがんで発現抑制が観察され、がんの臨床予後に重要な影響を与える RASSF6 の腫瘍抑制機能の分子機序の一端が解明された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5204　号	Sarkar Aradhan
論文審査担当者	主　査　田中　真二 副　査　仁科　博史、三木　義男	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は腫瘍抑制分子 RASSF6 と MDM2 の相互作用に関する研究についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者が所属する教室では、RASSF6 が MDM2 に結合して p53 分解を抑制し、細胞死を引き起こすことを明らかにしている。本研究では、RASSF6 と MDM2 の各ドメイン（領域）相互作用について解析し、RASSF6 の RA 領域が MDM2 による p53 分解を抑制して、p53 依存的に細胞死、細胞老化を起こすことを見出した。SARAH 領域は分子内で RA 領域に結合して、RA 領域の MDM2 に対する作用を抑制するが、活性型 Ras の存在下では、SARAH 領域による抑制作用が解消され p53 分解が再び抑制されることを明らかにした。RASSF6 の腫瘍抑制機能の分子機序の一端を示しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. RASSF6 の N 末端が MDM2 の中央部分に、RA 領域が MDM2 の E3 リガーゼ領域に、SARAH 領域が MDM2 の N 末端と中央部分にまたがる領域に結合することを示した。
2. RASSF6 の RA 領域は MDM2 による p53 分解を抑制し、p53 依存的に細胞死、細胞老化を起こすことを示した。
3. RASSF6 の SARAH 領域は分子内で RA 領域に結合して、RA 領域の MDM2 に対する作用を抑制することを示した。
4. 活性型 Ras の存在下では、SARAH 領域による RA 抑制作用が解消され、p53 分解が再び抑制されることを明らかにした。

以上のように申請者は、RASSF6 と MDM2 の各領域相互作用を解析し、活性型 Ras による RASSF6 の p53 分解機構を明らかにしている。これは RASSF6 の腫瘍抑制機能の分子機序の一端を示す極めて有意義な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には十分な分子生物学的知識、技術、知見のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。また、遺伝子組み換え実験に対する本学倫理審査委員会の承認を得ており、本研究が十分な準備の上に行われてきたと考えられる（細胞接着・細胞増殖・細胞死を制御するシグナル伝達系の解析）。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によって腫瘍抑制分子 RASSF6 の RA 領域と SARAH 領域の相互作用、MDM2-p53 分解における特異的役割、活性型 Ras による RASSF6 の p53 分解機構を明らかにして、RASSF6 の腫瘍抑制機能の分子機序を考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に値する十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	中筋　貴史
論文審査担当者	主査　金井　正美 副査　石野　史敏、藤井　靖久
論　文　題　目	Complementary Critical Functions of *Zfy1* and *Zfy2* in Mouse Spermatogenesis and Reproduction

（論文内容の要旨）

<要旨>

Y 染色体は精子形成において重要な役割を担っていると考えられているが、その構造上の特殊性から、従来の相同組み換えを用いた方法ではノックアウトマウスの作製が困難であり、個々の遺伝子機能解析が十分に進んでいない。我々は近年注目されているゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 system を用いてマウス Y 染色体短腕に存在する Zfy1,2 を標的とし Zfy1-ノックアウト（KO）,Zfy2-KO,Zfy1/2-ダブルノックアウト（DKO）マウスを作製しその表現型を観察した。Zfy1-KO,Zfy2-KO マウスは妊孕性を有していたが、Zfy1/2-DKO マウスは不妊であった。Zfy1/2-DKO マウスは精子頭部、鞭毛、精子運動率、capacitation、先体反応、卵活性化、染色体の断片化など様々な異常を認めた。これらの結果から Zfy1,2 は redundant な機能を持ち Zfy1,2 が精子形成のさまざまな段階に関与することが示された。

<諸元>

Y 染色体は性決定や精子形成に重要な役割を担っていると考えられている。しかし Y 染色体は多くの繰り返し配列を持つという構造上の特殊性から従来の ES 細胞を用いた相同組み換えを利用する方法ではノックアウトマウスの作製が困難であったため、個々の遺伝子の機能解析は雌マウスや複数の遺伝子が欠損した雄マウスに Y 染色体遺伝子をトランスジーンする方法がとられてきたが、生理学的な個々の遺伝子機能は十分に解明されていない。Y 染色体に存在する ZFY は Zinc finger domain と酸性ドメインを持ち活性型の転写因子と考えられている。ZFY は 1980 年代に性決定遺伝子として報告されたがその後同じ Y 染色体上の SRY が真の性決定遺伝子であることが判明したため以後その機能はしばらくの間、不明であった。近年、マウスホモログである Zfy2 は第二減数分裂や精子の頭部、鞭毛形成に関与するという報告がなされ再び注目を集めている。しかし、いずれの報告もトランスジェニックマウスの解析でありノックアウトによって生理学的な Zfy の機能を解析した報告は存在しない。

近年、ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 system が遺伝子改変に広く使用されている。CRISPR/Cas9 system は細菌のウイルスに対する獲得免疫を応用した技術であり、簡便、安価に遺伝子改変を行うことが可能である。今回、我々はこの CRISPR/Cas9 system を用いてマウス Y 染色

体短腕上に存在する Zfy1,2 を標的とし Zfy1-ノックアウト（KO）,Zfy2-KO,Zfy1/2-ダブルノックアウト（DKO）マウスを作製しその表現型を観察した。

<方法>

Zfy1-KO,Zfy2-KO,Zfy1/2-DKO マウス作製のため、guide RNA(gRNA)の標的配列は Zfy1 と Zfy2 の共通配列であり、かつ第二メチオニンからの翻訳を防ぐ目的に第二メチオニンの下流に設計した。1 細胞期受精卵に gRNA と Cas9 mRNA を microinjection し、偽妊娠マウスに 2 細胞期受精卵を移植し、産仔の尾から genome DNA を抽出し genotyping を行った。妊孕性の確認は 3 か月齢のノックアウトマウスと 8 週齢の BDF1 雌マウスと交配を行い確認した。Zfy1,2 の発現量の解析は 1 週齢から 5 週齢 BDF1 マウスの精巣を用いて quantitative real-time PCR を行った。精巣組織は HE 染色にて解析した。精子形態は光学及び透過型電子顕微鏡検査にて解析した。精子運動性は Computer assisted sperm analysis（CASA）を用いて解析した。In vitro での妊孕性は In vitro fertilization（IVF）及び Intra cytoplasmic sperm injection(ICSI)を用いて解析した。Capacitation は精巣上体尾部から採取した精子を HTF medium で培養しチロシンのリン酸化をウエスタンブロットにて解析した。先体反応は精巣上体尾部から採取した精子を卵丘細胞卵子複合体と共培養し IZUMO の局在変化を免疫染色により解析した。染色体構造は ICSI 由来受精卵の第 1 卵割期胚をギムザ染色にて解析した。Zfy1,2 が制御する下流遺伝子の検索のため精巣 total RNA を用いてマイクロアレイを、精子たんぱく質を用いて質量分析を行った。質量分析で得られた Zfy1,2 の標的遺伝子候補に関してはウエスタンブロットにて発現量の半定量を行った。

<結果>

Microinjection の時間を改良することにより効率良く Zfy1-KO,Zfy2-KO,Zfy1/2-DKO マウスを作製することに成功した。オフターゲットに関しては標的配列から予測される 3 か所に関してシークエンスを行ったがいずれの部位にも変異は認めなかった。Zfy1-KO,Zfy2-KO,Zfy1/2-DKO マウスは正常な交尾が可能でありプラグ形成にも異常を認めなかった。Zfy1-KO,Zfy2-KO マウスは産仔を得ることができたが Zfy1/2-DKO は不妊であった。

Zfy1,2 を発現している細胞を検討するため 1 週齢から 5 週齢の BDF1 マウス精巣を用いて quantitative real-time PCR を行ったところ Zfy1,2 ともに 3 週齢から発現量の増加が観察された。これは精母細胞や精子細胞で Zfy1,2 が発現していることを示している。

Zfy1-KO,Zfy2-KO,Zfy1/2-DKO マウスの精巣、精巣上体の肉眼所見では明らかな異常を認めず、精巣重量も野生型と比べて異常を認めなかった。また精巣組織 HE 染色で精子形成を観察したが明らかな異常を認めなかった。Zfy1-KO マウスは精子形態にも異常を認めなかったものの Zfy2-KO,Zfy1/2-DKO マウスは精子の頭部の形態異常や鞭毛のミトコンドリア、axoneme,outer dense fiber に形態異常を認めた。またこの異常精子の割合は Zfy2-KO マウスに比べて Zfy1/2-DKO マウスで高い傾向にあった。精子運動性を CASA を用いて測定したところ Zfy1-KO マウス精子は異常を認めなかったものの、Zfy2-KO マウスは運動率が 70%と野生型（85.6%）に比べて低下していた。Zfy1/2-DKO マウスの精子はわずか 1%しか運動精子を認めなかった。

IVF を行ったが Zfy1/2-DKO マウス精子は受精卵を得ることができなかった。Zfy1/2-DKO マウ

ス精子の受精障害の原因として運動率の低下や形態異常が考えられたが、その他の原因を解析するため capacitation（受精能獲得）、先体反応の有無を調べた。精巣上体尾部に貯留している精子は受精能を保持しておらず雌性生殖路内で様々な生理学的変化を受ける。この変化は capacitation と呼ばれそれに引き続き先体に貯留している様々な消化酵素が放出される先体反応と呼ばれる一連の反応が起こる。Capacitation は代表的なマーカーであるチロシンのリン酸を、先体反応は卵との膜癒合タンパクである IZUMO の局在変化によって観察した。Zfy1/2-DKO マウス精子は HTF medium で培養後もチロシンのリン酸化に変化はなくまた卵丘細胞卵子複合体と共培養しても IZUMO の局在に変化を認めなかった。これらの結果から Zfy は capacitation や先体反応を制御していると考えられた。

次に Zfy1/2-DKO マウス精子を用いて ICSI を行ったところ野生型と比べて非常に低い受精率であった。前核形成前に発生が停止した胚をホールマウント染色したところ premature chromosome condensation (PCC)を認めた。これは卵の活性化が起こっていないことを示しており Zfy が卵の活性化にも関与することが示唆された。Zfy1/2-DKO マウス精子を用いて ICSI によって得られた胚を 2 細胞期に偽妊娠マウスに移植したが産仔を得ることはできず子宮に着床痕も認めなった。またこの胚を継続して培養を行ったが胚盤胞到達率は野生型と比べて有意に低下していた。この胚盤胞到達率の低下の原因検索として精子由来の染色体を調べるために ICSI によって得られた胚の第一卵割期における染色体をギムザ染色にて観察したところ Zfy1/2-DKO マウス精子由来の一部の胚では染色体の断片化が観察された。この結果から Zfy1/2-DKO マウス精子の染色体異常が胚発生障害の原因の一部となっていることが示唆された。

Zfy1,2 は活性型の転写因子と考えられているがその下流の標的遺伝子に関しては不明である。標的遺伝子検索のため BDF-1 マウスと Zfy1/2-DKO マウス精巣を用いてマイクロアレイを、精子蛋白を用いて質量分析を行った。マイクロアレイで発現の低下していた遺伝子を the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)で解析したところ生殖に関わる様々な GO term が抽出された。また興味深いことにリン酸化に関わる GO term も抽出された。質量分析の結果も同様な GO term が抽出された。質量分析において Zfy1/2-DKO マウス精子で発現が低下していたタンパク質の中で sexual reproduction と annotation がついているものは 62 個であった。この中には今回の Zfy1/2-DKO マウスの表現型の原因と考えられる PLCZ1, PRSS21,PLCD4,HTT が含まれていた。これらのたんぱく質に関してはウエスタンブロットにて Zfy1/2-DKO マウス精子タンパクで発現が低下していることを確認した。

<考察>

今回我々は CRISPR/Cas9 system を用いて効率良く Y 染色体上の遺伝子である Zfy1,2 のダブルノックアウトマウスの作製に成功した。Zfy1-KO マウスは生殖に関わる表現型を認めなかったが、Zfy2-KO マウスは妊孕性を保持しているものの精子の奇形や運動率の低下を認めた。また Zfy1/2-DKO マウスは不妊であり Zfy2-KO マウスよりも精子の奇形や運動率の低下が高度であったことから Zfy2 は Zfy1 に比べて精子形成においてより重要な役割を担っており、かつ Zfy1,2 は redundant な機能を有していると考えられた。Zfy1/2-DKO マウス精子は形態、運動率、capacitaion、先体反応、卵活性化、染色体構造など様々な異常を認めた。これらの結果は Zfy1,2 が多段階に精

子形成に関与していることを示している。今回 Zfy の標的遺伝子候補として Plcz1, Prss21, Plcd4, Htt を同定した。しかし、Zfy1,2 を認識する抗体が存在しないため、これら遺伝子の制御が直接的なものかは不明である。Zfy1,2 にエピトープタグ配列のノックインを行うことで、Zfy1,2 が直接制御する遺伝子を同定することが今後の課題である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5205　号	中筋　貴史
論文審査担当者	主　査　金井　正美 副　査　石野　史敏、藤井　靖久	

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は CRISPR/Cas9 system を用いて、マウス Y 染色上の Zfy1-, Zfy2-, Zfy1/2-ダブルノックアウトマウスを作製しその表現型を観察したものである。Zfy1-,Zfy2-KO マウスは妊孕性を有していたが、Zfy1/2-DKO マウスは不妊で、精子頭部、鞭毛、精子運動率、capacitation、先体反応、卵活性化、染色体の断片化など様々な異常を認め、Zfy1,2 が redundant な機能を持ち精子形成のさまざまな段階に関与することが示唆された。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者の研究以前に、XO-Sry gain of function の系で Zfy の機能解析が行われていたが、申請者らは、CRISPR/Cas9 system を用いて Y 染色体上の遺伝子の KO を初めて達成し、ダイレクトで先駆的な研究を行い、独創的な結果が得られた。

２）社会的意義

申請者らの研究により、男性不妊の候補遺伝子として Zfy1,2 が redundant な機能を有し、妊孕性に重要な役割を担うことが明らかとなった。ヒト男性不妊症における Zfy の役割など解明すべき課題が示され、今後更なる発展が期待できる。

３）研究方法・倫理観

Y 染色体は相同遺伝子、相同配列が非常に多く存在することから、遺伝子ターゲティング研究が遅れていたが、今回の研究は CRISPR/Cas9 という最新の技術を用いた。また、申請者は高い倫理観のもと、科学者の行動規範を遵守して研究を追行したことが伺われた。

４）考察・今後の発展性

今回の研究で得られた成果は、精子の奇形や運動率の低下など男性不妊の疾患モデルとして、臨床への応用が期待できるものである。

３．その他

申請者は産婦人科医師としての臨床経験を基板に実施、発展させた研究成果を示した。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	董　暁書
論文審査担当者	主査　稲澤　譲治 副査　横田　隆徳、田中　真二
論　文　題　目	LAPTM4B-35 is a novel prognostic factor for glioblastoma

（論文内容の要旨）

<Abstract>

Lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B)-35, a newly identified cancer-associated gene, is overexpressed in a wide variety of malignant tumors. However, studies of its expression and role in glioma have not yet been reported. This study aimed to investigate the expression and the role of LAPTM4B-35 in glioma and to assess its value as a prognostic factor. 77 glioma cases (Grade II in 18 patients, Grade III in 16 and Grade IV in 43) were immunohistochemically examined for LAPTM4B-35, p-Akt, Factor VIII and Ki-67 expressions. The LAPTM4B-35 expression score of Grade II gliomas was lower than those of Grade III and Grade IV gliomas ($p<0.05$), while the difference between Grade III and Grade IV gliomas was not statistically significant. Of the 43 patients with glioblastoma (GBM), 27 (62.8%) had high LAPTM4B-35 expression, which was associated with high tumor micro-vessel density and pAkt activation. The median progression-free survival (PFS) of GBM patients with high LAPTM4B-35 expression was 5.13 months, significantly shorter than that of those with low LAPTM4B-35 expression (12.0 months, $p<0.0001$). The median overall survival (OS) of GBM patients with high LAPTM4B-35 expression was 12.5 months, again significantly shorter than that of those with low LAPTM4B-35 expression (29.6 months, $p<0.0001$). Multivariate analysis indicated LAPTM4B-35 to be an independent prognostic factor for PFS and OS of GBM patients. Our findings show LAPTM4B-35 to be strongly associated with tumor proliferation, tumor angiogenesis and poor outcomes of GBM patients, suggesting LAPTM4B-35 to potentially be applicable as a novel prognostic marker and even to possibly play a role in improving GBM treatment.

<Introduction>

Glioma is the most common primary tumor of the central nervous system, accounting for 40~70% of all intracranial tumors. Among high grade gliomas, glioblastoma (GBM) especially accounts for 15.1% of all intracranial tumors and 46.1% of all malignant brain and CNS tumors with an incidence of approximately 3 per 100,000 adults per year and 2 per million

children, making it one of the most common and aggressive malignant primary brain tumors. Current treatment regimens that include temozolomide have significantly improved median, 2- and 5- year survivals as compared to radiotherapy alone in patients with newly diagnosed GBM. Nevertheless, GBM patients have a poor prognosis with a median survival of only 14.6 months.

Lysosomal-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B)-35, an oncoprotein that belongs to the mammalian 4-tetra-transmembrane spanning protein superfamily, was originally cloned from hepatocellular carcinomas, is located in the chromosome 8q22.1 region and contains seven exons and six introns. Previous studies have shown the activity of LAPTM4B-35 to be upregulated in a wide variety of cancers, including hepatocellular, lung, breast, ovarian and colorectal carcinomas. Overexpression of LAPTM4B-35 is also reportedly associated with cellular transformation, tumorigenesis, metastatic progression, tumor angiogenesis and PI3K/AKT pathway dependent drug resistance.

However, research on its role in gliomas and the clinicopathological significance and prognostic role of LAPTM4B-35 in glioma patients has not been reported. We aimed to investigate the expression and the role of LAPTM4B-35 in gliomas and to assess its value as a prognostic factor.

<Patients and Methods>

Primary tumor specimens (n=77, 8 astrocytomas, 8 oligodendrogliomas, 2 oligoastrocyomas, 13 anaplastic astrocytomas, 3 anaplastic oligodendrogliomas and 43 GBM) were included. Patients with GBM who underwent surgical resection during the period from 2006 through 2013 were included in this study. None of the patients received either radiotherapy or chemotherapy prior to surgery.

Immunohistochemical detection was carried out using the advanced avidin-biotin system with the VECTASTAIN Elite ABC Kit for LAPTM4B-35, p-Akt and Ki-67 staining. The CSA II system was used for the detection of Factor VIII-related antigen.

LAPTM4B-35 expression levels were determined semi-quantitatively. The percentage of immunoreactive tumor cells was scored as: 0, <10%; 1, 10-50%; 2, >50%, and the staining intensity was rated as: 0, negative or weak; 1, moderate; 2, strong. The overall score for LAPTM4B-35 expression, ranging from 0 to 4, was the sum of scores of the percentage of immunoreactive tumor cells and staining intensity. Patients were defined as showing “low expression” when the sum was 0-2, or “high expression” when the sum was 3-4.

The overall score of p-Akt was calculated by multiplying the percentage of positive cells (range, 0~100%) by the staining intensity score (1, weak; 2, moderate and 3, strong).

Tumor micro-vessel density (MVD) was determined by counting the number of blood vessels per area in sections stained with antibodies against factor VIII–related antigens.

<Results>

Expressions of LAPTM4B-35 in histological sections from patients with different glioma grades

LAPTM4B-35 expression on gliomas is associated with glioma grades. Mean LAPTM4B-35 expression scores for Grade II, Grade III and Grade IV gliomas were 1.28, 2.44 and 2.53, respectively. The LAPTM4B-35 expressions were significantly higher in both Grade III and Grade IV gliomas than that in Grade II gliomas ($p<0.05$), while the difference between Grade III and Grade IV gliomas did not reach statistical significance.

GBM patients with high LAPTM4B-35 expression had significantly poorer outcomes

Kaplan-Meier survival analysis revealed that GBM patients with high LAPTM4B-35 expression had significantly poorer outcomes. The median PFS in GBM patients with high LAPTM4B-35 expression was 5.13 months, significantly shorter than that of those with low LAPTM4B-35 expression (12.0 months, $p<0.001$). The median OS in GBM patients with high LAPTM4B-35 expression was 12.5 months, again significantly shorter than that of those with low LAPTM4B-35 expression (29.6months, $p<0.001$).

Univariate analysis revealed patient age, pre-operative KPS, extent of surgery and LAPTM4B-35 expression to be significantly associated with the survival of GBM patients. Multivariate analysis revealed LAPTM4B-35 expression to be an independent prognostic marker for both PFS and OS in GBM patients.

The proliferative activity calculated based on Ki-67 staining indices also did not differ significantly between GBM patients with low and high LAPTM4B-35 expressions (27.5 ± 11.7 and $33.3 \pm 16.3\%$, respectively, $p = 0.233$, *t*-test).

Correlations of LAPTM4B-35 expression with tumor MVD and p-Akt activation in glioblastoma patients

Factor VIII–positive tumor MVD was significantly higher in tissue sections obtained from GBM patients with high LAPTM4B expression than in those from GBM patients with low LAPTM4B-35 expression (164.04±84.85 vs 77.24±54.06 per/mm^2, p=0.001, t-test). Pearson correlation analysis confirmed a significant correlation between MVD and LAPTM4B-35 expression (r=0.481, p=0.002).

The p-Akt expression score was significantly higher in tissue sections obtained from GBM patients with high than in those from patients with low LAPTM4B-35 expression (187.13±96.86 vs 78.64±49.47, p=0.0002, *t*-test). Pearson correlation analysis showed that expression of p-Akt correlated significantly with the expression of LAPTM4B-35 (r=0.605, $p<0.0001$).

<Discussion>

We found the expression of LAPTM4B-35 in grade III and grade IV gliomas to be

significantly higher than that in grade II gliomas. Our data also demonstrated that GBM patients with high LAPTM4B-35 expression had significantly poorer OS and PFS than those with low expression of this factor. The multivariate Cox regression analysis revealed LAPTM4B-35 expression to be an independent prognostic factor for PFS and OS in patients with GBM. These results are consistent with previous reports which showed correlations between LAPTM4B-35 expression and prognosis in various malignancies such as hepatocellular, lung, breast and colorectal carcinomas. Our results suggest that LAPTM4B-35 also plays a critical role in glioma progression.

Our results revealed LAPTM4B-35 expression to be significantly associated with increased angiogenic activity, as reflected by Factor VIII positive tumor MVD, suggesting that LAPTM4B-35 protein may promote tumor progression via induction of tumor angiogenesis.

Our results revealed the expression of p-Akt correlated significantly with LAPTM4B-35 expression in GBMs. These observations suggest that LAPTM4B-35 protein might be involved in activation of the PI3K/AKT pathway in GBM.

<Conclusion>

Our present results demonstrate LAPTM4B-35 to be an independent prognostic factor for GBM. Furthermore, LAPTM4B-35 is associated with tumor angiogenesis and p-Akt activation in GBM. These findings suggest LAPTM4B-35 to play a critical role in GBM progression through promoting tumor angiogenesis and activating PI3K/Akt signaling. LAPTM4B-35 might have clinical potential as a prognostic factor for GBM.

＜要約＞

Lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B)-35 は、乳癌、肺癌および肝細胞癌などの多くの悪性腫瘍で過剰発現していることが報告されている。しかし、膠芽腫における LAPTM4B-35 の役割は明らかにされていなかった。そこで本研究では、膠芽腫における LAPTM4B-35 の発現と予後との関連を解析した。東京医科歯科大学で手術を行った 77 名の初発神経膠腫（Grade II　18 例、Grade III 16 例、Grade IV 43 例）において、LAPTM4B-35 の免疫組織染色を施行したところ、Grade II 神経膠腫の LAPTM4B-35 の発現は、Grade III、Grade IV 神経膠腫と比較し有意に低かった($p<0.05$)が、Grade III と Grade IV の間には有意差を認めなかった。43 例の膠芽腫（=Grade IV 神経膠腫）のうち LAPTM4B-35 が高発現である症例は 27 例（62.8%）で、LAPTM4B-35 高発現は p-Akt の高発現と腫瘍血管の高密度と相関していた。膠芽腫における LAPTM4B-35 高発現群の無増悪生存期間中央値は 5.13 ヶ月であり、LAPTM4B-35 低発現群の無増悪生存期間中央値 12.0 ヶ月と比較して有意に短かった($p<0.0001$)。また、膠芽腫における LAPTM4B-35 高発現群の全生存期間中央値は 12.5 ヶ月であり、LAPTM4B-35 低発現群の全生存期間中央値 29.6 ヶ月と比較して有意に短かった($p<0.0001$)。多変量解析を行い、LAPTM4B-35 は膠芽腫の独立した予後因子であることを示した。膠芽腫に

おける LAPTM4B-35 の高発現は、腫瘍細胞の増殖、腫瘍血管の増生、予後不良と強く相関していた。以上より、LAPTM4B-35 が、膠芽腫患者の予後予測因子となりうる可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5206　号	董　暁書
論文審査担当者	主　査　稲澤　譲治 副　査　横田　隆徳、田中　真二	

（論文審査の要旨）

１．論文内容

LAPTM4B-35 は乳がんなど種々の悪性腫瘍で高発現していることが知られていたが、膠芽腫では未だ明らかにされていない。申請者は、初発神経膠腫の 77 例における LAPTM4B-35 の発現を免疫組織化学で検討し様々な臨床病理学的因子との関連を調べた。その結果、膠芽腫における LAPTM4B-35 の高発現は腫瘍の増殖、腫瘍血管の増生、予後不良と強く相関しており、LAPTM4B-35 が膠芽腫の予後予測因子となり得る可能性を示すことができた。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

初発神経膠腫における Lysosome-associated protein transmembrane-4 beta-35 (LAPTM4B-35) の発現を免疫組織化学で検討し様々な臨床病理学的因子との関連を調べることを目的とした研究である。神経膠腫と LAPTM4B-35 の発現の関連性を調べた研究は未だ見あたらず先駆的といえる。

２）社会的意義

神経膠腫は未だ有効な分子標的治療薬も開発されておらず予後不良の悪性腫瘍であり、治療効果や予後予測の有効なバイオマーカーの開発が望まれており、今回の研究は意義ある取り組みといえる。

３）研究方法・倫理観

高い倫理観のもと、科学者の行動規範を遵守して研究を遂行したことがうかがわれた。

４）今後の発展

今後、より詳細な検討が追加されることで膠芽腫バイオマーカーとしての臨床応用の可能性も期待できる。

３．その他

今回の研究が申請者の臨床活動に資するものとなることを期待する。

４．審査結果

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	喜田　壮馬
論文審査担当者	主査　柴田　俊一 副査　豊福　明　　秀島　雅之
論　文　題　目	Computational fluid dynamic study of nasal respiratory function before and after bimaxillary orthognathic surgery with bone trimming at the inferior edge of the pyriform aperture

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

顎矯正手術に伴う上下顎骨の移動は、硬組織や軟組織の形態変化による審美性のみならず、鼻呼吸機能に対しても影響を与える。下顎骨後方移動により咽頭が狭窄し、閉塞型睡眠時無呼吸（OSA）のリスクが高まると報告されている。下顎骨と同様に、上顎骨の移動も鼻腔形態変化をもたらすことから呼吸・睡眠動態に与える影響は大きいものと考えられ、それに対する機能的評価が必要である。これまで、顎矯正術に伴う上顎骨の上方移動を施行した場合には鼻腔は狭窄すると考えられてきた。そのため、上顎骨の上方移動に伴う鼻腔狭窄防止のために、梨状孔下縁切削術を併用しているが、その効果の詳細な検討は未だ行われていない。

近年、コンピュータの発展に伴い、シミュレーション技術の高速化がなされ、医学分野で活用されている。鼻腔通気に関しても、計算流体力学（CFD）を用いた研究が行われており、上顎骨の前方移動が咽頭部の体積を増加することにより OSA を改善するという報告や、小児に対する急速拡大が鼻腔通気を改善するという報告は認めるが、上顎骨の上方移動が鼻腔に与える影響を、CFD を用いて評価した報告は認められない。

そこで本研究では、上顎骨上方移動を伴う顎矯正手術が鼻呼吸機能に与える影響を、CFD を用いて明らかにすること、および手術時に梨状孔下縁を切削することの効果を明らかにすることを目的に解析を行った。

＜方法＞

1.対象

横浜市立大学附属市民総合医療センターにて、上顎骨上方移動を伴う上下顎移動術を施行し、梨状孔下縁を切削した患者 10 名を対象とした。種々の症候群や著しい非対称を伴う症例は除外した。

2.鼻腔 3 次元モデル

各患者の術前および術後の CT を用い、術前モデルおよび術後モデルをそれぞれ 10 モデルずつ作製した。また、梨状孔下縁を切削していない場合を想定して、術後モデルの鼻弁（Nasal valve）部分を 1mm および 2mm 狭窄させたモデルを 10 モデルずつ作製した。

3.流体解析

解析条件は大気圧下（1.013×105 Pa）、気温 20℃、安静時呼気を想定し、非圧縮性ニュートン流体定常流、密度：1.205 kg/m3、粘度：1.822×10-5 Pa･s とした。支配方程式は、連続の式およびナビエ - ストークス方程式を用い、乱流モデルは低レイノルズ型 k-ε モデルを適用した。境界条件は、入口境界条件を流量 200 ml/s、出口境界条件を自由流出境界条件とし、壁面は Non-slip と設定した。また、本研究における主な解析部位は鼻腔であり、その鼻腔に対する初期条件の影響を緩和するため、外鼻孔にドライバーを付与した。

鼻腔を外鼻孔前縁と後鼻孔により囲まれた領域と定義し、前後的に 3 等分した各部位における圧力損失を ΔP-a（前方部）、ΔP-m（中央部）および ΔP-p（後方部）とし、合計を ΔP-nose とした。また後鼻孔から喉頭蓋上縁までを咽頭とし、同部位における圧力損失を ΔP-PA とした。鼻腔前方部、中央部、後方部および咽頭部を代表する部位の断面積を CSA-NV、CSA-m、CSA-p および CSA-PA と定義し、術前後における断面積および圧力損失について比較を行った。

また、統計学的解析にはウィルコクソンの符号順位検定（$p<0.05$）およびスピアマンの順位相関係数（$p<0.05$）を用いた。

＜結果＞

1.圧力損失

術前に比べ術後において、ΔP-a は有意に減少し、ΔP-PA は有意に増加した。また、ΔP-m および ΔP-p は減少傾向を示した。一方、術前後ともに ΔP-nose が ΔP-PA より有意に大きな値を示した。

2.断面積

術前に比べ術後において、CSA-NV は有意に増加し、CSA-PA は有意に減少した。また、CSA-m および CSA-p は増加傾向を示した。

3.断面積と圧力損失の相関

術前後モデルにおいて、CSA-NV と ΔP-a、CSA-m と ΔP-m、CSA-p と ΔP-p および CSA-PA と ΔP-PA におけるスピアマンの順位相関係数はそれぞれ、$\rho=-0.938$、-0.708、-0.720 および -0.928 と、いずれも強い負の相関を示した。

4.狭窄モデル

1mm および 2mm 狭窄モデルの CSA-NV は全てのケースにおいて術後より減少し、ΔP-a は全てのケースにおいて術後より増加した。また、4 ケースにおいて、2mm 狭窄モデルの CSA-NV が術前より小さくなり、2mm 狭窄モデルの ΔP-a が術前より大きくなった。

＜考察＞

本研究から、上顎骨上方移動および梨状孔下縁切削を伴う上下顎移動術を施行した場合、圧力損失は咽頭よりも鼻腔の影響を受けやすい可能性が示唆された。このことから顎矯正手術の際には、以前より行われてきた咽頭への配慮のみならず、鼻腔に対する配慮が求められると考えられる。また、鼻腔の各部位における圧力損失は、それぞれの部位の断面積と強い負の相関を示した。したがって、鼻腔の断面積を拡大する手術法が、鼻腔通気の改善に繋がる可能性が考えられた。

従来の計測方法である rhinomanometry や acoustic rhinometry を用いた先行研究では、術後に鼻腔抵抗が減少し、鼻腔通気が改善するという報告が多く認められる。本研究においても、多くの症例で術後に圧力損失が減少しており、その要因の一つとして、術中に梨状孔下縁を切削したことに伴う鼻弁断面積の増加が考えられる。梨状孔下縁切削に伴う鼻弁断面積増加の鼻腔通気に対する効果を明らかとするため、梨状孔下縁を切削しなかった場合を想定した 1mm および 2mm の鼻腔狭窄モデルを作製し比較を行った。その結果、両狭窄モデルの全ての症例において、術後モデルに比較し、鼻腔前方部の圧力損失が増加し、鼻腔通気が減少していた。さらに、2mm 狭窄モデルの 10 症例中 4 症例において、術前モデルに比較し、鼻腔前方部の圧力損失が増加し、鼻腔通気が術前よりも減少していた。これらのことから鑑みて、梨状孔下縁を術中に切削し、その部位の断面積を縮小しないことが、鼻腔前方部の通気の維持あるいは改善に重要であることが示された。

一方、2mm 狭窄モデルにおける鼻弁断面積の術後の減少量は、鼻弁断面積の 5%であったが、鼻弁断面積が元々小さな症例にとってこの変化は大きな影響を持ち、わずかな鼻弁断面積の減少が著しい圧力損失の増加に繋がると考えられる。前述のように、症例によっては梨状孔下縁を 2mm 切削していなければ、術前に比較して、術後に鼻腔前方部の圧力損失が増加し、鼻腔通気が減少していた可能性が CFD を用いたことから明らかとなった。

さらに、術後に圧力損失が減少し、鼻腔通気が改善した別の要因としては次のことが考えられる。上顎骨の上方移動を行う場合、上方移動を円滑に行うため、また鼻中隔の湾曲を防ぐために、down fracture の際に余剰の鼻中隔は切除される。本研究においても、術後に鼻腔前方部以外に鼻腔中間部および鼻腔後方部の断面積が増加し、圧力損失が低下しているモデルが多く見られ、その手技が影響していると考えられる。先行研究では、鼻腔抵抗減少の要因として鼻腔前方部のみが指摘されていたが、本研究では CFD を用いたことで鼻腔前方部のみならず、鼻腔中間部および鼻腔後方部にも鼻腔通気改善の要因があることが明らかとなった。

以上のように CFD を用いることで、上顎骨上方移動を伴う顎矯正手術が鼻腔通気に与える影響について部位特異的な解析を行い、術中に併用する梨状孔下縁切削術の効果について検証することができた。さらには、呼吸に対する影響を考慮した理想的な顎骨の移動を行う治療計画や治療効果予測が可能となり、より優れた治療法を考案する際の一助となると考えられた。

＜結論＞

上顎骨の上方移動を伴う顎矯正手術時に、鼻腔の断面積の拡大のために梨状孔下縁を切削することは、鼻呼吸機能を維持するという点で有用である可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5207　号	喜田　壮馬
論文審査担当者	主 査　　柴田　俊一 副 査　　豊福　明　　秀島　雅之	
論 文 題 目	Computational fluid dynamic study of nasal respiratory function before and after bimaxillary orthognathic surgery with bone trimming at the inferior edge of the pyriform aperture	

（論文審査の要旨）

顎矯正手術による上下顎骨の移動は、硬組織や軟組織の形態変化による審美性のみならず、鼻呼吸機能に対しても影響を与えると考えられており、近年、下顎骨後方移動により咽頭が狭窄し、閉塞型睡眠時無呼吸（OSA）のリスクが高まると報告されている。また、下顎骨の移動と同様に、上顎骨の移動も呼吸・睡眠動態に与える影響は大きく、機能的評価が求められている。これまで顎矯正術による上顎骨の上方移動を施行した場合、鼻腔は狭窄すると考えられてきた為、施設によっては上顎骨の上方移動に伴う鼻腔狭窄防止および鼻道軟組織の収納スペースを確保するために、梨状孔下縁切削術を併用しているが、その効果の詳細な検討は未だ行われていない。

そこで喜田は、近年発展が著しく医療分野にも応用が進んでいるシミュレーション技術（計算流体力学、CFD）を用いて、上顎骨上方移動を伴う顎矯正手術が鼻呼吸機能に与える影響、また術中に梨状孔下縁を切削することの意義に関する研究を行った。この着眼点はたいへん理にかなったものであると評価できる。

方法としては、横浜市立大学附属市民総合医療センターにて、上顎骨上方移動を伴う上下顎移動術を施行し、梨状孔下縁を切削した患者 10 名を対象とし、各患者の術前および術後の CT を用い、術前モデルおよび術後モデルを 10 モデルずつ作製した。また、梨状孔下縁を切削していない場合を想定して、術後モデルの前方部分を狭窄させたモデルを 10 モデルずつ、計 40 モデル作製した。

上述のモデルを用いてシミュレーションを行い、鼻腔を前後的に 3 等分した各部位および咽頭における圧力損失[ΔP-a（前方部）、ΔP-m（中央部）、ΔP-p（後方部）および ΔP-PA（咽頭）]を求めた。また、各部位における断面積[CSA-NV（前方部）、CSA-m（中央部）、CSA-p（後方部）および CSA-PA（咽頭）]も求め、術前後および狭窄モデルにおける断面積および圧力損失を比較した。また、統計学的解析にはウィルコクソンの符号順位検定（$p < 0.05$）およびスピアマンの順位相関係数（$p<0.05$）を用いた。

これらは先行研究の結果を十分に検討し、綿密な予備実験を経て計画されており、本研究に対する同人の熱意と深い洞察を感じさせるものであった。

研究結果としては以下の知見を得ている。

1. 術前に比べ術後において、ΔP-a は有意に減少し、ΔP-PA は有意に増加した。また、ΔP-m および ΔP-p は減少傾向を示した。

2. 術前に比べ術後において、CSA-NV は有意に増加し、CSA-PA は有意に減少した。また、CSA-m および CSA-p は増加傾向を示した。

3. 術前後モデルにおいて、CSA-NV と ΔP-a、CSA-m と ΔP-m、CSA-p と ΔP-p および CSA-PA と ΔP-PA におけるスピアマンの順位相関係数はそれぞれ、ρ=-0.938、-0.708、-0.720 および -0.928 と、いずれも有意な負の相関を示した。

4. 10 症例中 4 症例において、狭窄モデルの CSA-NV が術前より小さくなり、ΔP-a が術前より大きくなった。

これらの結果は、上顎骨の上方移動を伴う顎矯正手術時に梨状孔下縁を切削することが、術後に鼻呼吸機能を維持するという点で有効であることを示し、またこれまで明らかとなっていなかった、上顎骨上方移動が鼻腔中央部および鼻腔後方部の鼻腔通気に与える影響を明らかにするものである。

以上より、本研究は、上顎骨上方移動が鼻腔通気に与える影響について部位特異的な解析を行い、術中に併用する梨状孔下縁切削術の意義を明らかとした。これらの研究成果は、呼吸に対する影響を考慮した理想的な顎骨の移動を行う治療計画や治療効果予測を可能とし、より優れた治療法を考案する際の一助となると考えられ、今後の歯科矯正学をはじめとする臨床歯学の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	手塚　弘樹
論文審査担当者	主査　興地　隆史 副査　高橋　英和　　宮新　美智世
論　文　題　目	Assessment of cervical demineralization induced by *Streptococcus mutans* using swept-source optical coherence tomography

（論文内容の要旨）

〈緒言〉

近年の医療の発達によって平均寿命は高くなり、高齢者人口が急激に増加している。高齢者に好発する根面齲蝕は脱灰深度の診断が難しく、歯科臨床において考慮すべき重要な課題の一つとなっている。齲蝕はバイオフィルム依存性の疾患であり、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*)は齲蝕病原性バイオフィルムの形成に深く関与する細菌の１つである。根面齲蝕を適切に管理するためには、病原性細菌による歯頚部齲蝕の発生機序を解明する必要がある。歯面上に齲蝕病原性バイオフィルムが形成される口腔内の環境を再現するために、人工口腔装置（Oral Biofilm Reactor、OBR）などが用いられている。

齲蝕の診断を正確に行うためには、脱灰深さを高精度で検知する技術の開発が望まれており、非侵襲的に観察対象物の断層画像を得ることができる光干渉断層計（Optical Coherence Tomography、OCT）はその解決手段として期待されている。波長走査型 OCT（Swept Source Optical Coherence Tomography、SS-OCT）は最新の OCT であり、光源に波長変換近赤外レーザーを用い、画像解像度と処理速度に優れている。しかしながら SS-OCT を用いた齲蝕の発症機序の解明と脱灰深さの検証を行った研究はまだ少ないのが現状である。そこで本研究は、in vitro にて歯頚部齲蝕モデルを作成し、SS-OCT 画像と共焦点走査型レーザー顕微鏡（Confocal Laser Scanning Microscopy、以下 CLSM）画像を比較し検討を行った。

〈方法〉

本研究では東京医科歯科大学倫理委員会の承認のもと、齲蝕や破折を認めない健全なヒト抜去臼歯を用い、頬側面の Cemento-Enamel Junction（以下 CEJ）を中心とした試料（5.0 × 5.0 × 2.0mm）を 30 個作製した。なお脱灰前の試片の状態を SS-OCT（Dental OCT System Prototype2. パナソニックヘルスケア）を用いて観察し、齲蝕がないことを確認した。供試細菌として *S. mutans* MT8148 を用い、試料表面に OBR 内でバイオフィルムを形成し 3 群に分け（n = 10）、所定の期間 Heart Infusion （以下 HI）溶液にて 37℃でインキュベートし脱灰処理を行った（1 週間、2 週間、3 週間）。HI 溶液は 24 時間毎に期間終了まで交換し、脱灰期間終了後、試料表面のバイオフィルムを NaOH 溶液（0.25mol/l）にて除去し、SS-OCT にて脱灰歯質の状態を観

察した。観察部位として、

Enamel area 1: CEJ より 100~300μm 離れた範囲のエナメル質（E1）

Enamel area 2: CEJ より 1000~1200μm 離れた範囲のエナメル質(E2)

Dentin area 1: CEJ より 0~200μm 離れた範囲の象牙質(D1)

Dentin area 2: CEJ より 1000~1200μm 離れた範囲の象牙質(D2)

を選択し、深さ方向 100μm における OCT シグナルの積分値（Area Under OCT Signal Curve、以下 AUC)を計測した。その後試料をエポキシレジン包埋し、ダイヤモンドブレードにて半切、研磨後、CLSM（×50）により脱灰状態を観察した。SS-OCT 画像、CLSM 画像それぞれにおける脱灰深度の測定を、Image J を用いて行った（ANOVA, Student's t-tests with Bonferroni corrections)。また Dentino-Enamel Junction（以下、DEJ)付近のエナメル質の剥離によるギャップ形成がみられる試料を確認し、各脱灰期間におけるギャップの発現数とその長さを計測した。得られた結果は統計処理ソフト（SPSS）を用い、Chi-squared test with Bonferroni corrections により信頼区間 95%にて評価した。

〈結果〉

SS-OCT を用いることにより、歯頚部エナメル質ならびに象牙質の脱灰を、画像における輝度の上昇部として観察し識別することができた。また SS-OCT 画像の輝度の上昇部位は CLSM 観察における脱灰部位とほぼ一致していた。バイオフィルムによる脱灰期間の延長により CEJ 付近のエナメル質と象牙質の脱灰は進行し、SS-OCT 画像の輝度の上昇部も深くなる傾向がみられ、CEJ における輝度は他の脱灰部位よりも上昇していた。また象牙質の脱灰の進行はエナメル質よりも早く、統計学的有意差がみられた（$p<0.05$）。

観察部位における脱灰変化を比較すると、E1 における AUC 値と脱灰深度は E2 よりも有意に上昇していたが（$p<0.05$）、D1 と D2 における AUC 値と脱灰深度に有意差はみられなかった（$p>0.05$）。

またバイオフィルム脱灰を行った試料に DEJ 付近のエナメル質の剥離によるギャップ形成がみられ、脱灰期間の延長によってギャップ形成のみられる試料数とギャップの長さは増加していたが、有意差はみられなかった（$p>0.05$）。

〈考察〉

SS-OCT を用いて齲蝕原性バイオフィルムによる歯頚部の脱灰を観察した結果、脱灰期間の延長によって脱灰が進行する様相を、SS-OCT 画像の輝度の上昇部として観察することができた。齲蝕は脱灰によるミネラルの喪失と組織の崩壊により進行する。脱灰によって歯質の多孔性が増加すると、歯質の結晶やコラーゲン線維の間に微小空隙が形成され、微小空隙の界面において近赤外線の散乱が生じ、SS-OCT 画像において輝度の上昇がみられることが報告されている。

脱灰を評価する指標として AUC 値を用い、輝度の上昇を比較した結果、E1 における AUC 値は E2 よりも有意に高くなることが示された。したがってエナメル質における脱灰は、CEJ に近接した歯頚部において歯冠側よりも進行が早いことがわかった。歯頚部エナメル質の形態的特徴として、不規則に配列したハイドロキシアパタイトの結晶や不定型のエナメル小柱を含む無柱エ

ナメル質や移行的エナメル質の存在が報告されている。またエナメル質中の炭酸塩はハイドロキシアパタイトの結晶度に影響し歯質の耐酸性を低下させ、歯頸部エナメル質に多くみられることが報告されている。このような歯頸部エナメル質の特徴が本研究での脱灰様相に影響した可能性が高いと思われる。

脱灰深度を比較すると、象牙質がエナメル質よりも有意に深く脱灰が進行しており、これはエナメル質と象牙質の構造の違いによる影響と考えられる。エナメル質は高度に結晶化した構造が全体を占めているのに対し、象牙質はエナメル質よりもミネラル密度が低く、有機質が多く含まれる。また象牙細管が存在し、酸の侵入経路やミネラル成分の放出路として作用することが報告されている。

SS-OCT を用いてバイオフィルム脱灰を行った歯頸部を観察した結果、DEJ においてエナメル質が剥離し、ギャップ形成を生じることが確認できた。DEJ 付近には有機質が多く含まれ、平行に配列した粗いコラーゲン束や象牙細管の顕著な部分が存在するため、ミネラル密度が低く脱灰の影響を受けやすいことが報告されている。したがって DEJ に沿って脱灰が進行し、ギャップが形成したものと思われる。

本実験において象牙質における脱灰はエナメル質よりも深くなることが確認された。これは根面齲蝕が歯肉退縮により露出象牙質に好発する臨床所見と一致している。また、歯頸部エナメル質は齲蝕原性細菌の影響を受けやすく、脱灰が他のエナメル質に比較して早く進行し、DEJ の破壊を生じることが判明した。したがって歯頸部齲蝕の早期発見は重要であり、SS-OCT は臨床において歯頸部齲蝕の診断に有効であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5208　号	手塚　弘樹
論文審査担当者	主　査　興地　隆史 副　査　高橋　英和　　宮新　美智世	
論 文 題 目	Assessment of cervical demineralization induced by *Streptococcus mutans* using swept-source optical coherence tomography	

（論文審査の要旨）

根面齲蝕は高齢者に多発し、歯髄炎に移行しやすく、予防と治療が困難な疾患である。また根面齲蝕は近年増加傾向にあり、発症機序の解明と正確な診断の確立は現代歯科医学における重要課題の１つとなっている。光干渉断層計（OCT）は、光の干渉作用を利用して非侵襲的に組織の断層画像を得る新技術であり、被曝を伴わないことから、継続的に疾患のモニタリング観察に使用することができる。本研究が遂行された背景には、高齢者の歯科臨床における現状と光学的な診断技術の開発があり、本研究はそれらを的確に捉え実施したものといえる。

実験はヒト抜去歯からエナメル質と象牙質を含む歯頚部歯質を切り出し、その試料表面に *Streptococcus mutans* とスクロース溶液を培養装置の中で連続的に滴下し、齲蝕病原性バイオフィルムの形成と in vitro の脱灰歯質の作成に成功している。齲蝕細菌に関する専門的な知識と高度な技術が要求される実験系であり、申請者が周到な準備のもと実験を行ったことが推察される。使用した OCT は波長走査型 OCT（SS-OCT）であり、他の OCT よりも画像深度が深いことが特徴として挙げられる。通常の OCT では観察困難な初期脱灰の変化を比較するための適切な選択といえる。

脱灰の観察は SS-OCT による断層画像に画像処理を加え、脱灰深さを計測している。また CEJ 付近のエナメル質と象牙質、さらにやや離れた歯冠部エナメル質と歯根部象牙質を選択し、それぞれの脱灰の進行度を SS-OCT シグナルの積分値として算出し半定量的な比較を行っている。新規性に富んだ試みであると同時に、歯頚部という特殊な形態における特徴を捉えるための工夫として評価することができる。バイオフィルムによる脱灰は１週間、２週間、３週間の３期間行い、SS-OCT 画像による観察結果を CLSM 画像と比較しており、正確な情報を得るための慎重な姿勢がうかがわれる。

得られた主な結果は、次のとおりである。

１．SS-OCT を用い歯頚部エナメル質ならびに象牙質の脱灰を観察することができた。バイオフィルムによる脱灰期間の延長により脱灰は進行し、SS-OCT 画像の輝度の上昇部も深くなる傾向がみられた。

２．CEJ 付近における SS-OCT 画像の輝度は他の脱灰部位よりも上昇し、特に歯頚部付近のエナメル質の脱灰シグナルは、歯冠部エナメル質のシグナルよりも有意に高くなっていた。

３．エナメル質と象牙質を比較すると、象牙質の脱灰が深く進行していた。
４．バイオフィルム脱灰後の歯頚部を SS-OCT 観察すると、DEJ 付近のエナメル質が脱灰により剥離し、ギャップの形成がみられた。

本論文の考察は、脱灰による微小空隙の増加と光の散乱による SS-OCT シグナルの増加、歯頚部エナメル質の解剖学的形態とハイドロキシアパタイトの結晶構造の違いによる脱灰への影響、DEJ におけるミネラル密度と脱灰の進行、エナメル質と象牙質の脱灰深度と臨床での歯頚部齲蝕との比較などから構築されており、理論的に展開され説得力が高く、臨床的にも興味深い内容となっている。

以上より、申請者　手塚弘樹が本研究領域において最先端の技術を駆使し、世界で初めてとなる歯頚部齲蝕の発症機序に関する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学、歯科診断学の発展に寄与すること大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものとして判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	森田　琢磨
論文審査担当者	主査：原田　浩之 副査：櫻田　宏一　　池田　正明
論　文　題　目	Characterizing Genetic Transitions of Copy Number Alterations and Allelic Imbalances in Oral Tongue Carcinoma Metastasis

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

癌の原発巣における不均一性は、転移巣を構成する細胞集団に大きな影響を与えている。この転移過程のメカニズム解明を目的に、口腔舌扁平上皮癌(OTSCC)患者の原発巣(PT)および頸部リンパ節転移巣(MLN)から得られたサンプルのゲノムについて比較解析を行った。10 名の OTSCC 患者からそれぞれ得られた PT および MLN の計 20 サンプルを対象に、高密度の SNP アレイを用いて全ゲノムコピー数解析を行い、ゲノムコピー数変異(CNA)およびコピー数変異のないヘテロ接合性消失(CN-LOH)に関して PT と MLN 間での相同性および相違性を評価した。階層クラスタリング解析の結果、10 症例中 8 症例において、原発巣-転移巣のクラスターが形成され、原発巣と同一患者の転移巣は概ね遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されていることが裏付けられた。10 症例中 6 例において PT-MLN で共通してみられた 8q11.21, 8q12.2-3, 8q21.3 の gain など、発癌過程に大きく関与する可能性のある染色体領域が検出された。一方で、20q11.2 の gain は 10 症例中 5 例の転移巣のみでみられた変異であった。この変異は統計学的有意差をもって、転移巣特異的な変異であることが示され、転移過程への関与が示唆された。この解析結果を検証するため、別コホートにおいて、20q11.2 上の候補遺伝子の発現を免疫組織化学染色にて評価した。その結果、*E2F1* が原発巣に比べ転移巣で有意に発現していた。本研究から、OTSCC の原発巣および転移巣におけるゲノムは大部分が共通している一方で、*E2F1* が存在する 20q11.2 gain のように”clonal evolution”を通して転移巣特異的に検出された変異が、転移巣の形成に必要であることが示唆された。

＜緒言＞

口腔扁平上皮癌（OSCC）を含む頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）において、頸部リンパ節転移の有無は最も重要な予後因子として認識されている。昨今、腫瘍における遺伝子の不均一性“inter- and intratumor heterogeneity”が転移巣の形成に影響を与えると考えられており、同一患者の原発巣と転移巣のゲノム情報の比較解析が転移過程の解明に必要である。近年の大規模なシークエンス解析により癌の不均一性の評価が進められ、HNSCC における大規模な全ゲノムコピー数変異(CNA)のデータが提供されている。しかしながら、これらは癌の原発巣のみを対象とし

たものである。本研究では、高密度の SNP アレイを用いて OTSCC の原発巣と転移巣における CNA, CN-LOH の両者を比較解析し、遺伝的相同性および不均一性の評価を行った。

＜方法＞

手術を施行した頸部リンパ節転移を有する OTSCC 患者 10 名を対象とした。原発巣と転移巣それぞれのパラフィン包埋ホルマリン固定(FFPE)組織、計 20 サンプルを用い、各サンプルが腫瘍のみで構成されるようトリミングし、通法どおりにゲノム DNA を抽出した。高密度の SNP(single-nucleotide polymorphism)アレイである OncoScan® FFPE Assay (Affymetrix)を用いて、全ゲノムコピー数解析を行った。OncoScan に搭載されている全てのプローブについて各々、コピー数の状態(gain, loss, normal)および CN-LOH の状態を原発巣・転移巣ともに評価した。加えて、上記対象とは別集団の 26 名の OTSCC 患者から正常組織・原発巣・転移巣の FFPE 計 76 サンプルを用い、20q11.2 上の遺伝子の *DNMT3B* と *E2F1* について、免疫組織化学染色を行った。なお、本研究は本学の倫理審査委員会（承認番号：592）の承認のもとに行った。

＜結果＞

Case 3 の原発巣・転移巣における CNA および CN-LOH の全染色体情報では、11q13.3 領域のコピー数増幅は 3-P と 3-L で共通してみられる一方で、7p 領域のコピー数増幅は原発巣ではみられず転移巣のみでみられた。CN-LOH についても同様に、2q 領域において原発巣と転移巣の CN-LOH の様相は概ね共通しているが、部分的に異なっていた。Case 3 においては、原発巣と転移巣の大部分は遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されているが、一部の細胞集団はその両者の間で異なっていた。他の 9 症例についても同様の評価を行った結果、3q, 5p, 7p, 8q, 11q13, 20q の gain、3p, 22q の loss は 10 症例中 5 症例において原発巣・転移巣で共通した CNA であった。また、CN-LOH について原発巣・転移巣で最も共通してみられた領域は 1p, 3p, 16p であった。次に全 20 サンプルを対象に事前ラベルなしの階層クラスタリング解析を行った。その結果 10 例中 8 例において、原発巣-転移巣のクラスターが形成され、原発巣と同一患者の転移巣は概ね遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されていることが裏付けられた。続いて、原発巣と転移巣の間での CNA 数および CN-LOH 数の比較を行った結果、数の変化については CNA、CN-LOH いずれも一定の傾向はみられなかった。さらに原発巣と同一患者の転移巣の CNA および CN-LOH の比較解析では 10 症例中 6 例において、8q11.21, 8q12.2-3, 8q21.3 の gain および 22q11.23 の loss が共通してみられた。また、16p11.2 の CN-LOH は 10 症例中 9 例で共通してみられた。一方、20q11.2 の gain は 10 症例中 5 例の転移巣のみで変異がみられ、統計学的有意差をもって転移巣特異的な変異であることが示された。別コホートにおける免疫組織化学染色の結果、E2F1 タンパクは原発巣では 26 例中 11 例で陽性だったが、転移巣では 26 例中 25 例で陽性であり、転移巣で有意に過剰発現がみられた。

＜考察＞

本研究におけるゲノム解析の結果で得られた 20q11.2 の gain は転移巣特異的な CNA であるという現象について 2 通りの可能性が挙げられる。一つは、20q11.2 の gain は原発巣でも実は起こ

っているが、それはごく一部の細胞集団内にとどまっているため SNP アレイでは検出されない。しかし、この変異を持つ集団は転移・増殖能を有しており、転移の過程で”clonal evolution”を通して顕著に増殖し、そのため転移巣でのみ検出されたという考えである。もう一つは、原発巣では 20q11.2 の gain は全く生じておらず、転移した後に発生してその集団が大多数を占めるようになったというものである。今後これらの仮説の立証に向けて、さらなる解析が求められる。

20 番染色体長腕の gain は多くの癌種でみられ、この染色体上に存在する *DNMT3B* と *E2F1* は興味深い遺伝子である。特に *E2F1* は、細胞周期に関わる遺伝子の転写を調節するもので、この遺伝子の発現異常ががんの浸潤・転移に関わると報告されている。

CN-LOH は片方の対立遺伝子(allele)が欠失した結果残ったもう一方の allele が 2 倍となることで、コピー数は正常だがヘテロ接合性消失を認めるという変異であり、核型分析や SNP アレイを通してのみ検出される。CN-LOH は様々な癌種で報告されているが、OTSCC ではほとんど解析がなされていない。本研究では、16p11.2 の CN-LOH において強い相同性がみられ、OTSCC の発癌過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

＜結論＞

本研究から、OTSCC の原発巣および同一患者の転移巣におけるゲノムは大部分が共通している一方、20q11.2 gain のように一部の転移巣特異的な変異が転移巣の形成に必要であることが示唆された。今後の研究においては、*E2F1* を筆頭に 20q11.2 に存在する他の候補遺伝子の詳細な解析とともに頸部リンパ節転移のメカニズム解明が求められる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5209　号	森田　琢磨
論文審査担当者	主　査　原田　浩之 副　査　櫻田　宏一　　池田　正明	
論 文 題 目	Characterizing Genetic Transitions of Copy Number Alterations and Allelic Imbalances in Oral Tongue Carcinoma Metastasis	

（論文審査の要旨）

癌の原発巣における不均一性は、転移巣を構成する細胞集団に大きな影響を与えている。森田琢磨は、この転移メカニズムの解明に向けて、口腔舌扁平上皮癌（OTSCC）における原発巣および頸部リンパ節転移巣について、高密度の SNP アレイを用いて全ゲノムコピー数解析を行い、ゲノムコピー数変異(CNA)およびコピー数変異のないヘテロ接合性消失(CN-LOH)に関して相同性および相違性を評価した。その結果、原発巣と転移巣は概ね遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されていることが示された。一方、20q11.2 の gain は 10 症例中 5 例で転移巣のみでみられた変異であった。この変異は有意に転移巣特異的であることが示されたことから、転移メカニズムに大きく関与していることが示唆された。さらに、別コホートにおいて、20q11.2 上の候補遺伝子の発現を免疫組織化学染色にて評価した結果、*E2F1* が原発巣に比べ転移巣で有意に発現していた。本研究で行われた同一患者の原発巣と転移巣を比較することは、癌の不均一性を十分に考慮し、転移メカニズムを解明するため優れた着眼点であり、評価に値する。

本研究で得られた結果は次の通りである。

1. OTSCC 10 症例の SNP アレイ解析から、原発巣と転移巣の大部分は遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されているが、一部の細胞集団は異なっていた。
2. 階層クラスタリング解析の結果、10 症例中 8 症例において原発巣-転移巣のクラスターが形成された。原発巣と同一患者の転移巣は概ね遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されていた。
3. 原発巣と転移巣の間での CNA 数および CN-LOH 数の比較を行った結果、数の変化については CNA、CN-LOH いずれも一定の傾向はみられなかった。
4. 原発巣と同一患者の転移巣の CNA および CN-LOH の比較解析を行った結果、10 症例中 6 例において、8q11.21, 8q12.2-3, 8q21.3 の gain および 22q11.23 の loss が共通してみられ、また 16p11.2 の CN-LOH は 10 症例中 9 例で共通してみられた。
5. 20q11.2 の gain は 10 症例中 5 例の転移巣のみでみられた変異であり、統計学的有意差をもって転移巣特異的な変異であることが示された。
6. 別コホート OTSCC26 症例における免疫組織化学染色の結果、*E2F1* タンパクは原発巣では 26 例中 11 例で陽性だったが、転移巣では 26 例中 25 例で陽性であり、転移巣で有意に

過剰発現がみられた。

以上の結果は、癌の不均一性という概念を裏付けるものであり、とくに 20q11.2 の gain は転移巣特異的にみられたという結果は新たな知見である。本研究では、免疫組織化学染色において *E2F1* タンパクは転移巣で有意に過剰発現を認めたことから、20q11.2 の gain に転移巣特異的な変異であることが裏付けられ、転移過程に大きな役割を担っていることが示唆された。これらの実験結果についての考察は論理的に行われている。

以上のことから、本研究は、舌扁平上皮癌の転移過程において重要な役割を果たす遺伝子の存在を示唆するものであり、今後の臨床腫瘍学、歯科医学の発展に寄与するところが極めて大きいものと考えられる。よって本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	NGUYEN VO Ngoc Trang
論文審査担当者	主査　荒川　真一 副査　原田　浩之　　坂本　啓
論　文　題　目	Ligature induced peri-implantitis: tissue destruction and inflammatory progression in a murine model

（論文内容の要旨）

Background:

Oral rehabilitation with dental implants has become well-established for edentulous and partially dentate patients because of its high predictability and success rate. However, literature support for osseointegrated dental implant therapy has been challenged lately by the onset of inflammatory reaction around implants. Plaque accumulation followed with subsequent inflammation is considered the most important etiological factor for the development of peri-implantitis. Besides that, the onset of peri-implantitis has been related to many individual risk factors including behavioral factors, systemic diseases, or genetic factors. Among these, genetic factors are likely to be significant. Hence, there is an urgency to investigate and obtain a thorough understanding of genetic influence on the mechanism of peri-implantitis. Experimental animal models are important tools in studying the mechanisms and development of therapeutically relevant solutions to diseases. However, current canine models are limited by the amount of available genetic screening assays. In this regard, mice are ideally suitable for peri-implantitis research as a wide variety of genetically engineered strains are available and high quality immunochemical and cellular reagents are commonly accessible.

Objectives: The aim of this study is to investigate tissue destruction and inflammatory progression of experimental peri-implantitis at the healed extraction socket site in mice at different time points and evaluate the possibility to establish an alternative murine model for peri-implant disease research.

Material and methods: Sixty male C57BL/6NCrSlc mice (4-week-old) were used and the maxillary right first molars were extracted. Eight weeks after extraction, custom-made pure titanium machined screw type implants (0.8 x 1.5 mm) were placed, one implant per animal. Four weeks later, 5-0 silk ligatures were applied around implant necks to induce peri-implantitis. Animals were sacrificed at 0 (before ligature), 7, 14, 21 and 28 days after ligature.

Thirty samples were analyzed radiologically (with micro-CT images) and histologically (with H&E staining) to measure bone level change, osteoclast number, density and distribution. To measure bone level change, bone height was determined by measuring the distance between the implant tip and the most coronal position of marginal bone that attached to the implant at all sites (mesial, distal, buccal and palatal). To count osteoclast number and measure osteoclast density as well as distribution, TRAP staining was applied. TRAP positive cells with three or more nuclei were considered osteoclasts. A region of interest (ROI) was applied to all samples. It was a 1.5 mm x 1 mm rectangular of which the longer side aligned with the central long axis of the implant, and covered the whole implant length from head to tip. Osteoclast density (cells/mm2) and osteoclast distribution (number of cells accumulating either around implant surface or at the infiltrated connective tissue) within the ROI were quantified manually by Image-J.

The rest of thirty samples was used to determine the relative mRNA expression levels of IL-1 and TNF-α with RT-PCR analysis.

Results:

At day 28 after ligature were applied to the implants, bone levels at both mesial and distal sites remained only 40-50% compared to that of before ligature ($p < 0.01$), from 0.81 ± 0.04 mm (mesial site) and 0.84 ± 0.03 mm (distal site) to 0.37 ± 0.03 mm (mesial site) and 0.37 ± 0.07 mm (distal site). Similarly, bone levels before ligature, which were 0.9 ± 0.06 mm (buccal site) and 0.84 ± 0.09 mm (palatal site) dramatically decreased after 28 days ligation ($p < 0.01$) with the values of 0.53 ± 0.03 mm (buccal site) and 0.45 ± 0.04 mm (palatal site). At day 28, the ICT (infiltrated connective tissue) area became larger and extended toward the position that was apical to the pocket epithelium. There was no epithelial barrier present between apical ICT and alveolar bone crest. At this time point, a large number of plasma cells, macrophages, endothelial cells and polymorphonuclear leukocytes was found at the ICT portion.

Osteoclasts' distribution slightly changed through different time points. Before ligature, osteoclasts were located mainly along the implant body and partly inside bone marrow of the alveolar bone. However, at 7 days after ligature, osteoclasts' distribution was more concentrated at the ICT area compared to that of along the implant body, and the difference was significant ($p < 0.05$). No significant difference was found on the distribution of osteoclasts along the implant body before and after ligature, but significant increase of osteoclasts was found at the ICT area after ligature compared to day 0 ($p < 0.05$).Osteoclast numbers and density increased significantly at days 7, 14, 21, and 28 compared to day 0 ($p < 0.05$). Interestingly, at day 28, the number of osteoclasts and their density decreased more significantly than that of day 21 ($p < 0.05$). Accordingly, IL-1 and TNF-α mRNA expression increased significantly at the early time points but decreased significantly at day 28 after

ligature ($p < 0.05$).

Discussion:

In the current mouse model, peri-implantitis was presented with progressive implant-surrounding hard and soft tissue destruction along with severe inflammatory signs. Bone was found to resorb significantly after using ligature to cause inflammation around the implant. Inflammatory signs started with positive bleeding while probing and mild swelling, then progressed by spontaneous bleeding even without probing, serious erythema and edema. Peri-implantitis in dogs are characterized by the presence of a large inflammatory cell infiltration localizing in the peri-implant mucosa, and extending into the alveolar bone (Lindhe et al., 1992), which was also found in the current murine model.

H&E stained images showed the presence of collagen fibers at the peri-implant mucosa. Notably, the orientation of those collagen fibers was found to be parallel to the titanium surface toward the apical portion of the pocket epithelium, which showed similarity with that in canine models (Berglundh et al., 1991). In the infiltrated connective tissues, the presence of many inflammatory cells was identified in which the two most abundant were polymorphonuclear leukocytes and macrophages. Additionally, the infiltrated connective tissue extended towards the alveolar bone and located apical of the pocket epithelium, chronologically. These characteristics were also found in recent studies in humans (Berglund;h et al., 2004; Carcuac and Berglundh 2014).

Apart from radiological and histological analysis, mRNA expression levels of preinflammatory cytokines IL-1 and TNF-α of implant surrounding tissue were analyzed in this study. IL-1 level increased significantly after 7 days of ligature, and then decreased at 28 days of ligature. The high level of IL-1 after peri-implantitis was consistent with some clinical studies in which peri-implant crevicular-fluid (PICF) in peri-implantitis patients were compared with that of healthy patients (Curtis et al., 1997; Murata et al., 2002). This result is in accordance with similar studies (Hultin et al., 2002; Laine et al., 2006), which suggested that the similar level of IL-1 expression reflected on the chronic status with slow progression of the infection rather than remaining as an active disease.

In the present study, an alternative approach to induce peri-implantitis in mice by ligature placement was demonstrated. It should be noted that one of the limitations of this study is the peri-implant hard and soft tissue reaction after ligature removal was not investigated, which will be addressed in future studies.

Conclusions:

Inflammatory response followed by significant peri-implant bone loss was observed after ligature placement, which suggested a novel peri-implantitis model in C57BL/6 mice could be achieved successfully. Additionally, 28 days ligation has been confirmed to be sufficient to

induce peri-implantitis in this current model. The current mice model might provide scientists with a better platform for understanding the progression and mechanism of peri-implantitis, which might hopefully lead to improvement in therapeutic solutions.

（和文要旨）

インプラント治療は咬合機能の十分な回復が期待でき、成功率も高い欠損補綴法である。しかしながら、その補綴装置へのプラーク沈着によってインプラント周囲炎が誘導され、食習慣、嗜好品をはじめ全身疾患、遺伝性疾患なども関与して骨結合の破壊をもたらすが、そのメカニズムは明らかではない。そこで本研究では、マウス欠損歯部位へのインプラント埋入モデルを用い、炎症サイトカインの遺伝子レベルおよび破骨細胞数からインプラント周囲炎の組織破壊を検討した。本研究は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て行われた（承認番号 0150220A）。

4 週齢雄のマウス上顎骨に 0.8x1.5mm チタンスクリューインプラントを埋入し、5-0 絹糸でインプラント頸部を結紮した。対照は結紮を行わないインプラントとした。0-28 日後に屠殺してインプラントを含む周囲組織サンプルを回収し、以下の計測を行った。マイクロ CT 解析および組織切片の染色像から、28 日間で歯槽骨レベルがインプラント先端に向けて 40-50%まで減少し、代わって結合組織の陥入がみられた。周囲組織には白血球やマクロファージなど炎症細胞の浸潤の増加に伴い破骨細胞数の増加が確認された。破骨細胞数は 21 日をピークに減少したが、いずれも対照群と比較して増加していた。周囲組織からの IL-1 および TNF-α の遺伝子発現は 7 日まで上昇したものの、その後は減少した。

インプラント周囲組織の破骨細胞数が、白血球数やマクロファージ数と同様な変化を示したことから、インプラント周囲炎では、炎症細胞によって炎症性サイトカインが分泌された結果、破骨細胞数が増加し、骨吸収が誘導される可能性が示唆された。これらの結果は、犬を用いた他の研究結果を支持するものであった。

以上より、マウス上顎骨に埋入したインプラントを結紮することによって、インプラント周囲炎が惹起される実験系が確立され、当該マウスのインプラント周囲炎部の病理組織学的所見から、破骨細胞の増加による歯槽骨の吸収が確認された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5210　号	NGUYEN VO Ngoc Trang
論文審査担当者	主　査　荒川　真一 副　査　原田　浩之　　坂本　啓	
論 文 題 目	Ligature induced peri-implantitis: tissue destruction and inflammatory progression in a murine model	

（論文審査の要旨）

インプラント治療は高い予知性と成功率を示す欠損補綴として確立している。しかしながら、その補綴装置へのプラーク沈着によってインプラント周囲炎が発症し、習慣、全身疾患さらに遺伝などの因子によって修飾され、骨結合の破壊がもたらされるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。現在、インプラント周囲炎に対する効果的な治療法は確立されておらず、当該疾患の発症・進行のメカニズムが明らかとなれば、インプラント周囲炎に対する効果的な治療法の開発につながる可能性がある。そこで、NGUYEN VO Ngoc Trang はインプラント周囲炎発症・進行のメカニズムの解明を目的として本研究を実施した。

本研究では、マウス上顎骨にチタンスクリューインプラントを埋入し、絹糸でインプラント頸部を結紮することによってインプラント周囲炎モデルを作製することを試みた。さらに当該マウスインプラント周囲炎誘発モデルを用いて、マイクロ CT 解析および組織切片の観察、さらには、RT-PCR を用いて炎症性サイトカインをコードする m-RNA の時系列での発現量の変化を検討した。なお、本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で実施された（承認番号 0150220A）。

本研究の成果は以下のとおりである。

1. マウス上顎骨において、絹糸でインプラント頸部を結紮することにより、インプラント周囲炎が発症した。
2. マイクロ CT 解析および組織切片の染色像から、歯槽骨の減少に伴って、結合組織の陥入が認められた。
3. インプラント周囲組織には、好中球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤の増加に伴い破骨細胞の増加が認められた。
4. RT-PCR の結果から、周囲組織に存在する細胞由来の IL-1 および TNF-αをコードする m-RNA の発現量の上昇が確認された。

これらの結果から、以下のことが考察された。

これまでマウスは、インプラント周囲炎モデルとして用いられていなかったが、本研究により当該動物に対してインプラント周囲炎を惹起することが可能となった。インプラント周囲炎発症・進行のメカニズムについては、インプラント周囲組織に存在する破骨細胞数が白血球数

やマクロファージ数と同様な変動を示した結果から、インプラント周囲炎では、炎症細胞の浸潤に伴って破骨細胞が増加し、結果として骨吸収が生じる可能性が示唆された。さらに、炎症細胞より分泌される炎症性サイトカイン IL-1 および TNF-α が、破骨細胞の増殖および骨吸収作用を誘導する可能性が明らかになった。これらの考察は理論的であり、論文中に明確に記載されている。

本研究においては、マウスに対してインプラント周囲炎を惹起する手法が確立された。これまでインプラント周囲炎研究では、サル、ミニブタなどが主に用いられてきたが、今後コストや扱い易さの面で優れたマウスを用いたインプラント周囲炎の研究が進行すると考えられ、高く評価できる。また、当該動物を用いた実験により、インプラント周囲炎の進行のメカニズムについて有用な知見が得られている。

これらの結果は、インプラント周囲炎の新規治療法の開発のみならず、インプラントの長期的予後に関わる骨結合の維持に対しての有用な知見であると考えられ、インプラント治療に関連する臨床歯学の発展に大きく貢献すると考えられる。

したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するにあたり十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	髙篠　奈美
論文審査担当者	主査　宇尾　基弘 副査　川口　陽子　　宮新　美智世
論　文　題　目	Effect of thermal cyclic stress on acid resistance of resin-infiltrated incipient enamel lesions in *vitro*

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

ICON®（DMG, Hamburg, Germany）はTEGDMA（トリエチレングリコールジメタクリレート）を主成分とするレジン形材料であり、初期齲蝕（ホワイトスポット）に浸透させ、脱灰の進行を抑制する機能を持った製品である。発売後、数年しか経過しておらずその臨床的耐久性は未知数である。そこで本研究は、臨床的耐久性を in vitro で推測することを試みた。一般に臨床的耐久性をインビトロで検討する場合、サーマルサイクル法（以下、TC）が採用されてきた。その理由は、材料が TC を受けると、材料の膨張収縮によりその機械的強度や化学的特性が比較的短期間で劣化し、材料と歯質の界面（以下、R-L 界面）が破壊されるためである。TEGDMA は比較的吸水性が高く、TC で変性や界面の破壊が起こる可能性がある。R-L 界面で破壊が起こると、その界面で gap が形成され酸の浸透を許し、歯質の脱灰が進行する。これまでの ICON に関する研究では、R-L 界面の gap 形成および酸抵抗性に与える TC の影響を検討した報告はなく、本実験はそれらを検証し、ICON の臨床的耐久性を推定することを目的とした。

＜材料と方法＞

1）試料作成

牛歯から 5×5×2 mm のエナメル質を切りだし、研磨紙で 2000 番まで研磨した。これをレジンに包埋後、エナメル質表面の 4 隅と包埋レジンをマニキュアで覆い、2×2 mm の窓を開け、試料とした。この試料を脱灰液（組成: CaCl2: 5.0 mmol/L, KH2PO4: 4.0 mmol/L, acetic acid: 50 mmol/L, NaN3: 0.02%, pH 4.8）に 19 日間、37℃で浸漬し初期齲蝕病変（表層下脱灰）を作成した。

2）ICON 塗布

上記の脱灰後、マニキュアを除去し、メーカー指定の方法で ICON を脱灰病変に処置した。すなわち塩酸ジェルを脱灰病変の表面に 3 分間塗布して脱灰病変の表層を溶解し、次いで蒸留水で 30 秒間洗浄後、エタノールにて脱水した。最後に ICON を塗布し、40 秒間光照射し、ICON 塗布と光照射を 2 回繰り返した。表面の未重合層はフッ素無配合のペースト研磨により除去した。

3）サーマルサイクル(TC)試験

ICON を塗布した試料を 3 群（各群 15 個）に分けた。A 群：TC なし、B 群：TC 5000 回、C 群：TC 10000 回とし、B と C 群は、5℃と 55℃の蒸留水に 30 秒ずつ試料を浸漬し、両温度のあいだの移動時間は 2 秒とした。コントロール群として、ICON 塗布をしていない試料（n=10）を用いた。

4）Ca 測定による ICON の脱灰抑制効果

A、B、C 群の各試料（各群 12 個）を 5 mL の pH4.5 の酢酸脱灰液に 37℃にて 7 日間浸漬して脱灰した。脱灰後、Ca イオン電極法にて ICON で被覆された試料から溶出した Ca 濃度を測定した。その際、ICON が塗布されていない部分からの Ca 溶出を防ぐため、エナメル質をマニキュアで覆って脱灰した。

5）微小エックス線法（TMR）による脱灰病変の深さとミネラル溶出量の解析

ICON 塗布前の脱灰病変、塩酸による表面処理後および 7 日間脱灰したコントロール群の病変深さを調べるため、各 5 個の試料で TMR（Transverse Micro-Radiography）分析した。それぞれの試料から約 120 µm の厚さの切片を作り、その切片の軟 X 線画像を撮像し、画像処理ソフトにて病変の深さとミネラル溶出量（ΔZ: vol% µm）を測定した。

6）SEM 観察と EDS 分析

R-L 界面の gap 形成の有無を調べるため SEM（走査型電子顕微鏡）観察し、同じ試料にてカルシウム（Ca）と炭素（C）の EDS（エネルギー分散型 X 線分光装置）による線分析を行った。約 2 mm に試料を切断し、切断面を鏡面研磨した試料について、SEM/EDS を用いて R-L 界面での gap 形成の有無を観察した。また EDS 分析でレジンの浸透深さを検討した。

7）SS-OCT 観察

走査型光干渉断層計（Swept-Source Optical Coherence Tomography: SS-OCT）を用い R-L 界面での gap の有無を観察した。空間内での深さ方向と水平方向の解像度は 11 µm と 17 µm であった。TC 前後にて同部位の観察を行うため、試料表面に線（マーク）を引きガイドとした。

8）統計処理

Ca 溶出量と脱灰後の pH に関してコントロール群、A、B、C 群の 4 群間で Wilcoxon の順位和検定による多重比較を行い、検定の多重性を避けるため Bonferroni 法を採用した。統計処理は PASW Statistics 18 （SPSS Inc., Chicago, IL, USA）を使用し行った。

＜結果＞

1）TMR による脱灰深さとミネラル溶出量の解析

塩酸処理前の TMR 像において、すべての試料でエナメル質表層下脱灰とその表層構造物の存在が確認され（n=6）、脱灰試料が初期齲蝕のモデルとして適切であることが確認された。その 病変の深さとミネラル溶出量（ΔZ）は、それぞれ 135 ± 34 µm、2065 ± 503 vol% µm であった。塩酸処理後（n=7）の病変の深さと ΔZ は、それぞれ 177 ± 32 µm、2902 ± 342 vol% µm であった。塩酸処理を行うと表層構造物は完全に除かれ、レジンの浸透を促進することが確認された。また脱灰の深さと ΔZ は増加していた。一方、7 日間脱灰したコントロール群にはエナメル質表層構造物がなく、病変の深さは 174 ± 10 µm、ΔZ は 10525 ± 948 vol% µm だった。ICON 処置群と比較し、強い脱灰を受けたことが確認できた。

2）Ca 測定による ICON の脱灰抑制効果

脱灰で溶出した Ca 量を計測した結果、A 群は 0.09±0.07 mg/cm^2、B 群は 0.08±0.05 mg/cm^2、C 群は 0.09±0.05 mg/cm^2、ICON 塗布してない群（コントロール群）は 4.82 ± 0.02 mg/cm^2 であった。ICON 塗布群（A, B, C 群）とコントロール群のあいだに有意差を認めた。コントロール群に対する ICON 塗布群の Ca 溶出の抑制率は 95.4%であった。一方、ICON 塗布群間（A, B, C 群）には有意差はみられなかった。

なお脱灰後の脱灰液の pH 変化を計測した結果、コントロール群と比較して ICON 塗布群では pH4.52 - 4.53 であり、元の pH 4.50 に近い値を示し、脱灰はほとんど起きなかったことが確認された。

3）SS-OCT 観察

A 群と B 群の SS-OCT 像では顕著な変化はみられなかったが、C 群ではレジン表面に白い点がみられた。これは後述の SEM 像における亀裂に相当するものであった。最も肝要な R-L 界面では、TC の直後および 2 回目の脱灰でも画像で確認できるような gap 形成は認められなかった。

4）SEM 観察と EDS 分析

低倍率（×200）と高倍率（×1000）の SEM 像では、B 群と C 群においてレジン表面に亀裂が認められたが、A 群では認められなかった。しかしながらこの亀裂は R-L 界面に達しておらず、TC の有無に関わらず R-L 界面における gap は観察されなかった。

SEM 像に対応して、レジン表面から脱灰病変底部までのカルシウム（Ca）と炭素（C）の EDS 線分析を行ったところ、レジン塗布部分では C の検出深さから ICON の浸透深さは約 180 ± 30 μm と推定された。この値は TMR 測定された脱灰病変の深さ（177 ± 32 μm）と類似していた。

＜考察＞

本実験で用いた脱灰液は pH4.5 の酢酸緩衝液であり、Ca とリン酸イオンを含まず、7 日間の連続脱灰に使用した。これは in vivo では起こりにくい厳しい脱灰条件であり、コントロール群の TMR 像では表層が完全に消失していた。一方、ICON 処置による Ca 溶出の抑制率は 95.4%であり、脱灰の抑制効果が非常に高いことが示唆された。また本実験では B 群と C 群における Ca 溶出量に違いがみられなかった。このことから 10000 回以上の TC でも脱灰抑制効果が持続する可能性が示唆された。

このレジン浸透材による高い脱灰抑制効果は、SEM と SS-OCT 像において R-L 界面で明らかな gap が認められなかったことから裏付けられる。しかしながら、3 つの ICON 塗布群でわずかであるが Ca の溶出が検出された。その理由として、レジンが脱灰病変に完全には充填されなかったこと、あるいは光重合時のレジンの収縮による影響が推察された。これらの結果と推察は、ICON が長期間、酸に曝されると酸の浸透を許す可能性が否定できないことを示している。

ICON の主成分 TEGDMA 分子は、MDP や 4-META のようにアパタイトに化学結合する機能性モノマーではない。しかしながら本実験では、TC の影響を受けながらも高い脱灰抑制率を得ることができた。これは、TEGDMA 分子に存在するカルボニル基（C=O）が水素結合を形成する性質を有するため、アパタイト結晶の水酸基（OH）もしくはアパタイト表面の Stern layer（固体に近い水分子の層）に存在する水分子の OH 基と水素結合するためと思われる。また、脱灰に

より疎になったエナメル質脱灰表面にICONの低粘性レジンが深く浸透し、強い機械的嵌合を起こす可能性も考えられる。

De Munckらは、歯質と材料の界面で化学的な変性が起こる理由として、①温水による分子の加水分解もしくは未重合レジンのオリゴマーの分解促進と、②温度による材料の膨張収縮が歯質より高く、界面において破壊が起こる可能性を指摘している。これらは亀裂やR-L界面でのgap形成につながる可能性がある。しかしながら本実験ではgap形成は認められなかった。その理由として下記の①，②が推定される。①脱灰病変内では、脱灰で小さくなったエナメル質結晶をICONが覆う状態になると思われるが、両者の存在比率は脱灰の上部から下部にかけて段階的であり、脱灰の上部ではICONが多く、底部ではICONが少なくなる。すなわち脱灰底部では脱灰の影響とレジンの浸透は少ないため、ICONの浸透に富んだ脱灰表層部と比較しより健全エナメル質に近く、その結果、脱灰底部ではレジンの熱膨張収縮の影響が少なくなる可能性がある。この推察は、フィラー含有が多いハイブリッドコンポジットレジンの場合、このレジンと歯質とは近似した熱膨張係数を示したとする他の研究者らの結果から支持される。また、②TEGDMA分子には、温度変化と酸性環境下で加水分解性などの化学結合の破壊を起こすような結合が含まれていないこと（化学的に安定な分子であること）も、gap形成を起こさなかった理由と考えられる。

今回、TCによってR-L界面のgapが形成されれば、SS-OCTを用いてgapを検出できると思われ、その目的でSS-OCTによる観察を行った。事実、本教室の他のグループが行った同様なTC条件下での研究において、SS-OCTを用いてgap形成を観察しており、共焦点レーザー顕微鏡においてgapの存在を確認している。またSS-OCTは脱灰による屈折率の変化を計測することができ、脱灰程度の評価にも有用であるとの報告がある。今回の実験では、TCの有無に関わらず、ICON塗布群において2回目の7日間の脱灰後にR-L界面での屈折率の増加はみられなかった。このことから、R-L界面での脱灰進行はほとんど起こらなかったと推察される。この推察は、コントロール群と比べICON塗布群でCa溶出量が極めて少なかった結果からも支持される。

＜結論＞

ICON処置された初期齲蝕は、TCの影響を受けてもR-L界面でのgapが形成されにくく、また高い脱灰抵抗性を示したことから、臨床的耐久性は高いと推察された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5211　号	髙篠　奈美
論文審査担当者	主　査　宇尾　基弘 副　査　川口　陽子　　宮新　美智世	
論 文 題 目	Effect of thermal cyclic stress on acid resistance of resin-infiltrated incipient enamel lesions in *vitro*	

（論文審査の要旨）

近年の齲蝕治療は歯質の切削を極力回避する傾向にあり、特に初期のエナメル質脱灰病変に対してはフッ化物等による再石灰化治療が行われている。しかしながら一般に脱灰病変はカリエスリスクが高く、さらに進行すると再石灰化治療は困難になる。ICON®は TEGDMA を主成分とするレジン系材料であり、脱灰エナメル質に浸透し、齲蝕の進行抑制を目的として開発され、新しい治療法として注目されている。しかしながら ICON®の歯質への浸透性と脱灰抑制効果は明らかではなく、その正確な情報が望まれている。また光干渉断層計（OCT）は近赤外光を用い、非侵襲的に組織の断層画像を得る機器であり、初期齲蝕の診断や接着性修復物の非破壊検査への応用が期待されている。本研究は、新たな齲蝕治療の概念を基盤として開発されたレジン系材料の登場と、画像診断機器の開発を背景に計画され、実行したものである。

実験は牛歯エナメル質を用いて脱灰病変を作成しているが、脱灰抵抗性の評価を目的とし、個体差の少ない均一な試料条件が要求される本実験において、妥当な選択といえる。エナメル質脱灰病変は過去の文献を参考に牛歯エナメル質を 19 日間脱灰し、表層下脱灰病変の作成に成功しており、申請者が周到な準備の上、本実験を遂行したことが窺える。

また、新規レジン系材料の脱灰抵抗性を評価する上で熱サイクル負荷を加え、その影響を検討しているが、新しい試みとして評価することができる。特に TEGDMA を主成分としたレジン系材料は熱膨縮による劣化と吸水による影響が懸念されることから、臨床的にも興味深い内容となっている。熱サイクル負荷は 5000 回と 10000 回行っており、正確な情報を得るための慎重な姿勢をみることができる。

実験の評価法として熱サイクル負荷後に試料を再度脱灰し、溶出した Ca をイオン電極法にて測定し、脱灰抵抗性を評価している。また試料のミネラル密度の変化を TMR 法により計測している。いずれも専門性の高い試験法であり、高度な研究遂行能力が要求される。レジン浸透材のエナメル質への浸透性を EDS 分析により観察していることも高く評価することができる。

エナメル質表層化脱灰の状態と、熱サイクル負荷後ならびに脱灰処理におけるレジン系浸透材の変化を、OCT を用いて非破壊で観察しているが、臨床に用いる上で新規性の高い情報を提供している。

本研究から得られた主な結果は以下のとおりである。

1．Ca イオン電極法によりレジン浸透材の効果を計測した結果、有意に脱灰を抑制することができ、熱サイクル負荷による影響はみられなかった。

2．OCT を用いてレジン浸透材の状態を観察した結果、脱灰の進行は抑制され、レジン浸透材の剥離やギャップの形成はみられなかった。

3．EDS 観察によりレジン浸透材の浸透性を計測した結果、TMR により得られたエナメル質の脱灰深さとほぼ一致しており、レジン浸透材の高い歯質浸透性を確認することができた。

本論文の考察は、実験で用いた脱灰条件と臨床における状態の比較、レジン浸透材の化学的組成から推察される脱灰抑制効果、歯質浸透性と熱膨縮の影響、OCT によるレジン浸透材と脱灰の評価の妥当性などから構築され、いずれも過去の文献の結果と対比しながら理論的に実験結果を分析しており、興味深い内容となっている。

以上より、申請者 髙篠奈美が本研究領域において最先端の計測技術を駆使し、レジン浸透材によるエナメル質脱灰抑制効果に関して新たな評価を行い、臨床技法の開発に資する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	堀江　圭
論文審査担当者	主査　倉林　亨 副査　宇尾　基弘　　永井　亜希子
論　文　題　目	Monitoring of cariogenic demineralization at the enamel-composite interface using swept-source optical coherence tomography

（論文内容の要旨）

〈緒言〉

修復物周囲に発症するう蝕（二次う蝕）は、臨床において再治療が必要となる主な原因として知られている。近年のコンポジットレジン修復においても重合収縮やボンド層の劣化が生じう蝕を誘発することから、良好な窩壁適合性は安定した長期予後を得るために重要である。

修復物周囲のう蝕は従来の視診、触診、X 線による早期発見が困難であり、病変が進行してから発見されることが多く、予防的管理や最小限の侵襲による治療を実現するために、精度の高い診断技術の開発が必要不可欠である。人体に無害な近赤外光を用いた波長走査型光干渉断層計（Swept-Source Optical Coherence Tomography、SS-OCT）は、非破壊で組織の精密断層像を得ることができ、過去の研究では修復物周囲のう蝕やギャップに対する SS-OCT 観察の有用性が示されている。SS-OCT に関する研究で人工脱灰溶液による修復物周囲の脱灰評価は行われてきたが、う蝕病原性細菌のバイオフィルムを用いた脱灰評価は極めて少ない。そこで本研究では、接着修復物周囲のう蝕の形成機序を解明するため、人工口腔装置（Oral Biofilm Reactor、OBR）を用いて in vitro の条件で修復物にバイオフィルムを形成させ、う蝕病原性細菌による脱灰病変の形成過程を SS-OCT により観察した。また共焦点レーザー走査型顕微鏡（Confocal Laser Scanning Microscopy、CLSM）を用い、SS-OCT から得られた結果と比較した。

〈方法〉

本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認のもと、冷凍保管したう蝕や破折のみられないヒト抜去第 3 大臼歯 60 本を実験に使用した。抜去歯の頬側歯冠中央部から縦 5 ㎜、横 5 ㎜、深さ 3 ㎜の試片を作成し、エナメル質側にダイヤモンドバーを用いて皿状窩洞（直径約 2 ㎜、深さ約 1 ㎜）を形成した。試片を 2 つの群に分け、それぞれ Clearfil SE Bond (Kuraray Noritake Dental) と Clearfil Tri-S Bond ND (Kuraray Noritake Dental) を用い、メーカーの指示通りに処理を行い、Estelite Flow Quick (Tokuyama Dental)を充填し、20 秒間光照射した。その後#1500 耐水研磨紙にて表面を研磨し、試料とした。すべての試料の脱灰前の窩壁の状態を SS-OCT を用いて観察し、画像を撮影した。

供試細菌として *Streptococcus mutans* MT8148 (*S. mutans*)を用い、Brain Heart Infusion 液

体培地にて培養後、リン酸緩衝液中で洗菌し、再懸濁した細菌懸濁液を準備した。次に試料を OBR に設置し、OBR 内部温度を温水循環にて 37℃に維持し、pH センサーによる管理下で細菌懸濁液、リン酸緩衝液、スクロース含有 Heart infusion（HI）液体培地を 20 時間滴下し、スクロース依存性のバイオフィルムを試料表面に形成させた。バイオフィルム形成後 1 週間、2 週間、3 週間の実験群に試料を分け、HI 液体培地を用いて 37℃でインキュベートし、その後コンポジットレジン修復物周囲のエナメル質の脱灰状態を SS-OCT により観察した。

窩縁部エナメル質に生じた脱灰の深さと修復物周囲のギャップの長さを測定するために、画像処理ソフト ImageJ を用いて SS-OCT 画像を 2 値化した。脱灰深さの測定部位として、修復物マージン部から歯質方向に 50 μm 離れた歯冠側ならびに歯頸側のエナメル質部位を抽出した。また修復物の界面に沿って侵入した脱灰深さと、修復物接着界面に生じたギャップの深さを測定した。それぞれの測定値からコンポジットレジン修復物の窩洞の深さに対する百分率（%）を算出し比較した。またギャップを生じた試料数を計測した。SS-OCT 画像の比較対照として、試料をエポキシレジン包埋後に半切し、切断面のエナメル質の脱灰と接着界面のギャップの状態を CLSM（×1250）により観察した。

得られた結果は統計分析ソフトウェア（SPSS）を用いて評価を行った。SS-OCT 画像と CLSM 画像の比較として Pearson 相関分析を行い（$\alpha = 0.05$）、また脱灰深さの測定値は Student's t-test により評価した（$\alpha = 0.05$）。さらにギャップの発生頻度については Fisher's exact test を（$\alpha = 0.05$）、ギャップの長さについては Wilcoxon rank sum test with Bonferroni correction を行った（$\alpha = 0.008$）。

〈結果〉

SS-OCT 画像では、エナメル質の脱灰は輝度の上昇部として観察することができ、エナメル質の脱灰深度とギャップの深さを CLSM 画像と比較した結果、すべて有意な相関が得られた（$p < 0.05$）。修復物窩縁から 50 μm 離れたエナメル質の脱灰深さは、Tri-S Bond ND と SE Bond の間で有意差はみられなかったが（$p > 0.05$）、どちらの接着材においても歯頸側の脱灰が歯冠側よりも深く進行していた（$p < 0.05$）。また接着界面における脱灰の侵入深さは Tri-S Bond ND が SE Bond よりも有意に深く（$p < 0.05$）。また歯冠側のほうが歯頸側よりも深く侵入していた（$p < 0.05$）。

また SS-OCT 画像では、接着界面におけるギャップの形成を白線として観察することができ、CLSM 画像でのギャップとほぼ一致していた。ギャップの長さは脱灰 1 週間と 2 週間の群で有意な差はみられなかったが、脱灰 3 週間では Tri-S Bond ND の歯冠側において有意に長かった（$p < 0.008$）。ギャップ形成がみられた試料数を比較すると、Tri-S Bond ND では歯冠側と歯頸側のどちらの部位でも有意なギャップの増加がみられた（$p < 0.05$）。SE Bond では歯冠側の脱灰 2 週間と 3 週間において有意な増加がみられたが（$p < 0.05$）、歯頸側では有意な増加はみられなかった。

〈考察〉

本実験においてコンポジットレジン周囲にう蝕病原性バイオフィルムを作用させ、人工的にエナメル質窩壁にう蝕を作成することができた。SS-OCT を修復物境界と周囲エナメル質の観察に

用いると、脱灰エナメル質は後方散乱光による輝度の上昇部位として識別することができた。本実験ではバイオフィルムを作用させたすべての試料において修復物周囲にエナメル質脱灰を生じ、SS-OCT 画像における輝度の上昇部は CLSM 画像でのエナメル質の脱灰部とほぼ一致していた。

Tri-S Bond ND ならびに SE Bond における歯頸側エナメル質は、歯冠側と比較して有意に深く脱灰が進行していた。バイオフィルムは試料表面に均一に形成され、脱灰条件は同一であることから、脱灰深さの違いはエナメル質の構造による影響と考えられる。歯頸側エナメル質はミネラル密度が低く、炭酸イオンやマグネシウムの密度が高いと考えられている。炭酸塩は PO_4^{3-}部に CO_3^{2-}基が置換されたタイプ A 炭酸塩アパタイトと OH^-基に CO_3^{2-}基が置換したタイプ B 炭酸塩アパタイトがあり、アパタイト格子に存在する炭酸イオンは化学的な安定性を低下させるため、う蝕感受性を高めると考えられる。またカルシウムのマグネシウムへの置換は、エナメル質の形成を阻害するといわれている。

一方、歯冠側における修復物境界に沿った脱灰の侵入は、歯頸側よりも有意に深かった。エナメル質の部位における破壊強度は異なり、エナメル小柱の縦断面における破壊強度は低く、接着強さも低くなることが報告されている。本実験では歯冠側エナメル質の窩壁面はエナメル小柱の走行に対してほぼ平行であり、脱灰の侵入に影響を与えたと考えられる。

また本研究の SS-OCT 画像から、窩洞に沿った白線が観察され、バイオフィルムの脱灰により修復物との界面にギャップが形成されることがわかった。*S. mutans* はコンポジットレジンとボンド層を加水分解するエステラーゼ活性を持つことが報告されている。また酸性モノマーを含むセルフエッチングアドヒーシブは吸水しやすく、接着界面の劣化に影響する。Tri-S Bond ND では歯冠側と歯頸側のギャップの形成頻度が有意に増加し、SE Bond では歯冠側でのみ 2 週間と 3 週間の群で有意にギャップが増加していた。one-step adhesives は two-step adhesives よりも吸水性と溶解性が高いことが知られており、ボンド層の吸水量が脱灰後のギャップの頻度に影響していると考えられる。*S.mutans* のエステラーゼが修復物境界部における細菌的侵襲にどのように機能しているかは詳しく解明されていないが、細菌の酵素が接着界面の劣化を高めている可能性がある。

Tri-S Bond ND は SE Bond よりも修復物境界における脱灰が深かったが、one-step adhesives は水分を透過しやすく吸水しやすく、two-step adhesives よりも接着強さが低くなることが報告されており、結果的に Tri-S Bond ND の脱灰が進行したと考えられる。また Tri-S Bond ND では、3 週間の脱灰で歯冠側におけるギャップの長さが有意に長くなっていた。エナメル小柱間は剥離しやすく亀裂を生じやすいことから、歯冠側におけるエナメル小柱が平行に走行していた場合、ギャップの形成が深くなる可能性がある。

近年の接着修復材料は優れた結果をもたらしているが、修復物境界部のう蝕は依然として大きな課題として残されている。本研究では、SS-OCT はコンポジットレジン修復周囲のう蝕原因菌によるエナメル質の脱灰を観察することができ、修復物周囲のう蝕の早期発見に有効と考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5212　号	堀江　圭
論文審査担当者	主　査　倉林　亨 副　査　宇尾　基弘　　永井　亜希子	
論 文 題 目	Monitoring of cariogenic demineralization at the enamel-composite interface using swept-source optical coherence tomography	

（論文審査の要旨）

修復物周囲のう蝕は再治療となる主な原因であり、修復物の適切なメインテナンスの確立とう蝕の早期発見は大きな臨床課題となっている。しかしながら、修復物周囲のう蝕の発症と進行の機序は明らかではなく、その解明は修復物周囲のう蝕の予防法を確立する上で必須な情報といえる。光干渉断層計（OCT）は光の干渉作用を利用して非侵襲的に組織の断層画像を得る技術であり、歯科領域においてう蝕の診断や修復物の非破壊検査への応用が期待されている。本研究は修復物周囲の、う蝕の発症機序の解明を目的として計画されたものであり、う蝕病原性細菌のバイオフィルムを作成し、臨床に近い条件で修復物周囲のエナメル質を in vitro で脱灰し、モニタリングを行ったものである。

実験はヒト抜去歯の歯冠部歯質に窩洞形成、コンポジットレジンを充填し、*Streptococcus mutans* とスクロース溶液の滴下によってう蝕病原性バイオフィルムの形成と *in vitro* の脱灰エナメル質の作成に成功している。う蝕細菌に関する専門的な知識と高い技術が要求される実験であり、申請者が周到な準備のもと実験を行ったことが推察される。接着材として one step 接着材の Tri-S Bond ND と two step 接着材の SE Bond を採用しているが、臨床で広く用いられる材料でかつ組成も類似しており、比較に適した選択といえる。使用した OCT は波長走査型 OCT（SS-OCT）であり、他の OCT よりも画像深度が深く、画像処理を行いながらエナメル質の脱灰深さを評価している。バイオフィルムによる脱灰は１週間、２週間、３週間の３期間行い、SS-OCT 画像による観察結果を CLSM 画像と比較しており、慎重な検討が行われている。

エナメル質の観察は、歯冠側と歯頚側の窩縁部の脱灰深さを計測し比較しているが、エナメル質の解剖学的形態を配慮したものであり、評価することができる。また使用した接着材の特性に着目し、接着界面のギャップの評価を試みており、本実験の新規性を高めている。

得られた主な結果は、次のとおりである。

１．SS-OCT を用いることにより、コンポジットレジン修復周囲のバイオフィルムによるエナメル質の脱灰を観察することができた。

２．歯頚部エナメル質の脱灰は、歯冠部エナメル質の脱灰よりも深く進行したが、コンポジットレジン修復に沿った脱灰の進行は歯冠側エナメル質のほうが深く、特に one step 接着材の

Tri-S Bond ND にその傾向が強くみられた。
３．バイオフィルムによる脱灰の結果、コンポジットレジン修復の接着界面にギャップの形成がみられた。

本論文の考察はエナメル質の脱灰とギャップの形成について理論的に構築されており、SS-OCT によるエナメル質の脱灰の観察とその理論的背景、歯冠部エナメル質と歯頚部エナメル質のハイドロキシアパタイト結晶構造の違いによるう蝕抵抗性の変化、窩洞の形態とエナメル小柱の走行による影響、ボンド層の加水分解と細菌による影響など様々な因子について理論的に展開しており、本実験系における修復物周囲の脱灰の発症機序を考察する上で説得力が高く、臨床的にも興味深い内容となっている。以上より、申請者　堀江圭が本研究領域において修復物周囲のう蝕の発症機序に関する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学、歯科診断学の発展に寄与すること大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定された。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	賴　威任
論文審査担当者	主査　高橋　英和 副査　若林　則幸　　堤　祐介
論　文　題　目	Development and modification of a device for three-dimensional measurement of orthodontic force system: The V-bend system re-visited

（論文内容の要旨）

Introduction

The application of force with optimum magnitude is of importance in orthodontic treatment. The optimal orthodontic force must be large enough to overcome the threshold of resistance from the periodontal ligament and bone and maximize the rate of tooth movement, but not too large to cause adverse effects. The moment of the force acting on the tooth is another important issue that additional counter moment is required to produce bodily movement or root movement.

A variety of force-generating systems are used in modern orthodontic treatment. In order to evaluate a system's performance, an objective standard is needed to determine whether the optimal forces and moments are being generated. This requires the measurement of both forces and moments in six spatial components. To obtain actual measurements, Friedrich et al. attempted to fabricate an apparatus that allowed intra-oral measurement; Lapatki et al. designed a smart bracket system with encapsulated microelectronic sensor chips; Badawi et al. developed an orthodontic simulator (OSIM) that incorporates multi-axis force sensors and an artificial dental arch.

The original OSIM device consists of a large sensor apparatus mounted around the artificial dental arch, which limits the accessibility of the arch when orthodontic adjustments are required. Therefore, the analysis of orthodontic force systems with multiple wire-bending patterns or loop designs that require frequent wire application and removal is difficult with the OSIM. The aim of this study was to modify the OSIM design and assess its effectiveness and reliability in acquiring measurements from a V-bend system.

Materials and Methods

Design of measuring device

The device consists of two six-axis sensors and cylindrical artificial teeth composed of an acrylic compound. The sensors and teeth were connected by a custom-made joint that we refer to as an "action stick". The action stick was necessary because the sensors are too large to fit

within the dental arch together. It was designed to be positioned oblique to the tooth axis, thus providing sufficient clearance for the sensors. They were composed of aluminum to ensure sufficient rigidity. Self-ligated brackets were bonded to the teeth using a self-curing dental adhesive resin cement. The two bracket slots were oriented in a straight line, parallel in all three planes. The inter-bracket distance (designated as "L" hereafter) was set at 8 mm.

Calibration procedure

The sources of error in this device could be classified as the errors associated with the sensor itself, and the errors associated with the transmission of the force and moment through the action stick. The former is provided by the manufacturer; the latter was determined by a calibration procedure of our devising. This procedure was performed under a test stand that can generate forces through an exclusive jig and force gauge. These calculations were based on the method and theory described in the original OSIM study. The overall errors were 2.06% for force and 2.0% for moment. These values indicate that the error was limited and was equivalent to the error rates reported for the original OSIM.

Calculation procedure

To derive the final values from the sensor readings, the calculations involved a combination of vector analysis and rotational coordinate transformation.

Experimental procedure

The V-bend system was evaluated in this study. Two common types of commercial orthodontic wires, stainless steel (SS) and beta titanium (TMA) were tested. For each material, three samples were measured. The degree of the V-bend was 20° in all cases. These wire samples were then set into bracket slots by passive ligation. Measurement was performed when the V-bend was located at 1/4L, 1/3L, 1/2L, 2/3L, and 3/4L of the inter-bracket distance between the two teeth.

Results

The V-bend tested in this study was activated to give a second-order (mesial or distal tipping) moment (My); vertical forces (Fz) were also generated due to equilibrium.

The measurements varied according to the bend location: at 1/2L, Fz was 0 for both teeth and the absolute values of My were identical, though the directions were opposite; at 1/3L and 2/3L, the value of My was close to 0 for the nearer tooth; at 1/4L and 3/4L, the moment was slightly reversed from the original direction of bend activation. These results were consistent with the findings in previous reports. The forces and moments generated by the TMA wire were less than half the values obtained with the SS wire, because the stiffness of TMA is approximately 40% that of SS.

Discussion

The incorporation of the force sensor is a key consideration in the development of a device for the measurement of orthodontic forces and moments. Rosarius and Friedrich's system linked sensors to the multibracket side of the device instead of to the tooth side to allow in vivo

measurement though the system was ethically questionable. The smart bracket system, incorporating multiple micro-sensor chips, is an excellent innovation that successfully transforms the stress signals to the moment component though it is unlikely to become widely due to its high cost. Six-axis sensors allow also for moment measurement, though the currently available ones are still larger than real teeth. Connecting the sensors directly to artificial teeth and brackets using a straight stick is an intuitive method. Nevertheless, it cannot be expanded to the full arch because multiple sensors will impinge on each other. The OSIM was developed with a focus on the adjustment of the location of the artificial teeth. However, this approach reduces operability in the dental arch, as described in the introduction.

On the other hand, although the straight-wire technique and the use of a pre-adjusted bracket system is becoming popular in contemporary orthodontics, plain wire is not appropriate in all clinical situations, and the mechanics described here are effective for local, fine control of tooth movement. Therefore, in this study, our main purpose was to modify the OSIM such that it could be conveniently used for orthodontic devices that incorporate the bended wire or loop, which requires setting the wire into the slot and removing it multiple times. The main feature of our design was the use of a modified L-shaped linking structure ("action stick") that allowed us to place the sensors inside the artificial arch, leaving the external surface exposed, thus increasing the operability. The introduction of the action stick required several matrix transformations; these equations have not been described in previous studies. Because the angle, length, and height of the action stick can be adjusted, our design can be applied to models with any number of artificial teeth. However, when using our device, any alterations in tooth position would require recalculation of the new coordinate system, which can be time-consuming. Therefore, investigators should consider the objectives of their study when deciding which OSIM design is more appropriate, in other words, whether the device needs to accommodate multiple wire adjustments or repeated variations in the tooth position. Moreover, our device was still effective even in the comparatively low-stiffness material that produced lower magnitude forces.

Conclusions

A modified design of an orthodontic measuring device allowing greater operability on wire settings was evaluated. Through the introduction of the action stick, the problem of the sensor size was resolved and the transformation equation and theory for this design was detailed. The precision of this device was acceptable and the effectiveness was confirmed by testing the V-bend. Moreover, this device could be expanded to evaluate different numbers of teeth.

＜和文による要約＞

矯正歯科治療において適切な矯正力を用いることは重要である。様々な治療メカニクスが歯に与える力やモーメントを計測する試みは多く行われてきたが、その多くは高価な装置や高度の技術を用いて模式的に行われ、実際に歯に作用する力とモーメントの同時計測は困難であった。近年小型化された六軸センサーを用いた計測が行われるようになったが、依然としてセンサーは歯のサイズよりも大きく、模擬歯列の外周に六軸センサーを配置した計測装置を用いた先行研究では、矯正ワイヤーの着脱が困難であり操作性に難がある。そこで我々は、カスタムメイドの連結部分（作用棒）を用いることによりセンサーを歯列内周に配置できるよう改良し、実寸大の歯列模型における計測を可能にした。この計測モデルは精密に校正され、高い精度を有するとものと思われる。作用棒導入による測定値のずれに関しては、ベクタル分析および回転座標変換を経てセンサー部の読み値から模擬歯部へと換算できる。さらに、この計測システムの有用性を検証するため、矯正歯科臨床で用いられている古典的な力系の一つであるＶベンドについて検討したところ、先行研究と同様の結果を得られたので、装置の正確性が証明された。本研究では模擬歯二本のモデルを用いたが、作用棒の角度や長さの工夫により、全顎の歯列に対応することも可能である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5213　号	賴　威任
論文審査担当者	主　査　高橋　英和 副　査　若林　則幸　　堤　祐介	
論 文 題 目	Development and modification of a device for three-dimensional measurement of orthodontic force system: The V-bend system re-visited	

（論文審査の要旨）

矯正歯科治療における力の測定は古くから重要視されている。過大な矯正力は治療中の疼痛を増大し歯根吸収などの望ましくない合併症を引き起こすだけでなく、歯の移動速度を低下させる可能性もある。また、力とモーメントの強度や方向は歯の移動様式に大きな影響を与え、モーメントコントロールの不足は傾斜移動などの不適切な移動様式を招くことになる。そのため、臨床状況に応じて最適な矯正力を用いるために力・モーメントを定量測定することは重要なことであり、矯正歯科治療の質の向上につながる。しかしながら、実際の臨床で使用されているのは簡単なばねばかりであるなど測定手段が乏しく、可能な測定値も 1 軸方向の力に限定される。加えて、マルチブラケット装置による治療では影響要素が極めて多いため、実質上精密な測定は不可能であり、わずかな条件の変化によりフォースシステムが大きく変わる可能性がある。その結果、矯正歯科治療は術者の感覚と長年培われた経験を頼ることになる。このような理由から、矯正力に関する先行研究では数学的・統計的手法を用いたコンピューターシミュレーションが多く、実測した例は少ない。先行研究の中で Orthodontic simulator (OSIM) は、14 歯を配し 6 軸センサーによる計測を実現しているが、そのオリジナルデザインでは模擬歯列は装置全体の内周に位置しているため、歯列に矯正装置を装着する際には外側に位置するセンサーおよびその他コード類の補助パーツが妨げとなる。本研究では OSIM 原理のもと、操作性向上のための改良を施した新たな測定装置の開発ならびにその精度と有効性を検証することを目的とした。

本研究の測定装置の構造は、模擬歯列、六軸力覚センサーならびにこの両者を繋ぐ action stick によって構成される。模擬歯列は相隣の下顎小臼歯を想定した二歯モデルである。日本人の歯冠幅径を参考とし、両ブラケット間の距離を 8mm と設定した。本研究はオリジナル OSIM の操作性を上げるため、センサーを外周から内周に変更したものであるが、直径 18mm の最小のセンサーを使用しても、センサーのサイズが実際の歯間距離より大きく、模擬歯列の内側に収まるのが不可能であった。そこで、カスタムメイドの action stick を作製し、これを介して二つの模擬歯を適切な距離に設定したところの着眼点は注目すべきものである。また、測定はセンサー部にて行われるため、action stick を導入すると、模擬歯部の測定値は変換する必要がある。変換のプロセスはベクトル分析と回転座標変換の二つの計算過程があるが、これに対し詳細かつ明瞭な説明を行えたことは本人の深い理解と知識を示している。装置の誤差

に関して独自のキャリブレーションを行った結果、誤差は限定的な値を示し、オリジナルOSIMとほぼ同じ精度を有することが確認された。
次に、この改良型OSIMの有効性と精度を検証するため、古くから歯科矯正臨床において用いられており、作用も良く知られている単純なforce systemであるVベンドをモデルに選定したことは理に適っており、過去の研究と一致した結果が明確に示された。したがって、装置の有用性が証明されたとともに、ベータチタンワイヤーでも同様の結果が得られたため、低荷重の矯正ワイヤーでも精確に評価できることが確認された。考察では一連の力学測定装置について比較検討し、本研究の利点および欠点を明らかにした。オリジナルOSIMに関しては、口腔内の測定はできないものの、実寸大の歯列モデルを再現することにより、技術と価格の障壁を軽減したことを評価している。オリジナルOSIMではワイヤーの着脱などの操作は困難であるが、模擬歯を移動させて様々な歯列をシミュレートすることが容易である。一方、本研究の設計コンセプトでは、ワイヤーとブラケットを組み合わせた複雑な力系の解析には有利であるが、模擬歯の移動は困難である。したがって、目標とする力系の解析に応じて、オリジナルOSIMと本研究のデザインとを選択すべきであるという結論に至った。本研究の測定装置は二歯のみのモデルであるが、着想の秀逸な点は、action stickの長さや高さ、そして角度を工夫することにより、全顎モデルの製作にも対応できるところである。

以上より、本研究の特色は、実寸大の全顎模擬歯列を作製することを可能にし、そこに矯正装置を装着することで、ワイヤー調節など様々の操作が臨床同様に行えることである。改良型OSIMを用いることにより、頻繁な調整を伴うワイヤーの着脱にも対応し、かつ簡便に測定ができる。また、測定装置を内周に配置したことから、実際の歯列と同様の感覚で術者は操作を行うことができる。したがって、治療メカニクスの力学的な解析に関する研究のみならず、若手矯正医の臨床トレーニングにも応用することができる。この成果は、ワイヤーやブラケットなどの材料・器具の評価、そして矯正治療のプロセスの効率化、さらには矯正歯科医の技術向上ならびに臨床教育にも大きく寄与するものと推察される。

本研究は、先行研究の結果を十分に検討した上で綿密な計画に基づいて行われ、頼威任の熱意と創意が高く評価できるものであり、博士（歯学）の学位申請に十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	千葉　彩香
論文審査担当者	主査　宇尾 基弘 副査　由井 伸彦、岡田 大蔵
論　文　題　目	The influence of elastic moduli of core materials on shear stress distributions at the adhesive interface in resin built-up teeth.

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

近年、根管処置歯の修復に広く用いられているファイバーポスト・コンポジットレジン支台築造法は、重篤な歯根破折などのトラブルを回避することができると報告されている。これは、以前より用いられてきた鋳造メタルコアや既製金属ポストと比べ、象牙質に近い弾性率をもつファイバーポストおよびコンポジットレジンを用いることで、ポスト先端部における応力集中を軽減できることによるとされている。一方で、実際に市販されているコンポジットレジンの弾性率は6000~17000MPa と、象牙質の弾性率 18000MPa より低く、コンポジットレジンの弾性率がレジン支台築造歯の内部応力分布にどのような影響を与えるかについての報告は少ない。また、ファイバーポストはコア部の保持を増強し、レジンポストコアの機械的性能を向上させるとされているが、ファイバーポスト埋入は支台築造歯の破壊強度改善には繋がらないこと、また根管壁象牙質への接着性能を低下させるという報告もあり、その有用性について議論がなされている。

そこで本研究の目的は、有限要素法を用いて、レジンポストコアおよび歯根の内部、さらに両者の接着界面に生じる内部応力分布の解析を行い、ファイバーポスト埋入の有無およびコンポジットレジンの弾性率が及ぼす影響の検証を行うこととした。

＜方法＞

根管治療後の下顎第一小臼歯をモデルに、歯根、歯根膜、歯槽骨、根管充填材、レジンコアおよびセラミッククラウンからなる三次元ボリュームを製作した。クラウンの高さは 6mm とし、支台築造歯にフェルールは設置しなかった。ポスト窩洞は歯頚部で直径 2mm、ポスト窩底部で直径 1.8mm、深さ 6mm と設定し、そこに直径 1.7mm のファイバーポストを埋入したモデルと埋入していないモデルを作成した。各部は接着していると仮定し、弾性係数とポアソン比は報告されている実験値を引用した。象牙質の弾性率はこれまでの報告から 18,000MPa、コンポジットレジンの弾性率は 12,000/18,000/24,000MPa の 3 種類に設定した。各部は線形弾性等方性物質としたが、ファイバーポストのみ異方性物質とし、横方向 9,500、縦方向 37,000MPa に設定した。各モデルは近遠心で対称設定とし、約 125,000 の六面体要素に分割した後、歯軸方向から頬側に 45°傾斜した 400N の荷重をクラウン頬側咬頭頂に負荷し、有限要素解析を行った。レジンポス

トコアおよび歯根内部の相当応力分布を精査し、最大相当応力を算出した。またレジンコアと歯根の接合界面におけるせん断応力分布を精査し、最大せん断応力を算出した。

＜結果＞

レジンコアにおける相当応力は舌側歯頚部に最大の応力集中がみられたが、コンポジットレジンの弾性率およびファイバーポスト埋入の有無に関わらず、その値はほぼ等しかった。一方で、高い相当応力を示した面積はコンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ広くなった。さらにファイバーポストを埋入したモデルでは、コア部中央におけるファイバーポスト側コンポジットレジン表面にも相当応力の集中が見られた。

歯根における相当応力は舌側歯槽骨頂部に最大の応力集中がみられ、コンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ応力は減少し、ファイバーポストを埋入した方が応力は高くなった。ポスト窩底部では、コンポジットレジンの弾性率およびファイバーポスト埋入の有無は相当応力に影響を与えなかった。

レジンコアポスト部と象牙質の界面におけるせん断応力は、ポスト基部および中央部に集中し、コンポジットレジンの弾性率が高い方が、またファイバーポストを埋入したモデルの方がせん断応力は増加した。歯頚部象牙質とレジンコアの界面におけるせん断応力は近遠心辺縁に集中がみられ、ファイバーポスト埋入の有無に関わらずコンポジットレジンの弾性率が高くなるほどせん断応力は減少した。

＜考察＞

これまでレジン支台築造法は、コンポジットレジンおよびファイバーポストの弾性率が象牙質の弾性率に近いためにポスト窩底部における応力の集中を防ぐことができ、歯根破折のリスクを低減できるという報告が多くなされてきた。本研究では 2003 年 Kinney らの報告を参考に、多くの有限要素法を用いた論文で用いられている 18,000MPa を象牙質の弾性率として採用した。一方で、レジン支台築造法で用いられるコンポジットレジンの弾性率は、有限要素法を用いた多くの研究で 12,000～16,000MPa が採用されており、象牙質の弾性率よりも低くなっている。本研究では、象牙質の弾性率に対して高いもしくは低い弾性率のコンポジットレジンの影響を評価するために、コンポジットレジンの弾性率は 12,000、18,000、24,000MPa とした。

レジンコア支台築造歯において歯冠修復物に負荷がかけられた際、レジンコアは歪みを生じ、応力を内部留保する。さらに、頬側咬頭に歯軸方向から頬側に 45°傾斜した角度でクラウンにかけられた負荷は、クラウンがコンポジットレジンよりも著しく高い弾性率を有しているために、クラウンが舌側に転覆する動きを引き起こすと考えられる。本研究ではレジンコアにおける相当応力の集中は舌側歯頚部に見られ、その応力値は全モデルにおいてほぼ等しかった。これはクラウンが転覆する動きが、コンポジットレジンの弾性率やファイバーポスト埋入有無よりも、舌側歯頚部における応力の集中に強く影響を与えるためと考えられる。一方で、高い相当応力を示す面積はコンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれて拡大した。これは、より高い弾性率を有するコンポジットレジンが歪みを抑制し、より大きな応力を内部留保するためと考えられる。さ

らにファイバーポストを埋入したモデルでは、コア部中央におけるファイバーポスト側コンポジットレジン表面に相当応力の集中がみられた。これは、ファイバーポストとコンポジットレジンの間で異なる歪みが生じるためと考えられる。

歯根において、ポスト窩底部における相当応力は非常に低く、その値はコンポジットレジンの弾性率およびファイバーポスト埋入有無の影響を受けなかった。これは、ファイバーポスト埋入の有無に関わらず、コンポジットレジンの弾性率を高くしても歯根破折のリスクが増加しないことを示している。一方で、歯根の歯槽骨頂部における相当応力はコンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ減少した。象牙質の弾性率よりも高い弾性率を有するコンポジットレジンを使用した場合、レジンコア内部においてより大きな応力を留保し、歯根へ伝わる応力は小さくなる。それに対し、象牙質よりも低い弾性率を有するコンポジットレジンを使用した場合、より大きく歪むレジンコアを支えるために歯根にかかる応力は増加すると考えられる。またファイバーポストを埋入すると歯根の歯槽骨頂部における相当応力はやや増加した。これはクラウンにかけられた負荷がファイバーポストの回転運動を引き起こし、歯根へ応力を伝えるためだと考えられ、ファイバーポスト埋入は歯根の内部応力を減少させることはできないということを示している。

本研究では、レジンコアと象牙質の接着界面における接着破壊を招く応力を明らかにするために、レジンコア界面のせん断応力分布を調べた。レジンコアポスト部と象牙質の界面では、近遠心のポスト基部およびポスト中央部においてせん断応力の集中がみられた。そしてファイバーポストの埋入は、コンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ、せん断応力の値により強く影響し、その値は増加した。象牙質やコンポジットレジンよりも縦方向に著しく高い弾性率を有するファイバーポストを使用すると、クラウンにかけられた負荷はファイバーポストに留保され、根尖へと伝えられると考えられる。さらにファイバーポストは、曲げ応力に対抗する支柱補強効果によってレジンコアの歪みを減少させ、結果として、レジンコアポスト部と象牙質界面におけるせん断応力はファイバーポスト埋入により増加した可能性がある。

レジン支台築造法では、レジンコアポスト部よりも特に歯頚部の接着強さが非常に重要な役割を果たしていることが論証されてきた。本研究では、歯頚部象牙質とレジンコアの界面における最も高いせん断応力は近遠心辺縁にみられ、その値はコンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ減少した。これは、より高い弾性率のレジンコアが応力を内部留保し、歪みを抑制したためだと考えられる。それに対し、ファイバーポストの埋入は最大せん断応力にほとんど影響を与えなかった。これは、ファイバーポストを埋入しても歯頚部における接着破壊のリスクを低減することはできないことを示している。

本研究では、フェルールのある修復歯ではポストやコアの機械的性質が応力分布にほとんど影響を与えないという報告を基に、フェルールのないレジン支台築造歯をモデルとし、コンポジットレジンの弾性率およびファイバーポスト埋入有無の影響について検討した。近年の有限要素法解析において、レジンコアが象牙質と接着していないと仮定した場合、その応力分布は著しく変化するという報告があり、接着界面の部分的な破壊も応力分布に大きな影響を与えると考えられる。フェルールの有無および接着界面における部分的破壊が起きた場合のコンポジットレジンの弾性率が応力分布に与える影響について、更なる有限要素法解析が必要と考えられる。

＜結論＞

有限要素法を用いたレジンポストコアおよび歯根の内部、さらに両者の接着界面に生じる内部応力分布の解析を行った結果、レジンコアに用いるコンポジットレジンの弾性率はやや高い方が、レジンコア歯頚部におけるせん断応力および歯根の相当応力を軽減できることが明らかになった。一方、ファイバーポストを埋入しても歯根における相当応力、レジンコアポスト部および歯頚部と象牙質との界面のせん断応力を改善することはできないと推定された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5214　号	千葉　彩香
論文審査担当者	主　査　宇尾 基弘 副　査　由井 伸彦、岡田 大蔵	
論 文 題 目	The influence of elastic moduli of core materials on shear stress distributions at the adhesive interface in resin built-up teeth.	

（論文審査の要旨）

近年、支台築造法としてレジンコアおよびファイバーポストが広く用いられており、鋳造メタルコアよりも重篤な歯根破折などのトラブルを回避することができると報告されている。これは、支台築造材料の弾性率が低い方が、ポスト先端部における応力集中を軽減することができるためであるとされている。実際に市販されているコンポジットレジンの弾性率は象牙質より低くなっているが、象牙質よりも弾性率が低い方が応力をコンポジットレジン内部で吸収することにより、象牙質への応力集中を防ぐことができる可能性がある。しかし、実用上理想的なコンポジットレジンの弾性率や、弾性率がレジン支台築造歯の内部応力分布にどのような影響を与えるかについては未だ明らかになっていない。またファイバーポスト埋入の必要性についても議論が続いている段階である。これまで行われている実際の歯牙を用いた破折強度試験では、破折を引き起こす最大応力を評価しているが、臨床において破折が起こるのは継続的な負荷がもたらす疲労による可能性が高いと考えられている。しかしながら、そのような試験を多様な条件で行うのは非常に困難であり、またその結果は歯牙の個体差に大きな影響を受けると考えられる。

このような背景のもと、千葉は有限要素法解析を用いてレジンコアで支台築造した小臼歯において、コンポジットレジンの弾性率およびファイバーポスト埋入の有無を変化させ、レジンコアおよび歯根の内部における相当応力、さらにレジンコアと歯根の接着界面に生じるせん断応力を算出し、支台築造に用いる理想的なコンポジットレジンの弾性率並びにファイバーポスト埋入の有用性について検討を行った。これまでレジンコアと歯質との接着は支台築造歯の耐久安定性の維持に非常に重要な役割を果たすことが報告されているものの、コンポジットレジンの弾性率が接着破壊にもたらす影響について検討した報告は少なく、その着眼点は高く評価できる。また得られた結果に対する検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことがうかがわれる。

本研究により得られた主な結果は以下の通りである。

1．レジンコアにおける相当応力は舌側歯頚部に集中し、その値にはファイバーポスト埋入の有無およびコンポジットレジンの弾性率による影響はほとんど見られなかった。しかし、高い相当応力を示す範囲は、コンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ拡大した。また、ファイバーポスト埋入モデルでは、コア部中央に相当応力の集中がみられた。

２．歯根における相当応力は、歯根舌側の歯槽骨頂部に集中し、コンポジットレジンの弾性率が高い方が相当応力は減少し、ファイバーポストを埋入した方が相当応力は増加した。また、ポスト窩底部では、コンポジットレジンの弾性率およびファイバーポスト埋入の有無は影響しなかった。

３．ポスト部におけるコンポジットレジンと歯根の接着界面のせん断応力は、レジンコアポスト基底部および近遠心中央部に集中し、コンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれてファイバーポストの埋入がせん断応力の値により大きな影響を与え、その応力が増加した。

４．歯頚部におけるコンポジットレジンと歯根の接着界面のせん断応力は、歯頚部近遠心端に集中し、ファイバーポスト埋入の有無に関わらず、コンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ、せん断応力は減少した。

以上の結果より、コンポジットレジンの弾性率およびファイバーポスト埋入の有無に関わらず、ポスト窩底部における相当応力は小さく、歯根破折のリスクは変化しないことが示唆された。しかしながら、コンポジットレジンの弾性率は象牙質よりもやや高くした方が、レジンコアと象牙質の歯頚部界面におけるせん断応力および歯根の相当応力を軽減することができることが明らかとなった。これは、コンポジットレジンの弾性率を高くした方が、レジンコアが歪みにくくなり、応力を内部保留するためであると結論付けている。また、ファイバーポストを埋入しても、ファイバーポストの横方向弾性率が著しく低いことに起因する大きな横方向歪みやポスト部における支柱補強効果の影響で、歯根における相当応力、レジンコアポスト部および歯頚部と象牙質との界面のせん断応力を改善することはできないという結論を導き出している。

こうした結論に至るまでの考察は、材料学的な特性や築造方法の特徴を十分に理解したうえで理論的な展開がなされており、申請者の本領域における十分な知識と情報を裏付けるものである。

以上のように、本研究は有限要素解析を用いて支台築造歯の応力分布について評価と検討を行い、コンポジットレジンの弾性率ならびにファイバーポスト埋入の影響を明らかにしたものである。本研究の成果は、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小滝　真也
論文審査担当者	主査　　原田　浩之 副査　　柴田　俊一　　立川　敬子
論　文　題　目	Diffusion tensor imaging of the inferior alveolar nerve using 3T MRI: a study for quantitative evaluation and fibre tracking

（論文内容の要旨）

要旨

拡散テンソル画像(Diffusion Tensor Imaging, DTI)は、生体内水分子の拡散やその異方性の解析に基づく MRI 画像であり、神経線維の定量的評価やその走行路の描出を可能とする。本研究の目的は、3T MRI による DTI を用いて、下歯槽神経の定量的評価とその走行路の可視化を行うことであった。健常被験者 46 名の下歯槽神経 92 束を対象として DTI 撮像を行い、DTI の指標である ADC と FA の値を用いて下歯槽神経の定量的評価を行うと共に、トラクトグラフィー（ファイバートラッキング)による神経走行路の描出を試みた。結果として、健常者の下歯槽神経の ADC と FA の値は、左右差はなく、計測部位別における差も認めなかった。またトラクトグラフィーによって、92 束中 70 束(76%)の下歯槽神経において、その走行路の描出が可能であった。

緒言

下歯槽神経は、歯科臨床において最も重要な神経の 1 つである。すなわち下歯槽神経の走行路やその状態を正確に評価することは、歯科治療による神経損傷のリスクの予測や回避、下歯槽神経に関連した病態の把握やその治療効果の判定のために必要である。

拡散テンソル画像(DTI)は、近年医学領域において普及しつつある新しい MRI の手法であり、生体組織における生理機能を反映するとされる。DTI では、組織における水分子の拡散の程度を表す ADC、水分子拡散の異方性の強さを表す FA という 2 つの指標を用いて、組織の状態を定量的に評価することが可能である。これまで DTI は主として中枢神経系の解析や診断に利用されてきたが、最近では正中神経や腰神経叢などの末梢神経の診断においても DTI の適用が可能であることが報告されている。しかしこれまでに DTI を下歯槽神経に適用した研究はほとんどなく、下歯槽神経の評価における DTI の有用性は未だ明らかにはなっていない。

本研究の目的は、3T MRI を用いた DTI を健常者の下歯槽神経に適用し、下歯槽神経の定量的評価とその走行路の描出を行うことであった。

方法

この前向き研究は、本学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行われた（No.1096)。全ての研究対象者から、書面によるインフォームドコンセントを得た。

・研究対象者

下顎骨に症状がなく、外傷や手術の既往のない 46 名(男性 21 名/女性 25 名、平均年齢 25 歳、範囲 20-36 歳)を研究対象者とした。

・MRI 撮像法

全ての MRI 撮像において、3T MRI 装置（Magnetom Spectra, Siemens Healthcare, Germany）と 16 チャネル頭頸部用コイルを使用した。DTI 撮像には SS-EPI 法を使用し、脂肪抑制法には STIR 法を使用した。撮像パラメーターは以下のとおりとした。TR/TE/TI=15000/80/250ms、FOV 230×230mm、マトリクス 128×128、スライス厚 1.8mm/ギャップなし、加算回数 3 回。軸位断像 30 スライスをパラレルイメージング(GRAPPA、加速因子 3)を併用して得た。双極傾斜磁場(MPG)は 12 軸とし、b 値は 2 点(0、600 s/mm^2)とした。撮像時間は 11 分 30 秒であった。DTI 撮像前に 3D T1 強調像を、MPRAGE 法により撮像した。撮像パラメーターは以下のとおりとした。TR/TE/TI = 1800/2.2/800 ms、フィリップ角 10°、FOV 210×210mm、マトリクス 256×256、スライス厚 1.8mm/ギャップなし、加算回数 1 回。矢状断面像 178 枚を得た。3DT1 強調像の撮像時間は 4 分 44 秒であった。

・画像解析

MRI 撮像後、ADC map と FA map を含む DTI データは MRI システムコンソールを用いて、一次関数モデルに基づき、自動的に計算された。定量的評価とトラクトグラフィーには Advanced Visualization System と付属ソフトウェアを使用した。定量的評価では、システム上に ADC map、FA map と 3D T1 強調像をそれぞれ 3 平面にて表示(軸位断、冠状断、矢状断)した。下歯槽神経の ADC と FA の値を計測するために、3DT1 強調像を参照しながら、ADC map と FA map の冠状断表示上で、左右の下歯槽神経の 3 部位にそれぞれ円形 ROI を設定した。部位は下顎孔(m_1)、第二大臼歯相当部(m_2)、オトガイ孔(m_3)とした。ROI は 3DT1 強調像の下歯槽神経と同位置に設定し、そのサイズは顎骨骨髄を含まないよう下歯槽神経のサイズよりやや小さくした。各 ROI の位置は 2 人の観察者(3 年と 10 年以上の経験)の同意により決定され、ADC、FA および ROI サイズを計測した。

下歯槽神経の三次元的な可視化にはトラクトグラフィーを用い、決定論的トラクトグラフィーによるファイバートラッキングを行った。3DT1 強調像上で、下歯槽神経血管束の位置を確認し、ファイバートラッキングのシードポイントとなる ROI を下顎孔に設定した。ROI は過小評価を避けるために神経束より少し大きく設定した。下歯槽神経を描出するための設定パラメーターは以下のとおりとした。FA 閾値 0.2、角度閾値 ±40°、最小線維長さ 35mm。全症例において、1 人の観察者が下歯槽神経を描出し、別の評価者が描出の程度を 3 段階で評価した。下歯槽神経束のほぼ全体（下顎孔からオトガイ孔付近まで)を描出できた場合を good、神経束の走行の一部が描出された場合を fair、下顎孔付近のみ描出または全く描出されない場合を poor とした。

・統計学的解析

下歯槽神経の ADC と FA の値について、同一被験者の左右側での統計学的有意差の有無を検定するために、対応のある t 検定を行った。 $p < 0.05$ の場合、有意差ありとした。同一被験者の同側 3 点の測定部位間における統計学的有意差の有無を検定するために、対応のある t 検定を行った。同検定においてはボンフェローニの補正を行い、$p < 0.017$ (0.05/3)の場合、有意差ありと

した。さらに、Bland-Altman plot を用いて、ADC および FA の左右差を測定部位毎に評価した。

結果

・DTI による下歯槽神経の定量的評価

46 名全ての研究対象者から、ADC map および FA map を得ることができた。ADC map 上で ROI 設定が困難であった 3 名を分析から除外し、合計 43 名、258 個の ROI の ADC と FA の値を計測した。同一被験者の左右下歯槽神経の ADC と FA の値には、測定部位にかかわらず、有意差は認められなかった（$p > 0.05$）。下歯槽神経の同側 3 点の測定部位の値についても、左側の m_1 と m_3 における ADC の値を除いて、有意差は認められなかった（$p > 0.017$）。

Bland-Altman plot の評価では ADC と FA の分布のいずれにも系統誤差は認められなかった。ADC の被験者間変動は、m_1, m_2, m_3 のそれぞれで、-55.9－57.6% (95%信頼区間: -11.9－4.69%), -172－57.6%(-9.88－13.5%), -65.7－81.1%(-10.2－11.8%)であった。FA については、-82.8－39.0%(-16.2－1.82%), -104－66.7%(-12.7－8.34%), -91.4－100%(-8.85－16.5%)であった。

・トラクトグラフィーによる下歯槽神経の可視化

92 例中 70 例（76%)において、下歯槽神経は全体的もしくは部分的に描出され、good または fair と評価された。トラクトグラフィーによって下歯槽神経が全く描出されなかった症例は 7 例(7.6%)であった。

考察

本研究から、健常者における下歯槽神経の FA の値には、いずれの計測部位においても左右差のないことが明らかとなった。また左右下歯槽神経の ADC と FA の被験者間変動は、狭い 95%信頼区間を示した。DTI を下歯槽神経以外の末梢神経に適用した過去の研究によれば、損傷された神経では、正常な神経と比較して FA の有意な低下が認められた。すなわち同一個体内の反対側（正常側)における DTI の値と比較することによって、片側の末梢神経の損傷を評価することが可能であった。健常者の下歯槽神経において DTI の値に左右差が無いことを示した本研究結果からは、下歯槽神経に関しても、FA や ADC の値を反対側（正常側)と比較することによって、その損傷や回復を定量的に評価することが可能になると考えられた。

本研究においては、下歯槽神経に対する DTI 撮像法に関して、種々の最適化を行った。すなわち DTI の脂肪抑制法としては磁場の不均一性に影響されにくく、頭頸部領域の撮像に広く利用される STIR 法を採用した。また、DTI の MPG 軸数は、方向性分解能と SNR の向上を意図して 12 軸としたが、これによってより薄いスライス厚の選択が可能となり、体軸方向の空間分解能の向上に有用であった。さらに、DTI 撮像前にはマニュアル操作による局所シミングを必ず行って磁場均一性の改善に努めた。トラクトグラフィーを行う上で我々が採用した single ROI 法は、下顎骨内における下歯槽神経の描出のために、従来より報告されている multiple ROI 法よりも優れた手法であると考えられた。

本研究の limitation として、研究対象者として、比較的年齢の若い健常者のみを対象としたことが挙げられる。今後はさらに幅広い年齢層を対象として研究を行い、加齢による FA や ADC の値の変化の有無についても検討することが必要であろう。

結論

DTI を適用することによって、下歯槽神経の定量的評価や可視化を行うことが可能であった。また健常者においては、下歯槽神経の ADC と FA の値に左右差のないことが明らかとなった。本研究によって、歯科治療の合併症として生じる下歯槽神経の損傷や回復の程度を DTI によって定量的に評価できる可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5215　号	小滝　真也
論文審査担当者	主査　　原田　浩之 副査　　柴田　俊一　　立川　敬子	
論 文 題 目	Diffusion tensor imaging of the inferior alveolar nerve using 3T MRI: a study for quantitative evaluation and fibre tracking	

（論文審査の要旨）

拡散強調画像（Diffusion Tensor Imaging, 以下 DTI)は、生体内水分子の拡散やその異方性を解析する MRI の手法である。正常な神経組織ではその線維束の方向に沿った異方性拡散が見られることが知られており、DTI を利用して、神経線維の走行を可視化することも可能である。DTI はこれまで主に中枢神経領域の診断に利用されてきたが、近年末梢神経の損傷を DTI のパラメーターの変化として検出できることが報告され、今後の臨床応用が期待されている。日常の歯科診療において下歯槽神経の評価は重要であり、とくに下顎埋伏智歯の抜歯や歯科インプラント手術の際に下歯槽神経を損傷し、神経麻痺が生じた場合には、神経損傷の程度やその後の治療効果を評価することが必要である。しかし、現在のところ画像診断によってこれらを定量的に評価することは不可能である。小滝はこの点に着目し、下歯槽神経の評価における DTI の有用性を明らかにすることを目的として、本研究を行った。本研究は下歯槽神経に対する新しい画像診断法の開発を目的としたものであり、その着眼点と独創性は高く評価される。

本研究において小滝は、46 名の健常者を対象として、下歯槽神経に対する DTI の撮像を行った。撮像後、左右の下歯槽神経の 3 部位（m_1:下顎孔, m_2:第 2 大臼歯, m_3:オトガイ孔相当部)に ROI を設定し、各部位における ADC 値および FA 値を計測した。部位の確認のためには、3D T1 強調像を参照した。これらの被験者における各値の左右差および近遠心的な部位の差について、統計学的分析を行った。さらにトラクトグラフィーによる下歯槽神経の可視化を行い、その描出能を評価した。以上の研究方法は明快であり、統計学的分析に関しても適切な手法が用いられている。また DTI の撮像に関しても、画質向上のために種々の最適化がなされており、本研究が十分な検討のもとに実施されたことが伺える。

本研究によって得られた主な結果は、以下のとおりであった。

1) 全ての研究対象者から、ADC map および FA map を得ることができた。

2) 同一被験者の左右下歯槽神経の ADC と FA の値には、測定部位にかかわらず、有意差は認められなかった。

3) 同一被験者の同側 3 部位間の下歯槽神経の ADC と FA の値には、左側の m_1 と m_3 における ADC の値を除いて、有意差は認められなかった。

4) トラクトグラフィーを行った結果、92 例中 70 例（76%)において、下歯槽神経の走行路が全体的もしくは部分的に描出され、神経線維束の可視化が可能であった。

以上の結果について小滝は、正常な下歯槽神経においては、DTI のパラメーターに左右差が認

められなかったという結果にとくに着目して考察を行っている。すなわち最近の研究によって、損傷した末梢神経では正常な神経と比較して FA 値が有意に低下することが明らかとなっており、このことから歯科治療の合併症として生じる片側性の下歯槽神経の損傷は、その FA 値を反対側（正常側)と比較することによって、損傷程度の定量的な評価が可能となると考察している。このような考察は、今後 DTI の歯科臨床への応用を検討する上で重要な示唆を与えるものであり、高く評価される。

以上のように、本研究は下歯槽神経の診断における DTI の有用性を詳細に評価したはじめての研究であり、今後の歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	熊谷　勇人
論文審査担当者	主査　嶋田　昌彦 副査　水口　俊介　　鈴木　哲也
論　文　題　目	Factors associated with mucosal pain in patients with partial removable dental prostheses

〈要旨〉

義歯装着者において，床下粘膜の痛みは頻度の高い問題の一つである．本研究の目的は部分床義歯装着者における床下粘膜痛の関連因子を明らかにすることとした．333 名の部分床義歯装着者(平均年齢 71.4 歳，男性 33.3%，500 義歯床)を対象とした．被験者は義歯床下粘膜の痛みの強さ及び頻度を評価した．先行研究による報告から床下粘膜の痛みに関連すると考えられた因子を，1 名の評価者が記録した．34.2%(171/500 床)の義歯で，評価時に痛み有りと評価され，義歯装着から評価時点までの間の痛み経験は 42.8%(214/500)の義歯で有りと評価された．ロジスティック回帰分析の結果，年齢，欠損歯数，粘膜性状，粘膜損傷，骨形態不整，痛み感受性 (圧痛閾値)，日中ブラキシズム，口腔乾燥のそれぞれが痛みの強さに関連していること，それらの因子に加えて，義歯種類と顎堤形態が痛みの頻度に関連していることが明らかになった．　これらの結果から，床下粘膜痛の発生には口腔粘膜・顎堤の特性，痛み感受性，パラファンクション，年齢，義歯関連因子が寄与することが示唆された．

〈緒言〉

補綴処置を受けた患者は，咀嚼機能や発語などの口腔機能における問題や義歯装着に伴う異物感など様々な問題を有することが報告されている．これらに加えて，義歯床下粘膜の痛みは頻度の高い問題の一つである．床下粘膜の痛みを取り除くことは義歯装着者の口腔機能及び口腔関連 QoL を向上させる上で重要であると考えられる．

全部床義歯装着者の床下粘膜痛には，義歯床形態や不均衡な咬合，粘膜損傷，顎堤吸収，菲薄な顎粘膜，骨形態不整，義歯装着時間，硬固物の咀嚼，口腔乾燥などが関連することがそれぞれ報告されているが，部分床義歯装着者についての報告はほとんどされていない．また，圧痛閾値のような感覚的な因子や不安レベルのような心理学的な因子が痛みに関連すると考えられているため，床下粘膜痛には複数の因子が関連すると考えられる．以上から，本研究では部分床義歯装着者における床下粘膜痛の関連因子を明らかにすることを目的とした．

〈方法〉

東京医科歯科大学歯学部附属病院義歯外来に通院する部分床義歯装着者 333 名(平均年齢(SD)71.4(8.2)歳，男性 33.3%，500 義歯床)を被験者とした．顎口腔領域に急性症状を有する場合は対象から除外した．なお，被験者には書面及び口頭で研究内容に関する十分な説明を行い，インフォームドコンセントを事前に取得した（東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会承認番号 1034）．

各被験者は使用中の義歯について調査時における痛みの強さ(0-10)，義歯装着から調査時までの痛みの経験頻度(0-4)をそれぞれ評価した．また痛みに関連すると考えられる因子として年齢，性別，系統疾患(高血圧，糖尿病，骨粗鬆症)の有無，喫煙習慣の有無，装着顎(上/下)，欠損歯数，欠損様式(ケネディ分類)，義歯使用期間(月)，義歯種類(最終義歯/治療用義歯)，欠損部顎堤形態(断面形態・面積・走行・付着歯肉の位置の合計スコア:0-12)，欠損部粘膜性状スコア(手指圧による被圧縮性:0-3)，粘膜損傷(発赤/白色擦過/潰瘍)の有無，骨形態不整の有無，痛み感受性(Pressure Pain Threshold; PPT[Newton])，日中ブラキシズム自覚頻度(0-3)，口腔乾燥自覚頻度(0-4)，不安レベル(日本語版 STAI form X)を評価者 1

名が評価した.

痛み強さ及び頻度の評価値が正規分布でなかったため，統計解析にはノンパラメトリック検定を用いた．痛み強さ及び頻度にそれぞれ関連する因子を明らかにするため，単変量解析および多変量解析を行った（SPSS ver.16.0，有意水準 p=0.05）.

〈結果〉

34.2%の義歯（171/500 床）において調査時に床下粘膜の痛みがあり，42.8%の義歯（214/500）において痛み経験を有した．咬合時や咀嚼時に床下粘膜の痛みを有したのは 30.4%（152/500），着脱時の痛みは 5.4%（27/500）であった．痛みの強さと頻度の評価値には有意な相関が認められた(ρ=0.85,p<0.001).

単変量解析の結果，義歯装着顎（下顎），欠損歯数，ケネディ分類，義歯種類，支台歯数，顎堤形態スコア，粘膜性状スコア，粘膜損傷，骨形態不整，PPT，日中ブラキシズム，口腔乾燥，状態/特性不安スコアが痛みの強さ及び頻度それぞれに有意に関連していることが示された(p<0.05).

ロジスティック回帰分析の結果，年齢，欠損歯数，粘膜性状スコア，粘膜損傷，骨形態不整，PPT，日中ブラキシズム，口腔乾燥のそれぞれが痛みの強さの有意な予測因子として検出された(p<0.05)．それらの予測因子に加えて，義歯種類と顎堤形態スコアが痛みの頻度の有意な予測因子として検出された（p<0.05）.

〈考察〉

本研究においては，対象義歯の約 3 分の 1(34.2%，171/500)において床下粘膜に痛みを有しており，そのうち 3 分の 2 が弱い痛み(痛みスコア 1-3)であることが明らかになった．痛み強さと痛み頻度の間に有意な正の相関が認められたことから，強い痛みを有するほど，痛みの経験頻度が高いことが示唆された.

ロジスティック回帰分析の結果，複数の因子が床下粘膜痛に関連することが示された．本研究では，先行研究で報告された因子に加え，新たに日中ブラキシズム，痛み感受性，欠損歯数が床下粘膜の痛みに関連する因子として検出された．痛みの強さと頻度それぞれに関連する因子が類似する傾向が認められたが，これは痛みの強さと頻度が相関しているためと考えられた(ρ=0.85).

床下粘膜痛に最も強く関連する因子として，床下粘膜の損傷が検出された．また，不良な粘膜性状(フラビーガム)や顎堤吸収，骨形態不整といった粘膜損傷に関連する因子が床下粘膜痛の有意な予測因子として検出されたことから，床下支持組織におけるこれらの特性も床下粘膜痛に関与することが示唆された．唾液は粘膜保護および軟組織修復作用を有することが報告されている．口腔乾燥は唾液の分泌量が低下していると考えられ，このことが床下粘膜に対する保護および創傷治癒効果の低下をもたらし床下粘膜痛に関与すると考えられた．また，日中ブラキシズムは床下粘膜への負担過重をもたらし，粘膜損傷および痛みの誘因になると考えられた.

これまでに，慢性痛患者は健常者と比較して痛み感受性が高いことが報告されている．本研究では口腔粘膜の痛み感受性（PPT）が高いことは床下粘膜痛の因子の１つとして検出されたが，この先行研究の結果から，床下粘膜痛を有することで痛み感受性が高いということも想定されるため，今後さらに検討が必要である．また，痛み感受性は不安スコアと関連していたことから，心理学的側面からの検討も必要であると考えられる.

年齢は，知覚神経系の加齢変性から，床下粘膜の痛みを低下させる因子であると考えられた.

義歯関連因子としては，欠損歯数の増加と不良な義歯のクオリティー(治療用義歯)が粘膜痛の有意な予測因子として検出された.

〈結論〉

部分床義歯装着者における床下粘膜の痛みには，複数の因子が関連することが示唆された．床下粘膜痛の発生には口腔粘膜・顎堤の特性，痛み感受性，パラファンクション，年齢，義歯関連因子が寄与することが示唆された.

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲第　5216　号	熊谷　勇人
論文審査担当者	主　査　嶋田　昌彦 副　査　水口　俊介　鈴木　哲也	
論文題目	Factors associated with mucosal pain in patients with partial removable dental prostheses	

（論文審査の要旨）

義歯床下粘膜の痛みは義歯装着者の多くが経験する問題の一つである．義歯装着者の 21～51%が痛みを経験しているとの報告がなされている．さらに義歯使用時の床下粘膜の痛みが咀嚼機能の障害に関連しているとの報告もある．これらのことから床下粘膜の痛みを取り除くことは義歯装着者の口腔機能及び口腔関連 QOL を向上させるうえで重要であると考えられる．これまでに義歯床下粘膜の痛みに関連する因子を報告する数多くの横断研究がなされてきた．全部床義歯装着者において義歯床形態や不均衡な咬合，粘膜損傷，顎堤吸収，菲薄な顎粘膜，骨形態不整，義歯装着時間，硬固物の咀嚼，口腔乾燥などが床下粘膜の痛みと関連していることが報告されてきた．他方で部分床義歯装着者に関する報告は粘膜損傷や口腔乾燥に限られていた．さらに上記の研究のほとんどは多変量解析を行って分析されていなかった．また，粘膜圧痛閾値(PPT)のような感覚的な因子や不安レベルのような心理学的な因子が痛みに関連するといわれている．そこで熊谷は多数の因子が部分床義歯装着者における床下粘膜の痛みに関連しているものと仮定し，多変量解析を行い，関連因子を明らかにすることを目的とし検証を行った．

被験者については東京医科歯科大学歯学部附属病院義歯外来に通院し，かつ部分床義歯を装着していることを取込基準とし，顎口腔領域に急性症状を有する場合は対象から除外した．これらの基準を満たし，かつ研究への同意が得られた患者を被験者とし，研究デザインは横断研究とした．本研究のアウトカムである床下粘膜の痛みの評価は使用中の義歯について行い，各被験者は評価時点における痛みの強さを 11 段階の Numerical rating scale で，義歯製作時から評価時点までの期間における床下粘膜の痛みの経験頻度を 0-4 の Likert scale で評価した．さらに評価者が先行研究による報告等から床下粘膜の痛みに関連すると考えられる因子を測定，評価した．統計解析に関してはすべての変数について単変量解析を行った後，痛みの強さ及び経験頻度を従属変数としたロジスティック回帰分析を行った．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 対象義歯の 34.2％において評価時点で床下粘膜の痛みが認められ，そのうちの半数以上(66.7%)は，評価値が 1-3 の比較的弱い痛みであった．また 42.8％において痛み経験が認められた．痛みの経験頻度と強さの間には相関係数 0.85 の有意な相関が認められ，痛みが頻繁に生じる義歯ほど痛みが強い傾向があった．

2. 単変量解析の結果，下顎，欠損歯数，ケネディ分類，義歯種類，支台歯数，顎堤形態スコア，粘膜性状スコア，粘膜損傷，骨形態不整，粘膜圧痛閾値，日中ブラキシズム，口腔乾燥，状態/特性不安スコアが痛み強さおよび経験頻度それぞれと有意に関連していることが示された．

3. ロジスティック回帰分析の結果，年齢，欠損歯数，粘膜性状スコア，粘膜損傷，骨形態不整，粘膜圧痛閾値，日中ブラキシズム，口腔乾燥が痛みの強さに対する有意な予測因子として検出された．それらの予測因子に加え，義歯種類と顎堤形態スコアが痛みの経験頻度に対する有意な予測因子として検出された．

本研究は義歯装着者において頻度の高い問題の一つである義歯床下粘膜の痛みについて，多変量解析という統計手法を用いることで交絡を補正し，関連する因子をその関連の強さも含めて明らかにすることを試みている．この統計解析を行うには大きなサンプルサイズを必要とすることから，来院患者数が多い本学大学病院の特色を生かした研究ともいえる．本研究では，主に全部床

義歯装着者を対象とした先行研究で報告された因子に加え，新たに日中ブラキシズム，痛み感受性，欠損歯数が床下粘膜の痛みに関連する因子として検出された.

今回の結果は多数の因子が部分床義歯装着者における床下粘膜の痛みに関連していることを明らかとし，床下粘膜の痛みの発生にとってはロ腔粘膜・顎堤の特性や年齢，痛みの感受性，行動学的因子が欠損様式や支台歯数よりも重要であること，臨床的には日中のパラファンクションを是正する行動学的アプローチやロ腔乾燥の治療が痛みを和らげるうえで効果的である可能性を示唆している．本研究から得られたこれらの床下粘膜痛に関連する因子については今後の補綴臨床への貢献が可能と期待されるものである.

以上の成果は今後の歯科医療，特に歯科補綴治療の発展に寄与するところが大きく，よって，本論文は、博士(歯学)の学位を申請するに十分値するものと認められた.

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	牧口　実央
論文審査担当者	主査　水口　俊介 副査　泰羅　雅登　　笛木　賢治
論　文　題　目	Effects of increased occlusal vertical dimension on the jaw-opening reflex in adult rats

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

成人の矯正歯科治療や補綴歯科治療において、咬合や顔貌の改善などを目的として咬合高径の増大がしばしば行われる。例えば、矯正歯科治療では過蓋咬合を伴う下顎前突症患者において臼歯の意図的な挺出により、また、補綴歯科治療では義歯により顔面高の増大が図られる。したがって、咬合高径の増大を伴う歯科治療の効果や安定性を理解することは重要である。

成熟ラットにおいて咬合高径増大後の顎口腔系の生理学的変化について過去に多くの研究がなされている。咬筋筋紡錘や顎関節機械受容器などの末梢受容器ならびに大脳皮質一次運動野などの中枢神経系は咬合高径増大に順応することが明らかにされている。一方、咀嚼リズムや顎運動パタンは咬合高径増大に影響を受けないという報告がなされている。しかし、顎反射については、鼻閉塞や液状飼料飼育などによる顎口腔領域の変化によって影響を受けることが報告されているものの、咬合高径増大に伴う変調に関する神経生理学的なメカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究では、咀嚼時における顎運動の調節に重要な役割を担う開口反射に着目し、成熟ラットにおける咬合高径増大が開口反射に与える影響について電気生理学的手法を用いて検討した。

＜材料および方法＞

本研究は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認（実験計画書承認番号：0150160A）を得た上で開始した。実験には 13 週齢の Wistar 系雄性ラット 120 匹を用いた。咬合高径増大を行う実験群(n=60)と、無処置の対照群(n=60)に分けた。実験群は、13 週目にサイアミラール麻酔下にて、両側上顎臼歯咬合面にレジンを 2mm 築盛し、咬合高径増大を行った。築盛したレジンの摩耗を防ぐために、下顎臼歯咬合面はレジンで被覆した。実験期間中、対照群および実験群ともに体重を測定した。

統計学的解析には、Windows のソフトウェア SPSS Version 12.0（SPSS Inc., Chicago, IL, USA）を用いて 2 要因多変量分散分析を行い、多重比較には Sidak 法による単純主効果分析を用いた。有意水準は 5%とした。

記録は、両群ともに 13、14、15、17、19 および 23 週齢で行った。サイアミラール麻酔下で

ステンレスワイヤー双極電極を両側下歯槽管に刺入し、周囲の下顎骨とレジンで固定した。また、左側顎二腹筋に双極電極を電極間距離 3mm で埋入した。その後、ラットを腹臥位で定位脳頭蓋固定装置に固定し、下歯槽神経に電気刺激（1 pulse、持続時間 0.2ms）を与えることにより開口反射を誘発した。

顎二腹筋に筋電図活動を誘発する最も低い刺激強度の 1.5 倍を開口反射を誘発させる刺激強度とした。反射性応答として、左側顎二腹筋から筋電図活動（EMG）を記録した。EMG は DAM-80（World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA）を用いて増幅し、データは CED 1401（Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK）を用いて収集した。データの解析には Spike2 Version 4.02a（Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK）を用いた。分析は、左側下歯槽神経刺激時の左側顎二腹筋 EMG を用いて行った。分析項目は潜時、持続時間および振幅とした。刺激を加えた時点から顎二腹筋 EMG の基線活動が 2SD を超えた最初の時点（onset）までの時間（ms）を潜時とし、onset から顎二腹筋 EMG の基線活動が 2SD 以下となった時点（offset）までの時間（ms）を持続時間とした。振幅（mV）は、onset-offset 間の単一 sweep から peak-to-peak 値を計測した。各週齢において実験群・対照群間の比較、および同一群内の異なる週齢における比較を行った。

＜結果＞

体重変化について、各週齢における両群間に有意差は認められなかった。

咬合高径増大後 1-6 週までの実験群は対照群と比較し、潜時は有意に延長し、振幅は有意に減少したが、両者ともに咬合高径増大後 10 週で両群間に有意差が認められなくなった。一方、持続時間については、実験期間を通じて両群間に有意差は認められなかった。

＜考察＞

咬合高径の増大が顎口腔領域に与える影響については数多く報告されている。歯根膜機械受容器の機能的な成熟後に咬合高径増大を行った先行研究において、咬筋筋紡錘、顎関節機械受容器および大脳皮質一次運動野の応答特性の変調が咬合高径増大 1 週後から認められた。機能的な順応に関しては、末梢である筋紡錘および顎関節機械受容器では 6-7 週後、中枢である大脳皮質一次運動野では 8 週後であったと報告されている。

本研究では、開口反射が咬合高径増大後の新しい口腔環境に順応する過程は 10 週と長期間を要した。この理由の 1 つとして、開口反射は末梢の歯根膜機械受容器が刺激を受容し、中枢を経由後に末梢に伝達し顎二腹筋活動の抑制が起きることで生じるため、その経路にある各器官の影響を受けることにより、大脳皮質一次運動野よりも順応に長期間を要したと考えられる。また咬合高径増大に伴い咬筋は伸長し、顎二腹筋は短縮するが、咬合高径増大を行った顎二腹筋は萎縮すること、ならびに短縮したヒラメ筋筋線維の萎縮が 1 週後には著明になることが報告されており、顎二腹筋の短縮が萎縮を引き起こすと考えられる。ラットの膝関節の下腿筋を萎縮させた組織化学的および電気生理的実験では、萎縮後 8 週において筋線維の直径は回復するが、EMG 記録の振幅と伝導速度に関しては回復しないことから、反射が咬合高径増大に順応するには 8 週以上を要することが示唆されている。

反射応答特性に関して、潜時は神経線維の伝導速度と比例し、末梢神経の伝導速度が増大すると、反射の潜時が短縮する。ラットにおいて咬合高径を増加させると 1 週後には咬筋 EMG が減弱することが報告されている。咬筋 EMG の振幅は咬合力と比例することから、咬合高径増大に伴う咬筋 EMG の減弱は咬合力の低下を生じると考えられる。咬合力の低下を想定したラット咬合機能低下モデルを用いた先行研究では、下歯槽神経における神経伝達速度が遅延したことも報告されており、これより、咬合高径の増大に伴う咬合力の低下は、下歯槽神経における神経伝達速度を遅延し、それにより開口反射の潜時も遅延したものと考えられる。また、本実験では咬合高径増大後 10 週で開口反射の潜時において順応が認められた。この結果は、臼歯部の咬合機能低下時の神経伝導速度が 9-12 週で順応するという報告や、咬筋は咬合高径増大後約 1 週で咬合力が一時的に低下し、咬合高径増大後 4 週までの間に回復傾向が認められるという報告から、神経伝達速度が一時的に遅延し、10 週前後に順応したためと考えられる。

持続時間は運動単位を構成する筋線維の数と関係する。筋線維数の経時的変化に関して様々な研究がなされており、ラットのヒラメ筋においては、約 3 週齢と 6 ヵ月齢の骨格筋筋線維数に有意差は認められなかったこと、筋の短縮による筋萎縮の状態では、筋線維の横紋が減少し、筋の大きさは変化するが筋線維数自体は減少しないことが報告されている。本実験では、持続時間は実験群と対照群を比較して有意差が認められなかった。これは、咬合高径増大で顎二腹筋が短縮、萎縮し、筋の断面積の直径が減少するが、筋線維数自体は変化しなかったためと考えられる。

振幅は電極に近接する筋線維の直径や数が減少すると小さくなる。電極に近接する筋線維直径の減少は、筋萎縮や直径の小さい Type I 線維の増加による筋の組成変化に依存しており、筋萎縮に伴い EMG の振幅が小さくなることが報告されている。 さらに咬合高径増大に伴って咬筋は伸長し、顎二腹筋は短縮するが、短縮された筋を効果器とする反射の振幅は小さくなることも報告されている。本実験では、初期に開口反射の振幅が減少したが、咬合高径増大により顎二腹筋の短縮に伴って生じる筋萎縮が生じたことが、振幅の減少を招いたのではないかと考えられる。萎縮状態にあったヒラメ筋における先行研究では、筋萎縮後 3 週から筋線維は細胞レベルで回復が見られた。したがって、咬合挙上に伴って短縮、萎縮した顎二腹筋は、10 週目までに筋線維直径が回復し、振幅は順応を示したと推察される。

開口反射は咀嚼中の顎運動に重要な役割を持つため、効果器である顎二腹筋においては機能的な順応が起こるとともに、ミオシン重鎖が遅筋型へと表現型を変化することで、咬合高径が増大しても生理的な咀嚼運動を遂行するために神経筋機構が補償している可能性が示唆される。

＜結論＞

咬合高径の増大に伴い開口反射の反射応答特性は変調し、長期間をかけて順応することが明らかとなった。したがって、成人において咬合高径の増加を伴う歯科治療は長期にわたり予後を観察する必要があると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5217　号	牧口　実央
論文審査担当者	主　査　水口　俊介 副　査　泰羅　雅登　　笛木　賢治	
論 文 題 目	Effects of increased occlusal vertical dimension on the jaw-opening reflex in adult rats	

（論文審査の要旨）

成人の歯科治療において、咬合や顔貌の改善などを目的に咬合高径の増大を伴った治療がしばしば行われ、矯正臨床や補綴臨床においてもその効果や安定性を理解することは重要とされている。生理学的観点では、咬合高径増大後における顎口腔系の生理学的変化について、成熟ラットを用いて過去に多くの研究がなされている。咬筋筋紡錘や顎関節機械受容器などの末梢感覚受容器ならびに大脳皮質一次運動野などの中枢神経系は咬合高径増加に順応することが明らかにされている一方、咀嚼リズムや顎運動パタンは咬合高径増大に影響を受けないという報告がなされている。

しかし、顎反射については鼻閉塞や液状飼料飼育などによる顎口腔領域の変化によって影響を受けることが報告されているものの、咬合高径増大に随伴する変化については未だ解明されていない。そこで牧口は、咀嚼時の顎運動を調節している反射調節機構に着目し、成人期の咬合高径増大は顎口腔系の反射調節機構の応答特性は短期において変調を生じるが、長期では順応するという仮説を立て、その仮説のもと電気生理学的検討を行い、興味深い結果を報告した。

研究方法としては、13 週齢 Wistar 系雄性ラット 120 匹を用い、咬合高径増大を行う実験群(n=60)と無処置の対照群(n=60)に分け、両群において 13, 14,15,17,19 および 23 週齢時に、左側下歯槽神経の電気刺激に対し左側顎二腹筋からの筋電図活動(EMG)を記録した。分析項目として、開口反射応答における潜時、持続時間および振幅を計測した。本手法は、電気生理学的知識のみならず高い解剖学的知識、外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、同人の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

研究結果としては、以下の知見を得ている。

1.　実験期間中、対照群と実験群の体重は経時的に増加したが、両群間の体重変化に有意差は認められなかった。

2.　潜時は､咬合高径増大後 1 週から 6 週において対照群と比較して実験群は有意に延長した。また、咬合高径増大後 10 週では、実験群と対照群の間に有意差は認められなかった。

3.　持続時間は、いずれの週齢においても両群間に有意な差は認められなかった。また、同一群内の異なる週齢間においても有意差は認められなかった。

4.　振幅は、咬合高径増大後 1 週から 6 週において対照群と比較して実験群は有意に小さな値

を示した。また、咬合高径増大後 10 週では、実験群と対照群の間に有意差は認められなかった。

本実験の結果から、成熟ラットにおける咬合高径の増大は、開口反射の反射調節機構に影響を与えるが、10 週経過後順応することが示唆された。これについて牧口は、咬合高径増大に対し、咀嚼運動を遂行するために末梢の感覚受容器から中枢、効果器へと順に順応し補償すると考察している。また、開口反射の順応の過程において、顎二腹筋の筋線維の状態、数および神経線維の変性に伴う伝導速度の変化が影響を与えると考察している。これらの考察は、先行研究を踏まえたものであり、極めて妥当なものである。

以上より、本研究は、咀嚼時の顎運動制御に重要な役割を果たす開口反射の応答特性に着目し、成熟ラットにおける咬合高径増大が関連する神経系および効果器である筋などを包括する反射調節機構に与える影響について初めて明らかにしたものであり、今後の歯学の基礎および臨床の各分野における発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	上野　智香
論文審査担当者	主査　興地　隆史 副査　高橋　英和　　大林　尚人
論　文　題　目	Optical analysis of enamel and dentin caries in relation to mineral density using swept-source optical coherence tomography

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

う蝕は口腔内細菌によって発症する頻度の高い歯科疾患であり、う蝕病原性の高い *Streptococcus mutans* はハイドロキシアパタイト（HA）に付着し、歯面 pH を HA の臨界 pH5.5 よりも低下させる。初期エナメル質う蝕は適切な非侵襲的処置によって再石灰化する可能性が高く、初期う蝕の診断は臨床において重要な意味を持つ。しかしながら従来の X 線写真によるう蝕診断の精度は低く、初期う蝕の場合困難であることが多い。

光干渉断層計（OCT）は生体組織の断層像を非侵襲的に得ることができる診断装置であり、光学的特性の変化により組織や疾患を区別して表示することができる。波長走査型光干渉断層計（SS-OCT）は光源波長を変換させて掃引し、精度の高いリアルタイム画像を構築することが可能であり、咬合面ならびに隣接面う蝕の診断における有用性が報告されている。また SS-OCT 画像のシグナル強度と減衰率は歯の脱灰による影響を受けるため、う蝕の診断に利用する試みが行われている。本研究はエナメル質と象牙質に *S. mutans* を用いて人工う蝕を形成し、SS-OCT による脱灰面の観察を行い、脱灰程度によるシグナル強度と減衰率の比較を目的としている。

＜方法＞

東京医科歯科大学倫理審査会の承認（承認番号 725）を得た 40 本のヒト抜去臼歯（健全歯 20 本・エナメル質う蝕 10 本・象牙質う蝕 10 本）を使用した。20 本の健全歯より 5×5×3 mm のエナメル質および象牙質の板状試料を作成し、各 10 個の 2 群に分け、試料の上面が水平になるよう研磨した。エナメル質と象牙質それぞれ 10 個の試料を無作為に選別し、人工口腔内バイオフイルム生成器（Oral Biofilm Reactor, OBR）を用いた細菌脱灰群に使用し、残りの 10 個をコントロールとして 7 日間リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（pH 7.2 -7.3）中にて保管した。天然う蝕を有するヒト抜去歯から同様に板状試料を作成し、7 日間 PBS 中にて保管したのちう蝕面がほぼ水平になるように研磨した。

エナメル質および象牙質のう蝕脱灰モデルを作成するため、*S. mutans* MT8148 による *S. mutans* 懸濁液と、培養液として 1%スクロースを添加した Heart Infusion （HI）溶液を用意した。エナメル質試料 10 個と象牙質試料 10 個を OBR 内に水平に設置し、試料面に *S. mutans* 培養液・HI-スクロース溶液・PBS を 20 時間滴下し、バイオフイルムを形成した。その後試料を

OBR から取出し、培養液を毎日交換しながら 37℃にて 7 日間インキュベートし in vitro の脱灰を行った。バイオフイルムの脱灰試料（OBR エナメル質、OBR 象牙質）と天然う蝕を有する試料（う蝕エナメル質、う蝕象牙質）の脱灰病巣部を半切し、試料面を作製した。

試料表面から脱灰の矢状方向（Sagittal scan）ならびに半切面から脱灰面の水平方向（Horizontal scan）の２方向の SS-OCT スキャンを行い、それぞれ 3D 画像データを取得した。得られた３D 画像情報から２D 画像を抽出し、シグナルの評価を行った。矢状方向の３D スキャンでは病巣の中央部から２D 画像を、また水平方向の３D スキャンでは深さを変えて 75μm の間隔で 5 枚（深さ 0、75、150、225、300 μm）の 2D 画像を抽出した。それぞれの２D 画像から、深さ方向に 5μm の間隔で 10 か所のシグナルを選出し、深さ 200μm までのシグナル強度の積分値（矢状方向 : SIS00、水平方向 : HIS200）とシグナルの減衰係数（矢状方向 Sμ、水平方向 Hμ）を算出した。

SS-OCT 画像情報を得た後、試料のミネラル密度の計測を TMR 分析により行った。健全エナメル質と健全象牙質のミネラル密度をそれぞれ 87%ならびに 48%とし、500μm×5000μm の観察範囲における 5%以上のミネラル密度の減少を脱灰と規定した。水平方向の SS-OCT スキャンから得られた深さ 0、75、150、225、300μm の HIS200 ならびに Hμについて、TMR から得られたミネラル密度の結果と対比させ、反復最小二乗法による多項式近似曲線を求めた。また HIS200 と Hμは健全歯質ならびに矢状方向から得られた SIS200 ならびに Sμ と比較し、有意水準 0.05 にて統計処理を行った。

＜結果＞

脱灰歯質の SS-OCT 画像は輝度が上昇し、バイオフイルムによる脱灰歯質と天然のう蝕の矢状方向スキャンから得られた SIS200 ならびに Sμ は、いずれも健全歯質から得られた値よりも高かった。水平方向スキャンの 0、75、150、225、300μm の深さから得られた HIS200 ならびに Hμは、試料内での値に変化が少なく、エナメル質う蝕のシグナル強度を除いて矢状方向の値より低かった。OBR エナメル質とう蝕エナメル質の HIS200 は健全エナメルよりも高く、また OBR 象牙質とう蝕象牙質の HIS200 は健全象牙質よりもわずかに高かった。

シグナルの減衰係数を比較すると、エナメル質と象牙質では異なる傾向を示した。脱灰エナメル質の Hμは健全エナメル質よりも高くなるが、脱灰象牙質の Hμは健全象牙質よりもやや低い値を示していた。

５つの深さにおける水平方向スキャンから得られた HIS200 ならびに Hμを、TMR から得られたミネラル密度と対比させて多項式近似曲線を求めた結果、HIS200 はすべてのミネラル密度の変化において健全歯質より高かった。また OBR エナメル質ならびにう蝕エナメル質の Hμは、う蝕エナメル質のミネラル密度 12%以下または 80%以上を除いて健全エナメル質よりも高くなるのに対し、OBR 象牙質ならびにう蝕象牙質の Hμはいずれも健全象牙質の値よりも低かった。

＜考察＞

本研究ではエナメル質ならびに象牙質の脱灰病巣に対する SS-OCT スキャンを、脱灰表面に対する矢状方向ならびに水平方向の２方向から行い、ミネラル密度の変化との比較を行った。矢状方向のスキャンから得られた SS-OCT シグナルの強度と減衰係数は、いずれも健全歯質の値よりも高く、過去の実験結果と一致していた。

水平方向の SS-OCT スキャンから得られた結果を比較すると、シグナル強度と減衰係数の値はいずれも矢状方向の結果よりも低く、画像深度も深くなった。しかしながら脱灰エナメル質の HIS200 は健全エナメル質よりも有意に上昇しており、ミネラル密度が 80%という低い脱灰でも 1200 という高い数値を示した。これはミネラルの喪失によって生じた微小な多孔構造が、低い脱灰レベルでも多数存在する結果と考えられ、SS-OCT による初期エナメル質う蝕の高い検出精度を報告した過去の論文結果とも合致している。

一方、脱灰エナメル質における SS-OCT シグナルの減衰係数は、OBR エナメル質の水平方向のスキャンはいずれも健全象牙質の値を上回るが、う蝕エナメル質の値は健全歯との間に有意差はみられなかった。これは OBR におけるバイオフイルムの脱灰は再石灰化プロセスが欠如しており、天然のう蝕よりも脱灰変化が強く表れシグナルの減衰係数に変化がみられたと考えられる。

脱灰象牙質の水平方向スキャンでは、OBR 象牙質ならびにう蝕象牙質の減衰係数は健全象牙質よりも低く、エナメル質とは異なる傾向がみられた。エナメル質は 90～92%の無機質からなる高度に石灰化した組織であるのに対し、象牙質は 50%の無機質と 30%の有機質からなる管状構造の組織である。象牙質う蝕は脱灰と有機質の崩壊がおこり、脱灰のみならず有機質の変化も OCT シグナルに影響を与えるといえる。細菌由来の酸による酸性環境は、象牙質内に存在する宿主由来マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)を活性化すると考えられ、う蝕象牙質は活性型 MMP-2, -9, -8, -3 を含み、I 型コラーゲンのようなマトリックス成分を分裂させることができる。コラーゲンは非線形で光を散乱するため、ゼラチン化され分断したコラーゲンは光透過性が高まり、Hμの低下につながったのではないかと推測される。

本研究の結果から、SS-OCT はエナメル質う蝕を脱灰レベルに関わらず HIS200 の増加として検出することができ、初期のエナメル質脱灰でも SS-OCT 像において明るい領域として識別することができた。象牙質では健全象牙質よりも HIS200 は高くなる傾向がみられたが、無機質と有機質が含まれることから変化は複雑であった。SS-OCT をう蝕の診断に用いるため、さらに脱灰エナメル質ならびに脱灰象牙質におけるシグナルの変化を検討する必要がある。

＜結論＞

本研究において、*S. mutans* のバイオフイルムによる脱灰を行ったエナメル質と象牙質ならびに天然う蝕の SS-OCT シグナルを観察し、シグナル強度と減衰係数をミネラル密度の変化と比較した結果、脱灰の矢状方向のスキャンでは、エナメル質と象牙質のシグナル強度と減衰係数はいずれも健全歯質よりも高い値を示した。脱灰の水平方向から得られたシグナルは、エナメル質におけるシグナル強度は低い脱灰レベルでも高くなり、脱灰程度による違いはみられなかった。象牙質の脱灰では、水平方向のスキャンでは減衰係数が低くなる傾向がみられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5218　号	上野　智香
論文審査担当者	主　査　興地　隆史 副　査　高橋　英和　　大林　尚人	
論 文 題 目	Optical analysis of enamel and dentin caries in relation to mineral density using swept-source optical coherence tomography	

（論文審査の要旨）

初期う蝕の診断はう蝕の非侵襲的再石灰化治療を選択する上で重要であり、その的確な手段の確立が求められている。光干渉断層計（OCT）は光の干渉作用を利用して非侵襲的に組織の断層画像を得る技術であり、近年う蝕診断への応用に向けた研究が進められている。OCT 画像は観察対象の光学的性質の変化によってシグナルが変化することが知られており、歯の脱灰や有機質崩壊によるシグナルの変化を、初期う蝕の診断に利用できる可能性がある。本研究はう蝕による光学的特性の変化に着眼し、OCT によるう蝕診断への応用を目的として実施したものである。

実験はヒト抜去歯を用い、in vitro で脱灰したう蝕モデルと天然う蝕のエナメル質と象牙質を対象として行われている。In vitro の脱灰では、ヒト抜去歯から切り出したエナメル質と象牙質の試料表面に *Streptococcus mutans* 懸濁液とスクロース溶液を滴下し、う蝕病原性バイオフイルムの形成と脱灰歯質の作成に成功している。う蝕細菌に関する深い知識と高い技術が要求される実験系であり、周到な準備のもと実験を行ったことが推察される。

実験に使用した OCT は波長走査型 OCT（SS-OCT）であり、画像深度に優れ歯科医学領域での研究が進められており、適切な選択といえる。また TMR 法によるミネラル密度の計測を行い、脱灰程度の評価も併せて行っている。SS-OCT の観察は、in vitro の脱灰と天然う蝕歯から得られた試料について、それぞれ脱灰表層から矢状方向と水平方向の２方向から３D スキャンを行い、シグナルの強度と減衰係数を計測し実験に利用している。矢状方向のスキャンは通常の臨床における観察方向と一致したものであり、また水平方向の観察は脱灰深度におけるミネラル密度とシグナルの変化を対比させるための工夫であり、高く評価することができる。新規性に富んだ試みであると同時に、臨床への応用を視野に入れた評価方法ということができる。

得られた主な結果は、次のとおりである。

１．矢状方向の SS-OCT スキャンでは、エナメル質ならびに象牙質のシグナル強度と減衰係数は、in vitro 脱灰試料と天然う蝕のいずれも健全歯よりも高く、過去の研究結果と一致していた。

２．水平方向のスキャンでは、病巣部におけるシグナルの強度と減衰係数の値は矢状方向より

も低くなった。

３．水平方向のエナメル質のスキャンでは、in vitro 脱灰とう蝕における SS-OCT のシグナル強度は増加しており、低レベルの脱灰でも有意に高く、脱灰程度による変化は少なかった。

４．象牙質の病巣に水平方向のスキャンを行うと、SS-OCT シグナルの減衰係数は健全歯よりも低くなった。

ミネラル密度と SS-OCT のシグナルの変化を詳細に検討した研究は極めて少なく、いずれも OCT によるう蝕診断を行う上で貴重な情報といえる。

本論文の考察は、脱灰による微小空隙の増加と光の散乱による SS-OCT シグナルの増加、エナメル質におけるシグナルの増加とミネラル密度ならびに微小空隙との関連性、エナメル質と象牙質の構造の違いとシグナルへの影響、象牙質う蝕における有機質の崩壊と SS-OCT シグナルの透過性などから構築されており、理論的に展開され臨床的に興味深い内容となっている。

以上より、申請者上野智香が本研究領域において SS-OCT のシグナルとう蝕の診断に関する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学、歯科診断学の発展に寄与すること大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものとして判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小田　憲
論文審査担当者	主　査　春日井　昇平 副　査　若林　則幸　　古屋　純一
論　文　題　目	Influence of implant number on the movement of mandibular implant overdentures

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

近年，高齢者人口の増加に伴い無歯顎患者数は増加するという報告が複数の国々でされており，高齢社会を迎えた本邦でも無歯顎補綴の重要性はますます大きくなるものと見込まれる．無歯顎に対する治療法として，インプラントと各種アタッチメントを用いて可撤性の義歯床を安定させるインプラントオーバーデンチャー（IOD）は，固定性インプラント補綴に比較して少ないインプラント数で同等の効果が得られる治療法として重要な役割を果たしており，広く臨床応用されている．一方で咀嚼時の義歯床の回転が咀嚼能力の低下を招くことが Kimoto らにより報告されており，患者の QOL 向上のためには義歯床の回転を抑制することが望ましい．

現在，IOD のインプラントの本数については下顎オトガイ孔間に埋入された 2 本のインプラントを維持源としたオーバーデンチャー（2-IOD）が第一選択とされている．しかし近年，維持源を前歯部正中の 1 本のインプラントに求めたオーバーデンチャー（1-IOD）も広く臨床応用されており，少ないインプラント数で高いインプラント生存率と患者満足度が得られる手法として注目されている．また 3 本のインプラントに維持されたオーバーデンチャー（3-IOD）は義歯床の動きを抑制できると報告されており，臨床においても良好な成績を示している．

これまでに口腔内を再現した模型を作製し，荷重が加わったときの義歯床の動きを模型上で測定する研究がいくつか行われているが，その多くは異なるアタッチメントシステム間の比較であり，インプラントの本数に注目した報告は少ない．3 本以上の異なるインプラント本数間で義歯の変位を比較した研究は報告されておらず，インプラントの本数が義歯の動きに与える影響は明らかになっていない．

本研究の目的は，下顎無歯顎模型上で IOD の動きを測定し，インプラントの数が下顎 IOD の動きに与える影響を検討することとした．

＜実験方法＞

加熱重合型義歯床用レジン（Acron clear）を用いて下顎無歯顎模型を作製し，その表面 3mm をシリコーン印象材（Exahiflex regular）に置き換え，擬似粘膜とした．模型の前歯部正中，両側側切歯および犬歯相当部に 5 本のインプラントレプリカ（Implant Replica Internal tri-channel connection RP）を平行に固定した．この顎模型上で全ての試験を行った．

注入型多目的レジン（Procast DSP clear）を用いて同一形態の実験用 IOD を 5 個作製した（N=5）．アタッチメントシステムはロケーター（Locator^{R}）とした．実験用義歯粘膜面の前歯部正中，両側側切歯および両側犬歯相当部にロケーターキャップおよびリテンションディスク青を装着した．これにより顎模型上でのロケーターアバットメントの付け替えのみで，異なるインプラント本数間の

比較が可能となった．

比較群はインプラントが正中に 1 本のみの 1-IOD，両側側切歯相当部に 2 本配置した 2-IOD，正中および両側犬歯相当部の計 3 本を配置した 3-IOD とした．

荷重試験には万能試験機（Instron 5544）を用いた．50N の負荷を実験用義歯の咬合面に垂直に加えた．荷重部位は前歯部正中（義歯床正中中央），左側犬歯相当部（前歯部正中から 14mm），左側小臼歯相当部（左側犬歯相当部から 10mm）および左側第一大臼歯相当部（左側小臼歯相当部から 10mm）とした．荷重端子には直径 5mm のアクリル製ボールを用いた．荷重時に生じた義歯右側後縁の垂直変位量，右側方向への水平変位量，および荷重点の沈み込み量を測定した．義歯後縁の垂直変位量および水平変位量は，右側後縁に設置したひずみゲージ式変位変換機（DTH-A-5）にて測定した．ひずみゲージ式変位変換機は，センサインタフェース（PCD300A）に接続し，解析を行った．また，荷重点の沈み込み量は万能試験機により荷重と同時に記録した．

各変位量についてインプラントの本数を要因として Tukey HSD 法による多重比較を行った．加えて，各インプラント本数における後縁の垂直方向変位量と水平方向変位量について対応のある t-test による 2 群比較, および後縁の垂直方向変位量について荷重位置を要因とした Tukey HSD 法による多重比較を行った．有意水準は 0.05 とした．

＜結果＞

義歯後縁の垂直方向変位量は，前歯部荷重時に 2-IOD の変位量が 1-IOD および 3-IOD と比較して有意に大きくなった（P<.01）．その他の条件では統計学的に有意な差は認められなかった．また，全ての群で前歯部および犬歯部荷重時に比べ，小臼歯部および大臼歯部荷重時の変位量は有意に小さくなった（P<.01）．

義歯後縁の水平方向変位量は，前歯部荷重時において 2-IOD の水平変位量は 1-IOD より有意に大きくなった（P=.03）が，その他の条件下では統計学的有意差は生じなかった．全ての荷重条件において，水平方向変位量は垂直方向の変位量と比較し有意に小さな値を示した（P<.01）．

荷重点の変位量は，前歯部荷重時に 2-IOD の変位量が 3-IOD と比較して有意に大きくなった（P<.05 が，その他の条件では統計学的有意差は認めなかった．

＜考察＞

本研究では 1-IOD と比較して, 2-IOD のほうが前歯部荷重時の義歯後縁垂直変位量が有意に大きくなった．これは FEM を用いた Liu らの先行研究の結果と一致する．2-IOD では 2 本のインプラントを結んだ線が fulcrum line となり，それを軸として義歯床の回転運動が生じた結果，大きな垂直方向の変位量を示したと考えられる. 一方 1-IOD では fulcrum line が形成されないため義歯床の回転が生じにくく，垂直変位量が小さくなったと思われる．インプラントが 1 本であると義歯の動きが一定方向に規制されず，義歯床があらゆる方向に大きく動いてしまうことが懸念されるが，今回の実験条件下ではいずれの荷重点においても 1-IOD が他の群と比較して大きく変位したという結果は得られなかった．この原因としては下顎模型上で作製した実験用義歯の粘膜面と擬似粘膜との適合が良好であり，義歯の回転が抑制されたためであると考えられる．本研究より， 2-IOD よりも 1-IOD のほうが, 義歯床の回転が起こりにくく咀嚼能力の高い IOD を製作できる可能性が示唆された．

本研究では，2-IOD と比較して，3-IOD のほうが義歯の浮き上がり量と沈下量が有意に小さくなった．Mericske-Stern らは 3 本以上のインプラントを埋入することにより，回転軸の形成を防ぐ

ことが出来るため，義歯床が回転しにくく機能時に安定すると述べている．本研究の結果はこの考えを支持するものであり，3 本のインプラントが義歯床の回転を抑制していることを示している．義歯床の回転は，咀嚼能力や患者満足度の低下を招くことが報告されており，臨床的には回転を極力抑制することが望ましい．本研究より 3 本のインプラントを埋入する侵襲とコストを患者が許容できるのであれば、3-IOD は 2-IOD に比べ義歯床の動きを抑制することができ，より安定して機能する義歯を作製できる可能性が示唆された．

各群の義歯後縁垂直変位量および, 荷重点変位量から推察するとインプラントの配置に関わらず, IOD は前歯部荷重時には荷重点が沈み込み, 義歯後縁が浮き上がるような挙動を示すと考えられる．一方臼歯部荷重時には，義歯床は荷重点において前歯部荷重と同程度に沈み込が，前歯部荷重時のような回転運動を生じないために浮き上がり量はわずかなものになると考えられる．これは臼歯部の咬合支持面積が前歯部よりも広いことに起因していると考えられる．義歯床は水平方向にも変位することが予測されたが，実際に測定された値は垂直変位量と比較して非常に小さい値であり，その臨床的な影響は非常に小さいことが推測される. 本研究より IOD の動きは垂直方向がほとんどであり，特に前歯で食物を噛み切ることを想定した前歯部荷重時に義歯が回転することが示された．この回転を防ぐために, IOD には前歯部に強い咬合接触を付与しないことが望ましいと考えられる．

実際の口腔内では義歯が模型実験同様の動きをするとは限らない．そのため口腔内で義歯の動きを測定することができれば理想的である．しかし，大きく運動する下顎における義歯の微小な変位を口腔内で測定することは困難であるため，本研究では模型上で変位の測定を行った．また，IOD 治療の成否は義歯床の動きだけでなく，機能時のインプラントへの応力，義歯の維持力や審美性といった多様な因子により決定される．これらの因子に関する更なる研究が求められる．

＜結論＞

本研究より以下のことが結論づけられた．

1．下顎 IOD においてインプラントが 2 本の場合，1 本または 3 本の場合と比較し，前歯部荷重時に義歯床が回転しやすい．

2．インプラント本数に関わらず，下顎 IOD の水平的変位量は，垂直的変位量と比較し小さい．

3．インプラント本数に関わらず，臼歯部荷重時の下顎 IOD の垂直的変位は，前歯部荷重時と比較して小さい．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲第　5219　号	小田　憲

論文審査担当者	主　査　春日井　昇平 副　査　若林　則幸　　古屋　純一
論文題目	Influence of implant number on the movement of mandibular implant overdentures

（論文審査の要旨）

下顎インプラントオーバーデンチャー（IOD）は，咀嚼時の義歯床の回転が咀嚼能力の低下を招くことが報告されており，患者の QOL 向上のためには義歯床の回転を抑制することが望ましい．現在，IOD のインプラントの本数については下顎オトガイ孔間に埋入された 2 本のインプラントを維持源としたオーバーデンチャー（2-IOD）が第一選択とされている．しかし近年，維持源を前歯部正中の 1 本のインプラントに求めたオーバーデンチャー（1-IOD）も広く臨床応用されており，少ないインプラント数で高いインプラント生存率と患者満足度が得られる手法として注目されている．また 3 本のインプラントに維持されたオーバーデンチャー（3-IOD）は義歯床の動きを抑制できると報告されており，臨床においても良好な成績を示している．これまでに義歯床の動きを模型上で測定する研究がいくつか行われているが，インプラントの本数に注目した報告は少ない．3 本以上の異なるインプラント本数間で義歯の変位を比較した研究は報告されておらず，インプラントの本数が義歯の動きに与える影響は明らかになっていない．

こうした状況を背景に，小田憲は，下顎無歯顎模型上で 1-IOD，2-IOD，3-IOD における義歯床の動きを測定し，インプラントの本数が義歯床の動きに与える影響を検討した．

本研究は下顎無歯顎模型と実験用義歯を用いて行われた．まず模型の表面を擬似粘膜で置き換えた下顎無歯顎模型を作製した．模型の前歯部正中，両側側切歯および犬歯相当部に 5 本のインプラントレプリカを平行に固定した．次に注入型多目的レジンを用いて同一形態の実験用 IOD を 5 個作製した．アタッチメントシステムはロケーターを用いた．実験用義歯粘膜面の前歯部正中，両側側切歯および両側犬歯相当部にロケーターキャップおよびリテンションディスク青を装着した．これにより顎模型上でのロケーターアバットメントの付け替えのみで，異なるインプラント本数間の比較が可能となった．

比較群はインプラントが正中に 1 本のみの 1-IOD, 両側側切歯相当部に 2 本配置した 2-IOD, 正中および両側犬歯相当部の計 3 本を配置した 3-IOD とした．

50N の負荷を実験用義歯の咬合面に垂直に加えた. 荷重部位は前歯部正中, 左側犬歯相当部, 左側小臼歯相当部および左側第一大臼歯相当部とした．荷重時に生じた義歯右側後縁の垂直変位量，右側方向への水平変位量，および荷重点の沈み込み量を測定した．

各変位量についてインプラントの本数を要因として Tukey HSD 法による多重比較を行った．加えて，各インプラント本数における後縁の垂直方向変位量と水平方向変位量について対

応のある t-test による２群比較を，後縁の垂直方向変位量について荷重位置を要因とした Tukey HSD 法による多重比較を行った．有意水準は 0.05 とした．

本研究は綿密に計画された上で行われ，結果は適切な統計を用いて分析されており，研究計画から考察に至るまで高く評価できる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 前歯部荷重時の義歯後縁垂直方向変位量において，2-IOD は 1-IOD や 3-IOD より有意に大きな変位を生じた．
2. 全ての群の義歯後縁垂直方向変位量において，前歯部および犬歯部荷重時に，小臼歯部および大臼歯部荷重時より有意に大きな変位を生じた．
3. 全ての荷重条件において，義歯後縁水平方向変位量は義歯後縁垂直方向変位量より有意に小さな値を示した．
4. 前歯部荷重時の荷重点変位量において，2-IOD は 3-IOD より有意に大きな変位を生じた．

以上の結果より，下顎 IOD においては 2-IOD は，1-IOD および 3-IOD と比べ前歯部荷重時に垂直的に大きく変位することが判明した．また，インプラント本数に関わらず，義歯床の水平方向の変位は垂直方向と比べ小さいことと，臼歯部荷重時の義歯床の垂直方向変位量は，前歯部荷重時と比較して小さいことが明らかになった．2-IOD よりも 1-IOD や 3-IOD のほうが義歯床の回転が起こりにくく咀嚼能力の高い IOD を製作できる可能性が示唆された．

本研究では，咀嚼能力の高い下顎 IOD を製作するために重要な情報となる，インプラント本数が義歯の動きに及ぼす影響を明確に示すことができた．今まで行われていない下顎 IOD の義歯床の変位と 1～3 本のインプラント本数の関連について調査したことに関しては新規性があり，本研究の結果は下顎 IOD 治療におけるインプラント本数決定の際の重要な根拠となることが期待される．したがって本研究は今後の歯科補綴治療のみならず歯科医学の進歩，発展に大いに寄与したと考えられる．よって，本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	菅森　泰隆
論文審査担当者	主査　中島　友紀 副査　和泉　雄一　　坂本　啓
論　文　題　目	Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling

（論文内容の要旨）

【緒言】

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)は局所に骨形成を誘導するタンパク質としてすでに臨床応用されている。しかしながら、BMP-2を局所に適用すると、適用部位に腫脹などの炎症症状が引き起こされることが知られている。また近年、骨誘導に十分な量のBMP-2を局所に適用させると、癌化のリスクが高まるとの報告もある。このため、BMP-2の使用量を減らすことにより、副作用発現を抑えるとともに、BMP-2の骨誘導能を促進させる薬剤が求められている。

BMP-2の骨形成作用を強める薬剤候補として、parathyroid hormone (PTH)、抗スクレロスチン抗体、transforming growth factor (TGF)-β1、fibroblast growth factor (FGF)-2、FGF-4及びペプチド薬が挙げられる。これらの薬剤候補の中で、分子量1,000～1,500程度のペプチド薬が合成費用・抗原性の低さ、構造改変の容易さといった利点を持つ。我々はこれらの利点を持つペプチド薬の中からすでに破骨細胞分化抑制作用を有することが報告されているWP9QY (W9)とOP3-4とを局所の骨形成を促進させる薬剤候補として選んだ。

W9はtumor necrosis factor (TNF) 1型受容体上のリガンド結合部位を模倣して設計されたペプチド薬であり、TNF-αに結合する。また、破骨細胞分化促進因子であるreceptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)にも結合親和性が高いことから、破骨細胞の分化抑制作用や機能抑制作用も発揮する。近年、W9は骨形成促進作用を有することが明らかとなっているが、その作用メカニズムの詳細は明らかになっていない。RANKLの遺伝子発現を抑えた細胞やRANKL欠損マウスから単離した骨芽細胞を用いた実験から、W9の骨芽細胞分化促進作用は、RANKLに関与して発現される可能性が示唆されている。一方、破骨細胞分化抑制因子であるosteoprotegerin (OPG)を模倣して設計されたOP3-4も、骨吸収抑制作用のみならず、骨芽細胞分化促進作用を併せ持つことが既に報告されている。OP3-4のRANKLへの結合親和性はW9とほぼ同等であることがいくつかの報告から推定されることから、OP3-4はW9とほぼ同程度に骨形成促進作用を有することが考えられる。

骨芽細胞分化を促進する経路は、BMP 受容体、prostaglandin E2 (PGE2)受容体、Wnt 受容体など細胞膜上の受容体を介した経路があり、どの経路も骨芽細胞分化初期マーカーである runt-related transcription factor 2 (Runx2)の発現を上昇させる。近年、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)の阻害剤であるラパマイシンが Runx2 発現を低下させ、骨芽細胞分化を抑制する事が

報告された。また、mTORC1 の活性化に必須な mTOR 複合体構成要素 Raptor を骨芽細胞特異的に欠損させると骨量が減少する表現型となる事から、mTORC1 の活性化により骨形成が促進する可能性が示唆されている。

本論文では、マウス頭蓋骨骨欠損モデルを用いて、W9 と OP3-4 が BMP-2 による骨誘導を同程度に促進することを示す。更に、両ペプチドが骨芽細胞分化を促進するメカニズムの一つとして、mTORC1 活性を亢進させる経路の存在を示す。

【方法】

＜骨芽細胞の分化および増殖の評価＞

1日齢C57BL/6Jマウス頭蓋骨から単離した初代骨芽細胞を用いた。骨芽細胞分化促進培地に200 μMのペプチド薬（W9, OP3-4）およびRANKL親和性の低いコントロールペプチドを各々添加し、6日後にalkaline phosphatase (ALP)染色、21日目にvon Kossa染色を行い、染色後、各染色面積占有率を計測した。

0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 nM のラパマイシンを添加した際の骨芽細胞増殖の影響を生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性を測定するMTT assayの変法を用いて検討した後に、10 nMのラパマイシン存在下および非存在下で、2種類のペプチド薬およびコントロールペプチドを添加した初代骨芽細胞培養を行い、ペプチド薬による骨芽細胞増殖の影響をMTT assayの変法を用いて検討した。また、骨芽細胞分化の影響をp-nitrophenyl phosphatase (pNPP)を基質としたALP活性測定を用いて検討した。

＜頭蓋骨骨欠損部に誘導される再生骨の評価＞

20匹の5週令雄性C57BL/6Jマウスを用い、頭蓋骨骨欠損モデルを作成した。欠損部に使用する以下の試薬により4グループ(n=5) に分けた。① gelatin hydrogel (GH) disc (担体)、②BMP-2 (0.3 μg)含有のGH disc、③W9 (0.4 μmol)とBMP-2含有GH disc、④ OP3-4 (0.4 μmol)とBMP-2 (0.3 μg)含有GH discの4グループである。全身麻酔下で、各discを欠損部に合わせ、4週間飼育した後、屠殺した。屠殺後、X線学的解析として、軟X線写真撮影、dual X-ray absorptiometry (DXA)による骨密度・骨塩量測定、microfocal computed tomography (μCT)による3次元再構築画像解析を行った。組織学的解析として、非脱灰薄切切片を作製後、骨再生部の組織像の観察、骨形態計測法を用いて、あらかじめ投与しておいた蛍光色素であるアリザリンとカルセインの骨への取り込み部位から動的骨形成指標であるmineralizing surface (MS)、mineral apposition rate (MAR)、local bone formation activity (MS x MARと定義)を算出し、骨形成活性の評価を行った。なお、本実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号0140070C, 0150203C2, 0160182A) 。

＜mTORC1シグナルの評価＞

12時間血清飢餓状態にあるマウス骨髄由来間質細胞株であるST-2細胞をRANKL結合ペプチドで刺激し、20分後の細胞を回収した。mTORC1の活性を調節する上流シグナル経路としてphosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Aktのリン酸化と、mTORC1キナーゼ下流のエフェクター分子であるribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1)のリン酸化をウェスタンブロット法で評価した。

＜統計解析＞

1-way analysis of variance (ANOVA)による分散分析の後、Fisher’s protected least significant difference (PLSD) *post hoc* testにより多重比較検定を行った。

【結果】

RANKL 結合ペプチドの骨芽細胞分化促進作用の強弱は、RANKL 親和性に依存すると仮定して、RANKL 結合ペプチドの骨芽細胞分化促進作用を比較するために、初代骨芽細胞培養実験を行った。その結果、W9 添加群および OP3-4 添加群は、各ペプチド添加により vehicle 添加群およびコントロールペプチド添加群と比べて、有意に ALP 及び von Kossa 染色面積占有率を増加させた。OP3-4 添加群と W9 添加群の染色面積占有率に有意差はなかった。

骨芽細胞培養実験より、OP3-4 は W9 と同等の骨芽細胞分化促進作用を有する事が確認できた。次に、*in vivo* における RANKL 結合ペプチドの骨形成促進作用を評価するために、マウス頭蓋骨骨欠損モデルを用いて *in vivo* 実験を行った。マウス頭蓋骨骨欠損部を μCT 像により観察すると、BMP-2 単独群では骨欠損部に明らかな骨の新生が認められなかったが、BMP-2+W9 群および BMP-2+OP3-4 群では骨欠損部が骨で覆われた。DXA を用いた定量解析から、RANKL 結合ペプチド併用群では、BMP-2 単独群と比べて、bone mineral content (BMC)、bone mineral density (BMD) が有意に増加した。各群の非脱灰切片作製後、蛍光ラベリングによる動的骨形成指標を計測したところ、動的骨形成指標である MS、local bone formation activity が、BMP-2 単独群と比べて RANKL 結合ペプチド併用群で有意に増加していた。MAR は、BMP-2 単独群と比べて、OP3-4 併用群で有意に増加していた。

mTORC1 活性が骨芽細胞の増殖および分化に関与するか否かを調べるために、mTORC1 活性化阻害剤であるラパマイシンを用いた骨芽細胞培養実験を行った。ラパマイシンの存在下もしくは非存在下で頭蓋骨由来の骨芽細胞を各ペプチド薬で刺激し、細胞増殖と骨芽細胞分化をそれぞれ比較した結果、ラパマイシン非存在下では、ペプチド薬（W9, OP3-4）をそれぞれ添加しても、細胞増殖は vehicle 添加群と比較して亢進は示さず、骨芽細胞分化の指標である ALP 活性は vehicle 添加群比べて有意に亢進した。一方、ラパマイシン存在下では、ペプチド薬（W9, OP3-4）添加の有無にかかわらず、細胞増殖は全群において同程度にまで抑制された。また、ラパマイシン添加による vehicle やコントロールペプチド添加群における ALP の活性抑制に比べて、ペプチド薬（W9, OP3-4）添加による ALP の活性亢進はラパマイシン添加により著しく阻害され、vehicle 添加群と同程度にまで抑えられた。

最後に RANKL 結合ペプチドが骨芽細胞分化を促進する経路を検証するために、ST-2 細胞を用い、mTORC1 シグナル経路が実際関与しているか否かを解析した。OP3-4 あるいは W9 を用いて ST-2 細胞を刺激すると、両ペプチド薬は mTORC1 の上流分子である Akt のリン酸化と下流分子である S6K1 のリン酸化をほぼ同程度に強める事がウェスタンブロット法により明らかとなった。

【考察】

本研究において、既に、BMP-2誘導による局所の骨形成を促進する事が報告されているW9だけでなく、OP3-4においても、BMP-2誘導による局所の骨形成を同程度に促進することを示した。さらに、我々はRANKL結合ペプチドによる骨形成促進作用に、骨芽細胞内のmTORC1シグナルの活性化が関与する可能性を示した。

本研究では、ラパマイシン存在下で両ペプチド薬による骨芽細胞分化促進作用を著しく抑制する事から、ペプチド薬による骨芽細胞分化促進作用がmTORC1シグナルに関与している可能性が示唆された。この実験に用いたラパマイシン濃度より2倍高い濃度(20 nM)でも増殖抑制程度が変

わらなかったことから、10 nMのラパマイシン濃度による分化抑制作用は細胞毒性による抑制作用ではないことが考えられた。mTORC1活性化阻害剤であるラパマイシンは増殖活性を抑える薬剤として知られているが、ペプチド薬添加により亢進した骨芽細胞分化をラパマイシンが著しく抑制した結果は、ラパマイシンが増殖抑制だけでなく細胞分化抑制にも作用する可能性を示している。ラパマイシンを用いた一連の実験結果とRANKL結合ペプチドによるAktとS6K1双方のリン酸化亢進を示した結果から、mTORC1シグナルを介してRANKL結合ペプチドが骨芽細胞分化を亢進することを初めて明らかにした。

我々は以前、RANKLをknock downした細胞を用いると、W9刺激によるALP活性の上昇が抑制されるという報告をしたが、その際に、従来リガンドと考えられてきたRANKLが膜受容体として働く「RANKL逆シグナル」について言及している。RANKL逆シグナルの存在を確認するためには、RANKLの細胞内ドメインに変異を与えたマウス頭蓋骨から単離した骨芽細胞を用いて、AktとS6K1のリン酸化が減弱するか否かを今後検討する必要がある。

RANKL結合ペプチドがBMP-2シグナル経路であるSmad1，5，8のリン酸化を亢進することが示されているが、このBMP経路の活性化は、RANKL結合ペプチド刺激後30分で亢進してくることから、BMP-2の分泌亢進からオートクライン的に刺激されるとは考えづらく、RANKL逆シグナルがmTORC1活性化以外にもBMPシグナルも活性化させた可能性が考えられるが、今後のさらなる検討が必要である。

W9とOP3-4の両ペプチドは破骨細胞の分化抑制作用が既に報告されているが、骨欠損部の破骨細胞数は、BMP-2単独群と比べて、これらRANKL結合ペプチド併用群の方が、破骨細胞が多い結果となった。マウスの破骨細胞の寿命が3~4日である事も鑑みると、本実験の屠殺時には、担体から徐放するペプチドが存在していたとは考えづらい。担体自体もほとんど代謝されたことが考えられた。しかし、骨新生を誘導するために十分な期間、RANKL結合ペプチドは担体から徐放ができたと推測され、ペプチドの骨吸収抑制作用ではなく、骨形成促進作用によりBMCとBMDの増加が認められたと結論付けた。

欠損部のサイズに関しては、直径4 mmがクリティカルサイズの境界との報告があるが、本実験のGH担体群の骨形成活性と、28日の実験期間ではほとんど骨欠損部が修復されなかったことから、直径3.5 mmの骨欠損はクリティカルサイズと判断した。

【結論】

2 種類の RANKL 結合ペプチドは同程度に骨芽細胞分化促進作用を示す。骨形成が十分に誘導できない微量の BMP-2 使用時においても、RANKL 結合ペプチドは BMP-2 誘導の骨形成を促進する。また、RANKL 結合ペプチドによる局所の骨形成促進作用は、mTORC1 シグナルの活性化を介した骨芽細胞分化促進に依るものであることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5220　号	菅森　泰隆
論文審査担当者	主　査　中島　友紀 副　査　和泉　雄一　　坂本　啓	
論 文 題 目	Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling	

（論文審査の要旨）

近年、分子量の小さな低分子医薬と抗体医薬に代表される高分子医薬との中間に位置づけられる中分子医薬が注目を集めている。中分子医薬は、低分子医薬と抗体医薬の特徴を併せ持つことから、アンメットメディカルニーズにも対応できる医薬品として開発が期待されている。低分子医薬にはない抗体医薬の特徴であるタンパク質間相互作用の抑制作用を持ち、標的への特異性の高さが期待できると同時に、低分子医薬の特徴である化学合成が可能な為に製造コストを抑制できる利点や抗体医薬と異なり、細胞内標的も狙うことができ、経口投与も可能であるという新しい医薬品のカテゴリーとして期待されている。

菅森はこの中分子医薬の範疇に属する分子量1226と1448の2種類のペプチドに着目した。両ペプチドは既に破骨細胞分化抑制作用と骨芽細胞分化促進作用の両作用を有するペプチドとして、報告されていたが、それぞれの作用を比較検討した論文は無かった。破骨細胞分化を抑制することは両ペプチドの破骨細胞分化促進因子であるRANKLへの結合親和性の高さから予想された結果であったが、これらのペプチドが骨芽細胞分化を促進するメカニズムの全容は、現在でも明らかにされていない。菅森は、両ペプチドがRANKLに結合するという報告と、分子量の小さな方のW9ペプチドがすでに、RANKL依存的に骨芽細胞分化を促進するという報告があることから、本実験では、W9と同じ設計手法でデザインされたOP3-4もRANKLに関与した骨芽細胞分化促進作用があるのではないかと考えて実験計画を立てている。

まず、菅森は、RANKL結合ペプチドの骨形成促進作用がRANKLに関与するか否かを明らかにするために、W9やOP3-4よりRANKL親和性が低いコントロールペプチドを用いて骨芽細胞分化に対する作用を比較した。興味深いことに、OP3-4はW9と同様に骨芽細胞分化を促進するが、RANKLに結合親和性の低いコントロールペプチドでは、分化促進が認められなかった。このことから菅森は、W9とOP3-4の骨芽細胞分化促進能はRANKL親和性と関連したメカニズムにより発揮されるものと考えた。

次に菅森は、頭蓋骨骨欠損モデルを用いてOP3-4もW9と同様にBMP-2の骨誘導能を促進するか否かを検討した。その際、菅森は、BMP-2の使用量を骨が十分に誘導できない用量にまで落とす工夫を加えて実験を行った。BMP-2の副作用である炎症症状は、骨を誘導するために十分な量のBMP-2を局所に適用させた場合に引き起こされることから、BMP-2量を抑えた実験上の工夫は、将来BMP-2の臨床応用を鑑みた工夫として高く評価できる。RANKL結合ペプチド単独使用群やBMP-2単独使用群では、欠損部にほとんど骨形成が誘導できなかったことから、RANKL結合ペプ

チドを併用する事がBMP-2の骨形成活性を引き出すために必要であることを示した。培養実験において骨芽細胞分化促進作用を示したRANKL結合ペプチドではあるが、*in vivo*実験ではペプチド単独使用による骨形成誘導がほとんど認められなかったことから、骨欠損部における骨誘導作用発現には、手術時の手技の改善やペプチド徐放担体の工夫、あるいはペプチド自体の活性増強など今後の検討が必要と思われた。しかしながら、菅森が行った骨欠損部のX線学的解析および骨形態計測学的手法を用いた解析により、RANKL結合ペプチドの骨形成促進作用は十分に裏付けられており、局所の骨形成を誘導するために十分ではない微量のBMP-2を使用した場合でも、RANKL結合ペプチドの使用により十分な骨量を得られる可能性を見出したことは今後の創薬の方向性を考えるうえで重要な知見と思われる。

菅森は、このように *in vitro* と *in vivo* の実験を通して、2 つの RANKL 結合ペプチドがほぼ同様な骨形成促進作用を有することを示した後、まだ全容が解明されていない RANKL 結合ペプチドの骨形成促進作用メカニズムの解明を目指して実験を計画している。手掛かりとなった報告として Runx2 が mTORC1 によってそのタンパク質発現量および活性が制御されるという報告があった。また、mTOR 複合体の構成タンパクである Raptor の骨芽細胞特異的欠損マウスが骨減少症の表現型を示したというエビデンスを基に、mTORC1 シグナルと RANKL 結合ペプチドによる骨形成促進との関連を探っている。

菅森はシグナル経路を解析する前に mTORC1 阻害剤であるラパマイシンを用いて、RANKL 結合ペプチドにより亢進する骨芽細胞分化に与える影響を調べている。ラパマイシンは細胞増殖を抑制する薬理作用により、抗がん剤として用いられていることから、頭蓋骨由来の骨芽細胞に対しても、増殖活性を抑制するが、ラパマイシンは RANKL 結合ペプチドにより亢進した骨芽細胞分化も有意に抑制するという結果を示したことは興味深い。

最後に ST-2 細胞に対して RANKL 結合ペプチドを添加し、mTORC1 キナーゼの標的分子である S6K1 のリン酸化と上流シグナル経路の Akt のリン酸化が双方とも亢進することを示した。このことは、RANKL 結合ペプチドによる骨芽細胞分化促進作用が、Akt-mTORC1 経路を介する可能性を示している。

本論文の主たる結果は以下の 4 つである。

1. RANKL 結合ペプチドである OP3-4 は W9 と同程度に骨芽細胞分化促進作用が認められた。一方、RANKL に親和性の低いコントロールペプチドには骨芽細胞分化促進作用は認められなかった。
2. 頭蓋骨骨欠損モデルにおいて、骨形成が十分に誘導できない微量の BMP-2 を使用した場合でも、OP3-4 は W9 と同程度に BMP-2 誘導の骨形成能を亢進させた。
3. RANKL 結合ペプチド添加により骨芽細胞の増殖活性は亢進せず、骨芽細胞の分化のみ促進したが、mTORC1 阻害剤であるラパマイシン添加によりその分化促進作用は抑制された。
4. RANKL 結合ペプチドは mTORC1 シグナルを活性化させることが示された。

本論文により、RANKL 結合ペプチドにより mTORC1 シグナルを介した骨芽細胞分化促進作用を見出したことは、新たな骨芽細胞分化促進経路の探索のために重要な知見と考えられる。また、

高用量の BMP-2 は炎症を引き起こすという報告があり、さらに、近年、癌化のリスクを増す可能性も指摘されているため、BMP-2 の使用量を減らす試みがなされているが、本研究では、BMP-2 の使用量を減らしても RANKL 結合ペプチドを併用すれば、十分な骨の再生が可能なことを示したことは、副作用を軽減する観点から興味深い研究結果となった。

本論文は 2 種類の RANKL 結合ペプチドが、その骨芽細胞分化促進作用、骨形成促進作用、骨芽細胞内シグナル促進作用ともに同様な作用を示したことから、将来 RANKL に結合するペプチドが、局所の骨新生促進薬開発の雛型となることが期待される。このため、菅森の研究結果は、骨折治癒過程の促進、現在 BMP-2 が用いられている脊椎損傷に対して BMP-2 使用による副作用の低減など、将来医科領域における貢献にも期待できる。歯科領域においても、抜歯窩の骨造成の促進、顎口蓋裂患児への応用、インプラント不適患者への骨造成、あるいは、歯列矯正時の固定源として用いるミニインプラントの埋植症例など BMP-2 と RANKL 結合ペプチドの組み合わせは、多くの臨床症例に応用可能と考えられる。このように菅森が行った一連の研究は、歯科医学を含めた骨再生学術研究の発展に寄与するところが大きく、博士（歯学）の学位申請を行うに当たり十分に価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	鬼塚　理
論文審査担当者	主査　中島 友紀 副査　井関 祥子　　新田 浩
論　文　題　目	ZBTB16 as a Downstream Target Gene of Osterix Regulates Osteoblastogenesis of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells

（論文内容の要旨）

＜要約＞

間葉系幹細胞(MSCs)は、骨芽細胞分化誘導培地(Osteogenic differentiation medium; ODM)で培養することにより骨芽細胞へと分化する。その分化の過程に関しては様々な転写因子が関与していると考えられているが、未だその詳細なメカニズムは不明な点が多いのが現状である。そこで、次世代シーケンサーを用いて、ヒト歯根膜由来 MSCs (hPDL-MSCs)の網羅的遺伝子発現解析を実施し、誘導培地により発現が大きく変動した遺伝子を選別したところ、転写因子である Zinc finger and BTB domain containing 16 (*ZBTB16*)の発現が ODM により著しく上昇していることが明らかになった。hPDL-MSCs を通常培地で培養した際に ZBTB16 は mRNA、タンパク質の発現共にその発現は見られなったが、ODM で刺激し骨芽細胞へと分化を誘導した際には、経時的にその遺伝子発現が上昇した。また *ZBTB16* をノックダウンすることにより骨芽細胞への分化能が低下することから、ODM による骨芽細胞分化誘導において骨芽細胞分化を正に制御しており、新たな骨芽細胞分化マーカーとなりうることが示唆された。さらに Sp7/Osterix (OSX)の発現が減少することで、ZBTB16 の発現も減少すること、転写因子である OSX が *ZBTB16* のプロモーター領域に結合することから、ZBTB16 の骨芽細胞分化への影響は OSX により制御されていることが示唆された。

＜緒言＞

骨芽細胞への分化において様々な転写因子や分泌タンパクが複雑に関与していることが知られており、Runt-related transcription factor 2 (Runx2)と Sp7/Osterix (Osx)が、骨芽細胞分化における必須な転写因子である。これらの転写因子の遺伝子欠損マウスでは膜内骨化と軟骨内骨化の両方で骨形成不全が起こることが報告されており、さらに Runx2 の下流に Osx があることや、Osx が *Bglap*、*Ibsp*、*Spp1* といった骨石灰化マーカーを制御していることも報告されている。MSCs は多分化能とコロニー形成能を有しており、ODM により骨芽細胞へと分化することが知られているが、未だその詳細なメカニズムについては解明されていない。

本研究では hPDL-MSCs の ODM による遺伝子発現の変化を、次世代シーケンサーで網羅的に解析することで、ODM 特異的に発現制御される骨芽細胞分化のメカニズムの解明を試みた。

<方法>

ヒトの抜去歯より歯根膜を採取し、酵素処理により単離した hPDL-MSCs を用いて実験を行った。3 種類以上の異なる検体より得られた hPDL-MSCs は 10%FBS 含有 α-MEM にて培養し、継代数 3 から 6 の間で使用した。ODM は上記の培地に 82μg/mL の L-ascorbic acid phosphate magnesium salt、10mmol/L の β-glycerophosphate と 10nmol/L の dexamethasone を添加したものを使用した。次世代シーケンサー (SOLiD3) を用いて high-throughput mRNA sequencing (RNA-seq)を行うため、hPDL-MSCs を通常培地で 4 日間培養した群(D4(-))、ODM で 4 日間培養した群(D4(+))、ODM で 14 日間培養した群(D14(+))の 3 群の total RNA を抽出し、ライブラリーを作成後に解析を行った。解析は Tophat2 – Cufflinks パイプラインを用いて、遺伝子発現は Fragments per kilobase of exon per million mapped reads (FPKM)値により定量化した。FPKM 値 > 1.0 を遺伝子発現の指標とし、FPKM 値の変化が 2 倍以上あり、かつ統計学的に有意なものを Differentially expressed genes (DEGs)とした。

ZBTB16 の発現を調べるため、hPDL-MSCs を 4, 7, 14 日培養の後、quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)法と Western blotting 法を行った。次に small interfering RNA (siRNA) transfection により *ZBTB16* の発現をノックダウンし、同遺伝子が骨芽細胞分化に及ぼす影響を、骨芽細胞分化マーカーである alkaline phosphatase (ALP)活性試験により確認し、石灰化結節形成の影響は Alizarin Red S の染色により確認した。また si*ZBTB16* による骨芽細胞分化への遺伝子発現変化を qRT-PCR により測定した。さらに骨芽細胞分化において重要な転写因子であるとされる *SP7* を siRNA によりノックダウンし、ZBTB16 の mRNA・タンパク質発現を確認した。また OSX が *ZBTB16* のプロモーター領域に結合することを確認するため、*ZBTB16* のプロモーター領域に存在する Sp1 binding site (OSX が結合すると報告されている特定の塩基配列部位)と一致するプライマーを設計し、OSX の抗体を用いて chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行った。

＜結果＞

RNA-seq の結果から 11,695 の遺伝子を検出し、その中から D4(-)と D4(+)間、D4(-)と D14(+)間の DEGs を選別したところ、有意に mRNA 発現が上昇している転写因子として *ZBTB16* が見出された。hPDL-MSCs を通常培地で培養した際に ZBTB16 は mRNA、タンパク質の発現共に検知出来なかったが、ODM で骨芽細胞へと分化培養した際に、経時的にその遺伝子発現が上昇した。さらに、si*ZBTB16* を hPDL-MSCs に導入することで、コントロール群と比較して ALP 活性と石灰化の形成能は有意に低下した。

また、骨の石灰化に関与していると考えられている *BGLAP* と *IBSP* の mRNA 発現も si*ZBTB16* により低下することが確認された。si*SP7* を hPDL-MSCs に導入することで、コントロール群と比較して ZBTB16 の mRNA とタンパク質の発現は著しく低下した。しかしながら si*RUNX2* によって *ZBTB16* の発現に有意な変化が見られなかった。さらに、ChIP assay の結果から、OSX は *ZBTB16* の転写開始点から上流 1 kb 内に存在する Sp1 binding site に結合することが確認された。

＜考察＞

ZBTB16 は Kruppel C2H2-type zinc-finger protein family に属している転写因子であり、精原細胞や Natural killer T 細胞の分化、成熟に関与する Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF)としても知られている。骨における ZBTB16 の過去の報告として、*Zbtb16* ノックアウトマウスを用いた研究では、同遺伝子は骨形成パターニングを制御していることが明らかにされた。また C2C12 や hMSCs を用いた *in vitro* の実験において ZBTB16 は骨芽細胞分化を促進させることや、RUNX2 を制御していることが示唆された。さらに、ヒト歯小嚢由来 MSCs を用いた場合でも ZBTB16 が骨芽細胞分化を促進していることが確認されているが、RUNX2 との関連性については否定的な見解もあり、今後の議論が必要であると考えられる。

本研究においても ZBTB16 は MSCs の骨芽細胞分化や、石灰化結節形成を促進していることが見出された。しかしながら、過去の報告との相違点としては、ZBTB16 の発現は骨芽細胞分化の後期において顕著に上昇しており、その発現は OSX に制御されている点である。OSX は骨芽細胞分化における重要な転写因子であると考えられており、その上流に RUNX2 が存在していることが明らかにされているが、他の報告では BMP 等のシグナルを介した際に Runx2 非依存的に Osx の発現を認め、骨芽細胞分化を促進することも知られている。本研究においても ZBTB16 の発現は OSX に制御されているが、RUNX2 には制御されていないことが示唆されており、RUNX2 と OSX の関係性には議論の余地が残る。また本研究結果が過去の報告と異なる点については、細胞や実験方法の違いが原因になることや、骨芽細胞分化の過程において様々な転写因子が複雑に関与していることから、ZBTB16 は分化過程の初期では RUNX2 を制御しており、後期になるとその発現を OSX が制御するといったことも考えられる。

今回の研究では OSX の発現が上昇した際も ZBTB16 の発現は上昇しなかったため、OSX が ZBTB16 の発現を制御する際に他の転写共役因子が関与していることが推測されるが、OSX がどのように ZBTB16 を制御しているかの解明は今後の研究課題の一つとなる。

＜結論＞

本研究により、ZBTB16 は骨芽細胞分化誘導時のみ mRNA、タンパク質ともに発現していること、またノックダウンすることにより骨芽細胞への分化能が低下することから、ODM を用いた分化誘導において hPDL-MSCs の骨芽細胞分化を正に制御しており、同遺伝子は新たな骨芽細胞分化マーカーとなりうることが見出された。さらに *SP7* をノックダウンすることにより ZBTB16 の mRNA、タンパク質発現ともに減少することと、転写因子である OSX が *ZBTB16* のプロモーター領域に結合することから、ZBTB16 の骨芽細胞分化への作用機序は OSX により制御されていることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5221　号	鬼塚　理
論文審査担当者	主　査　中島 友紀 副　査　井関 祥子　　新田 浩	
論 文 題 目	ZBTB16 as a Downstream Target Gene of Osterix Regulates Osteoblastogenesis of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells	

（論文審査の要旨）

間葉系幹細胞(MSCs)は、骨芽細胞分化誘導培地(Osteogenic differentiation medium; ODM)で培養することにより骨芽細胞へと分化することが知られている。その分化の過程に関しては実に複雑な転写因子の制御が関与していると考えられているが、未だその詳細なメカニズムは不明な点が多いのが現状である。

本研究では、ヒトの抜去歯より歯根膜を採取し、酵素処理により単離したヒト歯根膜由来MSCs (hPDL-MSCs)を継代培養し実験を行った。hPDL-MSCs から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて high-throughput mRNA sequencing (RNA-seq)を行い、ODM により mRNA の発現上昇が著明な遺伝子に着目し、その後の実験を行った。mRNA の発現を確認するために quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)法を行い、タンパク質の発現を確認するために Western blotting 法を行った。また、特定の遺伝子の機能を調査するため、small interfering RNA (siRNA)を用いて *ZBTB16* をノックダウンさせた後、骨芽細胞分化指標である alkaline phosphatase (ALP)活性の測定、*BGLAP* と *IBSP* の mRNA 発現の測定、石灰化結節形成の確認を行った。Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)と SP7/osterix (OSX) といった骨芽細胞分化関連転写因子が *ZBTB16* の mRNA 発現を制御しているか調査するため、si*RUNX2* と si*SP7* を導入した後に、qRT-PCR 法にて *ZBTB16* の mRNA 発現の測定を行った。さらに転写因子-DNA の相互結合作用を評価するため chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行った。

主たる結果をまとめると以下である。

1. RNA-seq の解析結果から、ODM による mRNA の発現上昇が最も著明な転写因子は *ZBTB16* であることが見出された。
2. qRT-PCR 法により *ZBTB16* の mRNA 発現は ODM 特異的であり、その発現は経時的に上昇すること見出された。さらに qRT-PCR の結果と同様に、ZBTB16 のタンパク質発現についても ODM 特異的であり、経時的に上昇した。
3. hPDL-MSCs に si*ZBTB16* を導入することにより、ALP 活性の低下、*BGLAP*, *IBSP* の mRNA 発現の低下、石灰化結節形成能の低下を認められた。
4. si*RUNX2* の導入により *ZBTB16* の mRNA 発現に変化は見られなかったが、si*SP7* の導入

により ZBTB16 の mRNA 発現、タンパク質発現ともに有意に減少した。

5. ChIP assay により、OSX は *ZBTB16* のプロモーター領域にある Sp1 binding site 特異的に結合することが見出された。

これらの結果から、以下のことが考察された。RNA-seq の結果より、他の遺伝子と比較して *ZBTB16* は ODM 特異的に発現上昇すること、また qRT-PCR の結果より、ODM 培養時のみ *ZBTB16* の mRNA 発現が上昇することから、ZBTB16 は hPDL-MSCs の骨芽細胞分化において重要な転写因子であると考えられる。また *ZBTB16* を *in vitro* でノックダウンした際に、ALP 活性の低下、*BGLAP*, *IBSP* の mRNA 発現の低下、石灰化結節形成能の低下を認めたことから、骨芽細胞分化を正に制御していると考えられる。さらに、骨芽細胞分化におけるマスター転写因子とされる *SP7* を *in vitro* でノックダウンすることにより、ZBTB16 の mRNA 発現とタンパク質発現が有意に減少し、かつ転写因子である OSX が *ZBTB16* のプロモーター領域に結合することから、ODM による骨芽細胞分化において、OSX が ZBTB16 の発現を制御していると考えられた。

本研究と異なる細胞を用いて実施された先行研究では、ZBTB16 が骨芽細胞分化を正に制御していると報告されている。しかし、その制御機構は不明であり、本研究で見出された OSX が ZBTB16 を正に制御しているという新たな知見は、骨形成の研究を推進する上で十分に評価できると考えられる。本研究を足掛かりとし、今後、MSCs の骨芽細胞分化における効果的な指標の検出や細胞を用いた再生療法の進展に大きく貢献するものと期待される。

よって、本論文は、医歯学研究の発展に広く寄与すると考えられ、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐藤　茉莉恵
論文審査担当者	主　査　川口　陽子 副　査　柴田　俊一　　下山 和弘
論　文　題　目	高齢者に対する甲状軟骨部皮膚牽引が嚥下動態に及ぼす影響

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

高齢になるとさまざまな疾患による摂食嚥下障害を有する人の割合は増加する。摂食嚥下障害は高齢者の主な死因の一つである誤嚥性肺炎を引き起こすことが多い。このため、高齢の摂食嚥下障害者の QOL 維持向上のためには、より安全な食事方法が望まれる。高齢者の大多数は自宅や施設で、自立もしくは介助下で食事を行っている。このうち、摂食嚥下障害が認められ誤嚥のリスクがある者には、より安全に経口摂取を続ける方法として、様々な代償手段が考案され使用されている。しかし、咽頭へ外力を加えることによる嚥下機能への影響を調べた研究はきわめて少ない。喉頭および舌骨の挙上は嚥下運動におけるきわめて重要な要素である。咽頭部に上方向へ外力を加えることは、喉頭挙上動態への影響が考えられる。前方向への外力を加えることは、食道入口部開大量の変化が予想される。しかしながら、甲状軟骨部皮膚牽引による嚥下に関連する器官の解剖学的位置関係の変化、および嚥下運動の時間的変化について検討した報告はない。そこで本研究は甲状軟骨部皮膚牽引の効果を嚥下造影検査によって評価検討を行うこととした。

＜対象と方法＞

対象：平成 27 年 10~12 月に、嚥下障害を主訴として摂食嚥下リハビリテーション外来を受診した 65 歳以上の高齢者のうち、椅子座位が可能で経管栄養を使用していない者を対象とした。その際、検査中に誤嚥した者、気管切開孔がある者は除外した。対象者は 18 名（男性 15 名、女性 3 名、平均年齢 78.8±6.2 歳）で、原疾患は、脳血管障害 14 名、神経疾患 1 名、肺炎 1 名、その他 2 名であった。

方法：デジタル X 線 TV システム（東芝メディカルシステムズ）を用いて 90 度座位、頸部中間位の姿勢をとった被検者に対し、側面より嚥下造影検査（VF）を行った。検査食は、とろみアップパーフェクト®にて中間のとろみ（ポタージュ状）に調整した 40%W/V バリウム液 5ml を使用した。検査者がシリンジを用いて被験者の舌下部に注入し、被検者のタイミングで自由に嚥下を指示した。試行回数はそれぞれ 2 回とし、平均値を用いて評価を行った。牽引する部位は体動がない静止状態における喉頭隆起を触診にて確認し、同部を基準として左右 1 cm の位置にある皮膚とし、検査者が手指にて前上方、つまりオトガイ方向に最大限牽引することとした。尚、被験者の腹側を前方、背側を後方とした。映像は 30 コマ/秒のサンプリング速度にてパーソナルコンピューターに取り込み、通常時の牽引していない状態（以下、非牽引状態とする）と牽引した状態(以下、牽引状態とする）における嚥下運動時の舌骨運動時間、舌骨位置、舌骨移動量、食道入口部開大時間、食度入口部開大量の変化を比較検討した。画像解析は画像ソフト（imageJ ver1.49 National Institutes of

Health）を使用した。計測には第 2 頸椎と第 4 頸椎の下端を結んだ直線を Y 軸とし、第 4 頸椎下端から Y 軸に垂直に引いた直線を X 軸として座標系を設定した。原点は第 4 頸椎下端とし、舌骨位置は舌骨体部下端を指標として、原点からの X-Y 座標点(mm)で計測を行った。計測値は、頸部に貼り付けた直径 15 mm の鉛玉で正規化した。嚥下運動における舌骨位置を以下のように定義し、評価項目(1)~(5)を測定した。

舌骨位置

① 安静位：食塊とりこみ前の安静時
② 嚥下反射開始位：食塊が口腔内保持され嚥下反射が開始する時
③ 最大挙上位：舌骨が最大挙上位置に達する時
④ 最大挙上位：舌骨が停滞運動後、下降運動し始める時
⑤ 嚥下反射終了位：急速な下降後退運動が終了した時

評価項目

(1)舌骨運動時間（s）
　挙上後退運動時間、挙上前進運動時間、前方停滞時間、下降後退運動時間、舌骨合計運動時間
(2)舌骨位置（mm）
　安静位、嚥下反射開始位、最大挙上位、嚥下反射終了位
(3)舌骨移動量（mm）
　挙上後退移動量、挙上前進移動量、下降後退移動量、舌骨合計移動量
(4)食道入口部開大時間（s）
(5)食道入口部開大量（mm）

統計：統計解析は SPSS Statistics 20.0 J を使用し、非牽引状態と牽引状態における上記検討項目について比較検討した。統計解析には対応がある t 検定を用い、有意水準は 5%とした。

＜結　果＞

(1)舌骨運動時間：非牽引時と比較して、牽引時に有意な挙上前進運動時間の短縮および前方停滞時間の延長がみられた。
(2)舌骨位置：安静位の X 値と Y 値、嚥下反射開始位の Y 値、最大挙上位の Y 値、嚥下反射終了位の X 値と Y 値で、非牽引時よりも牽引時の方が有意に大きかった。
(3)舌骨移動量：挙上前進移動量、下降後退移動量および舌骨合計移動量は非牽引時よりも牽引時の方が有意に小さかった。
(4)食道入口部開大時間：非牽引時よりも牽引時の方が有意に大きかった。
(5)食道入口部開大量：非牽引時よりも牽引時の方が有意に大きかった。

＜考　察＞

嚥下運動において、舌や下顎の運動とともに舌骨上筋群が収縮して舌骨は上前方に移動する。これに追従する形で、甲状舌骨筋が収縮し喉頭が挙上する。それらにあわせて輪状咽頭筋が弛緩し、

食塊の圧力とともに食道入口部が開大する。舌骨の運動は、舌骨上筋であるオトガイ舌骨筋、茎突舌骨筋、顎舌骨筋の影響が大きいとされている。これらの筋群によってもたらされる喉頭の十分な挙上は、喉頭蓋反転に寄与し、嚥下中誤嚥防止の上で重要な機能運動である。舌骨上筋が弱くなると、舌骨挙上量および喉頭挙上量が減少すると考えられるため、誤嚥の原因となりうる。高齢者において、嚥下関連筋の筋力低下により舌骨安静位は下降し、舌骨喉頭の挙上が困難になることが予想される。

舌骨は主に舌骨上筋群と舌骨下筋群とに結ばれ、半ば宙に浮いている状態であり、筋肉のバランスによって位置がかわる。本研究の結果より、甲状軟骨部皮膚牽引を行うことで、非牽引時に比し、舌骨は安静位が前上方に変位し、最大挙上位までの移動距離、移動時間および停滞時間が有意に変化することがわかった。これは、甲状軟骨部皮膚の牽引により、舌骨へ下方向にかかる力が減少し、舌骨位置の変化が起こったためと考えられる。舌骨の嚥下開始時の位置が前上方に変位したことで、最大挙上位までの移動距離が短くなっている。このことは、代表的な代償的嚥下方法の一つである顎引き嚥下と同様に下顎骨と喉頭との相対的距離を短縮する効果があることが示唆されたと考えられる。また、最大挙上位までの運動距離の短縮が、同じ筋力でもより短い時間で最大前進位に達することを可能にし、前方停滞時間の延長にも寄与したと考えられる。高齢者の多くに見られるようになる舌骨と喉頭の下垂は嚥下障害患者の機能不全の一症状であるが、甲状軟骨部皮膚牽引により代償的に補償できる可能性があると考えられた。

本研究の結果から、非牽引時と比較して牽引時の食道入口部開大時間、食道入口部開大量はともに有意に増加することが分かった。先行研究では食道入口部の開大には、舌骨の前方への移動量が関与しているといわれており、喉頭挙上術の手技においても、食道入口部の開大という機能の改善には喉頭の牽引は上方だけでなく前方への牽引が必要と報告されている。しかし、嚥下障害者は健常者よりも舌骨の上方移動量が減少し前方移動量が増加する傾向があり、嚥下機能低下による舌骨の挙上不足を、前方移動量を増加することで代償しているともいわれている。嚥下障害者の舌骨運動の影響を前方移動と上方移動で分割して考えることは困難であり、食道入口部の開大には、前方移動量と上方移動量の両方が関わっていることが予想される。以上より、甲状軟骨部皮膚牽引時には、舌骨が上方により大きく移動し、最大挙上位で長く維持されることで、結果的に、食道入口部開大量および食道入口部開大時間が増大したと考えられる。

本研究では、①牽引力を規定していないため試行・被験者により差が生じうること、②対象者が軽度嚥下障害者であるため、重度の嚥下障害者、特に誤嚥・残留への影響は不明であること、③長期的な使用による効果の評価をしていないことの問題がある。以上、3 点について、今後追加の検討が必要であると考える。

＜結　論＞

本研究で使用した甲状軟骨部皮膚牽引法は、侵襲性がなく、訓練器具の準備が不要かつ、頚部の可動域制限を有する患者や、従命指示が困難な患者にも使用でき、介助者だけでなく患者自身も使用が可能である。また、筋力を強化するものではないため、神経疾患やサルコペニアの患者にも適用できる。気管切開孔のように、頚部が牽引できない等の理由がない限り使用できるため、対象患

者の制限がきわめて少ない。以上より、甲状軟骨部皮膚牽引は、喉頭挙上不全、食道入口部開大不全による嚥下障害患者に対する、代償的嚥下方法のひとつとして有用である可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5222　号	佐藤　茉莉恵
論文審査担当者	主　査　川口　陽子 副　査　柴田　俊一　下山　和弘	

（論文審査の要旨）

高齢になるとさまざまな疾患による摂食嚥下障害を有する人の割合は増加する。摂食嚥下障害は高齢者の主な死因の一つである誤嚥性肺炎を引き起こすことが多い。摂食嚥下障害が認められ、誤嚥のリスクがある者には、より安全に経口摂取を続ける方法として様々な代償手段が考案され、使用されている。しかし、咽頭へ外力を加えることによる嚥下機能への影響を調べた研究は極めて少ない。喉頭および舌骨の挙上は嚥下運動におけるきわめて重要な要素である。咽頭部に上方向へ外力を加えることは、喉頭挙上動態への影響が考えられる。前方向への外力を加えることは、食道入口部開大量の変化が予想される。しかしながら、甲状軟骨部皮膚牽引による嚥下に関連する器官の解剖学的位置関係の変化、および嚥下運動の時間的変化について検討した報告はない。

このような背景のもと、佐藤は、本学倫理審査委員会の承認（第 1143 号)を得て臨床試験を実施し、甲状軟骨部皮膚牽引の効果を嚥下造影検査によって評価検討を行った。

研究方法として、嚥下障害を主訴として摂食嚥下リハビリテーション外来を受診した 65 歳以上の高齢者 18 名（男性 15 名、女性 3 名、平均年齢 78.8±6.2 歳）の嚥下造影検査（VF)画像を基に評価を行った。検査食は、とろみアップパーフェクト®にて中間のとろみ（ポタージュ状）に調整した 40%W/V バリウム液 5ml を使用した。検査者がシリンジを用いて被験者の舌下部に注入し、被検者のタイミングで自由に嚥下を指示した。試行回数はそれぞれ 2 回とし、平均値を用いて評価を行った。牽引する部位は体動がない静止状態における喉頭隆起を触診にて確認し、同部を基準として左右 1 cm の位置にある皮膚とし、検査者が手指にて前上方、すなわちオトガイ方向に最大限牽引することとした。そして、非牽引状態と牽引状態における、嚥下運動時の舌骨運動時間、舌骨位置、舌骨移動量、食道入口部開大時間、食道入口部開大量の変化を統計学的に比較検討した。甲状軟骨部皮膚牽引という頸部に外力を加える代償法について検討した点は、極めて独創的であり、すぐれた着想であると評価される。

研究結果として以下の所見が得られた。

1. 甲状軟骨部皮膚牽引を行うことで、舌骨は安静時位置が前上方に変位し、最大挙上位までの移動距離が減少、移動時間が短縮し、最大挙上位における停滞時間は有意に延長した。

2. 甲状軟骨部皮膚牽引を行うことで、食道入口部開大時間、食道入口部開大量はともに有意に増加した。

以上の結果から、佐藤は、甲状軟骨部皮膚の牽引により舌骨へ下方向にかかる力が減少し、舌骨位置の変化が起こったと考察した。舌骨の嚥下開始時の位置が前上方に変位したことによる最大挙上位までの運動距離の短縮が、同じ筋力でもより短い時間で最大前進位に達することを可能

にし、前方停滞時間の延長にも寄与したと考えられる。また、舌骨が上方により大きく移動し、最大挙上位で長く維持されることで、結果的に、食道入口部開大量および食道入口部開大時間が増大したと考えられる。甲状軟骨部皮膚牽引は、喉頭挙上不全、食道入口部開大不全による嚥下障害患者に対する、代償的嚥下方法のひとつとして有用である可能性が示唆された。

本研究で使用した甲状軟骨部皮膚牽引法は、侵襲性がなく、訓練器具の準備が不要かつ頸部の可動域制限を有する患者や、従命指示が困難な患者にも使用でき、介助者だけでなく患者自身も使用が可能であるため、対象患者の制限がきわめて少ない。これは臨床現場でより簡便に利用できる方法であり、有用な方法であると考察される。

以上のように、本研究は、甲状軟骨部皮膚牽引時における嚥下動態を明らかにしたはじめての臨床研究であり、高齢者歯科学のみならず、今後の歯科医療・歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられた。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	井川　泰葉
論文審査担当者	主査　泰羅　雅登 副査　秀島　雅之　　豊福　明
論　文　題　目	Effects of citalopram on jaw-closing muscle activity during sleep and wakefulness in mice

（論文内容の要旨）

要旨

睡眠時ブラキシズム（SB）は睡眠中に行われるグラインディングやクレンチングの総称で、咀嚼筋の非機能的運動である。近年、選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI: Selective Serotonin Reuptake Inhibitor）を投与されたうつ病患者においてSBが発症したとする報告がなされている。SB時には咬筋が強く活動しているため、SSRIが咬筋の筋活動に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されるが、不明な点が多い。そこで本研究では、SSRI の一種であるCitalopram（Cit）をマウスに6日間持続投与し、睡眠/覚醒サイクル、および、咀嚼筋である咬筋の筋活動にどのような影響を与えるか検討した。脳波、眼電図、頸筋および咬筋筋電図を 24時間記録し、12時間ごと（暗期、明期）、6時間ごと（20-02 h、02-08 h、08-14 h、14-20 h）のそれぞれの時間帯における、覚醒、NREM睡眠、REM睡眠の総時間、および咬筋活動パターンとの関連を解析した。その結果、睡眠/覚醒サイクルに大きな変化は認められず、咬筋の平均筋活動も、24時間の中のほとんどの時間帯で有意な変化は認められなかった。一方で、REM睡眠の1回あたりの持続時間は延長し、さらにCitの高濃度投与群では、暗期後半と明期前半のNREM期において、咬筋に高い活動が出現する時間の割合が有意に増加した。これらの結果から、Cit投与は睡眠/覚醒サイクルの日内変動の制御には影響を与えないが、咬筋筋活動を介して睡眠に依存した顎運動の制御に関与している可能性があることが示唆された。

緒言

SB は睡眠関連運動障害に分類され、補綴物の破損など顎口腔系に重大な障害を引き起こす可能性がある。SB は多因子疾患として知られており、遺伝的要因、ストレスなどの心理社会的要因、アルコール、カフェイン、SSRIなどの薬物の摂取などがリスク因子として考えられている。SSRI はセロトニン（5-HT）トランスポーターに結合して再取り込みを阻害し、細胞外の 5-HTを増加させることでうつ病を改善させるが、近年、SSRIの服用によってSBが発症したとの報告がなされている。5-HT は睡眠/覚醒行動、自律神経や咀嚼運動の調節などのさまざまな機能に関連しており、SSRIが睡眠/覚醒サイクルや咬筋活動に何らかの影響を与える可能性が示唆される。本研究では、SSRI の一種である Cit の投与が睡眠/覚醒サイクルや咬筋活動にどのような影響を及ぼすかを検討した。

方法

実験では雄性 C57BL/6 系統のマウス（7-10 週齢）を用い、12 時間ごとの明・暗期のサイクル下で飼育した。麻酔下にて、生体電気信号である脳波、眼電図、頸筋および咬筋の筋電図（EMG）記録用電極の埋入手術を行った。脳波記録用のビス電極は頭蓋骨に埋入し、咬筋・頸筋筋電図記録用のワイヤー電極はそれぞれの筋に 2 本ずつ、また、眼電図記録用ワイヤー電極は右眼に 2 本埋入した。全ての電極からの導線をコネクタに接続し、デンタルアクリルレジンにて頭蓋骨に固定した。

マウスは電極埋入手術後、5 日間の回復期間をおいて、記録環境への馴化トレーニングを 1 日おきに 3 回行った。トレーニング終了後の 2 日目を Day 0 として、午後 8 時より 24 時間、生体電気信号を記録した。Day 0 の記録終了後、マウスを Saline（n=8）、Cit10（10 mg/kg/day : n=9）、 Cit100（100 mg/kg/day : n=7）3 群に分け、Saline あるいはそれぞれの濃度の Cit を持続的に投与するための浸透圧ポンプを麻酔下にて背部皮下に埋入した。投与開始から 6 日目を Day6 として、午後 8 時より 24 時間記録を行った。また、Day 0 と Day 6 の記録終了後に体重を計測した。

得られた脳波、眼電図、頸筋筋電図の記録からマウスの睡眠ステージを覚醒期、NREM 期、REM 期に分類した。咬筋筋活動は波形を整流した後に、10 秒ごとの積分値として算出し、筋活動を個体間で比較をするために、Day 0 の筋活動量の平均値を 100%として Day6 の各睡眠ステージの筋活動量を正規化した。ただし、咬筋 EMG の基底レベルの波形に心電図波形が混入したため、筋活動の有無を判断する際の閾値を 15%とし、15%以下の筋活動しか認められなかった時間帯は筋活動なしとした。Day6 のデータは 6 時間ごと（20-02 h、02-08 h、08-14 h、14-20 h）、12 時間ごと（暗期：20-08 h、明期: 08-20 h）に分け、覚醒・

NREM 睡眠・REM 睡眠の総時間数、出現頻度、エピソード 1 回あたりの持続時間、咬筋の平均筋活動量と咬筋活動時間を計測し、解析を行った。

統計解析は、群内には Friedman followed by Dunn-Bonferroni test、群間には Kruskal-Wallis followed by Dunn-Bonferroni test を用い、有意水準は 0.05 とした。

結果

１）睡眠/覚醒サイクルに対する慢性 Cit 投与の影響

Saline、Cit10、Cit100 の各群において、Day0、Day6 間に有意な体重変化は認められなかった。

覚醒、NREM 睡眠および REM 睡眠、それぞれの総時間数、出現頻度、エピソード 1 回あたりの持続時間について 6 時間ごと（20-02 h、02-08 h、08-14 h、14-20 h）、12 時間ごと（暗期：20-08 h、明期: 08-20 h）に比較解析を行った。

総時間数については、過去の文献と同様に、覚醒期は暗期前半から明期前半にかけてすべての群において減少し、NREM 睡眠期、REM 睡眠期はすべての群において増加した。また、Cit 投与の覚醒期、NREM 睡眠期、REM 睡眠期のそれぞれの総時間数に対する影響はみられなかった。

出現頻度については、覚醒および NREM 睡眠の出現頻度はいずれの時間帯においても、Saline、Cit10、Cit100 の 3 群間に有意差は認めなかった。しかしながら、REM 睡眠の出現頻度は、6 時間ごとの解析では 02-08 h において、12 時間ごとの解析では暗期、明期において Cit10 群と比

較して Cit100 群で有意に減少した。

覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠のエピソード１回あたりの持続時間は、覚醒および NREM 睡眠についてはいずれの時間帯においても 3 群間に有意差は認めなかった。しかしながら、REM 睡眠の持続時間は、6 時間ごとでは 02-08 h および 14-20 h で、また、12 時間ごとでも暗期、明期において Saline 群と比較して Cit10、Cit100 投与群で有意に増加し、さらに 08-14 h では Cit10 群と比較して Cit100 群で有意に増加していた。

２）咬筋活動に対する Cit 投与の影響

覚醒期、NREM 期、REM 期における咬筋の平均筋活動量、咬筋活動時間について 6 時間ごと、12 時間ごとに比較検討を行った。平均筋活動量については Cit の投与による顕著な変化は認められなかった。一方、咬筋活動時間は、覚醒期、REM 期では有意差を認めなかったが、02-08 h と 08-14 h の NREM 期において Saline 群と比較して Cit100 群で有意に延長していた。

考察

１）睡眠/覚醒サイクルへの Cit 慢性投与の影響

Cit 投与は各睡眠ステージ（覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠）の総時間数に影響を与えなかった。これまでにも SSRI をラット、マウスの腹腔内に数週間にわたって繰り返し投与し、各睡眠ステージの占める総時間に対する影響を検討した報告はあるが、それらの結果には一貫性がない。これは投与量、投与期間、動物などの違いに起因する可能性がある。また、5-HT は前脳基底部/視索前野に作用して、サーカディアンリズムと睡眠/覚醒サイクルを統合して睡眠のサーカディアンリズムを作ることに関与しており、実際にこの領域の 5-HT 受容体を阻害するとリズムが消失する。従って Cit 投与による 5-HT のレベル上昇も各睡眠ステージの出現頻度に何らかの影響を与える可能性が考えられるが、暗期から明期にかけての覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠の総時間の増減に比べて、SSRI 投与による 5-HT レベルの上昇が睡眠/覚醒周期に与える変化はおそらく小さく、今回の実験系では検出できていない可能性がある。

一方、REM 睡眠のエピソード１回あたりの持続時間の延長については、Cit 投与によって背側縫線核などで上昇した 5-HT のレベルが REM-off ニューロンに影響を与えている可能性が考えられる。

２）咬筋活動に対する影響

今回の結果では、咬筋の平均筋活動量対する Cit 投与の影響は認められなかった。一方、02-08 h、08-14 h の NREM 期では、Saline と比較して Cit100 の咬筋活動時間は有意に延長した。これらの結果は、Cit 投与によって咬筋筋活動に対する影響はあったものの、筋活動を著しく増強するほどではなかったこと、NREM 期に運動を起動するための閾値に影響して咬筋活動時間を延長した可能性を示している。一方、記録した咬筋 EMG を検討すると、咬筋は睡眠中に phasic もしくは tonic な活動をくり返すパターンを示し、活動の継続時間、活動の間隔は不均一である。本研究では咬筋 EMG を 10 秒ごとの積分値で解析しており、今回の解析ではこのような咬筋の活動パターンの影響を十分に反映していない可能性がある。しかしながら、SB は、浅い NREM 睡眠中に発生することが知られているので、Cit 投与が NREM 期の咬筋活動時間を延長させたことは Cit 投与によって SB が発症する可能性を支持する結果であると考えられる。

ラットにおいて SSRI の一種である Fluoxetine を急性投与すると、Dopamine 取込阻害剤（2

型小胞モノアミントランスポーター阻害剤）の投与によって誘導される顎の震えを増加させたとの報告がある。この報告は、ヒトにおいても向精神薬が投与された患者において Cit 投与が顎顔面筋の過活動を生じさせる可能性を示唆しており、このような患者においては Cit 投与が間接的に SB を悪化させる可能性があることを示している。しかしながら、SSRI と SB の関連についてもまだ不明な点が多く、複数の薬剤と SSRI の相互作用による SB への影響については今後の課題である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5223　号	井川　泰葉
論文審査担当者	主　査　泰羅　雅登 副　査　秀島　雅之　　豊福　明	
論 文 題 目	Effects of citalopram on jaw-closing muscle activity during sleep and wakefulness in mice	

（論文審査の要旨）

選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI: Selective Serotonin Reuptake Inhibitor）はうつ病の治療に広く用いられている。一方で、SSRI は近年、睡眠時ブラキシズム（SB）のリスクファクターとして報告されている。従って、SSRI が睡眠中に咀嚼筋の筋活動に何らかの影響を与えている可能性があるが、その関連性について十分な研究はなされていなかった。本研究で井川は、マウスに SSRI の一種である Citalopram（Cit）を 6 日間慢性的に投与し、睡眠ステージと咬筋活動について解析を行った。これまで本研究のように 24 時間連続して咀嚼筋活動を記録し、睡眠ステージと関連させて解析した研究はなく、新規性は高い。

実験は、麻酔下にて生体電気信号記録用電極（脳波、眼電図、頚筋・咬筋筋電図）の埋入手術を行い、回復期間、記録環境への馴化トレーニングの後、午後 8 時より 24 時間としてコントロールデータを取得した。記録後、Saline または Cit（10 mg/kg/day または 100 mg/kg/day）を充填した浸透圧ポンプをマウスの背部皮下に埋入し、薬物を持続的に投与し、6 日目の午後 8 時より 24 時間データを取得した。脳波、眼電図、頚筋筋電図の記録を基にマウスの状態を覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠に分類し、24 時間を 6 時間ごと、12 時間ごとに分けた上で、各時間帯における覚醒・NREM 睡眠・REM 睡眠の総時間、出現頻度、エピソード 1 回あたりの持続時間、さらに平均咬筋筋活動量、咬筋活動時間について比較検討を行った。

本研究では以下のような結果を得た。

Cit をマウスに 6 日間慢性的に投与することによって

１．体重・睡眠/覚醒 cycle は変化を認めなかった

２．REM 睡眠の出現頻度は減少した

３．REM 睡眠の持続時間は増加した

４．咬筋の平均筋活動量は変化を認めなかった

５．NREM 睡眠中の咬筋活動時間は増加した

すなわち、Cit は睡眠/覚醒サイクルには影響を与えないが、SB が生じるといわれる浅い NREM 睡眠中の咬筋活動時間を延長させたことは Cit 投与によって SB が発症する可能性を支持する結果であると考えられる。本研究は未だ解明されていない SB の機序解明の一助となる可能性があることから、今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きく、よって，本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	津田　優香
論文審査担当者	主査　川口 陽子 副査　和泉 雄一　　宮新 美智世
論　文　題　目	Effect of brushing timing after erosive challenge on enamel loss in situ: white light interferometer and nanoindentation study

＜緒言＞

酸蝕は、摩耗や咬耗など他の wear 因子と混在することで、より硬組織が喪失しやすい状態となる。酸蝕が関与する tooth wear の要因は、唾液性状など生物学的な因子から食生活習慣まで多岐に渡る。これまで、酸蝕後唾液に暴露することで、軟化したエナメル質表層部の硬さが回復することを期待し、歯磨き開始時間を遅らせる効果（以下、遅延歯磨き）が検討されてきた。しかしながら、過去の研究では、in vitro 研究において人工唾液・ヒト唾液間の違いが指摘されたほか、 in situ 研究においての遅延歯磨き効果に関する見解は得られていない。さらに、最近の in vitro 研究では、長時間ヒト唾液に暴露した場合でも再硬化が完全には得られなかったことが報告されており、遅延歯磨き効果の是非は未だに検討が必要である。

エナメル質表層の軟化及び喪失量の定量的分析には、様々な評価手法が用いられてきた。実際の口腔内では、酸蝕に起因するエナメル質表層の喪失は nm 単位の微小な変化であり、実験室レベルでの報告値よりもはるかに少ないことが予想される。このため、口腔内環境に近似した実験条件下では、より精度の高い分析が求められる。白色干渉計は、光学干渉顕微鏡の一種で、近年酸蝕研究に活用され、研磨エナメル質に対し 20nm の測定精度を有することが報告されている。一方、超微小押し込み硬さ試験機は、従来の Vickers や Knoop test などの標準的な硬さ試験とは異なり、1g 以下の荷重や nm 単位での押し込み深さ設定など精度の高い測定が行えるので、in situ での酸蝕エナメル質の微小な表層硬さ変化の評価が可能である。

そこで本研究では、白色干渉計及び超微小押し込み硬さ試験機を用い、酸蝕後から歯磨き開始までの遅延時間が、エナメル質歯ブラシ摩耗量に及ぼす効果について in situ 試験で検討した。

＜材料および方法＞

被験者数 10 名（重度の酸蝕症を呈さない男女各 5 名）。

1)エナメル試料作製

牛前歯より切り出し、鏡面研磨後滅菌した 5mm x 5mm x 2mm のエナメル質試料にネイルバーニッシュにて 1mm×5mm の測定基準面を付与し、直後、3 分後、30 分後、60 分後、コントロール（酸蝕のみ、歯ブラシ摩耗なし）群に分けた。

2)酸蝕

各群試料を口腔内装置に装着後、口腔内に 20 分間留置しペリクルを形成させた。その後口腔外に取り出し、コカコーラ（日本コカコーラ株式会社）に 90 秒間浸漬した後、水洗のみを行った試料をコントロール群、歯ブラシ摩耗試験を行った試料を直後群とした。被験者がガム咀嚼により刺激唾液の分泌を促した後、その他の 3 分後、30 分後、60 分後群の試料を、口腔内に戻し、それぞれ一定時間経過後に取り出し、歯ブラシ摩耗試験を行った。

3)歯ブラシ摩耗

歯ブラシ摩耗試験機（k236、株式会社東京技研）に装着した歯ブラシ（プロスペックヤング、硬さ：ミディアム、株式会社 GC）を用い、荷重 250g にて Milli-Q 水にて 3 倍希釈した歯磨剤スラリー（クリニカ、ライオン株式会社）内で、各 30 ストロークずつ行った。

ペリクル形成から歯ブラシ摩耗までの過程は 1 日 2 サイクル、3 日間連続で行った。

4)測定

歯ブラシ摩耗後、白色干渉計（NanoMap-D, AEP Technology 社）を用いて表面粗さを測定し、基準面と摩耗面との平均段差を求め、これをエナメル質表層の喪失量とした。また、サンプルの基準面及び非歯ブラシ摩耗面に ENT-1100a（Elionix 社）を用いて超微小押し込み硬さ試験を行い、非歯ブラシ摩耗面の平均硬さ/基準面の平均硬さ×100(%)を評価した。非歯ブラシ摩耗面は、歯ブラシ摩耗時に歯ブラシの各タフト間に対応した、毛束の接触しなかった酸蝕エナメル表層部である。

5)被験者の唾液性状

各被験者の唾液を採取し、安静時及び刺激唾液の分泌量、pH、緩衝能を測定(チェックバフ、株式会社堀場製作所)し、その傾向と表面喪失量、相対的硬さの相関関係を person correlation を用いて調べた。

6)統計解析

得られた結果は一元配置分散分析および Bonferroni の調整を用いて、有意水準 5%にて統計処理を行った。

＜結果＞

エナメル質表層の喪失量は、直後群と比較し、全ての口腔内暴露群（3 分後群、30 分後群、60 分後群）において有意に少なく、また、30 分後群と 60 分後群間以外の全サンプル群間で有意差が認められた（$p<0.001$）。直後群のエナメル質表層の喪失量が最も多く(466±95nm)、3 分後群(277±39nm)、30 分後群(157±20nm)、60 分後群(135±22nm)が続き、コントロール群は最も少なかった（71.4±13nm)。

60 分後群は直後群と比較し、71%エナメル質表層の喪失量が少なかった。

測定基準面に対する非歯ブラシ摩耗面の硬さの割合（%）は口腔内に暴露した群で有意に高かった（3 分後群 $p=0.008$、30 分後群 $p=0.001$、60 分後群 $p<0.001$）が、口腔内暴露群間での有意差は認めなかった。

被験者の刺激唾液酸緩衝能は高く、安静時唾液のそれは中等度から高い緩衝能を示した。

エナメル質喪失量の傾向は安静時唾液の緩衝能に相関し、硬さの割合は安静時唾液及び刺激唾液の初期 pH、緩衝能と相関を示した。

＜考察＞

本 in situ 実験では、酸蝕後から歯磨きまでの遅延時間について検討するため、エナメル質表層喪失量と微小硬さ変化を評価した。健全ヒト抜去歯の入手が限られていることから牛歯を用いた。喪失量測定に用いた白色干渉計は、サンプル表面を損傷することなく短時間に走査出来る利点がある。また、白色干渉計は、酸蝕エナメル質の表層変化において、その他の一般的な測定機器よりも精度の高い評価が可能であることが報告されている。なお、その他の実験条件は、以前の報告で推奨されている酸蝕 in situ 研究プロトコルに準拠し、歯ブラシ圧、ブラッシング時間と頻度、酸暴露時間や遅延時間等を考慮して、より実際の日常生活に近似した環境を再現した。エナメル質歯ブラシ摩耗量は、過去の関連報告同様、酸蝕直後の歯磨きはエナメル質摩耗量が有意に多く、口腔内暴露時間（遅延時間）が長くなるにつれ摩耗量が減少した。白色干渉計および超微小硬さ試験結果より、遅延歯磨きの効果が明らかになった。しかしながら、遅延時間 60 分後群のエナメル質喪失量は、コントロール群（酸蝕のみ・歯ブラシ摩耗なし）よりも多く、たとえ 60 分間歯磨き開始を遅延しても完全な回復は認められなかった。

超微小押し込み硬さ試験結果より、酸蝕エナメル質の硬さの回復が示唆された。同硬さの回復は、石灰化溶液や人工唾液を用いる in vitro 研究でたびたび報告されているが、新鮮なヒト唾液を用いる in situ 研究では、唾液中に再石灰化を阻害するタンパク質が含まれるため留意する必要がある。近年のヒト唾液を用いた研究結果と異なり、本研究で硬さの回復が認められた要因として、硬さ試験における測定手法の違いが考えられる。すなわち、従来の硬さ試験では荷重条件 50g で測定していたが、超微小押し込み硬さ試験機では荷重条件を 1g に設定しており、微細な硬さ変化を検出することが可能となったと考えられた。

酸蝕直後群では、比較的低い硬さ値ならびに高い歯ブラシ摩耗量を示した。歯ブラシ摩耗は、酸蝕により軟化したエナメル質層で生じやすく、その下の健全エナメル質では起きにくい。本研究では、エナメル質摩耗量が 30 分後群で直後群と比較し有意に減少したにもかかわらず、酸蝕エナメル質の硬さ回復は 30 分以降で認められなかった。

本研究では、特に安静時唾液において、唾液の初期 pH および酸緩衝能とエナメル質の回復傾向との間に相関性を認めた。Jaeggi & Lussi は、同様な in situ 研究において、口腔内暴露 60 分後にエナメル質摩耗量が減少したことと安静時唾液分泌量との関連性を述べている。今回、わずか 3 分の遅延時間でエナメル質回復傾向に有意差が認められた要因として、ガム咀嚼より分泌された刺激唾液の酸緩衝能が高いことが考えられ、安静時唾液はペリクル形成時に、刺激唾液は口腔内暴露 3 分間において各々関与したものと考えられる。臨床上，安静時唾液と刺激唾液の分泌期間を明確に区別することは困難であるが、3 分後以降もエナメル質の回復傾向が認められることから、安静時唾液の 30 分後ならびに 60 分後における関与が示唆された。

しかしながら、in vitro ならびに in situ 結果と臨床状況との関連性を説明するのは難しい。ヨーロッパ 7 カ国 3187 人の若者を対象とした疫学調査では、朝食後の遅延歯磨きは重度酸蝕症と関連性がないことが示されている。本研究において、牛歯および白色干渉計を用い得られた、各遅延時間間の微細な表層変化の違いは、in vivo 環境下では容易に検出することは出来ないと思われる。

糖分を含有する酸性飲料の摂取により、う蝕を生じる可能性がある。遅延歯磨きは、nm または μm 単位でのエナメル質喪失を防止することに寄与するが、う蝕ではさらに大きい単位で歯が喪失することに留意すべきである。適切な歯磨きを考える際には、う蝕予防を優先するべきであり、遅延歯磨きはう蝕予防を必要とする患者には推奨出来ない。このため、明確な遅延歯磨きの指導は、全ての患者を対象とするのではなく、既に酸蝕に関連した tooth wear の所見を呈するハイリスク患者等を対象に行うべきである。

＜結論＞

本実験条件下において、酸性飲料浸漬後の遅延歯磨きは、エナメル質表層喪失量の減少および微小硬さの回復に効果があり、酸蝕リスクの高い患者に有効な予防法と考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5224　号	津田 優香
論文審査担当者	主　査　川口 陽子 副　査　和泉 雄一　　宮新　美智世	
論 文 題 目	Effect of brushing timing after erosive challenge on enamel loss in situ: white light interferometer and nanoindentation study	

（論文審査の要旨）

＜緒言＞

酸蝕は、摩耗や咬耗など他の wear 因子と混在することで、歯の硬組織が喪失しやすい状態となるもので、tooth wear の要因は、唾液性状や食生活習慣まで多岐に渡る。近年 tooth wear に対する研究が進展し、その予防法についての議論が高まっている。これまで、酸蝕後唾液に暴露することで、軟化したエナメル質表層部の硬さが回復することを期待し、歯磨き開始時間を遅らせる効果（以下、遅延歯磨き）が検討されてきた。しかしながら、これまでのところ遅延歯磨き効果に関する明確な見解は得られていない。これは歯の喪失が長期にわたって生じるものであり短期間の調査や実験での喪失量が極めてわずかであり、正確な測定ができないことや、実験で用いる人工唾液と実際のヒト唾液との違いによると考えられている。本研究は、より口腔内環境に近似した実験条件を設定した in situ 試験により、精度の高い測定法を応用して、酸蝕によるエナメル質の喪失量と表面硬さを評価して、酸蝕後から歯磨き開始までの遅延時間が、エナメル質歯ブラシ摩耗量に及ぼす影響について検討したものである。

実際の口腔内で想定されるエナメル質表層の nm 単位の微小な喪失量の測定には白色干渉計を用い、表面硬さの測定には、nm 単位での押し込み深さが設定できる超微小押し込み硬さ試験機を応用しており、これまでにはない精度の高い測定結果が得られており、高く評価できる。比較的弱い酸であるコーラを用いていること、その日常生活を想定した接触時間、その後の安静時唾液と刺激唾液暴露による影響、歯磨きの遅延時間の設定（直後群、3 分後群、30 分後群および 60 分後群）、さらに歯磨き法など、実験条件の設定は適切であり、十分な知識のもと周到な準備がなされている。唾液の酸緩衝能と結果の相関性を検討したことも評価に値する。用いられた統計手法も適切であり、倫理上の手続きも適切になされている。

得られた結果は以下のようなものである。

1. エナメル質の喪失量は、唾液に接触させないコントロール群が最少で、直後群が最も多く、3 分後群、30 分後群、60 分後群の順に減少した。

2. 非酸蝕面である基準面に対する非歯ブラシ摩耗面の硬さの割合は口腔内に暴露した群で有意に高かったが、口腔内暴露群間で統計的有意差は認めなかった。

3. 被験者の刺激唾液酸緩衝能は高く、安静時唾液は中等度から高い緩衝能を示した。

4. エナメル質喪失量の傾向は安静時唾液の緩衝能に相関し、硬さの割合は安静時唾液及び刺

激唾液の初期 pH、緩衝能と相関を示した。

以上の結果について津田は、測定に用いた白色干渉計の有用性、実験条件の妥当性、安静時唾液と刺激唾液の酸蝕エナメル質の表面硬さに及ぼす影響など慎重な考察を展開している。特にエナメル質摩耗量が 30 分後群で直後群と比較し有意に減少したにもかかわらず、酸蝕エナメル質の硬さ回復は 30 分以降で認められなかったことは、遅延歯磨きを推奨する結果といえる。しかしながら、う蝕による脱灰との比較から、明確な遅延歯磨きの指導は、全ての患者を対象とするのではなく、既に酸蝕に関連した tooth wear の所見を呈するハイリスク患者等を対象に行うべきである、と結論付けている。酸蝕症はすべての人に生じる現象であることを前提に、う蝕を含めた広い視点からの考察によるものであり、評価できる。

以上のように本研究は、酸蝕症によるエナメル質の喪失について、日常生活に近い実験条件による in situ 試験を行い、酸蝕後の遅延歯磨きによる影響を高い精度で評価したものであり、酸蝕症の予防法を確立するための貴重な情報を提示したものである。歯科保存学、予防歯科学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として、相応しいものと判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大島　ふじの
論文審査担当者	主査　水口　俊介 副査　塙　隆夫、池田　正臣
論　文　題　目	A finite element analysis of stress distribution in roots with different types of post systems

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

通常、失活歯に対しては支台築造後に歯冠修復を施すが、支台築造法には様々な術式が存在し、それぞれ歯根内応力分布状態が異なると考えられる。失活歯に対する支台築造法は従来、機械的強度が優れている等の観点から歯科用金属を用いた鋳造築造体を用いる方法が一般的であったが、歯根象牙質と弾性率が大きく異なることからポスト先端部に応力が集中し、時に重篤な歯根縦破折の原因になることが指摘されている。このような状況に対して、近年、象牙質の弾性係数に近似したコンポジットレジンが金属既製ポストあるいはグラスファイバーポストとともに使用されるようになってきた。これまで各種支台築造については模型実験、有限要素法を利用した解析が多く行われてきたが、生体において測定した咀嚼力を考慮した歯根内応力分布状態を検討した研究は少ない。そこで今回、過去に報告した生体で測定した咀嚼力を有限要素モデルに代入して各種支台築造法における咀嚼時の歯根内応力分布状態を解析し、最も歯根内応力の集中を緩和させる支台築造を探求するために研究を行った。

＜研究方法＞

汎用構造解析プログラム（MSC. Marc、MSC SOFTWARE）を用いて支台築造およびクラウンによる歯冠修復を想定した単純小臼歯有限要素モデルを作製した。支台築造部は金銀パラジウム合金を用いた鋳造築造体（CP）、金属既製ポスト併用コンポジットレジン築造（SP）および3,000MPa、29,000MPa、45,000MPa の 3 種類の弾性係数の異なるグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造（FP3、FP29、FP45）の計 5 種類とし、クラウンは全て金銀パラジウム合金によるものを想定した。また、対照として天然歯を想定したモデル（NT）、生活歯歯冠形成を想定した有限要素モデル（VT）も作製した。なお、歯根の長さは 12.0mm、ポスト部の長さは 8.0mm、歯冠高径は 6.0mm、コア部の高径は 4.0mm とした。また、歯根膜の厚みを 0.2mm、歯槽硬線の厚みを 0.3mm とした。これらモデルの歯槽骨下壁を完全拘束し、咬合面中央部の一点に生体で測定したビーフジャーキー咀嚼時の三次元咀嚼力（舌側方向：24N、遠心方向：29N、歯根方向：164N）を代入し、各々の有限要素モデルの歯頸部、ポスト基部およびポスト先端部の象牙質内ミーゼス応力分布状態を測定した。

＜結果＞

ビーフジャーキー咀嚼時の歯頸部の歯根象牙質内応力値は、CP、SP、FP3、FP29、FP45 の順に 10.5、13.4、14.6、14.3、14.2MPa となった。また、天然歯を想定した NT では、6.2MPa、生活歯の歯冠形成を想定した VT では、15.3MPa となった。支台築造を行ったモデルの中では、鋳造支台築造で応力集中が緩和されるのに対し、コンポジットレジンを用いた支台築造において応力が集中する傾向となった。

一方、歯根縦破折と関係が深いと思われるポスト先端部付近の歯根内応力値は、CP、SP、FP3、FP29、FP45 の順に 16.0、23.4、4.9、9.6、11.8MPa となった。また NT では 10.6MPa、VT では 11.2MPa となった。すなわち、支台築造を行ったモデルのうち、ポスト部に歯科用金属を用いた CP、SP で応力集中が認められた。一方で、ポスト部にグラスファイバーポストを用いたものの中では、弾性係数の小さいもので応力集中の緩和が認められた。

ポスト基部においては、歯根内応力値は、CP、SP、FP3、FP29、FP45 の順に 15.5、25.7、1.9、6.3、8.6Mpa となった。また NT では 2.1MPa、VT では 1.7MPa となり、これもポスト先端部と同様の傾向を示した。

＜考察＞

歯根破折の可能性を検討する研究方法としては、歪ゲージを用いた方法、破壊試験、光弾性法、有限要素法などが行われているが、それぞれの方法には長所と短所があり歪ゲージを用いた方法は実際の抜去歯の荷重時の歪みの様相を正確に計測できる反面、解析は歯の表面のみとなり、内部に関しては測定できず、破壊試験は実際の破折様相が評価できる反面、歯の内部の応力分布状態を評価できない。光弾性法はある程度歯の内部の応力分布状態を解析することは可能であるが詳細なモデルを作製することは難しい。有限要素解析はモデルの作製方法、材料定数の値などによって解析結果が異なる可能性があるが、モデルのいかなる部分の解析も可能という利点がある。

臨床において歯根破折は生活歯よりも失活歯に圧倒的に多く、鋳造支台築造は重篤な歯根縦破折を生じさせる可能性があるとされている。一方、コンポジットレジン築造は再治療可能な歯頸部での歯根水平破折が多く認められる。それ故、支台築造を施した歯の歯根象牙質のポスト先端部付近および歯頸部の応力分布状態を検討することは重要な意義があると考えられる。

コンポジットレジンを用いた支台築造法(FP3、 FP29、 FP45、 SP)においては、CP、NT と比較して歯頸部歯根象牙質に応力集中が認められた。VT も同様に歯頸部において応力集中が認められたが、これは実際の臨床では楔状に欠損を生じるものの，生活歯故に患者から痛みという情報として歯科医師に伝達されることから比較的早期に対応することが可能となり、重篤な結果にあまりつながらないと思われる。歯科用金属をポスト部に用いている CP、SP においてはポスト基部およびポスト先端部に応力集中が認められ、このことは歯根縦破折につながると考えられる。とりわけ、SP は歯頸部にも応力集中が認められることから、垂直性、水平性の両歯根破折に関して十分に注意を払う必要があると考えられる。グラスファイバーポストを用いたレジン築造は、ポスト先端部の応力集中を緩和させることから、重篤な歯根縦破折を生じさせる可能性はポスト部に金属を用いた支台築造法と比較して低いことが予想される。また、グラスファイバーポストを用いたレジン築造では、歯頸部象牙質の応力集中はグラスファイバーポストのヤング率の影響を比較的受けないが、ポスト先端部の歯根象牙質の応力値は弾性係数の大きさに関係しており、ヤング率の低いグラスファイバーポストを使用することによってポスト先端部の応力集中が

より緩和されることが明らかとなった。この結果より、比較的弾性係数の低いグラスファイバーポストを用いたコンポジットレジン築造が最も応力集中を緩和し、重篤な歯根縦破折を生じさせる可能性が低いことが予想される。

＜結論＞

様々な支台築造時におけるビーフジャーキー咀嚼時の歯根内応力分布状態について有限要素解析を用いて検討した結果、以下の結論が得られた。

1） ポスト基底部付近の歯根内象牙質における応力値はポスト部に歯科用金属を用いた鋳造支台築造、金属既製ポスト併用コンポジットレジン築造において大きな値を示したのに対し、最も弾性係数の小さいグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造では概ね、天然歯、生活歯歯冠形成歯とほぼ同程度の低い値を示した。

2） コンポジットレジン築造においては使用するポストの種類にかかわらず、歯頸部歯根象牙質に比較的大きな応力集中が認められ、また同様の傾向が生活歯の歯冠形成を想定したモデルにおいても認められた。

3） ポスト先端部付近の歯根内象牙質における応力値は、ポスト基底部と同様にポスト部に歯科用金属を用いた鋳造支台築造、金属既製ポスト併用コンポジットレジン築造において大きな値を示した。

4） グラスファイバーポストを併用したコンポジットレジン築造においては、弾性率の小さいグラスファイバーポストを使用した場合にポスト先端部付近の歯根象牙質の応力集中を緩和させる傾向が認められた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5225　号	大島　ふじの
論文審査担当者	主　査　水口　俊介 副　査　塙　隆夫、池田　正臣	
論 文 題 目	A finite element analysis of stress distribution in roots with different types of post systems	

（論文審査の要旨）

通常、失活歯に対しては支台築造後に歯冠修復を行う。支台築造法には従来、歯科用合金の鋳造築造体が多く用いられてきたが、弾性係数が象牙質と大きく異なることから、時に重篤な歯根縦破折を惹起する可能性があることが指摘されている。そのため、弾性係数が歯科用金属と比較して象牙質に近いコンポジットレジンが金属既製ポスト、グラスファイバーポストなどの既製ポストと併用して支台築造に応用されるようになってきた。近年臨床応用が増加しているグラスファイバーポストは、試作品を含め、様々な弾性係数を有するものが開発されているが、臨床応用にあたり必ずしも十分に歯根破折に関連する象牙質内応力分布状態について検討されていないのが現状である。これまで行われてきた抜去歯を用いた破壊強度試験では歯根破折を引き起こす最大応力を評価しているが、この値は抜去歯自体の歯根の形態、萌出から抜歯までの期間、抜歯後からの保存期間、保存方法などのいわゆる個体差の影響を受けやすいのが現状である。そこで大島は、日本人の平均的な小臼歯の形態を簡素化した有限要素モデルを作成し、これをもとに従来の鋳造築造体、金属既製ポストおよび種々の弾性係数を有するグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造および支台歯歯冠形成後のクラウン装着を想定した有限要素モデルを作成し、これらのモデルに過去に生体で測定されたビーフジャーキー咀嚼時の咀嚼力を負荷させ、歯根内応力分布状態を評価した。有限要素解析の結果はモデルの作製方法に依存するところがあり、正当性を確認することは極めて重要なことと考えられる。

大島は今回の研究に関して、有限要素モデルにおいて算出した荷重時の歯の変位様相とこれまでに生体で実測された荷重変位曲線を比較検討し、より生体に近いモデルとするために歯根膜に非線形の性質を付与し、さらに歯根膜を３層以上にするとより生体に近似することを確認し、有限要素モデルを改良している。このように、生体に近似させた有限要素モデルを用いて種々の支台築造法におけるクラウン装着時の歯根内応力分布状態を検討した報告は少なく、その着眼点は高く評価でき、得られた結果に対する検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本実験が遂行されたと考えられる。

本研究により得られた結果は以下の通りである。

１）　ポスト基底部付近の歯根内象牙質における応力値はポスト部に歯科用金属を用いた鋳造支台築造、金属既製ポスト併用コンポジットレジン築造において大きな値を示したのに対し、最も弾性係数の小さいグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造では概ね、

天然歯、生活歯歯冠形成歯とほぼ同程度の低い値を示した。

2）　コンポジットレジン築造においては使用するポストの種類にかかわらず、歯頸部歯根象牙質に比較的大きな応力集中が認められ、また同様の傾向が生活歯の歯冠形成を想定したモデルにおいても認められた。

3）　ポスト先端部付近の歯根内象牙質における応力値は、ポスト基底部と同様にポスト部に歯科用金属を用いた鋳造支台築造、金属既製ポスト併用コンポジットレジン築造において大きな値を示した。

4）　グラスファイバーポストを併用したコンポジットレジン築造においては、弾性率の小さいグラスファイバーポストを使用した場合にポスト先端部付近の歯根象牙質の応力集中を緩和させる傾向が認められた。

こうした結論に至るまでの考察は、支台築造における材料学的な特徴を十分に理解したうえで理論的な展開がなされており、申請者の本領域における十分な知識を有していることを裏付けるものである。

以上のように、申請者　大島ふじのが本研究領域において種々の支台築造時のクラウン装着歯における咀嚼時の歯根内応力分布状態の詳細について明らかとし、今後の支台築造法のあり方に対して重要な知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、補綴学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	三ツ山　晃弘
論文審査担当者	主査　　泰羅　雅登 副査　　小野　卓史　　鈴木　哲也
論　文　題　目	Effects of teeth clenching on the soleus H reflex during lower limb muscle fatigue

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

先行研究において、ヒラメ筋 H 反射は噛みしめに伴って促通され、その促通量と噛みしめ強度との間には有意な正の相関が存在することが明らかになっている。しかし、下肢筋疲労時の H 反射に対する噛みしめの効果は不明である。そこで本研究では、下肢筋疲労時のヒラメ筋 H 反射および等尺性足関節底屈筋力が噛みしめに伴いどのような影響を受けるのかを調べた。

被験者は顎口腔機能に異常のない健常成人とした。筋疲労誘発課題は 5 分間（TS1）と 10 分間（TS2）の右足つま先立ちとし、TS1 と TS2 にそれぞれ 13 名（男性 9 名）と 9 名（男性 6 名）が参加した。筋電図（EMG）は皿状表面電極を用いて両側咬筋および右側ヒラメ筋から記録した。ヒラメ筋 H 反射は脛骨神経の電気刺激により誘発した。また下肢筋疲労時の筋力に対する噛みしめ効果を検証するため、筋力測定装置による等尺性足関節底屈筋力を測定した。咬合条件は随意性最大噛みしめ（MVTC）と下顎安静位（RP）の 2 種類とした。ヒラメ筋 H 反射と等尺性足関節底屈筋力は TS1 と TS2 の前後にそれぞれ計測した。統計学的分析には一元配置分散分析法、ボンフェローニ法および対応のある t 検定を用いた（$P<0.05$）。

TS1 の前後において、MVTC 時のヒラメ筋 H 反射の振幅は RP 時に比較して有意に増加した。TS1 前の MVTC 時、TS1 後の RP 時および MVTC 時における等尺性足関節底屈運動時のピークトルク（PT）はそれぞれ 108.0%、83.7%および 88.9%（TS1 前の RP 時における PT を 100 とした時の百分率）であり、全ての条件間で有意差が認められた。また TS2 前では、MVTC 時におけるヒラメ筋 H 反射の振幅は RP 時より有意に大きかった。しかし、TS2 後では、全被験者で MVTC 時のヒラメ筋 H 反射の振幅は RP 時より大きかったにもかかわらず、両者に有意差は認められなかった。TS2 前の MVTC 時、TS2 後の RP 時および MVTC 時の PT はそれぞれ 110.1%、72.7%および 77.0%（TS2 前 RP 時の PT を 100 とした時の百分率）であり、TS2 後の RP 時と MVTC 時の間には有意差は認められなかった。

本研究結果より、TS2 後の RP と MVTC 時の比較では統計学的有意差は認められなかったが、TS2 後では全被験者で MVTC 時のヒラメ筋 H 反射の振幅は RP 時より大きかった。したがって、TS1 と TS2 の結果から、筋疲労の程度に関係なく噛みしめがヒラメ筋 H 反射に対して促通効果を及ぼしうることが明らかになった。また、筋疲労によって等尺性足関節底屈筋力が 83.7%程度減少しても噛みしめによる筋力増強効果は発現するが、さらに疲労して 72.7%にまで減少すると噛みしめ効果は得られなくなることが確認された。

＜緒言＞

スポーツ歯学の発展に伴い、口腔運動機能と全身運動機能に関する様々な研究が行われてきた。我々もこれまでに、ヒラメ筋 H 反射が噛みしめに伴い促通され、その促通量と噛みしめ強度の間には有意な正の相関が存在することを見出した。さらに噛みしめが下肢の等尺性筋力を増加させることを明らかにした。一方、運動によって筋疲労が生じるのは周知の事実であり、それは筋収縮時の筋張力が減弱することを意味する。山中らは等速性膝伸展筋力に対する噛みしめの効果が筋疲労の程度に依存していることを報告した。また、これまでに、筋疲労時の H 反射そのものについて調べられた研究は多く見受けられるが、筋疲労時の H 反射に対する噛みしめの効果に関する研究はなかった。そこで本研究では、下肢筋疲労時のヒラメ筋 H 反射および等尺性足関節底屈筋力に対する噛みしめ効果について調べた。

＜方法＞

被験者は顎口腔機能に異常の認められない健常成人とした。下肢筋疲労を誘発するための運動課題は 5 分間（TS1）と 10 分間（TS2）の右足つま先立ちとした。ヒラメ筋疲労は筋電図（EMG）データから中央パワー周波数（MdPF）の変化によって評価した。TS1 には 13 人（平均 28.5±2.9 歳、男性 9 人）、TS2 には 9 人（平均 29.1±3.0 歳、男性 6 人）が参加した。EMG は皿状表面電極を用いて両側咬筋および右側ヒラメ筋から記録し、咬合条件は随意性最大噛みしめ（MVTC）と下顎安静位（RP）の 2 種類とした。ヒラメ筋 H 反射は脛骨神経の電気刺激により誘発した。刺激には持続時間 1ms の矩形波を用い、誘発される H 波の振幅が最大 M 波の約 30%となる強度に設定した。測定は、咬合条件をランダムに設定したうえで、予測や注意などの影響を排除するため 8 秒以上のランダムな刺激間隔での刺激 25 回を 1 セッションとして、TS1 および TS2 前後にそれぞれ 4 セッション行った。筋疲労時の筋力に対する噛みしめの効果を検証するため、筋力測定装置（Cybex6000 Testing & Rehabilitation）による等尺性足関節底屈筋力を測定した。仰臥位にて右側膝関節 90°屈曲位で固定し、随意性最大努力による 3 秒間の等尺性足関節底屈運動を行わせ、その時のピークトルク（PT）値を計測した。咬合条件は MVTC と RP とし、TS1 および TS2 前後でそれぞれ 5 回ずつ計測した。結果の統計学的分析には一元配置分散分析法、ボンフェローニ法および対応のある t 検定を用いた。有意水準は P=0.05 とした。

＜結果＞

【筋疲労誘発運動 TS1 について】

TS1 終了前 30 秒間におけるヒラメ筋 MdPF は開始直後の 30 秒間に比べて 20.6%有意に減少した。TS1 後の MVTC 時の右側および左側咬筋 MdPF は、TS1 前と比較して、それぞれ 98.3%、95.4%であった。右側咬筋には統計学的有意差が認められたが、左側咬筋には認められなかった。

TS1 前の MVTC 時、TS1 後の RP 時および MVTC 時の H 反射振幅はそれぞれ 116.7%、102.3%および 113.6%（TS1 前の RP 時の H 反射振幅を 100 とした時の百分率）であった。多重比較の結果、TS1 前、TS1 後いずれにおいも MVTC 時の振幅は RP 時の振幅に比べ有意に大きかった（TS1 前: P< 0.0001、TS1 後: P< 0.0001）。

TS1 前の MVTC 時、TS1 後の RP 時および MVTC 時の足関節底屈 PT はそれぞれ 108.0%、83.7%

および 88.9%（TS1 前 RP の PT を 100 とした時の百分率）であった。多重比較の結果、TS1 前 RP と TS1 前 MVTC（P=0.005）、TS1 前 RP と TS1 後 RP（P=0.001）、TS1 前 RP と TS1 後 MVTC（P=0.029）、TS1 前 MVTC と TS1 後 RP（P< 0.0001）、TS1 前 MVTC と TS1 後 MVTC（P< 0.0001）および TS1 後 RP と TS1 後 MVTC（P= 0.002）間にそれぞれ統計学的有意差が認められた。

【筋疲労誘発運動 TS2 について】

TS2 終了前 30 秒間におけるヒラメ筋 MdPF は開始直後 30 秒間に比べて 28.2%有意に減少した。TS2 後の MVTC 時の右側咬筋 MdPF は TS2 前の 97.7%であったが、左側咬筋 MdPF は TS2 前と比べて変化はみられなかった。右側咬筋には統計学的有意差が認められた。

TS2 前の MVTC 時、TS2 後の RP 時および MVTC 時の H 反射振幅はそれぞれ 111.1%、114.1%および 120.0%（TS2 前の RP 時の H 反射振幅を 100 とした時の百分率）であった。多重比較の結果、TS2 前の MVTC 時の振幅は TS2 前の RP 時の振幅に比べて有意に大きかった（P = 0.003）。TS2 後の RP 時と MVTC 時の比較では統計学的有意差は認められなかったが、全被験者の TS2 後の MVTC 時の振幅は RP 時より大きかった。

TS2 前 MVTC 時、TS2 後の RP 時および MVTC 時の足関節底屈 PT はそれぞれ 110.1%、72.7%および 77.0%（TS2 前の RP 時の PT を 100 とした時の百分率）であった。多重比較の結果、TS2 後の RP 時と MVTC 時の PT の比較では統計学的有意差は認められなかったが、TS2 前 RP と TS2 前 MVTC（P=0.019）、TS2 前 RP と TS2 後 RP（P=0.009）、TS2 前 RP と TS2 後 MVTC（P=0.039）、TS2 前 MVTC と TS2 後 RP（P=0.002）および TS2 前 MVTC と TS2 後 MVTC（P= 0.008）間にそれぞれ有意差が認められた。

＜考察＞

筋力測定の実験は実験自体に筋力を増大させる効果があることが報告されているため、今回は実験間隔を 2 週間以上設けて行った。また脛骨神経への繰り返し刺激によって H 反射の振幅は抑制を受けることが報告されているため、刺激間隔は 8 秒以上に設定した。さらに H 反射は予測や注意などの精神的状況によって強く影響を受けることが知られているため（motor set）、ランダムな刺激間隔とした。

筋疲労は中枢性疲労と末梢性疲労に分類される。中枢性疲労は各々の筋肉の活性化を阻害するように進行し、脳や脊髄レベルに起因するとされる。末梢性疲労は局所的な筋肉の変化が生じて、中枢からの命令の実行を妨げられることによる。EMG 周波数は末梢性疲労に伴い低周波数帯に移行することがわかっている。従って MdPF は筋疲労を示すパラメータとして用いられ、本実験でもヒラメ筋の MdPF は筋疲労誘発課題 TS1 と TS2 に伴ってそれぞれ 20.6%と 28.2%の減少を示したことから、用いた右足つま先立ちが筋疲労を誘発する運動課題として適切であると考えられた。一方、疲労後の咬筋 MdPF は疲労前に比べてわずかな減少を示したが、いずれの被験者も実験中に咬筋の疲労感を訴えることはなかった。

これまでの運動力学的研究で噛みしめ時に等尺性筋力が 7.6%増加したことが報告されており、これは今回の実験結果と一致する。下田らによると、最大随意収縮による等尺性底屈筋力は 41-50 回の反復で約 80%に減少するという。これは今回、筋疲労誘発課題で用いた 5 分間つま先立ちと同程度の疲労と考えられる。また等速性膝関節伸展運動では、除体重 PT が筋疲労により 65%に減少す

るまでは、噛みしめによる増大効果がみられたと報告されているが、今回の等尺性足関節底屈運動ではこの報告よりやや早い段階で消失していた。

本実験での噛みしめによる H 反射の振幅増大という結果は、ヒラメ筋運動ニューロンプールへの促通作用がヒラメ筋疲労時にも機能していることを示唆している。この噛みしめによる H 反射変調の機序はこれまでの研究から上位脳からの運動指令に加えて口腔領域に生ずる感覚情報が関与していると考えられる。さらに近年の fMRI 研究から、噛みしめによる筋力増大効果には一次運動野、帯状回、補足運動野そして小脳が関与していることがわかっており、本実験での下肢筋疲労時の噛みしめによる H 反射促通作用にもこれらの領域が関与している可能性がある。

＜結論＞

本研究より、TS2 後の RP 時と MVTC 時の比較では統計学的有意差は認められなかったが、全被験者の TS2 後の MVTC 時の振幅は RP 時より大きかった。よって、ヒラメ筋 H 反射については下肢筋疲労の程度に関係なく、噛みしめによって促通していることが明らかになった。また、下肢筋疲労によって等尺性足関節底屈筋力が 83.7%程度減少しても噛みしめによる筋力増強効果は発現するが、さらに疲労して 72.7%にまで減少すると噛みしめ効果は得られなくなることが確認された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5226　号	三ツ山　晃弘
論文審査担当者	主査　　泰羅　雅登 副査　　小野　卓史　　鈴木　哲也	
論 文 題 目	Effects of teeth clenching on the soleus H reflex during lower limb muscle fatigue	

（論文審査の要旨）

最大筋力が必要とされるような高強度運動時に、ヒトは歯を食いしばることにより筋力値を増大させる。すでにこの点については科学的にも立証されており、運動力学的研究から随意性最大噛みしめを行使することで静的な四肢筋力が有意に向上することが明らかにされている。一方運動やスポーツを行うと疲労し、疲労が蓄積すれば筋力は低下するが、こうした筋疲労の発生進行過程における噛みしめの遠隔筋促通効果の存在はほとんど研究されておらず不明な点が多い。過去の等速性膝関節伸展筋力連続発揮実験で初期筋力値 65%相当まで噛みしめによる筋力増強効果が見込める可能性が示唆されているが、この効果機序に関する知見は乏しい。こうした背景を踏まえ、三ツ山晃弘は下肢筋疲労時の噛みしめによる遠隔筋促通効果の検証と神経生理学的機序を明らかにするべく、脊髄伸張反射および最大発揮筋力を指標とした本研究を着想するに至った。

実験では、片足つま先立ち持続課題にて下肢筋疲労を誘発した状況下で、随意性噛みしめ時のヒラメ筋ホフマン反射（H 反射）の促通動態を記録し、下位運動ニューロンの興奮性を解析することに加え、運動力学的見地から実際の筋力発揮に対する効果検証も行う工夫を凝らしており、新規性の高いものとなっている。H 反射は清明な意識下にあるヒトの運動機能を無侵襲に解析することができる誘発筋電図であるが motor set の影響を受けやすいため対策が求められる。これに対して申請者は刺激のタイミングと咬合条件の指示の双方プログラムをランダム化することで問題解決を図っており、誘発筋電図に関する深い理解と十分な解決能力が窺える。疲労強度を変化させて効果の発現様相を比較解析している点や、疲労そのものも高速フーリエ変換（FFT）処理で得られたヒラメ筋の筋電図波形の周波数解析を行って定量的評価を加えている点も評価できる。

得られた主な結果は以下の通りである。

1. 筋疲労前、5 分間筋疲労課題後ともに、随意性最大噛みしめによってヒラメ筋 H 反射は有意な促通を示した。
2. 10 分間筋疲労課題後、噛みしめによってヒラメ筋 H 反射は促通を示した。
3. 等尺性足関節底屈筋力に関して、疲労前下顎安静位の平均ピークトルク値を 100 とした場

合、疲労前噛みしめ、疲労後安静位および5分疲労後噛みしめ時のピークトルク値はそれぞれ108.0%、83.7%および88.9%となり、各条件間にすべて有意差を認めた。
4. 一方10分筋疲労下においては、疲労前噛みしめ、疲労後安静位、疲労後噛みしめ時のピークトルク値はそれぞれ110.1%、72.7%および77.0%となり、疲労後の安静位と噛みしめ時の間に有意差は認められなかった。

本研究より、筋疲労下における噛みしめの遠隔筋促通効果をH反射と筋力の両面から分析検討した結果、筋疲労が発生して筋力が約15%低下する状況では噛みしめの遠隔筋促通効果は確認されるのに対し、約30%にも達すると有意な効果が消失することが明らかとなった。そして筋疲労下でもH反射が促通を示し続ける点に着目し、過去の研究成果を踏まえながら論理的な推考を加え、筋疲労時の噛みしめの機能的意義は姿勢保持にあると結論づけている。

以上のように、本研究は運動・スポーツの実施に伴って不可避的に発生する筋疲労と咬合の遠隔筋促通効果との関わりを詳細に検証したものであり、咬合と身体運動機能の関係解明につながる重要かつ貴重な知見を見出しており、今後のスポーツ歯科医学の進歩発展に貢献するところが大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	深沢　慎太郎
論文審査担当者	主　査　　谷口　尚 副　査　　高久田　和夫，大木　明子
論　文　題　目	Application of addition-cured silicone denture relining materials to adjust mouthguards

＜緒言＞

近年、歯および歯周組織の外傷予防においてマウスガード（MG）が有用であることがますます認知されてきている。FDI の政策声明においても歯科外傷の予防にマウスガードが推奨されている。

MG 材料は衝撃吸収能、衝撃分散能、耐久性といった具備すべき物性がある。現在はそれらを考慮に入れて、エチレン酢酸ビニル共重合体（EVA）を主成分とする MG 材料が用いられている。EVA は口腔内使用への安全性に関して FDA の承認が得られている。耐久性に関しては、in vitro での報告はいくつかあるものの、in vivo のものは非常に少ない。

MG の適合性の変化を研究した報告はほとんどないが、臨床においては反復使用による適合性の低下が頻繁にみられる。MG の調整は、歯列および咬合の変化や治療のたびに必要となる。繰り返しの脱着や咬合力・衝撃力により MG の変形が起こり、適合性や維持力が低下する。さらに穿孔や損傷があった場合は、調整だけでなく裏装や再製作が必要となることもある。しかしながら、チェアサイドでの MG の修理は難しく、現在は再製作となる症例がほとんどである。そのため経済的な負担や競技スケジュールの調整が選手に課されることとなる。

適合不良になった MG を想定した適合精度改善のための基礎研究は過去にも行われてきたが、いずれも臨床応用できるほどの十分な結果は得られていない。特に MG シート材料として広く用いられている EVA は難接着性材料であり、適合不良になった MG 内面を裏装することは接着の観点から難しいのが現状である。しかしながら、義歯のように内面を裏装することで適合精度を改善することができれば、MG の修理・調整の選択肢が広がり、患者の負担も軽減できると考えられる。

以上のような背景から、本研究では、現在、歯科臨床で用いられているシリコーン系義歯床用裏装材に着目し、シリコーン系義歯床用裏装材の衝撃吸収能および MG シート材料である EVA とシリコーン系義歯床用裏装材との接着強度を評価した。

＜方法＞

1. 衝撃吸収試験

2 種類の付加型シリコーン系義歯床用裏装材（Evatouch®Super、ネオ製薬工業：ES、SOFRELINER TOUGH Medium、トクヤマデンタル：ST）を用いた。試料片は厚さ 2 mm、直径 50 mm の正円形とした。試験片は金型モールドを用いて成形し、成形後は室温 23℃にて 24 時間保管した。

試験はデュポン衝撃試験機を一部改変したものを使用した。各試片を厚さ 5 mm のステンレス鋼板上に静置し、直径 20 mm 鉄球（32.6 gf）を 600 mm 上方から自由落下させて加撃し、このときに発生する荷重変化をロードセルセンサ 3 個にて測定し、20 kHz でパーソナルコンピュータにデータを収録した。測定データをもとに最大衝撃荷重（MIF）および MIF 到達時間（MIF-t）を算出し

た。各種試料片の測定回数は 5 回とした。また、試料片を介さずに直接ステンレス鋼板上に鉄球を落下させたものをコントロールとした。

2. 接着剥離試験

2-1 材料

MG 材料は、EVA を主成分とした市販 MG 材料（Erkoflex®、エルコデント）を用いた。MG の調整用材料には、2 種類の付加型シリコーン系義歯床用裏装材（ES、ST）を用いた。

2-2 方法

MG シート材料の接着面の表面処理について以下の 4 通りの方法で行った。①コントロール群：表面の加熱処理なし。②MG シート表面にレジン粉末（UNIFAST® III クリアー、ジーシー）を散布、熱プレス機を使用して 130℃にて加熱（85 秒、300 秒、600 秒）、その後室温にて徐冷し、埋入処理を行った（以下、処理 E）。③接着面に対し粉液混和したアクリルレジン（UNIFAST® III クリアー）を筆にて塗布した（以下、処理 A）。④処理 E ののち処理 A を行った（以下、処理 EA）。各種表面処理した MG シートに対して、シリコーン裏装材との接着前に、付属のプライマーを塗布したのち、直ちにシリコーン裏装材を接着させ、室温にて硬化させた。

接着してから 24 時間放置後、平行部が幅 4 mm，長さ 15 mm のダンベル型（JIS K6251:2004 に準拠）に切断し、これを半切して試験片とした。

剥離試験は既報に従い、試料片を専用のジグにて万能試験機（1123 型、Instron）に保持し、クロスヘッドスピード 50 mm/min で行った。MG シートより剥離するまでの最大荷重を試験片の幅で除したものを接着強さとした。試料数は各群 6 個とした。

2-3 統計学的解析

二元配置分散分析ののち、Tukey's honest significant difference post-hoc test を行なった（有意水準 5%）。2 要因は 1）処理 E の加熱時間、2）処理 A の有無、とした。

＜結果＞

1. 衝撃吸収試験

a. MIF

ES と ST の MIF 値（mean±S.D.）はそれぞれ 410.9±8.6N、334.1±9.3N であった。

b. MIF-t

ES と ST の MIF-t 値（mean±S.D.）はそれぞれ 0.64 ± 0.02 ms、0.60 ± 0.04 ms であった。

2. 接着剥離試験

接着剥離試験の結果、MG シート表面に処理 EA を施し、ST を接着させたものが有意に高い接着強度を示した。熱処理を行わなかった試験片（コントロール群、処理 A 群）は接着強度が弱すぎるため、測定不能であった。

＜考察＞

1. 衝撃吸収試験

本研究の衝撃吸収試験ではコントロール荷重をおよそ 660N になるように設定した。コントロール荷重の大きさは外傷の頻度の高い上顎前歯およびその周囲にある上顎骨の衝撃耐性値を参考にし

た。

衝撃吸収試験の結果は、コントロールに比べ MIF は ES で 38%、ST で 49%減少した。また、MIF-t は ES で 1.64 倍、ST で 1.54 倍延長した。この結果より、我々が先行研究で行った市販の MG 材料の衝撃吸収試験の結果に比べて、シリコーン系義歯床用裏装材は同等以上の衝撃吸収能があることが示唆された。

2. 接着剥離試験

一般的に接着試験は、試験片の接着界面にかかる力の作用方向の違いを基準に、どの試験方法を選択するのか決められている。本研究では T 型剥離強度試験を選択した。接着のための表面処理として一部の試験片に熱処理を行った。加熱埋入処理の設定は温度 130°C、 85、300、600 秒であった。本研究での加熱温度、加熱時間の設定は選択した MG 材料の Erkoflex®（2mm）の成形の際に用いる設定が 130°C、85 秒であることを基準にした。

接着剥離試験の結果、コントロール群と処理 A 群は接着強度が弱く、測定不能であった。処理 E 群では一定の接着強さが認められたが、臨床的には不十分であると思われた。また接着剥離試験後の試験片接着界面の観察では、MG シート、シリコーンの両側にアクリルレジン粉末の球状の外形が確認でき、熱処理が十分ではなく、アクリルレジン層で破壊が起こったと考えられた。一方で処理 EA 群は非常に高い接着強さを示し、特に ST を用いた試験片では 2.40 - 2.55 N/mm となった。横田の報告によれば、EVA 系 MG シートと歯科用シリコーン材料を試作接着材とサンドブラストを組み合わせ、接着試験を行ったところ、接着強さが 0.51 N/mm であったことから、本研究の接着強度は非常に高いものと考えられる。ST を用いた処理 EA 群に焦点を当てると、加熱時間による接着強度の有意差は認められず、85 秒の加熱時間でも十分な接着強度が得られることが示唆された。また、接着試験後の試験片の観察では、試験片のほとんどが接着界面やアクリルレジン層ではなく、シリコーン部分で破壊されていることから、接着強度としてはシリコーン材料の限界であると考えられ、このことからも加熱時間に接着強度が依存しないことが示唆される。

今後、実際に臨床で MG を製作する際に MG 材料にアクリルレジン粉末を埋入できるかの検討や MG 材料とシリコーン材料を接着させた状態での衝撃試験を行う必要があると考えられる。

＜結論＞

本研究より、口腔内に使用可能な材料を用いて、難接着性材料である EVA と付加型シリコーン材料に対し十分な接着強度を付与することに成功し、付加型シリコーン系義歯床用裏装材は MG 調整用材料として臨床応用され得ることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5227　号	深沢　慎太郎
論文審査担当者	主　査　　谷口　尚 副　査　　高久田　和夫，大木　明子	
論 文 題 目	Application of addition-cured silicone denture relining materials to adjust mouthguards	

（論文審査の要旨）

スポーツ歯科外傷予防のマウスガード（MG）は国際歯科連盟（FDI）の政策声明にも採択され、世界各国で普及しつつあるが、昨今症例の多様化に伴って、きめ細かい臨床対応が求められている。特に学齢期や矯正歯科治療中、また外傷歯治療中の MG 症例では、顎の成長発育，歯の交換・移動、治療装置の修正変更に合わせて、小まめな調整対応が求められる。一般症例でも使用着脱の繰り返しによる変形や適合性の低下が起こる。競技者症例では高強度の加撃や咬合力負荷による穿孔や破損事故は頻発し、修理対応が必要となる。ところが MG は熱可塑性難接着性材料であるがゆえに、有効な補修技法が未だ確立されておらず、その開発が急務となっている。

このような背景にもとづき、申請者である深沢は母材である MG 材と同等以上の衝撃吸収能を有する義歯床用軟質裏装材の付加型シリコーンゴムの適性と良好な操作性に着目し、難接着性材料同士の接着技術の開発に取り組んでいる。とりわけ歯科用常温重合レジン粉末を MG 材表面に熱プレス埋入し、それを足場にレジン薄層を作りあげてシリコーンを接着させるという発想力は極めて独創的で、新規性が高い。そして実際に、その技法を確立した技術力も高く評価できる。

実験ではエチレン酢酸ビニル共重合体（EVA）を主成分とする MG 材（ERK）を母材に、2 種類の義歯床用軟性裏装材（ES、ST）の接着性能を評価している。ERK 表面に新規考案したレジン表面加工を施した上で ES あるいは ST を接着した試料片を作製し、剥離試験を行って接着強さを評価し、デジタルマイクロスコープで破断面観察も行っている。レジン表面加工の最適条件を探る目的で、レジン粉末埋入（E 処理）の加熱時間を変化させ、E 処理と常温重合レジン粉液泥塗抹（A 処理）それぞれの単独効果についても検討しており、綿密かつ周到な計画下で実験が行われたことがうかがえる。

本研究で得られた結果は以下の通りである。

１）ESはMG材と同等、STはMG材と同等以上の衝撃吸収性能を有していた。

２）E処理の加熱条件は130℃85秒で十分であった。E処理とA処理には相互作用が認められ、EA処理が最も有効であった。

３）ESの場合、E処理群の接着強さは0.12～0.21 N/mmであったのに対し、EA処理群は0.95～1.22 N/mmであった。STの場合、E 処理群0.09～0.11 N/mm、EA処理群2.40～2.55 N/mmとより強固な接着強さを示した。

４）コントロール群およびA処理群では、ES，STともに接着しなかった。

５）コントロール群およびA処理群は界面破壊、E処理群はレジン層での凝集破壊、EA処理群はシリコーンゴム層での凝集破壊を示した。

本研究結果より、今回新たに考案した常温重合レジンを応用した特殊加工処理を施すことによって、難接着性材料である MG 用 EVA と歯科用付加型シリコーンが凝集破壊を呈するほどに強固接着できることが示唆された。また処理の温度条件と加熱時間の目安を提示し、処理効果の交互作用や接着メカニズム、今後の課題についても論考されており、近い将来の臨床応用が期待される。

以上のように、レジン粉末を足場にレジン薄層を作成する新しい技術を駆使して MG 材と付加型シリコーンの接着に成功した本研究成果は、MG 補修技法の開発に資する重要知見であり、今後のスポーツ歯科医学の進歩発展に寄与するところが大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	赤澤　惠子
論文審査担当者	主査　木下　淳博 副査　井関　祥子　　中島　友紀
論　文　題　目	Double-layered cell transfer technology for bone regeneration

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

組織工学の発展により培養細胞を用いた再生医療の可能性が提唱されている。これまで、申請者らは様々なパターン状やシート状に配列した培養細胞を担体表面へ転写する“細胞転写技術”を開発し、虚血、骨欠損、歯周組織欠損などに対する細胞治療への応用の可能性を報告してきた。一方、近年、再生治療において複数の細胞種を同時に移植することで治療効果が増強される報告がなされている。本研究では、細胞転写技術を用いて 2 種類の細胞転写が可能であるか否か、そして 2 種類の細胞を転写した担体の移植が骨再生にどのような影響を及ぼすかを検討した。培養細胞は、PKH26、PKH67 あるいは GFP の遺伝子導入によって標識した。転写先の担体として脱細胞処理を施した羊膜を用い、蛍光顕微鏡を用いて転写された標識細胞を観察した。さらにマウス頭蓋骨欠損モデルへ細胞転写羊膜を移植し、骨組織の治癒についてマイクロ CT および組織学的分析により評価した。独立した転写基板上で 2 種類の細胞をパターン状に配列し、それぞれの細胞を独立した 2 回の転写操作によって担体の同一平面上へ転写すること（2 回転写法）は可能であった。しかし、シート状に配列した細胞の場合、1 つの転写基板上で 2 種類の細胞をあらかじめ 2 層に積層培養し、1 回の操作で転写する方法によってのみ成功した（2 層転写法）。また、2 層転写法による転写後は、担体である羊膜へ大きな変形などの力を加えても転写細胞が安定して膜上に維持された。さらに歯根膜幹細胞と骨芽細胞の 2 層転写羊膜を骨欠損に移植した場合、歯根膜幹細胞と骨芽細胞それぞれの単層の細胞転写羊膜移植と比較して有意な骨形成の促進が認められた。本研究は、2 層転写法によってさまざまな組み合わせの 2 種類の細胞を有する細胞移植材料の作製が可能であることを示し、さらに歯根膜幹細胞/骨芽細胞転写羊膜が骨再生を促進することを明らかにしたことから、今後新たな細胞移植法による新規再生医療の開発が期待される。

〈緒言〉

近年の組織工学的手法の発展により、培養細胞の移植による組織再生が提唱されている。疾患の進行によって失われた組織を培養細胞を用いて再生させるために、細胞を生体内へ移植する様々な方法が開発されている。細胞の移植方法は、移植部位の生化学的および解剖学的特徴や、再生させる組織の性質によって影響され、それぞれの再生治療について最適化される必要がある

ため、細胞移植法の開発が続けられている。申請者らは、印刷や半導体製造において微細パターン形成に用いられるフォトリソグラフィー技術を組織工学へ応用し、培養細胞をあたかも文字や絵を印刷するかのごとく基板上にパターン状に配列させた後に、移植担体上へ転写することを可能とする「細胞転写技術」を開発した。過去に申請者らは、この細胞転写技術を用いて、毛細血管に模したパターン状に配列した血管内皮細胞を転写した移植材を作製・移植し、マウスの虚血性疾患が改善することを報告した。また、細胞の位置ではなく数が重要と考えられる移植においては、細胞を基板上一面にシート状に配列し、その後担体へと転写した移植材の作製も可能である。申請者らはマウス頭蓋骨あるいはラット歯周組織欠損モデルに対して、歯根膜幹細胞あるいは骨芽細胞をシート状に転写した担体を移植して骨の再生が誘導されることを観察し、この細胞転写技術が硬組織再生へも応用可能であることを報告した。しかしながら、細胞の移植方法、移植細胞の選択など、未だ改善の余地が残されている。細胞を用いた再生治療では、これまで再生能力を有する単一の細胞種を移植する方法がとられてきた。しかし、近年、複数の細胞種を組み合わせて移植することで組織再生が向上することが報告されている。

そこで本研究では、硬組織再生における細胞転写技術の応用範囲拡大をめざし、異なる 2 種類の細胞が転写された移植材の作製について検討することを目的とした。さらにマウス骨欠損モデルを用いて、2 層構造の歯根膜幹細胞と骨芽細胞を転写した移植材が、単一細胞の単層転写による移植材に比べて再生量を増強するか否かについても検討した。

〈材料と方法〉

歯根膜幹細胞（PDLSC）は、健全抜去歯の歯根膜を酵素処理した後に培養した。臨床検体の採取については東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認のもとに行った。また、ヒト頭蓋骨由来骨芽細胞（HCO）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）を購入し実験に用いた。マウス骨芽細胞（KUSA-A1）は、国立成育医療研究センター 梅澤明弘先生より供与を受けた。細胞のラベルにはアデノウィルスを用いた GFP 遺伝子導入、もしくは PKH26、PKH67 を使用した。細胞転写基板は、ガラス基板上に tetraethylene glycol 層を作製後、細胞接着面を UV 照射によって形成した。細胞転写用の担体として脱細胞処理を施したヒト羊膜(約 3×3 cm)を使用した。羊膜の採取は、東京医科歯科大学倫理委員会の承認のもとに行った。細胞転写状態の検討は明視野顕微鏡下および蛍光顕微鏡下で行い、細胞転写羊膜断面の検討は凍結切片を作製し観察した。またマウス頭蓋骨欠損モデルへの細胞転写羊膜の移植では、ヌードマウスの左右の頭頂骨にクリティカルサイズの骨欠損を作製し、骨欠損部を覆うように細胞転写羊膜を移植した。その後、骨再生をマイクロ CT および組織学的分析により術後 8 週間まで観察し評価した。動物実験の内容については、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認のもと行った。

〈結果〉

転写基板上にドット・ライン・グリッドなどのパターン状に配列された PDLSC は、細胞転写技術を用いることにより羊膜上に転写された。さらにこの細胞転写操作を 2 回、同じ羊膜面上へ繰り返すことで 2 種類の細胞の転写が可能であった（2 回転写）。しかしながら、独立した転写基板上にシート状に配列された PDLSC と HCO を 2 回の転写作業を繰り返して積層させたところ、転写後に中央部の細胞が脱落した。そこで単一基板上に 2 種類の細胞（PDLSC、HCO）を時間

差で播種してあらかじめ 2 層構造を作製しておき、1 度に羊膜へ転写する方法を行うと、積層されている 2 種類の細胞を羊膜上へ安定して転写することが可能であった（2 層転写）。この 2 層転写法が、PDLSC と HCO 以外の細胞にも応用可能であるかどうか検討したところ、KUSA-A1、HUVEC、および NHDF の全ての細胞の組み合わせにおいて良好な細胞転写が観察された。また、この方法で転写された 2 層の細胞は、膜の折り畳み、穴あけ、トリミングなど、膜に変形を施しても安定して膜上に維持された。さらに、2 層転写羊膜の *in vivo* での骨再生への効果について調べるために、マウスの頭蓋骨欠損モデルへ PDLSC、HCO を単層転写あるいは 2 層転写した羊膜を移植材として移植した。その結果、単層転写と比較して 2 層転写を行った羊膜を移植した場合、マイクロ CT 像上で有意な骨形成の促進が認められた。組織学的には、PDLSC あるいは HCO の単層転写を行った羊膜を移植した骨欠損には薄い結合組織の形成が観察されるのみであったが、PDLSC と HCO を 2 層転写した羊膜を移植した欠損には多くの石灰化組織が認められた。

〈考察〉

本研究の目的は、2 種類の異なる細胞を細胞転写技術を用いて転写することが可能かどうか検討することであった。その結果、パターン形成用の基板を用いた場合、転写を 2 回繰り返すことによって 2 種類の細胞を羊膜上へ転写することが可能であった。しかし、細胞がシート状に配列された細胞転写基板を用いた場合、2 回転写を行うと、その後中央部の細胞が脱落した。シート状に配列された細胞を担体上に 2 層で配列された移植材を作製するには、2 層転写法が必要であることが明らかとなった。PDLSC と HCO で成功した 2 層転写は、他の細胞の組み合わせによっても可能であることが示され、様々な付着系細胞への応用が可能であることを示唆した。

生体内の細胞はしばしば層状の構造を取っており、例えば骨面を覆う骨芽細胞とその上に位置する間葉系細胞、歯根表面のセメント芽細胞とその上の歯根膜線維芽細胞など、生体内での構造を模した細胞移植が必要な場合には、2 層転写は有用な方法となりえると考えられる。さらに、2 層転写を施した羊膜は折り畳みなどの変形を加えても転写された細胞が安定して膜上に維持され、膜のトリミングなどを行うことも可能であり、2 層転写羊膜を移植部位局所へ良好に適合させることができる。また、手術用ピンセットなどによる膜の移動を容易かつ確実に行うことも可能である。移植部位が狭く移植が難しい場合、例えば歯周病で見られるような歯の周囲の小さな骨欠損などには、移植材である細胞シートを欠損内で器具を使って広げたり位置をずらして修正したりすることができるため、本方法は適していると考えられる。

PDLSC/HCO 2 層転写羊膜は、単層転写羊膜と比較してマウスの頭蓋骨骨欠損における骨再生を促進した。この結果は、骨再生において PDLSC/HCO 移植が有効であることを示しており、2 層転写羊膜の再生治療への応用の可能性を示唆するものである。本研究では 2 層転写羊膜移植が単層転写羊膜と比較して骨形成を促進した原因については明らかにすることはできず、この点については更なる検討が必要である。

2 種類の細胞を担体と共に移植する方法はこれまでにも報告がある。細胞転写技術を用いた細胞転写は従来の細胞シート作製法に比べて作業時間が短いという特徴がある。温度応答性培養皿は細胞シート作成に幅広く用いられている方法であるが、この方法では細胞がシートを支持する十分な細胞外マトリクスを産生する数日間の時間が必要となる。一方、細胞転写技術は、基板上への細胞播種・接着後、すぐに転写操作を行うことが出来るため、単層の転写で最短 3.5 時間、2 層転写では 5.5 時間で転写が完了する。細胞転写技術によって、従来の方法に比べて短時間で細

胞シート状の移植材が作成可能である。

〈結論〉

細胞転写技術によって 2 つの異なる細胞種を羊膜上へ転写することが可能となった。この転写技術を用いて PDLSC と HCO から成る 2 層の細胞転写羊膜を作製し、作製した細胞転写羊膜を骨欠損へ移植することにより骨形成が促進されたことから、本細胞移植法が新たな骨再生法の開発に結びつく可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5228　号	赤澤　惠子
論文審査担当者	主　査　木下　淳博 副　査　井関　祥子　　中島　友紀	
論 文 題 目	Double-layered cell transfer technology for bone regeneration	

（論文審査の要旨）

培養細胞の移植を用いた再生医療が新規治療法として期待されており、そのための細胞移植法についても様々な研究が行われている。本研究は申請者のグループが開発した「細胞転写技術」の適応範囲拡大の可能性を検討したものである。すなわち、これまでは効果の期待される1種類の細胞を担体へ転写・移植していたのに対して、2種類の細胞を転写することが可能であるのか、そして、これが可能ならば、その2種類の細胞の移植によって治療効果が増強するのか否かを、骨欠損モデルを用いて検討したものである。

申請者はまず、*in vitro* において、転写基板上にパターン状やシート状に配列された条件で2種類の細胞の繰り返しの転写による脱細胞羊膜への細胞転写（2回転写）を検討した。次に2種類の細胞をあらかじめ2層のシート状に配列した上で、脱細胞羊膜への細胞転写を1回で終了する2層転写法を検討した。さらに、2層転写法が適用可能な付着系細胞の組み合わせ、2層転写後の移植担体上の細胞への変形やトリミングによる影響の検討を行っている。そして最後に、マウスの骨欠損モデルへ、本技術を使って作製した歯根膜幹細胞と骨芽細胞の2層転写羊膜を移植し、単層細胞を転写して移植した場合と、骨再生への効果を比較検討している。

本研究で得られた結果をまとめると以下の通りである。

1. 2種類の細胞をパターン状に配列した場合、転写を2回繰り返すことで良好な細胞転写がえられる。
2. シート状配列の場合、2種類の細胞を積層して2層にしてから転写する、2層転写法を用いる必要がある。
3. 2層転写法は、歯根膜幹細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞など幅広い付着系細胞の組み合わせにおいて可能である。
4. 2層転写後の羊膜は折り畳みや、穴あけ、引っ張り等、様々な変形力に耐え、転写された細胞は安定して膜上に維持される。
5. 歯根膜幹細胞と骨芽細胞を2層転写した羊膜の移植は、マウス頭蓋骨に作製した骨欠損において、各細胞の単層転写後に移植した群と比較して骨の再生を促進する。

これらの結果より申請者は以下のように考察している。

2層細胞転写法は、2種類の細胞が層状に配列している生体内の部位に対して、生体の構造

を模倣して移植することを可能にすると考えられる。さらに、これまで多くの研究や臨床においては、主に再生に有用と思われる1種類の細胞が移植されてきたが、本研究の骨欠損モデルで示されたように2種類の細胞を移植することにより、移植後に細胞が相互に、またホストの細胞や組織と作用し合うことで再生治療の結果に影響することが考えられる。細胞転写技術はそのような目的の移植にも利用可能である。歯根膜幹細胞と骨芽細胞の組み合わせが骨形成を促進した理由については、本研究では明らかにされていないため、今後この点を明らかにする必要がある。また、より効果の高い再生治療の開発につながる新たな細胞の組み合わせを検討する必要がある。

積層された2種類の細胞が転写された脱細胞羊膜は非常に強固に細胞を保持し、膜を自由にトリミングしたり変形させたりすることができる。これは既存の細胞移植担体には認められない特徴であり、実際の移植操作時の細胞移植の確実性に大きく寄与すると考えられる。

本研究において、申請者は細胞転写技術の応用範囲を 2 種類の細胞へと拡大することに成功した。それによって 1 種類の細胞では達成できなかった細胞移植が可能となり、さらに骨再生については細胞移植による治療効果の促進にも成功している。これらの結果は、再生医療研究の分野へ新しい細胞移植法を提案し、より有効な骨再生のための基盤情報を提供している。本研究において開発された 2 層転写技術は、医科および歯科分野での再生治療の進展に大きく貢献するものと考えられる。よって本論文は、博士(歯学)の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	野田　昌宏
論文審査担当者	主査　井関　祥子 副査　高橋　英和　　山口 聰
論　文　題　目	High-frequency pulsed low-level diode laser therapy accelerates wound healing of tooth extraction socket: an *in vivo* study

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

本研究はラットの抜歯窩の創傷治癒における高繰り返しパルス発振の低出力半導体レーザーを用いたレーザー治療（LLLT）の効果を評価することを目的とした。ラットの上顎左右側第一臼歯を抜歯し、右側抜歯窩に低出力半導体レーザー照射（904-910 nm）を行い、左側抜歯窩を非照射にてコントロールとした。LLLT（0.28 W、30 kHz、61.2 J/cm^2）は抜歯直後から 24 時間毎に行い、抜歯後 3、7 日に安楽死させ、抜歯窩を含む上顎骨を採取し、分析を行なった。軟組織の治癒は抜歯直後、3、7 日における上皮化の程度を評価した。抜歯後 7 日においてマイクロ CT を用いて抜歯窩内の骨塩量（BMC）、骨量（BV）、骨密度（BMD）を評価し、組織標本を用いて組織形態計測を行なった。さらに、抜歯後 3 日において、骨形成関連マーカーの mRNA 発現を real time PCR 法を用いて分析し、PCNA の免疫染色を行った。その結果、抜歯後 7 日において、コントロール側と比較し、レーザー照射側で未上皮化部の面積が有意に減少しており（P= 0.04）、BMC、BV、BMD は有意に上昇した（各 P = 0.004、0.006、0.009）。組織学的には、新生した未熟な網状骨がレーザー照射側で増加するケースが多く観察された（P= 0.24）。術後 3 日において、レーザー照射側で *Osteocalcin* の mRNA 発現が有意に上昇しており（P =0.04）、PCNA 陽性細胞数が上昇した（P= 0.01）。以上から、高パルス発振の低出力半導体レーザー照射は抜歯窩の軟組織および硬組織の創傷治癒を促進することが示された。

＜緒言＞

低出力レーザー治療（Low-Level Laser Therapy: LLLT）は、歯科において抗炎症作用、疼痛緩和、創傷治癒促進や組織の再生を期待して臨床応用が行なわれている。LLLT は高出力レーザー治療と比較し、組織の傷害性が認められないという特徴を有している。半導体レーザーの波長は、他の波長と比べ、レーザー光が組織深部にまで到達する。そして、半導体レーザーを用いた LLLT は動物実験や臨床研究により創傷治癒に効果的であるという多数の報告があり、骨形成を促進することも報告されてきた。

近年、これまでの連続波やパルス波発振のレーザー装置と比較し、より深部の生体刺激効果を

期待した高ピークパワーを持つ高繰り返しパルス発振の低出力半導体レーザーが開発された。本レーザーは、ヒト歯肉上皮細胞の増殖や遊走を促進し、ヒト骨芽細胞の石灰化結節の形成や骨形成関連マーカーの遺伝子発現を促進することが報告されている。臨床研究においては、抜歯後照射による抗炎症作用や疼痛緩和効果が報告されている。しかし、高パルス発振の低出力半導体レーザー照射による抜歯窩の硬組織および軟組織両者の創傷治癒についての報告はない。よって、本研究は高パルス発振の低出力半導体レーザー照射による抜歯窩の硬組織と軟組織の創傷治癒への効果を検討することを目的とした。

＜方法＞

6 週齢雄性 Sprague-Dawley ラット 27 匹を用いて、全身麻酔下にて上顎左右側第一臼歯を抜歯し、右側をレーザー照射側、左側を非照射側（コントロール側）とした。レーザー装置は主波長 904-910 nm（パルス波、ピークパワー45 W）と第二波長 650 nm（連続波、赤色）の混合波長を発振する高パルス発振の半導体レーザー（Lumix 2、 Fisioline 社、 イタリア）を用いた。レーザー照射（0.28 W、30 kHz、61.2 J/cm^2）はまず抜歯直後（約 15 分後）に抜歯窩の 5 mm 上方より 1 分間照射し、24 時間毎に同一条件下にて 3 回あるいは 5 回の術後照射を行った。

その後の抜歯窩の軟組織および骨組織の治癒について評価した。歯肉の上皮化については、抜歯直後、3、7 日後における未上皮化部の面積を ImageJ を用いて計測した（n= 13）。抜歯後 7 日に安楽死を行い、抜歯窩を含む上顎骨を採取した。その後、骨密度の基準となるファントムとともにマイクロ CT（inspeXio、SMX-100CT、島津製作所、日本）を撮影し、分析ソフト（TRI/3DBON、RATOC 社、日本）を用いて骨塩量（BMC）、骨量（BV）、骨密度（BMD = BMC/BMC）を計測した（各 n= 12）。次に脱灰組織標本を作製し、上顎洞底線からの上顎第二臼歯の根間中隔の歯槽骨頂高さ（D1）と抜歯窩の新生骨の骨頂最低部の高さ（D2）の比（D2 / D1）を計測した。また、抜歯後 3 日に安楽死を行い、抜歯窩内の組織を採取し、real time PCR 法にて骨形成関連マーカーである *Collagen type 1*（*Col-1*）、*Alkaline phosphatase*（*Alp*）、*Runt-related transcription factor 2*（*Runx2*）、*Osteocalcin*（*Ocn*）、*Bone morphologenetic protein 2*（*Bmp-2*）の各 mRNA の発現について評価した（各 n = 11）。さらに、抜歯後 3 日の抜歯窩内の細胞増殖ついて評価するため抗 PCNA（Proliferating cell nuclear antigen）抗体（DAKO 社、日本）を用いて免疫染色を行い、単位面積（mm^2）当たりの PCNA 陽性細胞数および全細胞数に占める割合について調べた（各 n = 3）。

＜結果＞

軟組織の治癒について、抜歯後 7 日の肉眼所見では、コントロール側と比較し、レーザー照射側でより良好な治癒を示し、未上皮化部の面積は有意に減少しており（P= 0.04）、上皮化の促進が観察された。

抜歯後 7 日でのマイクロ CT による骨密度分析では、BMC、BV、BMD は全てレーザー照射側で有意に増加していた（各 P= 0.004、 0.006、 0.009）。組織学的分析では、レーザー照射側およびコントロール側の両側で、未熟な網状新生骨が窩底部より形成されつつある状況が観察され、歯槽骨の高さの平均はレーザー照射側で高い値を示したが、有意な差は認められなかった。

抜歯後 3 日での骨形成関連マーカーの mRNA 発現は、レーザー照射側で *Ocn* が有意に増加し（$P = 0.04$）、*Runx2*、*Alp* の増加傾向が認められた（各 $P = 0.08$）。*Col-1* と *Bmp-2* については、有意な差は、認められなかった。免疫組織染色による単位面積当たりの PCNA 陽性細胞数は、レーザー照射側で有意に増加し（$P = 0.01$）、全細胞数に対する割合では、高い傾向を示した（$P = 0.06$）。

＜考察＞

近年、LLLT は医学、歯学の分野で様々な組織の治癒促進のために応用されている。今回の研究では、抜歯窩の軟組織の創傷治癒において、高パルス発振の低出力半導体レーザー照射が抜歯窩の上皮化を促進することを示した。抜歯窩の上皮化が障害されるとドライソケットや歯槽堤の減少などの偶発症を増加させる可能性がある。LLLT による上皮化の促進はそのような様々な偶発症を減少させる上で有利であると示唆される。

抜歯窩の骨形成の分析については、従来、エックス線写真や組織学的分析などの 2 次元での評価が行われてきた。今回の研究では抜歯窩の創傷治癒を 3 次元的に観察、定量するためにマイクロ CT を用いて分析し、コントロール側に比べ、レーザー照射側では石灰化および骨形成の有意な上昇を認めた。しかし、組織形態計測においては、歯槽骨の高さはレーザー照射側で高い値を示したものの、有意差は認められなかった。その理由としては、マイクロ CT による分析が通常の組織学的分析と比較し、骨形成や石灰化を 3 次元的により客観的かつ正確に検出することができるためであると考えられる。

今回の研究では、LLLT が抜歯窩の軟組織および硬組織の創傷治癒を促進することが観察された。その理由としては、まずレーザー照射側での上皮化促進が挙げられる。この所見は以前に我々のグループが報告した高パルス発振の低出力半導体レーザー照射がヒト歯肉上皮細胞の増殖および遊走を促進する結果と一致しており、この上皮化の促進は、抜歯窩内の血餅の安定とその後に起こる結合組織形成を増進する可能性がある。次に、骨形成細胞の増殖、分化の促進が考えられる。本研究では、肉芽組織内の PCNA 陽性細胞の増加と骨形成マーカーである *Ocn* の発現の上昇が認められた。*Ocn* の合成は骨芽細胞分化に関連する *Runx2* によって促進されるが、今回の研究では、その *Runx2* の発現も高い傾向を示し、さらに骨形成に重要な *Alp* の発現も高い傾向を示した。これは LLLT が上皮細胞に加えて抜歯窩の肉芽組織内の骨芽細胞の増殖および分化を促進したことを示唆しており、その結果、骨形成が増進されたと考えられる。

今回の研究結果から、高パルス発振の低出力半導体レーザーを用いた LLLT は抜歯窩の軟組織および硬組織の両方の治癒を促進することが示された。LLLT は抜歯窩のみならず、歯周炎やインプラント周囲炎の再生治療においても骨再生を促進する有望な手段となり得る。軟組織および骨組織の創傷治癒および再生におけるレーザーを用いた光治療の確立のために、今後さらなる詳細な基礎実験や臨床研究が必要である。

＜結論＞

本研究では、高パルス発振の低出力半導体レーザー照射が抜歯窩の創傷治癒において細胞の増殖および分化を活性化することにより、上皮化および骨形成を促進することを示した。高パルス発振の低出力レーザー治療は抜歯窩の早期創傷治癒を増進することが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5229　号	野田　昌宏
論文審査担当者	主　査　井関　祥子 副　査　高橋　英和　山口 聰	
論 文 題 目	High-frequency pulsed low-level diode laser therapy accelerates wound healing of tooth extraction socket: an *in vivo* study	

（論文審査の要旨）

低出力レーザー治療（low-level laser therapy: LLLT）は、高出力レーザー治療と比較して生体組織への傷害性が少ないという特徴がある。中でも、本研究で用いられた高繰り返しパルス発振の低出力半導体レーザーは連続波や従来のパルス発振レーザーと比較し、より高い生体刺激効果を有することから治癒促進や疼痛緩和を目的として開発されたレーザー装置である。高繰り返しパルス発振低出力半導体レーザーによる LLLT の臨床研究としては、これまで歯周治療における非外科治療および外科治療後の応用として、抗炎症作用効果や、抜歯後の疼痛緩和作用を期待したものはあるが、抜歯窩の硬組織と軟組織両者の創傷治癒に及ぼす効果についての詳細な基礎的報告はなかった。

そこで野田昌宏は、高パルス発振の低出力半導体レーザーを用いた LLLT による抜歯窩の硬組織および軟組織の創傷治癒過程初期への効果を詳細に調べた。

本研究では、ラットの上顎左右側第一臼歯を抜歯後、右側抜歯窩に抜歯直後から 24 時間毎に術後照射を計 5 回行い、左側抜歯窩の非照射部位をコントロールとして比較した。術直後、術後 3 日、7 日に抜歯窩の軟組織の創傷閉鎖の程度を評価するために創傷部の未上皮化部の面積を経時的に観察し、術後 3 日における骨形成関連マーカーの mRNA 発現の分析および PCNA による免疫組織化学的分析を行った。また、術後 7 日における骨の治癒について、マイクロ CT による骨密度分析および組織標本を用いた形態学的および組織学的解析を行なった。

本研究において、野田昌宏が高パルス発振の低出力半導体レーザーの特性や臨床への応用を十分理解し、抜歯窩の治癒に対する生物学的効果を詳細に解析するために、軟組織および骨組織の分析方法について事前に十分な検討を重ね、適切な研究計画の下で用意周到に本実験を遂行したことは高く評価できる。なお、本研究は本学動物実験委員会の承認を得て行われている（承認番号：0160156C）。

本研究の主たる結果は以下のとおりである。

1.　免疫組織化学染色による細胞増殖解析では、抜歯後 3 日のレーザー照射部位で抜歯窩内肉芽組織の単位面積当たりの PCNA 陽性細胞数は有意な増加を示し、全細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の割合も増加傾向が認められた。

2.　抜歯窩の軟組織の創傷閉鎖分析において、抜歯直後では抜歯窩の未上皮化部の面積はレーザー照射部位およびコントロール部位において相違を認めなかったが、抜歯後 3 日でレーザー照射部位における未上皮化部の面積は減少傾向を示し、抜歯後 7 日での減少は有意差を示し、低出力半導体レーザー照射により上皮化が促進されることが示唆された。

3.　骨形成関連遺伝子の mRNA 発現の分析では、抜歯後 3 日にレーザー照射部位でコントロール部位に比べ、*Ocn* の発現が有意に上昇しており、*Runx2*、*Alp* 発現量も増加する傾向が認められた。*Col-1* および *Bmp-2* について差は認められなかった。

4.　マイクロ CT を用いた抜歯後 7 日での抜歯窩内の骨密度分析では、レーザーを照射した群で骨塩量（BMC)、骨量（BV)、骨密度（BMD）の値が有意に増加しており（各 $P = 0.004$、0.006、0.009)、骨形成が促進していることが示唆された。しかし、抜歯後 7 日の組織標本を用いた組織学的計測による抜歯窩内の新生骨高さの分析では、新生骨高さの平均値はコントロール部位よりレーザー照射部位で高い値を示すも有意な差は認められなかった。

以上の結果より、高パルス発振の低出力半導体レーザー照射が抜歯窩の創傷治癒過程の初期において細胞の増殖および分化を活性化することにより、上皮化および骨形成を促進することが示された。

本研究において、野田昌宏は、近年の医学および歯学分野において組織の治癒促進を目的とする応用が進んでいる LLLT について、 *in vivo* 抜歯窩モデルを用いてその生物学的効果を詳細に検討し、高パルス発振の低出力半導体レーザー照射が抜歯窩の軟組織および骨組織の初期の創傷治癒を促進させることを示した。

軟組織の創傷閉鎖については、経時的な画像解析により抜歯窩での上皮化の促進を示し、歯科臨床において発生しうる抜歯後のドライソケットなどの偶発症を減少させる可能性を考察している。また、マイクロ CT を用いて従来の組織標本を用いた 2 次元的評価方法に加え、3 次元的に新生骨形成量の分析を行なうことで、抜歯窩の創傷治癒における新生骨形成をより正確に分析した。さらに抜歯窩内の肉芽組織中の PCNA 陽性細胞の増加と *Ocn* の mRNA の発現上昇などの所見から骨形成細胞の増殖と分化の促進を考察しており、総合的な解析を行なった点は評価できる。

本研究は、抜歯窩の治癒において、高パルス発振の低出力半導体レーザーによる LLLT が軟組織と硬組織双方に効果を及ぼすことを初めて詳細に報告したものであり、今後のレーザーの歯科治療応用の研究に非常に重要なものである。

本研究結果は、高パルス発振の低出力半導体レーザーの臨床応用を行う上で、非常に有用なエビデンスを提供するものであり、レーザーの抜歯窩への応用のみならず、今後の歯周組織などを含めた再生医療分野への大きな貢献が期待できる。

よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行なうにあたり、十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	増子 律子
論文審査担当者	主査　川口　陽子 副査　荒木　孝二　　田畑　純
論　文　題　目	Morphological evaluation of artificial caries-affected dentin after applying FCP-COMPLEX.

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

接着修復材料の技術革新によって、う蝕罹患歯に対する低侵襲な治療が可能となり、ミニマルインターベンションの概念が世界中に普及した。う蝕象牙質内層は脱灰、軟化は認められるが、修復後の再石灰化が期待できるため、臨床では意図的に保存され接着修復の被着体となる。しかし、う蝕象牙質内層の機械的強度や修復材料の接着強さは健全象牙質に比べて劣ると報告されている。脱灰の影響を受けた歯質を強化するためにはフッ化物やフッ素含有材料の応用が試みられており、脱灰抑制効果や二次う蝕の抑制を示すことが報告されてきた。しかし、より効率的かつ低侵襲なミネラルの補給が求められている。Chow、Takagi らは、フッ素、カルシウム、リン酸の脱灰エナメル質の再石灰化への有効性について報告し、さらに同一容器内で安定的な状態で存在できる特異的な配合比率を発見し FCP-COMPLEX と名付けた。FCP-COMPLEX は、pH の上昇や配合比の変化によってフッ化カルシウムあるいは他のフッ素、カルシウム含有分子の沈殿を生じ、フッ化ナトリウムの約 7 倍のフッ素取り込みがフィルターディスク上やエナメル質において認められたことが報告されている。しかし、これまで象牙質に対する FCP-COMPLEX の研究報告はない。

接着性レジンと歯質との接着性の評価として、走査電子顕微鏡(SEM)による接着界面の形態観察が行われてきている。著者らはセルフエッチング接着システムを使用した際、健全象牙質との接着界面の樹脂含浸層直下に耐酸性を示す酸-塩基抵抗層(Acid-base resistant zone:ABRZ)が存在すること、フッ化物含有接着システムからのフッ素イオン徐放によって ABRZ の肥厚が確認されること、更にう蝕象牙質内層に対しても ABRZ が肥厚して観察されることなどの知見を報告してきた。

本研究の目的は FCP-COMPLEX 塗布によるう蝕象牙質内層を想定した牛歯人工脱灰象牙質に対する効果について塗布歯質の形態的変化とミネラルの取り込みについて評価し、ABRZ の形成状態を含めた接着界面付近の耐酸性への影響について検討することである。

＜方法＞

1. 溶液作製方法；実験群として FCP-COMPLEX 群(FCP 群)、2%NaF 水溶液群(NaF 群)及び脱イオン水群を用いた。FCP-COMPLEX はフッ化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸の割合

が 6:10:1(mol)となるように混合して作製した。FCP-COMPLEX は 2%NaF 水溶液と同様にフッ素濃度を 9000ppm に調整した。pH 値は、FCP 群が 0.38、NaF 群は 7.2、脱イオン水群は 6.5 であった。

2. 牛歯人工脱灰象牙質の作製方法;牛歯歯冠部中央部の象牙質を 280 番の耐水研磨紙で研削して露出後、象牙質ブロック(10 x 6 x 2 ㎜)を切り出した。その後エポキシレジン包埋し、ネイルバーニッシュを施して 4x4mm の処置面を設けた。Joves ら(2014)の方法を応用し、人工脱灰液(1.5 mM 塩化カルシウム、0.9 mM リン酸二水素カリウム、0.02% アジ化ナトリウム、50 mM 酢酸、pH4.5)中に 37℃で 60 時間浸漬後、試料を水洗した。脱灰試料は 576g の負荷をかけながら 600 番の耐水研磨紙上で長さ 15cm×3 回研削し、スメアー層を形成、人工脱灰象牙質モデルを作製した。脱灰の深さは OCT(光断層撮影 HSL-2000、サンテック社製)画像により、約 150 μm 程度であることを確認した。その後、試料表面に対して各溶液を 30 μm 塗布し、20 秒後に 10 秒間水洗し、処理試料とした。

3. 表面処理後の人工脱灰象牙質表層の評価；各群 4 個、計 12 個の処理試料に対してエタノール上昇系で脱水し、固定後、24 時間室温で乾燥し、金蒸着後に表面形状を SEM (JSM-5310LV、日本電子社製)観察した。さらに各群 5 個、計 15 個の処理試料を幅 1mm の切片に切出し、カーボンコーティング後、エネルギー分散型 X 線分析(EDS)による面分析(E-MAX7000、ホリバ社製)を行い、フッ素、カルシウム、リンの存在を検査した。得られたデータは one - way ANOVA(p=0.05)、Tukey Test 用いて統計解析した。

4. 接着界面の評価；各群 3 個、計 9 個の処理試料に対し、クリアフィルメガボンド(クラレノリタケデンタル社)を用いて接着後、エステライトフロークイック(トクヤマデンタル社)を築盛し、接着界面を作製した。それらを分割後、1 群には酸-塩基処理を施して ABRZ の観察、もう 1 群では SEM による接着界面の観察及び EDS による線分析を行い、フッ素、カルシウム、リンの存在を検査した。ABRZ の観察には従来通りの方法を応用し、人工脱灰液による酸処理は牛歯象牙質に対する脱灰条件を考慮して 50 分間の浸漬時間とした。

＜結果＞

人工脱灰象牙質表面の SEM 観察において、脱イオン水群では象牙細管の開口部が明瞭に認められ、管間象牙質は顕著に脱灰によるダメージを受けていた。NaF 群では象牙細管の開口が観察されたが、細管内部とその周囲に少量の沈着物を確認した。象牙質表層は脱イオン水群と比較して滑沢であった。一方 FCP 群では、象牙質表面を多量の沈殿物が被覆していた。EDS による象牙質表面の面分析では、全群においてフッ素、カルシウム、リンが検出されたが、FCP 群では定量分析の結果 NaF 群より約 14 倍のフッ素と約 1.5 倍のカルシウムが検出された。

接着界面の SEM 観察の結果、脱イオン水群と NaF 群では、界面直下の人工脱灰象牙質内に明らかな亀裂の形成が確認された。一方 FCP 群では、同部位に亀裂の発生はほとんど認められなかった。EDS による線分析の結果、FCP 群においては接着界面直下にフッ素とカルシウムのピークが認められたが、脱イオン水群と NaF 群においては認められなかった。酸-塩基処理後の SEM 観察において、全ての群で厚さ約 25 μm の Outer Lesion が確認された。さらに脱イオン水群においては、ABRZ 直下に幅約 100 μm、深さ約 250 μm の象牙質の脱灰を認めたが、NaF 群においては幅約 70 μm、深さ約 150 μm に減少し、FCP 群においては酸による脱灰の影響はほとんど

認められなかった。また全ての群で ABRZ が観察され、その厚さは脱イオン水群で約 10 μm、NaF 群と FCP 群で約 25 μm であった。

＜考察＞

本研究の結果から FCP-COMPLEX はフッ素のみならずカルシウムとリンを脱灰象牙質に供給したことが確認された。すなわち、FCP-COMPLEX は再石灰化に寄与するイオンを高濃度に含有すること、NaF のようなフッ素含有材料と比べて歯質への高い取り込み能力があることなどから、人工脱灰象牙質を再石灰化させる可能性を有すると考えられる。FCP-COMPLEX と NaF は、同じフッ素濃度に調整したが、酸-塩基処理後の SEM 観察において酸処理による脱灰の影響が形態的な違いとして確認された。この違いは FCP-COMPLEX は NaF とは異なり、カルシウムとリンが存在することによるもの考えられる。FCP-COMPLEX は、その配合比率が安定相を外れると直ちに沈殿を起こす性質を有するため、人工脱灰象牙質表面に FCP-COMPLEX を塗布すると、スメアー層を溶解し pH 値が急速に変化してフッ化カルシウムやフルオロアパタイトのような沈殿物が析出したと考えられる。更に、FCP-COMPLEX は、人工脱灰象牙質深部に浸透して、部分的に再石灰化する可能性を有している。これまでの研究においては象牙質-レジン接着界面の評価法の一つとして SEM を用いた ABRZ の形態学的な評価法がある。本研究においては、NaF 群と FCP 群の ABRZ では脱イオン水群と比較して厚く、明らかな違いが認められた。更に ABRZ 直下の象牙質において酸-塩基処理による脱灰の影響を受けた像が脱イオン水群と NaF 群で顕著に確認されたが、FCP 群では脱灰を抑制した像が確認された。これは FCP-COMPLEX によるフッ素、カルシウム、リンの供給が人工脱灰象牙質の物性を変化させたことによると考えられる。

人工脱灰象牙質表層の SEM 観察では、脱イオン水群と比較して NaF 群と FCP 群では滑沢な面を示した。また、FCP 群において象牙質表層が沈殿物で被覆され、象牙細管内への沈殿物の沈着が顕著であった。EDS による線分析では、FCP 群において、接着界面から象牙質側の約 15 μm の範囲にフッ素とカルシウムのピークを検出した。これは FCP-COMPLEX が人工脱灰象牙質に浸透し、フッ素とカルシウムの反応物が沈着したものと考えられる。

酸-塩基処理を行っていない象牙質-レジン接着界面の SEM 画像では、脱イオン水群と NaF 群において界面付近の人工脱灰象牙質に亀裂を認めた。人工脱灰象牙質モデルにおいて脱灰の影響を受けた範囲は約 150μm であり、この範囲ではミネラル密度が健全象牙質より低く、乾燥による影響により生じた亀裂と考えられるが、各群において酸-塩基処理による脱灰が ABRZ 直下において進行したことから、FCP 群で確認された脱灰抑制効果は、FCP-COMPLEX 塗布によるミネラル密度の回復が起きたことによるものと推察できる。

＜結論＞

本研究において、FCP-COMPLEX は、牛歯人工脱灰象牙質に対して優れた高いフッ素の取り込みと、脱灰抑制効果を示した。これらの効果はう蝕によって脱灰の影響を受けた象牙質の歯質を強化し、より高い接着安定性に寄与する可能性があると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5230　号	増子 律子
論文審査担当者	主　査　川口　陽子 副　査　荒木　孝二　　田畑　純	
論 文 題 目	Morphological evaluation of artificial caries-affected dentin after applying FCP-COMPLEX.	

（論文審査の要旨）

う蝕治療に際してはう蝕象牙質外層を除去し内層にレジンを接着させるが、その接着強さは健全な象牙質と比較して低下することが報告されている。その理由として、う蝕象牙質内層はう蝕による脱灰の影響を受けており、ミネラル密度が低下し、機械的強度も低下していることによると考えられている。本研究は、う蝕象牙質内層に対する接着性向上のために、接着操作の前にう蝕象牙質に再石灰化作用の期待できる処理を施して、被着面の改質を試みたもので、処理剤として特に近年実用化が期待される FCP-COMPLEX に着目し､その有効性を評価した。FCP-COMPLEX は、これまで不可能とされていたフッ素とカルシウムを一液にしたものであり、近年米国と日本での特許を取得した溶液である。一定の割合($F:Ca:PO_4=6:10:1$)で配合することにより、複合体として溶液中に存在し、pH 変化によって沈殿を生じる特性を持っている。歯磨剤などの様々な製品に入れることで、歯面におけるフッ素の取り込み量が飛躍的に向上するといった報告がされている。この技術を、う蝕象牙質内層に応用することにより、より安定な接着界面を形成し、修復物周囲の二次う蝕の抑制効果を高めることを目的としており、その着眼は高く評価できる。FCP-COMPLEX の再石灰化の可能性はエナメル質および健全な象牙質において確認されているが、これまでにう蝕象牙質内層に対する効果を検討したものはなく、新規性の高い研究である。

実験には牛歯を用い、すでに確立された人工う蝕象牙質内層モデルを調製し、被検面としている。天然のう蝕象牙質内層は個体差が大きく、安定した試料を得ることが困難な状況を考えると妥当な選択といえる。比較する処理液として、脱イオン水と、2%NaF 溶液とを用いているが、2%NaF 溶液は pH など異なる条件はあるものの、FCP-COMPLEX と同等の高濃度フッ素を含む溶液として、また一般的に臨床で用いられる溶液として適切な選択といえる。処理面の SEM による形態観察と、EDS 分析による元素の構成比較とにより、処理面の性状を理解したうえで、接着界面の違いを検討しており、周到な準備のもと本研究が計画されたことがうかがえる。とくに接着界面の評価は、酸-塩基抵抗層（Acid-base resistant zone, ABRZ）の SEM 観察を接着界面直下の脱灰された象牙質の形態の比較により FCP-COMPLEX の効果を検討しており、従来の接着界面の形態に関する研究に基づいたものである。

得られた主な結果は、次のとおりである。

1．FCP-COMPLEX 処理により、人工う蝕象牙質内層の表面では他の 2 群と比較して有意に多くのフッ素の取り込みを示し、ミネラルの沈着によると思われる滑沢な表面性状を示した。
2．FCP-COMPLEX 群においてのみ、コンポジットレジン接着界面直下にフッ素とカルシウムの取り込みが確認された。
3．脱灰後の接着界面の SEM 観察において、FCP-COMPLEX 群では ABRZ 直下の象牙質の脱灰が観察されなかったが、他の 2 群では脱灰が生じていた。
4．接着界面の SEM 観察において、FCP-COMPLEX 群では界面付近の人工脱灰象牙質内部に亀裂が観察されなかったが、他の 2 群では亀裂が生じていた。

以上の結果について、増子はそれぞれの結果を関連付けながら、FCP-COMPLEX が人工う蝕象牙質内層に対して浸透してミネラルの再沈着を促進し、二次う蝕に対する抵抗性の高い接着界面を形成する可能性を示している。う蝕象牙質内層を想定した本研究の脱灰モデルの妥当性、接合界面の SEM 観察試料における象牙細管の走行の違い、さらには実際の接着強さに及ぼす影響など、今後より詳細に検討すべき点が残されているものの、う蝕象牙質内層表面に FCP-COMPLEX を塗布することで、ミネラルの再沈着により、レジンの接着界面構造をより安定化させる可能性を示唆した研究として、評価に値すると思われる。

以上により本研究は保存修復学の発展に寄与するものであり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	井上　卓俊
論文審査担当者	主査　嶋田　昌彦 副査　豊福　明　　砂川　光宏
論　文　題　目	Drug delivery and transmission of lidocaine using iontophoresis in combination with direct and alternating currents

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

本研究は、直流(DC)または交流(AC)と印加方法を変えて、リドカインイオンがセロハン膜を介して効果的に移送されるかどうかを検討した。両端に白金電極を装着した平行平板型アクリル製セルにセロハン膜を設置し、ドナーセル内に１％リドカイン水溶液、レセプターセル内に超純水を満たした。直流は電圧３V、交流は正弦波、電圧 7.5V、周波数１kHz を用いて、DC と AC の印加時間の組合せを 10 分毎に変えて 60 分までリドカイン濃度を測定した。その結果、レセプターセルのリドカイン濃度は時間依存的に増加した。DC30 分・AC30 分、DC50 分・AC10 分、DC60 分、AC10 分・DC50 分は、通電 20 – 60 分で受動拡散群に比べてリドカイン濃度が有意に増加した。また、AC60 分、DC10 分・AC50 分、AC30 分・DC30 分、AC50 分・DC10 分は，通電 40 – 60 分で受動拡散群に比べてリドカイン濃度が有意に増加した。これらのことから、DC は薬物送達が急速であるが、AC は緩徐であることが明らかになった。また、DC から AC への切り替えは、AC から DC への切り替えより、リドカインイオンを速やかに移送することができた。これは、通電初期の DC による電気的反発力と AC による振動エネルギーの浸透メカニズムの違いであると考えられた。本研究により、DC と AC を併用したイオントフォレーシスは、それぞれの利点を生かした高効率の薬物移送が可能であることが示唆された。

＜緒言＞

イオントフォレーシス(IOP)は、電場を利用した薬物の物理的な皮膚吸収促進法であり、皮膚組織への薬物吸収を加速できるドラックデリバリーシステムの一つである。IOP には直流(DC)と交流(AC)の２種類の印加方法があり、DC-IOP が汎用的に用いられている。適応症には手掌多汗症、表面麻酔、腫瘍切開、鼓膜手術、術後鎮痛、癌性疼痛、ホルモン補充療法などがある。DC-IOP では皮膚の電極分極により火傷や発赤が発症することがあるため、適用時間の制限と浸透効率の低下が問題となる。一方、Shibaji らは過去の研究で AC-IOP による薬物移送を報告しており、正弦波(500Hz,1kHz,10kHz,100kHz,1MHz)を用いた in vitro 実験で、リドカインイオンの移送が可能であることを明らかにした。さらに、in vivo 実験では、AC - IOP がリドカインイオンのラット皮膚透過を促進することを報告した。この際、極性が時間的に変化するために電極分極が生

じにくく、長時間の通電が可能であった。しかしながら、DC-IOP と比較して薬物の浸透効率が低いため、新たな印加方法による浸透効率の向上が求められていた。

Nakajima らは、DC - IOP と AC - IOP について、in vitro 実験では、双方のリドカイン透過量に大きな差異はないが、in vivo 実験では、印加開始 20 分後では DC-IOP の透過量が特に大きく、40 分後以降では AC - IOP の透過量が DC - IOP よりも大きくなると報告した。また、Gaurav らは、in vitro 下で DC - IOP と AC - IOP のリドカイン透過試験を行い、1 時間の DC - IOP は 2 時間の AC - IOP に匹敵すると報告している。すなわち、DC-IOP は AC-IOP より高効率と考えられる。以上より、通電初期は DC-IOP によってリドカインを透過させ、以降は AC-IOP を印加することで、より効率が上昇すると予想できる。そこで、本研究では、DC-IOP または AC-IOP の電場の切り替えによって、リドカインイオンがセロハン膜を介して効果的に移送されるかどうかを検討した。

＜方法＞

実験用セルとして２つのチャンバー(ドナー層とレセプター層)を有するシリンダー型のアクリル製セルを準備した。直径 20 ㎜、厚さ 0.2 ㎜の白金板電極をセルの両端に膜と平行に設置した。セルの長さは 10 ㎜として、セロハン膜をセルの中間に設置した。利用可能な拡散面積は約 3.1 ㎠とした。ドナー層は１％リドカイン塩酸塩水溶液(3.0ml,pH4.6)、レセプター層は超純水(3.0ml)で満たし、セルは恒温槽(36.5℃)に設置した。セルに正弦波(7.5V;1kH)または DC-IOP(3V)を印加した。60 分間の通電中、開始から一定時間経過後に、DC と AC の印加を切り替えた。なお、比較対照として、DC60 分間(以下 D6)または AC60 分(以下 A6)を通電させ、さらに通電しない受動拡散群を設けた。

通電開始より 10 分ごとに 60 分まで 20μl ずつ、レセプター層の中心部よりマイクロピペットでサンプルを採取して、超純水で 25 倍に希釈後、分光光度計でリドカイン濃度を測定した。また、ドナー層の温度を、マイクロプローブサーモメータを使用し通電から 10 分ごとに 60 分まで測定した。

＜結果＞

D6 は通電 20 分から 60 分で受動拡散群と比べてリドカイン濃度が有意に増加し、A6 では通電 40 分から 60 分で有意に増加した。

DC-IOP から AC-IOP へ切り替えた際のリドカイン濃度では、DC30 分･AC30 分(以下 D3･A3)、DC50 分･AC10 分(以下 D5･A1)は受動拡散群に比べて IOP 通電後 20 分から 30 分で有意に増加した。さらに、全グループ(DC10 分･AC50 分(以下 D1･A5)、D3･A3、D5･A1)が受動拡散群に比べて通電 40 分から 60 分で有意に増加した。

AC-IOP から DC-IOP へ切り替えた際のリドカイン濃度では、AC10 分･DC50 分(以下 A1･D5)は受動拡散群に比べて通電 20 分から 60 分で有意に増加した。さらに、全グループ(A1･D5、AC30 分・DC30 分(以下 A1･D3)、AC50 分・DC10 分(以下 A5･D1))が、受動拡散群に比べて通電 40 分から 60 分で有意に増加した。

ドナー層の温度は、すべてのグループで増加したが、40 分後には約 35℃で一定になった。温

度変化は受動拡散群と比べて統計学的に有意差を認めなかった。

＜考察＞

本実験では、D6 は通電 20 分から 60 分で受動拡散群と比べて有意に増加し、A6 では通電 40 分から 60 分で有意に増加した。DC - IOP による薬物移送の原理は、電気的反発力(electrorepulsion)、電気的浸透力(electroosmosis)、受動拡散の総和として表される。イオン化した物質の移送においては電気的反発力が大部分を占めると考えられるが、電気的浸透力も無視できない。一方、AC - IOP による薬物移送の原理は、振動エネルギーと受動拡散の総和で表される。Shibaji らは AC-IOP の促進効果メカニズムについて報告しており、水溶液中におけるリドカインイオンは水分子とクーロン相互作用により、一定のストークス半径を保っているが、AC - IOP により、イオンに振動エネルギーが与えられることで、クーロン相互作用が断ち切られ、ストークス半径が減少し、拡散係数が増加すると考えられる。このことから、DC-IOP では、電気的反発力がイオンに直接圧力を加えて電荷を移動させるため、急速に移送すると考えられる。AC-IOP では、振動エネルギーにより拡散係数が増加するが、時間を要するために、緩徐に移送すると考えられる。つまり、リドカイン移送の初期では、電気的反発力は振動エネルギーより大きいことが考えられる。

D3･A3、D5･A1、D6 は、通電 20 分から 60 分で受動拡散群と比べて移送が促進された。これは、DC による電気的反発力の寄与が大きく、通電初期にリドカインイオンが急速に移送したことが考えられる。

D1･A5 が通電 40 分から 60 分で受動拡散群と比べて有意差を認めた。これは DC10 分では移動総量が小さく、その後の AC - IOP による振動エネルギーの影響が大きいために、AC6 と類似していたと解釈できる。このことから、初期の電気的反発力を発揮させるために、DC - IOP は最低 30 分間通電すると効率が高まると考えられる。

DC - IOP 後の AC - IOP は、初期の DC - IOP による電気的反発力によって、リドカインイオンを急速に移送した状態から、AC-IOP のよる振動エネルギーを利用することによって、緩徐にリドカインイオンを移送することができると考えられる。電気的反発力がイオンに直接圧力を加え、DC から AC へ切り替わることによって、振動エネルギーがクーロン相互作用を断ち切り、ストークス半径を減少させる。透過初期から後期にかけて、リドカインイオンの透過が期待できるとともに、AC-IOP への切り替えによって DC-IOP の副作用を回避できると考えられる。

A3･D3、A5･D1 は、通電 40 分から 60 分で受動拡散群と比べて移送量が多くなった。これは、通電初期の振動エネルギーによって、緩徐にリドカインイオンが水分子と分離し、移送していたと考えられる。

A1･D5 は通電 20 分から 60 分で受動拡散群と比べて有意差を認めた。これは AC10 分では移動総量が小さく、その効果が小さく、DC - IOP による電気的反発力の影響が大きいために、D6 と類似していた。

初期の AC-IOP は、振動エネルギーによる拡散係数の増加が主体であると考えられる。イオンに振動エネルギーが与えられることで、クーロン相互作用が断ち切られ、ストークス半径が減少する。AC-IOP から DC-IOP に切り替わることによって、電気的反発力がイオンに直接圧力を加

えて、電荷を移動させる。印加初期における濃度上昇は緩徐であり、40 分以上通電しないと顕著なリドカインイオンの透過が得られなかった。

本実験では温度変化に有意差を認めなかった。このことから、DC-IOP と AC-IOP を併用しても、温度上昇による発赤や火傷を引き起こさないと考えられる。

＜結論＞

本研究結果により、DC-IOP と AC-IOP を併用する IOP は、それぞれの利点を共有し薬物送達が効果的に行えると考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5231　号	井上　卓俊
論文審査担当者	主　査　嶋田　昌彦 副　査　豊福　明　　砂川　光宏	
論 文 題 目	Drug delivery and transmission of lidocaine using iontophoresis in combination with direct and alternating currents	

（論文審査の要旨）

イオントフォレーシス(IOP)は、電場を利用した薬物の物理的な皮膚吸収促進法であり、皮膚組織への薬物吸収を加速できるドラックデリバリーシステムの一つであり、これまでの研究で、より安全な IOP 治療のために交流 IOP（AC-IOP） に注目して研究を行ってきた。直流 IOP(DC-IOP)は広く使用されているが、電極分極から長時間通電できないこと、火傷や発赤の可能性があることが欠点である。一方、AC-IOP は長時間の通電が可能だが、通電効率が低い。これら特徴から、通電初期は DC-IOP によってリドカインを透過させ、以降は AC-IOP を印加することで、より効率が上昇すると予想できるが、これまでの報告がない。本研究で井上は DC と AC を組合せて、リドカイン透過量に与える影響を比較検討した。

両端に白金電極を装着した平行平板型アクリル製セルにセロハン膜を設置し、ドナーセル内に１%リドカイン水溶液、レセプターセル内に超純水を満たした。直流は電圧３V、交流は正弦波、電圧 7.5V、周波数１kHz を用いて、DC と AC の印加時間の組合せを 10 分毎に変えて 60 分までリドカインの移送量、温度変化を計測した。その結果、DC は薬物送達が急速であるが、AC は緩徐であることがわかった。DC から AC への切り替えは、透過初期から後期にかけて、リドカインイオンの透過が期待できるとともに、AC-IOP への切り替えによって DC-IOP の副作用を回避できると考えられた。また、AC から DC への切り替えは、透過初期における濃度上昇は緩徐であり､40 分以上通電しないと顕著なリドカインイオンの透過が得られなかったが、条件によって使用できると考えられた。温度変化は生体への為害性が及ばない範囲であった。以上より、DC と AC を併用するイオントフォレーシスは、それぞれの利点を共有し、薬物送達が効果的に行えることが示唆された。

本研究では直流と交流の切り替えに着目し、それをより高効率な薬物送達として応用できないかを検討した点で独創的といえる。また、実験はこれまで研究を行ってきた条件を検討し、最適と考えられる条件下で通電を行っている。なお、実験手法はすでに確立されており、信頼される結果が得られ、それらの結果を分析した統計手法は適切であった。

以上のように井上は DC と AC を併用したイオントフォレーシスは、それぞれの利点を共有した薬物移送が可能であることを明らかにした。これは今後 IOP の開発、改善の一助となるものであり、さらに薬剤投与法の一手段としてこれからの医療の発展に寄与できるものであると考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	AKTAR Most Dilruba
論文審査担当者	主査　柴田　俊一 副査　倉林　亨　　山口　聰
論　文　題　目	Value of real-time tissue elastography for squamous cell carcinoma of the tongue

Introduction

Preservation of function is important to preserve quality of life for patients undergoing treatment for tongue cancer. Fortunately, preoperative chemo-radiotherapy has enabled many patients to avoid surgery and to improve cancer control with few side effects for patients with large unresectable cancers. These combined (chemo-radiotherapy) modality treatments lead to higher cure rates while maintaining the patient's quality of life. Indeed, advances in anticancer agent and radiotherapy have resulted in a potent anti-tumor effect in many patients. However, some patients treated with this strategy develop induration in the center of their tumor that histologically varies from viable tumor to scar tissue. If a determination could be made as to whether the remaining induration is tumor or scar tissue, it may be possible to establish criteria for limited resection or no surgery. The tissue flexibility is decreased by pathologic tissue changes, such as inflammation and tumor growth. Indeed cancer growth results in an increase in tissue stiffness. Real-time tissue elastography is an ultrasound tomography modality that can objectively display tissue elasticity. The strain distributions in tissues in response to external compression are closely related to the distribution of tissue elasticity. These strain images can give a clear illustration of underlying tissue stiffness and provides useful clinical information. There are no reports of its use in the evaluation of primary oral cancers. When applying different levels of compression or relaxation, the elasticity imaging algorithm measures the displacement and strain by analyzing the RF (radiofrequency) signal in real time with subsequent conversion to a color-coded image. Using this method, the elasticity and strain ratio of squamous cell carcinoma of the tongue was measured, and the elasticity and strain ratio of the scar portion was quantified in cases in which preoperative therapy was performed.

Materials and Methods

Eligibility criteria

The study was conducted between August 2011 and April 2015 in the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the Tokyo Medical and Dental University, Japan. All study protocols were approved by the institutional ethics committee (Approval number 729). All patients provided written informed consent before entry into this study. The subjects comprised 50 patients (38 men, 12 women;

mean age, 59.1 years; age range, 30-86 years) who were treated for squamous cell carcinoma of tongue.

Patients were categorized into two groups. Group 1 included 38 patients. These patients underwent surgery alone and elastography before glossectomy. Patients in group 1 underwent surgery for partial glossectomy (n=14) or for hemi-glossectomy (n=24). Group 2 included 12 patients who underwent elastography before and after preoperative chemo-radiotherapy. Patients in group 2 underwent surgery for hemi-glossectomy (n=7) or for subtotal glossectomy (n=5). Preoperative therapies were chemoradiotherapy in 5 patients and chemotherapy in 7 patients. The median interval between end of preoperative treatment was 22.5 days (range, 13-35 days). T classification (group 1/group 2) was T1: 6/0, T2: 26/4, T3: 6/8, and the N classification was N0: 30/3, N1: 4/1, N2b: 4/3 and N2c: 0/5.

Histological classification of malignancy

In group 1, the histological classification of malignancy was evaluated according to the multifactorial system proposed by Anneroth. The histologic malignant score was determined using blocks of tissue that showed the maximum cross-sectional area.

Elastography

An Avious ultrasound system (HITACHI, Japan) was used to evaluate elasticity. Ultrasonographic features of each tumor including margins, echogenicity, ultrasound transmission and color Doppler signal were evaluated. Endosonography was performed to examine the tongue lesion, and 2% xylocaine jelly (a water-based gel with 2% lidocaine hydrochloride) was used to couple the ultrasound between the probe and tongue lesion. Then, the probe was repeatedly applied to apply and release pressure to obtain an elastographic image. The scanning plane was designed to move horizontally to show the maximum cross-sectional area across the tongue carcinoma. The system calculates the levels of resulting tissue deformation and display them as a color coded bar on the side of the image. The bar displays the tissue deformation in real time. The “dual” display mode allows one to visualize the elastosonography image and the corresponding B mode image simultaneously on the monitor. In group 1, the strain ratio of the tumor and normal tissue was measured with the ROI (region of interest) set in tumor tissue and normal tissue on the maximum cross-sectional line. In group 2, the ROI was set in the tumor tissue and normal tissue, and the strain ratio was measured before preoperative therapy. After preoperative therapy, the ROI was set in the tumor tissue, normal tissue, and scar tissue on the maximum cross-sectional line, and the strain ratio of them was measured. Comparing before and after preoperative therapy, and the ROI was set in the tumor reduced area after preoperative therapy, which was defined as a scar. This strain elastography displays tissue stiffness in a continuum of colors from red to green to blue, designating soft (high strain), intermediate (equal strain), and hard (no strain), respectively.

Statistical analysis

The statistical correlation between US thickness and histological thickness of tumor were analyzed using Pearson’s correlation coefficient. Tumor thickness and the strain ratio were analyzed using the Mann-Whitney U test. To identify correlative factors for strain ratio, data of histological parameters and strain ratios were analyzed by multiple regression analysis using SPSS data processing software (version 16.0).

Results

Pearson correlation analysis using data from group 1 showed that histological thickness was positively correlated with US thickness ($r=0.749$; $p<0.001$). In group 2, because only no viable tumor cells were seen in 3 cases, we evaluated histological thickness in 9 cases which viable tumor cells were present. Histological thickness was modestly correlated with US thickness ($r=0.041$; $p=0.917$).

In group 1, the strain ratio was 0.16±0.13 for tumor tissue and 0.82±0.35 for normal tissue. In group 2, the strain ratio of tumor tissue, scar tissue, and normal tissues was 0.19±0.18, 0.51±0.28, and 0.77±0.57, respectively. The portion of primary tumor which decreased after introduced of chemo radiation therapy was defined as “scar”. The scar tissue showed strain that was intermediate between those of the normal and tumor tissue. When the cutoff value for the strain ratio of tumor tissue was set 0.16, there was a significant correlation between strain ratio and US tumor thickness ($p=0.044$ by the Mann-Whitney U test). To identify predictive factors for strain ratio, the pathological findings of these patients were investigated. After collecting data regarding histological parameters and strain ratio, the data were analyzed by multiple regression analysis using SPSS data processing software. Analysis revealed that the strain ratio had a weaker correlation with histological tumor thickness.

Discussion

US can precisely detect small changes in soft tissue. It is noninvasive, does not exposure the patient to radiation, easily allows serial examinations, is readily available in an outpatient office facility, and is less expensive when compared with other diagnostic tools. Recently, several investigations have evaluated the efficacy of US for oral cancer, especially for measurement of tumor thickness.

The present study is the first to describe the efficacy of elastography for the characterization of tongue carcinoma. Real-time tissue elastography is a new ultrasound tomography technique that can objectively display tissue elasticity from which images of tissue stiffness can be depicted.

The present study used quantitative strain elastography as a technique to investigate the relative stiffness of tongue lesions. In quantitative strain elastography, images are produced by the estimation of the tissue recovery response to the pressure induced on the tissue. The ratio of displacement (strain) of the normal tissue and in response to the induced pressure is defined as the strain index value. The stiffness of the lesion is compared by strain index values. A higher strain ratio corresponds to lower elasticity. Future studies should include a larger sample size to reduce the standard deviation. The mean strain ratio in scar tissue was 0.51, showing lower elasticity than tumor tissue and higher elasticity than normal tissue. This result was expected and suggested that the portion of cancer tissue treated with preoperative chemo-radiotherapy contained lower elasticity than cancer tissue and higher elasticity than normal tissue. As it could be caused by fibrous tissue or lymphocyte infiltration, it is necessary to clear further study. To elucidate the histopathological significance for strain ratio, we consider it necessary to analyze extracellular matrix such as collagen deposition or fibrosis of the tissue.

If a cutoff value for tumor tissue and scar tissue can be established, the possibility of limited surgery after chemo-radiotherapy can probably be expanded.

Conclusions

This technology will undoubtedly become an important tool for diagnosis and prognostic evaluations for tongue carcinoma. Because surgery remains an important treatment modality for tongue carcinoma, our goal is to preserve the function of the oral cavity. In future, larger prospective studies will be needed to establish a cutoff value for tumor tissue to expand the indication for limited surgery after preoperative treatment.

(和文要旨)

リアルタイム組織弾性イメージング法は、超音波断層撮影方法によって、組織の弾性を客観的に評価する方法である。本研究の目的は、弾性係数により舌癌における腫瘍組織と正常組織を判別できるかを検討するとともに、弾性係数に関与する臨床病理組織学的因子を抽出することである。また、舌癌に対して術前化学放射線治療を行った後の腫瘍組織と非腫瘍組織の弾性係数についても調査した。

対象は 2011 年 8 月から 2015 年 4 月の期間中に治療した舌癌症例 50 例である。手術単独群（group1）が 38 例、術前治療後に手術を施行した群（group2）が 12 例である。手術前に日立社製 Avious ultrasound system を用い、組織の弾性を計測した。

group1 における弾性係数は腫瘍組織　0.16±0.13 で、正常組織　0.82±0.35 であった。単変量解析の結果、弾性係数と超音波検査による腫瘍の厚さに有意な相関関係を認めた。多変量解析により、腫瘍組織の弾性係数に関与する病理組織学的因子を検討したが、有意な因子は認めなかった。group2 における弾性係数は腫瘍組織 0.19±0.18、瘢痕組織 0.51±0.28、正常組織 0.77±0.57 であった。瘢痕組織は腫瘍組織より軟らかく、正常組織より硬いという結果であった。各 group の腫瘍組織および正常組織の平均弾性係数は近似しており、本法における弾性係数は再現性があるものと考えられた。

以上より、本法において腫瘍組織を識別する弾性係数の閾値が確立されれば、術前治療後の縮小手術および手術回避の適応基準、術後再発の判別に応用できる可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5232　号	AKTAR Most Dilruba

論文審査担当者	主　査　　柴田　俊一 副　査　　倉林　亨　　山口　聰
論 文 題 目	Value of real-time tissue elastography for squamous cell carcinoma of the tongue

（論文審査の要旨）

近年、抗癌剤や放射線治療の進歩により口腔癌の治療成績は向上している。術前化学放射線治療により抗腫瘍効果が得られた症例において、腫瘍が消失しているかどうかの判別、あるいは残存腫瘍の範囲を判別できれば、縮小手術および手術回避の適応基準の決定が可能となる。リアルタイム組織弾性イメージング法は、組織の弾性を客観的に評価できる超音波断層法である。本法はこれまで乳癌や甲状腺癌などを対象とした研究が散見されるが、口腔癌原発巣を対象とした研究報告はない。AKTAR Most Dilruba は、口腔癌の中で最も発生頻度の高い舌癌を研究対象とし、リアルタイム組織弾性イメージング法を用いて腫瘍組織と正常組織の判別を試みることを目的として本研究を計画した。この着眼点はたいへん理にかなったものであると評価できる。

本研究において舌癌症例 50 例に対しリアルタイム組織弾性イメージング法を施行した。手術単独群（以下、group1）38 例では、初診時に腫瘍組織と正常組織の弾性係数を調査した。術前治療後に手術を施行した群（以下、group2）12 例においては、初診時に腫瘍組織と正常組織、術前化学放射線治療後に腫瘍組織と正常組織および瘢痕組織の弾性係数を検索した。

本研究によって得られた主な結果は以下のとおりである。

1. group1 における平均弾性係数は腫瘍組織が 0.16±0.13、正常組織が 0.82±0.35 であり、これらの弾性係数間に有意差を認めた。
2. group2 における平均弾性係数は腫瘍組織が 0.19±0.18、瘢痕組織が 0.51±0.28、正常組織が 0.77±0.57 であった。腫瘍組織と正常組織、また腫瘍組織と瘢痕組織との弾性係数間に有意差を認めた。
3. 腫瘍組織の弾性係数と各病理組織学的因子との関連では、有意に関連する因子はなかったが、超音波検査による腫瘍の厚さとの間に有意な相関を認めた。

これら一連の研究における手技と解析は適切かつ十分に行われていたことと、研究結果が論文中に明確に示されていること、および結果に関する考察が適切に行われている事を確認した。

以上の結果により AKTAR Most Dilruba はリアルタイム組織弾性イメージング法が、腫瘍組織と瘢痕組織あるいは正常組織とを判別するための手技となりうることを示した。さらに本法の臨床応用に関し、化学放射線療法後の縮小手術および手術回避の適応基準や、術後再発の判別への手がかりとなりうるものであると結論づけている。

以上のように、本研究はリアルタイム組織弾性イメージング法を用いて口腔癌の弾性係数を評価した初めての研究であり、今後の画像診断学および口腔癌の治療法の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	荒井　昌海
論文審査担当者	主査　宇尾　基弘 副査　三浦　宏之　　由井　伸彦
論　文　題　目	The role of functional phosphoric acid ester monomers in the surface treatment of yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

CAD/CAM 技術の成熟に伴い、高強度の歯科修復用セラミックスとして、優れた審美性、生体親和性、機械的特性からジルコニアセラミックス（正方晶ジルコニア多結晶体、TZP）を用いた修復が近年臨床において多用されている。間接法歯冠修復物や、インプラントアバットメントに適用されるなど、その特性を生かした臨床応用が進められている。

従来から歯科で用いられてきたシリカ系のセラミックスに比べ、その接着前処理としてシランカップリング剤の有効性はやや低く、また酸による処理でも簡単には溶解しないため、機械的な嵌合力を得るためのサンドブラスト処理が推奨されている。近年の研究では、ジルコニアセラミックスの接着操作の前処理として適圧下（0.2-0.3 MPa）でのアルミナブラストと MDP 含有プライマーを使用することが長期的に安定した接着に効果的な処理であるとされており、多くの MDP 含有のジルコニア処理プライマーが開発されている。

しかしながら、単離した各種機能性モノマーで比較検討を行った報告はなく、接着性向上効果の機序の解明のためにも、構造の異なるリン酸系機能性モノマーを用いた、より詳細な比較検討が必要である。また、現在使用されているジルコニア処理プライマーはほとんどがアルコールもしくはアセトン溶媒に機能性モノマーを含有させたものであるが、塗布後に気銃によるエアー乾燥のみで前処理を終えることになっている。この方法では乾燥後に堆積した未反応の機能性モノマーがレジンセメントとの接着界面に残留し、接着を阻害する可能性も懸念される。このような背景から、本研究では、ジルコニア表面処理に用いる各種リン酸系機能性モノマーの違いが、引張接着強さと表面の濡れ性に及ぼす影響について検討することを目的とした。

＜方法＞

ジルコニア被着体（LAVA, 3M ESPE）表面を未処理（Con 群）、ならびに MDP、GPDM、Phenyl-P の 3 種のリン酸系機能性モノマーを 5%含むエタノール溶液にて 10 秒間処理した群（MDP 群、GP 群、PP 群）、ならびに各モノマー処理後にエタノールで 2 分間超音波洗浄し、余剰モノマーを除去した群（MDP-e 群、GP-e 群、PP-e 群）の計 7 群を設定した。これらの表面について、接触角測定器を用いて水との接触角測定を行った。引張接着試験においては、ジルコニア被着体表面を粒径 50 μm のアルミナを 10 mm の距離から 0.2 MPa で 10 秒間ブラスト処理した。接着面は

アルミテープを用いて直径 4 mm、セメント厚さ 100 μm に規定した。リン酸による 20 秒間処理および水洗後、各プライマーにて 10 秒間表面処理を行い、気銃にて溶媒を揮発させ表面を乾燥させた。さらにエタノールで 2 分間洗浄した群も含めて、接触角の測定と同様の 7 群を設定したステンレス棒の表面をサンドブラスト、洗浄後表面処理を行い、レジンセメントにて被着体に接着・光照射後に室温で 1 時間放置し、さらに蒸留水中にて 24 時間保管した。その後、万能試験機にてクロスヘッドスピード 2 mm/min にて引張接着試験を行い、光学顕微鏡にて破壊形態の観察を行った。

＜結果＞

接触角測定においては、MDP 群では表面が極めて親水性のため液滴が広がり角度測定が不可能であったものの、Con 群（51.2±3.2°）、GP 群（24.2±5.6°）、PP 群（33.6±2.7°）、MDP-e 群（65.4±3.5°）、GP-e 群（54.9±5.0°）、PP-e 群（49.9±4.0°）で計測値が得られた。Con 群、GP-e 群、PP-e 群の 3 群間には有意差がみられなかったものの、各モノマー処理群ではエタノール洗浄により有意に接触角が上昇した。引張接着強さにおいては、Con 群（4.5±1.2 MPa）、MDP 群（12.5±3.9 MPa）、GP 群（9.1±3.8 MPa）、PP 群（4.9±1.6 MPa）、MDP-e 群（13.8±3.8 MPa）、GP-e 群（11.7±4.8 MPa）、PP-e 群（7.2±2.7 MPa）の値が得られた。エタノール洗浄の有無にかかわらず、MDP 群が PP 群、Con 群よりも有意に高い接着強さを示した．また破壊形態の観察では MDP 群において 100%、MDP-e 群において 50%のレジンセメントの凝集破壊が観察されたが、他の群においてはすべて界面破壊のみであった。

＜考察＞

レジンセメントによる被着体への接着において、求められる表面処理剤の機能は、1) 被着面のコンタミネーションの洗浄、2) 被着体の表面改質によりセメントの濡れの向上、により接着力を高めることである。一般的にレジンセメントは疎水性であり被着体表面も疎水的に改質されることで、より接着性能を高めることができると考えられる。

水の接触角測定は、物質表面の親水・疎水性の評価法として広く用いられており、再現性の高い手法である。既往の研究ではセラミック修復物の表面が処理剤により疎水的に改質されることが、レジンセメントの接着には好ましいとされている。今回の結果からは、接触角測定においては MDP-e 群が最も高い値を示しており、引張接着強さもエタノール洗浄を行った群の中で最も高い値を示した。リン酸系機能性モノマーである MDP は開発当初は歯質表面処理への有効性が評価されてセルフエッチングプライマーの主成分として活用されており、歯質との高い化学的相互作用から、長期に安定した接着強さが得られることが報告されている。その後 Kern らによってジルコニアへの表面処理剤としても有効であることが示され、現在ではジルコニア用の表面処理剤として市販される殆どの製品に利用されている。接着性官能基であるリン酸基がジルコニア表面の水酸基と結合することで、強固な化学結合が得られているものと考えられている。また、付着 MDP が膜状に緊密に配列することで、被着体表面が疎水性基であるメタクリロイルオキシ基で被覆され、レジンセメントの濡れを向上させると推測される。接触角測定の結果から、塗布後にエアブローを行った群は、エタノールにて超音波洗浄した群と比較して 3 種すべてのモノマーで洗浄後に接触角が大きくなる結果が得られた。このことはモノマーのエタノール溶液を気銃で乾燥するのみでは、表面に結合していないモノマーが表面に残留していることを示唆している。MDP

は他のモノマーと比較して親水性の高いモノマーであることから、エタノール洗浄なしの群においては残留したモノマーが水分子を強くひきつけ、他群と比較しても高い親水性を示したものと考えられる。エタノール洗浄後では MDP-e 群のみが Con 群と比較して有意に大きな接触角を示したものの、GP-e 群、PP-e 群においては Con 群とほぼ変化がみられなかった。これは各モノマーの構造の差異が、被着体の表面の改質効果に影響したものと考えられる。

引張接着強さにおいては、MDP 群、MDP-e 群が最も高い値を示し、この 2 群でのみレジンセメントの凝集破壊が観察された。エタノール処理群において最も大きな接触角を示した MDP-e 群が最も高い接着強さを示し、またそのレジンセメントの凝集破壊が観察されたことからも、ジルコニア表面におけるレジンセメントとの濡れは、他のモノマーによる処理よりも向上していたと考えられる。MDP 群では液滴が形成されず接触角が測定できないほどの親水性を示したにも関わらず、引張接着強さは Con 群よりも有意に高く、MDP-e 群とも有意差はみられなかった。MDP は親水性基と疎水性基の両方を有しており、水にもレジンモノマーにも溶解させることが可能である。MDP 群においては、エタノールが揮発して残留した吸着していないモノマーが、レジンセメント内に取り込まれ、表層で吸着した MDP がレジンセメントの濡れ性を向上したものと考えられる。破壊様式も全てレジンセメントの凝集破壊であり、MDP 群の優れた接着性を裏付けた。MDP-e 群よりやや接着強さが低い理由として、レジンセメントに吸着された MDP がセメントの重合率を低下させ、その物性をやや低下させたことが考えられる。リン酸基を持つ機能性モノマーであっても、その分子構造によってジルコニア表面との反応性には大きな違いがあることが考えられ、GP-e 群、PP-e 群では接触角に有意差は見られなかったものの、引張接着強さは GP-e 群がやや高かった。GPDM は MDP と比較してやや疎水性のモノマーであり、その立体構造からもジルコニア表面に効率的に反応できず、濡れの向上は限局的であったと考えられる。Phenyl-P は他の 2 種のリン酸基と比較して 1 価のリン酸であり、またジルコニア表面に吸着するには立体障害が大きく、接触角ならびに引張接着強さが Con 群と差がないことからも、ほとんど吸着していない可能性が示唆される。

＜結論＞

1. ジルコニアの表面処理として、MDP を含むプライマーを用いることにより良好な接着を得ることが可能である。
2. リン酸系モノマーはその分子構造の違いにより、ジルコニア表面との反応性が大きく異なることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5233　号	荒井　昌海
論文審査担当者	主　査　宇尾　基弘 副　査　三浦　宏之　　由井　伸彦	
論 文 題 目	The role of functional phosphoric acid ester monomers in the surface treatment of yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals	

（論文審査の要旨）

ジルコニアセラミックスは、その高い機械的特性と生体親和性から、臨床において修復物材料として近年頻用されている。しかしながら、従来からシリカ系セラミックスの接着前処理として用いられてきたシラン処理の有効性は十分でなく、また酸エッチング処理でも容易には溶解しないため、機械的な嵌合を得るためにはアルミナブラスト処理が推奨されている。近年の研究では、リン酸系機能性モノマーである MDP を含むプライマーで処理することで、接着強さが向上することが報告されているが、単離したモノマーで検討を行った報告はない。

現在臨床で使用されているジルコニア処理用のプライマーはほとんどがアルコールもしくはアセトン溶媒にリン酸系機能性モノマーを含有させたものであるが、塗布後には乾燥のみで前処理を終えるため、堆積した未反応の機能性モノマーがレジンセメントとの接着界面に残留しており、接着を阻害する可能性も懸念される

このような背景の下で、荒井はジルコニアセラミックスの接着前処理におけるリン酸系機能性モノマーの役割を明らかにするため、MDP、GPDM、Phenyl-P を各 5%含有する試作プライマーを調製し、ジルコニアセラミックス表面における処理後の表面の性質ならびに接着強さを比較検討した。単離したリン酸系機能性モノマー溶液を用いて、ジルコニアセラミックス表面における役割や影響に特化した研究はこれまでに報告がなく、新規性の高い研究である。また、プライマー処理後の未反応モノマーの挙動ならびにその洗浄法についても未だ報告はなく、臨床における新たな指針を示す研究として評価できる。評価項目は、接触角ならびに接着強さであり、その測定方法は過去の報告を基に、今回の研究に際して適切に設定されたものであり、妥当な手法と考えられる。得られた結果に対する統計学的な検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

得られた結果は以下のとおりである。

1．接触角測定：MDP 含有プライマーで処理した群では、表面の親水性が極めて高く接触角測定が困難であったが、他の群は全て接触角の測定が可能であった。全てのプライマーにおいて、エタノールでの洗浄にて接触角は有意に上昇した。未処理群と比較して、GPDM 処理群、Phenyl-P 処理群は接触角に有意な差はみられなかった。このことから、モノマーのエタノール溶液をエアブローで乾燥するのみでは、表面の結合に寄与していないモノマーが表面に残留していることが示唆された。

２．引張接着強さ：MDP 処理群においては、その後のエタノール洗浄の有無に関わらず、未処理群と比較して有意に高い接着強さが得られた。Phenyl-P 処理群においては、エタノール洗浄の有無に関わらず、未処理群と比較して有意差はなく、MDP 処理群より有意に低い接着強さを示した。破壊形態においては、MDP 処理群においてのみ、レジンセメントの凝集破壊が観察されたが、他の全ての群においては、ジルコニアセラミックスとレジンセメントの界面破壊であった。

以上のそれぞれの評価結果の関連性については、過去の文献の情報も考慮しながら慎重に考察を展開し、ジルコニアセラミックスの表面処理プライマーにおいて、リン酸系機能性モノマーはその構造によって表面処理効果が異なること、表面に堆積した未反応のモノマーは初期接着強さに大きな影響を与えないこと、さらに MDP が 3 種の機能性モノマーのなかで最も接着強さの向上に寄与すると結論している。

以上のように本研究は、リン酸系機能性モノマーがジルコニアセラミックス表面で果たす役割を明確にするために、単離したモノマー溶液を用いて、処理面の接触角測定ならびに引張接着強さについて詳細に検討することで、それぞれのリン酸系機能性モノマーのジルコニア表面での挙動ならびに接着前処理において果たす役割を明らかにしたものである。これにより、ジルコニアセラミックスのリン酸系機能性モノマーによる接着前処理の効果について、その機序の一端が明らかとなった。これらの成果は、今後の表面処理剤の開発、改良に極めて有益なものであり、本研究は今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐藤　健人
論文審査担当者	主査　宇尾 基弘 副査　由井 伸彦、宮新 美智世
論　文　題　目	Dentin Bonding Durability of Two-step Self-etch Adhesives with Improvement of Degree of Conversion of Adhesive Resins

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

セルフエッチング接着システムは接着修復処置において広く用いられており、1−ステップシステムと 2−ステップシステムに分けられる。2−ステップシステムの接着強さが 1−ステップシステムと比較して優れていることが明らかになっているが、その 2−ステップセルフエッチング接着システムにおいてもボンド層の経時的な機械的強度の低下が接着強さに影響を及ぼすことが懸念されている。過去の報告によると、溶媒や水を含まないため 1−ステップシステムと比較して高い疎水性、低い吸水率を示す 2−ステップシステムのボンド層でさえ、経時的に機械的強度の低下が起こることがわかっている。一般的にボンディングレジンの重合率が高いほどその機械的強度は高くなることは明らかであり、また重合が不十分なボンディングレジンは吸水を起こしやすいという過去の報告もある。これらのことから、ボンディングレジンの重合率は初期または長期における接着強さに影響を及ぼす重要な因子と考えられている。しかしこれまでに、ボンディングレジンの重合率を左右する因子として、光照射器の種類や光量、照射時間の影響に関する報告は多くあるが、2−ステップセルフエッチング接着システムにおけるボンディングレジンの成分（光重合触媒、溶媒、機能性モノマーなど）の違いによる重合率と接着強さに及ぼす影響について検討した報告は少ない。また、過去の報告では全く異なる成分のボンディングレジンを比較しており、重合率以外の要因が接着強さに影響している可能性があるため、重合率と接着強さの相関性について正確には明らかになっていない。そこで本実験ではボンディングレジンにおける光重合開始材以外はほぼ同成分である 2−ステップセルフエッチング接着システムを使用し、ボンディングレジンの重合率の違いが初期または長期における接着強さに及ぼす影響についてボンディングレジンの機械的強度と吸水率についての比較とともに検討した。

＜方法＞

本実験では 2 種類の 2−ステップセルフエッチング接着システム、Clearfil SE Bond と Clearfil SE Bond2（CSE および CSE2; クラレノリタケデンタル社製）を使用した。両者のプライマーは同一で、ボンディング材は、重合開始材以外は同成分から成る。

・重合率の測定

CSE と CSE2 を光重合させた際の赤外吸収スペクトルを FTIR-ATR 法により時間依存的に測定し、光重合時の重合率の経時変化を評価した。光重合は LED 光照射器（Pencure2000；モリタ社製）を用いて 10 秒間照射して行い、照射開始と同時に FTIR の測定を開始し、その後 0.2 秒ごとにスペクトルを測定した。10 秒間の光重合後も、合計 40 秒間の光照射と吸収波長の測定を続け、光照射開始からの重合率の変化を評価した。これを各接着システムについて 3 回ずつ行い（n=3）、測定中における重合率の最高値について有意水準 5%で t 検定を行った。

・吸水率の測定

本実験では、試料の大きさと吸水期間に修正を加え、ISO4049 に準じて吸水率を測定した。まず、CSE と CSE2 をシリコーンゴムのモールドに注入し、Pencure2000 にて 180 秒間光照射して直径 8.0mm、厚さ 1.5mm のディスク状試料を作製した。各接着システムについて 8 枚ずつ試料を作製（n=8）し、試料寸法を計測し、試料体積（V）を算出した。試料は乾燥状態で保管し、24 時間ごとに重量を測定し、重量が一定になる値（M1）を求めた。次に、37℃の水中に試料を保管し、24 時間ごとに重量を測定して、重量が一定になる値（M2）を求め、吸水率(WS)を次式で算出した。

WS=（M2—M1）/V

得られた結果について有意水準 5%で t 検定を行った。

・弾性率の測定

三点曲げ試験のための試料として、CSE と CSE2 をシリコーンゴムのモールドに注入し、Pencure2000 にて 180 秒間光照射し、5 x 18 x 2 mm の板状試料を各 16 枚作製し、37℃の水中に 24 時間保管した。その後、CSE と CSE2 それぞれの試料を 2 つのグループに分け、一方はすみやかに三点曲げ試験を行い（dry 群）、もう一方のグループは、吸水試験の結果よりボンディングレジンが吸水により重量が一定になるまで約 1 ヶ月を要したことから、さらに 1 ヶ月間 37℃の水中に保管した後、三点曲げ試験を行い（wet 群）、曲げ弾性係数を測定した(n=8)。得られた結果について有意水準５％で 2-way ANOVA を用いて統計分析を行った。

・微小引張試験

24 本の健全なヒト抜去大臼歯の歯冠部エナメル質を歯軸と垂直方向に除去し、2 グループに分け、平坦象牙質にそれぞれ CSE と CSE2 を Pencure2000 により業者指示通りに処理した。その後、厚みが 5mm になるようにコンポジットレジン Clearfil AP-X（クラレノリタケデンタル社製）を積層充填し、37℃の水中に 24 時間保管した。水中から取り出して直ちにコンポジットレジンとヒト象牙質が一体になった棒状の微小引張試験片を接着面が 0.7x 0.7mm になるように 1 試料から各 10 本作製した。微小試験片は保管条件を 24 時間、6 ヶ月、1 年の 3 群に分け、各保管期間後に微小引張試験を行い、接着強さを算出した（n=12）。得られた結果について有意水準５％で 2-way ANOVA と多重比較として Bonferroni test を行った。

＜結果＞

CSE2 の重合率および 24 時間から 1 年のすべての水中保管期間後の接着強さは CSE と比較して有意に高く、加えて CSE2 の吸水率は CSE と比べて有意に低かった。また、CSE における 1 年後の微小引張り強さは 24 時間後と比較して有意に低下したが、CSE2 ではどの保管期間の微小引張

り強さにおいてもそれぞれの有意な差は認められなかった。さらに、CSE と CSE2 においてどちらも dry 群のほうが wet 群よりも有意に高い弾性率を示し、CSE2 の弾性率は wet 群、dry 群どちらの群においても CSE よりも有意に高かった。

＜考察＞

24 時間から 1 年のすべての水中保管期間後の微小引張試験の結果、CSE2 は CSE と比べて有意に高い接着強さを示した。また、CSE における 1 年後の接着強さは 24 時間後と比較して有意に低下したが、CSE2 では保管期間によらず有意な接着強さの低下は認められなかった。過去の報告では重合率と接着強さの相関性をありとするもの、なしとするものが混在しており、明確な結論が出ていない。これは接着強さが多因子に影響を受けるものであり、過去の研究では成分が全く異なる接着システムを用いて比較しているためと考えられる。本実験では光重合開始材以外はほぼ同条件の接着システムを比較しており、それにより重合率と接着強さの相関性が明らかにされた。

重合率測定の結果より CSE2 の重合率が CSE と比べて有意に高いことが示されており、理由として CSE２と CSE がどちらも光重合触媒として最も広く使われているカンファーキノンを含んでいるが、CSE2 にはさらに新しい光触媒が追加されていることが考えられる。しかし本実験では、実際の臨床において重合率に影響を与えうるプライマーの残留による重合阻害などは考慮されていないため、今後さらなる検討が必要である。

過去の報告から、機能性モノマーとして 10-MDP を含むボンディングレジンはハイドロキシアパタイトと化学結合し、安定して高い接着強さを示すことがわかっているが、一方で 10-MDP を含む CSE でさえ、長期保管後の接着強さは初期と比べて低下することが示されており、この知見は本実験の結果とも一致している。本実験では CSE2 は CSE と比べてすべての水中保管期間後において高い接着強さを示し、また 1 年保管後の接着強さも初期と比べて有意な差はなかった。これらのことから CSE2 は CSE と比べて優れた長期耐久性を示すことが示唆された。その理由として、本実験の結果が示すように CSE2 は CSE と比べて有意に弾性係数が高く CSE2 によるボンド層が高強度であること、また CSE2 は重合率も有意に高く、ボンド層だけではなくその下の樹脂含浸層もまた、強固で安定していることが示唆される。

さらに吸水試験と三点曲げ試験の結果から CSE2 の吸水率が CSE よりも有意に低く、また CSE2 の弾性率は wet 群、dry 群どちらの群においても CSE よりも有意に高かった。これらの結果はボンディングレジンの重合率が高いほど吸水が少なく、弾性率は高いという過去の報告にも一致している。これは、高い重合率を示す CSE2 における重合したボンディングレジンは CSE と比べて分子間で強く結合しており、その結果吸水率が低く、高い機械的強度を示すということが理由として推測される。また、吸水による機械的強度の低下率は CSE2 の方が CSE よりも低かったこと、dry 群における CSE の弾性率よりも wet 群における CSE2 の弾性率の方が高かったことの２点から、CSE2 の弾性率が吸水の有無に関わらず CSE より高く、CSE2 によるボンド層が非常に安定した高い機械的強度を有することが示唆された。

また、微小引張試験後の破断面の SEM では CSE でボンディング層における凝集破壊が観察されたが CSE2 では認められなかった。この結果は、前述した重合率が高い CSE2 によるボンディ

ング層の機械的強度が CSE と比べて高い、という考察と一致していた。

＜結論＞

2–ステップセルフエッチングシステムにおける接着性レジンの高い重合率がボンディング層の吸水劣化による機械的強度の低下を防ぐことで、初期の接着強さだけでなく長期耐久性も向上させることが示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5234　号	佐藤　健人
論文審査担当者	主　査　宇尾 基弘 副　査　由井 伸彦、宮新 美智世	
論 文 題 目	Dentin Bonding Durability of Two-step Self-etch Adhesives with Improvement of Degree of Conversion of Adhesive Resins	

（論文審査の要旨）

近年、歯科治療において MI コンセプトに基づいた接着修復治療は幅広く応用されており、様々な接着システムが開発されている。その中でもセルフエッチングシステムは世界中に普及しており、特に２ステップシステムは高い接着力を示すことが多数報告され、世界的にゴールデンスタンダードとなっている。しかしながら、高い疎水性、高い接着強さを示す２ステップセルフエッチングシステムでさえ、経時的なボンド層における吸水と、それに伴う機械的強度の低下が起こり、結果、長期間経過後に接着強さが低下することが報告されている。それゆえ、２ステップセルフエッチングシステムの長期耐久性についてはさらなる研究、改良が求められているといえる。過去には、ボンディングレジンの重合率がボンド層の吸水率や強度といった機械的特性に影響を及ぼすという報告があり、象牙質とコンポジットレジンとの接着強さやその接着安定性については、ボンディングレジンの重合率が重要な因子であるという報告もある。つまり、長期耐久性の向上のためにはボンディングレジンの重合率と、初期または長期における接着強さとの関係について明らかにする必要がある。これまでも光照射の条件を変えることでボンディングレジンの重合率と接着強さとの関係について検討した報告はあるが、さらなる長期耐久性の向上のためには、同じ光照射の条件下でのボンディングレジンの重合率を高める必要がある。

このような背景から、佐藤はボンディングレジンに含まれる重合開始材、溶媒、機能性モノマーの成分が重合率に影響を及ぼすことに着目し、ボンディングレジンに含まれる光重合開始材以外はほぼ同成分の 2 ステップセルフエッチング接着システムである、Clearfil SE Bond と Clearfil SE Bond2（CSE および CSE2; クラレノリタケデンタル社製）を使用して、ボンディングレジンの重合率の違いが初期または長期における接着強さに及ぼす影響について検討した。また、重合率の違いが接着強さに影響する原因を検討するため、ボンディングレジンの機械的強度と吸水率についても合わせて比較した。これまで、2–ステップセルフエッチングシステムにおけるボンディングレジンの成分（光重合触媒、溶媒、機能性モノマーなど）の違いが重合率と接着強さに及ぼす影響について検討した報告は少なく、さらにこれまでの重合率と接着強さに関する報告では全く異なる成分のボンディングレジンを使用しているため、重合率と接着強さの相関性について正確には明らかになっていないことからも、本研究の着眼点は高く評価できる。また得られた結果に対する検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周

到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことがうかがわれる。

本研究により得られた主な結果は以下の通りである。

１．微小引張試験による接着強さ評価の結果、CSE2 は CSE と比べてすべての保管期間で有意に高い接着強さを示した。また、CSE における 1 年後の接着強さは 24 時間後と比較して有意に低下したが、CSE2 ではどの保管期間の微小引張試験においても有意な差は認められなかった。

２．重合率測定の結果より CSE2 の重合率が CSE と比べて有意に高いことが示された。

３．吸水試験の結果より CSE2 の吸水率が CSE よりも有意に低かった。

４．三点曲げ試験で得られた CSE2 の弾性率は、乾燥状態と吸水状態ともに、CSE よりも有意に高かった。

以上の結果より、CSE2 は CSE と比べて優れた初期の接着強さ、長期耐久性を示すことが示唆された。その理由として、本実験の結果からも CSE2 は CSE と比べて有意に高い弾性係数を示しており、CSE2 によるボンド層の強度が高いこと、また CSE2 は CSE と比べて有意に高い重合率を示したことから、ボンド層だけではなくその下の象牙質とレジンとが混在した層もまた、強固で安定していることを挙げている。さらに CSE2 におけるボンド層の吸水率が低いことも吸水による機械的強度の低下を防ぎ、優れた長期耐久性を示した理由の一つとしている。これらのことから、2−ステップセルフエッチングシステムにおけるボンディングレジンの重合率の向上がボンド層の吸水と機械的強度の低下を防ぐことで、初期の接着強さだけでなく長期耐久性も向上させることが示されたと結論づけている。

こうした結論に至るまでの考察は、材料学的な特性を十分に理解したうえで理論的な展開がなされており、申請者の本領域における十分な知識と情報を裏付けるものである。

以上のように、本研究はボンディングレジンに含まれる重合開始材以外は同条件のもとで重合率と接着強さについて比較、検討を行うことで、重合率の向上が初期または長期の接着強さに寄与することを明らかにした。この知見は長期耐久性に優れた接着システムのさらなる改良、開発に寄与すると考えられる。本研究の成果は、今後の歯科保存学、歯科材料学ならびに接着歯学の発展に大いに貢献するものと考えられるため、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	松浦　毅士
論文審査担当者	主査　渡部　徹郎 副査　興地　隆史　　青木　和広
論　文　題　目	Involvement of CX3CL1 in the Migration of Osteoclast Precursors Across Osteoblast Layer Stimulated by Interleukin-1ß

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

破骨細胞は骨吸収を担う多核の細胞であり、造血幹細胞由来の単球／マクロファージ系の細胞が融合して形成される。骨芽細胞は新しい骨を作るための骨表面タンパクを分泌して、破骨細胞によってできた吸収窩を修復する。このような骨のリモデリングは絶えず起こっており、骨はその構造と強度を保っている。骨を吸収するために破骨細胞前駆細胞は骨表面上に到達すると考えられるが、その経路および詳細なメカニズムは明らかになっていない。破骨細胞前駆細胞の成熟した破骨細胞への分化は、破骨細胞前駆細胞が骨芽細胞の下に遊走してから開始すると考えられており、破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞との細胞接着と、破骨細胞前駆細胞の骨表面上への遊走が、破骨細胞の分化に関与していることが推察される。しかし、破骨細胞前駆細胞が実際にどのようにして骨芽細胞層下に遊走していくのかは、明らかにされていない。そこで本研究では、共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて、破骨細胞前駆細胞が骨芽細胞層の下に遊走する経路およびそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

＜材料と方法＞

ddY マウスの大腿骨および脛骨からマウス骨髄由来単核球(BM-MNCs)を採取し、破骨細胞前駆細胞とした。骨芽細胞としてマウス骨髄由来ストローマ細胞(TMS-12)を用いた。TMS-12 を、37℃、5%CO_2 の条件下で 10%FCS 含有 alpha-MEM を用いて培養した。BM-MNCs の TMS-12 基底膜側への遊走は BM-MNCs と TMS-12 を共培養後、共焦点レーザー顕微鏡(SP8, Leica)を用いて 15 分ごとに 3 次元画像を取得することにより観察した。さらに、共培養開始 6 時間後に固定した細胞を、走査型電子顕微鏡(S-4500, Hitachi)を用いて詳細に観察した。TMS-12 を 24 時間培養後に TMS-12 上に BM-MNCs を播種し、PGE_2 (Cayman, 100ng/ml)、IL-1β (Peprotech, 10ng/ml)刺激にて共培養を行った。共培養実験系を用いて、TMS-12 の密度（1×10^4、3×10^4、5×10^4/well of 96 wells plate）における破骨細胞分化支持能の違いを PGE_2 と IL-1β 刺激により比較した。また、白血球の遊走の際に関与すると考えられる分子に注目し、その mRNA 発現量を定量的 RT-PCR(ABI7500)を用いて調べた。遺伝子の発現は RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を用いて調べ、発現量は GAPDH 発現量との相対値で示した。破骨細胞の同定は酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP)染色を用い、TRAP 陽性で３核以上の多核細胞を破骨細胞とし、顕微鏡視野中に占める破骨細胞の割合で破骨

細胞分化能を定量化した。統計ソフト JMP10 for Windows の Tukey-Kramer および Dunnett 多重比較検定を用いて、有意差検定をおこなった。

＜結果＞

破骨細胞前駆細胞が骨芽細胞基底膜側へ遊走する経路を特定するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。BM-MNCs には、TMS-12 との共培養開始後約 3 時間で、骨芽細胞内を遊走する細胞内遊走(transcellular migration)と細胞間を通過する細胞間遊走(paracellular migration)の２種類の遊走が認められた。さらにこの２種類の遊走を、走査型電子顕微鏡を用いて確認した。共培養系において IL-1β 刺激後 6 日後に骨芽細胞層下に酒石酸耐性酸フォスファターゼ陽性の多核破骨細胞の分化が確認された。この破骨細胞分化は播種した骨芽細胞の密度に依存しており、高密度で培養しコンフルエントな TMS-12 において PGE_2 刺激では破骨細胞支持能は認められなくなったが、IL-1β 刺激では破骨細胞支持能亢進が依然として認められた。破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞の接着および破骨細胞前駆細胞の遊走に関与する候補分子(CD4, CD48, CD99, CD54, CX3CL1 および CX3CR1)について mRNA 発現量を定量的 RT-PCR を用いて調べたところ、TMS-12 に CX3CL1、BM-MNCs に CX3CR1 の発現が認められた。CD4, CD48, CD99, CD54 は BM-MNCs にのみ発現が認められ、TMS-12 には発現が認められなかった。TMS-12 における CX3CL1 の発現は IL-1β 刺激によって有意な上昇が認められたが、PGE_2 刺激ではその上昇は認められなかった。さらに、BM-MNCs の遊走に関して、抗 CX3CL1 中和抗体を用いた実験を行った結果、共培養開始 6 時間後において TMS-12 の基底膜側に到達した BM-MNCs の数は有意に減少した。さらに破骨細胞分化においても、骨芽細胞密度依存的に抗 CX3CL1 中和抗体による破骨細胞分化の抑制効果が認められた。

＜考察＞

白血球は炎症や組織修復の際に血管内皮細胞を通過し、血管外漏出を行うことが知られており、その際に白血球は血管内皮細胞に対して細胞内遊走及び、細胞間遊走を行うこと、その遊走に ICAM-1 や VCAM-1、CD99 などの接着分子が関与していることが報告されている。だが、破骨細胞前駆細胞における遊走については明らかにされていない。本研究では、初めてこの２つの遊走経路（細胞内遊走及び細胞間遊走）が、破骨細胞前駆細胞においても骨芽細胞層に対して存在することを、共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡により確認した。また、TMS-12 と BM-MNCs の共培養において、破骨細胞分化を検討したところ、破骨細胞分化と TMS-12 の密度の間に逆相関関係が認められた。この実験結果から、BM-MNCs が高密度の TMS-12 細胞層を通過し TMS-12 基底膜面に達することが困難であった可能性が推察された。さらに、高密度 TMS-12 において、PGE_2 刺激では破骨細胞支持能を失ったが、IL-1β 刺激では破骨細胞分化能は維持されていた。この実験結果より、IL-1β 刺激では何らかの方法により BM-MNC が TMS-12 細胞層を通過する形質を獲得したためではないかと考えられた。そこで、白血球の血管外遊走に関与すると報告されている接着分子について定量的 RT-PCR 法を用いて調べたところ TMS-12 には CX3CL1、BM-MCs には CX3CL1 のレセプターである CX3CR1 の発現が認められた。さらに、TMS-12 において IL-1β 刺激によって CX3CL1 の有意な上昇が認められたが、PGE_2 刺激ではその上昇は認められなかった。これらのことから、CX3CL1-CX3CR1 の系は BM-MNCs の TMS-12 下への遊走に関与しているのではないかと考えられた。BM-MNC の TMS-12 細胞層下への遊走に対する抗 CX3CL1 の中和

抗体の効果を検討した結果、IL-1β 刺激による BM-MNC の遊走は抗 CX3CL1 の中和抗体添加により阻害された。さらに、抗 CX3CL1 の中和抗体は共培養系で IL-1β 刺激における破骨細胞分化を抑制し、その効果は TMS-12 の細胞密度に依存していた。これらの結果より、CX3CL1-CX3CR1 系が破骨細胞前駆細胞の骨芽細胞層下への遊走に関わっており、その遊走が破骨細胞分化に必須であることが明らかになった。

また、関節リウマチの患者の CX3CL1 の血清レベルと疾患の間に相関関係があり、骨芽細胞における CX3CL1 の発現は関節リウマチの患者の方が有意に高いことが報告されている。さらに、抗 CX3CL1 抗体の投与によって関節リウマチの動物モデルにおける単球の滑膜組織への浸潤が抑制されることが報告されている。CX3CR1 欠損マウスは破骨細胞数が減少し、海綿骨および皮質骨の厚さの有意な増加を示したという報告もある。これらの報告と我々のデータは、CX3CL1-CX3CR1 系が骨疾患において破骨細胞分化に重要な役割を果たしていることを示している。しかしながら、これらの報告は破骨細胞の分化に関してのものであり、CX3CL1-CX3CR1 の系が破骨細胞前駆細胞の骨芽細胞下への遊走に関与していることは明らかにされていない。本実験で CX3CL1 中和抗体が BM-MNCs の TMS-12 細胞層下への遊走だけではなく、破骨細胞の分化も阻害したことから、我々は CX3CL1 の新たな役割を明らかにした。

CX3CL1 は CX3C ケモカインの一種であり、骨芽細胞上に発現し、細胞遊走因子と接着分子の２つの活性を併せ持っている。分泌型、細胞膜結合型として合成され、細胞膜表面に局在した後プロテアーゼ分解を受けて細胞表面から細胞外ドメインが切り出され遊走因子として働くことが知られている。その受容体である CX3CR1 は G タンパク質共役受容体であり単球、ナチュラルキラー細胞、Ｔ細胞に発現している。CX3CR1 の活性化によって誘発されるいくつかのシグナルが報告されており、破骨細胞前駆細胞として利用される RAW 細胞においては P13K/Akt の経路が挙げられており破骨細胞前駆細胞の生存や増殖に関わっている可能性が推察される。さらに、CX3CL1 による Syk の活性化が知られており、破骨細胞形成における RANKL の共刺激分子と言われている DNAX-activating protein of 12 kD が Syk の活性化を引き起こすことから、CX3CL1-CX3CR1 系による Syk の活性化は、破骨細胞前駆体の骨芽細胞層の下への遊走に寄与するだけではなく、直接破骨細胞形成に寄与している可能性が考えられた。しかし、破骨細胞前駆体細胞における CX3CR1 のシグナル伝達の詳しいメカニズムはまだ解明されておらず、これは今後の検討課題である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5235　号	松浦　毅士
論文審査担当者	主　査　渡部　徹郎 副　査　興地　隆史　　青木　和広	
論　文　題　目	Involvement of CX3CL1 in the Migration of Osteoclast Precursors Across Osteoblast Layer Stimulated by Interleukin-1ß	

（論文審査の要旨）

骨は破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成によりその恒常性が維持されている。この骨リモデリングにおいて、破骨細胞分化には骨芽細胞が重要な役割を担っていることが知られている。破骨細胞は骨基質上にのみ存在することから、破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞層を通過して骨基質に達する必要がある。このような背景のもと、松浦は破骨細胞前駆細胞が骨芽細胞層下に遊走する経路、およびそのメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

実験材料として、骨芽細胞としてマウス骨髄由来ストローマ細胞(TMS-12)を用い、破骨細胞前駆細胞としてマウス骨髄由来単核球(BM-MNCs)を用いた。そして、BM-MNC の骨芽細胞基底膜側への遊走を、共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を用いて観察した。さらに、破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞の接着および破骨細胞前駆細胞の遊走に関与する候補分子について、定量的 PCR 法を用いてその発現量を調べた。本研究における実験材料と実験方法の選択および観察は、生理学的知識のみならず非常に高い分子生物学的知識、実験技術の裏付けのもとに遂行されており、高く評価できる。

得られた結果の概要は以下である。

1. BM-MNCs には、TMS-12 との共培養開始後約 3 時間で、骨芽細胞内を遊走する細胞内遊走(transcellular migration)と細胞間を通過する細胞間遊走(paracellular migration)の２種類の遊走が認められた。
2. 接着及び遊走に関与する有力な分子として、TMS-12 に CX3CL1、BM-MNC に CX3CR1 の発現が認められた。
3. コンフルエントな状態で培養した TMS-12 には、IL-1β 刺激後 CX3CL1 発現量の有意な上昇と、破骨細胞支持能の亢進が認められたが、PGE_2 刺激ではそれらは認められなかった。
4. BM-MNC の骨芽細胞層下への遊走および骨芽細胞の破骨細胞分化支持能は、抗 CX3CL1 中和抗体添加により阻害された。

これらの実験結果は論文中に明確に提示されており、これらの結果から松浦は以下の考察を行った。

1. 破骨細胞分化と TMS-12 の密度の間に逆相関関係が認められた結果は、BM-MNC が高密度の TMS-12 細胞層を通過し TMS-12 基底膜面に達することが困難であったためと推察され

る。

2. 高密度 TMS-12 において、PGE_2 刺激では破骨細胞支持能を失ったが、IL-1□刺激では破骨細胞分化能は維持された。これはIL-1□刺激では何らかの方法により BM-MNC が、TMS-12 細胞層を通過する形質を獲得したためではないかと考えられる。

3. CX3CL1-CX3CR1 系が破骨細胞前駆細胞の骨芽細胞層下への遊走に関わっており、その遊走が破骨細胞分化に必須である。

実験結果に対するこれらの考察が、論理的に適切におこなわれていることを確認した。

以上のように、本論文は破骨細胞前駆細胞が骨芽細胞層の下への遊走だけではなく、破骨細胞の分化に対しても影響を及ぼす CX3CL1 の新たな役割を初めて明らかにしたものであり、今後の基礎および臨床歯学の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。

したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	幸田 直己
論文審査担当者	主査　渡部 徹郎 副査　小野 卓史　　池田 正明
論　文　題　目	The transcription factor mohawk homeobox regulates homeostasis of the periodontal ligament

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

歯根膜は、Ⅰ型コラーゲンに富む線維性組織であり、その歯周組織における機能は、咬合力等の力学的負荷の受容、知覚伝達、栄養供給等多岐にわたる。転写因子 mohawk homeobox（Mkx）は、主に腱組織で発現し、collagen type I alpha 1、alpha 2（*ColI α1, α2*）等の遺伝子発現を制御することで腱の成熟を促すことが報告されている。腱は歯根膜と構成成分や機能が類似しているため、両者には共通した分子制御メカニズムが存在すると考えられる。

本研究は、歯根膜組織における *Mkx* の発現様相の検索およびその機能解析を目的とし、*Mkx* 欠損（$Mkx^{-/-}$）マウス臼歯部における組織学的解析を行った。その結果、Mkx は歯根膜に限局して発現し、$Mkx^{-/-}$マウスでは加齢とともに上顎第一臼歯根間中隔部の歯根膜腔の拡大および歯根膜膠原線維におけるフィブリルの変性が観察された。また、歯根膜を構成する細胞形態の変化も観察された。さらに $Mkx^{-/-}$マウスでは、野生型（WT）マウスと比較し、歯根膜関連遺伝子（*Postn*: periostin）の発現低下および骨代謝関連遺伝子（*Sp7*：Sp7 transcription factor 7, *Atf4*：activating transcription factor 4, *Runx2*：runt related transcription factor 2）の発現上昇を認めた。以上の結果より、Mkx は加齢に伴う歯根膜の退行性変化を抑制することで、歯根膜の恒常性維持に働く可能性が示唆された。

<諸言>

歯根膜は、歯と歯槽骨を繋ぐ線維性結合組織で、咬合力等の力学的負荷を受容するとともに、知覚の伝達、栄養供給等歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担う。歯、歯根膜、歯槽骨や歯肉等歯周組織の効果的な再生法開発は社会的なニーズが高く、歯科領域の重要な研究テーマの一つとなっているが、歯根膜の詳細な機能調節機構は不明な点が多い。

歯根膜は、主にⅠ型コラーゲンで構成され、細胞外マトリックスを構成する分子である *Postn* や、転写因子 scleraxis（*Scx*）を発現することが報告されている。転写因子 *Mkx* は、*ColI α1, α2* 等の発現を制御することで腱組織の膠原線維の成熟に関与していると報告されている。腱は歯根膜と同様に力学的負荷を受容し、Ⅰ型コラーゲンを主成分とする組織であるため、両者には類似した分子制御機構が存在することが予想される。本研究では、歯根膜における転写因子 Mkx の発現様相および機能を明らかにするため、組織学的解析、形態学的解析ならびに遺伝子発現解析を行い、歯根膜における Mkx の役割について考察を行った。

<方法>

Mkx の発現解析には *Mkx* 遺伝子のエクソン 2 に GFP（Venus）をノックインした *Mkx*$^{-/-}$マウスを使用（東京医科歯科大学動物実験委員会承認番号：0160118A、2011-198C17）し、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織学的解析にて上顎骨歯槽部における Mkx の局在部位を検証した。加えて、10 週齢の野生型（WT）マウスの腱および上下顎臼歯の歯根膜からそれぞれ全 RNA（tRNA）を抽出し、定量的 PCR（quantitative polymerase chain reaction, qPCR）法を用いて *Mkx* の発現量を比較した。また、10 週、6 か月、および 12 か月齢各々の WT、*Mkx*$^{-/-}$マウスの上顎歯槽部を摘出後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて組織形態学的観察を行った。さらに、臼歯部歯根膜の透過型電子顕微鏡（TEM : transmission electron microscopy）による膠原線維断面の形態観察、トルイジンブルー染色による歯根膜細胞の形態学的観察を行った。また、10 週齢 WT および *Mkx*$^{-/-}$マウス歯根膜におけるコラーゲン、歯根膜および骨代謝関連遺伝子群（*ColI α1, α2, Postn, Scx, Sp7, Atf4, Runx2, Alpl*）の mRNA 発現量を qPCR にて比較検討した。また、マイクロアレイ（Agilent Sure Print G3 Mouse Gene Expression 8x60K v2、アジレントテクノロジーズ社）により、網羅的発現解析を行った。最後に、ヒト歯根膜線維芽細胞株（Clonetics CC-7049 HPdLF、ロンザ社）を用いた *in vitro* 実験系にて、small interfering RNA（siRNA）による *MKX* ノックダウン（MKX siRNA : SI04222064 Hs_MKX_3 FlexiTube siRNA、キアゲン社）を行うとともに、Mkx 発現ベクター（Adeno flag-Mk ViraPower Adenoviral System、フィッシャーサイエンティフィック社）を構築し、細胞に Mkx を強制発現させた。各細胞群より tRNA を抽出後、上述遺伝子群の mRNA 発現量を qPCR により解析した。

<結果>

上顎歯槽部における Mkx の発現を免疫組織学的に解析した結果、Mkx は歯根膜に限局して発現し、その発現量は腱の約 2 倍であった。WT および *Mkx*$^{-/-}$マウス歯根膜の組織学的解析の結果、10 週齢では両者に明らかな違いは認められなかったが、加齢（生後 6 か月から 12 か月齢）に伴って、*Mkx*$^{-/-}$マウスの上顎第一臼歯根間中隔部の歯根膜腔の垂直的な幅が拡大し、波状の歯槽骨縁に多核巨細胞が多数観察された。また、12 か月齢における歯根膜膠原線維のフィブリル断面は、WT において類円形を呈した一方、*Mkx*$^{-/-}$マウスでは辺縁が不整かつ細くなり、膠原線維の加齢変性が生じていることが推察された。また、根間中隔部に存在する歯根膜細胞の形態学的解析より、10 週齢では両者で明らかな違いは観察されなかったが、加齢とともに *Mkx*$^{-/-}$マウスでは細胞形態が紡錘形から多角形へと変化した。さらに、*Mkx*$^{-/-}$マウス歯根膜においては、*Sp7, Atf4, Runx2* の発現亢進、*Postn* の発現抑制傾向が認められた。マイクロアレイ解析の結果、*Mkx*$^{-/-}$マウスの *RANKL / OPG* 比は、WT に比較して約 2 倍となった。一方、炎症性マーカー遺伝子（*Tnf, Il1b, Il6*）発現量は、両群間で有意な差は認められなかった。最後に、ヒト歯根膜細胞を用いて *MKX* ノックダウンと *Mkx* 過剰発現による機能解析を行った結果、*MKX* ノックダウンでは *POSTN* 発現の低下および *SCX* 発現の上昇を認めた。*Mkx* 過剰発現では、*SCX* 発現の低下と著しい *ColI α1, α2* の上昇および *SP7, ALPL, RUNX2* の低下を認めた。

<考察>

Mkx$^{-/-}$マウスを用いた過去の報告では、腱の膠原線維のフィブリル短径の縮小や、これに伴う腱の低形成を示すことが報告されていることより、Mkx は腱の膠原線維の形成および成熟初期に関

与している可能性が考えられる。一方、本研究の結果より、歯根膜においては Mkx が膠原線維の加齢変性の抑制に関与している可能性が示唆された。一般に、マウス臼歯根間中隔部歯根膜の歯槽骨縁は幼若齢では平滑で、加齢に伴い波状を示すことが報告されている。12 か月齢の *Mkx*$^{-/-}$マウス歯槽骨縁では、WT と比較して顕著な波状構造が観察されたことから、Mkx が欠如することで歯根膜の退行性変化が進行する可能性が示唆された。また、*Mkx*$^{-/-}$マウスで観察された歯根膜腔の拡大は、根尖性歯周炎等で観察される炎症に伴った歯根膜腔の拡大と類似した病態像が疑われたが、*Mkx*$^{-/-}$マウス歯根膜において炎症性マーカーの上昇は認められず、歯周組織に炎症性細胞浸潤等も観察されなかったことより、根尖性歯周炎とは異なる病態成立機構の存在が推察された。ヒト歯根膜細胞を用いた *in vitro* 実験系で *MKX* ノックダウンにより *POSTN* の発現低下が認められた。*Postn*$^{-/-}$マウスの臼歯において歯根膜腔の拡大が観察されたとの報告があることから、*Postn* 発現低下が *Mkx*$^{-/-}$マウスの臼歯部歯根膜腔拡大の一因となることが示唆される。また同実験系では、*POSTN* 発現低下の他、*SCX* 発現上昇が認められた。コラーゲン関連遺伝子（*ColI* α*1*, α*2*）は有意な発現変化を示さなかったことより、*Mkx*$^{-/-}$マウスではコラーゲンの合成および維持を *Scx* が代償性に担う可能性が示唆され、このメカニズムにより *Mkx*$^{-/-}$マウスは高齢に達するまで歯根膜に顕著な表現型を示さない可能性が推察された。さらに *Mkx* 強制発現によりコラーゲン関連遺伝子の発現が著しく上昇したことから、Mkx は歯根膜線維芽細胞のコラーゲン合成を賦活化する役割を担う可能性が示唆された。

<結論>

本研究の結果より、Mkx は歯根膜において特異的に発現し、膠原線維の加齢変性を抑制することで歯根膜の恒常性維持の一端を担うことが明らかになった。本研究の結果は、歯根膜の再生等の臨床応用へと発展する可能性があると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5236　号	幸田 直己
論文審査担当者	主　査　　渡部 徹郎 副　査　　小野 卓史　　池田 正明	
論 文 題 目	The transcription factor mohawk homeobox regulates homeostasis of the periodontal ligament	

（論文審査の要旨）

歯周組織において歯根膜は歯と歯槽骨を繋ぐ線維性結合組織で、咬合力等の力学的負荷の受容、知覚伝達、栄養供給等多くの機能を担い、Ⅰ型コラーゲンに富むことで知られている。転写因子 mohawk homeobox（Mkx）は、主に腱組織で発現し、collagen type I alpha 1、alpha 2（*ColIα1,α2*）等の遺伝子発現を制御することで腱の成熟を促すことが報告されている。申請者は腱と歯根膜の構成成分や機能の類似点に着目し、両者には共通した分子制御メカニズムが存在すると想定したことから、歯根膜における転写因子 Mkx の発現様相および機能解明を目的とし、実験計画を立案した。本研究では *Mkx* 欠損（*Mkx*$^{-/-}$）マウス用いた組織学的解析、形態学的解析ならびに遺伝子発現解析を行い、歯根膜における Mkx の役割について考察を行った。

Mkx の発現解析には *Mkx* 遺伝子のエクソン 2 に GFP（Venus）をノックインした *Mkx*$^{-/-}$マウスを使用（東京医科歯科大学動物実験委員会承認番号：0160118A、2011-198C17）し、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織学的解析にて上顎骨歯槽部における Mkx の局在部位を検証した。加えて、10 週齢の野生型 (WT)マウスの腱および上下顎臼歯の歯根膜からそれぞれ全 RNA（tRNA）を抽出し、定量的 PCR（quantitative polymerase chain reaction, qPCR）法を用いて *Mkx* の発現量を比較した。また、10 週、6 か月および 12 か月齢各々の WT、*Mkx*$^{-/-}$マウスの上顎歯槽部を摘出後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて組織形態学的観察を行った。さらに、臼歯部歯根膜の透過型電子顕微鏡（TEM：transmission electron microscopy）による膠原線維断面の形態観察、トルイジンブルー染色による歯根膜細胞の形態学的観察を行った。また、10 週齢 WT および *Mkx*$^{-/-}$マウス歯根膜におけるコラーゲン、歯根膜および骨代謝関連遺伝子群（*ColIα1,α2, Postn*: periostn, *Scx*: scleraxis, *Sp7*: Sp7 transcription factor 7, *Atf4*: activating transcription factor 4, *Runx2* : runt related transcription factor 2, *Alpl*: alkaline phosphatase）の mRNA 発現量を qPCR にて比較検討した。またマイクロアレイ（Agilent Sure Print G3 Mouse Gene Expression 8x60K v2、アジレントテクノロジーズ社）により、網羅的発現解析を行った。最後に、ヒト歯根膜線維芽細胞株（Clonetics CC-7049 HPdLF、ロンザ社）を用いた *in vitro* 実験系にて、small interfering RNA（siRNA）による *MKX* ノックダウン（MKX siRNA：SI04222064 Hs_MKX_3 FlexiTube siRNA、キアゲン社）を行うとともに、Mkx 発現ベクター（Adeno flag-Mk ViraPower Adenoviral System、フィッシャーサイエンティフィック社）を構築し、細胞に Mkx を強制発現させた。各細胞群より tRNA を抽出後、上述遺伝子群の mRNA 発現量を qPCR により解析した。

これらの実験は、いずれも研究目的に対して適切に計画されたと考えられる。

以上の実験結果として、以下の 8 つの知見を得ている。

1) マウス上顎歯槽部における Mkx の発現を免疫組織学的に解析した結果、Mkx は歯根膜に限局して発現し、その発現量は腱の約 2 倍であった。
2) WT および *Mkx*$^{-/-}$マウス歯根膜の組織学的解析の結果、10 週齢では両者に明らかな違いは認められなかったが、加齢（生後 6 か月から 12 か月齢）に伴って、*Mkx*$^{-/-}$マウスの上顎第一臼歯根間中隔部の歯根膜腔の垂直的な幅が拡大し、波状の歯槽骨縁に多核巨細胞が多数観察された。
3) 12 か月齢における歯根膜膠原線維のフィブリル断面は、WT において類円形を呈した一方、*Mkx*$^{-/-}$マウスでは辺縁が不整かつ細くなり、膠原線維の加齢変性が生じ、Mkx が欠如することで歯根膜の退行性変化が進行する可能性が示唆された。
4) 根間中隔部に存在する歯根膜細胞の形態学的解析より、10 週齢では両者で明らかな違いは観察されなかったが、加齢とともに *Mkx*$^{-/-}$マウスでは細胞形態が紡錘形から多角形へと変化し、Mkx の欠如によって歯根膜細胞の性質が変化している可能性が示唆された。
5) *Mkx*$^{-/-}$マウス歯根膜においては、*Sp7, Atf4, Runx2* の発現亢進、*Postn* の発現抑制傾向が認められた。マイクロアレイ解析の結果、*Mkx*$^{-/-}$マウスの *RANKL / OPG* 比は、WT に比較して約 2 倍となった。
6) 炎症性マーカー遺伝子（*Tnf, Il1b, Il6*）発現量は、ＷＴと *Mkx*$^{-/-}$マウスの間で有意な差は認められなかった。
7) ヒト歯根膜細胞を用いて *MKX* ノックダウンを行った結果、*POSTN* 発現の低下、*SCX* 発現の上昇を認めた。
8) ヒト歯根膜細胞に *Mkx* 過剰発現した結果、*SCX* 発現の低下と著しい *ColIα1,α2* の上昇および *SP7, ALPL, RUNX2* の低下を認めた。

以上の結果から、*MKX* ノックダウンにおける *SCX* 発現上昇により、*Mkx*$^{-/-}$マウスではコラーゲンの合成および維持を *Scx* が代償性に担う可能性が示唆された。このメカニズムにより *Mkx*$^{-/-}$マウスは高齢に達するまで歯根膜に顕著な表現型を示さない可能性が推察された。*Mkx* 強制発現によりコラーゲン関連遺伝子の発現が著しく上昇したことから、Mkx は歯根膜線維芽細胞のコラーゲン合成を賦活化する役割を担う可能性が示唆された。

以上のように、申請者は、Mkx が歯根膜において特異的に発現し、膠原線維の加齢変性を抑制することで歯根膜の恒常性維持の一端を担うことを明らかとした。本研究は歯根膜における初の Mkx 発現報告であり、発生後の歯根膜の維持に関する分子制御メカニズムの完全解明への一助となる可能性がある。よって本知見は、歯根膜の再生等の臨床応用にも発展する可能性を持ち、今後の医学・歯学の発展に貢献するものと考えられる。

本研究の着眼点と研究手法およびその成果は高く評価され、基礎および臨床医学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	KULKARNI Tejaswini Vaman
論文審査担当者	主査　鈴木　敏彦 副査　東　みゆき，　荒川　真一
論　文　題　目	DNA-based culture-independent analysis detects the presence of Group A Streptococcus in throat samples from healthy adults in Japan

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

A 群レンサ球菌は主にヒトに感染し、咽頭炎や扁桃炎といった軽微な疾患から壊死性筋膜炎といった重篤な疾患などの様々な感染症疾患に関連している。また、本菌は健常人においても感染が成立していながら臨床的に確認し得る症状を呈さない、いわゆる不顕性感染を引き起こす。不顕性感染は将来の本菌を原因とする疾患の発症や、潜在的な感染規模の拡大、さらには菌の進化的多様性の拡大をもたらすリスク因子となりうることから、健常人においても本菌の感染率を調査することは重要であると考えられる。本菌の検出法としては、咽頭より得られたスワブ（拭い検体）を平板寒天培地に塗抹し培養する手法が広く一般的に用いられてきたが、最近では非培養系の手法、主に PCR 法による検出法が普及し、これにより迅速かつ効率的な菌の検出が可能となってきている。そこで本研究においては、従来型の培養系手法、及び新たに設計した本菌に特異的なプライマーを用いた非培養系手法により健常な日本人の成人より得た咽頭スワブ中の A 群レンサ球菌の存在を調査した。

＜方法＞

東京医科歯科大学歯学部に属するスタッフおよび学生の中から、感染症症状を示さない（健常人）148 人の咽頭スワブサンプルを 2 サンプルずつ収集した。1 サンプルは Trypticase soy 培地 (BBL Microbiology Systems)で培養し、A 群レンサ球菌の分離を試みた（培養法）。また、もう 1 サンプルは Power- Soil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories) にて DNA を抽出し、非培養法の鋳型サンプルとした。スワブサンプルから A 群レンサ球菌 DNA を特異的に PCR 増幅するためのプライマーを設計した。プラマーの設計には、Streptococcus 属細菌種の 16S rRNA 配列をデータベースから取得し、A 群レンサ球菌に特異的な配列領域を選定した。培養法による菌の分離には、羊血液を含む Selective Strep Agar, Modified#2 (SSB) 培地及び Columbia-CNA agar 培地を用い、これらの培地で β 溶血能を示すコロニーを単離し、バシトラシン感受性試験を行った後、菌の DNA を鋳型に、A 群レンサ球菌特異的プライマーを用いた PCR を行った。培養法によって得られた分離株及び非培養法により抽出したスワブ DNA サンプルを鋳型とし、*emm* 遺伝子の遺伝子型を解析した。得られた *emm* 遺伝子配列は CDC データベースに照らし合わせ、*emm* 型を決定した。

＜結果＞

今回新たに設計したA群レンサ球菌特異的な16S rRNAプライマー及びこれまでに有用性の報告がなされているV-Na^+-ATPaseプライマーを用いてPCR法を実施し、プライマーの反応特異性及び検出感度を検証した。

その結果、16S rRNAプライマーとV-Na^+-ATPaseプライマーのいずれにおいても、調べたA群レンサ球菌12株全てでPCR法による遺伝子増幅が認められ、近縁種11株では認められなかった。このことから、今回設計した16S rRNAプライマーはV-Na^+-ATPaseプライマーと同様に、A群レンサ球菌のDNAを特異的に検出できることが示された。次に、プライマーの感受性を検証するために、A群レンサ球菌JRS4株のゲノムDNAを段階希釈したサンプルを鋳型にし、PCR法を行った。その結果、V-Na^+-ATPaseプライマーが62.5 fg以上のDNAから検出が可能であったのに対し、今回設計した16S rRNAプライマーは6.25 fg以上のDNAから検出が可能であった。以上の結果から、今回設計したA群レンサ球菌検出用16S rRNAプライマーは、十分な特異性と感度であることが示された。

この検出プライマーを用いて、非培養法により得た健常人由来のスワブDNAサンプル中からA群レンサ球菌の検出を試みた。その結果、培養系手法によるA群レンサ球菌の検出率は3.4%（5/148）と低い結果であったのに対して、PCR法では実に98.6%（146/148）のスワブサンプルから本菌のDNAが検出された。

また、本菌のDNAが検出された146のスワブ検体において、新たに設計した*emm*（本菌の血清型を決定するMタンパク質をコードする遺伝子）プライマー用いたnested PCRを実施し、血清型の調査を行った．結果、16.9%（25/146）の咽頭スワブから5つの異なる*emm*型（*emm*58, *emm*106, *emm*81, *emm*6, *emm4*）を検出した。このうち*emm*58, *emm*106, *emm*81, *emm*6の4つの*emm*型は、近年日本で分離されている臨床患者（感染に起因する臨床症状あり）由来菌株の主要な*emm*型（*emm*1, *emm*12, *emm*4, *emm*28, and *emm*75）とは異なる極めて珍しい*emm*型であった。このことから、一般的な病原性を持ち感染流行を引き起こす血清型の菌ではなく、特殊な血清型のA群レンサ球菌が健常人における不顕性感染に関与していることが示唆された。

＜考察＞

本研究では、健常人からA群レンサ球菌の分離を試みるとともに、A群レンサ球菌DNAを特異的かつ高感度にPCR検出できるプライマーを設計し、健常人の咽頭スワブ由来のDNA中から本菌を検出することで、非培養的に、健常人における本菌の存在を検証した。非培養法でよって98.6%（146/148）のサンプルで陽性であった。この極めて高い検出率は現在進行形で感染している菌の存在だけでなく、過去の感染歴（残存DNAの存在）をも反映しているためであると考えられるが、本研究において新たに設計したプライマーがスワブ中の極少量のDNAからも効率的にA群レンサ球菌を検出できる能力があることを示した。

また、多様性の高いA群レンサ球菌の遺伝子型別に用いられる*emm*タイピング法を行い、3つの同一サンプル中から複数の*emm*型が同定できた。これは、複数の*emm*型A群レンサ球菌が健常人咽頭に存在していることを示しており、興味深い。日本におけるA群レンサ球菌感染症分離株は、*emm*1, *emm*12, *emm*4, *emm*28, *emm*75が主要な型であるが、今回検出された型は*emm*58,

*emm*106, *emm*81, *emm*6 であり、これは、特異な *emm* 型株が健常人における常在化と関連しているのかもしれない。

＜結論＞

非培養法による PCR 検出法は、健常人における GAS の保菌率調査において重要視されるべき手法であると考えられる。特に、本研究で用いた 16S rRNA と V-Na+-ATPase をターゲットにした A 群レンサ球菌特異的プライマーを用いることで、A 群レンサ球菌の保菌率を最大限見積もる際に有効である。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5237　号	KULKARNI Tejaswini Vaman
論文審査担当者	主　査　鈴木　敏彦 副　査　東　みゆき，　荒川　真一	
論　文　題　目	DNA-based culture-independent analysis detects the presence of Group A Streptococcus in throat samples from healthy adults in Japan	

（論文審査の要旨）

A 群レンサ球菌は、急性感染症として咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、劇症型 A 群レンサ球菌感染症、続発症として急性リウマチ熱、急性糸球体腎炎などを引きおこすグラム陽性の病原細菌である。また本菌は、健常人において不顕性感染を引き起こす。不顕性感染は、本菌を原因とする疾患の発症や、潜在的な感染規模の拡大、さらには菌の進化的多様性の拡大をもたらすリスク因子となりうることから、本菌の感染率を調査することは重要であると考えられる。検出法として、咽頭より得られたスワブ（拭い検体）を平板寒天培地に塗抹し培養する手法が広く一般的に用いられてきたが、最近では非培養系の手法、主に PCR 法による検出法が普及し、これにより迅速かつ効率的な菌の検出が可能となってきている。

そこで本研究においては、従来型の培養系手法、及び新たに設計した本菌に特異的なプライマーを用いた非培養系手法（PCR 法）により、健常な日本人の成人より得た咽頭スワブ中の A 群レンサ球菌の存在を調査した。新たな特異的プライマーによって、培養系手法では検出できない A 群レンサ球菌を拾うことができる可能性が期待された。今回、Tejaswini らは東京医科歯科大学歯学部に在籍する 148 人の健常人から 2 検体ずつ咽頭スワブを採取し、一方を選択培地での培養に、もう一方を PCR 法に供試した。抽出した DNA を鋳型とし、新たに設計した本菌特異的な 16S rRNA プライマーセット及びこれまでに有用性の報告がなされている V-Na^+-ATPase プライマーセットを用いて PCR 法を実施し、本菌の検出を試みた。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 今回設計した A 群レンサ球菌特異的 16S rRNA プライマーは、近縁種の細菌 DNA には交差せず、A 群レンサ球菌を特異的かつ高感度で検出できた。培養系手法による A 群レンサ球菌の検出率は 3.4%（5/148）と低い結果であったのに対して、PCR 法では実に 98.6%（146/148）のスワブから本菌の DNA が検出された。
2. 新たに設計した *emm*（本菌の血清型を決定する M タンパク質をコードする遺伝子）プライマーを用いた nested PCR を実施し血清型の調査を行った結果、16.9%（25/146）の咽頭スワブから 5 つの異なる *emm* 型（*emm*58, *emm*106, *emm*81, *emm*6, *emm4*）を検出した。このうち *emm*58, *emm*106, *emm*81, *emm*6 の 4 つの *emm* 型は、近年日本で分離されている臨床患者（感染に起因する臨床症状あり）由来菌株の主要な *emm* 型（*emm*1, *emm*12, *emm*4, *emm*28,

and *emm*75）とは異なる極めて珍しい *emm* 型であった。このことから、感染流行を引き起こす一般的な血清型の菌ではなく、特殊な血清型の A 群レンサ球菌が健常人における不顕性感染に関与していることが示唆された。

本研究において、ヒト咽頭スワブサンプル中から非培養法的に高感度で A 群レンサ球菌を検出できる手法が確立された。従来の培養法で知られていたよりも高確率で本菌が常在していることが示唆されたことは、今後本菌による感染症の治療・予防法への重要な知見となり、臨床的意義が大きい。本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	芝　多佳彦
論文審査担当者	主査　鈴木　敏彦 副査　荒川　真一　　春日井　昇平
論　文　題　目	Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms

（論文内容の要旨）

【要旨】

複合感染症は複数の細菌の存在とそれらの細菌間の相互作用により引き起こされる感染症である。インプラント周囲炎と歯周炎は口腔内における代表的な複合感染症で、類似した臨床症状を呈することが知られている。この 2 つの疾患の差違を明らかにするために、本研究では同一口腔内にインプラント周囲炎と歯周炎が認められる １２名の被験者よりサンプルを採取し、メタトランスクリプトーム解析により両疾患に関連する細菌種や機能遺伝子発現について比較した。

16S rRNA を基にしたインプラント周囲炎と歯周炎の細菌組成には類似性が認められなかったものの、mRNA を基にした機能遺伝子組成には両疾患で類似性が認められた。病原性因子組成についても両疾患で類似性が認められ、これは健常部位の組成とは明らかに異なっていた。また mRNA の発現のデータをもとに由来細菌種の共起関係を調べ、ネットワーク解析を行ったところ、共起ネットワーク構造内は主に活動性の高い菌（16S rRNA のリード数に対して、mRNA のリード数が有意に多い）で構成されており、それらの菌種間における特徴的な共起相関関係は両疾患で異なっていた。このようにインプラント周囲炎と歯周炎における細菌学的特徴は一部の共通性とともに明らかに異なる部分が存在していた。本研究より、病原因子が明らかでなかった複合感染症における細菌間相互作用が明らかにされた。

【緒言】

歯周炎はバイオフィルムが関与する口腔内の代表的な複合感染症である。中年成人の 15-20%は重度歯周炎に罹患しており、歯周炎による感染は糖尿病や心疾患にも関わりがあると報告されている。近年、歯の欠損を補う治療法として歯科用インプラントが用いられるが、これに伴いインプラント周囲炎も増加しており、その罹患率は 28-56%と報告されている。インプラント周囲炎を効果的に予防・治療することは、患者の QOL 向上に繋がる。両疾患は類似した臨床症状を呈する複合感染症であるが、歯周炎は治療により長期にわたり良好な経過を示すとの報告が多い一方で、インプラント周囲炎に同様の治療を行っても同様の効果がしばしば得られない。両疾患の原因となる細菌学的因子に着目すると、インプラント周囲炎と歯周炎で細菌叢に違いがあるか否かについては未だ議論が続いている。一致した見解が得られていない理由として、これまでの検査は細

菌 DNA を用いており、死菌を検出している可能性があること、また同一口腔内から両疾患のサンプルを採取し比較した報告がこれまでわずか一報しかなく、個体差が影響している可能性などが挙げられる。本研究では、同一口腔内に存在するインプラント周囲炎と歯周炎細菌叢を対象にメタトランスクリプトーム解析を行い、細菌組成だけでなく機能組成を比較することで、歯周炎とインプラント周囲炎の差異を明らかにすることを試みた。

【方法】

本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会承認を受けおこなわれた（第 616 号）。被験者はインプラント周囲炎と歯周炎に罹患している 12 名とした。両疾患の歯肉縁下プラークを採取し、RNA を抽出後、cDNA 合成を行った。その後、Miseq を用いて塩基配列を取得した。健常部位の塩基配列は HOMD から取得した。

前処置後のリードは EMIRGE を用いて 16S rRNA の配列抽出後、HOMD に対し BLASTN で塩基配列類似性検索を行い、種レベルでのアサイメントを行った。各サンプルの多様性は、dendrogram-heatmap と PCoA で視覚化を行った。

次に、機能遺伝子組成と機能遺伝子の由来細菌種の解析をおこなうため、NCBI nr（病原性因子に関しては加えて VFDB と MvirDB）に対し BLASTX を用いてアノテーションし、機能遺伝子組成、由来細菌種、また病原性因子の解析を行った。dendrogram-heatmap と PCoA の解析は 16S rRNA と同様におこなった。

最後に、16S rRNA と mRNA の両方で検出された細菌は、スピアマンの順位相関係数で 16S rRNA と mRNA のリード数を比較した。PCoA は 1 とスピアマンの順位相関係数の差分を距離として視覚化した。また、SparCC を用いて共起関係を調べ、ネットワーク解析を Cytoscape にて行った。

【結果・考察】

前処置後の 25,681,189 本の配列を解析に用いた。16S rRNA 配列から細菌叢の組成を種レベルでみたところ、インプラント周囲炎群からは 150 菌種、歯周炎群からは 164 菌種が検出された。両群で種多様性や細菌種での有意な差は認められないものの、PCoA では両疾患のクラスターはそれぞれに分けられ、細菌叢の組成が明確に異なることが示唆された。

細菌叢の機能組成を解析することで、細菌叢間の違いをより詳細に把握できることが報告されている。そこで申請者らは mRNA 配列を用い機能遺伝子の検索に加え、それらの由来細菌種の解析を行った。その結果、インプラント周囲炎で 22,613 個、歯周炎で 21,187 個が検出され、またこれらの由来細菌種はインプラント周囲炎で 2,936 菌種、歯周炎では 2,820 菌種であった。両群間で各機能遺伝子の発現に有意差は認められず、PCoA からも両疾患で細菌叢の機能遺伝子組成が類似していることが示された。

次に申請者らは、病原性因子にのみ着目し、それらの組成を microbial virulence （MV） types と定義した上で、それぞれの複合感染症や、複合感染症と健常部位が MV types により明確に区別できるか否かを検討した。本解析のために VFDB および MvirDB を用いた。VFDB の結果から、インプラント周囲炎では 1,579 個、歯周炎では 1,537 個、MvirDB の結果からは、インプラント周

囲炎では 2,722 個、歯周炎では 2,622 個の病原性因子が検出された。両群間で有意差のある病原性因子の発現は認められず、PCoA からも両群での MV typse の類似性が示された。一方で健常部位においては、VFDB、MvirDB における PCoA の結果から、健常部位と両疾患では MV types が明らかに異なることが確認された。

16S rRNA 配列と mRNA 配列から得られた細菌種組成を比較する有用性、またそれらの組成が異なることが報告されている。そこで各配列から得られた細菌種組成を両疾患で比較したところ、PCoA の結果から、両疾患ともに 16S rRNA 配列と mRNA 配列から得られた細菌種組成は大きく異なっていた。16S rRNA と mRNA の両方から検出された細菌種（viable taxa with in situ function：VTiFs）は、インプラント周囲炎では 146 種、歯周炎では 133 種であった。16S rRNA のリード数に対し、mRNA のリード数が有意に多い（mRNA-to-rRNA ratio が高い）活動性の高い菌（active taxa）は、インプラント周囲炎では 93 種、歯周炎では 70 種存在し、その中で、mRNA-to-rRNA ratio が７以上の菌種はインプラント周囲炎では *Slackia exigua*、*Eubacterium saphenum*、歯周炎では、*Porphyromonas* sp. 、*Prevotella oralis*、*Campylobacter concisus*、*Treponema socranskii*、*Veillonella* sp. であった。ネットワーク解析は、細菌種間の相互関係を把握するに適していると報告されている。そこで申請者らは、VTiFs の mRNA リード数を基に細菌種間の相関解析をおこない、強い正の相関を示した細菌種間に絞り、共起ネットワーク解析をおこなった。その結果、主要なネットワーク構造はインプラント周囲炎では 1 つ、歯周炎では 2 つ認められた。ネットワーク構造内において、インプラント周囲炎では歯周病原細菌として知られている Red complex の 3 菌種（*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*）がそれぞれ相関を示していたが、歯周炎では *P. gingivalis* と *T. denticola* のみ相関を示すなど、構造の違いが認められた。またネットワーク構造内は、active taxa で主に構成されていた。有意に正の相関を細菌種間で認めたほとんどのノードは active taxa であり、少なくとも 8 被験者から検出された。これらの細菌種は interacting core taxa と考えられ、インプラント周囲炎では 23 種、歯周炎では 10 種が見出された。これらのうち両群で共通した菌種は 3 種のみであり、この差が両疾患の治療効果に差を生じさせている可能性が示唆された。

【結論】

共起ネットワーク内の interacting core taxa の存在は、類似した症状を呈する複合感染症を区別する際の新たな指標となるかもしれない。その類似点と非類似点は、そのまま両疾患の臨床症状の類似性と、疾患進行速さの違いを反映している可能性がある。また、細菌叢組成の異常を伴う複合感染症は、MV types の変化により、疾患の発症や進行に関わることが示唆された。今回の発見は、インプラント周囲炎の特異的な治療法の開発だけでなく、他の複合感染症の病態解析のためにメタトランスクリプトーム解析をおこなう際の手本になり得ると考える。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5238　号	芝　多佳彦
論文審査担当者	主　査　鈴木　敏彦 副　査　荒川　真一　　春日井　昇平	
論 文 題 目	Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms	

（論文審査の要旨）

歯周炎はバイオフィルムが関与する口腔内の代表的な複合感染症である。中年成人の 15-20%は重度歯周炎に罹患しており、歯周炎による感染は糖尿病や心疾患にも関わりがあると報告されている。近年、歯の欠損を補う治療法として歯科用インプラントが用いられるが、これに伴いインプラント周囲炎も増加しており、その罹患率は 28-56%と報告されている。両疾患は類似した臨床症状を呈する複合感染症であるが、歯周炎は治療により長期にわたり良好な経過を示すとの報告が多い一方で、インプラント周囲炎に同様の治療を行っても同様の効果がしばしば得られない。これには疾患の主因となる細菌叢の違いが影響している可能性が考えられた。

そこで本研究では、両疾患の主因となる細菌叢を調べるため、同一口腔内に両疾患に罹患している被験者 12 名を対象に細菌 RNA を採取し、メタトランスクリプトーム解析が行われた。これによりインプラント周囲炎と歯周炎の主因となる細菌叢を網羅的に調べている。過去の報告と異なり、(1) RNA を対象としたことで、細菌叢の中でも活動性が高いと推測される細菌種の同定を行っていること、(2) 全ゲノムから抽出した mRNA に基づく機能遺伝子解析を行うことで、細菌叢のもつ機能的な特徴を明らかにしていること、さらに(3)細菌種間の共起ネットワーク解析により、複合感染症としてのインプラント周囲炎・歯周炎それぞれの特徴を明らかにしようとした点が、本研究の特徴である。

得られた結果は以下の通りである。

1. インプラント周囲炎と歯周炎では、生菌組成 (16S rRNA 遺伝子発現量) に非類似性が、機能遺伝子発現 (mRNA 発現量) に類似性が認められた。
2. 病原因子組成については両疾患で類似性が認められたが、健常部位の病原性因子組成とは明らかに異なっていた。この病原性因子組成 は複合感染症の発症予防と早期発見に寄与できる可能性が示唆された。
3. 生菌量と機能遺伝子発現量は異なり、活動性の高い細菌群に非類似性が認められた。
4. 細菌種間の共起ネットワーク構造、また構造内の共起関係にある主要な細菌群に非類似性が認められた。

これらの結果から以下のことが考察された。

複合感染症である両疾患と健常部位とで病原性因子組成が明らかに異なり、これらが両疾患の発症と進行に関わると考えられた。またインプラント周囲炎と歯周炎で認められる細菌構成は異なるものの、これらは類似した機能遺伝子組成を保有しており、これが両疾患の臨床的類似性の基となると推測された。加えて、共起関係にある主要な細菌群やそれらに基づく共起ネットワーク構造の違いは、両疾患の病態や治療に対する反応の違いに影響していると考えられた。これらの考察は理論的に実施されており、論文中に明確に記載されている。

これまでは特異性細菌説の考え方から歯周炎やインプラント周囲炎の病因が語られてきた側面があるが、(1) 次世代シークエンサーを用いた全ゲノム解析により網羅的に原因細菌叢を解析した点、(2) 社会学や人類学などで発展したネットワーク分析を細菌種間の共起・排除関係の解析に応用し、その特徴を理解しやすい形で示した点は、本研究独自のものといえる。また本研究で構築した独自のメタトランスクリプトーム解析手法は、インプラント周囲炎の特異的な治療法の開発だけでなく、他の難治性複合感染症にも応用可能なモデルケースになりうると考えられ、高く評価できる。

したがって本論文は、博士 (歯学) の学位申請を行うにあたり十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	金崎　彩子
論文審査担当者	主 査　　水口　俊介 副 査　　泰羅　雅登，上野　俊明
論　文　題　目	Effect of Chewing on Body Sway in Patients Wearing Dento-Maxillary Prosthesis after Head and Neck Tumor Resection

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

頭頸部腫瘍切除後の顎補綴装置装着患者において，ガムによる咀嚼運動が重心動揺に与える影響を調査することを目的とした．被験者は頭頸部腫瘍切除後に顎補綴装置を装着している患者 17 名とし，上顎に装置を装着している上顎欠損患者 11 名(第 1 群)と，下顎に装置を装着している下顎欠損患者 6 名(第 2 群)の 2 群に分けた．静的顎位(顎補綴装置によって習慣性咬合位を保持している状態)と，動的顎位(顎補綴装置を装着しガム咀嚼を行っている状態)の 2 状態において，閉眼立位時重心動揺を平衡機能計測装置にて測定した．重心動揺の外周面積，左右方向最大振幅，前後方向最大振幅，総軌跡長を算出し，2 つの顎位における数値をウィルコクソンの符号順位検定を用いて各群それぞれに比較したところ，第 1 群において，動的顎位で静的顎位と比較し重心動揺外周面積が有意に小さくなった($P < 0.05$)．第 2 群においては，2 つの顎位の間で有意差を生じなかった．上顎に顎補綴装置を装着している患者ではガム咀嚼時に重心動揺が小さくなる傾向が認められたが，下顎に装着している患者には認められなかった．

＜緒言＞

口腔内の状態と重心動揺の関連については過去にいくつかの報告がされており，健常者ではガム咀嚼運動が重心動揺を減少させるとの報告がある．頭頸部腫瘍切除後の患者において，多くの場合顎補綴装置によって発話や嚥下，咀嚼機能の回復がなされるが，顎補綴装置装着患者における咀嚼運動と重心動揺の関連についての報告は過去にみられない．頭頸部腫瘍切除後の顎補綴装置装着患者は，手術によって咬合状態，顎運動に変化を生じており，咀嚼運動が重心動揺に与える影響も健常者と異なる可能性が考えられる．本研究の目的は，頭頸部腫瘍切除後の顎補綴装置装着患者において，咀嚼運動が重心動揺に与える影響を調査することとした．帰無仮説は，頭頸部腫瘍切除後の顎補綴装置装着患者において咀嚼運動は重心動揺に影響を与えない，とした．

＜方法＞

被験者は，頭頸部腫瘍切除後に上顎無歯顎または下顎無歯顎に顎補綴装置を装着している患者 17 名(男性 8 名，女性 9 名，平均年齢 70.9 歳)とした．上記被験者を，第 1 群(11 名：上顎欠損および上顎無歯顎に顎補綴装置を装着している被験群)および第 2 群(6 名：下顎欠損および下顎無歯顎に顎補綴装置を装着している被験群)に群分けを行った．被験者収集およびデータ計測は東京医科歯科大学歯学部附属病院顎義歯外来にて行い，全ての被験者から研究参加の同意を得た．本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会にて承認されている (承認番号第 1055 番) ．

重心動揺の評価は，重心動揺計測装置(WinPDM-S, zebris Medical GmbH)を用いて，日本めまい平衡医学会の計測基準に準じて行った．被験者には計測装置の上に自然な状態で立つよう指示し，開眼

状態と閉眼状態でそれぞれ60秒計測した．サンプリング周波数は69Hzとし，本実験では閉眼状態の数値をデータ解析に用いた．各被験者に対し上記の計測を，静的顎位(顎補綴装置を装着し，習慣性咬合位にて静止した状態)と動的顎位(顎補綴装置を装着し，ガムを用いて習慣性咀嚼運動を継続した状態)の2状態で行った．

重心動揺外周面積(mm^2)，左右方向最大振幅(mm)，前後方向最大振幅(mm)，総軌跡長(mm)の 4 項目を算出し，静的顎位における重心動揺と動的顎位における重心動揺を第1群，第2群それぞれに，ウィルコクソンの符号順位検定を用いて比較した．有意水準は5パーセントとした．

＜結果＞

第1群，2群における各項目の中央値(25パーセンタイル，75パーセンタイル)を示す．

第 1 群における重心動揺外周面積は静的顎位において 303(237，793)，動的顎位において 273(167，682)であり，動的顎位において有意に小さくなった(P=0.033)．左右方向最大振幅は静的顎位において 20.3(14.9，31.8)，動的顎位において 16.6(15.5，25.1)，前後方向最大振幅は静的顎位において 34.3(26.5，45.7)，動的顎位において 32.7 (26.1，43.6)，総軌跡長は静的顎位において 1832(1492，2146)，動的顎位において1982(1407，2041)となり，これらの3項目については2つの顎位の間で有意差を認めなかった(P>0.05).

第2群における重心動揺外周面積は静的顎位において203(129，771)，動的顎位において136(115，1096)，左右方向最大振幅は静的顎位において 13.2(10.3，36.3)，動的顎位において 13.2(10.9，46.5)，前後方向最大振幅は静的顎位において 34.4(27.9，45.4)，動的顎位において 25.1(20.1，53.8)，総軌跡長は静的顎位において 2038(1743，2725)，動的顎位において 2104(1666，2616)となり，4 項目とも静的顎位と動的顎位の間に有意差は認められなかった(P>0.05).

＜考察＞

本研究において，重心動揺を4つの項目を用いて検討した．第1群において，重心動揺外周面積が静的顎位と動的顎位で有意差を認めたが，その他の項目では有意差を認めなかった．以上より，帰無仮説は部分的に棄却されたと考える．頭頸部腫瘍切除後の顎補綴装置装着患者において，ガム咀嚼運動は重心動揺に部分的に影響を与えることが示され，口腔状態が体全体のバランスに影響する可能性が示された．

今回の研究では，天然歯の影響を排除し顎補綴装置による咀嚼運動の影響を調べるため上顎無歯顎または下顎無歯顎に顎補綴装置を装着している患者を対象とした．動的顎位を再現するにあたっては，被験者には色変わりガムを計測中咀嚼し続けるよう指示した．ガムは咀嚼検査に用いられるグミゼリーやその他の食品と比較し，咀嚼運動中安定した形状で口腔内に維持されるため，本実験において動的顎位を再現するのに適切な材料と考えた．とくに色変わりガムは，義歯装着者や口腔腫瘍術後患者の咀嚼機能評価に用いられる検査食品であり，他のガムと比較して義歯に粘着しにくいため本研究の被験群に使用した．

日本めまい平衡医学会の基準によると，重心動揺は開眼状態と閉眼状態での測定を行うように記されている．開眼状態では，重心動揺は視覚の影響を受ける．上顎腫瘍切除後の上顎欠損患者において，手術の影響により手術側の視力低下が認められる症例があり，視覚による影響を排除するため結果の解析は閉眼時のデータで行った．

健常者において重心動揺はガム咀嚼によって減少するとの報告があり，その理由として血流の増加や精神的リラックス効果，筋活動が出現することによる頭部の安定，下顎感覚運動機構が姿勢制

御に関与している可能性などが考察されている．一方で開閉口運動に伴って頭部動揺が出現し，その頭部動揺に対して体のバランスを保つために重心動揺が出現する症例があるとの報告もあり，タッピング運動時の開口量が大きくなるほど，その運動に伴う頭部動揺や重心動揺が大きくなると述べられている．顎運動に異常が生じている症例では，咀嚼運動中の重心動揺が頭部動揺とともに大きくなる可能性が示唆されている．

本研究における第 1 群 11 人では，動的顎位における重心動揺外周面積が静的顎位と比較し 10 人の被験者で小さくなり有意差を生じた．左右方向最大振幅は 7 人，前後方向最大振幅は 8 人で動的顎位の方が小さくなったが，重心動揺総軌跡長は 3 人においてのみ動的顎位の方が小さくなった．これらの結果は，第 1 群において動的顎位で重心動揺が狭い範囲で小刻みに出現する傾向にあることを示しており，咀嚼運動が大きな重心のふらつきを減少させると考えられる．

上顎腫瘍切除後の被験者において，下顎運動は大幅な影響を受けておらず咀嚼運動においても健常者と類似した過程を示したと考えられる．また上顎無歯顎に対する顎補綴装置は，解剖学的アンダーカットの利用によって十分に維持させられる症例も多い．今回の研究結果より，上顎欠損に対する顎補綴装置装着患者において，過去の健常者における報告と同様に咀嚼運動が大きな重心動揺を減少させる影響があることが示された．

一方第 2 群 6 人のうち，重心動揺外周面積は 3 人，左右方向最大振幅は 2 人，前後方向最大振幅は 4 人，総軌跡長は 3 人の被験者で，動的顎位において静的顎位より小さくなった．いずれの項目においても有意差は認められず，一定の傾向はみられなかった．第 2 群においては，腫瘍切除に伴って下顎骨，筋肉，神経の切除が行われており，下顎の運動方向や対称性に変化が生じていると考えられる．開閉口運動の範囲や方向が被験者の間で多様に変化したため，咀嚼運動が重心動揺に与える影響も様々であったと考えられた．さらに下顎無歯顎に顎補綴装置を装着している患者では，装置の維持が難しいためガム咀嚼に大きな顎の動きを必要とする症例がみられた．顎補綴装置の維持安定は咀嚼運動の安定に影響を及ぼす．安定が得にくい症例では，頭部動揺を大きくすることによって咀嚼運動の力を補うことが考えられ，それに伴って重心動揺が大きくなることが示唆された．今回の研究では，顎補綴装置装着患者を上顎装着群と下顎装着群の 2 群に分け，それぞれの群においてガム咀嚼の重心動揺への影響を調査した．ガム咀嚼の影響は 2 つの群の間で異なっており，そのことから上顎顎補綴装置装着患者と下顎顎補綴装置装着患者で咀嚼運動のメカニズムが異なる可能性が示唆された．よって頭頸部腫瘍術後患者の機能評価を行う際は，上顎欠損患者と下顎欠損患者を区別して行うべきと考えられる．顎義歯装着患者において咀嚼運動による重心動揺への影響をさらに調査するためには，被験者を増やし，欠損範囲や腫瘍切除術式，咀嚼機能などの項目によってもグループ分けを行って分析する必要がある．研究を進めていくことで，咀嚼運動と重心動揺の関連について新たな発見につながることが期待できる．

＜結論＞

上顎無歯顎に顎補綴装置を装着している患者において，ガム咀嚼運動時に重心動揺外周面積の減少を認めたが，下顎無歯顎に顎補綴装置を装着している患者においては認められなかった．咀嚼運動が重心動揺に与える影響は，上顎に顎補綴装置を装着している患者と下顎に顎補綴装置を装着している患者で異なることが示唆された．

論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲 第　5239　号	金崎　彩子
論文審査担当者	主 査　　水口　俊介 副 査　　泰羅　雅登，上野　俊明	
論 文 題 目	Effect of Chewing on Body Sway in Patients Wearing Dento-Maxillary Prosthesis after Head and Neck Tumor Resection	

（論文審査の要旨）

頭頸部腫瘍切除後の患者の口腔機能については過去に多くの報告があるが，口腔状態と身体機能との関連を評価した研究はほとんどみられない．一方健常者においては，口腔状態と身体機能の関連について多くの研究がされており，とくに身体のバランス機能について，咬合回復やガム咀嚼が身体バランス保持に寄与すると報告されている．身体バランス機能は体の健康状態にも関係し，とくに高齢者の身体バランス低下は転倒などから骨折や寝たきりの状態を生み出すことにつながると考えられる．

本研究では，これまで報告のない頭頸部腫瘍切除後の顎補綴装置装着患者における口腔状態と，身体バランス機能の指標である重心動揺の関連に着目した．健常者において身体バランス保持に働くとの報告があるガム咀嚼運動が，顎補綴装置装着者の重心動揺に与える影響について検討しているが，その着眼は，臨床上の補綴装置装着による全身への影響を調べる上で役立つと考えられ，高く評価される．

被験者は頭頸部腫瘍切除後に顎補綴装置を装着している患者 17 名とし，上顎切除および上顎に顎補綴装置を装着している患者 11 名と，下顎切除および下顎に顎補綴装置を装着している患者 6 名の 2 群に分けた．静的顎位(顎補綴装置によって習慣性咬合位を保持している状態)と，動的顎位(顎補綴装置を装着しガム咀嚼を行っている状態)の 2 状態において，閉眼立位時重心動揺を平衡機能計測装置にて測定した．重心動揺の外周面積(mm^2) ，左右方向最大振幅(mm)，前後方向最大振幅(mm)，総軌跡長(mm)を算出し，2 つの顎位における数値をウィルコクソンの符号順位検定を用いて各群それぞれに比較した．被験者の選別は，年齢，手術部位，残存歯の状態について考慮されており，重心動揺の計測は日本めまい平衡医学会の計測基準に準じて適切に行われた．

本研究で得られた結果は以下のとおりである．

1．上顎切除および上顎に顎補綴装置を装着している患者群において，ガム咀嚼運動時に重心動揺外周面積が有意に小さくなった．

2．下顎切除および下顎に顎補綴装置を装着している患者群においては，2 つの顎位の間で有意差を生じず，ガム咀嚼運動が重心動揺へ与える影響は下顎切除患者ごとに様々であった．

以上の結果より，上顎切除患者では健常者における過去の報告と同様に，ガム咀嚼運動が身体バランス保持にはたらくことが示された一方で，下顎切除患者ではガム咀嚼運動が身体バランスに与える影響は健常者や上顎切除患者と異なる可能性が示唆された．

本研究は頭頸部腫瘍切除後の患者において，身体バランス機能の評価を行った新規性が高い研究であり，上顎切除患者と下顎切除患者でガム咀嚼運動の重心動揺に与える影響が異なることを明らかにした．口腔状態が全身の機能に与える影響を解明していくことは歯科医学にとって有用であり，本研究は今後の歯科医学，医療，歯科補綴臨床の進歩に寄与すると考えられる．よって，本論文は博士(歯学)の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	林　婉婷
論文審査担当者	主査　渡部 徹郎 副査　春日井 昇平　　青木 和広
論　文　題　目	Profilin Expression is Regulated by Bone Morphogenetic Protein (BMP) in Osteoblastic Cells

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

細胞骨格の活動を制御する Profilin1(Pfn1)は、細胞遊走の制御に重要とされる分子であるが、骨芽細胞における役割は十分明らかにされていない。骨芽細胞の分化等に関与する多機能性サイトカインである骨形成タンパク質(BMP)は、骨折治癒などで生理的骨形成に必須の役割を担う。様々な分子が BMP シグナルを調節することが知られているが、骨芽細胞における BMP の作用の制御機構の全容は未だ明らかではない。そこで本研究は骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 における *Pfn1* の発現を解析し、BMP 誘導性骨芽細胞分化におけるその役割を検討した。*Pfn1* は MC3T3-E1 に恒常的に発現し、その発現レベルは培養経過に伴ってアルカリホスファターゼ(*Alp*)の上昇とは対照的に減少したことから、骨芽細胞分化が *Pfn1* 発現を下方制御すると考えられた。そこで MC3T3-E1 における骨芽細胞分化の影響を検討するために BMP 存在下で培養すると、BMP は *Pfn1* の発現を抑制した。その抑制作用は時間依存性を示し、長期培養によりその作用はさらに顕著にみられた。MC3T3-E1 の *Pfn1* をノックダウン(KD)すると、BMP が誘導する ALP 活性の上昇が促進され、その効果の少なくとも一部は *Alp* の発現レベルの上昇促進によることが明らかにされた。BMP が誘導する BRE-ルシフェラーゼ・コンストラクトのレポーター活性の上昇も *Pfn1*-KD により促進された。以上の結果より、*Pfn1* は BMP の新たな標的であると同時に、BMP 誘導性分化を少なくとも転写過程の制御によって抑制することが示された。

＜緒言＞

超高齢社会をすでに迎えた我が国において高齢者の運動及び歩行能力の低下は大きな社会問題である。高齢者は身体機能の低下に伴い、骨格組織への力学的負荷が減少し、「廃用性骨粗鬆症」の病態を呈することがきわめて多い。「廃用性骨粗鬆症」の病態発生のメカニズムには骨芽細胞による骨形成の抑制と、破骨細胞による骨吸収の促進が同時に生じる機構が関与する。骨形成の抑制については骨芽細胞の遊走性制御が重要な役割を果すことが明らかにされたことより、細胞骨格制御の重要性が示唆されるが、その詳細は十分には解明されていない。

細胞骨格の制御には Profilin による線維性アクチン再構築制御が重要である。Profilin は線虫から哺乳類まで機能的に保存された、生命維持に関わる基本的分子であるが、哺乳類では Profilin と命名された蛋白質(アイソフォーム)が 4 種類(Pfn1 - Pfn4)存在して、それぞれ異なる遺伝子にコ

ードされる。しかし、骨系前駆細胞および骨芽細胞に注目するならば、その発現は *Pfn1* にほぼ限定される。

骨形成は機械的刺激に対する骨芽細胞の応答を基盤として制御され、機械的刺激の減少は骨芽細胞による骨形成を低下させるが、その過程に非コラーゲン性骨基質タンパク質のオステオポンチン(OPN)の存在が必要とされることが知られている。オステオポンチンは骨基質への細胞接着に重要とされるが、細胞骨格と骨芽細胞機能の関連性に関する報告は未だ少ない。

適切な力学的刺激の保たれた環境における骨形成過程では、骨芽細胞の増殖・遊走と分化が進行するが、骨芽細胞の分化・遊走の制御は BMP によっても修飾される。したがって力学的負荷に伴う細胞骨格制御は BMP によっても修飾される可能性が推定されるが、その関係は未だ解明されていない。そこで、本研究において我々は、骨芽細胞における *Pfn1* の発現に対する BMP の役割について検討した。

＜方法＞

細胞培養：骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を培養した。使用した培地は 10%ウシ胎仔血清を添加したミニマム・エッセンシャル培地 α (α-MEM)であり、37℃, 5%CO_2 の条件下で、1 週間に 2 回培地交換した。BMP の影響を検討するため、ヒト組み換え BMP2 を使用した。

リアルタイム定量 PCR : 培養細胞から抽出した RNA から cDNA を調整して定量的 PCR 法による遺伝子発現解析を行った。RNA 抽出には TRIzol 試薬を用い、逆転写キット(ABI)を用て cDNA を調整した。リアルタイム定量 PCR には StepOne TM システムを用い、全データは GAPDH で標準化した。

遺伝子導入 : 細胞密度 10,000 cells/cm^2 で播種した MC3T3-E1 に対して、24 時間後に Control siRNA または *Pfn1* siRNA を一過性に遺伝子導入（トランスフェクト）し、上記条件で最長 96 時間まで培養した。遺伝子導入には RNAi MAX を用いた。

アルカリホスファターゼ（ALP）アッセイ：PNPP 法に基づき ALP 活性を解析した。PBS で細胞を 2 回洗浄後、ライセートバッファー(10mM Tris-HCL, 2mM MgCl2, 0.05％Triton X-100; pH8.2)に溶解し、凍結（-28℃）・融解後、上清を用いて分光光度計で ALP 活性を測定し、総タンパク質量で標準化した値を評価した。

ルシフェラーゼアッセイ : 細胞密度 10,000 cells/cm^2 で播種した MC3T3-E1 について、24 時間後に Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて BMP 応答性ルシフェラーゼレポータープラスミド(BRE-luc)を遺伝子導入し、24 時間後に BMP2(100ng/ml)を添加した。BMP2 添加から 12 時間後にレポーター活性を Lumat LB9507 (Berthold)を用いて測定した。全データはウミシイタケルシフェラーゼレポーター活性で標準化した。

統計解析 : データは平均値および標準誤差で示し、群間の差を Student の t 検定に基づき解析した。2 元配置の分散分析により交絡を評価した。危険率５％未満を統計学的有意水準とした。

＜結果＞

1) *Pfn1* と骨芽細胞分化

Pfn1 mRNA の骨芽細胞における発現を MC3T3-E1 で調べ、その恒常的発現が培養開始から 72

時間まで緩やかに減少することを明らかにした。このような継時的変化は、培養経過に従って *Alp* の発現が増加することとは対照的であり、骨芽細胞分化が *Pfn1* 発現を下方制御した可能性を示唆すると考えられた。そこで、さらに骨芽細胞分化の誘導因子として BMP2 を培地に添加して、その影響を検討すると、同様に *Pfn1* 発現の抑制がみられた。すなわち、上記の 2 つの実験系から、骨芽細胞分化を誘導する過程で *Pfn1* が下方制御されることが示された。

2) *Pfn1* 発現抑制は BMP 誘導性 ALP 活性上昇を促進する

骨芽細胞分化に伴う *Pfn1* の発現抑制の生物学的意義を解明するため、*Pfn1* を siRNA でノックダウン(KD)した。至適 siRNA 濃度は 5nM と判定され、60–80%の *Pfn1*-KD 効率が 96 時間後まで持続することが確認された。本条件下で *Pfn1*-KD は、BMP 誘導性 ALP 活性上昇を促進し、培養液中の血清濃度に依存してその効果は増強した。したがって *Pfn1* は BMP によって発現制御されると同時に、BMP による骨芽細胞分化促進機能を制御する働きをもつことが示唆された。

Pfn1-KD による BMP 誘導性 ALP 活性上昇の促進は、BMP を高濃度で負荷すれば閾値に達して被覆される可能性も考えられたが、BMP 濃度を 200ng/ml まで増加させても *Pfn1*-KD による促進効果は消失しなかった。興味深いことに BMP 無添加の条件下でも *Pfn1*-KD は MC3T3-E1 の ALP 活性を促進した。BMP 負荷と *Pfn1*-KD による効果の間には統計学的に有意な交絡が認められ、異なる分子機構により ALP 活性を上昇させる可能性が示唆された。

MC3T3-E1 の ALP 活性は培養経過に従い増加することから、*Pfn1*-KD による ALP 活性への促進効果は長期培養により消失する可能性も想定された。しかし BMP 処理から 72 時間経過後における高い ALP 活性についても *Pfn1*-KD はさらに促進した。したがって *Pfn1*-KD が BMP 誘導性の ALP 活性上昇を促進する効果は培養経過に伴う分化進行とは異なる経路に基づく可能性が示唆された。

3) *Pfn1* 発現抑制は BMP 誘導性 *Alp* mRNA 発現上昇を促進する

上記のような *Pfn1*-KD による骨芽細胞における ALP 活性上昇の促進効果が、*Alp* 遺伝子の発現促進に基づく可能性を定量的 RT-PCR 解析で検証したところ、BMP が *Alp* mRNA 発現を増加させる効果は、*Pfn1*-KD によってさらに促進されることが確認された。

4) *Pfn1* 発現抑制は BMP 誘導性 BRE-Luc 転写活性上昇を促進する

上記のような *Pfn1*-KD による骨芽細胞における *Alp* 発現上昇の促進効果が、BMP 応答性配列を介した転写活性化に基づく可能性を BRE-Luc コンストラクトのトランスフェクト実験系で検証したところ、*Pfn1*-KD は BMP 誘導によるルシフェラーゼ転写活性の上昇を促進することが確認された。

＜考察＞

本研究は、*Pfn1* が骨芽細胞で恒常的に発現し、その発現変化が骨芽細胞分化と連動することを明らにした。また BMP が *Pfn1* の遺伝子発現を抑制した一方、*Pfn1* 抑制は MC3T3-E1 における BMP 誘導性 ALP 活性の上昇を促進したことより、*Pfn1* が BMP を制御する新たな負の調節因子である可能性を本研究は示した。多くの場合、BMP は自身に対する阻害分子の発現を促進し、負のフィードバックループを形成することより骨芽細胞分化における恒常性の維持に貢献する。これとは対照的に、BMP は *Pfn1* の発現を抑制し、相乗的な正のフィードバックを形成することによ

りその作用を最適化するような構図が考えられる。

骨芽細胞における遺伝子発現解析では *Pfn1*-KD が BMP による *Alp* 発現の上昇、更に BRE-ルシフェラーゼ・コンストラクトの転写活性の上昇を促進した。このような *Pfn1* による発現制御への影響の少なくとも一部は、Smad 依存性シグナル伝達経路を介した BMP シグナル伝達による可能性が示唆された。今後、BMP 誘導性の転写制御における *Pfn1* の具体的役割を詳細に解明する必要があると思われる。

Pfn1-KD が I 型コラーゲンを産生する骨芽細胞における BMP 誘導性分化を促進することより、細胞-マトリックス相互作用および BMP シグナル伝達経路との間に関連が存在し得ることが示唆された。

なお *Pfn1* は増殖および分化など重要な細胞機能の制御に寄与するアクチン線維の再構成を制御するキープレーヤーであり、胃癌で *Pfn1* 低発現がインテグリン β1 の発現を減少させ、*FAK* の伝える信号の伝達を阻害することが報告されている。もし骨芽細胞における信号伝達が、他の細胞系と類似するのであれば、*Pfn1* は、*FAK* と下流の信号を接続する役割を果たす可能性も考えられる。

＜結論＞

本研究は Pfn1-BMP 間に形成される正のフィードバックを解明した。この分子シグナル制御を行う新規フィードバック機構は、骨芽細胞分化恒常性を維持する BMP 制御システムの一つとして機能すると考えられた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5240　号	林　婉婷
論文審査担当者	主　査　渡部 徹郎 副　査　春日井 昇平　　青木 和広	
論 文 題 目	Profilin Expression is Regulated by Bone Morphogenetic Protein (BMP) in Osteoblastic Cells	

（論文審査の要旨）

高齢社会をすでに迎えた我が国において高齢者の運動及び歩行能力の低下は大きな社会問題である。高齢者は身体機能の低下に伴い、骨格組織への力学的負荷が減少し、「廃用性骨粗鬆症」の病態を呈することがきわめて多い。「廃用性骨粗鬆症」の病態発生のメカニズムには骨芽細胞による骨形成の抑制と、破骨細胞による骨吸収の促進が同時に生じる機構が関与する。骨形成の抑制については骨芽細胞の遊走性制御が重要な役割を果すことが明らかにされたことより、細胞骨格制御の重要性が示唆されるが、その詳細は十分には解明されていない。申請者は骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 における細胞骨格制御因子の Profilin1(Pfn1)の発現を解析し、BMP 誘導性骨芽細胞分化におけるその役割を in vitro で解析した。

実験では骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いて、培養条件として、10%ウシ胎仔血清を添加したミニマム・エッセンシャル培地 α (α-MEM)を使用し、37℃, 5%CO_2 の環境下で、1 週間に 2 回培地交換した。BMP の影響を検討するため、ヒトリコンビナント BMP2 を使用した。

遺伝子発現を解析するため、培養細胞から TRIzol 試薬で抽出した RNA から、逆転写キット(ABI)を用いて cDNA を調整し、定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った。定量的 RT-PCR には StepOne TM システムを用い、全データは GAPDH で標準化した。

細胞における *Pfn1* 遺伝子の発現を抑制するため、細胞密度 10,000 cells/cm^2 で播種した MC3T3-E1 に対して、24 時間後に RNAi MAX を用いて Control siRNA または *Pfn1* siRNA を一過性に遺伝子導入（トランスフェクト）し、上記条件で最長 96 時間まで培養した。

骨芽細胞の分化を評価するため、PNPP 法に基づいたアルカリホスファターゼ（ALP）アッセイを解析した。PBS で細胞を 2 回洗浄後、ライセートバッファー(10mM Tris-HCL, 2mM MgCl2, 0.05% Triton X-100; pH8.2)に溶解し、凍結（-28℃）・融解後、上清を用いて分光光度計で ALP 活性を測定し、総タンパク質量で標準化した値を評価した。

BMP 応答性制御の直接性を評価するため、BMP‐response element ルシフェラーゼアッセイを解析した。細胞密度 10,000 cells/cm^2 で播種した MC3T3-E1 について、24 時間後に Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて BMP 応答性ルシフェラーゼレポータープラスミド(BRE-luc)を遺伝子導入し、24 時間後に BMP2(100ng/ml)を添加した。BMP2 添加から 24 時間にレポーター活性を Lumat LB9507 (Berthold)を用いて測定した。全データはウミシイタケルシフェラーゼレポーター活性で標準化した。

これらの実験は、いずれも研究目的に対して適正に計画されたと考える。

以上の実験結果として、以下の知見を得ている。

第一に、Pfn1 の発現は骨芽細胞分化過程で下方制御される。

Pfn1 は骨芽細胞で恒常的に発現し、その発現レベルに関しては 72 時間の培養期間中に緩やかな下方制御が見られた。骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 は培養時間に従い分化することが知られている。また、Pfn1 発現レベルの経時的変化は骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼとは相反的な傾向を示したことから、Pfn1 の発現量は骨芽細胞の分化過程で下方調節されていることを示唆された。そこで、さらに骨芽細胞分化の誘導因子として BMP2 を培地に添加して、その影響を検討したところ、Pfn1 発現の抑制がみられた。すなわち、上記の 2 つの実験系から、骨芽細胞分化を誘導する過程で Pfn1 が下方制御されることが示された。

第二に、Pfn1 発現抑制は BMP 誘導性 ALP 活性上昇を促進する。

骨芽細胞分化に伴う Pfn1 の発現抑制の生物学的意義を解明するため、Pfn1 を siRNA でノックダウン(KD)した。至適 siRNA 濃度は 5nM と判定し、60–80%の Pfn1-KD 効率が 96 時間後まで持続することが確認された。本条件下で Pfn1-KD は、BMP 誘導性 ALP 活性上昇を促進し、培養液中の血清濃度に依存してその効果は増強された。したがって Pfn1 は BMP による骨芽細胞分化促進機能を制御する働きをもつことが示唆された。

Pfn1-KD による BMP 誘導性 ALP 活性上昇の促進は、BMP を高濃度で負荷すれば閾値に達して被覆される可能性も考えられたが、BMP 濃度を 200ng/ml まで増加させても Pfn1-KD による促進効果は消失しなかった。興味深いことに BMP 無添加の条件下でも Pfn1-KD は MC3T3-E1 の ALP 活性を促進した。BMP 負荷と Pfn1-KD による効果の間には統計学的に有意な交絡が認められ、異なる分子機構により ALP 活性を上昇させる可能性が示唆された。

MC3T3-E1 の ALP 活性は培養経過に従い増加することから、Pfn1-KD による ALP 活性への促進効果は長期培養により消失する可能性も想定された。しかし BMP 処理から 72 時間経過後における高い ALP 活性についても Pfn1-KD はさらに促進した。したがって Pfn1-KD が BMP 誘導性の ALP 活性上昇を促進する効果は培養経過に伴う分化進行とは異なる経路に基づく可能性が示唆された。

第三に、Pfn1 発現抑制は BMP 誘導性 Alp mRNA 発現上昇を促進する

上記のような Pfn1-KD による骨芽細胞における ALP 活性上昇の促進効果が、Alp 遺伝子の発現促進に基づく可能性を定量的 RT-PCR 解析で検証したところ、BMP が Alp mRNA 発現を増加させる効果は、Pfn1-KD によってさらに促進されることが確認された。

第四に、Pfn1 発現抑制は BMP 誘導性 BRE-Luc 転写活性上昇を促進する

上記のような Pfn1-KD による骨芽細胞における Alp 発現上昇の促進効果が、BMP 応答性配列を介した転写活性化に基づく可能性を BRE-Luc コンストラクトのトランスフェクト実験系で検証したところ、Pfn1-KD は BMP 誘導によるルシフェラーゼ転写活性の上昇を促進することが確認された。

以上のように、申請者は骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 における細胞骨格制御因子 Pfn1 の発現レベル及び BMP 制御との関連性を解析することで、Pfn1-BMP 間に形成される正のフィードバックを解明した。この分子シグナル制御を行う新規フィードバック機構は、骨芽細胞分化恒常性を維持する BMP 制御システムの一つとして機能すると考えられたことである。よって、本知見は、

骨芽細胞における Pfn1 の機能を解明するための一助となり、今後の医学の発展に貢献するものと考えられる。

以上、本研究の着眼点と研究手法およびその成果は高く評価され、基礎および臨床医学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	松川　京司
論文審査担当者	主査　若林　則幸 副査　宇尾　基弘　　二階堂　徹
論　文　題　目	The influence of the framework thickness on the surface strain of the 3-unit Zirconia Resin-bonded fixed dental prostheses under the functional loading

（論文の内容の要旨）

本研究はセリア安定化ジルコニア/アルミナナノ複合体（Ce-TZP/Al）を用いて，種々のデザインの接着ブリッジフレームを作製し，荷重時の表面歪みを計測して，比較，検討し，接着ブリッジのフレーム形態を最適化することを目的として行った．

上顎左側側切歯１歯欠損の３ユニットブリッジを想定して,従来用いられている金銀パラジウム合金フレーム（0.8 ㎜厚）に加えイットリア部分安定化ジルコニア(Y-TZP)フレーム（0.8 ㎜厚,0.5 ㎜厚）,Ce-TZP/Al フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）を作製し,ロゼッタゲージを用いて,荷重時のそれぞれの表面歪みを比較検討した.

ポンティック中央部に前歯部最大咬合力を想定した 200N を荷重した際の表面歪を測定したところ,Ce-TZP/Al フレームは，金銀パラジウム合金を用いて作製した接着ブリッジの歪みと同程度の歪み量を示したことから接着ブリッジのフレームを設計する際に，0.3mm 厚で作製可能であり，この材料の優れた機械的特性や耐低温劣化特性から，口腔内で長期的な予後を改善できる材料であることが示唆された.

＜緒言＞

前歯部 1 歯欠損症例に対して補綴歯科治療を行う際に固定性義歯は違和感が少なく,機能的,審美的な回復を再現出来るため広く臨床に用いられている．その中でも形成を原則としてエナメル質内にとどめ,健全歯質を可及的に保存する接着ブリッジは,ミニマルインターベンションの観点からも,広く普及し始めている.

イットリア部分安定化ジルコニア(Y-TZP)は，物理的強度や審美性に優れ，金属アレルギーを惹起しないことから，その臨床応用が拡大している．また，支台歯のスキャン精度や，デザイン，ミリング精度向上から，接着ブリッジのフレームの作製が可能となってきた．そこで我々は，Y-TZP の接着ブリッジの臨床応用に向けて，歪みゲージを用いた Y-TZP の歪み測定を行い，その優れた応力緩和を報告してきた.

しかしながら，Y-TZP は口腔内においてジルコニアの酸素空孔への OH^-イオンの侵入や，加水分解により，結晶構造が正方晶から単斜晶に変化し，物理的強度が減弱する低温劣化という現象が生じるため，Y-TZP の口腔内環境での物性低下にやや懸念が持たれている．一方,セリア安定化ジルコニア/アルミナナノ複合体（Ce-TZP/Al）は,ZrO_2 の安定化剤として CeO_2 を用いることにより，酸素空孔を排除し，Y-TZP と比較し低温劣化に対する耐性が飛躍的に向上している.

以上より，Ce-TZP/Al は Y-TZP と比較し,低温劣化を起こさず,口腔内環境下における長期安定性に優れている．また,破壊靭性値が Y-TZP と比較して約 2～3 倍であり,以前の報告からクラウンフレームワークとして Ce-TZP/Al を用いた場合，従来のクラウンフレームよりも薄い 0.3mm のフレー

ム厚みでも臨床使用可能な十分な強度を有していることが示唆されていることから，Ce-TZP/Al 材料の接着ブリッジフレームへの応用が期待されている．そこで我々は，Ce-TZP/Al 材料を用いて，種々のデザインの接着ブリッジフレームを作製し，その表面歪みを計測することで，接着ブリッジのフレーム形態を最適化することを目的として本研究を行った.

＜材料と方法＞

ヒト乾燥有歯上顎骨の左側中切歯から犬歯まで歯槽骨を含めて micro focus X-ray CT System（inspeXio SMX-1000CT, Shimazu Co.,LTD,）にて撮影し，得た DICOM データから側切歯部位を取り除き,STL データに変換し,各歯根を取り外しが可能な模型を 3D プリンターにて作製した.

得られた模型上で中切歯,犬歯に対し,フィニッシュラインの形態はシャンファーとし,基底結節部に直径 1mm,深さ 0.5mm の維持孔,隣接部に長さ 2mm,深さ 0.5mm のグルーブ形成を行った.

支台歯形成した模型を印象採得し，クリアフィル DC コア オートミックス ONE(Kuraray Noritake Dental Inc.)にて複製した複製模型にあわせて,金銀パラジウム合金(Castwell M.C.12%Gold,GC Co)フレーム（0.8mm 厚）,Y-TZP フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）(C-Pro HTZR, Panasonic Healthcare Co.Ltd),Ce-TZP/Al フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）(C-Pro NANOZR, Panasonic Healthcare Co.Ltd)をそれぞれ 5 個ずつ作製した．フレーム内面にアルミナサンドブラスト処理を行った後，表面処理し,PanviaF2.0(Kuraray Noritake Dental Inc.)を用いて金属歯型に接着した後,歯根膜を想定したシリコーン印象材(Correct Plus Bite, Pentron Co.)を歯根周囲に付与し支台歯を包埋した.包埋後,ロゼッタゲージ（KFG-1-120-D17-11N30C2,共和電業）を専用接着材 CC33A を用いて,ブリッジフレームの中切歯および犬歯舌側面に 1 枚ずつ貼付し,室温にて 24 時間放置した.

ポンティック中央部に斜め 45 度の方向から万能試験機(Autograph AGS-H, Shimadzu Co.,Ltd)を用いて,前歯部最大咬合力を想定した 200N の荷重を加え,その際の歪み量を測定し,最大主歪みを算出した．得られた歪み量は各グループ間にて,二元配置分散分析後,t 検定にて有意水準５％をボンフェローニ調整し,検定を行った.

＜結果＞

犬歯におけるメタルフレーム（0.8mm 厚）,Y-TZP フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）,Ce-TZP/Al フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）の最大主歪みは,それぞれ 261.6±55.1με, 141.5±40.7με, 205.5±83.0με, 180.7±41.6με, 202.5±50.5με, 216.8±35.2με であった.0.8mm 厚 Y-TZP フレームは,0.8mm 厚メタルフレームよりも優位に小さな歪み量を示した．又,0.3mm 厚 Ce-TZP/Al フレーム,0.5mm 厚 Y-TZP フレーム,0.8mm 厚メタルフレーム間には優位な差は認められなかった（$P<0.05$）.

中切歯におけるメタルフレーム（0.8mm 厚）,Y-TZP フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）,Ce-TZP/Al フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）の最大主歪みは,それぞれ 52.8±45.3με, 44.1±42.8με, 33.8±64.4με, 55.7±35.7με, 0.1±39.8με,－21.7±70.8με であった.すべての群間内に優位な差は認められなかった.

犬歯,中切歯において,すべての群間で犬歯の歪み量の方が中切歯の歪み量よりも優位に大きな値を示した（$P<0.05$）.

＜考察＞

静荷重下でのフレームの変形は有限要素法（FEM）や光弾性法,歪みゲージ法を用いて解析されてきた.歪みゲージ法は,生体内における補綴装置の応力と歪みみを直接,測定することが可能であることから,実際に作製された補綴装置の機能時の変形を評価することが可能である.我々は以前,歪みゲ

ージを用いて,in vitro および in vivo でのクラウンとブリッジの表面歪みみを検討しところ,in vivo および in vitro の実験モデルの間にフレームの変形の様相に変化がないことを報告した.そこで,本研究では,ヒト乾燥頭蓋骨の CT データから作製した実際の口腔内に近い,in vitro の実験モデルを用いて,歪みゲージ法によりフレームの歪みみを測定し,フレームデザインがフレームの剛性に与える影響について検討した.

荷重条件として,臨床においてはポンティックと支台歯部にバランスよく咬合力がかかるように設定するのが一般的であるが,今回の実験モデルでは実際の口腔内で想定されうる過酷な条件下での解析を行うため,ポンティック中央部に前歯部最大咬合力を想定した 200N を荷重することとした.

表面歪みの測定結果より,Y-TZP を用いたジルコニアフレーム（0.8Y）は金銀パラジウム合金を用いて作製したフレーム（0.8M）よりも優位に歪み量が抑制された以前の報告と同様に今回の結果からも Y-TZP は金銀パラジウム合金に代わる材料であることが示唆された.

今回の結果において,すべての群で犬歯のフレームの方が中切歯のフレームよりも大きな歪み量を示した.フレームの歪みはモーメント,弾性係数,断面係数によって決定される.今回口腔内をより正確に再現するためヒト乾燥有歯顎骨の CT データからモデルを作製したが犬歯が少々捻転しており,ポンティック部に荷重を加えた際にモーメントを生じやすいこと,このモデルでは接着面積が中切歯（103mm^2）の方が犬歯（75mm^2）よりも広いことからこのような結果が生じたのではないかと考えられた.

ガイド等の関係で犬歯のフレーム接着面積が確保できないケースにおいては過去の報告からグルーブ,ホール等の補助的維持装置は表面積,機械的嵌合力を向上させることにより前歯部接着ブリッジの長期予後を向上させる,フレームワークの強度を向上させるとの報告があることから,補助的維持装置の付与が望ましいと考えられる.

Ce-TZP/Al を用いた 0.3mm 厚ジルコニアフレーム（0.3C）は Y-TZP を用いた 0.5mm 厚ジルコニアフレーム（0.5Y）とほぼ同程度の歪み量を示した.

Ce-TZP/Al を用いたジルコニアフレームはセリア安定型正方晶ジルコニア多結晶体にナノサイズのアルミナを結晶に組み込むことにより物性の改善がなされ，破壊靭性値は 18 MPa・m$^{1/2}$ であり,Y-TZP の 6～10 MPa・m$^{1/2}$ と比較してきわめて高い値を呈する.また曲げ強度に関しても 1500 MPa と Y-TZP と同等以上を示すことから，今回このような結果を示したと考えられる.

以前の報告から Y-TZP をフレーム材料として用いることでフレーム厚みを従来のメタルフレームよりも薄く(0.5 mm 厚)できることが示唆されているが，今回の結果より 0.3C が 0.5Y とほぼ同程度の歪み量を示し,また従来用いられている 0.8mm 厚の金銀パラジウム合金フレームと優位な差は認めなかったことから,フレーム材料として Ce-TZP/Al を用いることでより歯質切削量を抑えることができ,適応症例の増加,形成時の象牙質露出等のリスクを回避することが可能になると考えられた.

Ce-TZP/Al では低温劣化が生じないことが報告されており,Y-TZP よりも口腔内等の湿潤環境下で相変態による低温劣化により物性が低下を生じないため安全面でも有用であると考えられた.

＜結論＞

本実験結果より,フレーム材料として Ce-TZP/Al を用いることができる可能性,Ce-TZP/Al を用いることでより歯質切削量を抑えることができ,適応症例の増加,形成時の象牙質露出等のリスクを回避することができることから,歯質の薄い日本人にはきわめて有用な治療方法であると考えられた.

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲第　5241　号	松川　京司
論文審査担当者	主査　若林　則幸 副査　宇尾　基弘　　二階堂　徹	
論文題目	The influence of the framework thickness on the surface strain of the 3-unit Zirconia Resin-bonded fixed dental prostheses under the functional loading	

（論文審査の要旨）

前歯部の１歯欠損症例に対して補綴歯科治療を行う際に，固定性義歯は違和感が少なく，機能的，審美的な回復を実現できるため，広く臨床に用いられている．中でも，形成を原則としてエナメル質内にとどめ，健全歯質を可及的に保存する接着ブリッジは，ミニマムインターベンションの観点からも，広く普及し始めている．

しかしながら，十分なフレームの剛性を得るためには，フレームの厚さを 0.7～0.8mm 確保する必要があるが，日本人のエナメル質の厚さが平均 0.6mm であることから，支台歯形成中に象牙質が露出する可能性が大きく，接着ブリッジの適用はごく限られているのが現状である．

従来，高弾性材料として，コバルトクロム合金や金銀パラジウム合金が広く臨床応用されているが，審美性や生体安全性から適応症例が限られるため，コバルトクロム合金の弾性係数とほぼ同程度の弾性係数を有し，高審美性で生体不活性なイットリア安定型正方晶ジルコニア多結晶体（Y-TZP ）の接着ブリッジフレームへの臨床応用が検討されている．しかしながら，Y-TZP は口腔内においてジルコニアの酸素空孔への OH^-イオンの侵入や，加水分解により結晶構造が正方晶から単斜晶に変化し，物理的強度が減弱する低温劣化という現象にやや懸念が持たれていることから，Y-TZP を口腔内に露出することは好ましくないとの報告もある．一方,セリア安定化ジルコニア/アルミナナノ複合体（Ce-TZP/Al）は,ZrO_2 の安定化剤として CeO_2 を用いることにより， Y-TZP と比較して低温劣化に対する耐性が飛躍的に向上している．

本研究は Ce-TZP/Al 材料を用いて，種々のデザインの接着ブリッジフレームを作製し，その表面歪みを計測し，比較，検討することで，最適な接着ブリッジのフレーム形態を明らかにするもので，この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる．

本実験モデルとして，ヒト乾燥有歯上顎骨の左側中切歯から犬歯まで歯槽骨を含めて micro focus X-ray CT System にて撮影し，得た DICOM データから側切歯部位を取り除き,STL データに変換後,各歯根を取り外しが可能な模型を 3D プリンターにて作製している．得られた模型上で中切歯,犬歯に対し,フィニッシュラインの形態はシャンファーとし,基底結節部に直径 1.0mm,深さ 0.5mm の維持孔,隣接部に長さ 2.0mm,深さ 0.5mm のグルーブ形成を行い,印象採得し,複製した模型にあわせて,金銀パラジウム合金フレーム（0.8mm 厚）,Y-TZP フレ

ーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）,Ce-TZP/Al フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）をそれぞれ 5 個ずつ作製している．フレーム内面にアルミナサンドブラスト処理を行った後，表面処理し,接着性レジンセメントを用いて金属歯型に接着した後,歯根膜を想定したシリコーン印象材を歯根周囲に付与し支台歯を包埋している.包埋後,ロゼッタゲージ（KFG-1-120-D17-11N30C2）を専用接着材 CC33A にて,ブリッジフレームの中切歯および犬歯舌側面に 1 枚ずつ貼付し,室温にて 24 時間放置した後，ポンテック中央部に斜め 45 度の方向から万能試験機を用いて,前歯部最大咬合力を想定した 200N の荷重を加え,その際の歪み量を測定し,最大主歪みを算出している．得られた歪み量は各グループ間にて,二元配置分散分析後, t 検定にて有意水準 5%をボンフェローニ調整し,検定を行っている.

以上のように，本研究は，周到な実験計画に基づいて行われており，妥当な方法によるものといえる.

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである.

１．犬歯におけるメタルフレーム（0.8mm 厚）,Y-TZP フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）,Ce-TZP/Al フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）の最大主歪は,それぞれ 261.6±55.1με,141.5±40.7με,205.5±83.0με,180.7±41.6με,202.5±50.5με,216.8±35.2με であった. 0.8mm 厚 Y-TZP フレームは,0.8mm 厚メタルフレームよりも優位に小さな歪量を示した．また,0.3mm 厚 Ce-TZP/Al フレーム,0.5mm 厚 Y-TZP フレーム,0.8mm 厚メタルフレーム間には優位な差は認められなかった（$P<0.05$）.

２．中切歯におけるメタルフレーム（0.8mm 厚）,Y-TZP フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）,Ce-TZP/Al フレーム（0.8mm 厚,0.5mm 厚,0.3mm 厚）の最大主歪は,それぞれ 52.8±45.3με, 44.1±42.8με, 33.8±64.4με, 55.7±35.7με, 0.1±39.8με,－21.7±70.8με であった.すべての群間内に優位な差は認められなかった.

３．犬歯,中切歯において,すべての群間で犬歯の歪量の方が中切歯の歪量よりも優位に大きな値を示した（$p<0.05$）.

以上の研究結果から，フレーム材料として Ce-TZP/Al を用いることができる可能性,Ce-TZP/Al を用いることでより歯質切削量を抑えることができ,適応症例の増加,形成時の象牙質露出等のリスクを回避することができることから,歯質の薄い日本人にはきわめて有用な治療方法であると考えられた.

以上のように本研究は、セリア安定化ジルコニア/アルミナナノ複合体（Ce-TZP/Al）を用いた，最適な接着ブリッジフレームのデザインについて検討を加えたもので，得られた知見は，前歯部ブリッジの設計を考える上で極めて重要な意義をもち，歯科補綴延いては歯学全般の進歩，発展に寄与するところは大である．よって本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた.

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	及川　悠
論文審査担当者	主査　渡部　徹郎 副査　三木　義男　　鵜澤　成一
論　文　題　目	Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma

（論文内容の要旨）

〈緒言〉

近年のがんゲノム研究は、次世代シークエンサー（NGS）を用いた大規模がんゲノムプロジェクトによりがんゲノム異常の全体像が明らかとなってきた。このようながんゲノム解析データの蓄積と分子標的治療薬の開発により、がん治療は発生臓器や組織型、病期で決定されてきた治療法から遺伝子変異別の治療法へとシフトしつつある。

口腔がんは全世界で年間約 300,000 人が罹患し、治療技術の進歩にも関わらず、5 年生存率は 60%にとどまっている。頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）においても NGS を用いた網羅的な遺伝子変異解析が行われ、HNSCC におけるゲノム異常に関する多くの情報がもたらされた。しかし、ゲノム異常を基にした層別化による治療を推し進めていくためのエビデンスは乏しい。また、HNSCC に適応のある分子標的治療薬は EGFR の抗体薬であるセツキシマブのみで、他臓器で使用されている薬剤の drug repositioning が検討されるべきである。本研究は NGS を用いたターゲットリシークエンスにより OSCC の遺伝子変異を解析し臨床病理学的な情報との統合により OSCC の治療予測、予後予測に関わるゲノム要因を明らかにすることを目的とした。

〈対象と方法〉

対象は東京医科歯科大学顎口腔外科を 2001 年から 2015 年に受診し、OSCC と診断された 220 例とした。病変の gDNA は FFPE 組織より抽出し、臨床病理学的な情報は医療記録より収集した。なお、本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得ている(No. 1087)。

ライブラリー調製は、2800 以上の COSMIC 変異を含むがん関連 50 遺伝子のパネルである Thermo Fisher Scientific 社の Cancer Hotspot Panel v2 を用い、シークエンスは Ion Proton を用いて行った。データは Torrent Suite Software v4.2.191 および Ion Reporter Software v4.6 で解析を行い、体細胞変異（SM）のカットオフ値を変異アレル頻度 4.0%未満とした。また、本研究では病変に対応する正常組織のシークエンスを行っていないため、公共データベース（1000 genome project および 5000 exomes project）を利用して可能性のある生殖細胞変異を除外した。コピー数変異（CNA）は Biomedical Genomics Workbench 2.5 を用い、9 例の非癌組織をコントロールとし解析を行った。増幅および欠失の判定基準はコントロールに対する log2 ratio で、2 以上のものを増幅、－2 以下のものを欠失とした。

臨床病理学的な因子と遺伝子変異に関する比較はカイ二乗検定またはフィッシャー正確検定、予後と臨床病理学的または遺伝子変異に関する因子の単変量および多変量解析はCox比例ハザードモデルを、生存曲線はカプランマイヤー法を用いた。すべての統計計算は PASW Statistics, version 18 を用い、また SM に関する統計学的解析はすべて non-synonymous 変異を対象に行った。

〈結果〉

対象の 220 例は、男性 135 例、女性 85 例で、口腔亜部位は舌 123 例、歯肉 64 例、頬粘膜 21 例、口底 10 例、口蓋 2 例、病期分類は Stage I 53 例、Stage II 48 例、Stage III 33 例、Stage IV 86 例であった。

SM は 311 変異検出され、synonymous 変異が 68 変異、non-synonymous 変異が 243 変異であった。遺伝子別では、*TP53* が 79 例（35.9%）、*CDKN2A* が 35 例（15.9%）、*PIK3CA* が 19 例（8.6%）、*NOTCH1* が 9 例（4.1%）、*HRAS* が 4 例（1.8%）、*RB1* が 3 例（1.4%）などであった。

CNA については、欠失は *CDKN2A* が 25 例（11.4%）、*NOTCH1* が 8 例（3.6%）、*SMAD4* が 3 例（1.4%）などで認められ、増幅は *PIK3CA* が 38 例（17.3%）、*AKT1* が 11 例（5.0%）、*HRAS* が 8 例（3.6%）などであった。RTK の増幅は 37 例（16.8%）認められ、遺伝子別では *EGFR* が 17 例（7.7%）、*ERBB2* が 7 例（3.2%）、*FGFR1* が 7 例（3.2%）、*FGFR3* が 6 例（2.7%）、*ERBB4* が 3 例（1.4%）、*MET* が 3 例（1.4%）、*FLT3* が 2 例（0.9%）、*KIT* が 1 例（0.5%）、*PDGFRA* が 1 例（0.5%）であった。

RTK、*CDKN2A*、*PIK3CA* ではそれぞれの遺伝子で SM と CNA は排他的傾向を認め、遺伝子間では、*CDKN2A* の欠失は *TP53* の SM と排他的である一方、*PIK3CA* の増幅は *TP53* の SM と協調的であった。

PIK3CA の SM は Stage III, IV に有意に多く認められ（p＝0.023）、増幅は Stage I, II に有意に多く認められた（p＝0.007）。T 因子、N 因子を別々に検討してみると、T3,4 症例で *PIK3CA* の SM が（p＝0.015）、N0 症例で *PIK3CA* の増幅が（p＝0.028）それぞれ有意に多く認められた。

RTK 増幅の 37 例中 9 例（24%）に遠隔転移を認め、これは全遠隔転移 21 例の 43%を占めていた。また、220 例中、pN0 症例で治療後に遠隔転移を認めた 3 例はいずれも RTK の増幅を認めた。

単変量解析において遺伝子変異の有無で有意差を認めたものは、RTK 増幅と *CDKN2A* 欠失で、累積 5 年生存率はそれぞれ 64.6%、63.7%であった。多変量解析では、RTK 増幅と *CDKN2A* 欠失に、年齢、組織化学的分化度、Stage の因子を加えて検討すると、RTK の増幅が唯一独立した予後因子であった。

TP53 の SM では OS に関し有意差は認めなかったが、*TP53* の変異と RTK の増幅の有無の 4 群で比較すると、*TP53* 変異/RTK 増幅の群が有意に予後不良の結果となり、累積 5 年生存率は 41.6%であった。

〈考察〉

本研究から RTK の増幅は OSCC の遠隔転移に対する予測因子であることが示された。更に RTK 増幅と *TP53* の SM を両方有する群では他の群と比較し有意に予後不良であることが示され、これは *TP53* の機能喪失が RTK の増幅による腫瘍活性化を推し進め、遠隔転移を有意に引き起こす結果となったと考えられた。

HNSCC における分子標的治療薬は抗 EGFR 抗体であるセツキシマブのみ臨床適応が認められ

ている。他にも様々な RTK に対する臨床試験が行われてきたが、未だセツキシマブのような効果は認められていない。これまで行われてきた臨床試験の多くは再発転移症例が対象であったが、RTK 増幅を認めるなどのハイリスク群に対して補助療法として使用することにより治療成績の改善の余地があるものと考えられた。

PIK3CA の SM と Stage に関して、Kozaki らは OSCC において Stage I-III と比較し Stage IV で有意に認められたと報告しており、今回の結果もほぼ同様の結果となった。一方、*PIK3CA* の増幅については、pN0 症例で有意に多いことから腫瘍の初期状態を反映しているものと考えられた。

喫煙は口腔がんにおけるリスク因子としてこれまで数多くの報告がされてきた。また、一般的に喫煙により C>A 変異が増加し、C>T 変異が減少することが知られている。今回の研究においては喫煙と非喫煙による遺伝子変異の差は認められず、塩基置換パターンに関しても両群に差は認められなかった。このことは、喫煙は口腔がんの発癌過程において遺伝子異常への影響は少ないものと考えられた。

本研究に用いたパネルは、これまで HNSCC に関して報告されてきた *CASP8* や *FAT1* 遺伝子が含まれていない。また、*TP53* は本研究でもっとも多くの変異が検出された（36%）が、TCGA では 72%、Vettore らは 38%、COSMIC では 42%と報告によってばらつきがあり、変異の検出方法の違いや民族差の影響が考えられた。今後はこれらの問題を解決することでさらなる有用な知見が得られるものと思われる。

〈結論〉

今回の研究結果から癌組織の FFPE 検体と NGS を用いることにより、RTK の増幅が OSCC の遠隔転移に対する予後予測因子であることが示され、NGS を用いたクリニカルシークエンスの有用性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5242　号	及川　悠
論文審査担当者	主　査　渡部　徹郎 副　査　三木　義男　　鵜澤　成一	
論 文 題 目	Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma	

（論文審査の要旨）

近年のがんゲノム研究は、次世代シークエンサーを含めた目覚ましい技術革新があり、ヒト検体サンプルから大量のゲノムデータを解析することが可能になった。大規模がんゲノムプロジェクトにより多くのがんにおけるゲノム異常の全体像が明らかとなってきた。このようながんゲノム解析データの蓄積と、分子標的治療薬の開発により、癌治療のはこれまでの発生臓器、組織型、病期(Stage)等によって決定されてきた治療法から、遺伝子変異別の治療法へとシフトしつつある。口腔扁平上皮癌（OSCC）患者は全世界で年間約 300,000 人が罹患し、診断技術や治療技術の進歩にもかかわらず、5 年生存率は未だ 60%にとどまっている。OSCC においても、次世代シークエンサーを用いた網羅的な遺伝子変異解析が行われ、ゲノム異常に関し多くの情報がもたらされた。しかしながら、ゲノム異常を基にした層別化による治療を推し進めていくためのエビデンスは乏しい。また、OSCC に適応のある分子標的治療薬はセツキシマブ 1 種類のみで、他臓器で使用されている分子標的治療薬の OSCC への適応拡大は大きな課題である。及川悠はこれらの点に着目し、の口腔扁平上皮癌 220 例のホルマリン固定パラフィン包埋組織と次世代シークエンサーを用いたがん関連 50 遺伝子のターゲットリシークエンスにより OSCC の体細胞変異とコピー数変異を解析し、臨床病理学的な情報との統合により、OSCC の診断、治療予測、予後予測に関わるゲノム要因を明らかにすることを目的として本研究を行った。

本論文で得られた結果は以下の通りである。

1）　220 例中 311 の体細胞変異を認め、同義置換は 68 変異、非同義置換は 243 変異であった。非同義置換はミスセンス変異が 161、ナンセンス変異が 49、フレームシフト変異が 25、インフレームシフト変異が 2、スプライスサイト変異が 6 であった。

2）　遺伝子別の変異は *TP53* が 79 例（35.9%）、*CDKN2A* が 35（15.9%）、*PIK3CA* が 19 例（8.6%）、*NOTCH1* が 9 例（4.1%）、*HRAS* が 4 例（1.8%）などであった。

3）　コピー数変異はがん抑制遺伝子における欠失は、CDKN2A が 25 例（11.4%）、NOTCH1 が 8 例（3.6%）、SMAD4 が 3 例（1.4%）などであった。一方、がん遺伝子における増幅は、*PIK3CA* が 38 例（17.3%）、*AKT1* が 11 例（5.0%）、*HRAS* が 8 例（3.6%）、*BRAF* が 6 例（2.7%）であり、チロシンキナーゼ受容体（RTK）遺伝子増幅は 37 例で認めら

れ、遺伝子別では *EGFR* が 17 例（7.7%）、*ERBB2* が 7 例（3.2%）、*FGFR1* が 7 例（3.2%）、*FGFR3* が 6 例（2.7%）、 *ERBB4* が 3 例（1.4%）、 *MET* が 3 例（1.4%）、 *FLT3* が 2 例（0.9%), *KIT* が 1 例 （0.5%）、*PDGFRA* が 1 例（0.5%）であった。

4） *CDKN2A* と *PIK3CA* では、体細胞変異とコピー数変異はそれぞれ排他的傾向が認められた。

5） *PIK3CA* の体細胞変異はステージ I/II と比較し、ステージ III/IV に有意に多く、T 因子との関連が認められた。一方、*PIK3CA* の増幅はステージ III/IV と比較し、ステージ I/II に有意に多く、N 因子との関連を認めた。

6） RTK 増幅を認めた 37 例で、遠隔転移を認めたのは 9 例（24%）で、これは全遠隔転移 21 例の 43%を占めていた。

7） 遺伝子変異の有無で全生存に対する単変量解析を行った結果、RTK 増幅と *CDKN2A* 欠失に有意差を認めた。RTK 増幅群の累積 5 年生存率は 64.6%であり、CDKN2A は 63.7%であった。*TP53* の体細胞変異に関しては差が認められなかった。

8） RTK 増幅と *CDKN2A* 欠失の有無および臨床病理学的な因子で多変量解析を行うと、RTK 増幅の有無のみが唯一独立した予後因子であった。

9） RTK 増幅かつ遠隔転移を認めた群では TP53 の体細胞変異が多く認められ、RTK と TP53 の変異の有無で 4 群に分け比較すると、RTK 増幅かつ TP53 体細胞変異群では有意に予後不良の結果となり、累積 5 年生存率は 41.6%であった。

以上の結果から、及川は RTK の増幅が口腔扁平上皮癌において遠隔転移の予測因子であることを明らかにした。さらに、組織サンプルのシークエンスにより分子標的治療薬の適応症例を選択することで予後の改善が期待でき、OSCC 治療薬へと適応拡大が可能になるのではないかと推論した。この推論は妥当なものである。

この成果は口腔扁平上皮癌の予後予測及び治療成績の向上に非常に深い意味をもたらし、今後さらに口腔がんの臨床・研究の進歩発展に寄与することは大きいものと判断された。よって本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大出　貴資
論文審査担当者	主査　三浦　雅彦 副査　荒川　真一　　中濵　健一
論　文　題　目	PDMP, a ceramide analogue, acts as an inhibitor of mTORC1 by inducing its translocation from lysosome to endoplasmic reticulum

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は細胞の増殖や代謝、分化の制御において中心的な役割を担う細胞内シグナル分子であり、リソソーム膜上で活性化される。セラミドアナログである 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) はスフィンゴ糖脂質の合成阻害剤として知られているが、リソソームや小胞体といったオルガネラの構造や機能にも影響を与える。本研究においては、PDMP が mTORC1 の細胞内局在を変化させることにより mTORC1 の活性を制御するという新たな機構を明らかにしたので報告する。マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞において、PDMP は mTORC1 をリソソームから小胞体へ移行させることで、mTORC1 の活性化因子 Rheb からの解離を引き起こした。これらの PDMP の作用は、スフィンゴ糖脂質合成阻害作用とは無関係に生じていた。さらに、PDMP は mTORC1 の活性を抑制し、MC3T3-E1 細胞の増殖や骨芽細胞分化を阻害した。以上の結果から、PDMP は mTORC1 の細胞内局在をリソソームから小胞体へ変化させることにより mTORC1 の活性を抑制することが示唆された。

＜緒言＞

mTORC1 はタンパク質合成や細胞増殖、分化を促進し、オートファジーを抑制する。mTORC1 は骨芽細胞分化においても重要な役割を担っている。mTORC1 の活性化には mTORC1 がリソソーム膜上に存在することが必要であり、mTORC1 はリソソーム膜上に恒常的に存在する mTORC1 活性化因子 Rheb によって活性化される。mTORC1 がリソソームにリクルートされるために、Ragulator は mTORC1 の足場として働く。

セラミドアナログ PDMP はグルコシルセラミド合成酵素を阻害し、スフィンゴ糖脂質の合成を抑制する。この作用により PDMP はアテローム性動脈硬化症や心肥大を抑制することが報告されている。一方、PDMP はスフィンゴ糖脂質合成阻害作用とは無関係に、リソソームや小胞体の構造を変化させることが報告されている。また、PDMP は mTORC1 の活性を阻害するという報告もある。しかし、それらの機構については未解明な点が多い。

本研究では、PDMP が mTORC1 の細胞内局在を変化させることで mTORC1 の活性を制御する

かどうかを明らかにするため、マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 に PDMP を作用させ、mTORC1 の細胞内局在や mTORC1 の活性への影響と、MC3T3-E1 細胞の増殖および骨芽細胞分化への影響を検討した。

＜方法＞

PDMP のスフィンゴ糖脂質合成に対する作用とオルガネラに対する作用を区別するため、PDMP の 2 つの異なる異性体、グルコシルセラミド合成酵素の阻害作用のある D-PDMP と阻害作用のない L-PDMP に加え、新たなグルコシルセラミド合成酵素阻害剤 D-*threo*-1-phenyl-2-benzyloxycarbonylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PBPP) を使用した。mTORC1 阻害剤である Rapamycin を mTORC1 阻害のコントロールとして使用した。

mTORC1 や Ragulator の細胞内局在を明らかにするため、マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 を D-または L-PDMP、PBPP を含む骨芽細胞分化誘導培地で培養後、免疫蛍光細胞染色を行い共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。二重染色により得られた 2 つのシグナルを解析することで、共局在率を定量化した。MC3T3-E1 細胞に FLAG-Rheb を発現させ、共免疫沈降法により mTORC1 と Rheb との相互作用を確認した。

mTORC1 の活性に対する PDMP 処理の影響を検討するため、mTORC1 の下流に存在する S6K のリン酸化を Western blot 法にて評価し、免疫蛍光細胞染色によりオートファゴソームの形成を観察した。MC3T3-E1 の細胞増殖や骨芽細胞分化に対する PDMP 処理の影響を確認するため、WST-8 アッセイや ALP 染色、リアルタイム RT-PCR 法を実施した。

＜結果＞

1. MC3T3-E1 細胞における PDMP の作用

D-PDMP または PBPP で処理した MC3T3-E1 細胞ではグルコシルセラミドの量が減少し、L-PDMP 処理細胞では変化しないことを確認した。免疫蛍光細胞染色の結果、D-または L-PDMP で処理した MC3T3-E1 細胞において、小胞体の染色パターンが変化した。

2. mTORC1 とリソソームの共局在

通常の条件下において mTORC1 はリソソームに局在していたのに対して、D-または L-PDMP 処理細胞では mTORC1 のリソソームへの共局在率が有意に減少した。共免疫沈降法の結果、D-または L-PDMP 処理により mTORC1 と FLAG-Rheb との相互作用が減弱した。PBPP ではいずれの変化も認めなかったことから、これらの現象にグルコシルセラミド合成酵素阻害の作用は寄与せず、PDMP の有するオルガネラへの作用が関係することが示唆された。

3. mTORC1 と小胞体の共局在

PDMP 処理細胞における mTORC1 と小胞体の染色パターンが類似していたため、mTORC1 と小胞体の共局在を観察した。D-または L-PDMP 処理により mTORC1 の小胞体への共局在率が有意に増加した。以上の結果から、PDMP 処理により mTORC1 がリソソームから小胞体へ移行することが示唆された。

4. LAMTOR1 の局在

mTORC1 の足場である Ragulator の構成要素 LAMTOR1 も、PDMP 処理によりリソソームから

小胞体へ移行することが判明した。脂質ラフトを解析したところ、脂質ラフトに局在するLAMTOR1 が PDMP 処理により増加することを確認した。

5. mTORC1 の活性

mTORC1 の下流タンパク質である S6K のリン酸化は、D-または L-PDMP、Rapamycin 処理により減少し、PBPP 処理では変化しないことが確認された。さらに、D-または L-PDMP 処理細胞ではオートファゴソームの形成が促進されていることが判明した。これらの結果から、PDMP 処理により mTORC1 の活性が抑制されることが考えられた。

6. 細胞増殖および骨芽細胞分化

D-または L-PDMP で処理した MC3T3-E1 細胞では、Rapamycin 処理細胞と同様、細胞増殖が有意に抑制されたが、PBPP 処理では影響を受けなかった。また、骨芽細胞分化への影響について ALP 染色で検討したところ、無処理のコントロール細胞や PBPP 処理細胞では ALP 染色陽性を示したのに対して、D-または L-PDMP 処理細胞では、Rapamycin 処理細胞と同様に ALP 染色陰性となった。D-または L-PDMP 処理細胞では、骨芽細胞分化の初期マーカーである Runx2 と Osx の発現も有意に減少したことから、PDMP 処理は mTORC1 の不活性化を介して細胞増殖および骨芽細胞分化を抑制することが示唆された。

＜考察＞

本研究では、MC3T3-E1 細胞においてセラミドアナログ PDMP が mTORC1 および LAMTOR1 をリソソームから小胞体へ移行させることを明らかにした。PDMP は小胞体の管状構造形成を引き起こすことが報告されており、小胞体の管状化は他のオルガネラとの膜接触を促進する可能性がある。また、mTORC1 の阻害に細胞内コレステロール輸送の障害が関与しているという報告があり、細胞内コレステロール輸送は小胞体-リソソーム間の膜接触と関係している。さらに本研究では LAMTOR1 が脂質ラフトを介して PDMP の影響を受けることが示唆されている。したがって、PDMP により mTORC1 がリソソームから小胞体へ移行する機構として、以上の複数の因子が寄与している可能性が考えられる。

PDMP は mTORC1 の細胞内局在の変化を引き起こしたが、PBPP は mTORC1 に影響を及ぼさなかった。PDMP の構造にはモルホリノ基およびデカノイルアミノ基が存在しており、一方 PBPP にはピロリジノ基およびベンジルオキシカルボニルアミノ基がそれぞれ相当する部位に存在する。これらの構造の違いから、PDMP のデカノイルアミノ基にあるアシル鎖が膜脂質への親和性に関与している可能性や、PDMP のモルホリノ基にある酸素原子が隣接する PDMP のヒドロキシル基やアミノ基と親和性を持つ可能性が考えられる。PDMP が作用する機序については、今後検討が必要である。

PDMP は癌治療における併用療法に有効という報告がある。癌細胞では mTORC1 の活性が促進されていることから、PDMP の癌細胞への影響は mTORC1 に対する抑制作用が関与している可能性がある。本研究では、PDMP は mTORC1 の不活性化を介して骨芽細胞の増殖や分化を抑制することが判明したが、その他のセラミドアナログやその他の細胞については十分に解明されていない。したがって、異なるセラミドアナログの mTORC1 への影響を検討することにより、mTORC1 の制御機構がさらに解明されると考えられる。

＜結論＞

セラミドアナログ PDMP はスフィンゴ糖脂質合成阻害作用とは無関係に、オルガネラに作用することで mTORC1 のリソソームから小胞体への移行を引き起こした。mTORC1 の小胞体への移行は mTORC1 と活性化因子 Rheb との相互作用を障害し、mTORC1 の不活性化を引き起こした。mTORC1 の不活性化により MC3T3-E1 細胞の増殖や骨芽細胞分化が抑制された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5243　号	大出　貴資
論文審査担当者	主　査　三浦　雅彦 副　査　荒川　真一　　中濵　健一	
論 文 題 目	PDMP, a ceramide analogue, acts as an inhibitor of mTORC1 by inducing its translocation from lysosome to endoplasmic reticulum	

（論文審査の要旨）

Mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) はリソソームの膜上で活性化される細胞内シグナル分子であり、細胞の増殖や分化の制御において重要な役割を担っている。mTORC1 の活性化には、mTORC1 の足場として働く Ragulator およびリソソーム膜上に恒常的に存在する mTORC1 活性化因子 Rheb の存在が必要である。骨芽細胞の増殖や分化においても mTORC1 の関与は報告されているが、詳細はいまだ十分に解明されていない。

セラミドアナログである 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) はリソソームや小胞体の構造を変化させることが報告されており、PDMP が mTORC1 の活性を阻害するという報告も存在する。しかしながら、それらの機構については未解明な点が多い。

そこで、大出貴資は、骨芽細胞における mTORC1 の役割や PDMP の作用を解明するため、PDMP 処理したマウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 における mTORC1 の細胞内局在および mTORC1 の活性を解析し、さらに MC3T3-E1 の増殖や分化に対する PDMP の影響を検討した。

本研究によって得られた結果の概要は以下の通りである。

1) 免疫蛍光細胞染色により、PDMP 処理した MC3T3-E1 細胞の小胞体の形態が変化することを認めた。
2) 免疫蛍光細胞染色および共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により、PDMP 処理細胞では mTORC1 とリソソームとの共局在が減少することを認めた。
3) 免疫沈降法により、PDMP 処理細胞では mTORC1 と活性化因子 Rheb との相互作用が障害されることを認めた。
4) 免疫蛍光細胞染色および共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により、PDMP 処理では mTORC1 と小胞体との共局在が増加することを認めた。
5) PDMP 処理により、mTORC1 の足場である Ragulator とリソソームとの共局在が減少し、一方で Ragulator と小胞体との共局在が増加することを認めた。
6) Western blot 法を用いた解析により、PDMP 処理細胞では S6K のリン酸化が減少することを認めた。
7) 免疫蛍光細胞染色により、PDMP 処理細胞ではオートファゴソームの形成が促進されることを認めた。

8) WST-8 アッセイを用いた解析により、PDMP 処理した MC3T3-E1 では細胞増殖が抑制されることを認めた。

9) PDMP 処理した MC3T3-E1 細胞では ALP 染色の染色性が低下した。

10) リアルタイム RT-PCR 法を用いた解析により、PDMP 処理した MC3T3-E1 における Runx2 および Osx の発現が抑制されることを認めた。

11) 以上の結果について、D-threo-1-phenyl-2-benzyloxycarbonylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PBPP) 処理細胞では変化を認めなかった。

以上の結果から、大出は以下の考察を行った。

1) PDMP のオルガネラへの作用によって mTORC1 とその足場 Ragulator はリソソームから小胞体へ移行した。

2) mTORC1 が小胞体へ移行されたことで mTORC1 と活性化因子 Rheb との相互作用が障害された。

3) mTORC1 と Rheb との相互作用が障害されたことで mTORC1 の不活性化が引き起こされた。

4) mTORC1 の不活性化により MC3T3-E1 の細胞増殖や骨芽細胞分化が抑制された。

5) mTORC1 の小胞体への移行には Membrane contact sites や細胞内コレステロール輸送が関与している可能性がある。

以上の様に本論文は、リソソームや小胞体といったオルガネラに着目し、セラミドアナログが mTORC1 の細胞内局在の変化を介して骨芽細胞の増殖や分化へ与える影響について初めて明らかにしたものであり、高く評価できる。また、骨芽細胞における mTORC1 の制御機構が解明されたことは、骨芽細胞の増殖および分化における分子制御機構を理解する上で極めて重要なものであり、基礎歯学のみならず臨床歯学の今後の発展に寄与するものと考えられる。したがって本論文は、博士 (歯学) の学位申請を行うにあたり十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	半田　和之
論文審査担当者	主 査　　宇尾　基弘 副 査　　山下　仁大　　二階堂　徹
論　文　題　目	The ball-on-disk cyclic wear of CAD/CAM machinable dental composite and ceramic materials

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

近年開発されたセラミックス同士の摩耗性および耐摩耗性を考慮した臨床指針は確立されていない．本研究では異なる強度のセラミックスおよびコンポジット材料が対合するときの摩耗特性を検討した．3 種類の CAD/CAM 切削加工用材料 (VITABLOCS Mark II, IPS e.max CAD, VITA Enamic) からボール形状とディスク形状の試料を製作し，計 9 種類の組み合わせで材料同士の摩耗を検証した．異なる材料同士の摩耗では，ボールとディスクのいずれであっても硬さや破壊靭性など機械的特性の低い方が多く摩耗し，同特性の高い材料の摩耗が少ない結果となった．また，長石系材料もしくはコンポジット材料の同種材料間の組み合わせを除いて，力学モデルを用いた応力解析により得られたボールとディスクの最大主歪み値の大小と摩耗量の大小が一致する傾向を認めた．歪み値と摩耗量の大小関係が示唆される一方で，咬頭と咬合面の摩耗量自体を予測するためには複合的な因子を含めた予測作業が必要であることが示唆された．

＜緒言＞

近年，修復・補綴に用いられる材料が多様化し，従来よりも高靭性で破折抵抗性の高いセラミック修復材料が開発されている．一方でこれらの材料を歯冠修復物として臨床応用した場合の対合歯や対合修復物の摩耗が懸念されている．新たに歯冠修復治療を行う場合，対合歯および対合歯列において様々な修復材料が混在している事があり，咬合する材料同士に過度の摩耗を誘発しない慎重な材料選択が必要である．しかしながら，歯科材料同士が咬合する事を想定した摩耗に関する報告は少ないため，対合材料を考慮した材料選択に関するガイドラインは存在せず，治療計画立案に際して大きな不確定要素となっている．また，セラミックスの摩耗に関して未だ理論的に解明されていない部分が多く，特に咬合する材料の組み合わせを考慮した摩耗の予測は行われていない．加えて，歯牙の咬頭形状が摩耗に与える影響も解明されていない．咬頭と対合材料との接触形態が摩耗量に大きな影響を与える事から，本研究で咬合シミュレーション時における歯冠補綴用材料の組み合わせと形態が摩耗量と最大主歪みに与える影響を調べた．

＜方法＞

材料には歯科 CAD/CAM 切削加工用ブロック 3 種，長石系ガラスセラミックブロックの VITABLOCS Mark II (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen,Germany) (FP)，二ケイ酸リチウムガラスセラミックブロックの IPS e．max CAD (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) (LD)，多孔質セラミックスに高圧下樹脂含浸して作製されたコンポジットブロックの VITA Enamic (VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany) (HC) を用い

た．摩耗試験には直径 4 mm の半球型ボール試料と直径 8 mm，厚さ 2 mm のディスク型試料を各材料より切削加工で成形した．材料毎に臨床に準じた方法で研磨処理を施し，摩耗試験を行った．ディスク型試料と摩耗圧子としてのボール型試料を試験機にとりつけ, 50 N の荷重のもと 3.7 mm のスライディングパスで 1.2 Hz，3000 回繰り返した．

各試料の摩耗量は，試料を口腔内スキャナで 3 次元的に記録し，得られた形状データをメッシュデータ編集ソフトウェア上で体積の測定を行った．

加えて，摩耗試験後の試料は，走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて，摩耗面の観察を行った．摩耗試験における各試料の応力および歪み分布を算出するため，ボール試料とディスク試料の３次元有限要素モデルを構築し，摩耗試験の荷重量とスライドを再現した接触解析を行った．

＜結果＞

ディスクとボール各試料の摩耗量について，最も多く摩耗したディスク試料は HC ディスク対 FP ボール (2.9 mm^3) の組み合わせで, 次いで FP ディスク対 LD ボール (2.7 mm^3), HC ディスク対 LD ボール (2.0 mm^3) と FP ボール (1.8 mm^3) の順であった．この４つの組み合わせは他の５つと比べて非常に大きな値であった．最も摩耗したボール試料は，HC ボール対 FP ディスク (1.3 mm^3) で，次いで FP ボール対 FP ディスク (1.1 mm^3) と LD ディスク (1.1 mm^3) であった．いずれの組み合わせにおいても，咬合するボールとディスクの摩耗量との間に有意差を認めた．ディスクの摩耗量が対合のボールよりも有意に大きかったのは４つの組み合わせであり, FP ボール対 HC ディスク（ボール摩耗量 / ディスク摩耗量 = 0.05），LD ボール対 FP ディスク (0.12) と HC ディスク (0.26), FP ボール対 FP ディスク (0.61) であった．残り５つの組み合わせにおいては，ディスクよりもボールの摩耗量が有意に大きかった．

摩耗試験後のディスク試料を SEM 観察したところ，FP と LD ボールに対合する FP と HC ディスクにおいて，大きなヒビが摩耗痕に沿って観察された．HC ボールと対合したディスク試料はいずれも進行方向に沿ってわずかな摩耗痕が認め，FP と LD ボールに対合した LD ディスクにおいて滑沢な面と荒い面が入り混じった複合的な摩耗痕を認めた．

有限要素解析において，スライディング中はボールの先端に大きな圧縮歪みを認め，ディスク側の接触点に強い圧縮歪み，その周りを取り囲む様に進行方向の前方と後方それぞれに引張り歪みを認めた．この歪み分布はどの組み合わせにおいても同様であった．FP と HC の同種材料が対合する組み合わせを除き，ボールとディスクで最大主歪みの値が大きい側の試料がより大きな摩耗量を示した．

＜考察＞

ディスクの摩耗量は硬さや靭性値がボールよりも低い場合に著しく大きくなった．同様に，同じ材料の組み合わせを除いて，ボールの機械的性質がディスクよりも弱い場合にボールが大きく摩耗した．この結果は機械的性質と歯科用セラミックスの摩耗量に相関があるという過去の報告と一致した. LD はいずれの組み合わせにおいても摩耗量は低く抑えられた．SEM 像では LD のディスクは摩耗された粗造な面と摩耗されていない滑沢な面の入り混じった状態を示したが，FP と HC では摩耗された粗い面しか認められなかった．これらの結果は，他の報告でも述べられているように，LD が他の材料より高強度で耐摩耗性が高いためと予想される．

有限要素法を用いて算出された歪みの値を参照すると, FP と HC が同じ材料同士の組み合わせを除き，ボールとディスクの摩耗量の相対的な大小は，有限要素法を用いて算出された相対的な歪みの大小と一致した．この接触面の歪み量は，機械的性質のうち弾性率とポアソン比を反映するもので，他の機械的強度は含まない．また，接触部の大きさや形状が摩耗量を規定し得るため，弾性係数が低い材料では接

触面積が広く，接触部のストレスを比較的低く抑えられたと考えられる．それゆえ，セラミックスにおける弾性係数は，歪みに対する抵抗性を示す値として考えられ，摩耗量を予想する因子としての可能性が示唆される．一方，同種材料の組み合わせでは歪み値と摩耗量の大小関係が一致しないケースが見られた．硬く脆い FP 同士では歪みの小さいディスクで摩耗量が大きく，柔らかいが曲げ強さが比較的高い HC 同士では歪みの大きな側のディスクでほとんど摩耗しなかった．前述の様に，ボールの接触部は圧縮歪みが主体であり，ボールがスライドしても歪み分布の変化は小さいが，ディスク側の接触部分は運動に伴って移動し，ディスク表面では引張り歪みを生じた直後に大きな圧縮歪みを生じ，またその直後に引張り歪みに移行するという急激な変化を示す．このことは，柔らかい HC は摩耗中の動的な歪み量の変化に対する耐性が高く，逆に FP は歪みの変動に対する耐性が低くディスクの摩耗が促進されたと推察することができる．さらに，摩耗の進行に伴う形態の変化，特にボール表面が平坦化する事で，ボールとディスクの接触面が増加し，ディスク側の摩耗が抑えられたとも考えらえる．

今回，有限要素解析で摩擦係数を 0.1 に設定したのは，近年の研究に基づくもので，予備実験において，摩擦係数が 0.3 に増加すると最大主歪みがおよそ倍になることが分かっている．摩擦係数が摩耗に与える影響の大きさが報告されているが，これは表面粗さが材料摩耗において重要な役割を果たすことがわかっており，セラミック修復物を十分に研磨することや，臨床的に再研磨を行うことで対合歯の表面に与える摩耗ダメージを最小限に抑えられる．

本研究では臨床的な状況をシミュレーションするために，各試料の研磨処理はチェアーサイドで行われるものに準じ，ボールオンディスク摩耗試験は咬頭が咬合面を滑走するグラインディングを再現している．本研究では，比較的短い回数で大きな摩耗量が観察されたことから，臨床上の初期段階でも過度な摩耗が生じるリスクが示唆された．

また，本研究において，ボールとディスクの相対的な摩耗量の大小関係を部分的に予測する事は可能であったが，各材料の組み合わせにおける摩耗量自体の大きさを予想することができなかった．摩耗量自体を予測するためには，一部の機械的性質だけでなく，複合的な因子を含む予測式が必要性と考えられ，このことは従来機械摩耗の予測式の多くが複数の因子を含む数式によって提起されていることからも明らかである．つまり，セラミック修復物とその対合の摩耗量を正確に予想するためには，材料の様々な物性に加え，他の環境因子を含めたさらなる研究が求められる．

＜結論＞

歯冠修復用材料同士を組み合わせとしたボールオンディスク摩耗試験において，同種材料同士の組み合わせを除き，材料の弾性係数および形状に基づいた最大主歪みの相対的大きさが摩耗量の大小を予想する一つの因子である事が示唆された．

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第　5244　号	半田　和之
論文審査担当者	主 査　　宇尾　基弘 副 査　　山下　仁大　　二階堂　徹	
論 文 題 目	The ball-on-disk cyclic wear of CAD/CAM machinable dental composite and ceramic materials	

（論文審査の要旨）

歯科用 CAD/CAM 技術の普及に伴い，材料開発競争がより激化している．日々新しい材料が登場し，材料の多様化は未だとどまるところを知らない．修復物の破壊によるトラブルを回避するためにより高強度な材料開発が中心となっているが，反面、高強度材料が対合する歯質や修復物を過度に摩耗させることが懸念される．臨床においてセラミックスを用いた修復が中心となってきており，異種類のセラミックス同士で咬合せざるを得ない症例は今後増えていくことが容易に想像される．そのため対合材料との摩耗性を考慮した材料選択の基準が必要である．しかしながら，新たな歯科材料が登場する度に，その材料とエナメル質の摩耗性についての報告は行われるものの，既存の材料を含め，材料同士の組み合わせを考慮した汎用性のある摩耗予測はなされておらず，治療計画立案に際して大きな不確定要素となっていることは大きな課題と考えられる．

セラミックスの摩耗において，様々な要因が摩耗性に影響を与えることがわかっているが，そのメカニズムは未だ明らかにされていない．特に歯科材料同士の組み合わせに加え，形態による影響まで検討した報告は極めて少なく，さらに有限要素法を用いた力学モデルから摩耗のメカニズムを解明しようと試みた報告もない．以上より，セラミックス同士を咬合させ，材料の組み合わせの違いによる摩耗を評価し，その摩耗メカニズムを有限要素法を用いて分析し，摩耗予測を試みた本研究は臨床上極めて注目すべき研究であるといえる．

本研究では，3種類の CAD/CAM 切削加工ブロックである，長石系ガラスセラミックスの VITABLOCS Mark II，二ケイ酸リチウムガラスセラミックスの IPS e.max CAD，高圧下樹脂含浸型コンポジットレジンブロックの VITA Enamic を用いて，ボール形状の試料とディスク形状の試料を切削加工により作製して，計9通りの組み合わせにおける，各材料の摩耗量の比較を行っている．そのため，同じ材料同士が咬合した組み合わせでも，形状の違いによる影響を検討することが可能となっている．摩耗試験としてはボールオンディスクタイプ，50N の荷重で 3000 サイクルを行っている．加えて，有限要素解析を用いた力学モデルから，摩耗試験開始時のボール試料およびディスク試料の接触部周囲における歪み分布の変化をシミュレーションしている．これにより，摩耗前の状況から摩耗後の状況を予想することを試みている．用いた手法としては，(1)ボールオンディスク摩耗試験，(2)摩耗後の試料の電子顕微鏡での観察，(3)有限要素法を用いた各試料に生じる最大主歪みの算出を行っている．

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである

１．異なる材料の組み合わせでは，硬さや靭性値が低い材料の方が形状にかかわらず摩耗量が多かった.

２．３種類の CAD/CAM 切削加工用材料の中で，最も硬さと靭性が高い二ケイ酸リチウムの試料が最も強い摩耗抵抗性を示した.

３. 有限要素法を用いて算出された歪みの値と摩耗量との関係を検討したところ, 同じ材料同士の組み合わせを除き, ボール試料とディスク試料の最大主歪みが相対的に大きな方が摩耗量も大きくなった.

4. 摩耗試験中にボールとディスクに生じる歪みは様式が違い, ボールでは滑走運動中は圧縮歪み主体で変化は少ないのに対して, ディスクでは接触部が移動することで引張り歪みと圧縮歪みが交互に生じる大きな歪みの変化を示した.

本実験では，CAD/CAM 切削加工用セラミックス同士を摩耗させることで歯科材料同士に摩耗が生じる場合の摩耗量測定と，有限要素解析を用いて力学モデル上で材料同士の接触部における歪みを算出するという別々のアプローチから，材料同士の摩耗について新たな知見を求めることに挑戦しており，重要な基盤的情報を提起していると考えられる.

結果として，異なる材料同士の摩耗における，摩耗量の相対的な大小を予測することに成功している点は評価に値する．加えて，セラミックス同士の摩耗では材料強度が耐摩耗性に直結すると明らかにしている点は，臨床的にも重要な知見である．比較的短期間のサイクルで大きな摩耗が進む事が示された点は，ブラキシズム癖のある患者に本研究で用いられた材料を使用した場合に，短期間で過度な摩耗が生じる可能性を示唆している．これは，歯科材料の選択において，対合の材料との摩耗特性を考慮に入れた材料選択が重要であることを示している．つまりは，特定材料に対する摩耗を考慮した材料選択の基準が必要であることを示しており, 歯科医学における摩耗分野での研究課題を提示している研究としても, 大変意義のあるものといえる.

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉　志元
論文審査担当者	主 査　　水口　俊介 副 査　　原田　浩之，塩田　真
論　文　題　目	The Morphological Evaluation of Denture Space in Glossectomy Patients

＜緒言＞

通法の全部床義歯治療では，良好な義歯の維持，安定の獲得のために，デンチャースペースの考慮は重要事項として論じられてきた．舌，頬，口唇の筋機能運動は義歯安定の重要要素である．様々な手法により，口腔周囲筋の筋機能運動を補うように全部床義歯の人工歯および研磨面形態は調整されてきた．

機能運動的アプローチによるデンチャースペース記録法の一つに西欧発祥であるピエゾグラフィー法がある．ピエゾグラフィー法により記録されたデンチャースペースはピエゾグラフィー印象体と呼称される．ピエゾグラフィー法では，流動性および粘性のある材料を利用し，患者に選択した発音をさせることで舌および頬側の筋機能運動を記録し，記録されたピエゾグラフィー印象体を義歯形態へ反映させる．

腫瘍やその他疾患のため舌，口腔底，下顎骨を切除および再建手術が行われた患者は，顎顔面補綴治療が必要である．通常の下顎無歯顎患者では，デンチャースペースの形態学的研究を通して，全部床義歯に対する生理機能的アプローチの有効性について述べられている．一方，顎顔面補綴学分野では，下顎無歯顎患者に対する生理機能的アプローチの有効性について症例報告はされているが，科学的手法による研究報告はなく，舌欠損を有する無歯顎患者のデンチャースペースの形態についても未知である．このことは，デンチャースペースを構造物として，定量的に評価することが困難であったことに起因する．本研究では，ピエゾグラフィー法を用いて，舌欠損を有する無歯顎患者のデンチャースペース形態を定量化し，評価した．

本研究の目的は，下顎無歯顎患者において，舌欠損を有する患者と舌欠損の無い患者を対象に，デンチャースペースの形態を評価することである．

＜材料・方法＞

舌欠損を有する下顎無歯顎患者 6 名を対象群とし，通常の下顎無歯顎患者 7 名をコントロール群に設定した．

デンチャースペースの記録にはピエゾグラフィー法を用いた．本法では，Klein の方法に従い，ピエゾグラフィー法を用いてデンチャースペースの抽出を行い，ピエゾグラフィー印象体を得た．ピエゾグラフィー印象体の記録にはシリコーン印象材を選択した．ピエゾグラフィー印象体はコーンビーム CT にてスキャンし，医療用 3D 画像ソフトおよび 3D データ検査ソフトを用いて，ピエゾグラフィー印象体の STL（stereolithography）データ形式の 3D モデルを製作し，以下の 2 項目について計測を行った．

第一計測項目として，ピエゾグラフィー印象体中心切断面上にて，ピエゾグラフィー印象体中心点

と残存顎堤頂の 2 点を設定し，咬合平面へ投影をした．投影された 2 点間の距離を 3D モデル切断面上にプロットし２点間の距離を計測した．本項目は臨床にて，舌欠損を有する患者において，残存顎提が人工歯排列位置の決定情報として寄与するかを明らかにすることを目的としている．

第二計測項目として，咬合平面上にて，ピエゾグラフィー印象体舌房相当部で囲まれた面積を計測した．すなわち，(ⅰ)ピエゾグラフィー印象体舌側表面の咬合平面切断線，(ⅱ)瞳孔間線と口蓋縫線投影して設定したピエゾグラフィー印象体中心線，(ⅲ)中心線と垂直に交わる線，の 3 線で囲まれた面積を計測した．さらに，(ⅲ)の垂線は中心線上の(ⅰ)と(ⅱ)との交点から 10,15,20,25mm 各 4 種類の距離を設定した．中心線により，左右に 2 分割して，大面積と小面積を決定し，面積比（大面積：小面積）を計算した．本項目は臨床にて，非欠損側のデンチャースペースを参考に対称な形態を欠損側に応用してよいのかを明らかにすることを目的としている．

2 計測項目の結果は，Mann-Whitney U test ($p<0.05$)を用いて，統計解析を行った．

＜結果＞

(１)咬合平面に投影された，ピエゾグラフィー印象体中心点と残存顎堤頂の 2 点間の距離は，舌欠損群 3.31mm，コントロール群 1.85mm で，舌欠損群の方が有意に大きかった．

（２）左右に 2 分割したピエゾグラフィー印象体舌房相当部の面積比は（ 対象群:コントロール群），10mm; 1.61:1.16, 15mm; 1.48:1.11, 20mm; 1.41:1.10, 25mm; 1.33:1.14 で，すべての垂線で舌欠損群の方が有意に大きかった．

＜考察＞

本研究では，ピエゾグラフィー印象法開発者である Klein の方法に基づいて，ピエゾグラフィー印象を行った．Klein の方法では，研磨面が平滑な基礎床を用い，上顎は無歯顎の状態でピエゾグラフィー印象が行われる．Klein 以外のピエゾグラフィー印象法として，ピエゾグラフィー印象時に，咬合高径の維持のためのキール付基礎床および上顎蝋義歯を装着した状態で行う方法が報告されている．本研究は，デンチャースペース形態への影響因子を舌欠損に焦点を絞る必要があった．キール付咬合床および上顎蝋義歯による発音の変化を通じたデンチャースペース形態への影響を回避するために，Klein の方法を選択した．

臨床的に残存顎堤による情報が人工歯排列位置決定に利用されることが多い．計測結果より，舌欠損群の患者とコントロール群の患者では，残存顎提から得られる情報とピエゾグラフィーから得られる情報には隔たりがあり，残存顎堤からのみでは把握できない人工歯排列位置情報の存在が示された．

本研究ではピエゾグラフィー印象体と設定した 3 種の線で囲まれた面積を舌房相当部の面積と仮定した．Takamata らの報告では，人工歯排列をした下顎全部床蝋義歯上で，(ⅰ)人工歯の最大豊隆部に沿った線，(ⅱ)左右第二大臼歯を結んだ線の 2 種類の線に囲まれた部位を舌房面積と定義しているが，本研究でデンチャースペースの抽出に用いたピエゾグラフィー法では，人工歯配列位置の舌側限界をピエゾグラフィー印象体の舌側表面の咬合平面切断線として定義している．以上より，本研究でピエゾグラフィー印象体と設定した 3 種の線で囲まれた面積を舌房相当部の面積と仮定することは妥当である．

本研究の計測結果では，ピエゾグラフィー印象体舌房相当部面積を中心線により，左右に 2 分割し

て，大面積と小面積を決定し，計算した面積比（大面積：小面積）は，舌房相当部面積の左右対称性を表している．面積比の値が大きい程，ピエゾグラフィー印象体および舌房面積が非対称であると考えられ，対象群の方が面積比が有意に大きかったので，舌欠損を有する無歯顎患者の方が，通常の無歯顎患者よりピエゾグラフィー印象体の左右非対称性が強くなることが示唆された．

これらの結果は，舌欠損自体の形態および舌運動の違い，舌運動を補足する形で動く口唇，頬粘膜の動き，さらには再建組織の容積，運動性の変化によるものであると推察される．

舌欠損患者の顎補綴治療においては，残存顎提から得られる情報を欠損側に応用できないことがあることを念頭に，残存顎提の精査だけではなくピエゾグラフィー法などを用いたデンチャースペースの精査を行う必要性が示唆された．

＜結論＞

本研究では，下顎無歯顎患者において，舌欠損を有する患者と舌欠損が無い患者を対象にデンチャースペースの形態を評価することを目的とし，ピエゾグラフィー法から得たピエゾグラフィー印象体を用いて舌欠損を有する無歯顎患者と舌欠損を有しない無歯顎患者の比較を行い，下顎無歯顎患者において，舌欠損を有する患者と舌欠損が無い患者ではデンチャースペースの形態が異なることが示された．

論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲　第　5245　号	吉　志元
論文審査担当者	主 査　　水口　俊介 副 査　　原田　浩之，塩田　真	
論 文 題 目	The Morphological Evaluation of Denture Space in Glossectomy Patients	

（論文審査の要旨）

全部床義歯治療では，良好な義歯の維持，安定の獲得のために，デンチャースペースの考慮は重要事項として論じられてきた．舌，頬，口唇の筋機能運動は義歯安定の重要な要素であり，顎顔面補綴治療が必要な患者においても同様である．

機能運動的アプローチによるデンチャースペース記録法の一つに，西欧発祥であるピエゾグラフィー法がある．ピエゾグラフィー法では，流動性および粘性のある材料を利用し，術者が選択した発音をさせることで，舌および頬側の筋機能運動を記録し，記録されたピエゾグラフィー印象体を義歯形態へ反映させる．

本研究は，下顎無歯顎患者において，舌欠損を有する患者と舌欠損が無い患者を対象に，デンチャースペースの形態を評価したものである．デンチャースペースの考慮が必要なことは歯科補綴学では周知の事実であったが，その形態を 3 次元的に科学的に示し，分析した研究は行われておらず，2 次元での計測が中心だったデンチャースペース分野の研究を，シリコーン印象材がＣＴスキャン可能であることに着目し，コーンビームＣＴにてデンチャースペースを立体構造物として全方位から計測することにより，3 次元での精密計測を可能とした．その着想・新規性ならびに計測手法を発展させたことは高く評価される．

実際の計測においては，被験者群として舌欠損を有する下顎無歯顎患者 6 名，コントロール群として舌欠損が無い下顎無歯顎患者 7 名を対象に，ピエゾグラフィー法を用いてシリコーン印象材によるデンチャースペースの印象採得を行い，ピエゾグラフィー印象体をコーンビーム CT にてスキャンし，STL データ形式に変換して保存し，以下の２項目を計測した．

(1）咬合平面上における頬舌方向の印象体中心点および咬合平面への顎堤頂からの投影点の 2 点間距離

(2）(ⅰ)ピエゾグラフィー印象体舌側表面の咬合平面切断線，(ⅱ)瞳孔間線と口蓋縫線投影して設定したピエゾグラフィー印象体中心線，(ⅲ)中心線と垂直に交わる線，の 3 線で囲まれた面積を，中心線により左右に 2 分割して，大面積と小面積を決定し，計算された面積比（大面積：小面積）なお、(ⅲ)の垂線は舌側表面の中心点から 10,15,20,25mm 各 4 種類の距離に設定した．

得られた 2 点間距離および面積比のそれぞれを Mann-Whitney U test を用いて２群間で比較検討した．

本研究で得られた結果は，以下の通りである．

(１)咬合平面に投影された，ピエゾグラフィー印象体中心点と残存顎堤頂の 2 点間の距離は，舌欠損群 3.31mm，コントロール群 1.85mm で，舌欠損群の方が有意に大きかった．
（２）左右に 2 分割したピエゾグラフィー印象体舌房相当部の面積比は（ 対象群:コントロール群），10mm; 1.61:1.16, 15mm; 1.48:1.11, 20mm; 1.41:1.10, 25mm; 1.33:1.14 で，すべての垂線で舌欠損群の方が有意に大きかった．

以上の結果より，下顎無歯顎患者において，舌欠損を有する患者と舌欠損が無い患者では，デンチャースペースの形態が異なることが明確に示された．これは，舌欠損患者において，デンチャースペースを構成する複数の主要な器官のひとつである舌がデンチャースペースに及ぼすことを明確に示したものであるが, 他の様々な症例のデンチャースペースの分析にも使用できる画期的方法である．

以上より，本研究は，今後の歯科医学，医療，特に歯科補綴学臨床の進歩に寄与するところが大きいと考えられる．よって，本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分価値あるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Tumurkhuu Tsasan
論文審査担当者	主査　小野　卓史 副査　森尾　郁子、植野　正之
論　文　題　目	Association between maternal education and malocclusion in Mongolian adolescents: a cross-sectional study

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年、社会経済的格差が疾患の罹患率に影響を与えるという報告が多く認められている。しかし、不正咬合と社会経済的要因との関連について検討した報告は少ない。そこで、本研究では、昨今経済発展の著しいモンゴル国ウランバートル市における思春期の生徒を対象に、社会経済的要因が不正咬合の発症に与える影響について検討した。

本研究は、モンゴル国ウランバートル市における 2 つの公立の学校に在籍する生徒 557 名（男子 44.9%、11-16 歳、平均 12.8 歳）を対象として行い、歯列模型を作製し、矯正治療必要度指標（Index of Orthodontic Treatment Need: IOTN）に準じて、不正咬合の診査を行った。社会経済的要因については、質問票を用いて保護者の学歴および世帯収入について調査し、カイ二乗検定により、分布を分析した。またその他の生活環境や身体状況についても調査し、それらを調整した robust variance estimators によるポワソン回帰分析を用いて解析した。

モンゴル国ウランバートル市の 2 つの公立の学校における不正咬合の有病率は 35.2%（95%信頼区間[CI]: 31.2-39.2）であった。不正咬合と社会経済的要因との関連性について、学歴を 3 段階（低学歴：中卒以下、中等度学歴：高卒または専門学校卒、高学歴：大学卒以上）に分類して分析したところ、母親の学歴による有意差が認められた。不正咬合の有病率比（prevalence ratio: PR）は母親が高学歴の場合、低学歴の場合と比較して高い値を示し（PR=1.46; 95%CI:0.96-2.2）、交絡因子を調整した場合では、有病率比が 1.72（95%CI:1.06-2.82）と有意に高い結果となった。

モンゴルの思春期の生徒を対象にした実態調査により、モンゴル国ウランバートル市においては高学歴な母親の子供ほど不正咬合の有病率が増加するという結果を得た。今後、母親の学歴と不正咬合の発症との関係についてより詳細に検討していく必要があると思われる。

＜緒言＞

近年、社会経済的格差が疾患発症に影響を与えるとの報告が多くみられ、個人の健康を増進するには、社会経済的要因に焦点をあてることが有効であるとされている。そのため、個人を取り巻く環境を、社会経済的な観点から広くとらえることで、疾患発症メカニズムを明らかにし、複数の疾患の共通リスク因子に対する政策を立案することが重要となってきている。また、気候、

居住地域ならびに食習慣を含む生活様式が、下顎の形態に多様性を与えているとの報告がなされ、個々を取り巻く社会環境が顎顔面形態に与える影響について注目されてきている。アジアにおける同一人種間においても、それぞれの国における社会経済的要因を含む社会環境要因が、顎顔面形態の決定に影響を与え、不正咬合の発症にも関与する可能性が考えられる。

1990 年にモンゴル国は、社会主義経済から自由主義経済に移行し、急激に経済状況が変化した。その結果、生活環境や食習慣だけでなく、社会における男女の役割や負担の割合も変化してきた。社会情勢に伴う変化は特にウランバートル市などの都市部で顕著にみられ、社会主義国家から民主主義国家への移行を経験した若者がやがて成人し、次世代を産み育てる時代を迎え、これらの親子は、激変する社会経済変化の影響を受ける結果となっている。すなわち、このような社会環境要因は、少なくとも一部の疾患の発症において、親の世代のみならず子の世代にも直接的あるいは間接的に影響を与える可能性が疑われる。

現在、モンゴル国では、齲蝕予防に対する意識の高まりがみられている一方、不正咬合の予防に関してはまだあまり注目されていないのが現状である。口腔内疾患として頻度が高い齲蝕罹患と社会経済的要因との関連性についての報告はみられるものの、不正咬合と社会経済的要因との関連について検討した報告は少ない。そこで本研究では、経済発展の著しいモンゴル国ウランバートル市における思春期の生徒を対象に、社会経済的要因の一つである母親の学歴が不正咬合の発症に与える影響について検討した。

＜方法＞

□　対象

本研究は、モンゴル国ウランバートル市における 2 つの公立の学校に在籍する 1,540 名（5 歳−16 歳）を対象にした横断研究である。2013 年 9 月から 10 月にかけて行われた実態調査により得られた資料を使用した。1,540 名中、IOTN を使用するにあたり信頼できる結果が得られるとされている 11 歳以上の矯正治療の既往がある 7 名を除いた 557 名を解析に用いた。なお、本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会（承認番号: 961）およびモンゴル国立医科大学歯学部倫理委員会（承認番号: 13-12/1A）による承認を得て行われた。

□　不正咬合の診断

実態調査により得られた歯列模型を使用し、国際的な矯正歯科治療必要度指標 IOTN に基づき、矯正歯科医が不正咬合の診査を行った。IOTN は 5 段階で評価されるが、先行研究に基づき、grade 1-3 を矯正治療の必要性なし、grade 4-5 を治療が必要な不正咬合とした。なお、診査者間信頼度に関しては、東京医科歯科大学大学院顎顔面矯正学分野に在籍する 3 人の矯正歯科医間において、κ=0.68、一致度 96.7%と十分であった。

□　社会経済的要因に関する検討

社会経済的要因については、質問票を用いて保護者の学歴および世帯収入について調査した。保護者の学歴に関しては、3 段階（低学歴：中卒以下、中等度学歴：高卒または専門学校卒、高学歴：大学卒以上）に分類した。世帯収入についても 3 段階に分類した。

□　交絡因子に関する検討

社会経済的要因と不正咬合に関係しうる交絡因子として、質問票から対象者の性別、生年月日（年齢の算出）、出生体重、指しゃぶり癖等の習癖の有無、歯磨きの頻度、親の年齢、母親の妊娠中の環境要因（アルコール摂取ならびに喫煙、X 線被爆）および成育環境（哺乳瓶ならびにおしゃぶり使用の有無、兄弟の人数、朝食の摂取の有無、居住している住宅の種類）をそれぞれ、子供の要因・母親の要因・生活環境要因に分類し検討した。また、現在の齲歯数は学校健診の結果を使用した。

５．解析

それぞれの診査項目に関して、変数の種類や分布に応じて、カイ二乗検定および t 検定を用いて不正咬合の有無との比較を行った。さらに、母親の学歴と不正咬合の種類ならびに齲歯数についてカイ二乗検定および分散解析を用いて分布を分析した。高学歴の母親を有する群と低学歴の母親を有する群との不正咬合の有病率比（PR）の比較を、交絡因子を調整したポワソン回帰分析を用いて解析した。全ての解析の有意水準は $p<0.05$ とした。

＜結果＞

モンゴル国ウランバートル市の思春期の生徒における矯正治療を必要とする不正咬合の有病率は、35.2% （95% confidence interval [CI], 31.2–39.2）で、男子 38.4%（95%CI：32.3-44.5）、女子 32.6%（95%CI:27.3–37.8）であった。

不正咬合の有病率と、保護者の学歴ならびに世帯収入についての社会経済的要因に関する検討においては、母親の学歴との間にのみ正の相関が認められた。また、母親の学歴とその他の項目に関して検討したところ、母親の年齢、父親の年齢・学歴、世帯収入および居住している住宅との間に正の相関が認められた。また、母親の喫煙と子どもの人数との間に、負の相関が認められた。さらに、母親の学歴が高くなるにつれて哺乳瓶とおしゃぶりの使用が増加する結果が得られた。母親の学歴と不正咬合の種類別に解析したところ、高学歴な母親の子どもほど、大臼歯咬合関係が増悪する結果が得られ、永久歯の萌出障害を生じていた。

不正咬合の有病率比（PR）は母親が高学歴の場合、低学歴の場合と比較して高い値を示し（PR=1.45; 95%CI:0.96-2.2）、交絡因子を調整した場合では、有病率比が 1.72（95%CI:1.06-2.82）と有意に高かった。

＜考察＞

本研究は、経済状況が著しく変化しているモンゴル国ウランバートル市において、社会経済的要因と不正咬合の有病率の関係を検討した最初の報告であり、発展途上国における都市部では、母親の学歴が高いほど、不正咬合の有病率が高いという結果を得た。

社会主義経済から自由主義経済への移行に伴い市場が自由化し、さまざまな食物を摂取することが可能となった。その結果、糖分を多く含んだ嗜好品が豊富に流通し、齲蝕罹患率が急激に増加した。今回の実態調査に参加した生徒の齲蝕罹患率は 95.1%であったことから、今回の調査に

おいては母親の学歴と齲歯数との間に相関関係を見出すことはできなかったものの、学歴が高い母親の子どもの方が、大臼歯咬合関係の異常をより多く認め、永久歯の萌出障害を生じる頻度が高い傾向にあった。この結果は、齲蝕により乳歯が早期に喪失することで隣在歯の移動が起こり不正咬合をもたらしたのではないかと考えられた。また、社会経済状況の変化により、高学歴な母親が社会進出する機会が増加してきており、食生活において、伝統的な食事よりも、加工されたより柔らかい食事を子どもに与えていることが推測され、咀嚼パターンの変化に伴い下顎の成長に影響を与えている可能性も考えられた。これらの因果関係を明確にするためには、乳歯列期からのより広範な縦断研究が今後必要になるものと考えられた。

＜結論＞

モンゴルの思春期の生徒を対象にした実態調査により、モンゴル国ウランバートル市においては高学歴な母親の子どもほど不正咬合の有病率が増加するという結果を得た。

これらの結果は、著しく経済状況が変化している国において、経済状況や生活様式の急変をもたらす社会経済的要因が、母親を介して子どもの咬合発育に影響を与えた可能性を示唆しており、不正咬合発症メカニズムを明らかにするうえで貴重な基礎データになり得ると考える。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5246　号	Tumurkhuu Tsasan
論文審査担当者	主　査　小野　卓史 副　査　森尾　郁子、植野　正之	
論 文 題 目	Association between maternal education and malocclusion in Mongolian adolescents: a cross-sectional study	

（論文審査の要旨）

近年、社会経済的格差が疾患発症に影響を与えるという報告が多くみられ、個人の健康増進のためには、社会経済的要因に焦点をあてることが有効であるとされている。そのため、個人を取り巻く環境を、社会経済的な観点から広くとらえることで、疾患発症メカニズムを明らかし、複数の疾患の共通リスク因子に対する政策を立案することが重要となってきている。また、気候、居住地域ならびに食習慣を含む生活様式が、下顎の形態に多様性を与えているとの報告もあり、個々を取り巻く社会環境が顎顔面形態に与える影響について注目されてきている。アジアにおける同一人種間においても、それぞれの国における社会経済的要因を含む環境要因が、顎顔面形態の決定に影響を与え、不正咬合の発症にも関与する可能性が考えられる。

1990 年にモンゴル国は、社会主義経済から自由主義経済に移行し、急激に経済状況が変化した。その結果、生活環境や食習慣だけでなく、社会における男女の役割や負担の割合も変化してきた。社会情勢に伴うこのような変化は特にウランバートル市などの都市部で顕著にみられ、社会主義国家から民主主義国家への移行を経験した若者がやがて成人し、次世代を産み育てる時代を迎え、これらの親子は、その激変する社会経済変化の影響を相互に受ける結果となっている。すなわち、このような社会環境要因は、少なくとも一部の疾患の発症において、親の世代のみならず子の世代にも直接的あるいは間接的に影響を与える可能性が疑われる。

現在、モンゴル国では、口腔疾患として頻度が高い齲蝕罹患と社会経済的要因との関連性についての報告はみられるものの、不正咬合と社会経済的要因との関連について検討した報告は少ない。そこで本研究では、経済発展の著しいモンゴル国ウランバートル市における 557 名（11-16 歳）の思春期の生徒を対象に、社会経済的要因の一つである母親の学歴が不正咬合の発症に与える影響について検討した。

方法として、実態調査により得られた歯列模型を使用し、矯正歯科医が国際的な矯正治療必要度指標（Index of Orthodontic Treatment Need: IOTN）に基づき不正咬合の診査を行った。IOTN は 5 段階で評価されるが、先行研究に基づき、grade 1-3 を矯正治療の必要性なし、grade 4-5 を治療が必要な不正咬合とした。なお、診査者間信頼度に関しては、東京医科歯科大学大学院顎顔面矯正学分野に在籍する 3 人の矯正歯科医が行ったところ κ=0.68、一致度 96.7%と高かった。社会経済的要因に関する検討は、質問票を用いて保護者の学歴および世帯収入について調査した。保護者の学歴に関しては、3 段階（低学歴：中卒以下、中等度学歴：高卒または専門学校

卒、高学歴：大学卒以上）に分類した。世帯収入についても 3 段階に分類して行った。また、交絡因子に関する検討は質問票から対象者の性別、生年月日（年齢の算出）、出生体重、指しゃぶり癖等の習癖の有無、歯磨きの頻度、親の年齢、母親の妊娠中の環境要因（アルコール摂取ならびに喫煙、X 線被爆）および成育環境（哺乳瓶ならびにおしゃぶり使用の有無、兄弟の人数、朝食の摂取の有無、居住している住宅の種類）、子供の要因・母親の要因・生活環境要因に分類し検討した。また、現在の齲歯数は学校健診の結果を使用した。

それぞれの診査項目に関して、変数の種類や分布に応じて、カイ二乗検定および t 検定を用いて不正咬合の有無との関連を分析した。さらに、母親の学歴と不正咬合の種類ならびに齲歯数との関連についてカイ二乗検定および分散解析を用いて分析した。高学歴の母親を有する群と低学歴の母親を有する群間との有病率比（PR）の比較を、交絡因子を調整したポワソン回帰分析を用いて解析した。全ての解析の有意水準は $p<0.05$ とした。

研究結果として、以下の知見を得ている。

１．モンゴル国ウランバートル市の思春期の生徒における矯正治療を必要とする不正咬合の有病率は、35.2%（95% confidence interval [CI]:31.2–39.2）で、男子 38.4%（95%CI:32.3-44.5）、女子 32.6%（95% CI:27.3–37.8）で、男女差は認められなかった。

２．不正咬合の有病率と社会経済的要因との関連においては、母親の学歴との間にのみ正の相関が認められた。母親の学歴とその他の項目について検討したところ、母親の年齢、父親の年齢・学歴、世帯収入および居住している住宅との間に正の相関が認められた。また、母親の喫煙と子どもの人数との間に、負の相関が認められた。さらに、母親の学歴が高くなるにつれて哺乳瓶とおしゃぶりの使用が増加する結果が得られた。母親の学歴と不正咬合の種類について解析したところ、高学歴な母親の子どもほど、大臼歯咬合関係が増悪する結果が得られ、永久歯の萌出障害を生じていた。

３. 不正咬合の有病率比（PR）は母親が高学歴の場合、低学歴の場合と比較して高い値（PR=1.45; 95%CI:0.96-2.2）示し、交絡因子を調整した場合では、有病率比が 1.72（95%CI:1.06-2.82）と有意に高かった。

モンゴルの思春期の生徒を対象にした実態調査により、モンゴル国ウランバートル市においては高学歴な母親の子どもほど不正咬合の有病率が増加するという結果を得た。これらの結果は、著しく経済状況が変化している国において、経済状況や生活様式の急変をもたらす社会経済的要因が、母親を介して子どもの咬合発育に影響を与えた可能性を示唆しており、不正咬合発症メカニズムを明らかにするうえで貴重な基礎データになり得ると考える。

以上より、本研究の着眼点とその成果は高く評価され、臨床歯学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士 (歯学) の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山口　博之
論文審査担当者	主査　春日井　昇平 副査　和泉　雄一　　中濱　健一
論　文　題　目	New approach to transfect NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides into the periodontal tissue using ultrasound-microbubble method

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

炎症性歯周疾患は世界的に多くの人々が罹患している疾患であり、これまで細菌などの外来性要因の排除を主とする治療が行われてきたが、近年では、宿主因子に着目した様々な治療方法が模索されている。その中で炎症に係る核内転写因子である NF-κB（初出はスペルアウトする）に着目した報告がある。NF-κB は、通常不活化状態で細胞質内に存在しているが、リポ多糖（LPS）やサイトカインなどの外来刺激により活性化されると核内へと移行し、遺伝子上の NF-κB に対する結合部位へと作用することで、炎症性サイトカインや細胞接着因子などの産生を促進することが知られている。NF-κB の活性を抑制する方法や NF-κB の働きを阻害する方法については過去に様々な報告がある。一方、NF-κB 認識配列を含む二本鎖 DNA オリゴヌクレオチドである NF-κB デコイは、NF-κB 認識配列部分を有することで、遺伝子上の認識配列部分への結合を競合的に阻害することにより、NF-κB の結合により惹起される様々な反応を阻害することが可能である。NF-κB デコイに関する研究は数多く行われており、アトピー性皮膚炎の治療や心臓移植拒絶反応の防止、心筋炎の進展予防および動脈損傷による内膜肥厚防止などでの有用性が報告されている。また、アトピー性皮膚炎や心臓バイパス手術時の血栓予防に関して、人体における NF-κB デコイの応用についての既報もあり、その効果や安全性についても高く評価されている。デコイの生体組織への導入方法に関しては、血管への NF-κB デコイの超音波発生装置とマイクロバブルを用いた導入法が開発されている。超音波マイクロバブル法とは、直径 1～10μmのマイクロバブル溶液と NF-κB デコイ溶液を超音波用ゲルに混濁したものを、目的の部位に塗布し、その後速やかに超音波を照射することで照射部位周囲にある細胞の細胞膜表面に一時的に小孔を開き、迅速かつ効率的な NF-κB デコイの導入を可能にする遺伝子導入の一方法である。しかしながら、超音波マイクロバブル法による歯周組織への NF-κB デコイの導入に関する報告はない。そこで本研究では、歯周組織への超音波マイクロバブル法による導入効率の検証と、導入された NF-κB デコイが炎症性サイトカインや細胞接着因子の産生にどのように影響するかを調査することを目的として実験を行った。

＜材料と方法＞

8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを無作為にコントロール群（C）、スクランブルデコイゲルを上

顎第二臼歯近傍の口蓋側歯肉に対し、塗布のみを行った群（A-Sc）、スクランブルデコイゲルの塗布の後に低出力超音波（0.5W/cm^2、1.0MHz、duty 50%）を照射した群（LUM-Sc）、同様に高出力超音波（2.0W/cm^2、1.0MHz、duty 50%）を照射した群（HUM-Sc）および NF-κB デコイゲルの塗布後に高出力超音波による導入を行った群（HUM-NF）の 5 群に分け実験を行った（各群 n=6）。スクランブルデコイとは同じ塩基組成をランダム配列にすることで、NF-κB デコイと同じ組成でありながら下流のタンパク質の発現に影響を与えないネガティブコントロール用核酸のことである。本実験では導入様相の可視化を目的として、スクランブルデコイの 5’末端に対し 6-FAM（励起波長：492nm）による蛍光標識を行った。

3.6%抱水クロラールにて腹腔内麻酔（0.9 mℓ/g）を行った後、A-Sc 群のマウスの上顎右側第二臼歯近傍の口蓋側歯肉に、スクランブルデコイとマイクロバブル溶液を超音波用ゲルに混濁したものの塗布を行った。LUM-Sc および HUM-Sc 群では同様にゲルの塗布を行い、速やかにそれぞれの出力にて超音波の導入を 60 秒間行った。C 群にはデコイやマイクロバブルを含まない超音波用のゲルのみを塗布した。処置後 2 時間後に屠殺し、上顎骨を取り出し、川本法に従い前頭断、厚さ 10μm の未固定非脱灰凍結切片を作製し、HE 染色による組織学的な解析、及び共焦点レーザー顕微鏡（FV10i-DOC）を用いた 6-FAM の蛍光強度の測定を行った。蛍光強度の解析においては、右側第二臼歯付近の連続切片を 5 枚取り出し、それぞれの切片で測定領域として歯肉上皮、歯肉下結合組織、歯槽骨よりそれぞれ 50μm×50μm の正方形を設定し、各領域の測定を 3 度行い、その平均値を各個体の蛍光強度として算出した。蛍光強度の測定には FLUOVIEW ソフトウェアを用いた。

また、HUM-Sc、HUM-NF および C 群ではウェスタンブロッティング法を用いてタンパク質量の観察を行った。HUM-Sc 群では上顎右側第二臼歯近傍の口蓋側歯肉に上記方法と同様にスクランブルデコイの導入を行い、HUM-NF 群では NF-κB デコイの導入を行った。コントロール群には超音波ゲルを塗布したのみとした。処置 2 時間後に、生理食塩水にて口腔内に残存しているデコイゲルを洗浄した後に、すべての群にて上顎右側口蓋側歯肉を 2.0 ㎜×2.5 ㎜の範囲で取り出し、RIPA buffer を用いて通法に従いタンパク質の抽出を行い、ウェスタンブロッティング法により IL-1β、IL-6、ICAM-1 の発現の解析を行った。統計学的手法として、一元配置分散分析とテューキーの検定を用い、有意水準は 5%とした。

＜結果＞

超音波マイクロバブル法を用いた HUM-Sc 群および LUM-Sc 群では、A-Sc 群と比較して測定したすべての部位で有意に強い蛍光強度を示した。特に歯肉下結合組織においては、HUM-Sc 群が LUM-Sc 群と比較して有意に強い蛍光強度を示したことから、デコイの組織浸透が超音波の出力の強弱に影響を受けていることが示唆された。また、A-Sc 群と C 群の間には有意に蛍光強度の差異がなかったことから、A-Sc 群のようにデコイの塗布のみではデコイの歯周組織内への浸透は十分に起こらず、HUM-Sc 群および LUM-Sc 群のように、超音波マイクロバブル法を用いることにより、歯肉上皮を越えた歯周組織への効率的な浸透が起こることが示唆された。また、HUM-NF 群では HUM-Sc 群および C 群と比較して有意に歯周組織での IL-1β、IL-6 および ICAM-1 のタンパク量は減少しており、NF-κB デコイが歯肉への導入後に NF-κB 下流のタンパク質の分布に影響を与えることが明らかとなった。また、HUM-Sc 群および C 群ではそれらのタンパク量には有意

な差は無かったことから、超音波マイクロバブル法の手技自体が照射部位の炎症性タンパク質量に影響を与えないことが示唆された。

＜考察＞

本実験の結果より、我々はNF-κBデコイの歯周組織への新規導入方法として超音波マイクロバブル法の有用性が示された。また、口腔内は唾液による湿潤環境であり、軟膏やゲルを目的の部位に長時間とどめておくことは困難な環境であることから、薬剤や核酸医薬の導入において、迅速で効率的、かつ局所的であることが望まれている。本実験では60秒間の超音波照射を行った組織における導入2時間時においてデコイの浸透および炎症性サイトカインへの発現減少させることが確認されたことから、超音波マイクロバブル法は口腔内という環境の特殊性を考えた上でも、有効な手法であることが示唆された。

また、歯肉表面は角化扁平上皮に覆われており、上皮細胞の密な構造は外部に対する物理的なバリアとして作用している。歯周組織へのデコイや遺伝子導入の先行研究では、上皮下歯周組織への注射による導入が行われているが、歯肉上皮を介した非侵襲性の導入はこれまで報告はない。本研究では超音波マイクロバブル法を用いることにより、歯肉上皮を介したデコイをはじめとする核酸医薬の導入の可能性を示すことができた点も本研究から得られた新たな知見であると考えられる。

さらに、歯周組織で調査したIL-1β、IL-6およびICAM-1といったNF-κB下流の歯肉の炎症の発生に関わるタンパク質量がNF-κBデコイの導入で減少したことが明らかとなったが、この結果はアトピー性皮膚炎や心臓疾患、臓器移植の拒絶反応や歯周病モデルへのNF-κBデコイ導入を行った先行研究によって得られた結果らと同様であった。しかしながら、本研究は炎症状態の歯肉に対してのものではなく、マウスの健常歯肉に対する結果であることから、今後は歯周病モデルなどの局所の炎症モデルに対して同様の手技で実験を行い、その結果を検証することが必要である。また、本実験の導入方法を歯周病の治療や予防の新たな方法として確立させるためにはさらなる実験を遂行し、NF-κBデコイによる炎症反応の抑制や歯槽骨減少の抑制のみではなく、歯槽骨の再生や歯肉の再生などとの関連についても解析すべきであると考えている。

＜結論＞

超音波マイクロバブル法を用いた歯周組織へのNF-κBデコイ導入により、下流のIL-1β、IL-6およびICAM-1の歯周組織におけるタンパク量の減少が認められ、歯周組織へのデコイ導入方法として超音波マイクロバブル法の有用性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5247　号	山口　博之
論文審査担当者	主　査　春日井　昇平 副　査　和泉　雄一　　中濱　健一	
論　文　題　目	New approach to transfect NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides into the periodontal tissue using ultrasound-microbubble method	

（論文審査の要旨）

炎症性歯周疾患は世界的に多くの人々が罹患している疾患であり、これまで細菌などの外来性要因の排除を主とする治療が行われているが、近年、宿主因子に着目した様々な治療方法が模索されている。山口らは超音波マイクロバブル法を用いた、NF-κB デコイの歯周組織への新規導入方法の開発を目的に、本論文においてベースラインとなる実験を計画し実行している。

研究方法としては、8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスをコントロール群（C)、スクランブルデコイゲルを上顎第二臼歯近傍の口蓋側歯肉に対し、塗布のみを行った群（A-Sc)、スクランブルデコイゲルの塗布の後に低出力超音波を照射した群（LUM-Sc)、同様に高出力超音波を照射した群（HUM-Sc）および NF-κB デコイゲルの塗布後に高出力超音波による導入を行った群（HUM-NF）の 5 群に分け実験を行っている。スクランブルデコイとは、NF-κB デコイと同じ塩基組成をランダム配列にすることで､NF-κB デコイと同じ組成でありながら NF-κB 下流のタンパク質の発現に影響を与えないネガティブコントロール用核酸のことである。本実験では導入様相の可視化を目的として、スクランブルデコイに対し 6-FAM による蛍光標識を行った。処置後 2 時間後に屠殺し、上顎骨を取り出し、前頭断の未固定非脱灰凍結切片を作製し、HE 染色による組織学的な解析、及び共焦点レーザー顕微鏡を用いた 6-FAM の蛍光強度の測定を行った。

また、HUM-Sc、HUM-NF および C 群ではウェスタンブロッティング法を用いてタンパク質量の観察を行った。HUM-Sc 群では上顎右側第二臼歯近傍の口蓋側歯肉に上記方法と同様にスクランブルデコイの導入を行い、HUM-NF 群では NF-κB デコイの導入を行った。コントロール群には超音波ゲルを塗布したのみとし、処置 2 時間後に、すべての群にて上顎右側口蓋側歯肉を 2.0 ㎜×2.5 ㎜の範囲で取り出し、ウェスタンブロッティング法により IL-1β、IL-6、ICAM-1 の発現の解析を行った。統計学的手法として、一元配置分散分析とテューキーの検定を用い、有意水準は 5%とした。

研究結果としては以下の知見を得ている。

1.　HUM-Sc 群および LUM-Sc 群では、A-Sc 群と比較して測定したすべての部位で有意に強い蛍光強度を示した。特に歯肉結合組織においては、HUM-Sc 群が LUM-Sc 群と比較して有意に強い蛍光強度を示した。また、A-Sc 群と C 群の間には蛍光強度の有意な差異を認めなかったことから、A-Sc 群で示すデコイ塗布のみでは歯周組織内への浸透は十分に起こらず、HUM-Sc

群および LUM-Sc 群のように、超音波マイクロバブルを併用することにより、歯肉上皮層を越えた歯周組織への核酸医薬の効率的な浸透が起こることが明らかになった。
2.　HUM-NF 群では HUM-Sc 群および C 群と比較して有意に歯周組織での IL-1β、IL-6 および ICAM-1 のタンパク量は減少しており、NF-κB デコイが歯肉への導入後に NF-κB 下流のタンパク質の分布に影響を与えたことが明らかとなった。また、HUM-Sc 群および C 群ではそれらのタンパク量には有意な差は無かったことから、超音波マイクロバブル法の手技自体が下流のタンパク質発現に影響を与えないことが示唆された。

本実験の結果より、山口らは NF-κB デコイの歯周組織への新規導入方法として超音波マイクロバブル法の有用性を示した。また、口腔内は唾液による湿潤環境であり、軟膏やゲルを目的の部位に長時間とどめておくことは困難な環境であることから、薬剤や核酸医薬の導入において、迅速で効率的な導入が望まれる。本実験では超音波照射を 60 秒間行った組織における導入 2 時間後でのデコイの導入および炎症性サイトカインへの発現制御効果が確認されたことから、超音波マイクロバブル法は口腔内という環境の特殊性を考えた上でも、有効な手法であることが示唆された。
また、歯肉表面は角化扁平上皮に覆われており、上皮細胞の密な構造は外部に対する物理的なバリアとして作用している。歯周組織へのデコイや遺伝子導入の先行研究では、歯肉上皮下組織への注射による導入が行われてきたが、歯肉上皮を介した導入に関する報告はこれまでない。本研究では超音波マイクロバブル法を用いることにより、歯肉上皮を介したデコイをはじめとする核酸医薬の導入の可能性を提示することができた点も本研究から得られた新たな知見は、将来の口腔内粘膜に対する核酸医薬応用に利するところが大きいと考えられる。
さらに、歯周組織で調査した IL-1β、IL-6 および ICAM-1 といった NF-κB 下流の歯肉の炎症に関わるタンパク質量が NF-κB デコイの導入で減少したことが明らかとなったが、この結果はアトピー性皮膚炎や心臓疾患、臓器移植の拒絶反応や歯周病モデルへの NF-κB デコイ導入を行った先行研究によって得られた結果と同様であった。

以上より、本研究は新たな歯周組織へのデコイ導入方法としての超音波マイクロバブル法の有用性を初めて明らかにしたものであり、今後の歯科領域での核酸医薬分野における発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉井　詠智
論文審査担当者	主査　　深山 治久 副査　　品田 佳世子，古屋 純一
論　文　題　目	要介護高齢者の適切な基礎代謝量算出方法としての生体電気インピーダンス法と予測式の比較

（論文内容の要旨）

[緒言]

入院患者や入所および在宅療養者の 3 割から 4 割が低栄養であると報告されている．近年介護老人福祉施設では，要介護高齢者の低栄養を防ぐために，栄養マネジメントの一つとして推定基礎代謝量をもとにエネルギー必要量を算出して食事の提供を行うことが多くみられるようになった．その推定基礎代謝量をいかに的確に算出するかが，要介護高齢者の低栄養を予防する観点から重要であり，経口維持の目的や歯科訪問診療において歯科医師が患者に関わる場合にも重要な情報である．ただし，高齢者のエネルギー必要量は基礎代謝量と身体活動レベルの個人差が大きいことから，基準値を参考に個人別に検討する必要があるといわれている．

基礎代謝量は，一般的には Harris－Benedict の式（以下 HBE）などを用いて推定する方程式が広く用いられている．しかし，HBE は欧米人の体格に合わせて確立された算出式であるため，過大評価してしまうという報告がある．よって近年，日本人の基礎代謝量を算出するために適した方程式として国立健康・栄養研究所の式（以下 Ganpule の式）が用いられるようになってきており，日本人において最もよく当てはまる式であるとされている．

また，個々の身体組成の測定については，医療機器として承認されている生体電気インピーダンス法（Bioelectrical impedance analysis（以下 BIA））の一つである体成分分析装置がある．これは骨格筋量を除脂肪量から求めるもので，それにより基礎代謝量が算出される．BIA は二重エネルギーX 線吸収測定法（Dual energy X-ray absorptiometry（以下 DEXA））や核磁気共鳴画像法（Magnetic resonance imaging（以下 MRI））とも相関が高く信頼性もあり，透析患者の浮腫率測定や栄養評価，体水分量測定についても高い精度がある．

そこで，今回われわれは日本人の要介護高齢者により適切な必要栄養量を算出することを目的として，まず BIA と Ganpule の式の結果から得られる基礎代謝量の比較を行った．さらにそれらの数値が一致しない場合の原因を検討した．

[方法]

対象者は，2014 年 7 月時点で東京都内 4 か所の介護老人福祉施設に入所する同意の得られた要介護高齢者 227 名とした．そのうち褥瘡，炎症性疾患（ネフローゼ，肝臓障害による急性肝炎，

肝硬変，悪性腫瘍），甲状腺機能障害，糖尿病，ペースメーカー装着者，測定結果エラーの 6 項目のいずれかに該当する 50 名は除外した．

本研究の対象者は要介護高齢者 177 名とした．調査項目は，基礎情報（年齢，身長，体重，既往歴，要介護度），栄養状態（Body mass index （以下 BMI）），筋肉量（骨格筋指数(Skeletal muscle mass index（以下 SMI））），体成分(除脂肪量(Fat- free mass（以下 FFM））)，体脂肪量(Body fat mass（以下 BFM））），体水分バランス（ratio of extracellular water to total body water（以下 ECW/TBW）），基礎代謝量（Resting energy expending（以下 REE））），Ganpule の式による REE とした．

各データの抽出方法及び計測方法，算出式を以下に示す．

＜計測方法＞

体成分：体成分分析装置（InBody s10：株式会社インボディジャパン）（認証番号: 第 223 AFBZX00130000 号, 医療機器) を用いて測定される項目のうち, 4 項目(FFM, BFM, ECW/TBW,REE）のデータを用いた．測定は食後 2 時間経過時とした．測定回数は 1 回，測定姿勢は座位または仰臥位で体水分の状態を安定させるために，同一の姿勢で 15 分間安静ののちに測定した．ECW/TBW の値が 0.4 以上を浮腫あり群，0.4 未満を浮腫なし群とした．

＜算出式＞

BIA の測定結果より得られた値と Ganpule の式から算出した値をそれぞれ使用した．REE として BIA より算出された値を使用した．基礎代謝基準値（kcal/kg/日）はそれぞれの REE を用いて REE(kcal)÷体重(kg)により算出した．

＜解析方法＞

統計解析には IBM SPSS　Statistics　ver.20（日本 IBM，東京）を使用した．統計はデータの性差を明らかにするために男女間の比較を t 検定と Mann-Whitney の U 検定を用いた．また基礎代謝基準値の Ganpule の式と BIA の有意差検定には対応のある t 検定を行い，REE との相関には Pearson の相関係数を用い，重回帰分析はステップワイズ法を使用した．統計学的有意水準は 5% 未満とした．

[結果]

1.被験者について

被験者の要介護度中央値は 4 であった. BMI より男女共に平均値での低栄養状態は認められなかったが，ECW/TBW の値より男性（58.6%），女性（70.9%）ともに浮腫がみられた．男女間においては，年齢，身長，体重の他，SMI や FFM で差が見られた（$p<0.01$）．基礎代謝基準値は，Ganpule の式で算出した値に性差が見られたが（$p<0.01$），BIA には見られなかった．また，男女ともに BIA を用いた基礎代謝基準値は Ganpule の式を用いて算出された数値より有意に高値であった（$p<0.01$）．

2.REE の差に及ぼす因子について

BIA による REE の結果では性差はみられなかったため, 算出方法による REE の違いを BIA＞Ganpule の式群と BIA≦Ganpule の式群で比較した．男性においては SMI，FFM，BFM，ECW/TBW（$p<0.05$，$p<0.01$），女性においては，要介護度以外の全ての項目で差が見られた（$p<0.05$，$p<0.01$）．また，男女ともに BIA＞Ganpule の式群は FFM，ECW/TBW が BIA

≦Ganpule の式群より有意に大きく，SMI と BFM は小さい値を示した（p＜0.05，p＜0.01）．また Ganpule の式による基礎代謝基準値には差が見られなかったが，BIA による値は BIA＞Ganpule の式群が高値を示した（p＜0.01）．

BIA による REE の値と相関関係が見られた項目は要介護度，SMI，FFM，BFM，ECW/TBW であった. Ganpule の式による相関関係が見られた項目は BMI，SMI，FFM，BFM であった．

また Ganpule の式から得られた REE と BIA との REE の差に及ぼす因子を検討するために，ステップワイズ法を用いて多変量解析を行った．その結果，男性において SMI が有意な因子として挙げられ（F＝20.86，p≦0.001），女性においては，FFM が有意な因子として挙げられた（F＝127.63，p≦0.001）．

[考察]

被験者の ADL 自立度は極めて低い状態にあるが，栄養状態は平均すると比較的良好に保たれていた．しかし，個々のデータをみてみると被験者の 40－50％が低栄養状態であった．今回の調査は介護老人福祉施設のみのデータのため，過去の報告より低栄養状態の者がやや多かったが，要介護 4，5 における PEM（タンパク質・エネルギー欠乏症）リスク者が 6 割と高頻度であったという報告もあり，それとは近似していた．

BIA の REE に影響を及ぼす SMI や FFM は同年代の要支援高齢者の平均値より低値を示した．ECW/TBW は細胞外水分と細胞内水分比を体水分バランスとしているもので，測定時の視診では被験者に明らかな浮腫が認められなくても，ECW/TBW の値により要介護高齢者は細胞外水分が増加しており，浮腫がみられることが明らかとなった．介護老人福祉施設に入所している要介護高齢者の多くは車椅子を使用しており，今回の調査の対象者も同様である．さらに，栄養状態が不良な者が 40－50％存在しており，相関は見られなかったが，原因の一つとなる浮腫の可能性も否定できないと考える．ECW/TBW は正常値が 0.38 とされており，0.4 を超えるとかなりの浮腫と判断できるということからこの浮腫の割合としては介護老人福祉施設に入所する要介護高齢者の浮腫率としては決して低くない数字ではないかと考えられる．さらに，男女間の浮腫の割合の違いについては，骨格筋量と浮腫率は負の相関があるという報告があり，今回の調査でも SMI は女性のほうが有意に低値であった．これは，女性は男性に比べて骨格筋量が少なく，細胞内液が減少することで浮腫が生じているという過去の報告とも一致している．また BIA>Ganpule の式群は，男女ともに SMI が小さいにも関わらず，FFM は高値を示しており，さらに浮腫が見られることが明らかとなった．BIA は FFM から REE を算出するものであり，体水分も FFM としてカウントしてしまうため，浮腫があると，その水分も FFM として REE が算出されるからではないかと考える． REE の差に及ぼす因子として，男性は SMI，女性は FFM が挙げられている．要介護高齢者において，筋肉量の多い男性は REE を BIA にて算出可能である．しかしながら，筋肉量がもともと少ない女性は, BIA により REE を計測する際に Ganpule の式から得られる値よりも FFM が筋肉量として多くカウントされることにより REE が多く算出される可能性が明らかとなった．

REE については，現在，世界的にも多く用いられている HBE や日本人に適していると言われる Ganpule の式は推定式である．高齢者の体組成は個人差が大きいことにより，それぞれ個人の体組成に即した REE の算出が理想であり BIA で算出する方が望ましいと考えた．しかしながら，

BIA を用いた要介護高齢者の REE の検討はこれまでに行われていないため，日本人によく当てはまるとされている Ganpule の式と体組成の計測が可能な BIA で REE の比較を行ったところ，要介護高齢者において BIA から得られる REE は Ganpule の式から算出される値より高く，差が生じた．健常者における BIA の信頼性は高いものであるが，要介護高齢者は浮腫が多く，それにより REE が多く算出されることが判明した．上記が高齢者に適した数値であるかは施設入所者の実際の経口摂取量の把握が困難であり，REE との比較を行えなかったために明らかにできなかった．今後は実際の経口摂取量や経管栄養からのカロリー摂取量の把握と栄養状態との関連について検討し，Ganpule の式から得られた REE が少ないのか，BIA から算出された結果が過大なものであるのかを明らかにし，要介護高齢者の低栄養状態の改善に向けて適切な REE の把握が重要であると考える．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5248　号	吉井　詠智
論文審査担当者	主査　　深山 治久 副査　　品田 佳世子，古屋 純一	

（論文審査の要旨）

入院患者や施設入所および在宅療養者の 3～4 割が低栄養状態の高齢者であると報告されている．近年介護老人福祉施設では，要介護高齢者の低栄養を防ぐために，栄養マネジメントの一つとして推定基礎代謝量を基にエネルギー必要量を算出して食事の提供を行っている．その推定基礎代謝量をより的確に算出することが，要介護高齢者の低栄養を予防する観点から重要である．高齢者は基礎代謝量と身体活動レベルの個人差が大きいことから，エネルギー必要量は数式ではなく生体電気インピーダンス法（以下 BIA）を用いた方法が適切ではないかという仮説を基に本研究では多様な基礎代謝量測定法の中から BIA と国立健康・栄養研究所の式（以下 Ganpule の式）を用いた．近年，BIA は透析患者の浮腫率測定や栄養評価，体水分量測定についても高い精度を示し，筋肉量を計測できる装置としてサルコペニアの診断にも多用され，高齢者の筋肉量の評価にも使用されているものである．BIA は体組成を評価する方法の一つで除脂肪量から求め，一方 Ganpule の式は推定式であり日本人に最も適しているといわれているものである．これまで BIA，Ganpule の式を用いた要介護高齢者への基礎代謝量の検討は行われていない．

このような背景のもと吉井は、本学歯学部倫理審査委員会の承認 (第 1026 号)を得て、日本人の要介護高齢者に，より適切な必要栄養量を算出することを目的として，BIA と Ganpule の式の結果から得られる基礎代謝量の比較を行った．さらに数値が一致しない場合の原因を検討した．研究方法として、介護老人福祉施設に入所する要介護高齢者 177 名を対象に基礎情報，栄養状態，筋肉量，体組成を基にそれぞれの基礎代謝量の評価を行った。

研究結果として以下の所見が得られた。

1. 過去に行われた基礎代謝量測定法の中の一つとされている直接法（体より発散される熱量を直接カロリメーターで測定するもの）を用いた研究では基礎代謝量に男女差があった．しかしながら，本研究においては BIA による基礎代謝量の結果では性差は認められなかった．
2. １の結果を踏まえ，算出方法による基礎代謝量の差における特徴を検討した所，基礎代謝量が BIA＞Ganpule の式群では，男女ともに SMI（骨格筋指数）が小さいにも関わらず，FFM（除脂肪量）は高値を示した．また ECW/TBW（体水分バランス）が 0.4 以上であることから，浮腫が見られることが明らかとなった
3. BIA より算出される基礎代謝量は，Ganpule の式より得られる基礎代謝量より高く評価される傾向があり，男性は SMI，女性は FFM がその差に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった．

以上の結果をもとに吉井は以下のように考察した．介護老人福祉施設での要介護高齢者において，BIA から得られる基礎代謝量は Ganpule の式から算出され得られた値より高く，差が生じたことより，浮腫を持たない健常者における BIA の信頼性は高いが，要介護高齢者は浮腫を有する者が多く，それにより基礎代謝量が多く算出される可能性が判明した有用な考察であると考えられた。このことよりさらなる研究で臨床現場でより簡便に利用できる方法を見出すために有用な基盤となり得る考察である．

以上のように，本研究は、要介護高齢者の算出方法による基礎代謝量の差に影響を及ぼす因子として，男性は SMI,女性は FFM であることが明らかにし，要介護高齢者でも筋肉量の多い男性は基礎代謝量を BIA にて算出可能であるが, 筋肉量がもともと少ない女性は BIA により基礎代謝量を計測することは，Ganpule の式から得られる値よりも除脂肪量が多くカウントされることにより基礎代謝量が多く算出される可能性が明らかとなったはじめての研究であり、高齢者歯科学のみならず、今後の歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられた。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	久保田　チエコ
論文審査担当者	主査　谷口　尚 副査　古屋　純一，佐々木　好幸
論　文　題　目	Association between chewing-stimulated salivary flow under the effects of atropine and mixing ability assessed using a color-changeable chewing gum

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

唾液は口腔粘膜の湿潤，虫歯予防などに重要な役目を果たしている．また，口腔乾燥は，味覚障害，固い食物に対する咀嚼能力の低下，義歯の安定不良，構音障害など様々な問題を引き起こす．さらに口腔乾燥感を有する者は，粘着物の摂取が困難で未精製の穀物等の摂取量が減少，主観的咀嚼能力評価での咀嚼困難感をもつことが報告されている．このように唾液量と咀嚼能力は関連しているため，咀嚼能力を判定する際にはその咀嚼能力評価法と唾液量との関係を明らかにしておく必要がある．

客観的咀嚼能力評価にはさまざまな方法がある．古くより用いられている篩分法は手順が煩雑で，判定に時間がかかると言った欠点がある．他に，実施しやすい方法として，ワックスやガムを使用した混合能力評価方法がある．特にガムによる評価法は，ワックスと比較して大半の人には噛み慣れている試験食で自然な咀嚼が行われやすい．また咀嚼も簡単であり，咀嚼後一塊にまとまり口腔から取り出せるため．高齢者など口腔機能が低下した者にも適応しやすいという特徴がある．

昨今，咀嚼能力評価用の色変わりガムが，幅広く使用されている．例えば，地域高齢者の身体能力，サルコペニアとの関連分析，顎骨や舌の切除術後の患者に対する咀嚼能力の判定にも使用され，幅広い被験者を対象にさまざまな知見が報告されている．この色変わりガムの判定は手持ちの色彩色差計による計測の他，専用のカラースケールを用いて視覚のみで判定することも可能である．今後も咀嚼能力評価を必要とする研究に幅広く使用されると考えられる．

色変わりガムを用いた混合能力と咀嚼能力関連因子の関係は，顎運動，咬合接触面積，口唇と舌の運動機能などの面では検討されているが，唾液量との関連はまだ明らかにされていない．
過去の咀嚼能力と唾液量との関連分析では，唾液量以外の咀嚼機能に関与する他要因の影響を排除するために，口腔乾燥を誘発する薬剤を使用した研究が散見される．咀嚼能力と唾液量との関係を明らかにするには，唾液量以外の因子が変動しないようにして，解析をすることが望ましい．そのため，本研究では唾液量を減少させる硫酸アトロピン（以下，アトロピン）を用いることとした．過去に若年健常者を対象とした，アトロピンによる唾液量の経時的変化を報告した研究として，アトロピン静脈注射投与後の酸味による刺激唾液量の経時的変化，またアトロピン内服と

筋肉注射投与後の安静時唾液量の経過的変化の報告がある．しかし，アトロピン投与後の咀嚼による刺激唾液量の経時的変化は明らかにされていない．

以上のことにより，本研究の目的を以下の事とした．

健常有歯顎者を対象に

1．アトロピン内服により経時的な咀嚼による刺激時唾液量の変化を明らかにする．

2．咀嚼による刺激唾液量と色変わりガムによる混合能力との関連性を明らかにする．

＜研究方法＞

対象者

本研究の趣旨に同意の得られた 27 歳から 43 歳までの 10 人の健常有歯顎者（5 人男性, 5 人女性）が本研究に参加した．対象者の体重は 59.1±9.7 kg（平均値±標準偏差）であった．ガム咀嚼に関する選択基準は，第 3 大臼歯を除いて喪失歯がない健常有歯顎者で，非喫煙者とした．除外基準は顎関節症，喫煙者，口腔乾燥，う蝕，歯周病罹患者とし，さらに，緑内障，前立腺肥大による排尿障害，麻痺性イレウス，うっ血性心不全，重症心疾患，潰瘍性大腸炎，甲状腺機能亢進症などのアトロピン使用禁忌患者及びアトロピン副作用が出る者は除外した．

実験手順

被験者には実験 2 時間前に飲食，口腔清掃の禁止，またアルコール摂取は実験 12 時間前に禁止した．被験者を静かな部屋で，椅子にリラックスした状態で座るように指示した．実験手順を口頭および書面にて説明し，同意を得た．サクソンテストにより唾液量を測定，洗口後，色変わりガムによる咀嚼能力の評価，これらの一式の行程を，アトロピン服用前に 1 回，アトロピン服用後 120 分前までの 10 分間隔で 12 回行った．これらの一連の測定を 1 日で 1 回行い，合計 2 日間，2 回の測定を行った．なお，アトロピンの十分な排泄のため第 1 回目の実施日と第 2 回目の実施日とに 1 週間以上のインターバルを置いた．

硫酸アトロピンの用意

薬剤師が硫酸アトロピン原末を乳糖にて 1000 倍に倍散したものを用いた．なお，倍散の調製においては硫酸アトロピン原末の均等混合を確認するため青色色素で着色を行った．調製された硫酸アトロピン 1 ㎎相当を個包装にした．

サクソンテストによる刺激時唾液量の測定方法

紙コップに医療ガーゼを入れ，重量を測定しておいた．口腔内の唾液をすべて飲むように指示した後に，予め重量を測定しておいた医療ガーゼを 2 分間咀嚼させた．ガーゼを咀嚼した後，口腔内に入っていたガーゼと口腔内に残存した唾液を同じ紙コップに全て吐き出させ，重量を測定した．これらの咀嚼前後の紙コップとガーゼ 2 つの重量の差を唾液量とした．

混合能力評価

混合能力は Hama らの方法で色変わりガム（キシリトールガム咀嚼力判定用，ロッテ）により

評価した．色変わりガム咀嚼前は，水道水で 15 秒間洗口させ，洗口後，メトロノームを使用して 60 回（1 回/1 秒）で色変わりガムを左，右，両サイドと被験者の自由に咀嚼させた．色の判定は色彩色差計（CR-13,コニカミノルタ）を用いて測色し，ΔE を計算した．

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - 72.3)^2 + (a^* + 14.9)^2 + (b^* - 33.0)^2}$$

$$\Delta E = 73.2 - \frac{2.85 \times 10^7}{1 + e^{9.95 \times 10^{-3}(N + 1.35 \times 10^3)}}$$

N は，Hama らが記載しているように ΔE から変換された一般的な咀嚼回数を意味し，色変わりの評価値である．本研究では，混合能力の評価値として N を採用した．

統計学的分析

アトロピン服用前から服用後 120 分までの唾液量は，各々の時間に対する第 1 日目と第 2 日目の平均値を使用．アトロピン服用前と服用後 10 分間隔で測定した刺激唾液量の経時変化については Steel の多重比較検定を行った．刺激唾液量の色変わりに対する効果には，一般線型混合効果モデルにより，固定因子を刺激唾液量，ランダム因子を被験者にした．REML 法を使用し，解析，分母の自由度は Satterthwaite 法の近似を使用した．なお，統計ソフトは JMP ver.12.0 (SAS Institute, NC, USA) で，有意水準は 0.05 とした．

＜結果＞

硫酸アトロピン服用前の唾液量と比較して，硫酸アトロピン服用後の唾液量はゆるやかに減少し，アトロピン服用後 50 分から 120 分で服用前と比べ有意に唾液量の減少が認められた（$P < 0.05$）．

また，刺激唾液量は色変わり効果に有意な関連が認められた($P < 0.001$)．R^2 は 0.94 であった．被験者間の分散は 117.1（95% CI [55.0,397.4]）．被験者と刺激唾液量との交互作用の分散は 2.1（95%CI [0.87,10.58]）であった．

＜考察＞

本研究において，アトロピン内服後の咀嚼による刺激時唾液量の経時的変化を観察した結果，アトロピン服用後 50 分から 120 分で有意に唾液量の減少が認められた．Volz らは安静時唾液量の経時的な変化の測定の際に，0.03mg/kg のアトロピン服用により，75−195 分後には，服用前の安静時唾液量と比較して唾液量が有意に減少することを示している．本研究と Volz との結果が一致しなかったのは，被験者，環境条件，唾液採取方法，アトロピン服用量などの条件の差によるものと考えた．本研究では，Volz らが用いたアトロピン量よりも少量で実験が行われたが，研究目的を満たす十分な唾液量減少が認められた．

硫酸アトロピン粉末は，包装が一度でも開封されると水分を含みやすく，計量誤差が生じることがある．本研究では，硫酸アトロピンを乳糖と粉砕・希釈し，個包装にしたので，計量誤差を最小限に抑え，投与に関する被験者の安全性も確保した．

被験者間の分散が大きく，10 人という少ない被験者を対象としたにも関わらず，唾液量とガムの色変わりとの関連性が認められた．色変わりガムは内容成分の流出により色変化を起こす．咀嚼によりクエン酸が唾液中に流出することで，ガム内はアルカリ性となり色素が発色し，ガムは黄緑色から赤色に変化する．本研究では溶媒となる唾液量が減少したため，内容成分の流出が減少して，色の変化が小さくなったものと考えられる．さらに，咀嚼前のガムは固形物であるが，咀嚼を重ねると柔らかく，粘着質になる．口腔乾燥の状態では，粘着性のある食物の咀嚼が困難になることから，咀嚼を重ねたガムは咀嚼しにくい素材であったと言えよう．

一方，唾液量に大きな影響を与える要因に味覚刺激がある．本研究の方法では，サクソンテストで無味のガーゼ咀嚼，甘味料が配合された色変わりガム咀嚼と，味覚刺激が異なっていたにも関わらず，混合能力と刺激唾液量との関連が見られた．

充分な唾液を有する健康な若者でさえ，唾液量が減少した状態で色変わりガムを用いて評価した場合，混合能力の低下を示した．このことから，唾液量が少なく，口渇や咀嚼能力に問題を抱える高齢者においても，唾液量が混合能力に少なからぬ影響を与えることが推察された．

今後臨床において，口腔乾燥による混合能力の低下を容易に検出するツールとして，幅広い患者を対象として色変わりガムによる咀嚼能力評価法が利用されることが期待される．

＜結論＞

健常有歯顎者を対象に，

1) 硫酸アトロピンの一律 1 ㎎服用により，服用前と比較して，服用後 50 分後から 120 分後までに有意に唾液量が減少した．

2) 色変わりガムの混合能力評価に，咀嚼による刺激唾液量の影響が認められた．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5249　号	久保田　チエコ
論文審査担当者	主　査　谷口　尚 副　査　古屋　純一，佐々木　好幸	
論 文 題 目	Association between chewing-stimulated salivary flow under the effects of atropine and mixing ability assessed using a color-changeable chewing gum	

（論文審査の要旨）

唾液は口腔粘膜の湿潤，う蝕予防などに重要な役目を果たしている．また，口腔乾燥は，味覚障害，固い食物に対する咀嚼能力の低下，義歯の安定不良，構音障害など様々な問題を引き起こすこと，食物の性質により咀嚼が困難になることが既に報告されている．このように唾液量は咀嚼能力と関連があるため，咀嚼能力を評価する際には唾液量との関係を明らかにしておく必要がある．今までに多くの咀嚼能力評価法が提唱されているが，その中でも混合能力を評価するガムは，判定の際には一塊にまとまり口腔から容易に取り出すことが可能であるなど，利便性，汎用性が高く，口腔機能が低下した高齢者にも適用しやすいものである．昨今，咀嚼能力評価用の色変わりガムが，幅広く使用されている．色変わりガムを用いた混合能力と咀嚼能力関連因子との関連性は，顎運動，咬合接触面積，口唇と舌の機能などの面では明らかにされているが，唾液量との関連性はまだ明らかにされていない．久保田は本研究により，色変わりガムを使用した混合能力と唾液量との関連性を明らかにした点で，新規性があると評価できる．

口腔乾燥を誘発するために，硫酸アトロピンを使用しているが，本薬剤を利用することで，同一被験者で唾液のみを変化させた測定を行うことができた．つまり，唾液以外の咀嚼能力に関与する他因子の影響を排除することが可能であり，唾液量と咀嚼能力との関連を明らかにするうえで有効な手段と言える．さらに，硫酸アトロピン服用後の経時的な咀嚼による唾液量の変化についてはまだ充分な研究がなされていない．こうした状況を背景に，久保田は硫酸アトロピン内服により，咀嚼による刺激時唾液量の経時的な変化，さらに咀嚼による刺激唾液量と色変わりガムによる混合能力との関連性を検討したことは高く評価できる．

被験者は 27 歳から 43 歳まで 10 人の健常有歯顎者である．第 3 大臼歯を除く喪失歯がある者，喫煙者，およびアトロピン使用禁忌の者は除外した．実験手順を口頭および書面にて説明し，同意を得た．口腔乾燥を誘発させるために硫酸アトロピン 1mg を服用させた．サクソンテストにより唾液量を測定，洗口後，色変わりガムによる咀嚼能力の評価，これらの一式の行程を，アトロピン服用前に 1 回，アトロピン服用後 120 分前までの 10 分間隔で 12 回行った．これらの一連の測定を 1 日で 1 回行い，合計 2 日間，2 回の測定を行った．本研究での硫酸アトロピンの投与量は，被験者の安全性が考慮された適切な量で実験が遂行された．

本研究で得られた結果は以下の通りである．

1. 硫酸アトロピン服用前の唾液量と比較して，硫酸アトロピン服用後の唾液量はゆるやかに減少し，アトロピン服用後 50 分から 120 分で有意に唾液量の減少が認められた．このことから，硫酸アトロピン 1 ㎎内服により，咀嚼による刺激唾液量が経時的に変化することが明らかになった．

2. 刺激唾液量は色変わり効果に有意な正の関連が認められた．このことから，色変わりガムを使用した混合能力は，唾液量の影響を受けることが明らかになった．

以上より，唾液量の減少に伴い，色変わりガムの内容成分の流出量が減少すること，また粘着性食品である色変わりガムの咀嚼が困難になることが，ガム色変わりが減少する原因であることが示唆された．

近年高齢社会の進展に伴い多剤服用による口腔乾燥状態の患者が増加し，咀嚼能力に対する唾液量の影響が懸念されているなか，本研究により唾液量が咀嚼能力評価の重要な因子であることとその様相が明らかとなった．したがって本研究は歯科補綴学，高齢者歯科学さらには歯科医学の発展に寄与するところが大きいと考えられる．よって本論文は，博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値のあるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	石山　裕之
論文審査担当者	主査　俣木　志朗 副査　小野　卓史　　戸原　玄
論　文　題　目	Effect of jaw-opening exercise on prevention of temporomandibular disorders pain associated with oral appliance therapy in obstructive sleep apnea patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

本研究は閉塞性睡眠時無呼吸症（Obstructive Sleep Apnea : OSA）患者に対する口腔内装置（Oral Appliance：OA）療法における顎関節領域の痛みに対する運動療法の有効性を明らかにすることを目的とした. 25名の顎関節症を伴わないOSA患者が被験者として選択された．患者を2群：Jaw-opening Exercise（JE，開口訓練）群13名とPlacebo Exercise（PE，頚部訓練）群12名にランダムに割り付け, OA装着2週間前後の計1ヵ月間各訓練を行った．ベースライン（運動開始時）, OA装着2週間後, 1ヵ月後および3ヵ月後において, RDC/TMDに基づいた痛みを伴う顎関節症発症の有無およびOA使用での朝・日中における顎関節領域の痛みの程度（100mmVAS）の評価を行った．その結果，痛みを伴う顎関節症は, PE群においてOA装着1ヵ月後に1名顎関節痛が認められたが, JE群では全ての評価時期で認められなかった．顎関節領域の痛みは，全ての評価時期において朝・日中ともにJE群の方がPE群よりVAS値は低い傾向となり，特にOA装着1ヵ月後の朝における開口時痛および咀嚼時痛，ならびに3ヵ月後の日中における開口時痛は有意に低い結果となった．これらのことから, OSA患者に対し治療前から開口訓練を行うことが, OA療法における顎関節領域の痛みが起こるリスクを軽減させた．したがって，開口訓練は痛みの予防に有効である可能性が示唆された.

＜緒言＞

閉塞性睡眠時無呼吸症（Obstructive Sleep Apnea：OSA）に対する歯科的治療法として口腔内装置（Oral Appliance：OA）療法がある. OA 装着により下顎を前方に牽引することで，睡眠中の舌根沈下に伴う気道閉塞を予防する．しかし下顎を不安定な位置で固定するため，顎関節や咀嚼筋に痛みを伴い，顎関節症を誘発することがある．痛みはコンプライアンス低下だけでなく，治療中断の理由にもなるため痛みのコントロールは必須となる．したがって, OA 使用のコンプライアンス維持においては，副作用を軽減しOA の装着感を高める必要がある．一方，運動療法は，筋や関節を動かす事で疼痛緩和や機能障害の改善を図る治療であるが，顎関節症に対する治療としても用いられている．腰や膝の痛みの運動器疾患に対する運動療法は，治療だけではなく予防にも利用されている．しかし，顎関節症の予防を目的として運動療法を行った報告はなく, OA 使用による顎関節領域の痛みを運動療法によって予防できるか否かは未だ明らかになっていない．そ

こで本研究では顎関節症を伴わないOSA患者に対し，顎関節領域の痛みおよびコンプライアンスに対する運動療法の有効性を明らかにすることを目的とした．

＜方法＞

被験者はPSG検査を行いOSAと診断され，本学歯学部附属病院の快眠歯科外来にOA製作依頼を受けた，顎関節症を伴わない者（復位性顎関節円板障害のみ除く）を対象とした．研究デザインには二重盲検化ランダム化比較試験を用いた．患者を封筒法にて，開口訓練（Jaw-opening Exercise: JE）群および頚部訓練（Placebo Exercise: PE）群の2群にランダムに割り付けた．痛みは性差が認められることから, 2群での性別の割合を均等にするため層別化も合わせて行った．訓練は2群とも手を使った訓練であり，開口訓練は関節の可動化や咀嚼筋の伸展を目的とし，頚部訓練は頚部筋の伸展を目的としたストレッチである．訓練を各群OA装着前後の2週間合計1ヵ月間行い，ベースライン（訓練開始時）, OA装着2週間後, 1ヵ月後および3ヵ月後での経時的評価を行った．術者は訓練指導者, OA装着・調整者および顎関節評価者の3人に分け, OA装着・調整者と顎関節評価者には訓練の内容がわからないようにマスキングを行った．評価項目は主要アウトカムとして，顎関節症の病態分類（RDC/TMD分類を用いた診査），顎関節領域の痛みの程度（100mmVAS）およびOAのコンプライアンス（アンケートによる週の使用頻度，睡眠時間に対する使用時間を評価）を設定した．副次アウトカムとして, OAの治療効果（OA装着有無でのPSG、ESS、PSQIの値を比較）を設定した．顎関節症の病態については, group Ⅰ（咀嚼筋痛）, group Ⅱ（顎関節円板障害）, group Ⅲ（顎関節痛）に分け, group Ⅰまたはgroup Ⅲやそれらの組み合わせは，痛みを伴う顎関節症と定義した．顎関節領域の痛みは朝と日中の痛みに分けて，安静時，開口時および咀嚼時に患者が経験した最も強い痛みについて評価した．サンプルサイズについては、OA使用時の顎関節領域の痛みの割合は10%から70%とバラつきが大きかったため効果量を中等度0.6と設定し, αを0,05, powerを0.8とし，予定被験数は90名と計算した. OAは上下分離型であるSomno Dent MASを装着した．タイトレーションはジョージゲージを使用し，前方可動量の70%の位置に設定した．

＜結果＞

36名が適格性の評価を受け，除外された者を除く25名が本研究にエントリーした．被験者全員が最後まで研究を終えた．うち2名はOA装着でのPSG検査を受けておらず, PSGのデータのみ欠測値とした．ベースラインにおいて，2群間のデータに有意差は認められなかった．OA装着による顎関節症については, PE群において装着2週間後に2名（group Ⅱ）, 1ヵ月後に4名（group Ⅱ，またはgroup Ⅲ）および3ヵ月後に2名（group Ⅱ）に症状が認められた. JE群はOA装着2週間後，1ヵ月後ともに1名（group Ⅱ）に症状が認められたが，3ヵ月後には顎関節症は認められなかった．痛みを伴う顎関節症は, PE群においてOA装着1ヵ月後に1名 （group Ⅲ）に認められたがJE群では全ての評価時期で認められなかった. OA使用による顎関節領域の痛みの程度については，安静時，開口時および咀嚼時全てにおいて朝・日中ともにJE群の方がPE群と比較してVAS値は低い傾向となった．OA装着1ヵ月後の朝における開口時痛および咀嚼時痛，ならびに3ヵ月後の日中における開口時痛については, JE群は有意に低い結果となった. OAのコンプライアンスについては，OA を毎日使用している人の割合，ならびに一晩通して使用できる人の割合はいずれも全ての評価時期でJE群の方がPE群より高い傾向を示したが，有意差は認められ

なかった. OA 装着による治療効果については, 2 群とも AHI は有意に減少した.

＜考察＞

本研究は OA 使用時の顎関節領域の痛みの予防を企図した最初の研究である. 副作用の発症時期や長期訓練を指示した場合のコンプライアンス低下を配慮し, 訓練の実施期間を OA 装着前後の 1 ヵ月間と設定した. 結果として, 顎関節症の発症は 2 群間においてほとんど差は認められなかったが, PE 群のみ OA 装着後 1 ヵ月後に痛みを伴う顎関節症および顎関節痛が認められた. しかし 3 ヵ月後には消失し認められなかった. そのため開口訓練を行うことでの顎関節症発症の予防に対する効果は小さく, OA 使用による顎関節症発症への影響は少ないと考えられた. 痛みは生活の質を落とすため, 痛みの性質や傾向を評価することは重要であると報告されている. 2 群とも VAS 値は, どの評価時期も 30mm 以下であったため, 軽度の痛みを覚えていたことになる. さらに痛みは朝に症状が強い傾向が認められた. これは OA 使用による影響と考えられ, コンプライアンスを向上させるには朝の痛みのコントロールが重要と考えられた. JE 群にて OA 装着 1 ヵ月後の朝における開口時痛および咀嚼時痛, ならびに 3 ヵ月後の日中における開口時痛をより軽減することができた. したがって開口訓練を行うことが, OA 使用による顎関節領域の痛みを軽減できる可能性が示された. コンプライアンスは 2 群間で有意差は認められなかったが, JE 群は全ての評価時期にて 75%以上であり, 過去の報告に比べ高い傾向が認められた. そのため開口訓練はコンプライアンスを向上させる可能性が示された. 下顎の前方牽引は, 顎関節周囲に引張応力や咀嚼筋の硬直およびこわばりが起こることが報告されている. したがって OA 装着時に, 過度な負荷によって持続的なストレスが発生している可能性がある. ストレスによる緊張が顎関節や咀嚼筋の代謝低下, 疲労蓄積を起こし, 痛みに繋がると推定される. それに対し, 運動器の柔軟性向上は疼痛軽減だけでなく, 疾病予防に有効と報告されている. そのため OA 使用時の痛みの予防のためには, 関節や筋の柔軟性を高めることが必要である. 本研究の結果から, OA 装着前から開口訓練を行うことにより, 関節の可動域や咀嚼筋の伸展性を高め, 柔軟性が向上したと考えられた. さらに下顎を前方に固定した状態に適応しやすくする, 運動学習効果の可能性も考えられた. 本研究には今後の課題として残された点がある. まず頸部訓練による痛みへの影響の可能性, 訓練なし群を設定していないことである. 患者のブラインド化ができないため, 訓練有無での評価は困難と考えられるが, プラセボ効果の可能性も含め, 3 群での評価が今後の検討課題と考えられる. またサンプルサイズが少ない点である. 研究実施期間に制限があったことや, 被験者の選択バイアスを防ぐため適格基準を厳しく設定した事が理由と考えられる. 最後に OA のコンプライアンスをアンケートにて評価したが, 主観的評価のため実際の装着状況と異なる可能性がある.

＜結論＞

顎関節症を伴わないOSA患者に対し, 治療前から開口訓練を行うことによりOA使用時の顎関節領域の痛みが軽減できた. したがって顎関節領域の痛みが起こるリスクを減らせる可能性が示唆された. しかし顎関節症の予防やコンプライアンスに与える影響は未だ限定されるため今後はさらにサンプルサイズを増やして評価する必要性があると考えられる.

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5250　号	石山　裕之
論文審査担当者	主査　俣木　志朗 副査　小野　卓史　　戸原　玄	
論 文 題 目	Effect of jaw-opening exercise on prevention of temporomandibular disorders pain associated with oral appliance therapy in obstructive sleep apnea patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial	

（論文審査の要旨）

閉塞性睡眠時無呼吸症（Obstructive Sleep Apnea：OSA）に対する口腔内装置（Oral Appliance：OA）療法は, OA装着により下顎を前方に牽引することで, 睡眠中の舌根沈下に伴う気道閉塞を防ぐ治療法である. しかし副作用として顎関節や咀嚼筋に痛みを伴い, 顎関節症を誘発することがある. 顎関節症は生活の質（QOL）を低下させ, 治療を中断せざる終えない場合があるにもかかわらず, 現在まで予防に向けた報告はない. こうした状況を背景に, 石山は運動療法について着目した. 運動療法は身体の全体や一部を動かすことで, 疼痛緩和や機能障害の改善を図る治療であり, 顎関節症の治療にも用いられている. 最近では, 運動療法による柔軟性の向上が運動器の疾病予防に繋がる可能性を示した報告もあるが, 顎関節症の予防を目的として運動療法を行った報告はない. そこで石山は, エビデンスレベルの高い二重盲検ランダム化比較試験により, OA使用における顎関節領域の痛みに対する運動療法の有効性について検証した.

25 名の顎関節症を伴わない（復位性顎関節円板障害のみは除く）OSA 患者が被験者として選択された. 患者を 2 群：Jaw-opening Exercise（JE, 開口訓練）群 13 名と Placebo Exercise（PE, 頚部訓練）群 12 名にランダムに割り付け, OA 装着 2 週間前後の計 1 ヵ月間各訓練を行った. ベースライン（運動開始時）, OA 装着 2 週間後, 1 ヵ月後および 3 ヵ月後にて, RDC/TMD に基づいた痛みを伴う顎関節症発症の有無, ならびに OA 使用での朝・日中における顎関節領域の痛みの程度（100mm Visual Analog Scale）の評価を行った. 術者は訓練指導者, OA 装着・調整者および顎関節評価者の 3 人に分け, OA 装着・調整者と顎関節評価者には訓練の内容がわからないようにマスキングを行った. OA は上下分離型である SomnoDent MAS を装着し,タイトレーションは前方可動量の 70%の位置に設定した.

本研究で得られた主な結果は以下の通りである. 痛みを伴う顎関節症はPE群において, OA装着1ヵ月後に1名顎関節痛が認められたが, JE群では全ての評価時期で認められなかった. 顎関節領域の痛みは, 全ての評価時期にて朝・日中ともにJE群の方がPE群よりVAS値は低い傾向となり,

特にOA装着1ヵ月後の朝における開口時痛および咀嚼時痛，ならびに3ヵ月後の日中における開口時痛は有意に低い結果となった.したがってOSA患者に対し治療前から開口訓練を行うことが，OA療法における顎関節領域の痛みが起こるリスクを軽減させた．以上のことから，開口訓練は痛みの予防に有効である可能性が示唆された.

OA使用における副作用の予防という本研究の発想は新しい着眼点であり，独創性がある．さらには副作用の中でも顎関節領域の痛みに焦点を当てたことは，極めて臨床的意義が大きい．また研究で用いた開口訓練は，既に顎関節症の治療に用いられているものであるため，簡便かつ応用可能なことが特徴である.

本邦において軽症・中等症OSAは, OAの代替として保険適応される治療法はない. OAが使用中止になった場合は患者の時間的・経済的負担になるばかりかQOL低下に繋がる．本研究の結果から，開口訓練を治療前から行うことが副作用予防に繋がる可能性が示されるとともに, OA療法のコンプライアンス向上をもたらすことからOSA患者の健康増進に寄与すると考えられた．さらには, OSA治療における歯科領域の評価向上に貢献できると考えられた．以上の成果は今後の歯科医学だけでなく，睡眠医歯学の発展に寄与するところが大きく，よって本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた.

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉嵜　太朗
論文審査担当者	主　査　宇尾　基弘 副　査　鈴木　哲也　　堤　祐介
論　文　題　目	Hydrophilic nano-silica coating agents with platinum and diamond nanoparticles for denture base materials

（論文の内容の要旨）

緒言

口腔常在菌は様々な全身疾患に関与することが知られている．とりわけ誤嚥性肺炎は死因の上位に位置し，超高齢社会において大きな関心事となっている．口腔ケアが誤嚥性肺炎を抑制することがわかっており，義歯の日常的なケアの重要性も指摘されている．

このような背景より，*Candida albicans* を代表とする口腔常在菌の義歯への付着を抑制することは重要な課題である．義歯の表面改質が様々な方法で行われてきたが，特殊な機器を用いず義歯床素地の機械的性質に悪影響を与えない物質による表面コーティングは臨床上有効な方法と考えられる．

親水性コーティングは *Candida albicans* が疎水性相互作用で義歯に付着することを抑制するのに役立っており，当分野の既往の研究でもその効果が認められた．しかし，コーティング膜の耐久性については検証がなされておらず，確認の余地が有った．

そこで本研究では膜の固形分濃度および添加剤を変化させることでコーティング膜の強度の改善を試み，その効果を評価・検討した．

目的

１．シリカコーティング膜の耐久性の向上に適したコーティング材の固形分濃度を評価する．

２．シリカコーティング材にプラチナ（以下 Pt），ダイヤモンド（以下 ND）のナノ粒子を加えた影響を評価する．

材料と方法

本研究に使用したコーティング材（Japan Nano Coat）はシリカ（SiO_2）のナノ粒子（2～8 nm）をメタノールに分散させたものを基本組成とし，添加群は，Pt および ND を添加したものを用いた．

加熱重合義歯床用レジン（アクロン（ピンク），GC）をメーカー指示に従い直径 2mm×厚さ 1.5mm に重合し,表面を#1000 まで研磨した．

コーティング材の塗布はディッピング法にて行い,ディップコートと 23℃，24 時間静置を 2 回繰り返したものを試験片とした．

以下，各実験の手順を示す．

実験１：シリカの固形分濃度を 0.25, 0.5, 0.75, 1.0%としたコーティング材について，ブラシ摩耗前後の対水接触角を測定した．ブラシ摩耗試験にはブラシ摩耗試験機（K236,東京技研）を用いた．義

歯ブラシにはエラック（GC）を用い，クリップに固定し，水中浸漬下で台座に固定した PMMA のサンプルを 150 回／分のスピードで，350g の負荷をかけ，600 回の擦動を行った．

対水接触角測定には VCA Optima（AST products, USA）を使用した. 0.6μl の水滴をシリンジよりサンプル表面に滴下し，水滴の形状を静止画にてキャプチャし，接触角の測定に用いた．

実験２： 実験１で用いたシリカコーティング材に Pt, ND(5.0×10^{-5}, 1.0×10^{-4} %)を添加したコーティング群について，ブラシ摩耗試験前後の対水接触角を測定した．

実験３：ブラシ摩耗試験前後の試験片について走査型電子顕微鏡（SEM；S4500, Hitachi High Technology Corp.による表面観察を行った．

統計解析はシャピロウィルク検定にて正規性の検討を行った後，正規分布のものに対して一元配置分散分析および Turkey の検定を，正規分布から外れたものについてはクラスカルウォリスの検定を行った．解析ソフトには R3.0.1 を用いた．

結果

実験１

コーティング群は全ての濃度でコーティングしていない群と比較し，有意に低い対水接触角を示した．ブラシ摩耗試験後，0.5, 0.75%の群は他の固形分濃度と比較して有意な差は認められなかったが，低い対水接触角を示した．

実験２

コーティング後の対水接触角は Pt, ND 添加群と添加していない群の間に有意な差は認められなかった．ブラシ摩耗試験後, 1.0%群は他の固形分濃度と比較して有意に高い対水接触角を示した．

実験３

コーティングしていない試験片は，コーティング群と比較し研磨痕やブラシ摩耗痕が顕著であった．ブラシ摩耗試験後の試験片はブラシの流れに沿ったコーティング膜の剥離を示したがブラシ摩耗痕は認めなかった．Pt および ND を添加した群では，顕著なコーティング膜の剥離は認められなかったが，微細なクラックが認められた．

考察

固形分濃度がコーティング膜の耐久性に影響を及ぼし, 最適なシリカ粒子の濃度は 0.5 から 0.75%の範囲にあることがわかった．固形分濃度がコーティング膜の耐久性に影響を及ぼす理由として，分散と凝集の相互作用が考えられる．濃度が高くなると粒子の凝集が起こりやすくなり，凝集塊はコーティング膜の剥離を起こしやすくしていると考えられる．ファンデルワールス力による凝集能はコーティング膜の密着性の向上に寄与していると考えられる．一方，大きすぎる凝集能はコーティング膜の形成に悪影響を及ぼす可能性があると考えられ, コーティング材のゲル化にも影響する．電気的反発力とファンデルワールス引力の合計が凝集の惹起に関わるとする Dejaguin-Lnadau-Verwey-Overbeek（DLVO）理論があげられる．溶液の濃度が高まると粒子間距離が小さくなり，ファンデルワールス引力が電気的反発力を上回り，凝集が起こる．また，粒子は電子の二重層を持ち，その表面電位が等電点近くでは 0 に近くなり，結果としてファンデルワールス引力による凝集が起こると考えられる．これらの理由から，分散と凝集のバランスがコーティング膜

の安定性に重要な役割を果たしていると言える．

実験２より，シリカコーティング材に Pt と ND を添加することで，コーティング膜の耐久性と親水性が改善することが示唆された．本研究で用いた ND は，爆轟法で合成された，超分散ダイヤモンドであるナノ粒子を用いた．ND を添加することでコーティング膜の耐久性が向上したことは，ND の高い硬度による所が大きく，爆轟法以前に一般に使われていたポリマーを用いた従来の ND 合成法が示した低い分散性を改善し，高い分散性を与えるのにも役立っている．この高い分散性は，二次凝集の防止に役立っていると考えられる. コーティング膜の耐久性の向上は SEM 像でブラシ摩耗試験による平行に走る擦動痕がコーティングしていない群と比較して少なかったことに反映されている．また，コーティング群では膜の形成とその剥離像も観察された．Pt,ND 添加群では研磨による傷を埋めるようにコーティング膜が形成されており，表面の凹凸が少なくなっている様子が観察できる．さらに，ブラシ摩耗試験後にコーティング膜の剥離が認められるものの，その範囲は抑制されているのが観察できた．超分散ダイヤモンドは従来のものと比べ安価で細胞毒性がないという望ましい側面も持ち合わせており，使用用途が広がっている．コーティング材の溶媒としては，メタノールを使ったものを使用しているが, 揮発後は無毒性のコーティング膜を形成するとは言え，有害性が高い物質である．この点をクリアし，安全で使い勝手のよいコーティング材を検討していくことで，高齢の義歯装着者や介助者が簡単に使用することができることから可能性の期待できる材料と言える．超高齢社会においては，このような義歯のケアを行う材料は需要が高まっていくことが期待できる．

結論

１．シリカの最適な固形分濃度は 0.5-0.75 wt%の範囲にあることが示唆された．

２．Pt, ND の添加はコーティング膜の親水性および耐久性を改善した．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲第　5251　号	吉嵜　太朗
論文審査担当者	主　査　宇尾　基弘 副　査　鈴木　哲也　　堤　祐介	
論文題目	Hydrophilic nano-silica coating agents with platinum and diamond nanoparticles for denture base materials	

（論文審査の要旨）

口腔常在菌は様々な全身疾患に関与することが知られている．とりわけ誤嚥性肺炎は死因の上位に位置し，超高齢化社会において大きな関心事となっている．

口腔ケアが誤嚥性肺炎を抑制することがわかっており，義歯の日常的なケアの重要性も指摘されている．カンジダは常在菌の中でも様々な害をもたらすものとして知られているが，その義歯への付着を抑制することは重要な課題である．義歯の表面改質が様々な方法で行われてきたが，特殊な機器を用いず床用材料の機械的性質に悪影響を与えない義歯表面のコーティングは臨床上有効な方法と考えられる．

親水性コーティングはカンジダが疎水性相互作用で義歯に付着することを抑制するのに役立っており，当分野の既往の研究でも親水性コートによる初期付着の抑制を認めたが、膜の耐久性については未検討であり安全性の懸念もあったことから，本研究では耐久性の検討と安全な材料開発を試みた．

こうした背景より，コーティング膜の耐久性の向上を目的とし，適切なシリカコーティング材の固形分濃度を検討すること，プラチナ（Pt）,ダイヤモンド（ND）のナノ粒子を添加した影響を評価することを目的とし，本研究を行った．

試験片には加熱重合レジン（アクロン（ピンク），GC）を直径 2 mm×厚さ 1.5 mm に成形しコーティング塗布面を#1000 まで研磨した．実験 1 では固形分濃度の決定のため，シリカのみ添加したメタノール溶媒のコート材を 0.25,0.5,0.75,1.0%に分けブラシ研磨と接触角測定にて評価した．実験 2 では，実験 1 で用いたコーティング材にそれぞれの濃度において Pt,ND の添加が与える影響を評価するため，実験 1 と同じ方法で評価を行った．実験 3 では，コントロール群, シリカコーティング及び Pt, ND 添加群のサンプルを塗布直後及びブラシ摩耗試験後の状態を走査電子顕微鏡（SEM）にて観察した．

本研究は事前の予備実験より充分な検討がなされた実験系のもと実施され，適切な統計学的解析により妥当性の高い結果が導かれている．加えて，考察においても様々な角度から検討されており，その内容は高く評価できる．

本研究で得られた結果は以下のとおりである．

１．コーティング群は全ての濃度で未コートの対照群と比較し，有意に高い親水性を示した．

２．0.5, 0.75%の群は 600 回のブラシ摩耗試験後にも有意な差は無いが，高い親水性を示した．
３．コート後の Pt, ND 添加群は未添加群と有意な差は認められなかったが，0.25, 0.5, 0.75%の群でブラシ摩耗後の親水性が有意に高くなった．
４．各群の表面を SEM にて観察を行った．未コート試験片では研磨痕やブラシ摩耗痕が顕著であったが，コートされたものは研磨痕及び摩耗痕が目立たなくなった．摩耗後の試験片はブラシの流れに沿った膜の剥離を示したが傷は認めなかった．

以上の結果より，固形分濃度がコーティング膜の耐久性に影響を及ぼし，最適なシリカ粒子の濃度は 0.5 から 0.75%の範囲にあることがわかった．固形分濃度がコーティング膜の耐久性に影響を及ぼす理由として，分散と凝集の相互作用が考えられる．濃度が高くなると粒子の凝集が起こりやすくなり，凝集塊はコーティング膜の剥離を起こしやすくしていると考えられる．このような理由から高分散性を維持し得るシリカ粒子の濃度範囲が上記の様に比較的狭い範囲に存在することが推定された。また，シリカコーティングに対し Pt と ND を添加することはコーティング膜の耐久性と親水性を改善することが示唆された．ND がコーティング膜の耐久性を向上するのは，その優れた硬度による所が大きく，高い分散性を与えるのにも役立っている．コーティング膜の耐久性の向上は，コート群表面の SEM 観察ではブラシ摩耗試験による平行に走る擦動痕が未コート群に比べて少ないことにも反映されている．更に，Pt，ND 添加群ででは研磨による傷を埋めるようにコーティング膜が形成されていることも観察された．同様に，ブラシ摩耗後の膜の剥離は認められるものの，その範囲は抑制されているのが観察できた．これらの結果より，Pt, ND の添加は膜の物性の向上に寄与するが，その効果にさらなる検討の余地があることも示唆された．

本研究はシリカコーティング材の強化に Pt, ND が適用された点に新規性が認められ, 義歯装着者が簡便に使用できるコーティング材の開発につながる可能性が期待される．従って本研究の成果は歯科補綴学の発展のみならず，今後の歯科医療及び患者の口腔衛生状況の発展・改善に寄与するところ大であり，よって本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに充分価値があるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	秋本　悌助
論文審査担当者	主査　高久田　和夫 副査　宇尾　基弘　　塩田　真
論　文　題　目	Evaluation of corrosion resistance of implant-use Ti-Zr binary alloys with a range of compositions

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

チタン-ジルコニウム合金（Ti-Zr 合金）は純チタン（Ti）に代わるインプラント材料として研究されている．現在，Ti-Zr 合金は，その高い機械的強度から幅径の狭いインプラントとして過酷な環境で用いられる．臨床研究，細胞および動物実験では，12～50%の広範囲な組成の Ti-Zr 合金が使われており，これらの研究では，Ti-Zr 合金は臨床で応用が可能であること，生体適合性に優れることを報告しているが，耐食性の観点から Ti-Zr 合金における最適な Zr 濃度の統一的見解がないのが現状である．

生体内で用いられる金属は，機械的性質に優れ，耐食性を含む生体適合性にも優れる必要がある．機械的強度の研究では，Ti-Zr 合金の広範囲の組成を調べた研究があり，Zr 濃度が 30～60 mol% の合金で，より高いビッカース硬さと引張強さを示すと報告されている．別の研究では，Zr 濃度 40 mass% の Ti-Zr 合金で高い微小硬さと曲げ強さを示す報告もある．

Ti を Zr と合金化することは高い耐食性を有することを予想しうるが、生体内における不働態皮膜破壊や溶解のリスクは残されている．生体適合性における耐食性の観点では，Zr は不働態皮膜を形成する高耐食性の生体不活性材料との報告があり，Ti が乳酸+塩化ナトリウム溶液により腐食されるのに対し，Zr の塩化物イオンによる腐食の報告がある．本研究の目的は，幅広い組成を有する Ti-Zr 合金（Zr : 30～70 mol%）の耐食性を調べ，その観点から生体適合性を評価し，Ti-Zr 合金における理想的な Zr 濃度が存在するか研究することである．

＜方法＞

試料は，スポンジチタン（99.8 mass%）とジルコニウムバー（99.8 mass%）から Ti-Zr 合金（Ti-30, 50, 70 mol% Zr）のボタンインゴットをアーク溶融炉から精製した．調整したインゴットの均質性を検証するために，蛍光 X 線分光分析装置（XRF）により組成分析を行った．その後，インゴットは真空アーク鋳造機で直径 10 mm の円柱状に鋳造し，対照試料として純 Ti および純 Zr 試料も作製した．アノード分極試験，溶出試験に用いた試験片は耐水研磨紙 800 番まで機械的研磨を行い，X 線光電子分光法（XPS）用の試料は 0.04 μm の SiO_2 にて鏡面研磨まで施した．全試料はアセトン及びエタノールで超音波洗浄を行った．

試験溶液は ISO 10271 に基づき加速腐食試験溶液として 5.85 g/L NaCl + 10.0 g/L 乳酸溶液（乳酸溶液）と，口腔内環境を模倣した房山の人工唾液（人工唾液）を適用した．

アノード分極試験は，ポテンショスタットとファンクションジェネレーターを用い，参照極に飽和カロメル電極（SCE），対極に白金黒化処理された Pt 電極を使用した．試料は，ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）ホルダーに固定し, 37℃で試験溶液中に試験片を浸漬し測定した．

溶出試験に使う全試料は，酸化膜を安定化のために室温で 24 時間超純水に浸漬した．その後，試験期間に準じ，試験溶液中に 37℃で 1, 2, 3, 4 週間保持された．金属イオン濃度は誘導結合プラズマ発光分析装置（ICP-AES）を用いて測定し，合金表面の不働態皮膜の組成解析は X 線光電子分光法（XPS）にて行った．

＜結果＞

アノード分極試験では，乳酸溶液中の純 Ti および Ti-30Zr で孔食は検出されなかったが，Ti-50Zr でサンプルの 1 つが孔食を示したものの，他のサンプルでは示さなかった．一方，Ti-70Zr と純 Zr ではそれぞれ 0.7 Vsce， 1.5 Vsce 以上で全てのサンプルで孔食を検出した．人工唾液中では，純 Ti, Ti-30Zr，および Ti-50Zr で孔食は検出されなかったものの, Ti-70Zr は 1.7 Vsce 以上，純 Zr は 1.4 Vsce 以上で孔食が全てのサンプルで検出された．

溶出試験における乳酸溶液中では純 Ti の Ti イオン溶出量は, 1 週間浸漬で約 14 mg/m^2 であった．これは他の Ti-Zr 合金や純 Zr からの溶出イオン量よりもはるかに高い数値であり, 2 週間でほぼ半分まで減少した後, 4 週目まで減少傾向を示した. Ti-30Zr では純 Ti と比較して Ti イオンの溶出量が 90%以上減少した．純 Zr からはわずかではあるが 1 週間で 0.6 mg/m^2 の Zr イオンの溶出が認められた．人工唾液中ではいずれのサンプルでも溶出金属イオンは検出限界以下を示した．XPS 解析では，不働態皮膜の Zr 濃度は，元の合金の組成に比べて高い値を示し, Ti-Zr 合金上に形成される不働態皮膜は Zr リッチであることを示した．

＜考察＞

生体内で使用される金属製インプラントは，その金属イオンを体内へ放出しない高いレベルの安定性が必要である．特に歯科用インプラントは，塩化物イオンを含む唾液や，歯垢に存在するミュータンス連鎖球菌のような常在菌によって産生される乳酸が存在する環境で適用される．Ti や Zr は，高い耐食性があることを知られているが，本研究では，耐食性の観点から Ti と合金化する最適な Zr 濃度を探し出すことを最終的な目的とした．

アノード分極試験の結果から，乳酸溶液という低 pH の厳しい環境下でも，純 Ti と Ti-30Zr は優れた耐食性を示した．一方で，Ti-70Zr と純 Zr では，両溶液で全てのサンプルが孔食を示した．Ti-Zr 合金中における Ti の割合の減少に伴い孔食が発生した理由は，Ti が局部腐食に対し高い抵抗性を持ち，塩化物イオンに対し低感受性であるという報告から裏付けられる．乳酸溶液中の Ti-70Zr は 0.7 V_{SCE} 以上で孔食を示したが，外科用ステントなどの医療機器に用いられる Type

316L SS が同じ溶液中で 0.2 V_{SCE} 以上で腐食を起こすという報告から, Ti- 70Zr と純 Zr の局部腐食性は低いとは言えない．さらに，耐食性の評価は孔食による局部腐食への抵抗性と，静的な環境下における金属イオンの溶出の結果を一緒に考慮すべきである．

溶出試験の結果から，溶出金属イオン量は Ti イオンが最も多く, Ti-Zr 合金では Zr の割合の増加に伴い溶出イオン量は減少した．溶出した金属イオンは，塩化物イオンを含む乳酸溶液中で Ti イオンが主であるものの，人工唾液中では検出されなかった．この結果は，乳酸を添加した人工唾液中で, Ti の腐食が増加した研究報告と一致している．興味深いことに Zr を添加することで著しく金属イオンの溶出を減少させ, 1 週間浸漬後の Ti-30Zr の溶出量は，純 Ti よりも 90%以上低い値を示した．この結果から，Zr の不働態皮膜は Ti のとは異なり，より安定していることが示唆された．また XPS 解析の結果から Ti-Zr 合金表面上の不働態皮膜の組成は Zr リッチであることがわかり，Zr 含有率増加に伴う金属イオン溶出量の減少が裏付けられた．非常に少数ではあるが，人体への Ti イオンの毒性の報告もあり，アレルギー反応に関連するリスクを軽減するには金属イオンの溶出は最小限にした方が良いといえる．このことから, Ti と Zr による合金化は腐食の危険性を減少させる一つの方法と考えられる．

アノード分極試験と溶出試験の結果から，Ti-30Zr および Ti-50Zr は純 Ti や Zr と比べても高いレベルの耐食性を提供すると言える．我々の先行研究で, Ti-Zr 合金の幅広い組成を調べた機械的性質の研究結果から，Ti-30Zr は純 Ti よりも有意に高い引張強さを示し（Ti-30Zr で 980 MPa，純 Ti で 345 MPa），また, Ti-50Zr は最も低いヤング率（85 GPa，純 Ti で 100 GPa 以上）を有することがわかった．この値は骨のそれ（10～30 GPa）よりも高いが，骨とインプラント間の不良な荷重伝達を減らすのに良好な結果といえる．

これらの知見と合わせると，本研究の結果は, 30%または 50%以下の Zr 添加が Ti との合金化に好ましい配合といえ，さらなる細胞実験や動物実験を行うことが, Ti-Zr 合金の臨床応用の助けになると考えられる．

＜結論＞

本研究は，幅広い組成の Ti-Zr 合金の耐食性を調査した．Ti-30Zr ないし 50%未満の Zr 添加は，耐食性の面で，臨床用途に有利であることが示唆された．以上より，耐食性の観点から，生体適合性を低下させることのない Ti-Zr 合金の妥当性が示唆された．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5252　号	秋本　悌助
論文審査担当者	主　査　高久田　和夫 副　査　宇尾　基弘　　塩田　真	
論 文 題 目	Evaluation of corrosion resistance of implant-use Ti-Zr binary alloys with a range of compositions	

（論文審査の要旨）

チタン-ジルコニウム合金（Ti-Zr 合金）は純チタン（Ti）に代わるインプラント材料として研究されている．臨床研究，細胞および動物実験による研究では，12～50%の広範囲な組成の Ti-Zr 合金が使われており，Ti-Zr 合金が臨床応用可能であること，生体適合性に優れることを報告しているものの，耐食性の観点から Ti-Zr 合金における最適なジルコニウム（Zr）濃度の統一的見解がないのが現状である．

そのため秋本は，種々の組成の Ti-Zr 合金の生体適合性を，耐食性の観点から評価した．純 Ti, Ti-30Zr（Zr 30 mol%）, Ti-50Zr, Ti-70Zr および純 Zr をアーク溶融炉およびアーク鋳造機からサンプルとして作製し，試験溶液として加速腐食試験溶液である乳酸+塩化ナトリウム溶液（乳酸溶液）と口腔内を想定し房山の人工唾液（人工唾液）を用いた．耐食性試験として，局部腐食性を評価するアノード分極試験と，静的な環境における不働態皮膜のわずかな金属イオンの溶出量を解析するため溶出試験を行った．また，不働態皮膜の組成を分析するため, X 線光電子分光法（XPS）により解析を行った．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．アノード分極試験では，両溶液で，純 Ti および Ti-30Zr で孔食は検出されなかったが, Ti-70Zr および純 Zr の全てのサンプルでは孔食が検出されたものの，外科用ステントなどの医療機器に用いられる Type 316L SS が乳酸溶液中で 0.2 V_{SCE} 以上で孔食を起こすという報告から, Ti- 70Zr と純 Zr の局部腐食性は低いとは言えない．また，耐食性の評価は孔食による局部腐食への抵抗性と，静的な環境下における金属イオンの溶出の結果を一緒に考慮すべきである．溶出試験では，乳酸溶液に浸漬した純 Ti からもっとも多くの金属イオンの溶出を認めた．一方, Ti-Zr 合金の総溶出量は Zr の添加により，純 Ti と比べ 90%以上も減少した．　この結果は, XPS 解析した Ti-Zr 合金上の不働態皮膜の組成が Zr リッチであったことからも示唆された. Ti との合金化における Zr の添加は，低 pH の乳酸溶液による過酷な条件下で，局部腐食の耐食性を減少させたが，静的な環境下における金属イオンの溶出は大幅に減少した．結論として，本研究は Ti-30Zr 合金または 50%未満の Ti への Zr 添加は，耐食性の観点から生体適合性に優れ，臨床応用に有利であることを示唆した．

以上の成果は今後の生体材料学ならびに歯科医学の発展に寄与するところが大きく，よって，本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	谷本　裕之
論文審査担当者	主　査　高橋　英和 副　査　高久田 和夫　　古屋　純一
論　文　題　目	An objective estimation of the removability of three home reliners

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

義歯安定剤の一種であるホームリライナーは，暫間的に義歯床と床下粘膜の適合を改善することで患者満足度や咀嚼効率を向上させる．一方で咬合関係の変化や口腔衛生の悪化が問題となる．これらの原因として，使用後のホームリライナーは義歯床から除去しにくいため，重ねて貼付してしまうことがあげられる．ホームリライナーには患者による管理が求められるため，使用後に剥離しやすい物性が望まれる．

ISO-10873 に規定されているホームリライナーの剥離試験は，アクリル板上に貼付されたホームリライナーを手指やガーゼで剥離したのち，残留の有無を目視で確認するため，剥離性を客観的に評価することが難しい．ホームリライナーと同様に粘弾性体である軟質裏装材の接着試験では，引張接着試験，せん断接着試験，剥離接着試験が行われる．ホームリライナーは材料自体が伸びて破断しやすいことや，吸水膨張しやすい材料であることから，軟質裏装材の接着試験を応用して剥離性を評価することは困難である．しかし，剥離性を客観的に評価することは，ホームリライナーの適切な使用法を患者に提供する一助となる．

そこで，手指による剥離試験と試作剥離試験を行い，ホームリライナーの剥離性を客観的に評価する方法を検討した．加えて引張試験，ショア E 硬さ試験を行い，義歯床からの剥離挙動について考察を加えた．

＜材料・方法＞

1. 材料

ホームリライナーは次の 3 種類とした：クッションコレクト（シオノギ製薬；以下 CC），タフグリップピンク（小林製薬；以下 TG），ライオデントピンク（ライオン；以下 LD）．また，ISO-7823-2 に準じたアクリル板（デラグラス AU-999，旭化成社．幅 80mm×長さ 50mm×厚さ 5mm）を用いた．アクリル板は平滑面をそのまま被験面とする群と，#600 の耐水ペーパーで表面を粗造化した群の 2 群とした．

2. 方法

1) 手指による剥離試験

テフロン製モールドを設置したアクリル板に 3 種類のホームリライナーを貼付した（幅 10mm×長さ 30mm×厚さ 1mm）．ホームリライナーをアクリル板の平滑面に貼付した群を Smooth Group，#600 の研磨面に貼付した群を#600 Group とし，各 10 個作製した．モールドを除去し 37℃の蒸留水に 24 時間浸漬したのち，室温に 15 分間静置したものを試験片とした．被験者は手指，視力に問題のない

者 10 名（男性 6 名，女性 4 名，平均年齢 28.2 歳）とし，アクリル板からホームリライナーを可能な限り手指で剥がすよう指示した．被験者は Smooth Group，#600 Group に対し，各 1 回剥離を行った．剥がしにくさは，主観的評価尺度である 100mm Visual analogue scale（VAS）を用いて評価した（VAS の値が小さいことは被験者に剥離しやすいと判断されたことを表す）．残留面積率（残留しているホームリライナーの面積／貼付後の面積）は画像処理ソフト（ImageJ）を用いて算出した．さらに試験後の試験片を目視で確認し，破壊様式を界面破壊，凝集破壊，混合破壊に分類した．本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号: 1265）.

2) 試作剥離試験

ジグ挿入部が 10mm になるようテフロンテープでマスキングしたアクリル板に，テフロン製モールドを設置し，ホームリライナーを貼付した（幅 10mm×長さ 30mm×厚さ 1mm）．モールドを除去し 37℃の蒸留水に 24 時間浸漬したのち，室温に 15 分間静置してからマスキング用テフロンテープを除去したものを試験片とした. 試験片は 3 種類のホームリライナーに対し, Smooth Group, #600 Group 各 5 個作製した.

レオメーター（RHEO METER CR-500DX，サン科学）に ABS 樹脂で作製した試作ジグを装着し，ジグ押下速度 40mm/min，ジグ移動距離 20mm にて，剥離試験を行った．荷重—変位量曲線のプロファイル，剥離に要する総仕事量，また荷重—変位量曲線における初期の直線部分の傾き（初期の荷重増加率）を評価した．破壊様式は手指による剥離試験と同様に，界面破壊，凝集破壊，混合破壊に分類した.

3) 引張試験

テフロンテープで全面をマスキングしたアクリル板上に，テフロン製モールドを設置し，ホームリライナーを貼付した （幅 15mm×長さ 40mm×厚さ 1mm）．37℃の蒸留水に 24 時間浸漬したのち，室温に 10 分間静置後モールドを除去した．さらに室温に 5 分間静置し，アクリル板から剥がしたものを試験片とした．試験片は 3 種のホームリライナーに対し，各 5 個作製した．レオメーターにてチャック間距離 35mm，引張速度 40mm/min で破断するまで引張試験を行い，最大荷重を求めた.

4) ショア E 硬さ試験

テフロン製モールドを設置したアクリル板にホームリライナーを貼付した（直径 45mm，厚さ 1mm）．モールドを除去し 37℃の蒸留水に 24 時間浸漬したのち，室温に 15 分間静置したものを試験片とした．ゴム硬度計 E 型（ASKER Durometer Type E，高分子計器）を用いて任意の 5 点を測定し，その平均値を求めた.

5) 統計解析

手指による剥離試験における VAS と残留面積率，試作剥離試験における初期の荷重増加率について，ホームリライナー間での比較を Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定を用いて行った．試作剥離試験における総仕事量，引張試験における最大荷重，ショア E 硬さについて，ホームリライナー間での比較を一元配置分散分析および Tukey の HSD 検定を用いて行った．また，試作剥離試験における初期の荷重増加率について，Smooth Group と#600 Group 間での比較を Mann-Whitney *U* 検

定を用いて行った．なお，有意水準は 5%に設定し，統計処理ソフトウェアには JMP®12.0.1（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いた．

＜結果＞

手指による剥離試験では，TG は Smooth Group，#600 Group ともにほぼすべての試料で界面破壊を生じたが，LD は界面破壊がみられなかった．手指による剥離試験における VAS の結果は，表面粗さに関わらず TG は CC，LD と比べ有意に低い値を示し，被験者に剥離性良好と判断された．TG はアクリル板との界面で良好に剥離するため，表面粗さに関わらず残留面積率はほぼ 0%であった．CC は Smooth Group で残留面積率がほぼ 0%であったのに対し，#600 Group はほぼ 100%であった．LD は表面粗さに関わらずほぼ 100%の残留面積率を示した．

試作剥離試験における TG（Smooth）の荷重—変位量曲線では，変位量 2~3mm 付近で荷重の降下がみられた．TG（Smooth）以外の材料では，そのような荷重降下はみられなかった．総仕事量は TG（Smooth）が有意に低い値を示した．初期の荷重増加率は，表面粗さにかかわらず 3 種類のホームリライナーの中で TG が最大値を示した．またそれぞれの材料において，Smooth Group，#600 Group 間に有意差は認められなかった．試作剥離試験では，TG（Smooth）のみに界面破壊が生じ，CC，LD はすべて凝集破壊を示した．

引張試験における最大荷重，および硬さ試験におけるショア E 硬さは，TG が最大値を示した．

＜考察＞

手指による剥離試験において, TG は最も多く界面破壊を生じ, 残留面積率も最も小さかったため, 剥がしにくさの尺度である VAS が低値を示したと考えられる．この結果から 3 種類のホームリライナーのうち TG が最も手指による剥離性が高いといえる．

試作剥離試験における荷重—変位量曲線において，TG（Smooth）のみ変位量 2～3mm で荷重の降下がみられたこと，加えて TG（Smooth）のみ界面破壊を生じたことから，TG（Smooth）にみられた荷重降下は，界面破壊を生じたときの荷重の降下と推察される．

試作剥離試験における初期の荷重増加率は TG が高い傾向にあり，ショア E 硬さと同様の傾向を示した．初期の荷重増加率は剥離初期に材料を圧縮している状態での圧縮弾性率を近似しているため，ショア E 硬さと同様の傾向を示したと考えられる．また，引張試験の最大荷重においても TG は最も大きい値を示したことから, TG が最も硬く破断しにくい材料であることがわかる．これらの理由から TG は変形しにくく，剥離力が接着界面に伝わりやすいため，最も多く界面破壊が生じたと考えられる．ホームリライナーと同じ粘弾性体である軟質裏装材の接着試験において，硬い材料の方が材料自体の変形が少なく，接着界面に伝わる力が大きくなるため界面破壊が生じやすいという報告と一致する．

本研究で行った試作剥離試験は, TG のように硬い材料においては手指と同様の界面破壊が生じる傾向がみられたが，CC，LD では手指による剥離とは異なる破壊様式を生じる傾向が示された．これは手指による剥離では繰り返し剥離を行うのに対し，試作剥離試験ではワンストロークのジグ移動で剥離を試みている点に起因すると考えられる．今後，ジグの剛性や形状，ストローク数の検討などを行い，さらなる検討が必要と考えられる．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲第　5253　号	谷本　裕之
論文審査担当者	主　査　高橋　英和 副　査　高久田 和夫　　古屋　純一	
論文題目	An objective estimation of the removability of three home reliners	

（論文審査の要旨）

義歯安定材の一種であるホームリライナーは，義歯床と床下粘膜の適合を改善し患者満足度や咀嚼効率を向上させる一方，使用後に義歯床から剥がしにくいという問題点があげられる．ホームリライナーの使用は患者自身による管理が求められるため，使用後に剥離しやすいことが望まれる．

国際標準化機構（ISO）において規格化されているホームリライナーの剥離試験は，剥離性を客観的に評価することが難しい．剥離性を客観的に評価することはホームリライナーの適切な使用法を患者に提供する一助となるが，その方法は確立されていない．

こうした状況を背景に，谷本裕之は ISO 規格を想定した手指による剥離試験と試作剥離試験を行い，ホームリライナーの剥離性を客観的に評価する方法を検討した．また引張試験，ショア E 硬さ試験を行い，ホームリライナーの剥離挙動について考察を加えた．

本研究は 3 種類のホームリライナーを使用した（クッションコレクト；以下 CC，タフグリップピンク；以下 TG，ライオデントピンク；以下 LD）．ホームリライナーを貼付するアクリル板は平滑面を用いる群（Smooth Group）と，#600 の耐水ペーパーで表面を粗造化した群（#600 Group）の 2 群とした．

アクリル板に貼付したホームリライナーを被験者に剥離してもらい，剥がしにくさを Visual analogue scale（VAS）で評価した．また残留面積を計測し，破壊様式を界面破壊，凝集破壊，混合破壊に分類した．試作剥離試験では，嘴状の ABS 製ジグをレオメーターに装着し，アクリル板に貼付したホームリライナーの剥離試験を行った．試作剥離試験では，荷重—変位量曲線のプロファイル，剥離に要する総仕事量，荷重変位量曲線における初期の直線部分の傾きを算出した（初期の荷重増加率）．また，手指による剥離試験と同様，破壊様式を分類した．加えて，引張試験，ショア E 硬さ試験を行った．

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され，適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を導いており，研究計画から考察に至るまで高く評価できる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

１．手指による剥離試験の結果から，TG は CC，LD より剥離性が良好であることが示された．

２．手指による剥離試験では，CC（Smooth），TG（Smooth），TG（#600）で界面破壊を多く示した．

３．試作剥離試験の TG（Smooth）における荷重—変位量曲線では，変位量 2〜3 mm で荷重降下がみられた．
４．試作剥離試験の TG（Smooth）における総仕事量は，CC，LD より有意に小さい値を示した．
５．試作剥離試験では，TG（Smooth）のみ界面破壊を生じた．
６．引張試験の最大荷重は TG が CC，LD より有意に大きい値を示した．
７．ショア E 硬さは TG が CC，LD より有意に大きい値を示した．

以上の結果より，3 種のホームリライナーのなかで TG の剥離性が良好であった．また試作剥離試験では，荷重—変位量曲線のプロファイルの検討により界面破壊の徴候を捉えられた点，また総仕事量が CC，LD より有意に小さかったことから，試作剥離試験によりホームリライナーの剥離性を客観的に評価できる可能性が示唆された．また試作剥離試験において， TG では手指と同様の界面破壊が生じる傾向がみられたが，CC，LD では手指による剥離とは異なる破壊様式を生じる傾向が示された．この点に関しては谷本裕之が論文中で考察しているように，ジグの形状やストローク数，ジグの移動速度などを検討する必要があり，今後の報告が期待される．

本研究はホームリライナーの剥離性を客観的に評価する方法について検討した点に新規性が認められ，患者に正しい情報の提供が求められるホームリライナーの適切な使用法を示す一助となることが期待される．したがって本研究は今後の歯科補綴治療のみならず歯科医学の進歩，発展に大いに寄与したと考えられる．よって，本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	守田　剛
論文審査担当者	主査　井関　祥子 副査　森尾　郁子、横山　三紀
論　文　題　目	An *in situ* hybridization study of *Hyaluronan synthase* (*Has*) mRNA in developing mouse molar and incisor tooth germs

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ヒアルロン酸（Hyaluronan：HA）は様々な組織における細胞外基質の主要な構成分子の一つであり、3 種類のヒアルロン酸合成酵素（HA synthase : Has）により合成されることが知られている。本研究では、胎生 11.5 日から生後 7 日（E11.5 - P7）までのマウス臼歯および切歯歯胚形成過程における *Has1*、*2* および *3* mRNA の量および局在をリアルタイム PCR 法と *in situ* hybridization 法によって検索した。

Has1 mRNA は実験期間中のすべての歯胚において検出されなかった。*Has2* mRNA は臼歯および切歯歯胚において E12.0 から E18.0 まで、歯胚周囲の間葉組織に局在が認められたが、出生後には認められなかった。一方、*Has3* mRNA は胎生期歯胚のエナメル器に強い局在が認められ、特に鐘状期初期まで内エナメル上皮、星状網および中間層に認められた。また、*Has3* mRNA 局在は内エナメル上皮が分化期エナメル芽細胞に分化するにつれ消失したが、臼歯歯胚においては生後の歯根形成期に至るまで中間層での局在が認められた。さらに、*Has3* mRNA は歯根形成に関与するヘルトビッヒ上皮鞘（HERS）にも局在していた。切歯歯胚では、*Has2* mRNA の局在は臼歯歯胚と類似していたが、*Has3* mRNA は切歯特有の構造である apical bud における Transit-amplifying（TA）細胞の領域に限局して認められ、また成熟エナメル質近傍の乳頭層においても認められた。

これらの結果より、Has3 が歯胚形成過程における HA 合成の主な調節因子であり、歯冠および歯根形成を部分的に制御していることが推測された。さらにこの分子は乳頭層におけるミネラル輸送や apical bud における幹細胞ニッチの維持にも関与している可能性が示唆された。

＜緒言＞

ヒアルロン酸（Hyaluronan : HA）はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンとの二糖の繰り返しから成る直線的なグリコサミノグリカン鎖であり、細胞外基質の主要な構成分子の一つである。HA は親水性、粘弾性および拡張性という物理的性質を有し、生体の生理学的・物理学的特性および恒常性を維持すると考えられている。また、HA の機能は細胞の増殖、分化および遊走においても重要な役割を果たすことが知られている。さらに、HA はアグリカンやバーシカンなどの大型プロテオグリカンと結合して巨大な会合体を形成し、生理的機能を発揮するとされている。

このように HA は単純な化学構造であるにもかかわらず、生体における多様な生理的機能に関与している重要な分子である。

HA は糖転移酵素であるヒアルロン酸合成酵素（Hyaluronan synthase：Has）により合成される。Has ファミリーは一般的なグリコサミノグリカン合成酵素とは異なり、細胞膜に局在している。Has は三種類のアイソフォーム (Has1, -2, -3) が同定されており、各 Has のアイソザイムは類似したアミノ酸配列および分子構造的特徴を持つが、各 Has により合成される HA の分子量および合成量が異なっていることが知られている。

歯胚の形態形成は上皮間葉相互作用によって進行するが、その際の HA をはじめとする細胞外基質の関与についても様々な報告がなされている。歯胚の形態形成は連続した過程であり、蕾状期、帽状期、鐘状期および添加期と分類することができ、その後歯冠形成期から歯根形成期へと転換していく。歯根形成に関しては HERS の関与が報告されている。一方、マウスの切歯は生涯を通じて歯が伸長する常生歯であり、切歯の形成端は apical bud と呼ばれる特異的な上皮構造を持つことが報告されている。近年は apical bud は幹細胞ニッチとして認識されるようになっている。

しかし、歯胚形成過程における *Has* mRNA 発現に関する報告は、発生初期の臼歯歯胚のみでなされており、出生後の臼歯歯胚および切歯歯胚に関しては報告がなくその発現様式の詳細は不明である。そこで本研究は、マウス臼歯および切歯歯胚形成過程における各 *Has* mRNA の発現量および発現パターンを特に HERS と apical bud に注目し、リアルタイム PCR 法と *in situ* hybridization 法とを用いて検索することを目的として行われた。

＜材料および方法＞

E14.0-18.0 の ICR マウスの下顎から臼歯歯胚を分離し、トータル RNA を抽出し逆転写を行った後、各日齢の歯胚における *Has* mRNA の量の変化をリアルタイム PCR 法によって定量した。E16.0 の歯胚に関しては、酵素処理によって上皮と間葉に分離してそれぞれの組織から RNA を抽出し、*Has* mRNA の量の違いについて検索した。また、歯胚における *Has1*、*2* および *3* mRNA の局在を明らかにするために、E11.5-18.0 および P4, P7 のマウス頭部を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、以下通法に従って EDTA 脱灰、パラフィン包埋を行った。その後、5μm の連続切片を作成し、^{35}S-UTP 標識プローブを用いた *in situ* hybridization を実施した。さらに、ビオチン標識ヒアルロン酸結合タンパク (HABP)を用いて歯胚における HA の局在を検出した。

リアルタイム PCR のデータに関しては、平均値±標準偏差にて示し、統計処理は一元配置分散分析を行い、各群の比較には Tukey の検定を用いた。有意差はいずれも $p<0.05$ とした。

＜結果＞

［各 *Has* mRNA の発現量］

リアルタイム PCR の結果より、*Has1* mRNA は実験期間中の歯胚において検出できなかった。*Has2* mRNA は E14.0 から認められ、E18.0 まで経時的に減少していた。一方、*Has3* mRNA の量は E16.0 で有意に増加し、その後 E18.0 まで維持されていた。また、E16.0 の歯胚を上皮と間葉とに分離してリアルタイム PCR を行うと、*Has2* mRNA は上皮側よりも間葉側で 2 倍ほど高い量を示

した。一方、*Has3* mRNA は間葉側より上皮側で顕著に多かった。

［マウス下顎臼歯歯胚における *Has* mRNA の局在］

Has1 mRNA は歯胚形成のいずれの段階でも認められなかった。*Has2* mRNA は E11.5 から間葉組織に弱く局在し、E12.0 から E13.0 にかけては歯胚周囲の間葉組織での局在が強かった。その後は次第に減少し、出生後には認められなくなった。*Has3* mRNA の発現は E11.5 で dental placode に認められ、E12.0 では tooth bud に、E13.0 ではエナメル器に認められた。E14.0 および E15.0 では内エナメル上皮および星状網に強いが発現が認められたが、一次エナメル結節および外エナメル上皮では認められなかった。E16.0 ではこれらの構造物に加え、この時期に出現した中間層にもその発現が認められた。E18.0 では内エナメル上皮、星状網および中間層に引き続き *Has3*mRNA の発現が認められたが、分化期エナメル芽細胞では消失していた。出生後では、中間層と HERS で引き続き発現が認められたが、星状網では消失していた。

［マウス上顎切歯歯胚における *Has* mRNA の局在］

Has1 mRNA は臼歯歯胚と同様に発現が認められなかった。*Has2* mRNA の発現は E13.0 では tooth bud と間葉組織において弱く認められ、その後に形成された歯乳頭においても弱く認められたが、E18.0 以降では認められなくなった。*Has3* mRNA の発現は E13.0 では tooth bud において強く認められ、E14.0 では内エナメル上皮に認められたが、外エナメル上皮には認められなかった。E16.0 および E18.0 では、*Has3* mRNA の発現は唇側の apical bud 内の Transit-amplifying（TA）細胞や中間層、陥入した内エナメル上皮で強く認められたが、舌側の apical bud では認められなかった。出生後では、*Has3* mRNA の発現は apical bud における Transit-amplifying（TA）細胞の領域に限局して認められ、また成熟エナメル質近傍の乳頭層においても認められた。

［マウス臼歯および切歯歯胚における HABP の染色結果］

HA の局在は *Has2* あるいは *Has3* mRNA 発現と共存する部位としない部位が認められた。臼歯歯胚における HA は上皮側では dental placode、肥厚した口腔上皮およびエナメル器内の星状網に局在していた。間葉側の HA の局在は歯胚周囲の間葉組織において認められたが、凝集した間葉組織内には認められなかった。また、出生後の歯胚での HA の局在は星状網、中間層および HERS に強く認められたが、歯乳頭における局在は弱いものであった。一方、切歯における HA の局在は E16.0 までは臼歯歯胚と類似したパターンを示したが、E18.0 および P7 では apical bud 内の星状網、乳頭層、象牙芽細胞下層および apical bud 近傍の歯乳頭の領域に限局して認められた。

＜考察＞

本研究では、*in situ* hybridization の結果より、歯胚形成過程における *Has1* mRNA は検出できなかった。リアルタイム PCR や先行研究の結果と一致しており、*Has1* mRNA は歯胚の形態形成において重要ではないことが推測された。

Has2 mRNA の発現は E12.0 - 18.0 の間で歯胚周囲の間葉組織、歯乳頭および歯小嚢において認められたが、上皮では認められなかった。また、*Has2* mRNA は発生が進むにつれて発現が弱くな

り、出生後には消失した。さらに、*Has2* KO マウスは E9.5-10.0 で心臓の形成不全により胎生致死を示すことからも、*Has2* mRNA は初期の歯胚形成において関与するが、出生後ではそれほど関与していないことが推測された。

Has3 mRNA の発現は歯の発生時における段階で、上皮組織であるエナメル器に継続的に認められたことから、エナメル器で合成された Has3 は出生前および出生後の歯胚の HA 合成のための重要な調節因子である可能性が示唆された。

次に、鐘状期後期で内エナメル上皮が分化期エナメル芽細胞に分化すると、*Has3* mRNA の発現は消失した。一方中間層細胞および星状網では引き続き認められた。これらのことから、細胞の分化に伴い細胞の HA 合成の調整様式に変化が生じたと推測された。また、*Has3* mRNA は HERS において継続的に認められた。HABP 染色も HERS 細胞周囲に認められたことから、Has3 を介した HA 合成により HERS の構造が維持されている可能性が示唆された。

マウス切歯は apical bud 内に幹細胞が存在し、HA が幹細胞ニッチの主な細胞外基質であることが報告されている。*Has3* mRNA は TA 細胞領域においてその発現が認められ、HA の局在は apical bud においては星状網でのみ認められた。以上のことから、TA 細胞により HA が apical bud 内の星状網に分泌されていると推測され、Has3 を介した HA 合成は apical bud 内の幹細胞ニッチの維持に関与している可能性が示唆された。

乳頭層はエナメルへのミネラルの輸送とエナメルの成熟を促進する機能があることが報告されている。HA の局在は切歯のエナメル器、中間層および乳頭層において認められ、*Has3* mRNA の発現は E18.0 の中間層および P7 の成熟エナメル質近傍の乳頭層において認められた。以上の結果から、中間層または乳頭層における *Has3* mRNA は HA 合成を介してミネラルおよび水の輸送に関与していることが推測された。しかしながら、歯胚における Has により合成された HA の機能とその機序については未だ不明なことが多く、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

＜結論＞

本研究の結果から Has ファミリーの中でも特に Has3 が歯冠形成期から歯根形成期にかけての主要な HA 合成調節因子であり、この分子の歯胚形成過程への関与が示唆された。また、切歯歯胚形成過程において Has3 を介した HA 合成が apical bud 内の幹細胞ニッチの維持および乳頭層でのミネラルの輸送に関与している可能性も示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5254　号	守田　剛
論文審査担当者	主　査　井関　祥子 副　査　森尾　郁子、横山　三紀	
論　文　題　目	An *in situ* hybridization study of *Hyaluronan synthase* (*Has*) mRNA in developing mouse molar and incisor tooth germs	

（論文審査の要旨）

ヒアルロン酸（Hyaluronan：HA）は、多くの細胞外基質の主要な構成分子の一つであり、歯胚形成過程にも深く関与している事が知られている。HA は細胞膜に局在する糖転移酵素であるヒアルロン酸合成酵素（HA synthase：Has）により合成される。Has には、Has1、2 および 3 の 3 種類のアイソフォームが同定されており、歯胚形成過程における Has 遺伝子の発現は発生初期の臼歯歯胚で報告されているが、それ以降の発生段階、特に歯根形成に関与するヘルトビッヒ上皮鞘 (HERS) や近年幹細胞ニッチとして認識されているマウス切歯の apical bud における報告は皆無であった。

このような背景のもと、守田はそれぞれの Has 分子がマウス臼歯および切歯の HA 合成を空間的、時間的に制御しているのではないかという作業仮説を立て、*Has* mRNA の量と局在をリアルタイム RT-PCR 法およびラジオアイソトープ標識プローブによる *in situ* Hybridization 法で検出し、また HA の局在について標識された HA 結合タンパク質を用いた組織化学的手法にて検討した。このように周到かつ綿密な研究計画によって、歯胚形成過程と Has の関連に着目したことは高く評価されるものである。

Has mRNA の定量解析では、胎齢（E）14.0-18.0 のマウス下顎から臼歯歯胚を摘出して total RNA を回収し逆転写を行った後、各日齢における発現量を Real-time RT-PCR 法により定量した。また、*in situ* hybridization および免疫組織化学は、E11.5 -18.0 および生後（P）4 および P7 のマウス頭部のパラフィン組織切片を作製して解析を行った。歯胚における *Has* mRNA の量、歯の発生段階に応じた各 *Has* の発現パターンに着目しそれぞれを比較•検討した。実験手技および検討方法は、分子生物学的知識のみならず組織学的知識の裏付けのもとに厳密に遂行されており、優れたものであると評価できる。

得られた結果は以下の通りである。

1. *Has1* mRNA は検討した発生段階の臼歯および切歯歯胚のいずれにおいても検出できなかった。
2. 臼歯歯胚の形成過程で *Has2* および *Has3* mRNA の量は経時的に変化した。また E16.0 の臼歯歯胚で前者は間葉組織、後者は上皮組織に強い発現が認められた。
3. *Has2* mRNA は臼歯および切歯歯胚において、歯の形態形成初期から間葉側の組織において

認められたが、出生後ではほとんど認められなかった。

4. *Has3* mRNA は臼歯歯胚において、dental placode、tooth bud、エナメル器、内エナメル上皮、中間層および星状網において認められた。出生後では中間層とヘルトビッヒ上皮鞘において認められたが星状網では認められなかった。
5. *Has3* mRNA は後期鐘状期の臼歯歯胚において、内エナメル上皮がエナメル芽細胞へと分化すると認められなくなった。
6. *Has3* mRNA は胎生期の切歯歯胚において、幹細胞ニッチとして認識される apical bud 内の transit-amplifying 細胞、中間層および陥入した内エナメル上皮において認められた。
7. *Has3* mRNA は出生後の切歯歯胚において、中間層では認められなかったが乳頭層において認められた。
8. ヒアルロン酸結合タンパク質を用いた HA の局在の検討では、上皮、間葉両者とも HERS や apical bud をはじめとする様々な部位に陽性反応が認められた。その局在は *Has2* あるいは *Has3* mRNA と共存する部位としない部位があった。

これらの結果はマウス臼歯および切歯歯胚形成過程において、Has2 は主に間葉側、Has3 は主に上皮側に発現する事に加え、発現パターンが空間的、時間的に変化して行く事を示し、当初の作業仮説を裏付ける結果が得られた。各 Has の中でも Has3 が歯胚発生、特に生後における歯根形成や apical bud の HA 合成の制御に関与し、歯胚の構造維持に関与している可能性が示唆された。

以上のように本論文は、マウス歯胚発生過程における Has 分子に着目し、胎生期から出生後までの *Has* の局在変化を初めて明らかにした。これは、今後の口腔領域における解剖学、発生学領域における細胞外基質研究、さらには再生医療分野における組織工学手法への応用など、科学の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	杉浦 美穂
論文審査担当者	主査　川口 陽子 副査　倉林　亨、永井　亜希子
論　文　題　目	White spot lesion remineralization by sugar-free chewing gum containing bio-available calcium and fluoride: A double-blind randomized controlled trial

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

White Spot Lesion（以下 WSL）は、エナメル質表層下におけるミネラル成分の低下に伴いその色調が不透明に変化した、実質欠損を伴わない初期のエナメル質白斑病変である。また、WSL の様な実質欠損を伴わないう蝕病変は、MI（最小限の侵襲）に基づき再石灰化療法を試みることが推奨されている。一方、水溶性 Ca 素材は、エナメル質病変に対する再石灰化促進効果を有することが知られており、同再石灰化はフッ化物の存在により加速する。シュガーレスガムは、再石灰化療法における一つの方策として有効であり、その再石灰化能ならびに抗う蝕性の向上を目的として、水溶性 Ca 素材ならびにフッ化物の配合が試みられている。

視診を基に行う ICDAS （International Caries Detection and Assessment System）は、新たなう蝕診断システムとして導入された。一方、光干渉断層装置（Optical Coherence Tomography、以下 OCT）は、非侵襲的かつリアルタイムに観察対象物の内部構造を観察することが出来る。しかしながら、単一の臨床評価結果のみでエナメル質 WSL の脱灰ならびに再石灰化に関する十分な信頼性を得ることは困難であり、少なくとも 2 種類の評価方法を併用する方が有益であると考えられる。

そこで本研究では、二重盲検ランダム化比較試験のもと、ICDAS ならびに OCT を用いて、水溶性 Ca 素材リン酸化オリゴ糖カルシウム（以下 POs-Ca）およびフッ化物配合ガムの口腔内 WSL に対する再石灰化効果について評価を行った。

＜材料および方法＞

本臨床研究は、東京医科歯科大学倫理審査委員会承認（771 号）のもと、ICDAS code2 または code 1 の WSL を少なくとも 1 歯有し、本研究趣旨に同意が得られた 37 名を被験者とした。3 種類のガム（コントロールガム、2.5wt% POs-Ca 配合ガム、2.5wt% POs-Ca および 1.2wt% 緑茶抽出物由来フッ化物配合ガム）を用い、二重盲検ランダム化比較試験のもと行われた。各ガムはコードでラベル化され、そのコードは全ての臨床試験が終了するまで（臨床試験に直接関与しない）コントローラーにより管理される。試験期間中、研究者はガムの種類を知らずに被験者に提供し，被験者はガムの種類を知らせられないまま摂取し、全ての臨床試験が終了後、コントローラーよりガム情報が開示される。被験者をランダムに 3 群に割り付けし、それぞれのガムを毎日 1 回 2

粒・1 日 3 回の頻度で、3 ヵ月間摂取させ、1 ヵ月毎に臨床評価を行った。

1) ICDAS 評価

各 WSL は以下の ICDAS コードに基づき評価された。

code 0: 健全エナメル質。歯面乾燥後にエナメル質透明性に視覚的変化がないもの。

code 1: エナメル質表層に、不透明や変色のような初期の視覚的変化を、湿潤状態では確認できないが、十分な歯面乾燥状態で認めるもの。

code 2: エナメル質表層に、白斑や褐色斑のような明瞭な視覚変化を、歯面乾燥状態だけでなく湿潤状態でも認めるもの。

2) OCT 評価

OCT の中心波長を 1310nm に設定し、WSL の 2 次元 OCT 画像撮影を行った。得られた 2 次元 OCT 画像の光学データは、臨床試験に直接関与のない他の評価者により ImageJ を用いて解析し、各ガム群について 1 ヵ月ごとの WSL の脱灰深さの平均値を算出した。なお WSL の脱灰深さは、過去の文献よりエナメル質表層から光の明暗境界部までと定義した。

3) 統計手法

OCT 解析結果に関する統計学的分析は、Wilcoxon rank-sum test と Bonferroni 法を用いて危険率 5%にて行った。

＜結果＞

本研究では、臨床試験中に脱落した被験者は認められず、全ての被験者が有害事象なく安全に最終評価まで終了した。

1) ICDAS 評価

ガム摂取前後において顕著な ICDAS code 変化 (code2→code 1, code 1→code 0, code 2→code 0) を認めた WSL の割合は、コントロール群 30%、POs-Ca 群 48%、POs-Ca+F 群 45%であった。

2）OCT 評価

各群におけるガム摂取前の平均脱灰深さは、コントロール群 183.7±46.2μm、POs-Ca 群 176.3±65.2μm、POs-Ca+F 群 173.5±57.8μm を示した。一方、ガム摂取後の各観察期間における平均脱灰深さは、コントロールガム群では全期間内で有意差を認めず ($p>0.05$)、 POs-Ca 群および POs-Ca+F 群では 0M-3M 間において有意差を認めた ($p<0.05$)。また、群間における平均脱灰深さの比較では、摂取 1 ヵ月後においてコントロールガム群と POs-Ca+F 群との間に有意差を認めた ($p<0.05$) 。

＜考察＞

本研究では、二重盲検ランダム化臨床試験のもと、POs-Ca およびフッ化物配合ガムの継続摂取による口腔内 WSL の再石灰化効果について検討した。主たる研究結果は、シュガーレスガムの継続摂取による WSL の脱灰深さ改善を伴う病態変化であり、その再石灰化効果には異なるガム群間において有意な違いを認めた。従来の多くの *in situ* 研究では、抜去歯から作製された人工う蝕を装着した口腔内装置が用いられ、その再石化効果はマイクロラジオグラフィーにより測定されてきた。一方、本研究では ICDAS および OCT を用いることで、ヒトロ腔内 WSL を対象とし

た定量的再石灰化評価を可能にした。

近年、初期う蝕の臨床評価において、ICDAS が正確かつ再現性のある評価方法として世界的に認知されている。ガム摂取前後の ICDAS 変化(code2→code 1, code 1→code 0, code 2→code 0)は、コントロール群 30%、POs-Ca 群 48%、POs-Ca+F 群 45%を示したが、その微小変化については識別が困難であった。一方、OCT 画像を用いた再石灰化評価では 3 ヵ月間を通して WSL の明瞭な内部構造変化の検出が可能であった。OCT 画像は，X 線および computed tomography（CT）画像と比較して高解像度(10-15μm)であり、過去の関連研究において OCT 波長が 780-1500nm の範囲、特に 1310nm 付近で明瞭なエナメル質の画像検出が可能であることが示唆されている。本研究では OCT の中心波長を 1310nm に設定し、WSL の表層部脱灰を容易に検出し評価することが可能であった。このため、OCT 断層画像は WSL 内部構造変化の評価に有効であり、ICDAS の補助的評価方法として適切であると考えられる。しかしながら、口腔内 WSL 再石灰化効果評価における ICDAS コードと OCT 評価との相関性についてはさらなる研究が必要である。

本 *in vivo* 研究では、3 ヵ月間の継続したシュガーレスガム摂取が WSL の進行停止または再石灰化に効果的であることが示唆された。一方、各被験者間およびガム群間において再石灰化程度の差が認められた。POs-Ca ガムおよび POs-Ca+F ガムでは、水溶解性カルシウム素材 POs-Ca の配合により、ガム摂取時に唾液中カルシウム濃度が向上し、表層下脱灰へカルシウムイオンが供給される。現在まで、水溶性カルシウム素材による WSL 再石灰化効果が実証されてきたが、その再石灰化効果はフッ化物が加わることで促進することが報告されている。本研究結果では、ガム摂取 1 ヵ月後の脱灰深さにおいて、コントロールガム群と POs-Ca+F 群との間に有意差を認めた ($p<0.05$) 。この結果より、POs-Ca+F ガムは、WSL 再石灰化を促進する上で、カルシウムのみを配合する POs-Ca ガムよりも有利であることが示唆された。関連する *in situ* 研究においても、低濃度フッ素の存在が、効果的な再石灰化効果を得る上で重要な役割を果たすことが報告されている。カルシウムおよび低濃度フッ素の WSL 再石灰化促進作用について、今後さらなる *in vitro* ならびに *in vivo* 研究が必要である。

より正確に WSL の再石灰化効果を評価するためには、再石灰化療法を試みる前に、WSL の組織学的な構造や発症原因（う蝕原生、非う蝕原生、両者の混合型）に関して注意深く臨床評価する必要がある。WSL 表層部には、その発症原因や活動性に応じて、ミネラル成分の取り込みを阻害するであろう高度石灰化層が存在すると考えられている。また、非う蝕原生であるエナメル質形成不全はう蝕に罹患しやすい傾向があり、この様な病変の管理方策として、う蝕リスク評価を行うとともに継続的に経過観察することが重要であると考えられる。

なお，OCT 所見にはいくつかの限界があり、脱灰深さが 300μm を超える WSL 評価は不可能であった。最近の牛歯エナメル質サンプルおよび OCT を用いた *in vitro* 研究では、脱灰深さが 200μm を超える WSL の再石灰化は困難であることが確認されている。

＜結論＞

今回の二重盲検ランダム化比較試験により、口腔内初期エナメル質う蝕の再石灰化におけるカルシウムおよびフッ素イオンの重要性が示された。さらに、POs-Ca へのフッ化物添加は口腔内 WSL の再石灰化効果を促進することが示唆された。また、ICDAS に加え OCT を用いて WSL 内

部構造変化を定量的に分析することにより、口腔内 WSL の経時的な再石灰化評価が可能であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5255　号	杉浦 美穂
論文審査担当者	主　査　川口 陽子 副　査　倉林　亨、永井　亜希子	
論 文 題 目	White spot lesion remineralization by sugar-free chewing gum containing bio-available calcium and fluoride: A double-blind randomized controlled trial	

（論文審査の要旨）

近年、 White Spot Lesion（以下 WSL：実質欠損を伴わない初期のエナメル質白斑病変）に対して再石灰化療法が推奨されている。 ICDAS （International Caries Detection and Assessment System）は、特に WSL の視診を含めた新たなう蝕診断システムとして導入され、普及しつつある。WSL の再石灰化のためには、水溶性 Ca 素材の有効性が確認され、さらにフッ化物の存在により再石灰化が促進することが報告されている。

こうした再石灰化療法の判定に際して、ICDAS が適用されることになるが、視診の不確実性という問題があり、より信頼性の高い評価法が求められている。光干渉断層装置（Optical Coherence Tomography、以下 OCT）は、非侵襲的かつリアルタイムに観察対象物の内部構造を観察することが出来ることが報告されており、再石灰化効果を検証する臨床試験に応用可能と考えられる。

このような背景の下、本研究では、水溶性 Ca 素材リン酸化オリゴ糖カルシウム（以下 POs-Ca）およびフッ化物配合ガムの口腔内 WSL に対する再石灰化効果について、ICDAS ならびに OCT を用いて二重盲検ランダム化比較試験により臨床試験を行ったもので、優れた着想と評価できる。試験では、ICDAS code2 または code 1 の WSL を被験者に対し、コントロールガム（コントロール群）、2.5wt% POs-Ca 配合ガム（POs-Ca 群）、2.5wt% POs-Ca および 1.2wt% 緑茶抽出物由来フッ化物配合ガム（POs-Ca+F 群）の 3 種のガムを 3 ヵ月間摂取させ、1 ヵ月毎に臨床評価を行っている。今回実施した二重盲検ランダム化比較試験は、国際的に最も信頼性の高い臨床試験であり、3 種のガムは適切に選択されたもので、周到に準備されたことがうかがえる。

特に OCT による評価で、各ガム群について 1 ヵ月ごとの WSL の脱灰深さの平均値を算出して定量的な評価ができたことは、精度の高い再石灰化療法の効果判定を可能にしたもので、高く評価でき、統計学的分析も適切に行われている。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.ガム摂取前後において顕著な ICDAS による改善効果が認められた WSL の割合は、コントロール群 30%、POs-Ca 群 48%、POs-Ca+F 群 45%であった。

2.ガム摂取後の各観察期間における平均脱灰深さは、コントロールガム群では全期間内で有意差を認めず、POs-Ca 群および POs-Ca+F 群では開始時と 3 か月後との間で有意差を認めた。

3.ガム群間における平均脱灰深さの比較では、摂取 1 ヵ月後においてコントロールガム群と POs-Ca+F 群間に有意差を認めた。

本研究より、ICDAS code と OCT 評価との相関性についてさらに検討は必要であるが、ガム媒体による口腔内 WSL の再石灰化評価に、ICDAS および OCT を用いたランダム化比較試験が可能であることが示唆された。また、POs-Ca 配合ガムと POs-Ca およびフッ化物配合ガムの口腔内 WSL に対する再石灰化効果があることが確認された。さらにこの両者の違いについても慎重に考察を展開し、POs-Ca に加えて微量フッ素イオン追加により再石灰化効果が促進されたとしている。

これまで、POs-Ca およびフッ化物配合ガムの口腔内 WSL に対する再石灰化効果は不明であった。これは WSL の定量化がむつかしいためであったが、本研究では、ICDAS code を用いて、WSL の再石灰化過程を数値化すると同時に、OCT を導入することで非侵襲的かつリアルタイムに WSL 内部構造変化をとらえ、その横断画像から脱灰深さの変化を定量的に分析することができたことは、これまでにない優れた成果である。さらに、二重盲検ランダム化比較試験により、POs-Ca およびフッ化物配合ガムの WSL 再石灰化効果と有効性についてより精度の高い臨床評価が得られたことも特筆すべき点である。この臨床評価手法は、WSL の再石灰化療法評価に新たな展開を提供し、今後の歯科保存学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	藤川　芳織
論文審査担当者	主　査　小野　卓史 副　査　井関　祥子、田畑　純
論　文　題　目	An *in situ* hybridization study of *perlecan*, *DMP1*, and *MEPE* in developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible and limb bud cartilage.

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

下顎頭軟骨は発生学的に二次軟骨に分類され、四肢の軟骨原基等の一次軟骨とは発生する時期、由来および細胞外基質の発現パターンが異なっていることが知られている。特にマウス下顎頭軟骨は、アルカリフォスファターゼ陽性の骨膜様組織に由来すること、前駆細胞が軟骨細胞に分化するやいなや急速に肥大軟骨細胞に分化すること、形成直後の肥大軟骨細胞は一過的に多様な分子を発現することが明らかになっている。一方、細胞外基質は骨•軟骨の発生過程に重要な役割を演じており、その遺伝子やタンパク質の発現が発生過程におけるマーカー分子として利用されている。この観点から論文提出者が所属する研究室では、これまでにタイプ I、Ⅱ、Xコラーゲン、アグリカン等の骨•軟骨関連分子の下顎頭軟骨発生過程における発現を検討してきた。その研究の一端として、本論文では perlecan、dentin matrix protein 1（DMP1）および matrix extracellular phosphoprotein（MEPE）の下顎頭軟骨における発現パターンに着目することにした。それぞれ、次のような知見がある。

perlecan はヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、他の細胞外基質や成長因子と結合して形態形成や細胞の増殖、分化に広く関与することが知られている。さらに、*perlecan* 欠損マウスによる研究から perlecan が正常軟骨発生に必須の分子であることが明らかとなっている。しかし、軟骨初期形成過程における *perlecan* mRNA 発現変化については、正常マウス下顎頭軟骨および肢芽軟骨のどちらにおいても報告がこれまでにないことから、その検討によって両軟骨の特徴や差異がさらに明らかになることが期待される。

DMP1 は、非コラーゲン性タンパクの small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein（SIBLING）family に属し、主に骨細胞や象牙芽細胞等の石灰化組織に発現するが、軟骨や顎下腺等の非石灰化組織でも弱く発現する。マウスの軟骨では、胎生 16 日齢（E16.0）から出生後の肢芽の肥大軟骨細胞に *DMP1* mRNA が発現することが報告されている。そして、DMP1 タンパク質の C 末端断片が主として肥大細胞層や石灰化層に局在しているため、軟骨基質の石灰化に促進的に働くことが推測されている。しかしながら下顎頭軟骨発生過程および一次骨化点出現前の肢芽軟骨における DMP1 の発現については遺伝子レベルでもタンパク質レベルでもこれまで明らかにされていない。

MEPE も DMP1 と同様に SIBLING family の一員で、骨細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞等に発現

する。軟骨においては、*MEPE* mRNA が 3 週齢マウス成長板の肥大軟骨細胞に発現するという報告はあるが、下顎頭軟骨および肢芽軟骨においての報告はこれまでない。

以上のことから、本研究の第一の目的は下顎頭軟骨および肢芽軟骨発生過程における *perlecan*、*DMP1* および *MEPE* の mRNA 発現を検討し、それらの分子の両軟骨発生過程における役割の一端を明らかにすることとした。また、学位申請者所属研究室では、以前にマウス、ラットおよびヒトのメッケル軟骨において明瞭な MEPE の免疫染色陽性反応を得ていたことから、MEPE は軟骨特有のマーカー分子に成り得るのではないかという仮説の検証を本研究の第二の目的とした。

＜材料および方法＞

E14.0-16.0 の下顎頭軟骨の原基および下顎頭軟骨を顕微鏡下で採取し、Total RNA を回収して逆転写を行った後、リアルタイム PCR 法によってそれらの組織における 3 分子の発現量を定量した。リアルタイム PCR によるデータは平均値 ± 標準偏差にて示し、統計処理は一元配置分散分析を行い、多重比較検定には Turkey 法を用いた。有意差はいずれも $p<0.01$ とした。さらに、E12.0-16.0 の下顎頭軟骨および脛骨の軟骨原基（脛骨軟骨）を摘出した後に通法に従いパラフィン包埋連続切片を作製し、^{35}S-UTP 標識 RNA プローブを用いた *in situ* hybridization および免疫組織染色を行なった。また、抗体の抗原特異性の検討のために、3 週齢マウスの骨および気管軟骨からタンパク質を抽出し western blotting を行った。

＜結果＞

［リアルタイム PCR による発現量の定量解析］

E14.0 の下顎頭軟骨原基は間葉細胞凝集からなり、E15.0 に初めて軟骨細胞が出現し、その一部は肥大化していた。E16.0 には著しく長さが伸長し、特に肥大細胞層の拡大が顕著であった。リアルタイム PCR によって、*perlecan* mRNA は E14.0 から E16.0 の間に有意な発現増加が認められた。*DMP1* および *MEPE* は、E14.0 から E16.0 の間にわずかな発現の増加傾向を認めたものの、有意差は認められなかった。

［両軟骨における *perlecan* mRNA 発現とタンパク質局在］

下顎頭軟骨における *perlecan* mRNA 発現は E15.0 および E16.0 の軟骨細胞で検出されたが、E16.0 の肥大細胞層深層では減弱していた。脛骨軟骨における *perlecan* mRNA 発現は E13.0 および E14.0 の軟骨細胞で検出されたが、E14.0 の肥大軟骨細胞では減弱していた。免疫染色によって、perlecan タンパク質の局在は両軟骨ともに軟骨基質全体に認められた。

［両軟骨における *DMP1* mRNA 発現とタンパク局在］

下顎頭軟骨における *DMP1* mRNA 発現は E15.0 のごく一部の肥大軟骨細胞、E15.0 と E16.0 の bone collar で認められた。脛骨軟骨における *DMP1* mRNA 発現は、E14.0 の肥大細胞層深層の軟骨細胞および Bone collar で認められた。DMP1 の C 末端部位を認識する抗体を用いた免疫染色によって、DMP1 タンパク質の局在は下顎骨、両軟骨の bone collar および E14.0 の脛骨軟

骨の肥大細胞層深層に認められた。

［両軟骨における *MEPE* mRNA 発現タンパク局在］

両軟骨ともに *in situ* hybridization では *MEPE* mRNA 発現が認められなかった。しかしながら免疫染色によって、MEPE タンパクの局在が両軟骨の軟骨基質全体および bone collar で認められた。

［DMP1 および MEPE の western blotting］

DMP1 抗体によって骨由来サンプルおよび軟骨由来サンプルから 65kDa のバンドが検出された。MEPE 抗体によって骨由来サンプルから 62kDa、軟骨由来サンプルから 67kDa および 59kDa のバンドが検出された。

＜考察＞

［perlecan について］

perlecan mRNA 発現は、脛骨原基の間葉細胞凝集では認められず、新たに出現した軟骨細胞で初めて発現が認められたが、骨幹部の肥大軟骨細胞では発現が減弱していた。このことは分化成熟段階にある軟骨細胞は活発に perlecan を合成するが、肥大軟骨細胞では低下することを示している。下顎頭軟骨においても軟骨細胞に発現が認められたが、E16.0 の肥大細胞層深層では発現が減弱していた。E15.0 で最初に形成された軟骨細胞はすでに肥大軟骨細胞の性質を有しているが、この細胞にも発現が認められたことから、軟骨前駆細胞が肥大軟骨細胞へと急速に分化したことで perlecan の mRNA やタンパク質が残留しているとも考えられ、この時期の肥大軟骨細胞が多様な分子を発現するという、従来から言われている下顎頭軟骨の特徴がさらに裏付けられた。また、perlecan タンパク質の局在は両軟骨とも基質全体に認められたことから perlecan は基本的な軟骨基質成分の 1 つであることが確認された。

［DMP1 について］

一次骨化点出現前の脛骨軟骨の肥大細胞層は、細胞の形態等によって浅層と深層に区別されている。本研究では、*DMP1* mRNA が肥大細胞層深層に発現しており、DMP1 が長骨の成長軟骨における肥大細胞層深層の新たなマーカー分子になると考えられるとともに、この分子の軟骨基質石灰化への関与が示唆された。一方、下顎頭軟骨では E15.0 のごく一部の肥大軟骨細胞に発現するのみであったことから、この時期の DMP1 の下顎頭軟骨における役割は脛骨軟骨と比較すると大きくはないと考えられた。

［MEPE について］

今回検索した日齢では、*in situ* hybridization による *MEPE* mRNA 発現はいずれの軟骨でも認められなかったが、免疫染色では軟骨基質において明瞭な陽性反応が認められた。western blotting による検索では、今回使用した MEPE 抗体によって、骨組織由来標本で陽性が確認されたバンドとは、やや大きさが異なるものの、軟骨基質由来標本においても陽性バンドが認め

られた。このことから軟骨基質にはこの抗体で認識される分子が確かに存在し、免疫反応が非特異的なものではない事が確認され、*in situ* hybridization で遺伝子発現が検出できない程度の少量 mRNA から合成された MEPE タンパク質が軟骨組織に蓄積しているのではないかと推察した。しかしながら、軟骨細胞における明らかな mRNA 発現が認められなかったことから、MEPE が軟骨細胞のマーカー分子になりうるのではないかという仮説は修正する必要があると考えられた。

＜結論＞

本研究では、マウス下顎頭軟骨発生過程における perlecan、DMP1 および MEPE の遺伝子発現とタンパク質局在の変化を検索し、一次軟骨である脛骨軟骨と比較することにより、代表的な二次軟骨である下顎頭軟骨の新たな構造上の特徴を明らかにすることができた。また従来提起していた MEPE に関する仮説は修正する必要があると結論づけた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5256　号	藤川　芳織
論文審査担当者	主　査　小野 卓史 副　査　井関 祥子、田畑　純	

（論文審査の要旨）

下顎頭軟骨は発生学的に二次軟骨に分類され、四肢の軟骨原基等の一次軟骨とは発生する時期、発生の由来および細胞外基質の発現パターン等が異なっている。また、細胞外基質は骨・軟骨の組織発生に関与し、しばしば各器官特有のマーカー分子として利用される。細胞外基質の中でも、ヘパラン硫酸プロテオグリカンである perlecan は、他の細胞外基質や成長因子と結合して正常発生や病態の発現過程に広く関与し、さらに *perlecan* 欠損マウスによる研究から perlecan が正常軟骨発生に必須の分子であることが明らかとなっている。しかしながら、軟骨初期形成過程における *perlecan* mRNA の発現変化については、正常マウス下顎頭軟骨および肢芽軟骨のいずれにおいても報告がみられない。dentin matrix protein 1（DMP1）は small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein（SIBLING）family に属し、主に骨細胞や象牙芽細胞等の石灰化組織に発現するが、軟骨や顎下腺等の非石灰化組織でも弱く発現する。軟骨組織においてはこの分子の C 末端断片が主として肥大細胞層や石灰化層に局在しており、軟骨基質の石灰化に促進的に働くことが推測されているが、下顎頭軟骨発生過程および一次骨化点出現前の肢芽軟骨における発現については不明である。matrix extracellular phosphoprotein（MEPE）も SIBLING family に属し、骨細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞に発現するが、軟骨における MEPE 発現に関する検討は少なく、生後マウス成長板の肥大軟骨細胞に発現するという報告はあるものの、下顎頭軟骨および肢芽軟骨においては検討されていない。

以上のような背景のもと、藤川はこれら 3 分子に着目し下顎頭軟骨および肢芽軟骨発生過程における各分子の発現パターンを検討することで、両軟骨の特徴がさらに明らかになると考え、本研究を行った。数多くの先行研究も参考にした上でこのような発想に至ったことは非常に理にかなったものであると評価できる。また本研究において藤川は、以前に提案された「MEPE が軟骨特有のマーカー分子に成り得る」という仮説についての検証も併せて行なった。

方法としては、まず mRNA 発現の定量解析のために、胎生（E）14-16 日齢 の下顎頭軟骨の原基および下顎頭軟骨を採取しリアルタイム RT-PCR を行なった。次いで E12.0-16.0 のマウス下顎頭軟骨および脛骨の軟骨原基（脛骨軟骨）を摘出した後に通法に従いパラフィン包埋連続切片を作製し、^{35}S-UTP 標識 RNA プローブを用いた *in situ* hybridization および免疫組織染色を行なった。さらに抗体の抗原特異性検討のために、3 週齢マウスの骨および気管軟骨からタンパク質を抽出し、western blotting を行った。これらの実験手技および観察方法は、解剖学的知識および分子生物学的知識に基づき適切に行われていた。

得られた結果の概要は以下に示すものであった。

1. E14.0 の下顎頭軟骨原基は間葉細胞凝集からなり、E15.0 に初めて軟骨細胞が出現し、その一部はすでに肥大化しており、E16.0 には著しく長さが伸長した。リアルタイム RT- PCR によって、*perlecan* mRNA は E14.0 から E16.0 の間に有意な発現増加が認められた。*DMP1* および *MEPE* mRNA は同期間にわずかな発現の増加を認めたが、有意差は認められなかった。
2. 下顎頭軟骨における *perlecan* mRNA 発現は E15.0 および E16.0 の軟骨細胞で検出されたが、E16.0 の肥大細胞層深層では減弱していた。脛骨軟骨における *perlecan* mRNA 発現は E13.0 および E14.0 の軟骨細胞で検出されたが、肥大軟骨細胞では減弱していた。
3. 免疫染色によって、perlecan タンパク質の局在は両軟骨の軟骨基質全体に認められた。
4. 下顎頭軟骨における *DMP1* mRNA 発現は E15.0 のごく一部の肥大軟骨細胞と bone collar で認められた。脛骨軟骨における *DMP1* mRNA 発現は E14.0 の肥大細胞層深層の軟骨細胞および bone collar で認められた。
5. 免疫染色によって、DMP1 タンパク質の局在は下顎骨、両軟骨の bone collar および E14.0 の脛骨軟骨の肥大細胞層深層に認められた。
6. *In situ* hybridization では、両軟骨ともに *MEPE* mRNA 発現は認められなかったが、免疫染色では MEPE タンパク質の局在が両軟骨の軟骨基質全体および bone collar に認められた。
7. western blotting による解析では、MEPE 抗体によって骨由来サンプルから 62kDa、軟骨由来サンプルから 67kDa および 59kDa のバンドが検出された。

以上のことから、下顎頭軟骨発生初期 (E15.0) における肥大軟骨細胞の *perlecan* mRNA 発現は、軟骨前駆細胞が急速に肥大軟骨細胞に分化するという下顎頭軟骨の特徴をさらに裏付けるものであった。DMP1 は脛骨軟骨深層のマーカーに成り得るが、下顎頭軟骨における役割は大きくないことが考えられた。MEPE に関しては、western blotting による解析から免疫反応が非特異的なものではないことが明らかになったが、軟骨組織における明らかな mRNA 発現が認められなかったことから、MEPE が軟骨細胞特有のマーカー分子になるという仮説は修正する必要があると結論付けた。

以上より、本論文はマウス下顎頭軟骨発生過程における perlecan、DMP1 および MEPE の遺伝子発現とタンパク局在の変化について初めて検討したものであり、一次軟骨である肢芽軟骨との相違点が明らかとなり、代表的な二次軟骨である下顎頭軟骨の新たな構成上の特徴を明らかにした。これらの成果は、今後の解剖学、発生学のみならず、顎顔面の成長発育の新たな制御方法の開発など、臨床各科の発展にも寄与するところが非常に大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	沈　東鶴
論文審査担当者	主査　宇尾　基弘 副査　中島　友紀、塩田　真
論　文　題　目	Synthesis and enhanced bone regeneration of carbonate substituted octacalcium phosphate

＜緒言＞

リン酸カルシウム骨補填材は、その高い生体親和性、骨伝導性を用いて、歯科や整形外科の治療に多用されている。これらは非吸収性のハイドロキシアパタイト(HA)と吸収性のリン酸三カルシウム(TCP)に大別されるが、近年、リン酸八カルシウム(OCP; octacalcium phosphate)はその骨伝導性、生体親和性、生体内吸収性の高さに注目が集まっている。OCP は骨や歯の無機成分であるリン酸カルシウムから成る HA 結晶の前駆体と考えられており、HA と結晶構造が類似しており、生理的環境下において加水分解によって HA へと結晶構造を転換する特性を持つ。この OCP を前駆体として骨欠損部に埋入すると、生体内で HA に転化し、その後に生理的な骨を形成することが報告されている。特に、ほとんど吸収されない HA や、短期間に吸収されてしまう β-TCP に比べ、OCP は骨再生の良い足場になる可能性がある。そこで、本研究では、OCP の生物学的、物理化学的性質のさらなる強化をねらい、材料中の炭酸イオンに着目した。OCP 中のリン酸イオンの一部は、炭酸イオンに置換することが可能であるとの既報があり、また HA 系の材料においても炭酸置換によりその生体親和性が向上することが知られている。OCP においても炭酸置換によりその諸特性が変化し、より高性能な骨補填材料になる可能性がある。本研究では、炭酸置換リン酸八カルシウム(OCPC; Octacalcium phosphate carbonate)を合成し、その物理・化学的性質を明らかにするとともに、OCPC に対する in vitro の反応を調査し、OCPC の次世代の骨補填材料としての可能性を探索することを目的とした。

先述のように、OCP は HA と類似した結晶構造を持ち、生体中における HA の前駆体と考えられている。実際に、骨欠損部に埋入された OCP は生体内で HA に転化することが知られている。OCPC においても生体中にてアパタイト構造へ変化し、炭酸アパタイトに転化するものと考えられる。そこで、本研究では、OCP および OCPC の転化後の物質である CDHA、 CDCA を合成し、その炭酸置換効果を OCP および OCPC と併せて評価した。

本研究では、湿式合成方法を用いて OCPC を合成し、その形状、結晶構造、化学組成を評価した。さらに MG63 細胞を用いて OCP、OCPC、CDHA、CDCA における骨芽細胞の増殖と骨芽細胞への分化を研究した。

＜材料と方法＞

4 種の試料、OCP、OCPC、CDHA、CDCA を合成した。OCPC は、リン酸水素カルシウム二水塩($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$; DCPD)と炭酸カルシウム($CaCO_3$)、さらに炭酸イオン源として炭酸水素ナトリウムの３種の原料をモル比 5 : 2 : 1 で混合し、純水中 60˚C で 2 時間撹拌した後、沈殿物を蒸留水で洗浄し、60˚C で 3 日間乾燥させ、OCPC 原料粉とした。この反応は DCPD → OCPC → CDCA の逐次反応であり、OCPC は中間生成物として得られ、さらに反応時間の延長により CDCA を得ることが可能である。同じ手順にて、撹拌時間を 24 時間まで延長することにより、CDCA を合成し、OCPC と同様の方法にて懸濁液から原料粉を回収した。OCP の合成には、原料として酢酸カルシウムとリン酸二水素ナトリウムを用いた。0.03 mol、250 mL リン酸二水素ナトリウムの水溶液を 60˚C に保持し、0.04 mol、250 mL 酢酸カルシウム水溶液を滴下し、60˚C で 3 時間反応させ、OCP を得た。同じ方法で得られた OCP 懸濁液を 70˚C で 21 時間撹拌し、CDHA を合成した。すべての沈殿物を蒸留水で洗浄し、60˚C で 3 日間乾燥させ、原料粉とした。

Ｘ線回析（XRD）、フーリエ変換赤外分光法（FT-IR）、誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）、走査電子顕微鏡（SEM）を用いて、形態観察、結晶構造解析、化学組成の決定を行った。まず、原料粉を一軸加圧成型し、4 種類のペレットを作製した。ペレットは 70 % エタノールと超純水で 2 回洗浄した後、室温で乾燥させた。一つのペレット上の 5 か所をレーザー顕微鏡で表面粗さを計測した。

次に、ヒト腫瘍由来の MG63 細胞を 37 °C, 95 %大気＋5 % CO_2 雰囲気で 10 % fetal bovine serum と 1 % penicillin-streptomycin を含む αMEM で培養した。ついで、OCP, OCPC, CDHA, CDCA のペレットおよび対照群として準備したガラス基板上に細胞を播種した。細胞増殖は細胞培養 1、3、6 日後、通法に従い MTT assay で評価した。さらに Ascorbic acid, β-glycerol phosphate, dexamethasone を分化因子として用いて培養した MG63 細胞の骨芽細胞への分化を ALP 活性により評価した。タンパク量は Micro BCATM Protein Assay Kit で、アルカリフォスファターゼ活性は LabAssayTM ALP kit で計測し、相対的な ALP 活性は ALP 活性(μmol/μL)/総タンパク量 (μg/μL) で評価した。各評価値の検定は、一元配置分散分析によりおこない、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

OCP および OCPC の転化を検討するために，細胞培養と同一の環境下で、OCP と OCPC のペレットを同じ細胞培養液に浸漬させた。3 日間に 1 回培養液を交換し、11 日後、PBS およびを用いてペレットを洗浄し、XRD パターンの測定を行った。

＜結果と考察＞

走査電子顕微鏡での観察結果より、合成された OCP および OCPC の粒子は、板状結晶であった。OCPC と OCP の板状結晶の長さが異なり、OCPC は OCP に比べて短い板状結晶であった。この相違は合成時の結晶成長初期の環境の影響、例えば、DCPD から OCPC への転換過程中、反応原料として存在する $NaHCO_3$ が pH に影響し、結晶の成長に影響を及ぼしたと考えられる。OCP および OCPC で観察された板状結晶は、既報の OCP 粒子の形態に類似しており、炭酸イオンが粒子形態へ与える影響はわずかであることが分かった。一方、合成した CDHA の粉は針状結晶の集合より成っており、合成した CDCA では CDHA 同様の針状結晶と板状結晶双方が観察された。CDCA でも炭酸含有の有無は結晶形態に大きな差を生じていなかった。

OCP と OCPC の XRD パターンは OCP のそれに一致していた。CDHA と CDCA の XRD パターンは HA と一致していた。XRD から、OCP と CDHA への炭酸イオンの置換で、結晶の格子定数は軽微に変化することが判明した。

FT-IR のスペクトルでは、OCPC および CDCA において炭酸イオンの存在を示す吸収ピークが観察された。この吸収ピークは、1419cm^{-1} 及び 1456cm^{-1} に位置しており、これは、OCP 結晶構造中のリン酸水素イオンが炭酸イオンによって置換されたことを意味し、炭酸イオンを含有する OCP である OCPC の合成に成功したことを示している。また、OCP および OCPC ではリン酸水素イオンのピークが観察された。CDHA および CDCA では、リン酸水素イオンのピークは見られず、水酸化物イオン（OH^-）に由来するピークが観察された。ICP-AES 分析結果によると、OCP, OCPC, CDHA, CDCA における Ca/P モル比はそれぞれ 1.32, 1.45, 1.46, 1.50 であった。OCPC の Ca/P モル比は 1.45 であった。これらの結果に基づき、OCPC の化学組成を $Ca_8(HPO_4)_{1.52}(PO_4)_4(CO_3)_{0.48}\cdot 5H_2O$ と算出した。各試料の表面粗さを比較したところ、それぞれに有意差は認められなかった。細胞培養培地 11 日間浸した後において、OCP と OCPC の XRD パターンにおいて明らかな変化は認められず、培養環境中におけるこれら素材の HA への転換は認められなかった。

MG63 細胞はすべての試料において、6 日目までの培養で細胞数が増加した。これより、OCP、OCPC、CDHA、CDCA は生体適合性があり、MG63 細胞の生存と増殖を抑制しないことが示された。炭酸イオン含有の OCPC では OCP に比べて細胞増殖を促進する効果が高く、炭酸イオン含有の CDCA でも CDHA に比べて細胞増殖を促進する効果が高かった。特に OCPC は他と比べて *in vitro* で MG63 細胞の増殖と分化を促進した。6 日目での MG63 細胞の増殖は、OCPC、CDCA、OCP、CDHA の順で高かった。

ALP 活性はいずれの試料においても、6 日目から 10 日目で増加、10 日目と 14 日目では減少する傾向を示した。10 日目では OCP より OCPC での活性が高かったが、有意な差は認められなかった。一方、6 日目と 10 日目の ALP 活性は、CDHA に比べて、OCP, OCPC, CDCA 上で有意に高かった。また、CDHA より炭酸イオン含有の CDCA において高かった。

細胞を培養したペレットの表面粗さでは、試料間での有意な差は認められず、上記の細胞挙動の差はペレットの表面性状によるものではなく、化学組成に依存していることが示唆された。従って細胞増殖の差異は結晶構造、表面粗さ、表面の形態に起因するとは考えられず、化学組成の相違によるものと推察された。炭酸イオンの骨伝導促進については、未だ不明な点が多く、今後、さらなる研究が必要であるが、本研究で得られた OCPC は骨芽細胞の増殖と分化を促進するなど、骨欠損治療用材料としての可能性が期待された。

＜結論＞

本研究では、骨補填材料としての OCP の性能強化をねらい、OCP 中に炭酸イオンを含有する OCPC を合成する手法を確立した。得られた OCPC は、OCP と同様の結晶構造を持ち、構造中のリン酸イオンの一部が炭酸イオンに置換された構造を持つことが明らかになった。また、MG63 細胞を用いた OCPC の *in vitro* 評価では、炭酸置換が骨芽細胞の増殖および分化を促進させることを示唆する結果を得た。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5257　号	沈　東鶴
論文審査担当者	主　査　宇尾　基弘 副　査　中島　友紀、塩田　真	
論 文 題 目	Synthesis and enhanced bone regeneration of carbonate substituted octacalcium phosphate	

（論文審査の要旨）

近年、歯科治療において骨再生に基づいた骨補填材は幅広く応用されており、様々な骨補填材料が開発されている。その中でもリン酸カルシウムは世界中に普及しており、特に水酸アパタイト（HA）、β-リン酸三カルシウム（β-TCP）は高い生体親和性、骨伝導性を示すことが報告され、臨床的に多く応用されている。しかしながら、HA は生体内で吸収されず、また一方で β-TCP は早期に吸収される結果、骨再生の予測が困難とされている。近年、リン酸八カルシウム（OCP）は優れた生体親和性や生体内吸収性、高い骨伝導性を有しており、生体材料として研究されている。OCP 結晶内の HPO_4^{2-}が CO_3^{2-}に置換された炭酸置換リン酸八カルシウム（OCPC）は，生体骨の無機主成分である炭酸含有アパタイトの前駆体として利用可能と考えられるが，未だその合成方法や，細胞に及ぼす影響に関して詳細な検討はなされておらず、また、炭酸イオンの置換がどのような影響を与えるかは未だ解明されていない。

このような背景のもと、本研究では OCPC の合成、理化学的性質や、生体機能を明らかにするために、OCP, OCPC,カルシウム欠損ハイドロキシアパタイト(CDHA)、カルシウム欠損炭酸アパタイト(CDCA)を合成した。OCPC の結晶構造や形態及び化学的性質は、フーリエ変換赤外分光法（FT-IR）、誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）、X 線回折（XRD）、走査電子顕微鏡（SEM）を使用して、OCP、OCPC、CDHA および CDCA と相互に比較し、物性評価を行った。また、これら四つの粉体試料から作製したペレットを作製し、その表面粗さや形態を評価すると共にペレット上での細胞培養試験もあわせて行った。ヒト骨肉腫由来 MG63 細胞をペレット上に播種し、一定期間培養し、その増殖や分化に対する作用は、MTT assay と ALP assay にて評価した。

OCP は骨補填材として治験が開始されているが，より生体骨に近い OCPC に関して報告は少なく、さらに炭酸イオンの置換が OCPC の性質に与える影響は明らかになっていないことから、その着眼点は高く評価できる。また得られた結果に対する検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことがうかがえる。

本研究により得られた主な成果は以下の通りである。

１．湿式合成した OCP の粒子は long plate-like の結晶、OCPC は short plate-like の結晶であった。一方、CDHA の粒子は針状結晶の集合より成っており、CDCA では同様の針状結晶と板状結晶が観察された。合成した OCPC の XRD パターンは OCP のそれに一致してい

た。CDHA と CDCA の XRD パターンは HA と一致していた。FT-IR のスペクトルで OCPC および CDCA において炭酸イオンのピークが観察されたことから、炭酸イオンの置換固溶が推定された。また、OCP および OCPC ではリン酸水素イオンのピークが観察されたが、CDHA および CDCA では OH^-のみのピークが観察された。OCP, OCPC, CDHA, CDCA における Ca/P モル比はそれぞれ 1.32, 1.45, 1.46, 1.5 であった。圧粉作製したペレットの表面粗さを比較したところ、試料間の有意差が認められなかったことから，基板表面の形態は細胞機能制御に影響を及ぼさないことが示唆された。生体内環境における OCP および OCPC の HA への転化を検討する為に，ペレットを培地に 11 日間浸したが、各試料の XRD パターンに明らかな変化は認められなかった。

２．MG63 細胞はすべてのペレット表面で 1 日目から 6 日目で増加していることから、OCP、OCPC、CDHA、CDCA は生体適合性があり、MG63 細胞の生存と増殖を抑制しない事が示された。6 日目での MG63 細胞の増殖は、OCPC、CDCA、OCP、CDHA の順で向上していた。

３．ALP 活性はいずれの試料においても、6 日目から 10 日目で増加、10 日目と 14 日目では減少する傾向を示した。10 日目では OCP より OCPC での活性が高かったが、有意な差は認められなかった。一方、CDHA と比較すると、6 日目と 10 日目の ALP 活性は OCP, OCPC, CDCA 上で有意に向上していたことから、MG63 細胞の分化が促進されていることが示唆された。

以上の結果より、OCP に炭酸イオンを置換固溶した OCPC を、湿式法にて合成可能であることを合成物の結晶構造や組成分析から明らかにした。また、OCP および HA への炭酸イオンの取り込みが骨再生の促進に寄与する可能性が示唆された。その理由として、本実験結果では OCPC は OCP と比較して有意に MG63 細胞の増殖を促進すること、さらに OCPC が良好な骨芽細胞の分化能を有していたことが挙げられる。こうした結論に至るまでの考察は、材料学的な特性を十分に理解したうえで理論的な展開がなされており、申請者の本領域における十分な知識と情報を裏付けるものである。

本研究成果は、OCPC の骨補填材としての可能性を示すだけでなく、OCP とアパタイトに取り込まれた炭酸イオンの細胞への影響を解明する事に寄与し、今後の小児歯科学、歯科材料学、口腔外科学ならびに歯科インプラント学の発展に大いに貢献するものと考えられる。また、生体骨の無機主成分である炭酸含有アパタイトの前駆体として、OCPC の合成方法を確立したことは、今後のリン酸カルシウムを用いた骨補填材の開発を加速するための基盤技術を確立したと考えられる。

以上より、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として、十分価値のあるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	内間　コエクリン　カリン　春美
論文審査担当者	主査　泰羅　雅登 副査　柴田　俊一　　秀島 雅之
論　文　題　目	Effect of unilateral nasal obstruction on the craniofacial muscles in growing rats

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

Human neonates are nasal breathers by nature. However, inadequate breathing patterns can occur after obstruction of the airways, increasing the upper airway resistance. The obstruction of the upper airways can develop throughout life, and the effect of the different breathing patterns on the craniofacial growth has been widely debated. In humans, changes in the nasal pathways can develop a mouth breathing pattern as an adaptive response or a habit acquired after birth. Patients with nasal obstruction and mouth breathing are related to abnormal growth pattern of the different craniofacial structures, and its function. A normal respiratory pattern influences the harmonious growth and development of the craniofacial structures, by adequately interacting with mastication and swallowing. However, an altered breathing pattern is usually related to alterations in the craniofacial complex, such as a lower position of the mandible, an anterior and lower position of the tongue, lower tonicity of orofacial muscles, etc., that can lead to malocclusion problems, such as open bite, etc.. Muscles in the upper airway are involved in multiple functions, and the tongue plays an important role in maintaining the airway patency during respiration. The masseter participates in respiration by stiffening the upper airway, and also the digastric muscle has participation in the respiratory process. In mammals, similar tendencies are found, and several studies of nasal obstruction in animals have been performed in order to understand its influence in the craniofacial complex and the whole organism. In rat animal studies, models of nasal obstruction have been widely used, suggesting this protocol a reliable one to perform. Although changes in the breathing pattern can be seen since birth, these changes can also start in elder ages, between the childhood and adolescence, particularly due to adenotonsillar hypertrophy and allergic rhinitis. Previous studies suggested that nasal obstruction not only affected the craniofacial normal growth and development, but also reported changes in the musculature tonicity, activity, and histology. Based on these finding we aimed to study the effects of nasal obstruction on the craniofacial muscles and function, by analyzing the contractile characteristics of the tongue-protruding muscles, including the genioglossus muscle, the histological characteristics of the genioglossus muscle, and the jaw-opening reflex characteristics.

＜方法＞

In the first experiment, we used 60 male Wistar rats (n=10), dividing them in control and experimental group. The experimental group rats underwent unilateral nasal obstruction of the left nostril at 8 days-old. Contractile characteristics of the tongue-protruding muscles were measured at 5, 7, and 9 weeks-old.

We stimulated the medial branch of the hypoglossal nerve and measured the contractile properties by attaching the tip of the tongue to an isometric force transducer with a silk suture. We analyzed the twitch force, contraction time, half-decay time, tetanic force at 60Hz, tetanic force at 80Hz and fatigue index.

In the second experiment, we used one-hundred-two male Wistar rats that were divided in control and experimental group. Rats in the experimental group underwent unilateral nasal obstruction of the left nostril at 5 weeks-old, and both contractile properties of the tongue protruding muscles (n=7) and jaw-opening reflex (n=10) characteristics were measured at 7, 9 and 11 weeks-old. The tongue protruding muscles characteristics were measured similarly to the first experiment. For the measure of the jaw-opening reflex, we stimulated the inferior alveolar nerve, and inserted electrodes in the anterior belly of the digastric muscle to measure the jaw-opening reflex latency, duration, and peak-to-peak amplitude.

In the third experiment, we used sixty-three male Wistar rats that were divided in control and experimental group. Rats in the experimental group underwent unilateral nasal obstruction at 8 day-old, and both the contractile characteristics (n=7) and the immunohistochemical characteristics (n=2) of the genioglossus muscle were measured at 5, 7 and 9 weeks-old. We removed the mandibular insertion of the genioglossus muscle and stimulated the genioglossus branch of the hypoglossal nerve to measure the contractile properties by attaching the detached insertion of the genioglossus to an isometric force transducer with a silk suture. We analyzed the same parameters as in the first experiment. In addition, we analyzed the myosin heavy chain composition of the genioglossus muscle fibers by immunohistochemistry, and measured the number, ratio, diameter and cross-sectional area of the slow type, fast-type, IIa-type and IIb-type muscle fibers.

＜結果＞

There were no statistical changes in the rats weight at any age between the control and experimental group in any of the experiments. In the first experiment both twitch force, tetanic force at 60Hz and tetanic force at 80Hz were increased at all ages after nasal obstruction. Half-decay time was also increased at all ages in the experimental group. However, the fatigue index was decreased in the experimental group at 5 weeks-old. In the second experiment, regarding the contractile properties of the tongue-protruding muscles, the twitch force and tetanic force at 80Hz were increased only at 9 and 11 weeks-old in the experimental group. The tetanic force at 60Hz and the half-decay time were increased at all ages after nasal obstruction. Regarding the jaw-opening reflex, the latency was increased, and the peak-to-peak amplitude was decreased at all ages after nasal obstruction.

In the third experiment, the twitch force, the tetanic force at 60Hz and the tetanic force at 80Hz were increased at all ages in the experimental group. The fatigue index was decreased only at 5 weeks-old in the experimental group. The fast-type diameter and cross-sectional area, IIa-type cross-sectional area and

IIb-type diameter were increased in the experimental group at 7 and 9 weeks-old. The IIa-type diameter and IIb-type cross-sectional area increased after nasal obstruction at all ages.

＜考察＞

Nasal obstruction during the growth period has great effects in the craniofacial muscles and function, by altering the tongue protruding muscles and jaw-opening reflex. The tongue protruding muscles contractile characteristics and the jaw-opening reflex physiological characteristics are alters after nasal obstruction in both early and late stages of growth. Moreover, the genioglossus muscle also changes its contractile characteristics and its muscle fiber histological characteristics after nasal obstruction in rats.

The tongue plays an important role during respiration by maintaining the airway patency by contracting its protruding muscles, and any affection in the breathing pattern may also affect the tongue muscles. The muscle function is influenced by its contractile characteristics. Moreover, the contractile characteristics have a deep relation with its muscle fiber composition.

The tongue force increased at all ages after nasal obstruction at early and late stages of growth, and also maintained the contraction for longer time. Furthermore, the genioglossus muscle, that moves the tongue forward and downward, increased its contraction force, muscle fiber diameter and cross-sectional area of the fast-type, IIA-type and II-B type muscle fibers, clarifying that genioglossus muscle is indeed stronger after nasal obstruction. The tongue-protruding muscles not only increased their force after nasal obstruction, but also altered their physiological function and histology.

Tongue musculature is not only affected, but also the masticatory muscles are affected as well by nasal obstruction. Regarding the jaw-opening reflex, there was an increase in the latency, and decrease in the peak-to peak amplitude, suggesting that nasal obstruction delays the reflex regulation, affecting the rhythmicity and function of the masticatory muscles.

＜結論＞

Nasal obstruction during the growth stage affects the craniofacial muscles and function, possibly affecting the normal growth and development of the craniofacial complex.

＜和文による要約＞

ヒトは鼻気道を用いて正常な呼吸活動を行っている。鼻呼吸は、嚥下と咀嚼が適切に相互作用することで、顎顔面領域の調和した成長を助けているが、近年、鼻呼吸障害を有する子供が増加傾向にある。成長期における鼻呼吸障害については顔貌・咬合に対する報告が主であり、成長期における鼻呼吸障害が顎顔面領域の機能に与える影響については解明されていない。今回の研究では咀嚼・呼吸運動を調節する舌突出筋であるオトガイ舌筋の活動に着目し、電気生理学的手法を用いて検討を行った。

実験 1 では、8 日齢ラットの片側の鼻閉塞を行い、5,7,9 週齢でオトガイ舌筋の収縮特性に与える影響に関して検討を行った。実験 2 では、5 週齢ラットに片側の鼻閉塞を行い、オトガイ舌筋の収縮特性と開口反射に与える影響に関して検討を行った。実験 3 では、8 日齢ラットに片側の

鼻閉塞を行い、5,7,9 週齢でオトガイ舌筋の収縮特性を電気生理学的に検討し、筋構成要素の変化については免疫組織化学的手法を用いて検討した。

その結果、介入時期に関わらず、鼻閉が舌突出筋・オトガイ舌筋の収縮特性に影響を与えることが示され、顎顔面領域の神経系および効果器において発育障害が生じ、呼吸・咀嚼調節機能が変調する可能性が示唆された。また、出生直後の鼻閉の免疫組織化学的変化については筋線維の直径および断面積が増加することが示され、筋力増加と開口反射の調節機構に変化を与える可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5258　号	内間　コエクリン　カリン　春美
論文審査担当者	主　査　泰羅　雅登 副　査　柴田　俊一　　秀島　雅之	
論 文 題 目	Effect of unilateral nasal obstruction on the craniofacial muscles in growing rats	

（論文審査の要旨）

近年、アレルギー性鼻炎等により鼻呼吸障害を有する子供が増加傾向にある。矯正歯科臨床においても、上顎前突や開咬を主訴とする学童期の患者の中に、鼻閉や口呼吸を有する者が多く見受けられる。呼吸は、咀嚼・嚥下と協調し、顎顔面領域の正常な発育を促す上で重要な意義を持っている。一方で、顎顔面領域の筋肉も咽頭気道の開閉に関与するなど呼吸に重要な役割を担っている。先行研究から、鼻呼吸障害が顎顔面領域の形態および機能に重大な影響を与えることが明らかにされているが、顎顔面筋の神経生理学的な変化・適応については未だ詳細な検討がなされていない。

そのため内間は、咀嚼・呼吸運動を調節する舌突出筋の収縮特性および舌突出筋の一つであるオトガイ舌筋の収縮特性に着目し、咀嚼時の顎運動調節の一端を担う開口反射と関連させ、成長期における鼻呼吸障害が顎顔面筋および反射調節機構に与える影響について電気生理学的手法を用いて検討を行った。

本研究は以下の 3 つの実験により構成されている。

1. Early growth stage における鼻閉塞と舌突出筋の収縮特性との関連を解明する実験（実験 1）
2. Late growth stage における鼻閉塞が舌突出筋の収縮特性および開口反射に与える影響を解明する実験（実験 2）
3. Early growth stage における鼻閉塞がオトガイ舌筋の収縮特性およびオトガイ舌筋筋組織に与える影響を解明する実験（実験 3）

実験 1 では、6 日齢 Wistar 系雄性ラットを用い、8 日齢で片側外鼻孔の完全閉鎖術を行う実験群と偽手術を行う対照群に無作為に分けた。記録は両群において 5, 7, 9 週齢時に行い、舌下神経の内側枝を電気刺激した際の舌突出筋の収縮特性を記録した。分析は、単収縮張力の最大力、収縮時間、半減期、および強縮力の 60Hz 最大力、80Hz 最大力、100Hz 疲労度を計測した。

研究結果としては、以下の知見を得ている。

1. 実験期間中、対照群と実験群の体重は経時的に増加し、各週齢において両群間の体重変化に有意差は認められなかった。
2. 単収縮張力の最大力と半減期、強縮力の 60Hz 最大力、80Hz 最大力は、各週齢において、

実験群が有意に大きな値を示した。100Hz 疲労度は 5 週齢においてのみ、実験群が有意に小さな値を示した。

実験 2 では、5 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、5 週齢で実験群と対照群に無作為に分けた。記録は両群において 7, 9,11 週齢時に行い、実験 1 と同様の方法で舌突出筋の収縮特性について記録した。また、並行して開口反射の記録を行うため、左側下歯槽神経電気刺激時の左側顎二腹筋筋電図活動(EMG)と、右側下歯槽神経電気刺激時の右側顎二腹筋 EMG を記録した。分析は、舌突出筋の収縮特性は実験 1 と同様に単収縮張力と強縮力の各項目を、開口反射については左右 EMG の潜時、持続時間および振幅を計測した。

研究結果としては、以下の知見を得ている。

1. 実験期間中、対照群と実験群の体重は経時的に増加し、実験 1 と同様に各週齢において両群間の体重変化に有意差は認められなかった。
2. 単収縮張力の最大力、強縮力の 80Hz 最大力は、5 週齢において、実験群が有意に大きな値を示した。また、単収縮張力の半減期、強縮力の 60Hz 最大力は、各週齢において、実験群が有意に大きな値を示した。
3. 潜時は、各週齢において、実験群が有意に大きな値を示した。振幅は、各週齢において、実験群が有意に小さな値を示した。

実験 3 では、6 日齢 Wistar 系雄性ラットを用い、実験 1 と同様に 8 日齢で実験群と対照群に無作為に分けた。記録は両群において 5, 7, 9 週齢時に行い、オトガイ舌筋の収縮特性を記録した。記録後、オトガイ舌筋を摘出し、切片作成ならびに免疫組織染色を行い、オトガイ舌筋の筋線維を観察した。筋線維の分析は、遅筋、速筋、速筋 IIa および速筋 IIb 各タイプの数、比率、直径および断面積を計測した。

研究結果としては、以下の知見を得ている。

1. 単収縮張力の最大力、強縮力の 60Hz 最大力と 80Hz 最大力は、各週齢において、実験群が有意に大きな値を示した。100Hz 疲労度は 5 週齢においてのみ、実験群が有意に小さな値を示した。
2. 速筋の直径・断面積、速筋 IIa の断面積および速筋 IIb の直径は、7,9 週齢において、実験群が有意に大きな値を示した。速筋 IIa の直径および速筋 IIb の断面積は、各週齢において、実験群が有意に大きな値を示した。

本研究は、以上 3 つの実験から、咀嚼・呼吸運動を調節する舌突出筋の収縮特性と組織学的特性、開口反射の応答特性に着目し、成長期ラットにおける鼻呼吸障害が、関連する神経系および頭蓋顎顔面筋に与える影響について初めて明らかにしたものであり、今後の歯学の基礎および臨床の各分野における発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	羅　思陽
論文審査担当者	主査　水口　俊介 副査　塙　隆夫，高橋　英和
論　文　題　目	Stress distribution in luting agents with different post and core systems

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

齲蝕などで歯冠が大きく崩壊し，根管治療が施された歯に対しては，通常支台築造を行ったのちクラウンにより修復する．歯冠修復治療においてセメントは重要な役割を担うことから近年では改良が進み，多くの種類のセメントが使用可能となっている．また，クラウン修復においてはクラウンに負荷された力がセメントを介して支台歯の支台築造部に伝播されるため，セメントの合着力やヤング率などの物理学的性質は，クラウン修復の予後に大いに関連すると思われる．

種々の歯科用セメントのうち接着性レジンセメントは，優れた接着性やマイクロリーケージが少ないことから臨床で使用される頻度が増加している．過去の報告によれば，クラウン合着用セメントは応力分布様相からそのヤング率は歯質に近い方が良いとされている．すなわち，セメントのヤング率が歯質に近似していれば過度の応力集中が少なくなり，その結果としてセメントの崩壊を防ぐ可能性がある．そこで本研究では，口腔内で実際に測定されたビーフジャーキー咀嚼時の咬合力を３次元有限要素モデルに代入し，クラウンにより修復を行った歯の機能時におけるセメント内応力分布状態を詳細に検討することを目的として解析を行った．

＜材料と方法＞

汎用構造解析ソフトを用いて，根管治療を施しクラウンを装着した非線形３次元単純小臼歯モデルを作成した．支台築造法は，金銀パラジウム合金による鋳造築造体（MP），グラスファイバー併用コンポジットレジン築造（GFP）の２種類，さらにクラウン合着用セメントとしてコンポジット系レジンセメント（CC）およびメタクリル酸メチル樹脂セメント（MMA）の２種類を想定し，計４モデルを作成した．材料定数は過去の報告を参考に線形のものを代入したが，歯根膜は粘弾性の性質を有するため，過去の報告をもとに非線形の性質を代入した．クラウンは金銀パラジウム合金を用いて製作した全部金属冠を想定した．本研究ではセメント層の厚みを 100μm とし，詳細に検討を加えるために２層に細分化し，有限要素モデル全体の 7.3%を占める 4240 要素とした．このモデルの歯槽骨下壁を完全拘束し，咬合面中央部に過去の報告を参考にビーフジャーキー咀嚼時の３次元咀嚼力（遠心：24 N，舌側 29 N，歯根方向：164 N）を代入し，歯頚部におけるミーゼス応力を算出した．なお，フェルールは 2mm を想定し，マージン形態はシャ

ンファーとした．以上のように各々のモデルにおいてクラウンマージン部のセメント内におけるミーゼス応力を算出し，比較検討を加えた．

＜結果＞

いずれのモデルにおいてもセメント内に応力集中が認められた部位はポスト先端部とクラウンの歯頚部辺縁付近であった．ポスト先端部に関しては，同じセメントを用いた場合，GFP の方が MP に比較して応力値が小さかったのに対し，歯頚部辺縁部のセメント内応力値は，GFP の方が MP と比較して大きかった．歯頚部辺縁部におけるセメント内応力分布様相に関しては，支台築造法にかかわらず，コンポジット系レジンセメントではクラウン側から象牙質側に向かって徐々に応力値が減少するのに対し，MMA 系レジンセメントではクラウン側で最大値，次いで象牙質側，セメント中央部で最小値となり，セメントの材質の違いにより応力分布様相も異なることが明らかとなった．また，全てのモデルにおいてセメント内応力値は，マージンの歯頚部辺縁から象牙質側に向かうにつれて徐々に低下する傾向を示した．

＜考察＞

歯頚部辺縁におけるクラウン合着用セメントの崩壊はクラウンが脱離する一つの要因である．合着用セメントの辺縁部における崩壊の原因の一つとしてセメント内の応力集中が考えられる．しかしながらクラウンにおけるセメント内応力分布状態について十分に詳細な検討を行った報告は未だないのが現状である．すなわち，これまで行われてきた研究では，セメント層を単層として扱っている報告が多く，このようなモデルにおいてはセメント内応力分布様相を詳細に検討することは難しいと考えられる．また，その他の手法として歯もしくは顎骨などの形態情報を CT からスキャンしモデルを構築する方法があり，この手法では歯根の形態を詳細に再現したモデルを構築することが可能であるが，CT の精度に限界があるためセメント層，根管，マージン部など細部まで完全にスキャンすることができず, 本研究のような被薄なセメント層を検討する場合，かえってモデルの精度を下げることもあるのが現状である．支台築造法が同じであれば，セメントの種類によってクラウン側から象牙質へ向かうセメント内応力値の変化は異なる．ヤング率の大きい CC を用いた場合，最も大きな値を示すのがクラウン側，次いでセメント中央部，そして最も小さい値を示したのが象牙質側であった．一方，象牙質およびクラウンに比較してヤング率の小さい MMA において，最も大きな応力値を示したのは CC と同様にクラウン側であったが，セメント中央部および象牙質側はこれより小さくほぼ同じ値であった．すなわち，歯根象牙質に近似したヤング率を有する CC では，セメント内で応力値がクラウン側から象牙質に向かって徐々に減少しており，ある程度セメント内応力の変化は均一なのに対して，歯根象牙質よりかなり小さいヤング率を有する MMA においては，その応力値がクラウン側から歯根象牙質に向かって急激に小さくなっており，両者においてセメント内応力分布状態が異なることが明らかとなった．

＜結論＞

1.歯頚部におけるセメント内応力値は MP のほうが GFP より小さかったのに対し, ポスト先端に

おけるセメント内応力値は MP の方が GFP より大きかった.

2.本実験で用いた 2 種のセメントでは，いずれもセメント内における応力集中が象牙質側よりもクラウン側で大きかった.

3.歯頸部辺縁において, CC では応力値がクラウン側から象牙質側へと徐々に減少したのに対して MMA ではクラウン側と象牙質側で大きくセメント中央部で小さい値となり，両者で異なる応力分布を示した.

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5259　号	羅　思陽
論文審査担当者	主　査　水口　俊介 副　査　塙　隆夫，高橋　英和	
論 文 題 目	Stress distribution in luting agents with different post and core systems	

（論文審査の要旨）

クラウンの脱離の原因の一つにクラウン辺縁部における二次カリエスが考えられる．二次カリエスの原因としては合着用セメントの歯質あるいは補綴物の接着力の経年的な低下，崩壊などが考えられる．これらはクラウン辺縁部とりわけセメント内部の応力集中が関連していることが考えられる．セメント内部の応力分布状態は，支台築造法やセメント自体のヤング率などの物理学的性質に深く関係していることが想定され，セメント内部の応力分布状態を把握することは，長期にわたって機能する歯冠修復を設計するにあたって極めて重要な情報となる．クラウンマージン部における応力分布様相の検討は，抜去歯を用いた荷重試験，光弾性法を応用した研究，有限要素解析などが行われてきたが，これらの多くはクラウン部あるいは歯根象牙質を検討したものであり，セメント内部の応力を検討した報告は少ない．現状ではセメント内部の応力分布状態を検討する研究方法としては，汎用構造解析ソフトを用いた有限要素解析法を用いる手法が最も詳細に検討できる方法と考えられる．有限要素法を用いた多くの研究では，形態データをスキャンし構造解析プログラムへデータを代入することにより研究が遂行されているが，この方法ではクラウン，歯根，支台築造部などと比較して極めて被薄な合着用セメント内部の応力分布状態を詳細かつ正確に解析するために選択的に多くの要素数を分配することは難しく，十分な研究が行われていないのが実情である．

このような背景を元に羅はセメント層に多くの要素数を付与させるために歯槽骨を含めた下顎小臼歯モデルを作製し検討を行っている．被薄なセメント層を 2 層構造とし，総要素数の約 7.3%にあたる 4320 個の要素を付与することで，より詳細かつ正確に解析と検討を行っている．また，有限要素モデルをより生体に近似させるために歯根膜には粘弾性的性質を考慮した非線形の物理学的性質を付与し，さらに荷重は過去の研究において実際に生体で測定されたビーフジャーキー咀嚼時の三次元咬合力を付与するなど随所に工夫がみられる．支台築造方法に関しても従来から臨床で多く用いられている歯科用金属によるメタルコアに加え，近年急速に普及しているグラスファイバー併用コンポジットレジンコアも検討し，合着用セメントも，歯質に弾性係数が近いコンポジット系レジンセメントおよび弾性係数の小さいMMA系レジンセメントで検討を行っている．

これまで，このように合着用セメント内部の応力分布状態を詳細に検討した報告は少なく，その着眼点は高く評価できる．また，得られた結果に対する検討も適切に行われ，十分な情報

と知識を背景に，周到な準備のもと本研究が計画，遂行されたことがうかがわれる．

本研究により得られた主な結果は以下の通りである．

1.歯頸部におけるセメント内応力値はメタルコアのほうがグラスファイバー併用コンポジットレジンコアより小さかったのに対し，ポスト先端におけるセメント内応力値はメタルコアの方がグラスファイバー併用コンポジットレジンコアより大きかった．

2.本実験で用いた 2 種のセメントでは，いずれもセメント内における応力集中が象牙質側よりもクラウン側で大きかった．

3.歯頸部辺縁において，コンポジット系レジンセメントでは応力値がクラウン側から象牙質側へと徐々に減少したのに対して MMA 系レジンセメントではクラウン側と象牙質側で大きくセメント中央部で小さい値となり，両者で異なる応力分布を示した．

こうした結論に至るまで，合着用セメントの材料学的な特性や築造方法の特徴を十分に理解したうえで理論的な展開がなされており，申請者の本領域における十分な知識と情報を裏付けるものである． 本研究は有限要素解析を用いて支台築造歯のセメント内応力分布について評価と検討を行ったものであり，研究の成果は，今後の歯科補綴学，歯科材料学の発展に大いに寄与するものと考えられる．したがって，本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	周　媛
論文審査担当者	主査　高橋　英和 副査　倉林　亨　　宮新　美智世
論　文　題　目	Non-invasive optical assessment of biofilm-induced demineralization on human teeth with and without resin-based material application

（論文内容の要旨）

Study I – Assessment of bacterial demineralization around composite restorations using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT).

Objective: To observe the bacterial demineralization of the enamel and dentin around composite restorations bonded with one-step and two-step self-etch adhesive systems using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT).

Materials and Methods: Forty class V cavities (2.5-mm surface diameter, 2.0-mm maximum depth) were prepared on cervical areas of twenty human molars. The specimens were either treated with one-step adhesive (Clearfil Tri-S Bond ND Quick; TS) or two-step adhesive (Clearfil SE Bond; SE), restored with a flowable resin composite (Estelite Flow Quick). Specimens in the demineralized group were incubated for 2 weeks after *Streptococcus mutans* biofilm formation, while specimens in the control group were incubated for 2 weeks without biofilms. After SS-OCT observation, specimens were cut and examined under confocal laser scanning microscope (CLSM). The lesion depth (LD), interfacial gap depth (GD) and gap length (GL) obtained from SS-OCT and CLSM were analyzed by Pearson's correlation, LD by Independent-samples t-test, GD and GL by Welch t-test, the frequency of specimens with or without gap by Fisher's exact test at the 95% significant level.

Results: Specimens with interfacial gaps in the demineralized group showed significantly higher frequency than that in the control group ($p < 0.05$). There was a significant correlation between SS-OCT and CLSM values of LD, GD and GL ($p < 0.05$). SE showed significantly larger LD of dentin, but less GD and GL of enamel than TS ($p < 0.05$).

Conclusion: SS-OCT nondestructively detected demineralization around composite restorations and interfacial gaps created by *S. mutans* biofilm in this *in vitro* model.

Study II – Evaluation of resin infiltration on demineralized root surface: An *in vitro* study

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of resin infiltration on root caries induced by *S. mutans* biofilms.

Materials and Methods: *In vitro* root caries on 60 tooth blocks from 30 human premolars was fabricated

using *S. mutans* for 24-hour biofilms formation and 3-day incubation. The specimens were divided to 5 groups: negative control (NC), Clearfil SE Bond (SEB), Icon-etch120s+Icon-infiltrant (HA120), Icon-etch10s+Icon-infiltrant (HA10), K-etchant10s+Icon-infiltrant (PA10). The resin penetration was observed by fluorescent microscope after propidium iodide staining. Biofilm-induced demineralization was conducted again, followed by swept source optical coherence tomography (SS-OCT) and confocal laser scanning microscope (CLSM) observation. The maximum resin penetration depth (PDmax), lesion depth increase (ΔLD), frequency of cervical enamel loss, dentinoeamel junction (DEJ) separation length were measured and statistically analyzed.

Results: The maximum resin penetration depth (PDmax), lesion depth increase (ΔLD), frequency of cervical enamel loss, dentinoenamel junction separation length were measured and statistically analyzed. HA120 showed 138.00±49.25 μm PDmax that was significantly larger than PA10 and SEB ($p<0.05$). SEB created 136.58±64.73 μm coating layers. HA120 and SEB showed significantly lower ΔLD than NC ($p<0.05$).

Conclusions: Resin infiltration with 120s-HCl pretreatment has got a good penetration ability and preventive effect on root caries, however, an additional risk factor of cervical enamel loss was identified after the pretreatment with HCl.

Study III – Assessment of root caries under wet and dry conditions using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT)

Objective: The aim of this study was to observe and compare different images of *in vitro* and natural root caries under controlled wet and dry conditions using SS-OCT.

Methods and Materials: Four sound human premolars and six premolars with natural root cervical caries were selected. In vitro root caries on 8 tooth cervical blocks from the 4 premolars was fabricated using *S. mutans* biofilms twice for 24 hours followed by a 3-day incubation. The specimens were observed by SS-OCT under controlled wet and dry conditions, respectively, followed by confocal laser scanning microscope (CLSM) and scanning electronic microscope (SEM). Signal intensities (SI) obtained from OCT images after the 1st and 2nd in vitro demineralization (Dem1, Dem2) were investigated in comparison to natural root caries. From OCT, demineralization thicknesses (DT) were measured after Dem1 under wet and dry conditions (DT1wet, DT1dry) and after Dem2 under wet and dry conditions (DT2wet, DT2dry). From CLSM, demineralization thickness with baseline (DTbaseline) and that without baseline (DTnon-baseline) were measured. DTs of OCT were compared by paired samples t-test. The correlations between DT2wet and DTbaseline, DT2dry and DTnon-baseline were analyzed by Pearson's correlation test; DT2wet and ML, DT2dry and ML were analyzed by Spearman's correlation test. All the statistical procedures were performed at a significance level of 0.05.

Results: In vitro root caries showed different OCT images with different SI. Dry lesion body was thinner and darker than wet lesion body. Dry lesion boundary showed a white line. DTwet was significantly higher than DTdry. DT2 was significantly higher than DT1. DT of OCT and DT of CLSM showed a significant correlation. Three natural root caries showed similar OCT images and SI with in vitro root caries under dry

conditions.

Conclusion: For root caries, the base of demineralized dentin can be detected more clearly under dry conditions than under wet conditions by SS-OCT. Also, optical properties of SS-OCT provide information of root caries, including lesion depth, shrinkage of demineralized dentin and the presence of water in dentin.

（和訳）

実験１　SS-OCT によるコンポジットレジン修復周囲の細菌性脱灰の評価

＜目的＞SS-OCT を用い、１ステップまたは２ステップ接着材のコンポジットレジン修復周囲におけるエナメル質ならびに象牙質の細菌性脱灰を観察する。

＜方法＞20 本のヒト抜去臼歯に直径 2.0mm 深さ 2.5mm のＶ級窩洞を形成し、１ステップ接着材（Clearfil Tri-S Bond ND Quick; TS）または２ステップ接着材（Clearfil SE Bond; SE）による処理を行い、フロアブルレジン（Estelite Flow Quick）を充填した。脱灰を行う実験群では *S. mutans* のバイオフイルムを試料表面に作用させ２週間インキュベートし、コントロール群ではバイオフイルムを形成せずにインキュベートを行った。得られた試料について SS-OCT 観察を行い、その後半切し走査型レーザー顕微鏡（CLSM）観察を行った。得られた SS-OCT ならびに CLSM 画像から脱灰病巣の深さ（LD）、接着界面のギャップの深さ（GD）、ギャップの長さ（GL）を計測し、信頼度 95%にて統計処理を行った。

＜結果＞接着界面におけるギャップの発生頻度は、バイオフイルムの脱灰処理により有意に増加した（$p < 0.05$）。SS-OCT と CLSM において、LD、GD、GL は有意な相関がみられた（$p < 0.05$）。SE を用いた象牙質において、LD は TS よりも深くなり、またエナメル質における GD と GL は TS よりも短くなった（$p < 0.05$）。

＜結論＞SS-OCT を用いることにより、*S. mutans* バイオフイルムによって形成したコンポジットレジン修復周囲の脱灰とギャップを観察することができた。

実験２　歯根面の脱灰におけるレジン浸透材の in vitro 評価

＜目的＞SS-OCT を用い、*S. mutans* バイオフイルムによって形成した歯頚部の歯根面う蝕におけるレジン浸透材の効果を検討する。

＜方法＞30 本のヒト小臼歯の歯根面から 60 個の試片を切り出し、*S. mutans* のバイオフイルムによる脱灰を 3 日間行った。試片をコントロール群（NC）、 Clearfil SE Bond 群（SEB）、Icon-etch120s+Icon-infiltrant 群（HA120）、 Icon-etch10s+Icon-infiltrant 群（HA10）、K-etchant10s+Icon-infiltrant 群（PA10）の 5 群に分割し、それぞれ実験材料を作用させ、レジンの浸透状態を蛍光顕微鏡により観察した。その後さらに 3 日間バイオフイルムによる脱灰を行い、SS-OCT ならびに CLSM による観察を行った。

＜結果＞レジンの最大浸透深さ (PDmax)、脱灰病巣の増加 (ΔLD)、歯頚部エナメル質の崩壊頻度、エナメル象牙境の剥離の長さを計測し、統計処理を行った。HA120 の PDmax は 138.00±49.25 μm であり、PA10 ならびに SEB よりも有意に深かった ($p<0.05$)。SEB は 136.58±64.73 μm のコーティング層を形成していた。 HA120 と SEB のΔLD は NC よりも有意に少なかった ($p<0.05$)。

＜結論＞HCl の前処理 120 秒間行った Icon 浸透群では象牙質への深い浸透がみられ、歯根面う蝕の抑制効果がみられた。しかしながら HCl 処理によって歯頚部エナメル質の消失がみられた。

実験３　走査型光干渉断層計による歯根面う蝕の湿潤ならびに乾燥条件の観察

＜目的＞本研究は in vitro ならびに天然の歯根面う蝕を湿潤ならびに乾燥条件で SS-OCT 観察し、画像の比較を行う。

＜方法＞4 本の健全小臼歯と 6 本のう蝕を有する小臼歯を実験に使用した。健全小臼歯から 8 個の象牙質試片を作製し、*S. mutans* による象牙質の脱灰を 24 時間のバイオフイルムの形成と３日間のインキュベートを２回行うことにより形成した。湿潤ならびに乾燥条件における試片について SS-OCT 観察し、その後 CLSM 観察、SEM 観察を行った。OCT におけるシグナルの変化を１回目と２回目の脱灰後に観察し、天然のう蝕と比較した。OCT 画像から１回目と２回目の脱灰における脱灰病巣の深さを観察し、CLSM 画像から脱灰層の厚みの変化を、脱灰を行わなかった基準面の位置から比較した。

＜結果＞in vitro の脱灰では OCT シグナルが変化し、乾燥条件では脱灰層は薄くなり、湿潤条件よりも画面上で輝度の低下がみられ暗くなった。乾燥条件では脱灰病巣の境界が白く表示された。脱灰層の厚みは２回目の脱灰で増加し、OCT 画像と CLSM 画像の脱灰層の厚みには相関がみられた。3 本の天然う蝕において in vitro う蝕と同様、乾燥条件で象牙質う蝕の OCT 画像が暗くなった。

＜結論＞SS-OCT により歯根面う蝕を乾燥状態で観察すると、湿潤条件よりもう蝕を明瞭に観察することができた。SS-OCT の光学的特性から、歯根面う蝕の病巣の深さや脱灰病巣の収縮、また象牙質における水の存在を評価することができた。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5260　号	周　媛
論文審査担当者	主　査　高橋　英和 副　査　倉林　亨　　宮新　美智世	
論 文 題 目	Non-invasive optical assessment of biofilm-induced demineralization on human teeth with and without resin-based material application	

（論文審査の要旨）

う蝕は世界的に蔓延する疾患の１つであり、特に今日では高齢者の歯頚部う蝕が増加傾向にあり、大きな問題となっている。修復物の周囲のう蝕は再治療となる主な原因であり、歯頚部においても同様である。光干渉断層計（OCT）は光の干渉作用を利用して非侵襲的に組織の断層画像を得る技術であり、歯科領域においてう蝕の診断や修復物の非破壊検査への応用が期待されている。本研究は歯頚部に行ったコンポジットレジン修復周囲の脱灰を評価した論文１と、レジン系浸透材による象牙質う蝕の抑制効果を評価した論文２、ならびに象牙質う蝕のOCT による診断法の開発を目的として行った論文３から成立している。いずれもヒト抜去歯を用いて *Streptococcus mutans* とスクロース溶液を連続的に滴下し、う蝕病原性バイオフイルムの形成と歯質の脱灰に成功しているが、カリオロジーに関する専門的な知識と高い技術が要求される実験系であり、本研究が周到に遂行されたことが推測される。

論文１では歯頚部の窩洞に１ステップ接着材の Tri-S Bond ND と２ステップ接着材の SE Bond を用いてコンポジットレジン充填を行い、バイオフイルム脱灰に用い評価している。使用した接着材は組成が類似しており、比較に適した選択といえる。脱灰期間は２週間であり、本実験にて評価する上で適切な条件を設定している。OCT 画像からエナメル質ならびに象牙質における脱灰と接着界面のギャップを計測し、歯頚部修復のう蝕に関する新しい情報を得ることに成功し、以下のような結果を得ている。

１．接着界面のギャップは、バイオフイルムの脱灰により有意に増加した。

２．象牙質に SE Bond を用いると、脱灰深さは Tri-S Bond ND よりも深くなったが、エナメル質におけるギャップの深さと長さは Tri-S Bond ND よりも小さくなっていた。

考察では、脱灰による OCT 画像の輝度上昇の理論、*S. mutans* による脱灰と接着界面の破壊、OCT 画像における屈折率の影響､1 ステップ接着材と２ステップ接着材の相違と脱灰への影響、エナメル質と象牙質の脱灰による OCT 画像の変化などから構成され、理論的で説得力のある内容となっている。

論文２ではヒト抜去歯の歯頚部に人工的脱灰病変を作製し、そこにレジン浸透材である Icon と、比較対象として２ステップ接着材の SE Bond を浸透させ、その後の脱灰による変化を OCT により観察している。レジン浸透材は本来エナメル質脱灰の抑制を目的としているが、象牙質脱灰の抑制効果を評価した新しい実験として評価できる。バイオフイルム脱灰の期間はコーテ

ィング前後にそれぞれ３日間であり、論文１と同様、本実験の目的に適った条件設定といえる。得られた主な結果は次のとおりである。

１．レジンの脱灰象牙質への浸透深さは使用した材料によって異なり、Icon のメーカー指示の処理面が最も深かった。

２．Icon と SE Bond の処理面では、脱灰の抑制効果が確認できた。

考察では特に、塩酸処理による有効性と同時に、歯頚部エナメル質に対する為害性を指摘している。

論文３では論文１と同様、バイオフイルム脱灰を行った象牙質と天然う蝕の OCT 画像を観察し、乾燥後のシグナル変化からう蝕象牙質の新しい識別法を提案している。得られた主な結果は次のとおりである。

１．バイオフイルムによる脱灰では、乾燥によって脱灰象牙質の OCT 画像は暗く変化した。

２．脱灰象牙質と下層象牙質の境界に白線状シグナルの上昇部が表示され、う蝕の識別に利用できた。

本論文の考察は、OCT 画像の水分の影響、う蝕象牙質の空隙とコラーゲンの変化、乾燥条件と画像への影響などから構築され、臨床的に興味深い内容となっている。

以上のように申請者周媛は、歯頚部う蝕に関する一連の研究において、OCT による新たな診断法の可能性を提示し、その予防法と治療法に関する新たな知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学、歯科診断学の発展に寄与すること大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものとして判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	勝村　早恵
論文審査担当者	主査　中島　友紀 副査　和泉　雄一　　中濱　健一
論　文　題　目	Beta Adrenergic Receptor Stimulation Suppresses Cell Migration in Association with Cell Cycle Transition in Osteoblasts - Live Imaging Analyses Based on FUCCI System.

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

超高齢社会となった我が国において、老化などによって介護が必要となる患者や寝たきりの患者では、廃用性骨粗鬆症を発症することから、生命予後の観点から大きな問題となっている。 廃用性骨粗鬆症は、骨リモデリングの破綻に伴う急速な骨量減少によって引き起こされることが示唆されており、その作用機序として、骨芽細胞における交感神経系シグナルの関与が報告されている。しかしながら、この細胞内シグナルがどの様に骨芽細胞を制御しているか、いまだ十分な解明には至っていない。本研究では、交感神経系シグナルが、骨芽細胞の遊走や増殖にどの様に作用しているか明らかにするため、Fluorescent Ubiqutination-based Cell Cycle Indicator (FUCCI)トランスジェニックマウスの骨芽細胞を用いたライブイメージング法を構築した。FUCCI トランスジェニックマウスから単離した初代骨芽細胞に、β アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノールを作用させた結果、骨芽細胞の遊走距離や速度、細胞増殖は、いずれも有意に抑制されることが見出された。破骨細胞が形成した骨吸収部位へ、骨芽細胞前駆細胞が増殖・遊走することで、骨リモデリングの恒常性は補完されており、本研究から、交感神経系による骨形成の制御機構の一端が明らかにされた。

＜緒言＞

閉経や加齢を主因とした骨質・骨量低下から脆弱性骨折をきたす骨粗鬆症は、脊椎や大腿骨の骨折を生じ、日常生活動作を低下させるだけでなく、寝たきりリスクを増大させ、生命予後を不良にすることから、大きな社会問題となっている。現在、高齢化社会の進展に伴い、骨粗鬆症の治療の重要性が近年益々高まっている。骨組織は、骨リモデリングの制御によって恒常性が保たれており、その破綻が骨粗鬆症の発症に繋がる。骨リモデリングは、骨吸収と骨形成の連携により成り立ち、破骨細胞が骨を吸収すると、カップリングファクターなどの誘導によって、近傍の前骨芽細胞の増殖や骨吸収窩への動員が促進すると考えられている。動員された前骨芽細胞は骨芽細胞へと分化して、骨基質蛋白質を分泌することで骨吸収窩を新生骨で満たしている。

廃用性骨粗鬆症のモデル実験系として知られる尾部懸垂モデルでは、非荷重への環境変化により骨量は急速に減少する。これまでの研究で、その発症メカニズムに非荷重に伴う交感神経の亢

進が関わることが示されてきた。尾部懸垂マウスにβブロッカーを投与すると骨吸収亢進と骨形成抑制はいずれも軽減して骨量減少は抑制される。一方、β アゴニストを投与すると尾部懸垂と同様の骨量減少が起こるが、後肢を非荷重状態とした尾部懸垂マウスへの投与では、骨量の減少はおこらず、非荷重による骨量減少がβ受容体経路を介することが示唆されている。しかしながら、生体内で交感神経系シグナルがどの様にして骨形成を制御しているのか不明な点が多いのが現状である。

＜方法＞

生後 2-3 日目の FUCCI トランスジェニックマウスの頭蓋骨から単離した初代骨芽細胞を 10%のウシ胎児血清（FBS）存在下で 12 時間培養後、FBS 濃度を 0.5%に変更し 36 時間培養することで細胞周期を同調させた。βアドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノール（10 nM）を、骨芽細胞に加えた後、細胞挙動を共焦点レーザー走査型顕微鏡（オリンパス FV10i-w）で 36 時間の連続的な観察を実施した。コントロールの細胞には、緩衝液のみを加えた。画像撮影は 30 分毎に 1 枚の間隔で撮影し、36 時間の連続撮影により得られた合計 73 枚の画像から、動画を再構成して細胞遊走と細胞周期の変化を観察した。本解析では、遊走速度、遊走距離、遊走パターン、細胞周期の位相変化の 4 項目で評価した。無作為に選んだ 20 細胞/視野の個々の細胞について遊走速度・距離と遊走パターンを、解析ソフトウェアである ImageJ を用いて、マニュアルトラッキングにより測定し、細胞周期の位相評価は、すべての全静止画像上で全細胞数に対する S/G2/M 期に移行した細胞数の割合で評価した。

＜結果＞

FUCCI トランスジェニックマウスの頭蓋骨から単離した初代培養細胞を、βグリセロリン酸およびアスコルビン酸存在下で 21 日間の分化誘導を行い、骨基質の産生と石灰化を解析し骨芽細胞であると確認した。この細胞を用いてイソプロテレノール存在下および非存在下でライブイメージング解析を行った結果、イソプロテレノール群では、S/G2/M 期に移行する細胞比率が抑制される傾向が観察され、コントロール群との比較解析により、統計学的に有意な抑制が示された。イソプロテレノールは細胞周期移行のパターンを変えるだけでなく、S/G2/M 期に移行する細胞数も抑制していた。観察開始 4-7 時間培養後および 24-28 時間培養後に S/G2/M 期に移行する細胞数のピーク（第 1 ピーク、第 2 ピーク）が認められたが、どちらのピークにおいてもそのピーク値がイソプロテレノール存在下で有意に抑制されることが、コントロール群との比較により統計学的に明らかになった。以上のことから、β アドレナリン受容体のシグナルが、骨芽細胞の増殖を抑制することが示唆された。

次に、骨芽細胞の移動速度についても、イソプロテレノールは抑制的に作用することが見出された。イソプロテレノール存在下の細胞では G0/G1 期において細胞移動速度が有意に抑制された。興味深いことに、この移動速度の低下は、G1/S 期、S/G2/M 期においては有意と見なされなかったが、細胞移動距離は細胞周期の位相に関わらずイソプロテレノール存在下で有意に抑制された。また、追跡描画した遊走パターンについては、2 群間に明らかな相違は見られなかった。ポジティブコントロールとなる実験として、PTH を加えた実験群では、コントロール群と比較して骨芽

細胞の移動距離や移動速度、細胞増殖の全てにおいてイソプロテレノールとは、相反する促進効果が得られた。

＜考察＞

本研究では、FUCCI システムによるライブイメージング法を活用し、骨芽細胞の細胞遊走や細胞周期の移行を同時に解析する方法を構築した。骨芽細胞における β アドレナリン受容体シグナルは、遊走パターンに影響することなく細胞遊走および細胞増殖を抑制することが見出された。この結果は、交感神経系が骨芽細胞の遊走および細胞増殖の両側面から、骨形成を制御していることを示唆した。

本実験系で細胞周期を同調させた後に、比較的早期に S/G2/M 期に移行する細胞の立ち上がりが見られ、4-7 時間後の小さなピーク(第 1 ピーク)として現れた。第 1 ピークの意義は明らかではないが、その後の立ち上がりによる 24-28 時間後のピーク(第 2 ピーク)と比べると少数細胞の一過性の応答であり、後者が主な応答と考えられる。そして、どちらのピークもイソプロテレノール存在下で抑制されることが示された。交感神経刺激が S/G2/M 期の各位相の長さを抑制して総細胞周期の長さを抑制すると考えられるが、その分子メカニズムの詳細は不明であり、今後の研究を進めなければならない点の一つである。

また、骨形成促進作用を有する骨粗鬆症治療薬として知られる PTH 製剤(テリパラチド)は、骨芽細胞における PTH 受容体を介した骨形成促進という薬理作用を発揮する。7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体である PTH 受容体は、交感神経シグナルを伝える β アドレナリン受容体と同様に cAMP 径路を主径路とする。それにもかかわらず、個体レベルの PTH は骨形成を促進し、交感神経シグナルは骨形成を抑制する。骨形成促進作用をもつ PTH 製剤のさらなる作用点を含め、本研究の結果は、新たな治療法開発への糸口となる可能性が示唆される。

＜結論＞

本研究は、FUCCI システムを基盤とした骨芽細胞のライブイメージング法を確立した。細胞遊走と細胞周期の移行を同時に解析できるこのシステムによって、交感神経系による骨形成の制御機構として、骨芽細胞の遊走および増殖能の重要性が明らかになった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5261　号	勝村　早恵
論文審査担当者	主　査　中島　友紀 副　査　和泉　雄一　　中濱　健一	
論 文 題 目	Beta Adrenergic Receptor Stimulation Suppresses Cell Migration in Association with Cell Cycle Transition in Osteoblasts -Live Imaging Analyses Based on FUCCI System.	

（論文審査の要旨）

廃用性骨粗鬆症は、骨リモデリングの破綻に伴う急速な骨量減少によって引き起こされることが示唆されており、その発症機序として、骨芽細胞における交感神経系シグナルの関与が報告されている。しかしながら、この細胞内シグナルがどの様に骨芽細胞を制御しているか、いまだ十分な解明に至っていない。

勝村早恵は、交感神経系シグナルが、骨芽細胞の遊走や増殖にどの様に作用しているか明らかにするため、Fluorescent Ubiqutination-based Cell Cycle Indicator (FUCCI)トランスジェニックマウスの骨芽細胞を用いたライブイメージング法を本研究で構築した。そして、β アドレナリン受容体アゴニストが、骨芽細胞の遊走距離や速度、細胞増殖のいずれも有意に抑制することを見出し、交感神経系による骨形成の制御機構の一端を見出した。

本研究から、勝村早恵は以下の結果を得た。

・FUCCI トランスジェニックマウスの頭蓋骨から単離した初代培養細胞を、骨芽細胞分化培地にて培養し、骨基質の産生と石灰化を解析し骨芽細胞であると確認した。

・FUCCI トランスジェニック骨芽細胞の細胞周期を同調させた後、共焦点レーザー走査型顕微鏡による 36 時間におよぶ連続観察を可能とした。

・画像撮影は 30 分毎に 1 枚の間隔で撮影から得られた画像から動画を構成して、細胞遊走の変化と細胞増殖を評価することを可能とした。

・イソプロテレノールは、骨芽細胞の S/G2/M 期に移行する細胞比率が抑制される傾向が観察され、コントロール群との比較解析により、統計学的に有意な抑制が見出された。

・イソプロテレノールは、細胞周期移行のパターンを変化させるだけでなく、S/G2/M 期に移行する細胞数も抑制することが、統計学的に見出された。

・骨芽細胞の移動速度についても、イソプロテレノールは抑制的に作用することが見出され、その細胞では G0/G1 期において細胞移動速度が有意に抑制された。さらに、この移動速度の低下は、G1/S 期、S/G2/M 期においては、有意性が見出されなかった。

・PTH を加えた実験群では、コントロール群と比較して、骨芽細胞の移動距離や移動速度、細胞増殖の全てにおいてイソプロテレノールとは逆転した結果が得られた。

これらの結果から勝村早恵は、以下のことを考察した。

・本研究で構築した FUCCI システムによる骨芽細胞のライブイメージング法は、細胞遊走や細胞周期の移行を同時に解析する方法として、これまでの解析法にない優位性を有している。

・骨芽細胞におけるβアドレナリン受容体シグナルは、細胞遊走および細胞増殖を抑制することから、交感神経系が骨芽細胞の遊走および細胞増殖の両側面から、骨形成を制御していると考えられる。

以上のように、本研究において、勝村早恵は、FUCCI システムを基盤としたライブイメージング法を活用し、骨芽細胞の細胞遊走と細胞周期の移行を同時に解析することで、交感神経系による骨形成の制御機構として、骨芽細胞の遊走および増殖能の重要性を明らかにした。

この知見は、交感神経刺激が骨形成を制御するメカニズムを解明するための一助となり、今後の医科および歯科分野での骨疾患制圧を目指した最先端医療の発展に貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	上窪　彩乃
論文審査担当者	主査　木下　淳博 副査　宇尾　基弘　　大槻　昌幸
論　文　題　目	Effect of antimicrobial photodynamic therapy using rose bengal and blue light-emitting diode on *Porphyromonas gingivalis in vitro*: Influence of oxygen during treatment

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ローズベンガル（RB）と青色 LED（BL）の組み合わせは，抗菌光線力学療法（a-PDT）における新しい技術様式として注目されている．本研究では *Porphyromonas gingivalis* に対する，RB と BL を併用した処置における酸素の影響が *in vitro* で明らかになった．

＜緒言＞

歯周病は歯の周囲の支持組織である歯周組織の炎症により生じる．初期の炎症は歯周病原細菌の慢性的な感染に対する反応として起こる．歯周病の管理はこれら細菌の除去を基本とし，主に手用器具を使用した機械的除去に，症例に応じて抗菌薬を併用する形で行われている．しかし，従来の機械的治療法では病原因子を完全に取り除くことは困難であることが知られている．また，抗菌薬を用いた化学療法では,しばしば薬物耐性菌の増殖が生じる可能性がある．高齢社会を迎えるにあたり，新たな非侵襲性・非外科的な治療法の開発が求められている．

これまでも，レーザーを含む光エネルギーは感染性の病原細菌を破壊する目的で臨床応用されてきたが，さらに光化学反応を応用した抗菌光線力学療法（a-PDT）の歯科治療への応用が試みられている．a-PDT は，低出力光エネルギーにより光感受性物質を活性化することで活性酸素種を放出させ，非侵襲的に殺菌治療を行うものであり，歯周治療においては半導体レーザーや LED による赤色光とメチレンブルーやトルイジンブルーといった青色色素の組み合わせでその応用がなされてきた．その一方で,光の波長の特性を考慮すると青色光は好気下で抗菌効果を示すため，a-PDT に用いる際にはさらに効果的となる可能性があることから，近年では新たに赤色色素と青色光の組み合わせによる a-PDT が注目されている．申請者らのグループはこれまでに，赤色色素である RB と BL を用いた a-PDT が代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* のコロニー形成を強力に抑制することを *in vitro* において明らかにし，本法が歯周治療において細菌を除去するための新しい技術となり得ることを報告した．

a-PDT は３つの要素から成り立っている．安全性に問題のない光源，毒性を示さない光感受性薬剤，そして酸素である．また a-PDT は耐性菌を生じさせないことが知られている．光感受性薬剤が酸素の三重項状態を一重項に励起し，細菌にとって毒性の強い一重項酸素あるいは超酸化物

陰イオンを発生させる．それゆえ，a-PDT における酸素の必要性と重要性は一般的に認識されている．しかしながら，a-PDT における酸素の効果，とくに RB と BL の併用処置の際の抗菌効果における酸素の影響については正確に明らかにされておらず，それぞれの構成要素（RB や BL）単独の効果についても，特に *P. gingivalis* のような嫌気性菌に対してはその詳細が明らかにされていない.

本研究では酸素が a-PDT の抗菌効果に与える影響の詳細を明らかにするために, *P. gingivalis* 菌液に RB, BL をそれぞれ単独で,または RB と BL の併用で好気および嫌気状態において作用させ, その効果を検証した.

＜材料と方法＞

様々な濃度の RB を *P. gingivalis* 菌体懸濁液に添加し,最も細菌増殖に影響しない RB 濃度を調査した．嫌気環境下または好気環境下にて，１） RB （0.001%：最終濃度 0.0001%）添加のみ，２） BL 照射（450 nm - 470 nm; 1 W/cm^2, 5 秒）のみ，および，３）RB （0.001%）添加後に BL （1 W/cm^2, 5 秒） 照射（RB＋BL）の 3 つの実験群を用意した．各群の処置終了後，嫌気培養を施し，経時的に菌体懸濁液の濁度（OD600 nm）を測定した．また別に，処置後の菌液を血液寒天培地に塗布し，嫌気培養を行い，9 日後に出現したコロニー数を測定した.

mid-log phase にある細菌培養液に対して，好気環境下にて RB＋BL 処置を行い，短時間での菌体濁度の変化を観察した．さらに細菌から RNA を抽出し，Agilent 2100 Bioanalyzer （Agilent Technologies, Palo Alto, CA）を使用して RNA integrity number を指標とし，RNA の分解に対して解析を行った.

＜結果＞

菌体培養液に対して，様々な濃度の RB を添加したが，0.001％RB を添加した群（最終混和濃度 0.0001％）において培養後 12 時間まで *P. gingivalis* 細菌に対して明らかな増殖抑制効果が認められず，影響が少ないことを確認し，以後同一濃度の RB を実験に供した. RB，BL および RB+BL 処置後 18 時間では，嫌気環境下において，コントロール群と比較して RB 添加のみまたは BL 照射で，それぞれ共に同程度の細菌の増殖遅延が認められた．同一時点の好気環境下でも細菌増殖に対する同様の影響が認められた．RB＋BL 処置においては，嫌気的環境下でさらにその低下が有意に顕著であった一方で，好気環境下では細菌増殖が全く認められなかった．好気的 RB＋BL 処置（a-PDT）群を除き，すべての群で細菌増殖はその後も継続し，36 時間後には静止期に達し，48 時間後には対照群とほぼ同程度の細菌増殖が確認された．好気的 RB＋BL 処置 （a-PDT）群では依然として細菌増殖が認められないままであった. 処置後 18 時間嫌気培養した試料を血液寒天培地に塗抹し， 9 日間の嫌気培養後であっても，コントロール群と嫌気的 RB＋BL 処置群と比較して好気的 RB＋BL（a-PDT）群のみ，ほとんどコロニー形成を確認することができなかった.

好気環境下での RB＋BL 処置（a-PDT）による増殖抑制効果が，殺菌作用によるものか，あるいは強力な増殖抑制である静菌作用によるものかを調査するために，mid-log phase の菌体に対して好気的に RB＋BL 処置（a-PDT）を行った結果，菌液の濁度は急速に減少し，処置後 40 分以降は濁度の変化を認めなかった．さらに，この試料から RNA を抽出し分解度を測定した結果，検

出不可能なレベルの RNA の完全な破壊が認められた．

＜考察＞

本研究において RB あるいは BL 単独または RB と BL の組み合わせが嫌気・好気環境下で *P. gingivalis* に与える抗菌効果について詳細に検討し，BL と RB の組み合わせによる a-PDT 処置中の酸素の影響がはじめて明らかとなった．嫌気下で RB もしくは BL のみ単独で作用させた場合には細菌増殖にわずかな抑制が認められ，RB＋BL 処置によりその増殖抑制効果はより顕著に増大した．さらに好気環境下において，その抑制効果はより増大した．嫌気環境下での RB＋BL 処置においては，処置後 18 時間まで *P. gingivalis* の増殖に明らかな遅延を認めたが，その後細菌増殖は継続し，48 時間後には対照群とほぼ同程度の細菌増殖の回復が確認された．従ってこの場合の抗菌効果は一時的なものであり，静菌的であると推測された．一方，好気環境下で RB＋BL 処置（a-PDT）を行った群は，実験操作 48 時間後まで濁度の上昇を認めず，血液寒天培地上で 9 日間培養した後もほとんどコロニーの発生を認めなかった．この場合の抗菌効果は完全に細菌増殖を抑制しており，殺菌的であることが示唆された．

さらに，高い濁度の菌液を使用して好気環境下で RB＋BL 処置（a-PDT）を行ったところ，菌液の濁度は急速に減少し，実験操作 40 分後以降は濁度の変化を認めなくなった．これは RB＋BL 処置（a-PDT）により菌体の破壊が進行し，40 分以内に完了したことを示している.また，RNA の破壊の程度についても，コントロール群と嫌気・好気環境下の RB＋BL 処置群を評価した．好気環境下で RB＋BL 処置（a-PDT）を行った群では，基本的な rRNA のピークが完全に消滅しており，RNA が完全に破壊されたことを示していた．一方，嫌気環境下での RB＋BL 処置群では，コントロール群と比較して明らかな違いは認められなかった．これより嫌気的に RB＋BL 処置した群の抗菌効果は RB や BL をそれぞれ単独に使用した群と同様に静菌的であるが，好気的に RB＋BL 処置した群（a-PDT）の抗菌効果は殺菌効果であり，酸素が存在することによって a-PDT としての効果が生じたであろうことが結論づけられた．

a-PDT の臨床応用では，スケーリング・ルートプレーニング（以下 SRP）と a-PDT を組み合わせて治療を行うことにより，SRP のみの場合と比較して臨床パラメーターが改善したことが報告されている．しかし現状において a-PDT の効果は短期間で限定的なものであり，臨床的な有用性は低いと考えられている．歯周ポケット内はポケットが深くなるにつれてより嫌気的な環境になることから，臨床的な効果の弱さは酸素の不足がその一因である可能性がある．従って，色素溶液を改良することにより意図的に歯周ポケット内に酸素を供給することで，a-PDT の効果をより高めることができる可能性がある．今後は歯周ポケット内の a-PDT の臨床応用に最適な酸素の濃度について究明していくことが必要と示唆された．

＜結論＞

嫌気環境下で RB＋BL 処置した群は静菌効果を示したのに対し，好気下で RB＋BL 処置した群は a-PDT 効果が発揮されることにより殺菌効果が示された．さらに好気環境下での RB＋BL 処置後（a-PDT）には，RNA と細菌体の破壊が短時間のうちに認められた．

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5262　号	上窪　彩乃
論文審査担当者	主　査　木下　淳博 副　査　宇尾　基弘　　大槻　昌幸	
論　文　題　目	Effect of antimicrobial photodynamic therapy using rose bengal and blue light-emitting diode on *Porphyromonas gingivalis in vitro*: Influence of oxygen during treatment	

（論文審査の要旨）

歯周病の治療では，現在，機械的治療法を中心として抗菌薬が併用されており，通法の機械的療法のみでは病原因子を完全に取り除くことが困難であることが知られている．高齢社会のなかで，全身疾患を抱える患者も確実に増加傾向にあり，新たな非侵襲性・非外科的な治療法開発が求められている．

レーザーを含む光エネルギーは感染性の病原細菌を破壊する目的で臨床応用されてきたが，近年非外科的な治療法の選択肢の一つとして光化学反応を応用した抗菌光線力学療法（a-PDT）の歯科治療への応用が試みられてきている．a-PDT は，低出力光エネルギーにより光感受性物質を活性化し活性酸素を産生させることで非侵襲的に歯周病原細菌の死滅を図るものである．歯周治療においては，これまで半導体レーザーや LED による赤色光と青色色素の組み合わせでその応用がなされてきた．青色光は好気下で抗菌効果を示すため，近年新たに赤色色素と青色光の組み合わせによる a-PDT が注目されている．

申請者は青色 LED（BL）の抗菌効果に注目し，ローズベンガル（RB）を光感受性薬剤としてのその適性およびこれらを組み合わせた a-PDT の効果について検討してきたが，RB と BL の併用処置の際に，酸素やそれ以外の構成要素（RB や BL）がその抗菌効果に与える影響の詳細は不明である．

そこで申請者の上窪彩乃は，酸素およびそれぞれの構成要素が a-PDT の抗菌効果に与える影響を明らかにするため， *P. gingivalis* 菌液に RB あるいは BL，または RB と BL を併用で好気あるいは嫌気状態で作用させ，その効果を検証し，さらに RNA の変化を解析した．

本研究では，RB を *P. gingivalis* 菌体懸濁液に添加し，最も細菌増殖を抑制しない RB 濃度を検索し，嫌気および好気環境下にて，１） RB 添加のみ，２） BL 照射のみ，３）RB と BL の併用の 3 群を用意し，各群の処置終了後，経時的に菌体懸濁液の濁度を測定した．処置後の菌体を血液寒天培地に塗布し，9 日後に出現したコロニー数を測定した．

さらに好気的 RB＋BL（a-PDT）処置を行い，短時間の菌体濁度の変化を観察し，さらに細菌から RNA を抽出し，RNA の分解に対して解析を行った．

本研究において，上窪彩乃は嫌気性菌である *P. gingivalis* の取り扱いについてよく理解し，用意周到な準備計画のもとに本実験を遂行したことが伺える．細菌増殖を時系列で詳細に追うことで a-PDT の効果が細菌増殖の増殖抑制である静菌効果であるのか，菌体の破壊が起き

ている殺菌効果であるのかを厳密に考察し解明した点など高く評価できる．また，RNA の分解を解析するために分子生物学的手法を用い，適切な機器を使用していることなども評価できる．

本研究の主たる結果は，以下の通りである．

菌体培養液に対して，0.001％の RB 濃度を添加して細菌増殖に大きな影響がないことを確認し，以後，本濃度を実験に供した．嫌気および好気的条件下では，ともにコントロール群と比較して RB 単独または BL 単独で同程度の細菌増殖の抑制を認めた．RB＋BL 処置は，嫌気的条件下では低下がより顕著であった一方，好気的条件の RB＋BL 処置 （a-PDT）ではさらに細菌増殖が全く認められなかった．この処置では培養 9 日目の血液寒天培地においても，ほぼコロニーを確認することができなかった．

好気条件下での RB＋BL 処置（a-PDT）による増殖抑制効果が殺菌作用であるのか，あるいは，強い静菌作用であるのかを調べるために，mid-log phase の高濃度の菌液に対して好気的に RB＋BL 処置 （a-PDT）した結果, 1 時間以内に顕著な濁度の減少が認められた．さらに，この試料から RNA の分解の程度の評価のために RNA を抽出し分解度を測定した結果，検出不可能な程の完全な破壊が認められた．

以上の結果より，嫌気環境下で RB＋BL 処置した群は静菌効果を示したのに対し，好気下で RB＋BL 処置した群は酸素の存在により a-PDT 効果が発揮されることにより殺菌効果が示された．さらに好気環境下での RB＋BL 処置後には，RNA と細菌体の破壊が短時間のうちに認められた．

本研究において，上窪彩乃は歯周病原細菌である *P. gingivalis* に対する a-PDT の抗菌効果の詳細について示した．酸素の存在下での処置においてのみ短時間のうちに細菌が死滅し菌体が破壊されていることを初めて明らかにした．

本研究結果は，歯周病原細菌に対する a-PDT の臨床応用を目指す上で，非常に重要な基礎的エビデンスを提供するものであり，歯周治療学における光エネルギーを応用した新規の治療法の開発や発展に大きく貢献するものと考えられる．

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

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	八尋　浩平
論文審査担当者	主査　井関　祥子 副査　小野　卓史　　田畑　純
論　文　題　目	Histone methyltransferase *Setdb1* is indispensable for Meckel's cartilage development

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

SET domain bifurcated 1 (SETDB1) はエピジェネティクス機構を司るヒストンメチル化酵素の一つである。*Setdb1* コンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死であるため、頭蓋顔面領域における *Setdb1* の役割は不明である。そこで本研究では、神経堤細胞由来の組織特異的に *Setdb1* をノックアウトさせたマウス (*Setdb1* CKO) および siRNA にてノックダウンさせたマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 (si*Setdb1* ATDC5) を用いて、メッケル軟骨における *Setdb1* の役割を検討した。

メッケル軟骨は発生が進むと下顎の中では消失していくが、*Setdb1* CKO ではメッケル軟骨の直径および軟骨細胞自体が増大している傾向が認められた。さらに胎生 16.5 日と 18.5 日ではメッケル軟骨の軟骨膜の一部が消失し、胎生 18.5 日にはメッケル軟骨の一部に石灰化物の沈着が認められた。*Setdb1* CKO のメッケル軟骨、si*Setdb1* ATDC5 ともに細胞増殖能は有意に亢進していた。一方、軟骨分化マーカーである *Sox9, matrix metallopeptidase (Mmp)13, Collagen II* および *aggrecan* は si*Setdb1* ATDC5 において有意に減少しており、未分化な状態にあることが示された。また、bone morphogenetic protein （BMP）シグナル関連分子であるリン酸化 Smad1/5/8 などが、*Setdb1* CKO のメッケル軟骨および si*Setdb1* ATDC5 においてともに有意に増加した。本研究より、*Setdb1* によるエピジェネティクス機構がメッケル軟骨の発生および消退に必須であることが示された。

＜緒言＞

個体発生というダイナミックな形質変化を伴う生命現象においては、ジェネティックおよびエピジェネティックな機構が複雑に関連し合いながら組織特異的な遺伝子発現制御を行い、個体に多様性を生じさせると考えられている。エピジェネティックな変化は、このような正常な個体における形態形成過程に加え、先天異常をはじめとした様々な疾患の発症にも関与することが明らかにされてきた。

ヒストン修飾には、アセチル化、メチル化およびリン酸化などがあり、これら多岐にわたる修飾の組み合わせは、遺伝子発現の on/off だけでなく、その時間幅や強度といった微細な調整に用いられる。ヒストンメチル化酵素の一つである SETDB1 は、ヒストン H3 タンパクの 9 番目のリジン残基をトリメチル化することにより遺伝子発現を負に制御する働き、つまりエピジェネティ

ックな働きを行う。しかし、*Setdb1* のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生 5.5 日までに致死となるため、各組織での *Setdb1* の具体的な役割には不明な点が多い。しかし、間葉細胞特異的に *Setdb1* がノックアウトされたマウスでは、軟骨細胞の肥大化や骨端軟骨を構成する成熟軟骨細胞数の減少を伴う軟骨内骨化の異常が見出された。すなわち、エピジェネティクス機構が軟骨細胞の増殖・分化に重要な役割を担っていることが示唆された。

神経堤細胞由来のメッケル軟骨は、胎生期において下顎の支持組織として機能するが、同じ一次軟骨である軟骨内骨化部の軟骨細胞とは異なる性質を示す。すなわち、メッケル軟骨の遠位部と近位部では軟骨内骨化が生じ、それぞれ、下顎骨結合部およびツチ骨とキヌタ骨を形成する。一方、メッケル軟骨の大部分を占める中央部の軟骨細胞は、肥大化軟骨細胞へと分化した後、消失していくことが知られている。

BMP シグナルは、未分化間葉細胞から軟骨細胞への分化、そして軟骨細胞の増殖や肥大化など軟骨内骨化の各プロセスで重要な役割を担っている。BMP の過剰発現により、軟骨細胞は増殖し、軟骨組織の過形成を生じる。一方、軟骨細胞特異的に BMP 受容体 1a 型（*Bmpr1a*）をノックアウトさせたマウスでは軟骨形成不全が認められる。さらに、軟骨細胞特異的に *Smad1* および *Smad5* をノックアウトさせたマウスにおいても、重度の軟骨形成不全が生じると報告されている。BMP 阻害因子である *Noggin* の発現抑制や *Bmpr1a* 過剰発現によって BMP シグナル亢進させるとメッケル軟骨は消失せず、通常生じることがない骨組織へと置換されることが報告されている。以上のことより、BMP シグナルは、軟骨内骨化だけではなく、メッケル軟骨の発生においても重要な役割を担っていることが示唆されている。

そこで本研究では、メッケル軟骨における *Setdb1* の役割を検討するため、神経堤細胞特異的に *Setdb1* をノックアウトさせたマウスおよび siRNA により *Setdb1* をノックダウンさせた ATDC5 を用い、組織や細胞の形態変化を観察し、かつ BMP シグナルに関与する分子の動態を解析することとした。

＜方法＞

神経堤細胞特異的に *Setdb1* をノックアウトさせたコンディショナルノックアウトマウス (*Setdb1* CKO)、siRNA にて *Setdb1* をノックダウンしたマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 (si*Setdb1* ATDC5)を用意した。胎生 13.5 日から 18.5 日齢の胎仔を採取、パラフィン組織切片を作製し、アルシアンブルーおよびアリザリンレッドの二重染色を行った。細胞増殖活性の解析のため、BrdU を妊娠マウスへの腹腔投与および ATDC5 の培地に添加して取り込ませ、回収後、その取り込み量を定量した。さらに、ATDC5 から RNA を抽出後、cDNA を合成し、定量 PCR にて軟骨分化マーカーおよび BMP シグナルに関与する遺伝子の発現量を検討した。免疫蛍光染色には、リン酸化 SMAD1/5/8 を認識するウサギポリクロナール抗体を用い、ウサギ抗体を認識する蛍光標識した 2 次抗体にて検出した。

＜結果＞

出生直後の *Setdb1* CKO は、顎顔面領域の低形成を認め、特に下顎の低形成が顕著であった。一般的に、メッケル軟骨は発生が進むと消失していくが、*Setdb1* CKO は胎生 13.5 日から 18.5 日

の全ステージで対照群と比較し明らかに直径が増大している組織像を認めた。また、胎生 16.5 日と胎生 18.5 日では一部の軟骨膜が消失しており、胎生 18.5 日 ではメッケル軟骨内の一部にアリザリンレッド陽性の石灰化領域が認められた。

胎生 14.5 日の *Setdb1* CKO のメッケル軟骨の軟骨細胞は、対照群と比較し肥大化していた。また BrdU の取り込みは、*Setdb1* CKO のメッケル軟骨および si*Setdb1* ATDC5 において増加していた。

続いて、*Setdb1* の欠失が軟骨細胞の分化に与える影響を検討した。si*Setdb1* ATDC5 は RNA レベルで、軟骨分化マーカーである *Sox9*、*Collagen II*、*aggrecan* および (*Mmp*)*13* の発現が有意に減少し、逆に軟骨細胞を未分化な状態に維持させる機能をもつ *Axin2* は有意に上昇していた。

次に BMP シグナルに対する影響を調べた。BMP シグナル経路が働く時に現れるリン酸化 SMAD1/5/8 を認識する抗体にて免疫染色を行ったところ、対照群のメッケル軟骨内では軟骨膜付近の軟骨細胞において陽性反応は認められなかったが、*Setdb1* CKO ではメッケル軟骨内全域で陽性反応が認められ、対照群より有意に増加していた。si*Setdb1* ATDC5 でも同様に、リン酸化 SMAD1/5/8 陽性細胞は有意に増加した。また si*Setdb1* ATDC5 では、*Bmp4*、 *Bmpr1* および *Bmpr2* の発現が有意に増加し、BMP のアンタゴニストである *Noggin* の発現は有意に減少していた。

＜考察＞

ダイナミックな変化を生じる発生過程では、調和のとれたエピジェネティクス機構により組織特異的な遺伝子発現調節が行われ形態形成が進行する。一方、その過程に何らかの異常が生じた際に、先天異常疾患が発症すると考えられている。先天異常疾患と同様、がん化およびその進行においてもエピジェネティクス機構の異常が関与していることが報告されている。*SETDB1* は、肝がん、肺がん、前立腺がんおよび乳がんなどのがん細胞において発現量が上昇しており、がん遺伝子の一つと考えられている。*SETDB1* の発現量が上昇している肺がん、肝がんおよび前立腺がんの細胞に対し、siRNA を用いて *SETDB1* をノックダウンさせると、がん細胞の増殖は抑制され、*SETDB1* の過剰発現とがん細胞の異常増殖との間に緊密な関連が存在すると示唆される。一方、我々が検討を行った *Setdb1* CKO のメッケル軟骨では、細胞増殖能が亢進しており、がん細胞とは異なる結果となった。この現象が生じた理由の一つとして、*Setdb1* CKO のメッケル軟骨において Smad を介した BMP シグナルの増強が関与していると考えられた。BMP シグナルは、軟骨形成において重要な役割を担っており、BMP のアンタゴニストである *Noggin* の機能喪失もしくは *Bmpr1* を過剰発現するマウスでは、BMP シグナルの上昇に伴い、メッケル軟骨の増大および増殖能の亢進が認められた。この表現型は我々の *Setdb1* CKO と類似しており、*Setdb1* の欠失が直接的もしくは間接的に BMP シグナルを増加させることにより、軟骨細胞の増殖能の亢進に関与したと考えられた。また、*Setdb1* CKO においては、軟骨細胞の増大が認められ、これが *Setdb1* CKO のメッケル軟骨の直径増大に関与したと考えられる。間葉細胞特異的に *Setdb1* をノックアウトさせたマウスでは、四肢の短縮や頭蓋骨の矢状縫合部分の開存が生じ、また軟骨細胞の肥大化に異常が生じると報告されており、本研究結果を考慮すると、*Setdb1* は軟骨細胞の分化に関与することが示唆された。また、軟骨細胞の増殖能の亢進には、SMAD 依存性の BMP シグナルの活性化が一因となっている可能性が示唆された。

＜結論＞

本研究において、*Setdb1* によるエピジェネティクス機構が、メッケル軟骨における軟骨細胞の増殖、分化およびサイズの制御に関与していることが示された。また、この制御機構は BMP シグナルを介している可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5263　号	八尋　浩平
論文審査担当者	主査　　井関　祥子 副査　　小野　卓史　　田畑　純	
論 文 題 目	Histone methyltransferase *Setdb1* is indispensable for Meckel's cartilage development	

（論文審査の要旨）

エピジェネティクス機構は、遺伝子の塩基配列自体を変化させることなく、後天的な修飾により遺伝子発現を制御するメカニズムのことを表し、正常な個体発生過程で重要な役割を担う。エピジェネティックな制御機構の一つであるヒストン修飾には、アセチル化、メチル化およびリン酸化などが存在し、これらの多岐にわたる組み合わせにより細胞の多様性を生み出している。SET domain bifurcated 1(*Setdb1*)はヒストン H3 の 9 番目のリジン残基を特異的にメチル化する酵素であり、そのコンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死であるため、*Setdb1* の発生過程における役割は不明な点が多い。間葉細胞特異的に *Setdb1* をノックアウトさせたマウスでは、軟骨細胞の増大ならびに骨端軟骨を構成する成熟軟骨細胞数の減少により長管骨における軟骨内骨化に異常が生じることが報告された。これは、エピジェネティクス機構が軟骨内骨化における細胞の増殖・分化に重要な役割を担っていることを示唆するものである。一方、胎生期の下顎骨の支持組織として機能するメッケル軟骨に関しては、エピジェネティック制御機構の関与について報告した例は未だ認めない。

このような背景から、八尋は、神経堤細胞特異的に *Setdb1* をノックアウトさせたマウスおよび siRNA により *Setdb1* をノックダウンさせたマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 を用い、メッケル軟骨における *Setdb1* の役割を検討した。

研究方法として、神経堤細胞特異的に *Setdb1* をノックアウトさせたコンディショナルノックアウトマウス (*Setdb1* CKO)、siRNA にて *Setdb1* をノックダウンしたマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 (si*Setdb1* ATDC5)を用意した。胎生 13.5 日から 18.5 日齢の胎仔を用いて、頭部のパラフィン組織切片を作製後、アルシアンブルーおよびアリザリンレッドの二重染色を行った。細胞増殖能の解析のため、BrdU を投与した妊娠マウスより回収したサンプルを用いて、BrdU の取り込みを定量した。また ATDC5 に関しても、BrdU の取り込みによって細胞増殖活性を検討した。さらに、ATDC5 から RNA を抽出後、cDNA を作製し、定量的 PCR にて軟骨分化マーカーおよび軟骨形成を誘導する bone morphogenetic protein（BMP）シグナルに関与する遺伝子の発現量を検討した。免疫蛍光染色には、BMP シグナル伝達因子であるリン酸化 SMAD1/5/8 を認識するウサギ由来抗体を用い、抗ウサギ抗体を認識する蛍光標識した 2 次抗体にて検出した。

以上より、八尋の研究は適切な研究計画に基づいて、メッケル軟骨における *Setdb1* の役

割を検証しうる実験系を構築し、その変化を適切に分析・考察している点で学術的価値は高く評価できる。

研究結果として、以下の知見を得ている。

出生直後の *Setdb1* CKO は、顎顔面領域の低形成を認め、特に下顎においてそれが顕著であった。一般的に、メッケル軟骨は発生過程に伴い下顎骨の中から消失していくが、*Setdb1* CKO では胎生 13.5 日から 18.5 日の全ステージで対照群と比較し明らかに直径が増大している組織像を認めた。また、胎生 16.5 日と胎生 18.5 日では軟骨膜が一部消失し、さらに胎生 18.5 日では、石灰化を示すアリザリンレッド陽性の領域がメッケル軟骨内部に認められた。胎生 14.5 日の *Setdb1* CKO のメッケル軟骨の軟骨細胞は、対照群と比較し増大していた。また BrdU の取り込みが *Setdb1* CKO のメッケル軟骨では増加していた。この結果と同様に、si*Setdb1* ATDC5 においても BrdU の取り込みの増加が認められた。続いて *Setdb1* が軟骨細胞の分化に与える影響を検討した。si*Setdb1* ATDC5 は mRNA レベルで、軟骨分化マーカーである *Sox9*、*Collagen II*、*agreecan* および *Matrix metallopeptidase* (*Mmp*)*13* の発現が有意に減少し *Axin2* が有意に上昇していた。リン酸化 SMAD1/5/8 を認識する抗体にて免疫染色を行ったところ、対照群のメッケル軟骨ではリン酸化 SMAD1/5/8 陽性細胞がほぼ認められなかったが、*Setdb1* CKO ではメッケル軟骨内全域でリン酸化 SMAD1/5/8 陽性細胞が認められ、対照群より有意に陽性細胞が増加していた。また、si*Setdb1* ATDC5 でも同様に、リン酸化 SMAD1/5/8 陽性細胞は有意に増加し、*Bmp4*、*Bmpr1* および *Bmpr2* は有意に増加し、BMP のアンタゴニストである *Noggin* は有意に減少していた。

以上の結果より、*Setdb1* CKO のメッケル軟骨で認めた軟骨細胞の増殖能亢進・直径の増大といった表現型は、SMAD を介する BMP シグナルの異常亢進により発現したと推察された。本研究において得られた結果は、*Setdb1* によるエピジェネティクス機構が、BMP シグナルを介しメッケル軟骨の増殖・分化制御に関与する可能性を示唆し、頭蓋顔面領域の発生や先天異常の発症メカニズムを理解する上での新たな視点を加えるものであった。

本研究の着眼点とその成果は高く評価され、基礎および臨床歯学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士 (歯学) の学位を申請するに十分値するものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	鈴木 亮一
論文審査担当者	主　査　柴田 俊一 副　査　宇尾 基弘　　鵜澤 成一
論　文　題　目	Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model

＜緒言＞

低出力のレーザーを応用した低反応レベルレーザー療法は、創傷治癒の促進など様々な臨床分野に適用されている。最近になってヘリウムネオンレーザーに代わり半導体レーザーが用いられるようになったが、その最適な使用条件については検討が不十分である。そこで本論文では、ラット創傷モデルにおける 660-nm 半導体レーザーの創傷治癒効果について研究し、その最適な使用条件を明らかすることを目的とする。

＜材料および方法＞

1 実験動物

実験動物には 60 頭の Sprague-Dawley 系ラット、雄 8 週齢（体重 240-330g）を使用した。実験動物は所定の期間にわたりケージ内で飼育し、餌を自由に採食できるようにした。

2 創の作製

動物は最初にイソフルランにて麻酔を施した。毛刈りを行い、ポビドンヨードで皮膚を消毒した後、胸部背側に No.11 のメスで長さ 15 mm の全層切開創を作製した。メッツェンバウム外科剪刀で皮膚と皮下組織を筋膜から分離した。創作製後、4-0 ナイロン縫合糸で創の中央と両端を単純結紮で閉鎖した。術後にエンフロキサシン 5 mg/kg を投与した。創部感染を防ぐため実験期間を通して創部を 6 cm × 4 cm の滅菌ドレープで覆った。創周囲の皮膚にドレープを接着するためにシアノアクリレート系接着剤を用いた。

3 レーザー照射

実験には AlGaInP 半導体レーザーを備えたレーザー装置（OSL-1000V）を使用し、照射条件は波長 660 nm、出力 20 mW、照射面積 1.77 cm^2（出力密度 11.3 mW/cm^2）と設定した。レーザプローブの先端部から創部までの距離は 30 mm とした。レーザー照射を行ったラットはそれぞれ 92、460、920 秒の照射時間に応じて 3 グループに分けられた。このとき、それぞれのグループでの照射エネルギー密度は 1、5、10 J/cm^2 である。創作製を行って 24 時間後にドレープを背部皮膚から除去し、手術創にレーザー照射した後、再びドレープが設置された。非照射群にはレーザー照射は行わなかった。

4 組織学的評価

各群の実験動物は術後 3 日目と 7 日目にペントバルビタールの過剰投与にて犠死処置を行い、手術創を含めた背部皮膚組織片を採取した。組織学的観察のために組織片を 10 %ホルマリンで固定し、パラフィン包埋を行った。包埋した組織片より頭部から近位と中央の縫合糸の間の位置において約 4 μm の厚さの組織切片を作製した。

術後 3 日目に採取した組織からの切片は炎症細胞を同定するために HE 染色と免疫染色を行った。免疫染色において組織切片は抗 ED1 抗体と共に 4℃の加湿チャンバーで一晩インキュベートした。その後に Alexa 488 標識二次抗体と共に 60 分間インキュベートした。核はヨウ化プロピジウムで染色した。HE 染色した組織切片は光学顕微鏡で観察し、CCD カメラを用いて画像を取り込んだ。 ED1 免疫染色した切片の観察と画像の撮影は共焦点顕微鏡を用いて行った。各切片の創周辺における 750 μm × 600 μm の領域内の ED1 陽性のマクロファージの数を画像解析ソフトウェアにて測定した。

術後 7 日目に採取した組織からの切片は HE 染色を行った。染色した組織切片を光学顕微鏡で観察し、画像は CCD カメラを用いて撮影した。染色性の薄い組織領域の幅を、肉芽組織の大きさを推定するために画像解析ソフトウェアを用いて測定した。また、創周囲のコラーゲン線維を偏光顕微鏡を用いて観察し、画像を CCD カメラで撮影した。これらの画像から画像解析ソフトウェアを使用して創周辺における 625 μm × 500 μm の領域内でコラーゲン線維によって占められる面積の割合を測定した。

5 引張試験

各群の実験動物は術後 7 日目にペントバルビタール過剰投与で犠死処置を行い、背側から術創部が中央に位置するように皮膚組織片（10 mm × 60 mm）を採取した。引張試験の前に、各皮膚組織片の両端 20 mm をサンドペーパー（＃180）が表面に接着されたステンレス板（20 mm × 20 mm × 0.5 mm）の間に挟んだ。

引張試験は、試料採取後 30 分以内に力学試験機（オートグラフ AG-1kNX）を用いて行った。クロスヘッド速度を 5 mm/min として試験片が破断に到るまで引張試験を行い、破断強度および剛性を求めた。

6 統計分析

統計分析はエネルギー密度を要因として一元配置分散分析（ANOVA）を用いて分析した。次いでボンフェローニ・ホルム法により水準を修正した Welch の t 検定により多重比較を行った。全ての統計分析は R ソフトウェアを用いて行った。

＜結果＞

1 組織学的所見

術後 3 日目の HE 染色における組織所見では創周囲に炎症細胞が多数認められた。また新生コラーゲン線維は観察されなかった。免疫染色の所見では指定した領域内の ED1 陽性マクロファージの平均数はコントロール群、10 J/cm^2 群と比較して 1 J/cm^2、5 J/cm^2 の照射群で有意に低かった。（$p < 0.01$）

術後 7 日目の HE 染色における組織所見では明らかな炎症細胞は認められず、染色性の薄い未熟な肉芽組織が認められた。偏光顕微鏡下の観察でコラーゲン線維の存在が明らかとなった。5

J/cm^2 群では治癒のステージが進行していることが観察され、1 J/cm^2 群ではコラーゲン線維の連続性がほぼ回復していることが観察された。対照的にコントロール群と 10 J/cm^2 群では治癒過程が開始されるステージに留まっているように観察された。コラーゲン線維の領域については、5 J/cm^2 群ではコントロール群と比較して約 2 倍となって最大値を示し、1 J/cm^2 群がコントロール群と比較して 1.5 倍となってそれに続いた。しかし 4 群間における多重比較では、測定データのばらつきの大きさのため有意差が認められなかった（$p > 0.05$）。このような大きなばらつきは、偏光下で観察されるコラーゲン線維領域の測定が線維の配行と偏光板の角度設定に依存することから生じると考えられた。また肉芽組織の大きさを評価する目的で HE 染色切片において染色性の薄い好酸性組織の幅を測定したが、群間では有意差は認められなかった。この原因としては、染色性の問題から測定データのばらつきが大きくなるためと考えられた。

2 引張試験

引張試験においては全ての組織片が創部領域で破断した。多重比較では手術創の平均破断荷重及び剛性がコントロール群よりも 1 J/cm^2 および 5 J/cm^2 の照射群で有意に大きかった（$p < 0.05$）。10 J/cm^2 群はコントロールに比べて大きな値を示したが統計的に有意な差は認められなかった（$p > 0.05$）。

＜考察＞

創傷治癒過程の最初のステージである炎症期においてマクロファージは主要な炎症細胞であり、創部から壊死組織を除去するなど重要な役割をもつ。したがって我々は術後 3 日目の炎症期において創周囲のマクロファージの数を測定するために ED1 の免疫染色を行い、コントロール群と 10 J/cm^2 群と比較して 1 J/cm^2 と 5 J/cm^2 の照射群では有意に減少していることを観察した。このことから比較的低いエネルギー密度（1 J/cm^2 と 5 J/cm^2）でのレーザー照射が創周辺のマクロファージの増殖を抑えたことが示された。また高いエネルギー密度（10 J/cm^2）ではマクロファージの減少は認められなかった。詳しいメカニズムは不明であるが、光 - 組織相互作用が非線形的な性質を有するためと推定された。

増殖期においてコラーゲンは炎症細胞から分泌されるサイトカインの刺激に応答する線維芽細胞によって合成され、皮膚組織の機能回復が促進される。そこで偏光顕微鏡を用いて術後 7 日目における創周囲のコラーゲン線維が占める面積の割合を測定した。コラーゲン線維が占める面積は 5 J/cm^2 群で最大を示し、1 J/cm^2 群がその後に続いた。低いエネルギー密度でのレーザー照射とコラーゲン合成の増加との間には関連性があることが推察された。

7 日目の皮膚組織片の引張試験では 1 J/cm^2 と 5 J/cm^2 の照射群でコントロール群と比較して破断強度と剛性が有意に大きかった。低いエネルギー密度のレーザー照射が皮膚強度の増加をもたらすことが示された。一方で 10 J/cm^2 の照射群では強度の増加は観察されなかった。

低エネルギレーザー照射の治療効果のメカニズムに関連しては、3 日目の組織学的観察で炎症反応が低エネルギー（例えば 1 J/cm^2 と 5 J/cm^2）のレーザー照射によって抑制されたことが示された。炎症細胞は創傷治癒過程において抑制的に働くことが知られており、これらの細胞の減少が治癒を促進すると考えられている。したがって比較的低いエネルギー密度のレーザー照射が適度に炎症を抑制し、増殖期におけるコラーゲン合成及び組織強化が促進されると考えられた。し

かしながら、本研究ではより大きなエネルギー密度（例えば 10 J/cm^2）のレーザー照射が炎症抑制や組織強度の増加に効果的でないことも示され、基本的なメカニズムの詳細については今後の研究課題と考えられた。

本論文の結果は1から5 J/cm^{2}程度のエネルギー密度のレーザー照射が皮膚組織の治癒を促進することを示している。しかしながら、本研究はラットモデルを利用したものであり、今後より長期的な評価やレーザー照射が炎症を抑制するメカニズムの解明が期待される。

＜結論＞

ラット創傷モデルにおいて、出力密度 11.3 mW/cm^2 の 660-nm 半導体レーザーを用いた低反応レベルレーザー療法は、1 から 5 J/cm^2 のエネルギー密度の範囲で創傷治癒を促進することが分かった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5265　号	鈴木　亮一
論文審査担当者	主　査　柴田 俊一 副　査　宇尾 基弘　　鵜澤 成一	
論 文 題 目	Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model	

（論文審査の要旨）

低反応レベルレーザー療法は、創傷治癒促進効果、抗炎症効果、疼痛抑制効果など様々な効果をもつことで知られている。しかしながらその効果のメカニズムは解明されておらず、また治療における最適な照射条件も明らかにされていない。このような状況を背景として、鈴木は660-nm 半導体レーザーをラット皮膚切開モデルに照射し､組織学的定量法と力学的定量法を用いて半導体レーザーの最適な照射条件について検討した。このようなテーマの設定は研究の意義が大きいと言える。

研究においては、実験動物の SD 系ラット胸部背側に長さ 15 mm の全層切開創を作製し、皮膚と皮下組織を筋膜から剥離した。創は 4-0 ナイロン縫合糸を用いて創の中央と両端を単純結紮で閉鎖した。感染を防ぐために実験期間を通して創部を滅菌ドレープで被覆した。レーザー装置には AlGaInP 半導体レーザーを使用し、照射条件として波長 660-nm、出力 20 mW、出力密度 11.3 mW/cm^2 に設定した。レーザープローブの先端部から創部までの距離は 30 mm とした。照射回数は 1 回とし、エネルギー密度について 0、1、5、10 J/cm^2 の 4 群を設けた。創作製から 24 時間後に皮膚のドレープを除去し、レーザー照射を行った。照射後には再びドレープを設置した。

術後 3 日目と 7 日目に手術創を含めた背部皮膚組織片を採材し、薄切標本を作製した。術後 3 日目の標本は炎症細胞を観察するために HE 染色および抗 ED1 抗体を用いて免疫染色を行った。創周囲の ED1 陽性細胞をマクロファージとし、その数を画像解析で求めた。術後 7 日目の標本は HE 染色を行い、偏光顕微鏡下でコラーゲン線維を観察し、創周囲におけるコラーゲン線維の面積の割合を画像解析で求めた。術後 7 日目にラットの背部から採材した皮膚組織片を用いて引張試験を行い、皮膚創部の強度と剛性を求めた。

統計分析はエネルギー密度を要因として一元配置分散分析（ANOVA）を用いて分析した。次いでボンフェローニ･ホルム法により水準修正した Welch の t 検定により多重比較を行った。これらの実験方法は妥当であり、実験計画は周到に計画され準備されたものと認められる。

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

・ 術後 3 日目の炎症期において、比較的低いエネルギー密度（1 J/cm^2 群、5 J/cm^2）では創周辺のマクロファージの増殖が抑えられていることが示された。また高いエネルギー密度（10 J/cm^2）ではマクロファージの減少は認められなかった。詳細なメカニズムは不明であるも

のの、これは光‐組織相互作用が非線形的な性質を有することに起因すると推定された。

- 術後 7 日目の増殖期において、創周辺のコラーゲン線維が占める面積の割合には群間での有意差は認められなかったものの、5 J/cm^2 群で最大を示し、1 J/cm^2 群がそれに続いた。この結果から、低いエネルギー密度の LLLT とコラーゲン合成との間には関連性があることが示唆された。
- 術後 7 日目の引張試験では、1 J/cm^2 群と 5 J/cm^2 群においてコントロール群と比較して破断強度と剛性の有意な増加が観察された。これに対して 10 J/cm^2 群では強度の有意な増加は観察されなかった。このことから低いエネルギー密度のレーザー照射が皮膚強度の増加をもたらすことが示された。

これらの結果より、鈴木はラット創傷モデルを用いた本論文において、出力密度 11.3 mW/cm^2 の 660-nm 半導体レーザーを用いた低反応レベルレーザー療法が、1 から 5 J/cm^2 のエネルギー密度の範囲で皮膚切開創における創傷治癒を促進することを示した。これらの考察および結論は妥当であると評価できる。

このように本研究では 660-nm 半導体レーザーを用いた低反応レベルレーザー療法が創傷治癒を促進すること示され、組織学的定量法と力学的定量法を用いてレベルレーザーの最適な照射条件が見出された。これらの研究成果は医学、歯学、獣医学における貴重な知見であり、治療効果の向上に寄与するところが大きいと評価できる。よって、本論文は博士（学術）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	高　紋子
論文審査担当者	主査　佐々木　明子 副査　緒方　泰子　　森田　久美子
論　文　題　目	認知症高齢者への効果的な入浴誘導の特徴;録画とインタビューによる質的研究

（論文内容の要旨）

Ⅰ.はじめに

認知症のケアについては、BPSD への対応やコミュニケーション障害へのケアの困難さなどが指摘されている。また、認知症ケアにあたるスタッフは、BPSD によりストレス状態にあることや職業満足や離職意向に影響があるとの報告がある。

しかし BPSD の発生に関しては、プライバシーにかかわるケア提供時や、高齢者に不安・混乱・落ち着きのなさ・あきらめを示す態度や言動を生じさせるケア提供者の関わりなどの報告もある。認知症高齢者に対し、個別的なケアが必要とされるが、個別性に基づいたケアの提供は困難な状況にある。今後は、個別性の尊重を推進する一方で、スタッフの技術向上に資する、簡便で有効な、「良いケア」の手がかりや指針が求められるように思われる。そのため、エビデンスに基づいたより良いケアを提供するためには、ケア場面に関するより客観的なデータを収集し、ケア方法を探索していくことも重要と思われる。

先行研究では、プライバシーにかかわるケアの際に高齢者の抵抗があることなどの報告があるも、ケアの導入時に焦点をあてた研究は殆んどみられていない。特に入浴などプライバシーに配慮が必要なケアへの導入場面は、その後にしばしば発生する BPSD を予防する上でも重要な場面であり、実際のケアに影響することから充分な検討が必要である。

そこで、本研究では、認知症高齢者の入浴のための誘導場面に着目し、最終的に高齢者が同意の反応を示した働きかけと示さなかった働きかけの比較を通して、効果的な誘導のあり方を検討した。

Ⅱ.研究方法

1.　研究対象者

本研究の対象は、首都圏にあるＡ病院の認知症閉鎖療養病床に入院中の認知症高齢者 10 名およびスタッフ 13 名である。

2.　データ収集

1）映像録画方法

週 2 回の入浴日に、スタッフが高齢者へ入浴誘導を行っている場面を録画した。データ収集期間は平成 24 年 6 月～8 月であった。

2) スタッフへのインタビュー

スタッフに録画を見てもらい、場面の１つ１つの行動にどのように高齢者の反応を理解したか、スタッフの行動についてなぜそのように行動したかを話してもらった。

3.データ分析

1)映像分析場面の選定

本研究では、分析開始時点をスタッフが高齢者に入浴誘導のための働きかけを開始した時とした。終了時点は、(1)高齢者が同意を示した時、(2)同意の有無が判断できないときは、高齢者が移動のための動作を開始した時、(3)移動しないときは、スタッフが立ち去ったあるいは車椅子移動の操作を始めた時のいずれかとした。「同意」の定義を、言葉による是認やうなずき、移動のため身体が前傾になるなどの動作が観察できることとした。

2)分析の手続き

映像から、スタッフ、高齢者ともの様子を詳細に記述した。働きかけによって高齢者が反応を示す、または高齢者の反応に変化がない場合はスタッフが働きかけを変えるところまでを一区切りとし、データ切片とした。切片ごとにスタッフの働きかけの内容を示すコード名をつけ、時系列で並べ、高齢者の最終的な反応（同意または拒否）によって２分類した。その次にスタッフの働きかけと働きかけの中で示された高齢者の応答により、場面を５パターンに分類した。場面の画像から、最終的に同意に至った場面のみに出現する高齢者の微細なサインを見出し、全場面で、そのサインの有無と出現のタイミング、およびサインの出現と高齢者の最終的な反応との関連を検討した。インタビューデータは逐語に起こし、上記の分析に合わせて検討した。

3)信頼性の手続き

映像場面からスタッフの働きかけの内容と回数を抽出した場面に対し信頼性の確認を行った。コーディングカテゴリーの一致率は 76.5%であった。

4.倫理的配慮

調査は A 病院の倫理委員会の審査・承認を得て行った。

Ⅳ.結果

1. 研究対象者の概要

対象者の概要はスタッフ 13 名中男性が 7 名(53.8%)、平均年齢が 37.3（ ±7.5)歳、看護師が 3 名(23.1%)、介護福祉士が 10 名(76.9%)であった。認知症高齢者 10 名のうち、女性が 6 名(60.0%)で、平均年齢 80.2 (±10.1)歳であった。

2. 入浴誘導と認知症高齢者の反応

ビデオ映像場面は計 193 場面であり、そのうち分析可能な入浴誘導場面は 142 場面で、録画時間は平均 16.5 秒であった。

1)スタッフによる働きかけと高齢者の反応により、142 場面は 5 つのパターンに分類できた。

A.　単回群

「単回群」とは、スタッフの 1 回のみの働きかけで、高齢者が同意や同意につながる応答を表出した場面である。全場面のうち 60.6%（86/142）でスタッフが「お風呂の準備ができましたよ。」「行きましょう」と声かけで、高齢者は同意を示していた。特に「お風呂」という言葉を含んだ言葉かけにすぐに同意を示した場面が多かった（77 場面）。

単回群の録画に基づくインタビューでは、スタッフが個人の特徴を事前によくとらえていたことや、声をかける時間的なタイミングが合っていたことなどが語られた。

B.　加算群

加算群とは、高齢者の同意の表出までに時間がかかり、その間に働きかけが追加された場合である（13 場面）。スタッフの働きかけを認識はしているが内容を理解できない様子などが見られ、その後に働きかけが追加された場合を「加算群」とした。「お風呂」という言葉を理解するまでに時間がかかる、難聴など聞き取りにくい困難があるなどの例があった。このような場合、スタッフは入浴の説明を再度行ったり、ジェスチャーを組み合わせたりしていた。

C.　身体動作群

身体動作群とは、コミュニケーションが困難なことなどにより高齢者からの応答が見られない中、スタッフが身体的な補助をして高齢者を動き出させた場合である（13 場面）。

言葉かけと同時に、高齢者の表情を見ながらつないだ手を自分の方に引き寄せて立ち上がりを促したり、背中に手を当て浴室の方向へ身体を向けるなど身体的な動作を促すことを 2 回、3 回と行うことで、移動動作が開始されていた。

D.　代替案や切り替え群

代替案や切り替え群は、スタッフの働きかけに対し、高齢者がいったん拒否を示した場面である（10 場面）。スタッフは拒否の理由に合わせ代替案を提示したり、高齢者の関心を転換したり、興味を示す会話に合わせたりして、その結果高齢者は入浴に向かう動作を開始していた。

E.　非効果群

スタッフがどのように働きかけても高齢者が同意を示さない場面もあった（20 場面）。拒否を続ける高齢者に対し、スタッフが時間をかけ、高齢者の表情を確認しながら、話題を変えたり（切り替え）、車椅子移動を提案したり（代替案）する中で、反対に高齢者が怒りを表出する場面もあった。

なお、録画画像で測定すると、スタッフの働きかけの開始から高齢者の同意までは、最長で 117 秒であった。それ以上働きかけを継続していた場面は全て拒否で終わっていた。

2)認知症高齢者からのサイン(表 3)

高齢者の同意・拒否の表現以外に、スタッフの働きかけを認識していることを示す小さなサインを見出し、engage back と命名した。これらはスタッフとの相互行為の中で示され、表出されるタイミングもそれぞれであるが、スタッフが変わっても一人の高齢者が表出するサインは同じであった。

Engage back は「非効果群」の 20 場面では 1 回も見られなかった一方、「単回群」では 19.8%

（17/86 場面）、「加算群」で 76.9%（10/13 場面）、「身体補助群」と「代替案か切り替え群」では 100%に見られ、engage back は最終的な同意を予測する手がかりとして活用できる可能性が窺われた。

V．考察

本研究は、認知症高齢者の入浴誘導の場面に着目し、最終的に高齢者が同意の反応を示した働きかけと示さなかった働きかけの比較を通して、効果的な入浴誘導のあり方を検討した。

1．パターンごとの誘導方法の戦略

本研究では、スタッフによる効果的な働きかけのプロセスが 4 パターンで示された。

単回群では、個別の特徴を把握し、高齢者とスタッフとの相互作用がうまく合致したことが推察される。

加算群では、高齢者が同意の応答を示すまでに時間がかかる要因として、老化による難聴や聞き間違いによるもの、認知症の疾患特性によるものに大別された。そのため、ケアする側は、高齢者が理解できるまで待つことが必要である。

身体動作群では、スタッフは、言語的コミュニケーションとともに、不安を軽減させるような非言語的コミュニケーションを取り入れることによって、移動動作を行うことの意味付けを高齢者に示していたといえる。

代替案・切り替え群では、拒否を示した高齢者にそのまま押し問答をするのではなく、代替案を提示したり、話題を切り替えたりすることが効果的ということであることが示された。

2．働きかけの回数

高齢者が最終的に入浴に同意し移動に至るスタッフは 3 回の働きかけまでは、最終的に同意が得られる可能性がある。高齢者が最初に拒否してもすぐにはケアを中断しないこと、また一方で、ケアをあきらめるタイミングのてがかりを提供しているともいえる。

また、同意に至った働きかけは最長 117 秒であった。ユマニチュードという認知症ケアの技法では、ケアの合意を得るプロセスは 20 秒から 3 分と推奨しており、この提言と類似している。本研究では同意を得るための働きかけのプロセスが具体的に示されたと考えられる。

3．Engage back

認知症高齢者がスタッフの働きかけを認識していることを示すと窺われるサインを Engage back と名付けた。このサインはケアを継続性の判断が行えることで拒否に対するスタッフの不安や負担の減少に寄与することやケアを継続する判断になりうる可能性がある。また、反応がわかりづらい高齢者においても、スタッフを受け入れているというサインを自覚することによりお互いの関係性が深まっていくのではないかと考える。

4．認知症ケアの経験知をシンプルに提示すること

実際のケア提供場面から実証的に効果的なケアを示した研究は見られない。実践からの経験知をシンプルに提示することで、多忙な実践現場で簡便に活用可能にできる技法を今後さらに蓄積する必要があろう。

VI．本研究の限界と課題

今後は、本結果をもとに、「良いケア」の有効性を検討していく調査を行い、エビデンスの蓄積に努め、より効果的なケア方法の構築を行っていく必要があると考える。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5268　号	高　紋子
論文審査担当者	主査　佐々木　明子 副査　緒方　泰子　　森田　久美子	

（論文審査の要旨）

超高齢社会を迎え、介護を要する認知症高齢者が増加しており、効果的なケアへのニーズが高まっている。特に、認知症高齢者の入浴のケアは拒否などにより困難を伴うことも多く、適切なケア方法の開発が求められている。これまで認知症高齢者の入浴場面についての介入研究はいくつか行われているが、入浴の導入時のケアに焦点をあてた研究は殆んどみられていない。

そこで申請者は、認知症高齢者の入浴の誘導場面に着目し認知症高齢者が同意の反応を示した働きかけの特徴を明らかにし、効果的な入浴誘導のあり方を検討した。

対象は認知症閉鎖療養病棟に入院中の認知症高齢者 10 名及びスタッフ 13 名（ケアワーカー10 名、看護師 3 名）であり、週 2 回の入浴誘導場面のビデオ録画およびスタッフへのインタビューを行った。スタッフ、認知症高齢者（自分で意思決定の困難な場合は家族などの代諾者）の双方から書面にて、さらに研究実施日においては再度説明と承諾を得た。映像した 193 場面のうち、会話が聞き取れずやり取りが不明瞭なもの、映像が途中で切れてしまっていたもの、1 回の場面の中に複数のスタッフが介入していたもの、また認知症高齢者が返答や応答を示す前にスタッフが浴室へ移送したものを除外した 142 場面について、切片化してコードを付し、認知症高齢者の入浴の同意に至る働きかけの特徴をスタッフへのインタビューと合わせ分析した。

その結果、働きかけには①1 回で同意が得られる「単回群」（86 場面）、②認知症高齢者の同意の表出までに複数回の働きかけを要する「加算群」（13 場面）、③行動で示しながら促す「身体動作群」（13 場面）、④代替案か切り替えで促す「代替案や切り替え群」（10 場面）があった。どれだけ働きかけても拒否する非効果群は 20 場面であった。同意に至る働きかけは 3 回までで、それ以上は何度働きかけても拒否することを明らかにした。

さらに、認知症高齢者の同意・拒否の表現以外に、スタッフとの相互作用の中で、認知症高齢者がスタッフの働きかけを認識していることを示す微細なサインを見出し、engage back と命名した。 engage back のサインは認知症高齢者によって異なり、「スタッフの手を握り返す」「スタッフに顔をしっかり向ける」「スタッフの行為を目で追う」などであり、スタッフが変わっても一人の認知症高齢者が表出するサインは同じであった。

engage back は「非効果群」の 20 場面では 1 回もみられなかった一方、「単回群」では 19.8%（17/86 場面）、「加算群」で 76.9%（10/13 場面）、「身体動作群」と「代替案や切り替え群」ではすべてにみられた。

以上より、スタッフの働きかけにより認知症高齢者が入浴の同意に至るプロセスにはパターンがあること、3 回までの働きかけで拒否がみられる場合は、その際の入浴の誘導のケアをあきらめ

て改めて働きかける可能性があること、engage　back は最終的な同意を予測する手がかりとして活用できる可能性があると結論づけた。

本研究は、認知症高齢者の入浴の誘導場面に着目し、認知症高齢者が同意や拒否を示す働きかけについて、ビデオ録画とケアスタッフからのインタビューの分析を基に、明らかにした研究である。これまで経験知に基づき行われてきた認知症高齢者の入浴誘導のケアに関して、科学的根拠を基にその有効性を明らかにしたことは、画期的であり、実践の場に応用可能な方法を導き出している。今後発展が期待される研究としての意義があり、さらに高齢者看護の領域での十分な実践や知識を備えており、博士(看護学)の授与に値すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	竹生　礼子
論文審査担当者	主査　緒方　泰子 副査　本田　彰子　　山﨑　智子
論　文　題　目	Development and evaluation of community residents participating in livelihood support system for community-dwelling cancer patients (CPL-CCP system)

（論文内容の要旨）

〈背景と目的〉

日本は、超高齢社会に対応するために、地域で最期まで生活できるようにする地域包括ケアシステムを整備することを目指している。また、がんは全死亡の約 3 割の死因を占め、今後さらに増えることが予測される。こうした背景から、がん療養者の生活支援に地域住民の互助の力を活用し、地域の中で支える方策が求められている。今回、がん療養者が在宅で過ごすことが難しいといわれている北海道内において、住民が療養者の生活支援に参加する方法を実践的に検討した。先行研究を元に作成した在宅がん療養者の住民参加型生活支援システム案を運用、評価し、修正システムの提案を目的とした。

〈研究方法〉

研究の全体像

Mixed Method を用いた参加型アクション・リサーチを行った。研究の全体像を図 1 に示した。Phase 1 ：7 段階の Step を含んだ CRP-CCP-system システム素案の（図 1 ）をあらかじめ研究者が作成し、Phase2：Action システムを 2 地域で実施、Phase3：Evaluation 実施しながら各段階で評価（一部は終了してから評価）、Phase4：Modification 最後にシステムを修正する手順ですすめた。

対象地域は、北海道内の人口規模が異なる、人口 190 万人の市：都市地域、人口 1 万 8 千人の町：郊外地域とした。

研究参加者は、研究への参加に同意した以下(1)－(3)の人々である。

(1) 住民あるいは支援者：指定のルール遵守を誓約している。(2) 在宅がん療養者・家族：自身ががんであることを知っており、訪問看護を利用している。(3)　訪問看護師：(2)の療養者の在宅ケアを担当している。

2 地域にて、「在宅がん療養者の住民参加型生活支援システム」素案の 7 つの Step を運用した。介入内容、研究参加者・関係者の反応と変化を評価し、修正版生活支援システムを示した。

データ収集方法

量的データと質的データを並行して収集した。量的データは、Step3~6 にて研究参加者に対して行った自記式調査票より収集した。調査票の主な項目は、在宅がん療養者の生活支援への住民

参加に対する期待と躊躇、活動継続意欲・満足感、さらに療養者にはQOLに関する4項目、療養者の家族には介護肯定感と負担感、支援者には援助成果11項目と援助負担感12項目をたずねた。質的データは全Stepの活動記録、会議録、Step4・6での半構成的インタビュー、Step5でのFGIよりデータ収集した。インタビューでの質問内容は、生活支援への期待と躊躇、躊躇の解決方法、活動の効果等である。住民による支援の前中後の生活支援の内容・参加観察をデータとして加えた。

データの分析及び記述方法

調査票のデータはPre-Post比較分析、Wilcoxonの符号付き順位検定を行い、有意水準を5%未満とした。分析には、統計ソフトSPSSVer.18を使用した。記録物から要約した介入内容、介入に対する参加者や関係者の反応や変化、回答者の語り、観察内容は質的帰納的分析をした。

研究実践者と本研究者の位置づけ

研究実践者は、コアメンバーとしてプロジェクトに関与した。本研究者は、研究実践者としてプロジェクトに参加し、研究のデータ収集・分析を中心に行った。

研究の信頼性・妥当性

Mixed Method を用いてデータの信用性を確保し、研究結果の他地域への波及可能性を検討した。データ分析結果は研究実践者間及び研究者2人以上により確認し、研究の全過程にわたりスーパーバイザーの指導を受けた。

倫理的配慮

北海道医療大学および札幌南青州病院の倫理審査会の承認を得た。研究参加者に対し口頭と文書にて、研究目的・方法、自由参加、プライバシー保護の説明と同意を得た。研究参加住民には、守秘の誓約を課した。療養者・家族の心身の負担を避けるため、研究者によるモニタリングを行った。

〈結果〉

１．システムの運用プロセス

都市・郊外地域同時に運用を開始し、都市地域では2年6か月で在宅がん療養者の生活支援に住民が参加して7Stepに達した。郊外地域では、住民の啓発(Step3)に進んだ段階でStepを変更し、支援者の組織化(Step5)を省いた。郊外地域では支援の実施はなかった。

Step1：コアメンバー招集・Step2：仕組みづくり計画

両エリアともに、地域のキーパーソンである1名の訪問看護師と協議してコアメンバー5~6名を決めた。都市地域では、医師を含んだ医療職5名がコアメンバーとなり、住民による在宅がん療養者の生活支援の仕組みを検討した。郊外地域では、医療職に限定しない6名が集まり、計画について町役場に助言を求めた。

Step3：一般住民の啓発

都市地域では、在宅療養の啓発のための講演会を計画し、医師会・看護協会・社会福祉協議会等の後援を得た上で、マスコミを活用して広く住民に参加を呼びかけた。講演会に135名が参加した。医師が在宅医療の実際と互酬性の価値、他県の先駆者が在宅がん療養者への住民参加型生活支援の体験談を話した。

郊外地域では、町内 2 地区に出向くアウトリーチ型にて在宅療養と互酬性の価値に関する学習会を開き、25 名が参加した。2 地区の非参加住民から行政不参加の活動に批判が寄せられ、啓発活動を中止した。

Step４：支援者養成

都市地域では、活動可能な 20 名を選定し、支援者養成講習を開講した。プログラム内容は、がん療養者のケアの目標、住民による支援の意義、医学的知識、遺族の体験談や在宅ケア場面の映像、コミュニケーション演習を含めた。

郊外地域では、他の支援者養成講習修了者を対象に、在宅がん療養者の生活支援に関する講習を追加し、15 名が参加した。内容は、がん療養者のケアの目標、在宅医療、在宅療養者が利用できる制度等であった。

Step５：支援者グループの組織化

都市地域では、養成講習受講者 16 名によるグループをつくった。各自が役割を持ち、定期的にミーティングを開いた。活動の目標や情報の共有を目的としたジャーナルを定期発行した。

Step６：支援のコーディネート

都市地域では、コーディネーターを配置した。研究期間中に支援の依頼が 9 件あり、2 件が利用に結びついた。１件は依頼 10 日後に家具の移動の支援を実施した。2 件目の依頼内容は、家族不在時の見守り、部屋の片づけ、買い物等であり、依頼 3 日後から 4 日間 5 名の支援者が入った。依頼後支援に結び付かなかった理由は、急な依頼で支援者が見つからなかった、支援前に療養者が死亡した、利用を迷ったまま療養者が死亡したなどであった。

郊外地域では、NPO 法人等の既存のコーディネート機能を活用することとした。

Step７：活動継続

都市地域では、直接的支援がない状況が続いたことで、支援者の活動に対するモチベーションの低下が懸念されたため、直接的な支援に限らない活動を工夫した。

２．システムの運用プロセスの評価

一般住民への啓発のための講習会を行った結果、受講者の在宅療養の肯定的価値観と在宅がん療養者への生活支援の期待が高まり、躊躇が減った。また、支援者を養成するための講習前後の自記式調査によると、講習後にはがん療養者への支援の躊躇が小さくなった。「急変が不安」は講習後も残った。講習後のインタビューでは、受講者は「遺族等の体験談による活動のイメージ化と動機づけ」「療養者・家族を支える効力感の獲得」「チームとクリニックのバックアップの安心感」を得ていた。

郊外地域では、支援者の講習を行った前後の躊躇・期待などに変化がなかった。

実際に住民による支援を受けた在宅がん療養者の前後評価では、生活満足度、QOL 指標の「自己コントロール感覚」「自分らしさ」「支えられている」が高まった。療養者・支援者ともに、支援の場で相互が相手の役に立つ感覚を認識し、喜びを表現した。

３．修正版在宅がん療養者の住民参加型生活支援システムの提案

修正版システムでは、7 つの Step をさらに「計画」「養成」「組織化」「実施」の４の STAGE に分け、

STAGE1 計画

Step1　地域のキーパーソンに呼びかけ、目的を共有できるアクションメンバーを参集

Step2　医療提供を保証したコミュニティから承認された仕組みの考案

STAGE2 養成

Step3　専門的・先駆的な活動をしている人材を活かして、広く住民に在宅療養・互酬性の価値を啓発

Step4　在宅がん療養者を支援できる人を選定して養成・プログラム化した養成方法

STAGE3 組織化

Step5　支援者個々が役割認識をもって情報共有と話し合いができる組織構築

STGAE4 実施

Step6　終末期療養者のニーズに合ったタイムリーな支援の実施・医療者と連携した支援

Step7　支援のモチベーション維持と活動の継続

の内容を盛り込んだ。

〈考察〉

住民参加につながる在宅がん療養者の生活支援システムの活用として、地域に根付いた人脈と手軽に届く情報を活用すること、住民の躊躇を除くトレーニングと芽生えたモチベーションを保持すること、互酬性の価値に対する理解の浸透をはかること、思いを活かした即対応のコーディネートをすること、地域住民の価値観や互助の力に合わせて Step を調整することが重要である。

在宅療養者支援の住民グループがなく、人口規模の大きな都市では、在宅がん療養者を支えたいと願う住民を集めてグループを組織することが可能であり、「計画」「支援者養成」「組織化」「支援実施」の順ですすめる。在宅療養者を支援する住民グループがありかつ小規模人口の地域は、行政のバックアップを得ながら、既存のグループを支援者として活用することを検討し、「計画」「支援者養成」「支援実施」で進めることを提案する。

〈結論〉

本システムは、人口規模と住民の互助活動の状況に応じて進めることにより他地域でも応用可能だと考える。今後は、他の市町村において本システムを用いた在宅がん療養者の生活支援に住民が参加できるよう検証をする。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5269　号	竹生　礼子
論文審査担当者	主　査　　緒方　泰子 副　査　　本田　彰子　　山﨑　智子	

（論文審査の要旨）

少子高齢化を背景に、住み慣れた地域で自分らしい暮らしを最期まで続けられるよう、地域包括ケアシステムが構築され、地域住民の互助に大きな期待が寄せられている。しかしこれまで、地域住民が、がん患者とその家族を支援した例は少なく、また、互助の様相の地域における違いに着目して取り組まれた事例はない。

申請者は、在宅がん療養者の住民参加型生活支援システム（Community Resident Participating of Livelihood Support System：CPL-CCP System）を運用、評価し、修正版 CPL-CCP System を提案することを目的にアクションリサーチを行った。

対象地域は、人口や、人々の互助の様相の違い等から、都市部、郊外の 2 地域とした。研究参加者は、都市部では、住民（119 名、うち支援者 20 名）・在宅がん療養者 2 名・家族 2 名・訪問看護師 2 名、郊外では、住民（支援者）15 名であった。支援者とは、実際にボランティアとして在宅がん療養者宅を訪問し、がん療養者のニーズ応じた活動をする者である。

研究は、①CPL-CCP system 素案の作成、②2 地域での CPL-CCP system（Step1～7）の実施、③実施中及び一部終了後の評価、④CPL-CCP system の修正、といった 4 つのフェイズで行われた（研究期間：2012 年 12 月～2015 年 6 月）。

分析については、活動記録、会議録、自記式調査票、半構成的インタビュー、Focus group interview、実施中・終了後の質問紙調査等から得られたデータを用いた Mixed Method が用いられた。データの信頼性・妥当性を高めるため、研究参加者間での相互確認、研究者 2 人以上によるコード・カテゴリの確認、研究の全過程への研究方法・分析に卓越したスーパーバイザーによる指導を受けた。介入内容・評価結果にもとづきシステムを修正した。

CPL-CCP system を実施しながら、同時に評価を行った。Step1 (コアメンバー参集)：都市では、コアメンバー全員が共通目標をもって活動開始したが、郊外では、目的や価値観が多様で、意見統一やメンバー間の良好な関係性保持に多くの時間を要した。Step 2(仕組みづくり計画)：都市ではシステム素案に沿って進められたが、郊外では、メンバーに医師が含まれず、行政主催の活動でもなかったため、住民の信頼を得られる仕組みとするのが困難であった。Step 3(一般住民の啓発)：都市では、市民講座受講後に、在宅療養に対する肯定的価値観、在宅がん療養者の生活支援を住民が行うことに対する期待・躊躇に有意な変化が認められた。郊外では本研究へ不参加の住民（2 地区とも）から町内会への批判が示され啓発活動を中止した。Step 4(支援者養成講習の開講)：都市では、受講前後で、(a)在宅がん療養者が生活支援を住民から受けることへの「躊躇」が減った。 (b)療養者への生活支援を住民が提供することへの「躊躇」は少なくなった。郊外では、

全項目で変化がなかった。Step 5(支援者グループの組織化)：都市で効果的だった活動は「遺族や先駆者の体験談・在宅医療場面の見学により、在宅のがんや終末期療養者の生活を支援がイメージできた」「がんの療養者を支援するために必要な知識や支援技術の継続的な学習をした」等であった。在宅がん療養者の生活支援は「療養者・家族が何を支援者に依頼したらよいのか理解しておらず、ニーズがあがらない」等があり、「メンバーの体験の共有」「活動内容・支援内容の療養者への周知」「コーディネータ機能の強化」等が解決策として出された。Step 6(支援のコーディネート)：都市では、依頼 9 件中支援につながった 2 件の支援前・中・後のインタビュー内容及び参加観察より、(1)支援を受け入れることで支援者に対して信頼が生まれ、(2)無償への気兼ねがお礼の気持ちに変わり、(3)療養者・家族が支援を喜ぶことは支援者の喜びとなり、支援を受け入れることで支援者の役に立つことは療養者の喜びとなったことが確認された。活動継続意欲は、全体的に高かった。Step 7(活動継続)：都市では、支援者グループが組織され活動を継続できる段階に入ったが、支援者のモチベーション維持が必要であった。郊外では、支援者のグループ化はせず、学習会を継続し、既存グループを活用して在宅がん療養者の生活支援ができる住民養成を目指すこととした。

本研究は、住民による支援を実現するシステムを構築することによって、支援者と支援を受ける側（在宅がん療養者・家族）に起こる変化（影響）を確認できた貴重な研究である。また、地域性を考慮した取り組みが必要であることが示されており、今後、住民間の互助に基づく仕組みの構築に重要な示唆を示している。

論文審査では、複雑な研究の過程を明快に分かりやすくプレゼンテーションがなされ、質疑応答では、研究の限界や今後の展開等について適切に解答がなされた。審査全般を通じて、申請者が、高い専門性と調整力、忍耐力、実践力を有し、本研究の全てのプロセスに丁寧に取り組み、論文としてまとめたことが確認された。また、申請者がこの分野における十分な知識・実践を有すること、研究者としての十分な資質を有することが確認された。

以上より、申請者は、博士（看護学）の学位授与に値すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	村田　洋章
論文審査担当者	主査　齋藤　やよい 副査　田中　真琴　　三浦　英恵
論　文　題　目	What prevents critically ill patients with respiratory failure from using noninvasive positive pressure ventilation: A mixed-methods study

（論文内容の要旨）

＜結言＞

気管挿管や気管切開せずにマスクを用いて換気補助を行う非侵襲的陽圧換気療法(Noninvasive positive pressure ventilation:NPPV)は、「人工呼吸器関連肺炎罹患率/気管挿管率/死亡率/入院費用」を有意に減少する呼吸療法である。また、気管挿管と比べ侵襲が少なく導入が容易で、鎮静剤を必要としない場合も多いため言語的なコミュニケーションを取る事や、時には飲食が可能な呼吸療法である。

一方、NPPV はマスク・ベルトによる圧迫感や不快感など解消困難な継続阻害要因も多く、NPPV を継続するには患者の理解と協力を必要とする。また、NPPV では治療効果が得られず、結果的に気管挿管へ移行する患者も存在する点において、不確実性のある呼吸療法でもある。以上のように、NPPV はメリットがある一方、継続阻害要因が多く・不確実性もあるため、生活行動や心理面を側で支援する看護師の役割は重要と言える。その為、NPPV のメリットを最大限生かし、NPPV を断念することなく出来る限り継続できるように支援することが求められる。その一方、急性期領域で NPPV から挿管へ移行する患者(挿管移行者)は、8～40%台であり、その中でも、48 時間以上 NPPV を施行した後に挿管へ移行した者の死亡率は早期挿管移行者に比べ、約 10 倍高くなることが分かっている。その為、NPPV 施行患者のうち必要時には早期挿管へ繋げる必要がある。しかし、数多くある要因のうち具体的にどの要因に着目し介入したら NPPV 継続や早期挿管へ繋げることが出来るのか実態は明らかで無く、看護師が経験的な判断で様々な要因をアセスメントしているのが現状である。

そこで本研究では、NPPV 施行患者が必要時には早期挿管へ繋げられ、挿管の必要が無ければ断念することなく継続できるよう、患者の認識を含めた導入初期における継続阻害要因及び促進要因の明示と共に、必要な看護支援の提案を目的とした。

＜対象と方法＞

NPPV 継続阻害要因の抽出は、以下の順次的混合研究デザインを用いて抽出した。

まず、インタビューで NPPV 施行患者の体験をデータ収集し質的に分析。次に、質的研究結果の中から NPPV の継続阻害要因と考えられる体験(認識／意欲)を含め、診療録より量的にデータ収

集し統計学的分析により要因を提示した。

研究対象者は、全 1075 床(内 ICU:20 床)を有する大学附属病院の ICU において、急性呼吸不全で NPPV を行った患者を対象とした。

データ収集及び分析方法は、NPPV 施行患者の体験過程をインタビュー調査でデータ収集し、質的な分析で明示。その後、NPPV 施行患者の診療録を対象に後ろ向きにデータ収集した。データ収集項目は、患者属性やICU入室時及び入室中の対象者の経時的身体状態(導入～12時間)、ICU滞在日数、NPPV 施行時間や経時的看護記録からもデータ収集した。特に経時的看護記録中の記載からは、インタビューデータの分析で明らかになった NPPV 中の体験に着目し、記録中にその記述があれば「1」、なければ「0」というように 2 値を割り振った(以下、フラグ化とする)。このフラグ化は、「NPPV 装着直後」「～装着後 2 時間以内」と 2 時間毎に経時的に行った。本研究において NPPV 断念者は、「挿管が必要となった者：Intubation group」及び「NPPV 継続を拒否し継続断念に至った非挿管者：NPPV abandonment group」と定義した。また、診療録調査により収集した量的データは、ロジスティック回帰分析並びに決定木分析を用いることにより継続阻害要因を明示した。

<u>＜結果＞</u>

1. インタビュー調査では、9 名へインタビューを実施した。その内訳は、男性 6 名、女性 3 名、平均年齢 61.9±14 歳、NPPV 平均施行時間 27.3±19.8 時間、NPPV 離脱後からインタビューするまでの平均経過日数は 9.8±12.9 日であった。分析の結果、36 個のコードから 26 個のサブカテゴリおよび 24 個のカテゴリが生成され、さらに 8 側面である「マスクに伴う不快(圧迫感・閉塞感)」「圧・流量に伴う不快」「不快感や幻覚に伴う不眠」「NPPV をイメージできず戸惑う」「呼吸が徐々に楽になる」「必要性を自覚する」「サポートにより不安や不快感が緩和する」「NPPV 継続の為の自己の取り組み」へと集約された。つまり質的研究では、NPPV 中に患者が感じている不快感や戸惑い、そしてそれらに対する自己の取り組みが明らかになった。
2. 診療録調査では、126 名の診療録を対象に分析を行った。その際、質的研究で明らかとなった体験の、「マスクに伴う不快(圧迫感や閉塞感)」「圧や流量に伴う不快」「呼吸困難：呼吸が楽になる」「不眠感」「NPPV の必要性の自覚」に着目しフラグ化も行った。対象者の内訳としては、男性 84 名、女性 42 名、平均年齢 68.7±14.7 歳、NPPV 平均施行時間 34.1±45.3 時間であった。また、「Intubation group」は 25 名、「NPPV abandonment group」は 26 名、「NPPV を完遂した者:Success group」は 75 名であった。「Intubation group」「NPPV abandonment group」「Success group」の 3 群間で有意差のあった項目は、重症度スコア(APACHE-Ⅱ)、ICU 在室日数、導入直後の PF ratio($PaO_2 \div FiO_2$)、導入 3 時間前後の PF ratio、NPPV 中の譫妄出現者、「呼吸が楽になる」、「マスクに伴う不快(圧迫感・閉塞感)」「不眠」であった。
   1) ロジスティック回帰分析からは、Intubation group への移行要因として、「APACHE-Ⅱ(OR:1.11,P＝0.04)」、「呼吸が楽になる（OR:0.27, P＝0.046）」、「導入 3 時間前後の PF ratio（OR:0.98, P＝0.002）」が関連要因であった。NPPV abandonment group

の要因として、「不眠(OR:72.3, P＜0.000)」、「せん妄（OR:1.62, P＝0.013）」、「マスクに伴う不快感：圧迫感や閉塞感（OR:4.38,P＝0.04）」、「導入 3 時間前後の PF ratio（OR:1.01, P＝0.025）」が継続阻害要因であった。

2) 決定木分析(CART)結果においてもロジスティック回帰分析とほぼ同様の要因が選択された。その中でも、Intubation group への移行要因として、APACHE-Ⅱは本分析では要因と抽出されなかったが、「NPPV の必要性の自覚」に関しては、有効な移行要因の一つとして抽出された。また、NPPV abandonment group の要因においても、「NPPV の必要性の自覚」は、有効な移行要因の一つとして抽出された。

＜考案＞

以上の結果を踏まえると、臨床的に有用で看護師として着目するべき NPPV 継続阻害要因は、「PF ratio」、「呼吸困難」「NPPV 必要性の自覚」「不眠」「せん妄」「マスクに伴う不快：圧迫感や閉塞感」であることが分かった。また、本研究結果で得られた継続阻害要因への看護支援に関して、以下に考察する。

「呼吸困難の有無の把握」は、ベッドサイドでタイムリーに知り得ることのできる指標の一つである。ICU では動脈ラインが挿入されており、安易に血液ガス分析を行う傾向にあるが、分析結果の 79%が予測範囲内であることや、分析頻度を減らしても死亡率に影響しないとされている。そのため看護師は、もっと積極的に判断指標の 1 つとして活用するべきである。ただし、Visual analogue scale(VAS)や numeric rating scale(NRS)を活用し患者の認識を客観的・経時的に把握かつ記載していくことが看護師にとって重要である。

「NPPV 必要性の自覚」を促す看護支援としては、「嗽や排痰などで一時的に NPPV を外した際に少しでも呼吸困難が出現したさい重要性を強調する」ことや、「呼吸器であり NPPV が無理であれば気管挿管の可能性を医師と共に伝える」こと等が考えられる。

「睡眠状態の改善」を促す看護支援に関しては、まず主観的睡眠感を VAS 形式で簡便な The Richards-Campbell Sleep Questionnaire を用いることで客観的な睡眠状態の把握が可能である。次に不眠を引き起こす一因と考えられる、「マスクや圧・流量による不快感」に対して軽減できるように可能な限り看護支援していく必要がある。1 案として、比較的安価で熟眠感にも寄与するとされる耳栓の使用を考慮しても良いのかもしれない。

ICU におけるせん妄予防法として、「早期離床」「環境調整」が提言されている。早期離床に関しては、患者の状況にもよるが気管挿管患者よりも、NPPV 施行患者の方がはるかに離床を行いやすく NPPV のメリット 1 つであり、積極的に行っていく必要がある。

「マスクに伴う不快：圧迫感や閉塞感」を軽減する看護支援としては、医療者からの説明により必要性を理解し自覚を促すことで NPPV への納得が生まれ、不快ながらも装着意欲を支えてくれる源になるのではないかと考えられる。そのため、タイミングを見計らい適宜、必要性を説明していくことが重要である。

以上より、NPPV 施行患者が必要時には早期挿管へ繋げられ、挿管の必要が無ければ断念することなく継続できるよう、優先的に着眼するべき要因が明示化され、より効率的・効果的な看護実践に繋げることのできる視点を提案することが出来たと考える。

＜結論＞

NPPV 導入後、生理学的および客観的な指標である「PF raito」や、「せん妄」に集中するのではなく、患者の認識である「呼吸困難」「不眠感」「マスクに伴う不快感」「必要性の自覚」へも同様に着目し看護介入することで、NPPV 継続の促進、あるいは必要時には早期挿管へ効率よく繋げられることが明らかになった。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5270　号	村田　洋章
論文審査担当者	主　査　齋藤　やよい 副　査　田中　真琴　　三浦　英恵	

（論文審査の要旨）

非侵襲的陽圧換気療法(NPPV)は人工呼吸器関連肺炎罹患率を有意に減少させ、侵襲が少なく鎮静剤を必要としない場合も多いため言語的なコミュニケーションや飲食が可能になるなど QOL を維持する呼吸療法として施行されている。しかし、その一方で継続阻害要因も多く、治療効果が得られず、結果的に気管挿管へ移行する患者も存在する点で、不確実性のある呼吸療法とも言われる。

そこで申請者は施行患者が必要時には早期挿管に繋げられ、挿管の必要がなければ断念することなく継続できるよう、患者の認識を含めた導入初期における継続阻害要因及び促進要因を明らかにし、必要な看護支援を提案することを目的として、研究を行った。

方法は順次的混合研究デザインを用い、まずインタビューで 9 名（男性 6 名、女性 3 名、平均年齢 61.9±13.9 歳、NPPV 平均施行時間 27.3±19.8 時間）の NPPV 施行の体験(認識／意欲)を質的に分析し、次に 126 名（男性 84 名、女性 42 名、平均年齢 68.7±14.7 歳、NPPV 平均施行時間 34.1±45.3 時間）の診療録から収集した量的データをロジスティック回帰分析並びに決定木分析により継続阻害要因を提示した。量的データには患者属性や経時的な身体状態に加え、インタビューデータで明らかにした体験をフラグ化して収集した。

その結果、NPPV 中に感じた不快感や戸惑い、それらに対する自己の取り組みからは 36 個のコード、26 個のサブカテゴリおよび 24 個のカテゴリが生成され、 [マスクに伴う不快(圧迫感・閉塞感)][圧・流量に伴う不快][不快感や幻覚に伴う不眠][NPPV をイメージできず戸惑う][呼吸が徐々に楽になる][必要性を自覚する][サポートにより不安や不快感が緩和する][NPPV 継続の為の自己の取り組み]の 8 側面へ集約された。また、診療録調査では、「挿管移行群」25 名、「NPPV 断念群」26 名、「NPPV 継続成功群」75 名に分類して比較したが、3 群間で有意差のあった項目は、重症度スコア(APACHE-Ⅱ)、ICU 在室日数、導入直後の PF ratio、導入 3 時間前後の PF ratio、NPPV 中の譫妄出現、「呼吸が楽になる」「マスクに伴う不快(圧迫感・閉塞感)」「不眠」であった。また挿管移行には「APACHE-Ⅱ」「呼吸が楽になる」「導入 3 時間前後の PF ratio」が、断念には「不眠」「せん妄」「マスクに伴う不快感」「導入 3 時間前後の PF ratio」が関連し、「NPPV の必要性の自覚」は挿管移行と断念に共通する関連要因であることを明らかにした。

以上より、医学的指標のみならず、「呼吸困難」「不眠感」「マスクに伴う不快感」「必要性の自覚」といった患者の認識に看護介入することが、NPPV 継続の促進、あるいは必要時には早期挿管へ効率よく繋げられると結論づけた。

NPPV は人工呼吸管理と並ぶ呼吸管理の一様式として定着し、医学的指標を中心とした量的研

究により有効性は検証されている一方で、重症例や不快感の継続や患者の非協力により断念せざるを得ない場合も少なくない。申請者は医学的な指標に加え、これまで医学的に説明できなかった患者の主観的体験に注目して看護学の視点から継続断念要因を明らかにしており、看護学研究としての意義は高い。また、患者の主観的体験に関わる看護援助について具体的に提案し、NPPVのみならず、本研究の成果はさまざまな医療処置を受け入れセルフケアを促進する看護活動にも発展可能であり、新たな看護援助の在り方を示した研究として高く評価できる。

論文審査では、明確なプレゼンテーションが行なわれ、混合研究デザイン、分析方法、結果の解釈、結果の普遍性、研究の限界などの質問に的確な回答が得られ、この分野における十分な知識を有することが確認できた。

以上より、申請者は博士（看護学）の学位授与に値すると判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山中　源治
論文審査担当者	主査　齋藤　やよい 副査　佐々木　吉子　　近藤　暁子　　田中　真琴
論　文　題　目	在宅療養に移行する植込型補助人工心臓患者および主介護者の体験と看護支援の検討

（論文内容の要旨）

Ⅰ.はじめに

心臓ドナーの出現が少ない日本では補助人工心臓（Ventricular Assist Device：以下 VAD）は心臓移植までの橋渡しとして欠かせない。近年、植込型 VAD が登場し、これまで困難とされてきた退院が可能になり QOL の向上が期待されている。一方で、約半数の患者が植込型 VAD 装着後 360 日以内に何らかの合併症を経験し、退院後も突然クリティカルな状況に陥るリスクをはらんでいる。そのため、患者は在宅療養移行後も苦悩、葛藤を抱え生活していると考えられる。また、VAD 患者をサポートする家族、とくに主介護者には 24 時間の患者サポートが求められるため、生活や QOL に多大な影響を与えると考えられる。

そこで本研究では、VAD 患者と主介護者の主観的体験と QOL に注目し、在宅療養移行期から退院後に抱える問題や苦悩・葛藤、健康関連 QOL の推移および患者－主介護者の相互作用を明らかにする。さらに、これらを踏まえ VAD 患者と介護者の在宅療養に関する看護支援を検討する事を目的とする。

Ⅱ.研究デザイン

患者と主介護者の質的データと量的データを並行して収集･分析する Mixed Method を用いる。本研究では質的データを主として、量的データを補完的に扱う。

Ⅲ.研究方法

1. 質的調査

1）対象

2012 年 10 月から 2015 年 10 月までの期間に A 大学病院で VAD 植込術を受けた患者（以下、新規装着患者）と、既に在宅療養を経験している患者（以下、退院経験患者）を対象とする。

さらに、同上期間に VAD 植込術を受けた患者の主介護者（以下、新規装着主介護者）および既に退院を経験している VAD 患者の主介護者（以下、退院経験主介護者）を対象とする。

2）調査方法および調査内容

ⅰ.面接調査：患者・主介護者それぞれに半構造的面接を行った。患者には在宅療養に関する思いや体験、困難感などを、主介護者には VAD 患者と共に生活する上での思いや体験、困難感などを面接調査した。新規装着患者・主介護者には、初回退院前後、その後 6 ヶ月、12 ヶ月の時期に

数回面接を実施した。退院経験患者・主介護者には、外来または再入院時に複数回の面接を目指し実施した。面接内容は対象者の許可を得て録音しデータはすべて逐語化した。

ⅱ.診療録調査：対象者の年齢、性別、家族形態などの属性、合併症の有無と種類、病態と経過などについて情報を得た。

3）分析手順

対象者各々の記述的データについて質的内容分析を行った。個人分析と全体分析から、QOL に影響する体験と相互作用の側面について、サブカテゴリー、カテゴリーを導出し、テーマとしてまとめた。

2. 量的調査

1）対象

2012 年 10 月から 2015 年 10 月までの期間に A 大学病院で治療・手術を受け、在宅療養に移行した植込型 VAD 患者。

また、同上期間に A 大学病院で治療・手術を受けた VAD 患者の主介護者を対象とした。

2）調査方法および調査内容

ⅰ.質問紙調査：質問紙は健康関連 QOL 尺度の SF-36v2™（以下、SF36）を使用した。①初回退院直前（以下、PDC）をベースラインとして、②初回退院後 1～2 ヶ月（以下、DC1M）、③初回退院後 6 ヶ月（以下、DC6M）、④初回退院後 12 ヶ月（以下、DC12M）に実施した。

ⅱ.診療録調査：年齢、性別、家族構成、主介護者以外の協力者の有無、就業（就学）の有無、合併症・後遺症の有無、再入院の有無などの情報を診療録から得た。

3）分析手順

ノンパラメトリックの一元配置分散分析の Kruskal-Wallis Test および Bonferroni 調整を行った。有意水準は p 値＜0.05 とした。統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics 20 を用いた。

Ⅳ.倫理的配慮

本研究は、対象患者の治療施設の倫理委員会から承認を得て実施した。対象候補者には研究の趣旨を文面で説明し、自由意思による研究参加と中断の自由、データの守秘を保証した。調査によって対象者の心身に危険が及ぶ可能性がある情報を得たときは、VAD チームに連絡し連携を取りながら研究を進めた。

Ⅴ.結果

1. 植込型 VAD 患者の初回退院後 12 ヶ月までの体験と QOL

1）質的調査結果

ⅰ.対象者・面接調査概要：新規装着患者は 7 名を対象とし面接時間合計 601 分、面接回数合計 25 回であった。退院経験患者は 6 名を対象とし面接時間合計 304 分、面接回数合計 10 回であった。

ⅱ.植込型 VAD 患者の QOL に影響する体験（以下、テーマ：「」）：本研究対象患者は、術前重症度が高く VAD 植込術後も期待していた程度に体力が回復せず「身体機能の限界」を感じ、在宅療養に移行することに不安と不満を抱えていた。また「医療機器管理の責務」に緊張し、さらに「コントロールできない合併症」に苦悩していた。退院後は在宅療養移行期から引き続く課題の他に、新たな現実的問題に直面し「フラストレーションが蓄積」していた。初回退院後 6～

12ヵ月ごろには身体機能や体力と折り合いをつけた生活が送れるようになるが、術前の期待とは裏腹に「社会との調整に難渋し」、社会的役割を獲得できず苦悩する者がいた。

2）量的調査結果

ⅰ.対象者：対象者はVAD患者19名で、初回退院後12ヶ月を経過した者は14名であった。

ⅱ.健康関連QOLの経時的変化：退院直前PDC、初回退院後DC1M、DC6M、DC12Mの各時期間におけるSF36コンポーネントサマリースコア（以下、CS得点）および下位尺度得点の多重比較では、いずれも有意差は認めなかった。

3）質的調査と量的調査結果の解釈的統合

VAD患者は体力の不足や合併症の問題を抱えており、身体CS得点は全体を通して低水準で推移していた。また、在宅療養後は新たな課題に直面し苦悩・葛藤やフラストレーションが蓄積していた。しかし、精神CS得点は経時的に有意な低下は認められなかった。社会生活に関する苦悩は、退院後に経験するものが多く、社会役割CS得点は個人差がありばらつきがあった。

2.主介護者のVAD患者初回退院後12ヶ月までの体験とQOL

1）質的調査結果

ⅰ.対象者・面接調査概要：新規装着主介護者は7名を対象とし面接時間合計350分、面接回数合計20回であった。退院経験主介護者は6名を対象とし面接時間合計201分、面接回数合計13回であった。

ⅱ.主介護者のQOLに影響する体験（以下、テーマ：「」）：主介護者の主観的体験から、自身の身体的・精神的問題よりも「脆弱性が残る患者」の体調や「責任を担う機器管理」、自分だけに「一点集中する介護」の負担によって、QOLは左右されていた。特に、患者退院後は自分の時間、休息、健康など「自己を犠牲」にして患者の安全・安楽を確保していた。そのため、生活や「社会的役割の変化に苦悩」しており、中には心身への負担や疲労が蓄積し、身体症状が出現する者がいた。

2）量的調査結果

ⅰ.対象者：対象者は主介護者10名で、初回退院後12ヶ月を経過した者は6名であった。

ⅱ.健康関連QOLの経時的変化：CS得点と下位尺度得点に関して、患者退院直前PDC、初回退院後DC1M、DC6M、DC12Mの各時期間で多重比較を行ったが、有意な差は認められなかった。

3）質的調査と量的調査の解釈的統合

主介護者の身体的QOLは患者退院後6ヶ月になると患者の状況次第で個人差がでるが、身体CS得点は経過を通してみると高水準で推移していた。また患者退院後は、患者の状態や合併症および機器管理等に対する不安の他に、社会的生活の変化や経済的な苦悩を抱えるが、精神CS得点の低下には繋がらなかった。主介護者は長期間にわたり社会的役割の変化に苦悩しており、社会役割CS得点は低水準で推移していた。

3. VAD患者と主介護者との相互作用の様相

患者データと主介護者データから導出された互いの働きかけや影響に関するカテゴリー、サブカテゴリーを照合し、家族関係の調和を軸として相互作用の様相を捉えた結果、概念的に相互作用を表す5のテーマ（以下、「」）が導出された。質的データから患者の自立度と主介護者の介護負担度が相互作用に影響し合う様相が明らかになった。

VAD 患者と主介護者が苦悩・葛藤を伴う生活変化や社会役割の変化に順応するには、互いに「生活変化への“バランスを取り合う”」事が重要であり、相互の関係性が鍵であった。互いの生活が大きく変化しないように「不都合を“気遣い合う”」余裕があるときには家族関係は調和を維持し、両者ともに「VAD があっても“気にならなく”」なり生活への順応を実感する。一方で、合併症やそれに伴う後遺症で、患者が主介護者に依存することが増える、または主介護者が介護を重荷に感じ始めると、バランスを維持できなくなり「互いの生活を負に“刺激し合う”」。さらなる患者の自立度低下と介護者の負担度増大は、「互いの生活を“おびやかし”」、家族関係の悪化を招くことが危惧される。

Ⅵ.考察

植込型 VAD 治療は、生命予後の観点や最大限の内科的治療との比較から QOL が向上する事が認知されている。しかし、在宅療養移行後の主観的体験と QOL との関係は検討されていなかった。本研究結果では、在宅療養に移行する VAD 患者の主観的な QOL への欲求は退院しただけでは満たされず、健康関連 QOL でも著しい向上は認めなかった。また主介護者は介護の負担のみならず社会生活や社会役割の変化に苦悩していた。

患者・主介護者が術前に期待した生活と術後の現実にギャップを認識すると、QOL や生活変化への適応が阻害される。植込型 VAD 治療は退院を前提としているため、術前から、命をつなぐためだけでなく、VAD の選択がどのように社会生活・人生に影響するかを患者と家族が理解できるよう関わる必要がある。本研究結果をもとに、看護師が VAD 患者の辿る軌跡や生活の変化、家族が担う具体的な役割を術前に情報提供・教育する事で、VAD 在宅療養における課題の予期および生活変化の適応促進に繋げる事が期待できる。さらに、VAD 医療の当事者は患者だけでなく主介護者も含まれることを意識し、家族システムとして変化やストレスに対応可能な能力が備わっているか構造的かつ機能的にアセスメントする必要がある。家族アセスメントをもとに主介護者にも寄り添ったケアをすることは患者・家族の QOL や well-being 向上の一助となると考える。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5271　号	山中　源治
論文審査担当者	主査　齋藤　やよい 副査　佐々木　吉子　　近藤　暁子　　田中　真琴	

（論文審査の要旨）

植込型 VAD（補助人工心臓）は、心臓移植数の少ない日本で、重症心不全患者の在宅療養への移行を可能にし、QOL の向上も期待できることから、心臓移植までの橋渡しとして用いられている。しかしその一方で、合併症の頻度やクリティカルな状況に陥るリスクが高いため、患者は退院後も苦悩や葛藤を抱えながら日常生活を送ることになり、サポートする家族にも多大な影響を及ぼす等の問題がある。

そこで申請者は、VAD 患者と主介護者の主観的体験と QOL に注目し、在宅療養移行期から退院後に抱える問題や苦悩・葛藤、健康関連 QOL の推移、患者―主介護者の相互作用を明らかにすることを目的に研究を行った。

方法は混合研究デザインを用い、VAD 患者 13 名の半構造的面接による質的データを主とし、患者 19 名、主介護者 10 名の健康関連 QOL 尺度 SF-36v2・属性・診療記録からの量的データを補完的に扱いながら分析した。面接時期は、初回退院前後、退院 6 ヶ月後、退院 12 か月後の 3 時点とし、量的研究では QOL の 3 側面（身体、精神、社会役割）の推移を測定した。

その結果、QOL に影響する体験からは、8 つのテーマが抽出され、「身体機能の限界」を感じ、「医療機器管理の責務」に緊張しながら、「コントロールできない合併症」や「フラストレーションが蓄積」する状況を体験した。そして身体機能や体力と折り合いをつけながら生活するようになっても、「社会との調整に難渋」し、社会的役割を獲得できず苦悩する実態が明らかになった。また介護者の体験からは、「社会的役割変化への苦悩」や「想像を超える自己犠牲」など 8 つのテーマが導かれた。

また、量的研究の健康関連 QOL は、国民標準値と比して、患者では身体得点と社会役割得点は低く、精神得点は高く推移し、また介護者では社会役割得点は低く、身体得点と精神得点は高く推移したが、いずれも統計学的に有意な変化はみられなかった。さらに、患者と介護者の相互作用については、患者の自立度と主介護者の介護負担が相互に影響しあう様相を構造化し、互いに「生活変化へのバランスを取り合う」ことが重要であり、相互の関係性が鍵となることを明らかにした。

以上より申請者は、在宅療養に移行した後も VAD 患者は身体機能の限界や合併症予防の課題を残し、社会との調整に苦悩し、主介護者は自己を犠牲にして苦悩を抱えながらケアする体験と、複雑な課題を抱える者同士が何とかバランスをとりあいながら生活を送っている実態を明らかにした。さらにこれらの結果から、術前から在宅療養を見据えた情報提供と患者・家族教育の必要性や、患者を中心とした家族アセスメントを充実した看護支援について提案した。

日本で植込型 VAD による治療を行う施設は限られており、QOL 向上を報告する文献はあるものの、その裏にある患者や家族の主観的体験を報告した文献は少ない。特に、患者や家族がさまざまな困難を抱え、必死に自助努力をしている実態は十分に明らかにされてこなかった。このような背景から、申請者は修士論文から発展継続して本論文をまとめ、臨床の場では表面化しにくい患者や家族の苦悩や葛藤といったネガティブな体験に注目したが、本論文の成果はこの点からも新奇性が高く、得難い貴重なデータを着実に積み重ねたことも高く評価できる。また申請者は全国の VAD 看護をリードする VAD 専任看護師として活躍しており、実践に深く根付いた臨床研究としても高く評価できる。

論文審査では、明確なプレゼンテーションが行なわれ、混合研究デザイン、分析方法、結果の解釈、結果の普遍性、研究の限界、今後の課題と発展などの質問に的確な回答が得られ、この分野における十分な知識と実践力を有することが確認できた。

以上より、申請者は博士（看護学）の学位授与に値すると判定した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	齋藤　真希
論文審査担当者	主査　近藤　暁子 副査　大久保　功子　　深堀　浩樹
論　文　題　目	Use of Traditional Birth Practices by Chinese Women in the United States

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

グローバリゼーションで国境を越えた人の移動が増え、母国外で医療を受けたり出産したりする機会が増している。医療従事者はますます多様な集団に対してケアを行なうことになるため、母国外で出産する女性が文化的な問題にどのように対処しているのかについて、十分に理解する必要がある。

中国には妊娠・出産に関する特有の慣習があるが、中国系女性の慣習に関する研究は散在する程度である。そこで本研究は、カリフォルニア州に住む国外生まれの中国系女性が慣習とアメリカ合衆国（以下、アメリカ）での妊娠・出産にどのように対応しているのかを探求することを目的とした。

＜対象と方法＞

研究対象： 中国、台湾、香港出身の英語を話す女性で、アメリカでの出産を予定している妊娠後期以降の女性、もしくは、5 年以内にアメリカで出産した女性を研究対象とした。研究実施地域のいくつかの大学に研究について掲示し参加者を募集した。Facebook において、台湾出身の母親たちによる地域のグループにも掲示し研究参加者を募集した。また、スノーボールサンプリングにより、研究に協力してくれる女性を紹介してもらった。

データ収集：13 名の女性に半構造化面接を実施し、5 名の女性に追加面接を実施した。面接はすべて英語で実施した。面接は IC レコーダーで録音し、逐語録を作成した。データは 2015 年 2 月～6 月に収集した。

データ分析：J. Corbin と A. Strauss(2007)のグラウンデッド・セオリー・アプローチを用い、継続比較して分析した。概念を明確にするためにデータは行ごとにコード化した。コードからカテゴリーをつくり、カテゴリー同士の関係性を検討して概念を作った。作成した概念モデルは、追加面接により複数の対象者と共有し発展させた。

＜結果＞

対象者の年齢の中央値は 35 歳（28-45 歳）で、出身国は台湾（10 名）、香港（2 名）、中国（1 名）であった。アメリカ入国から本研究の対象事例となった出産までの期間は、2 か月から 15 年であった。初産婦が 9 名で、経産婦（4 名）のうち 3 名は以前出産した国もアメリカであった。

中国系女性には、妊娠や出産に関する多数の慣習があった。妊娠中には、自分自身や胎児に害が及ぶのを避けるため、悪いことが起こると信じられていること（例えば、はさみやナイフを使用したり、バナナを食べたりすると流産する）を避けるべきとされていた。また、体を冷やさないために、長袖を着る必要があった。出産に望ましい日にちと時間があると信じられていた。「坐月子」と呼ばれる出産後１か月は、中国系女性にとって非常に重要な時期で、女性は基本的に自宅で寝て過ごし、産後の健康を促進する漢方を用いた伝統的な食事を食べることになっていた。体を冷やさないために冷たいものを飲んだり、水に触れたりすることも避ける必要があった。その後の健康に影響をおよぼしうる活動（例えば、児を抱くと腰痛を引き起こす）を控えることが求められていた。

中国系女性は、これらの慣習を考慮すべきものととらえてはいたが、慣習に単に従っているわけではなかった。妊娠する前には慣習の詳細について必ずしも知っているわけではなく、妊娠してから慣習を学びつつ、慣習に従うべきかを決めていた。中国系女性はさまざまな方法で慣習を吟味し、中国の伝統的な考え方についての評価とアメリカの考え方についての評価を統合することで、自分自身の独自の考え方を確立していた。中国系女性は、慣習それぞれについて別個に評価した結果、慣習に従う、部分的に従う、従ったふりをする、従わない、と行動には幅があった。女性の考え方の幅は、アメリカでの滞在期間などとは関係せず、それぞれ異なっていた。

自分自身の考え方を確立するプロセスでは、いくつかの要素を考慮していた。それらの要素には、「慣習に納得するか」「快適さ」「利用可能な選択肢」「年上の女性からのプレッシャー」「仲間の経験」「自身の過去の経験」「一時的な試行」があった。

慣習に納得するか

女性は慣習が納得できるものかを考え、根底にある理由づけを探していた。理由づけがみつけられないと、女性は慣習に従わなかったり、親世代の前でのみ慣習に従っているふりをしていた。また、伝統的な理由づけについて理解はできても、その理由づけが現代社会にそぐわないと考えることもあった。

快適さ

快適さも考慮し、例えば産後１か月シャワーを避けるという慣習については、慣習より快適さを優先することがあった。快適さは天候や季節の影響を受け、体を冷やさないために長袖を着るという慣習は、従いづらいと感じられることがあった。

利用可能な選択肢

自国とアメリカでは利用可能な選択肢が異なるため、女性は選択可能な選択肢から最善のものを選んでいた。自国では近年、産後ケアセンターの利用が増えているが、アメリカでは限られた都市にしかないため利用できなかった。その代わり、ナニー（家事および育児の手伝いをする人）を利用し、産後の継続的なサポートを受けていた。

年上の女性からのプレッシャー

女性は慣習について学ぶなかで、年上の女性（特に母親や義母）とは考え方が異なることを認識していた。親世代の方が慣習を重視し、より厳格な考え方を持っていることが多かった。そのことが、自分自身の態度を決める上でも影響していた。アメリカで出産する女性にとっては、自国にいる親世代から離れているため、プレッシャーが少ないとも感じていた。しかし、離れてい

ても慣習に従っていないことが知られると、責められることもあった。プレッシャーを感じつつも親世代からの支援には感謝し、親世代が自分のためを思って慣習に従うように言っていると認識していた。そのため、親世代を失望させないために、親世代が言ったことを拒まないようにすることもあった。

仲間の経験

仲間の経験に基づく情報を信頼し、自国での出産体験の情報よりアメリカでの出産体験の情報を重視していた。アメリカにいる友達、ワークショップ、ネットワークグループなどから慣習についての情報や、慣習に対してどう対応したかについての情報を得て、自分自身の考え方を確立していた。自国の親しい友達の情報よりもネット上の知らない誰かの情報を信頼し、自分自身で考え方を決めることができると自信につなげていた。その一方で、アメリカで出産した人が自国の慣習に従っているというネット上の記事を見つけると、プレッシャーに感じることもあった。

自身の過去の経験

自身の過去の経験が、慣習に対する考え方の確立に影響していた。前回の出産時に慣習に従った結果、うまくいったと思った場合、慣習により価値をおくようになっていた。前回の出産時に慣習に完全には従わず、その後に身体の不調を生じた場合、その不調は慣習に従わなかったために生じたと考えていた。そういった経験により、新たな考え方を確立していた。

一時的な試行

自分自身のやり方を確立する過程で、それまでの考え方と異なるやり方を一時的に試してみることもあった。例えば、児に洋服を着せ過ぎて発熱を起こす傾向があると小児科医に言われた女性は、児の洋服を減らしてみた。それがうまくいくと、それまで疑っていた考え方を受け入れるようになっていた。

＜考案＞

本研究では、慣習に対して独自の考え方を確立するプロセスに関連した要因を明らかにした。独自の考え方の確立に関与する要因の中で、親世代からのプレッシャーは大きな影響を与えていた。これは、慣習に従う主な理由は自身や親世代への敬意だとする先行研究と同様の結果であった。近年では自国においても、慣習に対する柔軟な対応も見られてきている。本研究でも同様に、女性の考え方はそれぞれ異なり、非常に伝統的な考え方から非常にアメリカ的な考え方まで、大きく幅があった。本研究では、中国系女性は習慣を重視しつつも、それぞれの慣習に対して、人それぞれ独自の考え方を確立していることを示した。このように、中国系の女性全体に共有されている、ある特定の考え方が存在するのではないと言える。

本研究の限界は、対象者数が少ないこと、対象者すべてが英語を話し、面接は英語で行なったことである。データ収集は中国系の人口が比較的多いカリフォルニア州で行なったため、中国系の人口が少ない地域の女性は異なる経験をしている可能性がある。

医療従事者は、慣習についての中国系女性の考え方に理解をしめす必要がある。それぞれの女性が異なる考え方を持つことを考えると、画一的（ステレオタイプ）な対応ではなく個人の考え方を探索し、女性自身の考え方の確立を援助することが重要である。また、女性が母親や義母と異なる考え方を持っている場合、女性が親世代との対立に対処し自分自身の決断ができるように、親世代へも介入することが役立つ可能性がある。加えて、親世代も慣習に対してそれぞれ独自の

考えを持っていることを認識する必要がある。さらに、専門職として正確な情報を提供し、非専門的な情報源からの不正確な情報を修正することが求められる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5272　号	齋藤　真希

論文審査担当者	主　査　近藤　暁子 副　査　大久保　功子　　深堀　浩樹

（論文審査の要旨）

世界で人々の行き来が容易になり、グローバリゼーションということで、異文化を持つ対象への看護が重要性を増してきている。我が国においても、移民は周産期の若い世代が多く、母国外で出産する女性が母国と居住国での文化の違いにどのように対応しているのか理解する必要がる。そこで申請者は、中国では周産期の女性の生活において特有な慣習があり、国外でもこの慣習を継続していることに注目し、米国カリフォルニア州において国外生まれの中国系女性が米国での妊娠･出産にどのように対応しているのかを明らかにすることを目的として研究を実施した。

方法はグランデッド・セオリーアプローチを用いた、質的記述的研究で、米国に住む中国（香港・台湾も含む）生まれの中国人女性で、米国で出産を予定している妊娠後期以降の女性もしくは過去5年以内に米国で出産した経験のある女性13名を対象として半構造的インタビューを実施した。対象者の募集にはいくつかの大学およびFacebookでの掲示、スノーボールサンプリングを使用した。

その結果、中国には伝統的に妊娠・出産に関する様々な習慣があったが、研究対象者は妊娠前に必ずしもこのような習慣を知っていたわけではなく、妊娠中に学び、米国での視点と合わせて考え、各習慣について実行するかどうか決めていた。つまり、習慣に従う、部分的に従う、従ったふりをする、従わないであった。図1は中国と米国での視点を各自評価し、それぞれどの程度重要視するか判断して双方を融合した視点を各対象者は形成していたことを示している。

対象者は自分自身の統合された視点を確立するまでに、いくつかの要素を考慮していた。つまり、「習慣に納得するか」「快適さ」「利用可能な選択肢」「年上の女性からのプレッシャー」「仲間の経験」「自身の過去の経験」「一時的な試行」であった。「習慣に納得するか」はその習慣が理にかなっているかどうか批判的に考え、納得できない場合は従わない、あるいは従うふりをしていた。「快適さ」はその習慣に従わないほうが快適な場合は、伝統よりも快適さを優先していた。「利用可能な選択肢」は自国と米国では利用できる施設などが異なるため、利用可能な資源から最も良い方法を選択していた。「年上の女性からのプレッシャー」は実母や義母は多くの場合伝統的信条を強く持っており、これが自分の方法を決める最も大きな影響要因の一つであった。「仲間の経験」は母国の友人や家族よりも米国で出産経験のある面識のない女性の情報を頼りにし、その経験から伝統について判断していた。「自身の過去の経験」は自分が前回の妊娠・出産で伝統にしたがってうまくいった場合は伝統を重んじ、伝統に従わなくてうまくいかなかった場合はその原因は伝統に従わなかったからだと思っていた。「一時的な試行」は米国の医師に中国の伝統的な方法に従わないほうが良いとアドバイスされ、最初はそれを疑っていたが、

試しに米国での方法をやってみてうまくいった場合は、新しい方法を受け入れていた。

以上のような結果から申請者は、すべての女性は伝統的信条に影響されていたが、伝統に対する見方は個々で大きく異なり、中国人の集団として画一的な見方はするべきではないということを示唆した。つまり、医療従事者は中国の伝統にしたがうというステレオタイプで判断するのではなく、対象者個々の視点や価値観をもとに伝統をどのようにうけ入れるか・受け入れないのかについてサポートするべきである。また、実母や義母から伝統にしたがうようなプレッシャーを受けている可能性もあり、親世代への教育的介入も必要ではないかと述べている。そして、伝統を重んじる心情を尊重しつつも、非専門的な情報を修正し、正確な情報を提供する必要性を述べている。

研究の限界として、カリフォルニア州に住む英語を話す中国系の女性に対象を絞ったため、外国生まれで中国語のみ話す女性や中国系の人口が少ない他の地域に住む女性は異なる経験をしていた可能性があることを述べている。

論文審査では、明確なプレゼンテーションが行われ、審査員からの質問にも的確に返答し、今後の課題なども述べることができた。米国における中国人女性を対象として研究ではあるが、日本における中国人を対象とした看護においても相違点を踏まえつつ適用できることも述べられた。

以上のように、研究の限界も理解したうえで、分析結果に基づき看護ケアへの具体的な示唆があり、博士論文として高く評価できるものであると言える。

最終試験の結果の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　　号	齋藤　真希
論文審査担当者	主　査　近藤　暁子 副　査　大久保　功子　　深堀　浩樹 公開審査　：　平成 29 年 1 月 19 日	

（最終試験の結果の要旨）

副　査　大久保　功子

グローバリゼーションによって増加しつつある母国外での出産に対する対応が、医療・看護における重要な課題となっている。そこで申請者は、その課題に看護として貢献するために、米国の中国（台湾・香港・中国：以下中国）系移民女性に着目して、母国の慣習と母国外での妊娠・出産にどのように対応しているかを探求した。研究デザインには、Corbin,J.&Strauss,A.のグランデッド・セオリー・アプローチを用い、中国系の女性13名を対象として半構造化面接にてデータを収集し、分析し、結果を導いた。中国系女性は、出身国の産育習俗、すなわち妊娠中は胎児に害となる行動を忌避する、妊娠中体を冷やさない、風水による出産に適した日時、産後1ヶ月の安静（坐月子）、伝統的な産後食、産後に体を冷やさない（水に触れない、シャワーをしない、エアコンを使わない）、新生児には1枚多めに服を着せる等といった伝統的な考え方と出産する国での考え方の間で、納得するか否か、快適さ、利用可能な選択肢、年長者からのプレッシャー、仲間の経験、自身の経験、試行からの影響を受け、評価・統合して自分自身の独自の考え方を持つに至り、慣習に従う、従わない、部分的に従う、慣習に従ったふりをすることが明らかとなった。したがって、看護実践への示唆としては、中国系女性の産育習俗を理解している必要ある一方で、ステレオタイプで対応するのではなく、独自の考えに至る過程に即した個別の対応が必要である。また、その支援には、親世代も含めて信頼のおける情報提供をしていく必要があるとしていた。

研究の背景、方法、結果、考察と展望について明確なプレゼンテーションがなされた。質疑応答では、データ収集方法によるサンプルバイアスと、本研究結果の転用可能性に関して質問をした。申請者が実際に用いた方法と内容、現在有している当該領域に関する知見を的確に説明し、今後の課題についても言及することができた。したがって、研究方法に関する知識、当該領域に関する専門知識を十分に有していることが認められた。

本研究が、母国外で出産する女性の支援を促進するより一般的な知見を構築するという新規的な切り口の研究の一部であり、既に米国で出産した日本人に関する研究が進行中であることなどから、この領域に取り組む強い意志が伺え、今後の研究の発展が期待できる。

以上より、申請者が当該領域における専門的な知識と、看護研究に関する十分な学識を有することが確認でき、博士（看護学）の学位を授与するに値すると判断した。

副　査　深堀　浩樹

申請者は、グローバル化が進行するなか、医療・看護における重要な課題となっている母国外での出産に対する看護・医療職の支援に貢献するために、米国で増加しているというアジア系移民の中でも中国系の移民女性（台湾・香港・中国）に着目して、彼女たちが母国の慣習と母国外での妊娠・出産にどのように対応しているかを探求した。中国系の女性13名を対象として半構造化面接にてデータを収集し、グラウンデッド・セオリー・アプローチにより分析した。結果として従来の研究では、母国外で出産する女性は母国の慣習に従うとされていたのに対して、本研究で対象となった中国系女性は、出身国の伝統的な考え方と出産する国の考え方を評価・統合し、慣習やケアごとに自分自身の独自の考え方に至り、慣習に部分的に従ったり、慣習に従ったふりをするなどしていることが明らかとなった。

プレゼンテーションでは、研究の背景、方法、結果、考察について明確に説明された。質疑応答では、異文化における出産についての研究動向についての質問を行い、その回答から申請者が中国系女性のみならず広く母国外の出産における研究動向を把握した上で本研究に取り組んだことが確認できた。また、研究方法論に関連して、英語を母語としない対象者と調査者により調査が行われたことの影響やその影響への対応などについて質問を行い、用いた方法論に準拠して適切な回答が得られた。さらに、本研究から得られた実践への示唆として、個々の妊婦が独自の考え方に至ることを支援するために、医療職として信頼のおける情報提供を行う必要性やその前提として個々の妊婦が慣習に対して異なる考え方をもつことを理解しておくことが重要であることを明確に述べた。

また、プレゼンテーションの最後では、申請者の今後の展望として、現在すでに取り組んでいる米国で出産する日本人に関する研究や日本で出産する外国人に関する研究などから、母国外で出産する女性の支援を促進するより一般的な知見を構築して行きたいという意志が述べられ、今後の研究の発展が期待された。

以上より、本研究は、母国外の出産の支援につながる新規性のある知見を創出したものと認められ、申請者のプレゼンテーション・質疑応答から申請者は十分な学識を有するものと認められる。申請者を博士(看護学)にふさわしいものと判定する。

主　査　近藤　暁子

申請者は中国では周産期の女性の生活において特有な慣習があり、国外でもこの慣習を継続しているため、看護ケア時に考慮が必要であること、さらに我が国において出産する外国人では中国出身の女性が最も多いことについて論文に書かれていない内容も補足し、この研究の意義を説明した。研究結果から、すべての女性は伝統的信条に影響されていたが、伝統に対する見方は米国での視点と融合され、どの程度伝統を重視するかは個々で大きく異なり、中国人の集団として画一的な見方はするべきではないということを示唆した。

具体的には、１．伝統的慣習に対する女性の見方に注意を払う、２．各伝統的慣習に対して、各女性が違う見方を持っていることを考慮する、３．各女性が中国の伝統と米国での方法についてどのように対応するか考えを決めるサポートを行う、４．専門職として、正確で信頼できる情

報提供を行う、５．年配の女性と違う視点を持っていて対立している可能性があり、健康教育を行う場合は、実母や義母などと一緒に行うことで、対立を緩和したり、女性がどのような視点を持つか決定するサポートを行う、６．年配の女性も特定の伝統に対していろいろな見方を持っている可能性があるので、実母や義母などの考えも確認する必要がある、というもので、看護実践に具体的に活用可能な内容が示唆されている。

今回は米国在住の女性を対象とした研究であるが、基本的には日本に住む中国人にも適用可能であり、相違点としては米国と日本での社会資源の違いがあるので、日本での社会資源を活用してサポートする必要性が説明された。

外国人に対しては異文化を理解して看護する必要性については多く述べられているが、その国の典型的な文化や慣習を理解するのみならず、個別性を重視することの重要性、特に外国で出産する中国人女性に対し具体的にどのような点で個別性を考慮すればよいのか示した新規性のある論文である。方法論的なバイアスや研究の限界、今後の研究課題についても明確に回答することができ、この分野における十分な知識を有し、研究者としての資質を有することが確認された。

以上より副査２名と協議の上、博士（看護学）学位授与に値すると判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	揃田　陽子
論文審査担当者	主査　沢辺　元司 副査　窪田　哲朗　　笹野　哲郎
論　文　題　目	Pancreatic cysts in general population on ultrasonography: Prevalence and development of risk score

（論文内容の要旨）

【背景】

膵嚢胞性病変は検診超音波検査においてしばしば指摘されるが、その有病率は 0.2 - 44.7 %と報告により大きく異なる。膵嚢胞性病変に関わる因子としては、過去に高齢、胆嚢腺筋腫症が報告されている。膵嚢胞性病変の有病率については、過去に入院や外来における患者を対象として主に報告がされているが、一般集団における検討はなされていない。膵嚢胞性病変は腺癌の併存との関連が指摘されているばかりでなく、将来膵癌を発症する危険因子としても知られているため、経過観察と精査を必要とする。

超音波検査は低侵襲でコストも安価であり、簡便な事から一般検診において膵臓を含む腹部臓器のスクリーニング検査に広く用いられている。しかしながら、消化管ガスや肥満における脂肪の影響で膵全体を描出することはしばしば困難であり、精査、経過観察が必要な膵嚢胞性病変を膵描出不良例においては見逃しが生じる可能性がある。そのため膵描出不良例において、膵嚢胞性病変の高リスク群は CT や MRI など、他モダリティーにおける精査を検討する必要がある。

本研究の目的は、多数例の検診集団を用いて、一般人口における膵嚢胞性病変の有病率と膵嚢胞性病変の存在と関連する因子を明らかにし、膵嚢胞性病変の存在を予測するモデルを確立することである。

【対象】

対象は東京大学医学部附属病院検診部にて 2007 年 12 月から 2013 年 12 月までに一般検診として腹部超音波検査を施行された受診者とし、検査は一晩の絶食下で施行された。

消化管ガスや脂肪の影響で膵臓が全く描出されない受診者は対象から除外した。胆摘後、胆嚢描出不良症例、膵手術後症例も除外対象とした。当研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

【統計解析】

年齢、性別、BMI、体脂肪率、肝外胆管径、脂肪肝の有無（肝腎コントラストの有無）、胆嚢ポリープ、胆嚢結石、胆嚢腺筋腫症の有無を対象項目とし、膵嚢胞性病変の存在との関連を検討

するため、単変量及び多変量解析を行った。単変量解析としてカイ二乗検定、多変量解析としてロジスティック回帰分析を用いてオッズ比と 95%信頼区間を求めた。

膵嚢胞性病変の存在を予測するスコアリングシステムの確立にはスプリットサンプルメソッドを用いた。対象を無作為に training sample と testing sample の二群に分け、training sample におけるロジスティック解析分析により得られた最終モデルにおける β 係数を元にそれぞれの因子に点数を割り当て、その和を Pancreatic cyst (p-cyst)スコアとした。

Training sample を用いて作成したスコアの有効性を、testing sample を用いて検討した。有効性の評価には ROC 解析により得られた AUROC を用い、カットオフ値の算定には Youden's test を用いた。

【結果】

受診者背景

2007 年 12 月から 2013 年 12 月までに腹部超音波検査を施行された検診受診者は 5901 例であった。胆嚢を評価できなかった 244 例、膵描出不良 457 例、膵手術後の 2 例を除外して 5198 例を解析対象とした。

全対象患者の平均年齢は 57.1 歳、男性患者割合は 50.1% (2602/5198 人)であり、膵嚢胞性病変の有病率は 3.50% (182/5198 人)であった。膵嚢胞性病変の平均のサイズは 7.07mm であり、胆嚢ポリープ、胆嚢結石、胆嚢腺筋症、肝腎コントラストは各々1077 人 (20.7 %) 、331 人 (6.37 %) 、197 人 (3.79 %) 、1674 人 (32.5%)に認めた。肝外胆管径の平均は 4.7mm であった。主膵管 3mm 以上の拡張は 29 例 (0.56 %) に認め、膵嚢胞性病変のある群では 6.59 %に 3mm 以上の主膵管拡張が認められた。

膵嚢胞の存在と予測因子

単変量解析において、膵嚢胞性病変の有病率は、高齢、女性、胆嚢腺筋腫症あり、肝腎コントラスト陰性群において有意に高く、多変量解析では膵嚢胞性病変の有病率は高齢、女性、胆嚢腺筋腫症あり群で有意に高かった。

膵嚢胞の存在予測のスコアリングシステム

被験者を<u>無作為に</u> training sample と testing sample の二群に分割した。
Training sample を用いたロジスティック回帰分析において、高齢、女性、胆嚢腺筋腫症あり、肝腎コントラストなしが膵嚢胞性病変と有意に関連した。最終モデルにおける β 係数に基づいて各々の項目にスコアを割り当て、各スコアの和を p-cyst score とした。P-cyst score の有効性を testing sample で検証した。膵嚢胞性病変の検出率は 0 点から 5 点まででそれぞれ、0 %, 1.02 %, 2.37 %, 4.64 %, 11.1 %, 33.0 %であった。P-cyst スコアの膵嚢胞検出の有効性の検討のために ROC 解析を行った。AUROC は 0.711(0.662-0.760)であった。カットオフを 2.5 とし (Youden's index) 、その際の感度は 0.77、特異度は 0.54、正診率は 0.55 だった。CT や MRI など、他モダリティーで精査が行われた症例に限って検討を行っても AUROC は 0.727(0.671-0.783)と全症例で解析した際と同様の結果を得られた。

【考察】

本研究では一般集団における膵嚢胞性病変の有病率とその関連因子について大規模健常集団で検討した。本研究における一般集団における膵嚢胞の検出率は 3.5%であった。既報における膵嚢胞性病変の有病率は 0.21-44.7%と報告により様々であるが、ほとんどが外来、入院患者を対象とし、一般集団を対象としたものではない。今回の検討対象は検診の受診者であり、一般集団を反映したものになっていると考えられる。

De Jong らは検診における膵嚢胞有病率を MRI 検査を用いて検討しているが、この検討における膵嚢胞の有病率は 2.4%であり、我々の報告より低い。この報告における対象集団の平均年齢は 51.1 歳であり、本研究より 6 歳若かった。過去の報告、本研究ともに膵嚢胞の有病率は加齢と共に優位に増加することが指摘されており、本研究との有病率の差違の原因と考えられる。

本研究において、膵嚢胞の有病率は女性、胆嚢腺筋腫症を有する群、肝腎コントラスト陰性群において有意に高かったが、過去にも分枝型膵管内乳頭粘液腫が胆嚢腺筋症の有無と関連するとの報告がある。性差については過去のほとんどの報告において、膵嚢胞の有病率と性別は関連がないとされるが、本邦からの報告で、膵嚢胞の有病率が女性において高いとする報告も存在する。肝腎コントラストと膵嚢胞の関連については過去に報告がなく、本研究においても肝腎コントラストとの関連は他の項目と比べるとやや弱かった。性差と肝腎コントラストと膵嚢胞の関連については今後更なる検討が必要と考える。

P-cyst score はシンプルなパラメーター（年齢、性別、胆嚢腺筋腫症の有無、肝腎コントラストの有無）で構成され、膵嚢胞の存在を予測するスコアリングシステムとして高い有用性を示した。膵嚢胞の検出に関して MRI は超音波検査より高い感度を示すことが報告されるが、高価であり一般検診には適さないため超音波検査が検診では広く用いられている。超音波検査は消化管ガスや皮下脂肪で視野が限られるため、膵臓全体を描出することができない例が存在する。これらの要因は繰り返し検診を受けても改善されるものではなく、膵描出不良例においては膵臓が確認されないまま、長期間にわたり病変が放置される可能性がある。膵嚢胞性病変は前癌病変となることもあり、また悪性病変の併存を示唆する間接所見でもあるため、精査や経過観察が必要とされる。今回の集団で膵嚢胞の指摘された 182 人のうち、2 人は実際に膵癌を発症した。膵臓が描出できない集団に対して今回の p-cyst score を用いれば精査を勧める一助になる。今回 p-cyst score5 点の集団では膵嚢胞の有病率は 33%であり、このスコアにおいて、検診で最も重要な指標の一つである、陰性的中率は 0.982 にのぼった。

本研究においては、超音波で膵嚢胞性病変と指摘された病変に対してゴールドスタンダードとなる検査が行われておらず確定診断に至っていない症例も存在する。しかし、大半の症例で他のモダリティーでの精査が行われており、確診に至った症例に限って評価しても p-cyst score の有効性は全症例で検討した際と、同様の成績を示した。本研究にて確率立されたこのスコアにより、超音波における膵描出不良例における高リスク群を囲い込み精査を検討する根拠になりうることは意義深いと考える。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5273　号	揃田　陽子
論文審査担当者	主　査　　沢辺　元司 副　査　　窪田　哲朗　　笹野　哲郎	

（論文審査の要旨）

膵嚢胞は腫瘍性と非腫瘍性に分かれるが、初期の膵癌の一部は膵管から発生し、膵癌症例で膵嚢胞を高率に合併することから、非腫瘍性膵嚢胞の少なくとも一部は膵癌に進展すると考えられている。膵癌は全ての悪性腫瘍の中で最も予後の悪い腫瘍であるが、頻度が低く、また特異性が高く安価な検査がないことから現在のスクリーニング、早期診断には限界がある。そこで膵癌に高率に合併する膵嚢胞を前癌病変、リスクとみなすと、膵嚢胞の検出が膵癌のスクリーニングに有用である。一方、膵嚢胞に関しては患者を対象とした研究はいくつか報告があるものの、一般集団を対象とした研究がなく、その頻度や合併する病態については全く知られていない。

本研究は超音波検査を用いて一般集団における膵嚢胞の頻度、合併因子を解析することを目的とした。対象は健康診断者の中で胆嚢摘出症例、膵描出不良症例などの 703 例を除く 5,198 例である。平均年齢は 57 歳、男女比は 1 である。膵嚢胞の有病率は 3.5%であった。胆嚢ポリープ、胆嚢結石、胆嚢腺筋症、肝腎コントラスト、主膵管径、肝外胆管径と腎嚢胞の有無の関連を検討したところ、高齢、女性、胆嚢腺筋症、肝腎コントラストなしが膵嚢胞のリスクであった。多重ロジスティック解析分析では高齢、女性、胆嚢腺筋症がリスクとなっていた。また高齢、女性、胆嚢腺筋症、肝腎コントラストなしを変数としてスコアシステムを構築したところ、AUROC=0.71、感度 0.77、特異度 0.54、正診率 0.55 であった。

本研究は膵嚢胞を一般集団で解析した最初の報告であり、高齢、女性、胆嚢腺筋症との密接な関連を明らかにした。今後、他集団での検討、前向き検討で本研究結果を再検証される必要があるが、膵癌のスクリーニングに新たな視点を与えるユニークで注目すべき研究である。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	佐藤　恵美
論文審査担当者	主査　窪田　哲朗 副査　沢辺　元司，戸塚　実
論　文　題　目	Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein

（論文内容の要旨）

【背景】

血清アミロイド A (SAA)は主に肝臓で生成される急性期反応蛋白であり、肥満やメタボリックシンドローム、2 型糖尿病、関節リウマチなどの慢性炎症性疾患でも上昇することが知られている。しかし、SAA の生理学的な機能に関してはほとんど報告がない。SAA は HDL と結合した状態で血中を循環しており、SAA の N 末端の α ヘリックス構造が脂質結合に重要とされている。

HDL には抗酸化能、コレステロール引き抜き能、血管内皮修復能、抗血栓作用、抗炎症能などの抗動脈硬化作用がある。アポリポ蛋白 A-I (apoA-I)は HDL の主要な構成蛋白であり、動脈硬化進展抑制の中心的な働きをしていると考えられている。

急性炎症時、SAA は IL-1、IL-6、TNFα によって誘導される。その結果、基準範囲(8 μg/mL 未満)の 1000 倍にも上昇し、apoA-I と置き換わることによって HDL と結合することが報告されている。一方、apoA-I から通常の HDL が生成されるのと同様に、SAA は肝臓で ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)を介して SAA 含有 HDL (SAA-HDL)として産生されるという報告もある。急性炎症時、SAA が HDL 中の apoA-I と置き換わることはすでに報告されているが、多くの研究はマウス由来の SAA および HDL を使用している。ヒト由来のものを使用した実験もあるが、再構成 SAA-HDL 作製後、HDL と結合していない free SAA を除去していないなどの問題点がある。また、SAA の結合による HDL の機能変化についても詳細は不明である。

本研究では、再構成 SAA-HDL や高 SAA 患者血清から精製した HDL を用いて、炎症時の SAA による HDL の構造的な変化を評価し、それに付随する抗酸化能の変化について検討した。

【材料と方法】

<u>血液サンプル</u>

患者血清は東京大学医学部附属病院から得た。患者は血清 SAA 値によって 3 グループに分類した：Low (SAA ≦ 8 μg/mL, n = 11)、Middle (8 < SAA ≦ 100 μg/mL, n = 10)、High (SAA > 100 μg/mL, n = 20)。正常血清は東京医科歯科大学の健常人ボランティアから得た。この研究は東京大学医学部倫理委員会、東京医科歯科大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

<u>リポ蛋白分離</u>

LDL (1.006-1.063 g/mL)や HDL (1.063-1.210 g/mL)は超遠心法によって分離し、抗酸化能試験用は-80°C、その他の実験用は 4°C で保存した。

再構成 SAA-HDL の作製

急性炎症時を想定し、健常人血清から精製した HDL に最終濃度が HDL-コレステロール(HDL-Cho) 25 mg/dL、SAA 1 mg/mL になるように recombinant human SAA (rhSAA)を混和した。60 分間のインキュベーション後、結合していない free SAA を除くため、1.210 g/mL の比重で再超遠心した。

電気泳動とウェスタンブロット

リポ蛋白フラクションはアガロースゲル電気泳動を行い、Fat red 7B で染色した。ウェスタンブロットは SDS-PAGE、及び非変性ゲル電気泳動を行った後、それぞれの特異抗体を用いて apoA-I および SAA を検出した。

抗酸化能

蛋白濃度 50 μg/mL の LDL を 1 μM $CuSO_4$ で酸化する際に、各種抗酸化物(5 μg/mL apoA-I および rhSAA, または 50 μg/mL HDL)を添加し、生成する共役ジエンを 234 nm でモニタリングした。抗酸化能は、共役ジエン形成の遅延時間(lag time)と最大速度(Vmax)を、LDL 単独時の値を 1 としたときの比で評価した。

SAA と apoA-I、蛋白、脂質測定

SAA はラテックス凝集比濁法、apoA-I は免疫比濁法によって測定した。総蛋白(TP)は Lowry 法、総コレステロール(TC)、トリグリセライド(TG)、リン脂質(PL)は酵素法を用いた。

【結果】

rhSAA による HDL remodeling

急性炎症時に相当する濃度で rhSAA と HDL を混和、インキュベーションし、超遠心分離した。上層の HDL fraction と下層の protein fraction を SDS-PAGE、非変性ゲル電気泳動で分析した。SDS-PAGE では rhSAA とインキュベーションした HDL に 11.7 kDa の rhSAA のバンドを確認できた。遊離 apoA-I と rhSAA は下層に確認できたが、apoA-I の量は rhSAA 処理したもので明らかに多かった。このことから、apoA-I が rhSAA と置き換わったことが確認された。非変性ゲル電気泳動では、SAA 添加による粒子サイズ、apoA-I 分布に差はみられなかったが、rhSAA は小粒子の HDL3（HDL3c: 7.2-7.8 nm）付近にシャープなバンドが確認された。

様々な SAA 濃度の患者 HDL の性質

患者 HDL の総重量あたりの Cho は、Low SAA 群と比較して High SAA 群で有意に低かった($P < 0.05$)。総 HDL 蛋白あたりの SAA は Low SAA 群と比較して、High SAA 群で有意に高かったが($P < 0.001$)、apoA-I の割合は Middle SAA 群と比較して、High SAA 群で有意に低かった($P < 0.05$)。アガロースゲル電気泳動では、High SAA 群の HDL 移動度が Low SAA 群と比較して小さく、HDL の移動度が SAA 値と反比例の関係にあることが分かった。非変性ゲル電気泳動で HDL の粒子サイズを比較した。血清 SAA 値に関わらず、Low SAA 群でも High SAA 群でも様々な大きさの HDL 粒子を確認することができ、HDL2 と HDL3 の割合も異なっていた。一方、SAA

は High SAA 群の大きな HDL 粒子で確認することができ、in vitro の再構成 SAA-HDL とは異なる結果が得られた。Middle SAA 群の患者 HDL でも同様の結果が得られた。

HDL の抗酸化能

SAA および apoA-I がそれぞれ単独で LDL の酸化に及ぼす影響を比較したところ、lag time 比は apoA-I で 1.22±0.02、rhSAA で 1.33±0.05 と延長が認められ($P < 0.05$)、Vmax 比は apoA-I で 0.86±0.02、rhSAA で 0.79±0.03 と低下が認められた($P < 0.05$)。次に、normal HDL と再構成 SAA-HDL で比較したところ、lag time 比は normal HDL で 1.46±0.27、SAA-HDL で 1.83±0.20 と延長が($P < 0.05$)、Vmax 比では normal HDL で 0.66±0.09、SAA-HDL で 0.54±0.15 と低下の傾向が確認された。最後に患者 HDL で比較したところ、lag time 比は SAA Low、Middle、High の順に 1.24±0.06、1.25±0.06、1.36±0.14 となり($P < 0.05$)、Vmax 比はそれぞれ 1.18±0.08、1.11±0.15、1.06±0.08 と低下した($P < 0.01$)。HDL-Cho 濃度はそれぞれ 51.8±24.0、40.6±21.5、40.3±12.5 であった。また、血清 SAA 値と lag time 比には相関が認められた($r = 0.554$、$n = 41$、$P < 0.001$)。

【考察】

今回、HDL 粒子における apoA-I と SAA の置換を in vitro で確認したが、HDL 粒子のサイズに大きな変化は見られなかった。これは HDL に結合した SAA の量が少なかったためであると考えられる。実際、再構成 SAA-HDL 内には apoA-I の約 17%しか SAA が含まれておらず、これは高度炎症ではなく慢性炎症時に相当する。

対照的に、高炎症群の患者では、様々なパターンの HDL remodeling が見られた。High SAA 群の血清 SAA 値は 170-3490 μg/mL と広く、HDL に含まれている SAA の割合も様々であった。In vitro の結果から、HDL 総蛋白に対する apoA-I の割合が High SAA 群で低いのは SAA が apoA-I と置き換わっているためだと考えられる。さらに、患者 HDL は SAA 濃度が高くなるにつれて Cho の割合が減少したが、これは SAA が apoA-I と置換し、apoA-I により活性化される Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT)活性が減弱したことによる lipid core の CE の減少による可能性が示唆される。

アガロースゲル電気泳動では、SAA 濃度が上昇するにしたがって HDL の移動度が減少した。これは HDL に結合している SAA の等電点（pI 6.1）が apoA-I の等電点（pI 5.75）より高いことが影響していると考えられる。HDL における SAA の分布を非変性ゲル電気泳動で調べると、in vitro では SAA は小さな再構成 HDL として確認されたが、患者 HDL では SAA は HDL2 にも HDL3 にも確認することができた。これは SAA が小さな HDL3 に結合したのち、HDL2 と同様のサイズまで大きくなるため、また一部の SAA 含有 HDL、特に小さな粒子は異化されやすいためと考えられる。High SAA 群の SAA-HDL はほとんどが 8.0 nm より大きかった。SAA は apoA-I と同様、ABCA1 を介して HDL を形成することから考えると、患者 HDL は normal HDL のように原始 SAA-HDL として生成され、様々なサイズに代謝されていく可能性が示唆される。すなわち、血中で SAA によって apoA-I が置き換わって生成される SAA-HDL は少ない可能性が考えられる。

rhSAA と apoA-I で抗酸化能を比較すると、rhSAA は apoA-I と比較して lag time が 9%、Vmax

が 8%上昇した。さらに、再構成 SAA-HDL も normal HDL と比較して lag time が 25%、Vmax が 18%上昇した。同様に High SAA 群の患者 HDL でも lag time が延長したことから抗酸化能が上昇したと考えられる。また、血清 SAA 濃度は lag time 比と相関していた。一般的に、炎症時は SAA-HDL の異化が亢進するため、HDL-Cho 濃度は低下する。今回、High SAA 群の HDL-Cho 濃度は Low SAA 群と比較して 22%も低下していた。一方、High SAA 群の HDL の抗酸化能は Low SAA 群と比較して 10%上昇していた。このことは、HDL-Cho 濃度低下を代償するために HDL の抗酸化能が上昇している可能性を意味するかもしれない。

【結論】

SAA は HDL の apoA-I と置換することで HDL の特徴や構造を変化させ、HDL の抗酸化能を上昇させる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5274　号	佐藤　恵美
論文審査担当者	主査　　窪田　哲朗 副査　　沢辺　元司，戸塚　実	

（論文審査の要旨）

博士号審査論文　“Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein” (Bioscience Reports, doi:10.1042/BSR20160075)について審査した。急性期反応性蛋白の一つである血清アミロイドA(SAA)は脂溶性であり，血液中では high density lipoprotein (HDL)と結合しているが，その病態形成上の意義については不明の点が多い。本研究は SAA が HDL の構造と機能に与える影響を解明することを目的として行われた。

まず，SAA が HDL の構造に与える影響を調べるために，HDL と組換えヒト(rh)SAA を混和して 1 時間静置した後，超遠心で分離して上層の HDL 分画と下層の蛋白分画を SDS-PAGE で解析した。その結果，上層に rhSAA のバンドが観察されるとともに下層の apoA-1 のバンドが増強しており，rhSAA が apoA-I と置き換わって HDL に取り込まれることが確認された。炎症反応高値の患者血清を東京大学医学部附属病院から得て，SAA 値が低い群，中等度の群，高い群に分類して HDL の組成を比較したところ，高い群では総 HDL 蛋白あたりの SAA が多く，apoA-I が少なくなっており，生体内でも SAA が apoA-I と置き換わって HDL に取り込まれることが示唆された。LDL を硫酸銅で酸化する反応系で，生成される共役ジエンを 234 nm の吸光度でモニターしたところ，rhSAA は apoA-I より強い抗酸化能を発揮した。また，HDL と rhSAA を混和して rhSAA を取り込ませた再構成 HDL は，HDL より強い抗酸化能を発揮した。患者血清から得た HDL を添加した場合，血清 SAA 値が高い検体から得た HDL は強い抗酸化能を示した。

これらの結果から，炎症性病態においては HDL の組成が変化し，その結果 HDL の抗酸化能が亢進することが判明した。このような所見は炎症性疾患における動脈硬化などの病態形成を考察する上で貴重な情報を提供するものであり，臨床病理学的に価値のある論文と考えられる。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉本　明
論文審査担当者	主査　窪田　哲朗 副査　角　勇樹　　戸塚　実
論　文　題　目	Paraoxonase 1 associated with high-density lipoprotein transfers to oxidized low-density lipoprotein depending on the degree of oxidation

（論文内容の要旨）

＜結言＞

粥状動脈硬化症の進行において、低比重リポタンパク（LDL）の酸化は重要な因子である。酸化 LDL（oxLDL）は、過酸化脂質（LOOH）や陰性荷電を帯びた apoB-100 を有し、粥状動脈硬化症発症の原因となる泡沫細胞の形成促進や病態進行のいくつかの細胞反応の促進に寄与する。

一方、高比重リポタンパク（HDL）の表面酵素である Paraoxonase1（PON1）は HDL の抗酸化システムにおいて重要な役割を果たしてしている。コレステロールエステル転送タンパク（CETP）やリン脂質転送タンパク（PLTP）によって、LDL から引き抜かれた LOOH は HDL 中で PON1 によって分解される。さらに、PON1 はマクロファージに特異的に結合し、炎症性サイトカインの分泌を減少させることが報告されており、重要な抗粥状動脈硬化酵素であると考えられている。

PON1 はその抗粥状動脈硬化作用を HDL 以外のリポタンパク中でも発揮することが報告されており、近年酸化感受性の高い small dense LDL（sdLDL）中に転移することが報告された。しかしながら、その研究では血清をインキュベーションした結果のみしか示されておらず、LDL 中へ PON1 が転移する確かな証拠はこれまで示されていない。従って、我々は HDL 中の PON1 が LDL や酸化 LDL に転移するかどうか検討した。

＜対象と方法＞

<u>血液サンプル</u>：インフォームドコンセントの得られた健常人ボランティアより採血した血液を用いた。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会より承認を得ている（番号 1441）。

<u>リポタンパクの分離</u>：LDL（d = 1.006-1.063 g/mL）と HDL（d = 1.063-1.210 g/mL）は超遠心法にて健常人血清より分離した。

<u>PON1 活性測定</u>：基質には paraoxon を用い、健常人血清を標準血清としてリポタンパク中の PON1 活性を測定した。

<u>リポタンパク中の PON1 の分布</u>：3 mL の血清を KBr で比重 1.063 に調製し、超遠心した後、VLDL、LDL を含む上層、透明な中間層、HDL と血清タンパクを含む下層の 3 層に分離した。各分画の PON1 活性（U/L）と容積から PON1 量を算出した。下層分画は比重を 1.210 に調製し、再超遠心した後、HDL を含む上層、中間層、血清蛋白を含む下層に分離し、PON1 量を上記と同様

に算出した。

酸化 LDL の作製：等量の LDL（2 mg/mL）と $CuSO_4$（20 μmol/L in PBS）を混和し 37℃で 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 時間（h）インキュベーションした後、1/3 容の EDTA（300 μmol/L）を添加し、酸化反応を停止した。酸化の程度を評価するために、各 oxLDL サンプルを PBS で希釈して 0.050 mg/mL とし、共役ジエンと LOOH を測定した。また、リポタンパク電気泳動を行い、未酸化の LDL の移動度を 1 として各 oxLDL の相対移動度（REM）を測定した。

ゲル濾過クロマトグラフィによる解析：LDL、oxLDL（4h 酸化）に HDL を添加したものとしていないもの、さらに HDL のみのものを、それぞれ 37℃90 分インキュベーションした後、ゲルろ過法（CL6-B セファロースカラム、1.5 × 95 cm）で LDL と HDL を再分離した。

超遠心法による解析：LDL、oxLDL（0.5 mg/mL：1、2、4 h 酸化）に HDL（2.5 mg/mL）を添加したものとしていないものないもの、さらに HDL のみのサンプルを調整し、37℃で 90 分インキュベーションした。LDL と HDL は比重 1.063 の超遠心にて再分離し、上層、中間層、下層の 3 分画に分離した。各分画中の PON1 活性、コレステロール、リン脂質量を測定し、上層中の LDL については、電気泳動にて REM を測定した。

＜結果＞

リポタンパク中の PON1 の分布：血中の PON1 は主に HDL 表面に存在していること、超遠心法によって HDL から離脱してしまうことが報告されているため、超遠心で分離したリポタンパク分画中の PON1 活性、リン脂質、コレステロールを測定し、用いた血清のそれぞれの値を 100%として相対的に評価した。比重 1.063 での超遠心では PON1 活性のほとんどは下層（HDL および血清タンパク）に見られたが、その値は 80%であった。下層を比重 1.210 で再超遠心し、上層、中間層、下層の 3 層に分離したところ、PON1 活性の分布は HDL を含む上層が 12.9 ± 7.3%、中間層が 36.1 ± 3.9%、下層が 7.0 ± 2.2%であった。しかしながら、リン脂質、コレステロールは中間層（2.9%、2.5%）より上層（32.2%、28.3%）のほうが高値であった。

oxLDL の酸化状態の評価：硫酸銅で酸化した LDL の酸化状態を評価するために、各酸化 LDL の REM、共役ジエン、LOOH を測定し、それぞれ酸化時間に概ね比例して増加することが確認された。

ゲル濾過クロマトグラフィによる解析： はじめに、HDL を添加していない LDL、oxLDL（4h）では、どの分画においても PON1 活性がないことを確認した。また、HDL では HDL 分画にのみに PON1 活性があることを確認した。LDL あるいは oxLDL を HDL とプレインキュベーションしたところ、ゲルろ過後の LDL 分画に全 PON1 活性のそれぞれ 5.4%、13.7%が認められた。酸化 LDL との共存による PON1 の失活を考慮し、ウエスタンブロットによる半定量解析を行ったところ、HDL とプレインキュベーションした oxLDL の LDL 分画の PON1 量は、対照として用いた同じ PON1 活性量の HDL のそれよりも多いことが確認された。また、LDL 分画に少量の apoA-I が検出された。LDL、oxLDL（4h）のみでは、ゲルろ過後の LDL 分画に PON1 のバンドは認められなかったが、HDL と LDL の混合試料の LDL 分画には、わずかに apoA-I のバンドが認められた。

超遠心法による解析：HDL から oxLDL への PON1 の転移について、比重に基づいた分離方法である超遠心法でも検討した。LDL、oxLDL（1、2、4 h 酸化）を比重 1.063 にて超遠心法で再分

離すると、上層（LDL 分画）のコレステロールとリン脂質は、oxLDL（4h）では HDL の共存の有無に関わらず有意に減少し、中間層では上昇が認められた。一方、LDL、oxLDL のみでは PON1 活性は認められないことを確認したが、HDL とのプレインキュベーションにより LDL を含む上層の PON1 活性が LDL の酸化度に依存して上昇した。さらに、この上層の PON1 活性は、酸化後の LDL 中共役ジエンと有意な正の相関を示した（$r = 0.90, p = 0.003$）。また、oxLDL（4h）と HDL から得られた PON1 活性は中間層（3.4 ± 1.1 mU）の方が上層（1.9 ± 0.3 mU）より高値を示した。HDL を含む下層の PON1 活性、コレステロール、リン脂質はどの LDL とプレインキュベートしても有意な変化は認められなかった。上層の LDL について陰性荷電を調べてみると、HDL とのプレインキュベーションによって REM の減少傾向が認められた。

＜考案＞

従来の超遠心法で分離された HDL 中の PON1 活性の回収率は約 12.9%であり、大部分の PON1 は HDL を離脱あるいは失活していることが示唆された。PON1 の回収率を考慮し、LDL と HDL のインキュベーションはタンパク量換算で 1：5（健常者血漿ではおよそ 1：2.5）に設定したが、この比率は生理的条件を大きく逸脱していないと考えられる。また、調製した oxLDL の酸化状態の評価として、共役ジエン、LOOH、REM を測定すると、どの項目でも酸化時間に依存して増加し、oxLDL（2h）の REM は冠状動脈狭窄患者で報告されている REM の値と近い値であった。以上のことより、これらのリポタンパクを使用した本実験は、病態生理学的な条件を反映していると考えられる。我々は２つの再分離方法を用いて HDL 中 PON1 の LDL への転移について検討した。

ゲル濾過法による解析では、oxLDL と HDL とのプレインキューションによって LDL 分画に PON1 活性を認めたが、未酸化 LDL と HDL のプレインキュベーションでもわずかに PON1 活性を認めた。これらの結果は PON1 が HDL から LDL へ転移し、LDL の酸化がその転移を増加させる要因であることを示唆している。未酸化 LDL への PON1 の転移は、分離過程やインキュベーションによりわずかに酸化された LDL、あるいは sdLDL への転移による可能性が考えられる。ウエスタンブロッティングでは、oxLDL と HDL から得られた LDL 分画について、同じ PON1 活性量の HDL と比較すると、PON1 のバンドの強度が著しく強かった。これは転移した PON1 の大部分が酸化脂質によって失活していることを示唆している。また、LDL 分画に少量の apoA-I が認められたが、PON1 バンドとの比は HDL のそれと大きく異なり、LDL 分画の PON1 活性が HDL のコンタミネーションあるいは HDL 粒子の巨大化が原因で生じたものではないことが示唆される。

超遠心法による解析でも、HDL とのプレインキュベーションによって PON1 活性が LDL 分画中に増加した。さらに、その増加した PON1 活性量は HDL と oxLDL 中の共役ジエンと有意な相関を示した。また、HDL とのプレインキュベートによって、再分離後の LDL の REM はわずかに減少していた。PON1 は oxLDL の単球-内皮細胞間の相互作用を減少させること、PON1 ノックアウトマウス由来の LDL は単球を遊走させる能力が野生型マウス由来の LDL と比較して高いことが報告されている。これらのことを考慮すると、HDL 表面の PON1 は LDL へ転移し、その抗酸化作用を発揮している可能性が示唆される。

＜結論＞

本研究により HDL 中の PON1 が LDL の酸化の程度に応じて LDL へ転移することが明らかとなった。これは転移した PON1 がその抗酸化能によって抗粥状動脈硬化作用に重要な役割を果たしている可能性を示しているものと考えられる。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5275　号	吉本　明
論文審査担当者	主　査　　窪田　哲朗 副　査　　角　勇樹　　戸塚　実	

（論文審査の要旨）

学位審査論文　“Paraoxonase 1 associated with high-density lipoprotein transfers to oxidated low-density lipoprotein depending on the degree of oxidation.(International Journal of Analytical Bio-Science, in press)” について審査した。高比重リポタンパク(HDL)の表面に存在するparaoxonase 1(PON1)は, 低比重リポタンパク(LDL)から引き抜かれた過酸化脂質を分解するなどの抗酸化作用を有し，さらにマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制することも示唆されるなど，粥状動脈硬化の病態形成を抑制する酵素と考えられている。PON1 は HDL の他，LDL に転移してそのような機能を発揮する可能性が示唆されているが, 明らかな証拠は得られていない。そこで本研究は，PON1 が LDL に転移することを明らかにすることを目的に行われた。

まず，分子量によって分画するゲル濾過クロマトグラフィーで解析を行った。その結果，LDL 分画および酸化 LDL 分画には PON1 活性が認められなかった。しかし，HDL とプレインキュベーションした LDL には 5.4%，HDL とプレインキュベーションした酸化 LDL には 13.7%の PON1 活性が認められ，PON1 が HDL から LDL に移行したことが示された。次に比重によって分画する超遠心法でも検討した。その結果，比重 1.63 の超遠心では LDL 分画および酸化 LDL 分画には PON1 活性が認められなかったが，HDL とプレインキュベーションしたプレインキュベーションした LDL 分画および酸化 LDL 分画には PON1 活性が検出された。その PON1 活性は，LDL の酸化の度合いと正の相関を示した。以上のような検討により，HDL 中の PON1 は LDL に転移すること，しかも LDL の酸化の度合いが強いほど多く移行することが証明された。

本研究によって，これまで不完全な方法のみから推定されていた PON1 の LDL への移行が，分画されたリポタンパクを用いた検討で明らかに証明された。研究は適切な計画のもと，丁寧に遂行されて信頼性の高いデータが示されており，粥状動脈硬化の病態形成機構の解明を一歩前進させた貴重な論文と言える。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	矢野　哲也
論文審査担当者	主査　星　治 副査　角　勇樹　　沢辺　元司
論　文　題　目	Application of low-vacuum scanning electron microscopy in cytopathology: To what extent can adenocarcinoma be morphologically distinguished from squamous cell carcinoma in lung cancer?

（論文内容の要旨）

＜はじめに＞

昨今、分子標的治療薬に代表される新規抗がん剤が様々な悪性腫瘍に応用されている。特に肺癌や乳癌では早くから臨床応用され病理診断がその選択的治療において重要な役割を果たしている。従来、肺癌では、上皮性悪性腫瘍（癌腫）の治療適応に対しては小細胞癌か非小細胞癌であるかが重要であり、それ以上の亜型分類は治療選択においてあまり重要でなかった。しかし、肺癌に対する分子標的治療薬であるゲフィチニブやエルロチニブなどは非小細胞癌の中でも特定の遺伝子変異を有する腺癌に治療効果を認めることが多く、ベバシズマブや葉酸代謝拮抗薬であるペメトレキセドなどでは扁平上皮癌以外の非小細胞肺癌を対象とする。よって、非小細胞癌の中でも多くを占める腺癌や扁平上皮癌の鑑別が治療選択においても重要になってきた。

肺癌の病理組織診断において低分化な非小細胞癌では典型的な形態像を示さないため、数種類の抗体を用いた免疫組織化学的検索が必須である。しかし、細胞診では検体量がわずかで免疫細胞化学的検索が難しい場合が多く、特に気管支鏡などの肺癌細胞診では低分化な腺癌や扁平上皮癌などの鑑別が困難であり、サンプル量に左右されない新たな診断法の開発が望まれてきた。

また、以前より電子顕微鏡を用いた細胞診における研究が行われてきたが、電子顕微鏡を扱う際に専門的知識や技術が必要とされ、機器やランニングコストが高価なこともあり、細胞診への応用が組織診ほど進まなかった。しかし、昨今の電子顕微鏡機器における技術革新、特に低真空下で観察可能な走査電子顕微鏡の開発により、生物学領域へのさらなる応用が期待されている。我々は、以前、細胞診で用いられるエタノール固定パパニコロウ染色標本を低真空走査電子顕微鏡（LVSEM）で非破壊的に観察できる技術を開発し報告した（参考文献：Yano et al. Microscopy. 2016; 65: 269-73）。これらの技術を用いれば、検体量の限られる細胞診検査への応用が可能となり、また診断に用いられた既往標本を検討することで後方視的検討も行いやすくなる。

そこで、本研究ではこれら技術を応用し肺癌細胞診標本を LVSEM で観察し、癌細胞の微細な表面構造や立体構造から腺癌と扁平上皮癌の鑑別が可能かどうか検討した。

＜対象と方法＞

組織診で診断が確定した呼吸器細胞診 37 検体（気管支鏡ブラッシング 6 例，気管支鏡キュレッ

ト 6 例，気管支鏡洗浄 17 例，経気管支的穿刺吸引細胞診 2 例，喀痰 6 例；腺癌 26 例，扁平上皮癌 11 例）を対象とし、細胞形やその表面構造について LVSEM を用い後方視的に検討した。組織診にて低分化な成分を有する腺癌は 6 例、扁平上皮癌は 6 例であった。

細胞診標本は 95％エタノール溶液固定後、パパニコロウ染色施行され診断された後のものを用い、脱カバーガラス・脱マリノール後、10%リンタングステン酸水溶液で室温で 60 分間、導電染色後、アルミ試料台に固定した。LVSEM 観察は、加速電圧 7kV，真空度 50Pa，BSE モードで倍率 200～20,000 倍で行った。観察後はすべての標本に再度パパニコロウ染色を施行し原状回復した。

観察に際し 20 個の癌細胞を対象とし、細胞形では球形か平面的か、表面構造では “filaments” と名付けた微絨毛様構造を中心に、その有無、長さ、太さ、密度、それらの癒合や細胞表面の陥没の有無などを調べ、その出現頻度を比較検討した。長い filament は 300nm 以上、太い filament は 150nm 以上とし対立する優勢な形質を抽出し、腺癌、扁平上皮癌の特徴を明らかにした。LVSEM とパパニコロウ染色標本における診断の正確度やそれぞれの症例の LVSEM 観察における形質についてフィッシャーの正確確率検定による統計学的解析を行い、0.05 以下を有意差ありと判定した。

＜結果＞

LVSEM において腺癌と扁平上皮癌の鑑別に有用な所見は、腺癌で球形 73.1％、長い filaments 65.4％、密な filaments 80.8％、表面陥没 57.7％、扁平上皮癌で平らな表面 81.8％、疎な filaments 72.7％、filaments 無し 81.8％で有意差がみられた。

対象症例のパパニコロウ染色による細胞診正診率は 81.1%（腺癌 96.2%、扁平上皮癌 45.5%）で、LVSEM では 83.8％（腺癌 80.8％、扁平上皮癌 90.9％）であり、パパニコロウ染色による診断と LVSEM による診断を併せると正診率は 97.3％となった。全症例、腺癌、扁平上皮癌について、それぞれパパニコロウ染色のみ、LVSEM のみ、パパニコロウ染色＋LVSEM による診断間で統計学的有意差はみられなかった。

パパニコロウ染色では、鑑別できなかった 7 例のうち、扁平上皮癌 6 例、腺癌 1 例で、扁平上皮癌 4 例、腺癌 1 例に組織診において低分化な成分がみられた。また、鑑別できなかった扁平上皮癌のうち、4 例で重責性のある細胞集塊が出現し、2 例で核の偏在や角化のない細胞質を有し、部分的に腺癌の形質を示した。LVSEM では、扁平上皮癌 1 例、腺癌 5 例で鑑別ができなかった。鑑別できなかった 5 例の腺癌では、平らな表面や疎な filaments などの扁平上皮癌の形質を示し、そのうち 2 例で粘液癌成分を有し、1 例で肺胞上皮置換性の増殖形態を示した。パパニコロウ染色＋LVSEM においても鑑別できなかった 1 例は、重積性のある細胞集塊や核の偏在を示し、球形で密な filaments を有する中分化～低分化の扁平上皮癌であった。

＜考察＞

本研究において、LVSEM による肺腺癌と肺扁平上皮癌の鑑別における正診率（83.8%）はパパニコロウ染色による鑑別（81.1%）と同程度であったが、これら二つの診断法を併せて用いると 97.3%と高率になった。これはパパニコロウ染色では特に低分化な扁平上皮癌の診断が難しく、

LVSEM では filaments 構造のはっきりしない腺癌症例で鑑別不能になることが起因しており、二つの診断法がそれぞれの欠点を補完できる可能性が高く、免疫細胞化学的検索が行いにくい細胞診において新たな診断法となる可能性が示せた。

また、組織診においても低分化な肺腺癌、肺扁平上皮癌の HE 染色を基本とした形態のみでの鑑別は難しく免疫組織化学的検索が必要とされている。既報告によれば、腺癌マーカーの TTF-1 と扁平上皮癌マーカーの p63 または p40 を用いることで約 100%の診断精度があるといわれているが、今回の検討で細胞診においても LVSEM を診断に用いれば同程度の正診率が得られることが分かった。

本検討において filament とした線維状構造物は、後方視的検討であることや元来サンプルが僅少で検討に使用しづらい状況から、同一サンプルでの透過電子顕微鏡検索ができなかったため微絨毛と断定していない。しかし、細胞内のアクチン（径 5-7nm）や中間径フィラメント（径 10nm）、微小管（径 20nm）などの線維状構造物はその太さから明らかに否定されるため、filament はほぼ微絨毛であると推察される。

＜結論＞

呼吸器細胞診における LVSEM 観察は、腺癌と扁平上皮癌の鑑別に有用であり、免疫細胞化学的手法に代わる補助的診断法になりうる可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5277　号	矢野　哲也
論文審査担当者	主査　星　治 副査　角　勇樹　　沢辺　元司	

（論文審査の要旨）

肺癌の治療には，組織型の鑑別診断が重要である。なかでも非小細胞癌の中で多くを占める腺癌と扁平上皮癌の鑑別は，治療薬を選択する上で必要であり，免疫組織化学的検索が有効である。しかし，肺生検や気管支鏡による肺胞洗浄液などによる細胞診では検体量に限りがあるため，新たな診断方法の開発が期待されている。本研究では，非導電性試料を無コーティングで観察可能な低真空走査型電子顕微鏡（LVSEM）を用いて肺癌の細胞診における有用性に関する検討を行った。

対象は組織診で診断が確定した腺癌 26 例，扁平上皮癌 11 例で，低分化な成分を有する腺癌 6 例と扁平上皮癌 6 例を含むものである。そのうち 20 個の癌細胞について，LVSEM により表面構造を観察した。その結果，腺癌では球形 73.1%，長い filaments65.4%，密な filaments80.8%，表面陥没 57.7%，扁平上皮癌では平らな表面 81.8%，疎な filaments72.7%，filaments 無し 81.8%で有意な差がみられた。パパニコロウ染色による細胞診の正診率は 81.1%（腺癌 96.2%，扁平上皮癌 45.5%）であったが，それに LVSEM の診断を併せると正診率は 97.3%と向上した。これにより，腺癌と扁平上皮癌の鑑別診断には LVSEM 観察が有用であることが示された。

本研究は，申請者がすでに学術誌に報告しているパパニコロウ染色された細胞診標本を LVSEM 観察する技術を応用したもので，今後，他の組織における細胞診にも発展されていく可能性を秘めた内容と考えられる。

口頭試問においては，主査および副査から研究の背景，実験の方法，結果の解釈，今後の展望などについて質問がなされたが，いずれに対しても適切な回答が得られた。これにより，申請者は本領域について十分な学識を有することが確認され，博士（保健学）の学位を授与するに値するものと判断した。

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	矢野　康次
論文審査担当者	主査　伊藤　南 副査　赤澤　智宏　　戸塚　実
論　文　題　目	Cholesterol Efflux Capacity of Apolipoprotein A-I Varies with the Extent of Differentiation and Foam Cell Formation of THP-1 Cells

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

高比重リポタンパク（HDL）の主要アポリポタンパクである apolipoprotein A-I (apoA-I)は、ATP-binding cassette transporter A-I（ABCA1）を介して細胞に蓄積した余剰なコレステロールを細胞外へ引き抜く作用を有する。これをコレステロール引き抜き能といい、粥状動脈硬化症の進展を抑制する機能の一つとして近年注目されている。その測定方法は以下のとおりである。単球をマクロファージへと分化させ、アセチル化低比重リポタンパク（アセチル化 LDL）とともに標識コレステロールを細胞に取り込ませることで泡沫化させる。そこへ、コレステロールのアクセプターとして apoA-I や HDL を添加することで細胞内コレステロールは細胞外へと引き抜かれる。引き抜かれたコレステロール量をその標識物により評価しコレステロール引き抜き能とする。現在多くのグループがこの解析技術により患者由来の apoA-I や HDL、または酸化・糖化などの修飾を受けた apoA-I や HDL のコレステロール引き抜き能を評価している。しかしながら、同じ解析目的で行われた結果が研究グループ間で異なった見解を導いており、その原因として測定方法の未確立が考えられる。現在までのところ、コレステロール引き抜き能の測定条件は研究グループごとに異なっており、未だ確立されているとは言い難い。そこで我々は、コレステロール引き抜き能測定条件の中でも、分化・泡沫化の程度がコレステロール引き抜き能評価に与える影響について解析を試みた。さらに、それらの影響を確認するため、心血管疾患リスク因子の一つであるホモシステインにより修飾を受けた *N*-ホモシステイン化 apoA-I を用いて、分化・泡沫化がコレステロール引き抜き能に及ぼす影響についても解析した。

＜対象と方法＞

試料：血漿はインフォームドコンセントの得られた複数の健常者から採取したものをプールして用いた。この研究は、東京医科歯科大学医学部倫理委員会の承認のもと行った（倫理番号:1441）。プール血漿から超遠心法により LDL（1.019-1.063 g/mL）および HDL（1.063-1.21 g/mL）を分離した。HDL はエタノール／エーテル混合液にて脱脂後、ゲルろ過法（S-200-HR カラム）にて apoA-I を分離・精製した。アセチル化 LDL は酢酸ナトリウムおよび無水酢酸を用いて作製し、使用まで -20℃にて保存した。

細胞培養：急性単球性白血病細胞株（THP-1）は 10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地を用いて 37℃、5% CO_2 条件下にて 2-10×10^5 cells/mL の状態を保ち使用した。

コレステロール引き抜き能評価：THP-1 細胞を phorbol-12-myristate-13-acetate（PMA）にて異なる期間の分化刺激を行った。続いて、アセチル化 LDL、Liver X Receptor agonist として T0901317、そして ^{3}H 標識コレステロールを添加し、異なる期間の泡沫化を行った。18 時間の平衡化処理後、10 μg/mL の apoA-I と 4 時間インキュベーション後、細胞外へ引き抜かれた ^{3}H 標識コレステロールを液体シンチレーションカウンターにて測定し、（細胞外へ引き抜かれた ^{3}H 標識コレステロール）×100／（細胞内に取り込まれた ^{3}H 標識コレステロール）によりコレステロール引き抜き能（%）を評価した。

形態学的解析：異なる期間の分化・泡沫化刺激後の細胞を PBS で洗浄、3.7%ホルムアルデヒド溶液にて固定後、ヘマトキシリンにて核を、オイルレッド O にて脂質を染色し顕微鏡にて解析を行った。オイルレッド O 染色は Image J にて評価した。

フローサイトメトリー解析：分化状態評価のため、異なる期間の分化刺激細胞を、セルスクレーパーにて剥離後、FITC 標識抗 CD11b 抗体にて染色し、フローサイトメーターにて解析を行った。それぞれの刺激日数において、アイソタイプコントロール抗体の最大蛍光強度を上回った細胞数をパーセントとして評価した。

ウエスタンブロッティング：分化状態評価として抗 CD11b 抗体、apoA-I コレステロール引き抜きに関与するトランスポーターの評価として抗 ABCA1 抗体を、ローディングコントロールとして抗□-アクチン抗体を用いてウエスタンブロット法によりそれぞれ解析を行った。

N-ホモシステイン化：精製した apoA-I（70 μmol/L）とホモシステインチオラクトン（10 mmol/L）を 37℃にて 6 時間インキュベーション後、等電点電気泳動を行い、抗 apoA-I 抗体を用いたウエスタンブロット法にて修飾の程度をデンシトメトリーにて解析・評価を行い、コレステロール引き抜き能評価に用いた。

＜結果＞

細胞の分化程度が apoA-I コレステロール引き抜き能に及ぼす影響：異なる期間の PMA 刺激を行ったところ、細胞の形状は刺激日数の増加に伴い大きくより突起を持った細胞に変化した。CD11b 発現量は 2 日で有意に高値となりその後プラトーに達した。CD11b 発現量はウエスタンブロット解析でも同等の結果を示した。コレステロール引き抜き能は 2 日で 6.4±0.3%と最も高く、以降は徐々に減少した。さらに細胞内に取り込まれた ^{3}H 標識コレステロールは泡沫化日数が一定にもかかわらず PMA 刺激 1 日では取り込みが著しく低く、2 日で最も高くなり、その後減少した。さらに、細胞外に引き抜かれた ^{3}H コレステロールは細胞内に取り込まれた量とほぼ同様の動態を示した。一方で、ABCA1 発現量は 1 日で最も高く、刺激日数の経過に伴い減少した。

泡沫化の程度が apoA-I コレステロール引き抜き能に及ぼす影響：分化刺激期間を 2 日に固定し、異なる期間泡沫化を行ったところ、細胞内に認められた脂肪滴の数は泡沫化日数に比例し増加した。コレステロール引き抜き能は 1 日目が 10.4±0.4%と最も高く、その後減少した。また、細胞内に取り込まれた ^{3}H 標識コレステロールは徐々に増加する傾向を示したのに対して、細胞外へ引き抜かれた ^{3}H 標識コレステロールは徐々に減少した。また ABCA1 発現量に有意な変化は認めら

れなかった。

N-ホモシステイン化が apoA-I のコレステロール引き抜き能に及ぼす影響 : *N*-ホモシステイン化した apoA-I を等電点電気泳動後デンシトメトリーにより解析を行ったところ、51.9%±5.9%の apoA-I が修飾を受けていることが示された。これを用いてコレステロール引き抜き能を評価したところ、1 日および 2 日の分化または泡沫化刺激においては *N*-ホモシステイン化 apoA-I は apoA-I に対してコレステロール引き抜き能が有意に低値を示したが、3 日以降では有意差は認められなかった。

＜考察＞

異なる分化状態にある細胞を用いてコレステロール引き抜き能を評価したところ、分化刺激 2 日目が最も高いことが示された。1 日目、つまり十分に分化していない細胞では ABCA1 発現量は最大であったにも関わらずコレステロール引き抜き能が低かった。これは細胞が十分な分化状態になく ^{3}H 標識コレステロールを取り込めていないことが原因である可能性が考えられた。一方で、3 日目以降はコレステロール引き抜き能が減少した。これは、^{3}H 標識コレステロールが細胞内に取り込まれた量および細胞から引き抜かれた量はともに 2 日目よりも減少したが、細胞から引き抜かれた量の減少の割合がより大きかったためであると考えられる。実際、コレステロール引き抜きに関与する ABCA1 発現量は減少していた。PMA は Protein kinase C（PKC）を介して ABCA1 発現量を減少させるとの報告があり、過剰な分化刺激は ABCA1 発現量減少に伴うコレステロール引き抜き能低下を招く可能性が示唆された。

分化刺激を 2 日に固定し、異なる日数の泡沫化を行ったところ、コレステロール引き抜き能は 1 日目で最も高いことが示された。Oil red O および細胞内に取り込まれた ^{3}H 標識コレステロール量の結果から、泡沫化の日数の増加とともに細胞内に取り込まれた脂質または ^{3}H 標識コレステロール量は増加することが示された。一方で ABCA1 発現量が変化しなかったにも関わらず、細胞外へ引き抜かれた ^{3}H 標識コレステロール量は減少する傾向を示した。細胞内に取り込まれたフリーコレステロールはアシル CoA コレステロールアシルトランスフェラーゼ（ACAT）によりエステル化され脂肪滴として貯蔵される。コレステロール引き抜きの際には、ライソソーム酸性リパーゼ（LAL）によりフリーコレステロールとなり ABCA1 を介して apoA-I によって引き抜かれるが、この LAL は過剰なコレステロールエステル蓄積によりその活性が低下するとの報告がある。そのため高度に泡沫化した細胞では、過剰なコレステロールエステル蓄積による LAL 活性の低下から、フリーコレステロールに変換することができず、細胞外へ引き抜くことができなくなっている可能性が考えられた。それに伴い細胞内のコレステロール蓄積が増加することから、結果として引き抜かれた比率、つまりコレステロール引き抜き能としては大きく減少する結果となったことが考えられた。

異なる分化状態または泡沫化状態にある細胞を用いて、*N*-ホモシステイン化 apoA-I のコレステロール引き抜き能を評価したところ、ともに過剰な分化または泡沫化状態では *N*-ホモシステイン化修飾によるコレステロール引き抜き能低下が認められなかった。過剰な状態ではコレステロール引き抜き能を的確に反映していない可能性があり、より正確な評価を行うためにその目的に応じた条件設定が必要である可能性が示唆された。これまで多くの研究グループがあらゆる修飾

apoA-I または HDL を用いて修飾がコレステロール引き抜き能にどのように影響を与えるか検討がなされてきたが、研究グループごとにその条件は異なっており確立されていない。本研究結果は細胞の分化状態や泡沫化状態がコレステロール引き抜き能に及ぼす影響について言及した初めての研究であり、今後 THP-1 細胞に限らずその他の細胞株においても検討する必要があることが示唆された。

＜結論＞

apoA-I および *N*-ホモシステイン化 apoA-I のコレステロール引き抜き能は細胞の分化および泡沫化の程度に大きく影響を受けることが明らかとなった。コレステロール引き抜き能は、目的に応じて複数の条件で評価することが重要であることが示された。

論文審査の要旨および担当者

報　告　番　号	甲 第　5277　号	矢野　康次
論文審査担当者	主査　伊藤　南 副査　赤澤　智宏　　戸塚　実	

（論文審査の要旨）

学位申請論文 Cholesterol efflux capacity of apolipoprotein A-I varies with the extent of differentiation and foam cell formation of THP-1 cells

(Journal of Lipids, Volume 2016, Article ID 9891316, 9 pages))について審査した。

高比重リポタンパク（HDL）の主要アポリポタンパクである apolipoprotein A-I (apoA-I)が、ATP-binding cassette transporter A-I（ABCA1）を介して細胞に蓄積した余剰なコレステロールを細胞外へ引き抜く作用が、粥状動脈硬化症の進展を抑制するメカニズムの一つとして注目されている。しかしながら、コレステロール引き抜き能の測定条件が研究グループごとに異なっており、測定方法が同じであるにもかかわらず異なる見解に至る原因となっている。著者らは測定条件がコレステロール引き抜き能測評価に与える影響を評価するために、ヒト急性単球性白血病細胞株(THP-1)の分化・泡沫化の程度が apoA-I によるコレステロール引き抜き能評価に与える影響を解析した。さらに、*N*-ホモシステイン化 apoA-I を用いて、心血管疾患リスク因子の一つであるホモシステインによるコレステロール引き抜き能の変化を比較した。THP-1 細胞の培養液に Phorbol12-myristate13-acetate を添加して（PMA 刺激）細胞を分化させ、Acetylated low-dencity lipoprotain（アセチル化 LDL）を添加して細胞を泡沫化させた。細胞内および培養液のトリチウム（^{3}H）で標識したコレステロール量の変化をシンチレーションカウンターで測定して、コレステロールの引き抜き能を評価した。すべての研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会の承認のもとに行われた。

①分化刺激を１～５日行い、泡沫化日数を一日に固定した。THP-1 細胞の分化を形態の変化、抗 CD11b 抗体の発現量の増加で確認した（図１、図２）。コレステロールの引き抜き能は PMA 刺激 2 日で最も高くなり、その後減少した。（図３）。^{3}H コレステロールの細胞内への取り込み量も同様の時間経過を示した。一方、ABCA1 発現量は PMA 刺激 1 日で最も高く、その後減少した。分化が不十分だと ABCA1 発現量によらずコレステロール引き抜き能が低く、分化刺激が過剰になると ABCA1 発現量減少に伴ってコレステロール引き抜き能が低下する可能性が示された。

②分化刺激を 2 日間に固定し、１～５日間泡沫化を行ったところ、細胞内の脂肪滴数が増加した（図４）。コレステロール引き抜き能は 1 日目が 10.4±0.4%と最も高く、その後減少した（図５）。細胞内への取り込み量は徐々に増加したが、細胞外への引き抜き量は徐々に減少した。ABCA1 発現量に有意な変化は認められなかった。これはコレステロールの取り込みや ABCA1 の発現量とは別に、過剰なコレステロールエステル蓄積によりライソソーム酸性リパーゼ（LAL）LAL 活性が低下して、コレステロール引き抜きの過程でフリーコレステロールに変換することが

できなくなっている可能性が考えられる。

③*N*-ホモシステイン化修飾を受けた apoA-I（全体の 51.9%±5.9%、図６）を用いて、コレステロール引き抜き能を測定した。１～２日間の分化または泡沫化刺激では apoA-I の *N*-ホモシステイン化によりコレステロール引き抜き能が有意に低下したが、3 日以降では有意差は認められなかった（図７）。

本研究は、これまで見過ごされてきた細胞の分化状態や泡沫化状態がコレステロール引き抜き能に及ぼす影響について初めて言及したものである。さらに、apoA-I の *N*-ホモシステイン化による影響を評価した結果が、細胞の分化および泡沫化の程度により変化することを示した。地道な努力により、コレステロール引き抜き能の測定条件の設定の意義、必要性を示したことはたいへん評価される。今後 THP-1 細胞に限らずその他の細胞株においても、研究グループ間のコレステロール引き抜き能測定の評価法を標準化することを促す、意義のある研究である。

審査では、本研究の背景、実施方法、結果について明快な説明がなされた。試問では、本研究の着想に至る背景、^{3}H ラベルによる測定精度、データの解釈、THP-1 細胞を使用した理由と使用の是非、今後他のヒト由来の細胞を利用する可能性について質疑があり、明快な回答を得た。申請者は研究の解釈や限界について正当な認識を示した。以上の内容を踏まえ、審査担当者の合議により、申請者が当該分野における十分な学識を有し、博士の学位（保健学）に値すると結論した。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	前田　斉嘉
論文審査担当者	主査：村松　正明 副査：奈良　雅之 副査：伊藤　暢聡
論　文　題　目	Studies on the effects of the long-term administration of melatonin on blood metabolites in aging mice (加齢マウスの血中の代謝産物に及ぼす長期メラトニン投与の影響)

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

メラトニンの長期投与は、マウスにおける寿命延長効果以外に、ヒトでは睡眠障害の改善、閉経後骨粗鬆症における骨密度の増加やアルツハイマー病における記憶障害の改善など、多岐にわたる効果が報告されている。一方で、メラトニンの長期投与の作用全体を理解するためには、網羅的な分析手法を用いた生体内の物質挙動をとらえることが有効な方法の一つであると考えられる。本研究では、血液に存在する代謝物を網羅的に同定し、ゲノム情報と統合解析を行うクロスオミクス手法を用い、加齢マウスの血液内の代謝物をメラトニン投与群と対照群で比較する事で、加齢マーカー及びメラトニン投与によって影響を受ける物質を多数検出した。ステロイド合成パスウェイの中では、これまで長寿指標として知られているデヒドロエピアンドロステロンサルフェート（DHEA-S）が、メラトニン投与によって有意に増加する事をはじめて見出した。さらに、アラキドン酸パスウェイでは、ジヒドロキシエイコサトリエノイックアシッド（DHET）と推定される物質をメラトニンが有意に増加させることも見出した。これらの物質以外にも、加齢により変動する代謝物の中には、メラトニンの長期投与によりレスキューされる物質が多数存在していた。それらの物質同定に関しては、今度の課題である。

＜緒言＞

近年の抗加齢研究において、カロリーリストリクション仮説と酸化ストレス仮説は科学的証明がされつつあるが、多くの部分はいまだに不明のままである。その主な理由は、加齢は生命体全体の変化であり、一つの指標ですべてを証明する事が困難であるからである。

メラトニンは主に松果体から分泌されるトリプトファン由来のホルモンであり、体内時計の同調因子として知られている。メラトニンはシアノバクテリアから植物・動物まで多くの生物でその存在が確認されており、起源が古い物質である。メラトニンは、自身がフリーラジカルのスカベンジャーであるだけでなく、レセプターに結合すると生体内の抗酸化酵素を活性化させるために、近年、抗酸化物質としても注目されている。最近では、糖代謝、脂質代謝や骨代謝に及ぼす作用や様々な生活習慣病との関連も明らかになりつつある。また、マウスではメラトニンの長期投与が、寿命を延長する事が知られている。このようにメラトニンは多岐に渡る効果を持つホルモンであるが、生体内におけるメラトニンの作用の全体像を理解するためには、働きを一つ一つ明らかにしていく手法では限界がある。

一方、細胞や血液などに存在する代謝物を網羅的に同定し、ゲノム情報と統合解析を行うクロスオミク

ス手法を用いた研究は、ある特定の物質の作用全体を網羅的に理解するために有効な手法の一つであると考えられる。そこで、本研究では、加齢マウスにける血液中の代謝物を網羅的に検出し、加齢により変動する酵素遺伝子群などの他のオミックスと組み合わせた統合解析を用いて、加齢に伴い変動するバイオマーカーの探索とメラトニンの長期投与の影響を調べ、さらにその生物学的意味を考察した。

＜方法＞

加齢及びメラトニンによる血液中の低分子物質の検出：BALB/c 雄マウスを管理下にて 18 ヵ月間飼育し、メラトニン投与群と対照群を比較した。サンプルは、4 ヵ月目に血液を採取した群、18 ヵ月目に採取した群、10 ヶ月齢から 8 ヵ月間メラトニン（100μg/mL）を飲料水に加えた群の 3 群を作製し、血漿中に存在する低分子物質の測定に供した。QTOF 型質量分析機にて LC/MS 測定を行い、各ロット n = 3 のテクニカルレプリケート測定を実施した。多変量解析ソフトを用い、分散分析検定後、主成分（PCA）分析及びクラスタリング解析を行い、繰り返しの再現性及び群間比較を実施した。さらに、4 ヵ月齢群、18 ヵ月齢群及びメラトニン投与 18 ヵ月齢群の比較において、同じ変化を示した共通物質（ピーク）を検索した。

メラトニンにより量的変化を起こす低分子物質の生物学的意味の確認：BALB/c 雄マウスを 2 群（各 8 匹）に分け、10 ヵ月齢から 6 ヵ月間、実験群にはメラトニン（100μg/mL）を溶かした水を与えた。メラトニン投与開始後 12，14，16 ヵ月齢の時点で尾部静脈から採血を行った。採血直後に血漿を分離し徐タンパク処理後、上清を測定に供した。QTOF 型質量分析にて代謝物を測定し、メラトニン投与群と対照群の 2 群比較を行った。更に、より詳細な解析の為に、FT ICR 型質量分析機を用い、超高精度質量データを再取得し、再現性、ベースラインの補正を実施後、量的変化と p 値を軸にとり 2 次元表示（volcano plot）を行い、有意差がありかつ量的変化のあるピークを抽出し、メラトニンによる変動ピークリストと定性確認用の質量数を得た。

定性確認用質量データを Scripps Center のメタボロミクス METLIN データベースを用い検索し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）番号をアサインした。次に、加齢により変動する遺伝子リスト 675 種を The Digital Ageing Atlas より取得し、それらのデータと KEGG 番号をアサインした代謝物リストとを同時にパスウェイ上にアサインする機能を持つ KEGG Mapper を利用して、統合解析を実施した。

＜結果＞

マウスの血漿中代謝物の測定結果を PCA 表示したところ、4 ヵ月齢、18 ヵ月齢、メラトニン投与 18 ヵ月齢群の 3 群に大まかに分類できた。PCA 解析において、測定の再現性が高い事が示された。次に各群間のピーク強度変動を詳細に検討する事を目的として、K-平均法及び Heatmap 法によりクラスタリング表示を行った。その結果、加齢に伴い存在量が減少し、メラトニン投与によりその減少が抑えられる質量グループ（物質群）、逆に、加齢に伴い存在量が増加し、メラトニン投与によりその増加が抑制される質量グループ（物質群）が存在することが分かった。この解析により、マウス血漿中には、加齢により量的変化をする物質が多数存在すること、またその中には、長期間のメラトニン投与によりその変動が抑制される物質群が存在する事が明らかとなった。これらの代謝物の生物学的意味を確認する為に、メラトニン投与群と対照群を再度作成し比較したところ、影響を受けるピークが 101 種類存在した。それらを FT ICR 型質量分析器にて再測定し、METLIN 代謝物データベースよりアサインした。次に、代謝物 101 種類と加齢により変動する遺伝子 675 種類の統合解析を KEGG　Mapper を用いて実施し、加齢により変動する酵素と代謝物が共通して存在する 246 種類のパスウェイを見出した。その中では、ステロイド合成

パスウェイに存在する長寿マーカーの一つとして知られている DHEA-S と男性ホルモンであるテストステロンが、ともにメラトニン投与により対照群よりも有意に高値を示した。さらに、アラキドン酸パスウェイでは、DHET と推定される物質の存在量がメラトニン投与により有意に高値を示した。

＜考察＞

代謝物の網羅的解析と他のオミックスを組み合わせたクロスオミックス解析を用いた本研究により、マウスの加齢に伴う血液中代謝物のプロファイリング及びメラトニン投与により影響を受ける代謝物群を見つける事に成功した。加齢に伴いマウスの血漿中に存在する多数の低分子物質の著しい変化は、加齢現象が生体内におけるダイナミックな変化である事を推測させる。同時に加齢により存在量を変化させた代謝物の中で、メラトニンの長期間摂取によりレスキューされる分子候補を 101 種類見つける事ができた。しかし、代謝物測定は LC/MS 法のみで全ての物質を検出できるわけではなく、他の手法も取り入れてさらに広いバイオマーカーの探索を行う必要がある。いずれの測定法においても、装置の検出範囲内で確認出来た物質だけで判断しており、ごく微量しか存在しない物質については検討する事ができない。そのような限界にも注意しながら網羅的解析を進めていくべきである。

本研究にて既知の代謝物としてアサイン出来た物質を KEGG パスウェイ上で加齢により変動する遺伝子と統合解析を行い、加齢に伴い変化する酵素により影響を受ける代謝物を、ステロイド合成パスウェイ及びアラキドン酸パスウェイの中に見出した。構造異性体が存在する代謝物の一部は標準物質を用いて LC/MS 分析にて同定し、メラトニンの加齢と関連した作用を推定した。この手法は様々なストレス応答による解析や疾患原因解析などに応用が可能であり、より一般的な手法として広まる事が期待できる。

代謝物のデータベース検索において、本研究では未同定の 208 種類のバイオマーカー候補（加齢に伴う変化をメラトニンがレスキューする物質群）を見出すことができた。物質同定の手法としては、本研究に用いた質量分析に加え、NMR, FT-IR, X 線等の利用が考えられ、構造の決定後、ターゲット分子測定法にて超高感度分析が LC/MS 法で可能になる。その時点が加齢マーカープロファイリングのゴールとみなされる。

本研究で詳細を検討したステロイド合成パスウェイ中にある物質は加齢指標として既知の物質ではあったが、メラトニン投与により有意に存在量が変動する事を初めて見出だすことが出来た。まだ多くの埋もれているバイオマーカーが今後の研究で明らかにされるものと思われる。

また、加齢に関連する酵素を遺伝子情報から抽出したが、加齢に伴い酵素の活性が変わるのか、量が変化するのかは検討できていない。現在、タンパク質を質量分析にて定量する技術が確立されており、網羅的タンパク質定量を行う事で酵素の動きも十分検討する事が可能となる。この点も今後の研究に期待する。

＜結論＞

加齢マウスの血漿中に存在する代謝物を LC/MS 法で網羅的に測定し、遺伝子情報と同時にフリーサイトを用いて解析する手法を用いて、メラトニンの長期投与によって変動する代謝物マーカー候補を複数見つけた。その中に、長寿マーカーとして知られている DHEA-S がメラトニン投与によって有意に増加する事をはじめて見出すことができた。

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	前田　斉嘉
論文審査担当者	主査：村松　正明 副査：奈良　雅之 副査：伊藤　暢聡
論　文　題　目	**Studies on the effects of the long-term administration of melatonin on blood metabolites in aging mice** （加齢マウスの血中の代謝産物に及ぼす長期メラトニン投与の影響）

（論文審査の要旨）

松果体から分泌されるメラトニンは抗酸化作用を持っており、個体の加齢・老化に関する研究よりマウスに長期投与した場合、寿命が延伸することが知られている。加齢による変化を網羅的・包括的に捉えるにはオミックス的なアプローチが有用であると考えられる。そこで、申請者はメラトニンをマウスに長期投与し、血中メタボロミクス解析を試み、コントロールマウスと比較した。

最初の課題として、血中代謝物における加齢指標マーカーを探索するための LS/MS 法のプロトコールを確立させた。そこで凝固などの問題を回避すべく、試料の前処理および LC/MS による測定法の条件検討を行い、再現性の高いデータを得ることに成功した。ついで、その手法をもちいて、メラトニン投与群と非投与群のマウスから、１２、１４、１６月齢において経時的に採血し、代謝物の網羅的解析を行った。質量スペクトルのデータについて代謝物データベースを用いて検索した結果、メラトニン投与により影響受けるピーク 309 種類のうち、101 種類の代謝物を同定し得た。さらに得られた代謝物のリストを用いてパスウェイ解析を行った。その結果、メラトニン投与群で、ステロイドホルモン合成経路の Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S)変動およびアラキドン酸回路の dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET)に大きな変動がみられた。前者の代謝物は加齢・老化と関係は良く知られているが、後者の代謝物はアラキドン酸パスウェイの関連物質であり、加齢・老化との関連は新しい知見である。今回の実験では LC/MS で得られたピークの同定を公共データベースに依ったため、加齢やメラトニン投与で変動したピークの帰属できてないものも多く、メタボロミクス解析の精度向上は今後の大きな課題である。加齢およびメラトニンによる抗加齢作用という難しい課題に対して、個体レベルでの基礎的データをもたらし、これを起点とした加齢・老化研究の展開が期待されるような新たな知見を得たことは評価できる。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	佐竹　紀彦
論文審査担当者	主査：石川　俊平 副査：仁科　博史 副査：三木　義男 副査：由良　敬
論　文　題　目	**Investigation of pathway biomarkers of hepatocellular carcinoma based on gene regulatory networks** (遺伝子制御ネットワークに基づく肝細胞癌のパスウェイ・バイオマーカーの探索)

（論文内容の要旨）

Abstract

In 2012, hepatocellular carcinoma (HCC) was recognized as the second most common cause of cancer-related death worldwide. Since then, the number of patients with HCC has continued to increase, especially in Europe and the United States. Because molecularly targeted therapy for HCC is currently limited to sorafenib, there is a high demand for novel drugs to improve prognosis.

In this study, we used gene expression profiles from HCC patients to identify pathway biomarkers, which are the molecular networks involved in the pathophysiology of HCC. As identification of an abnormal branch in such molecular networks can contribute to the discovery of new therapeutic targets for HCC, we also aimed to obtain knowledge on candidate molecules that may serve as such therapeutic targets.

Gene expression profiles of 140 HCC specimens were obtained by DNA microarray, and the data set is available at the Integrated Clinical Omics Database (iCOD). Among these, we selected 40 gene expression profiles of cancerous tissues to compare the pathway biomarkers in patients in good (n = 20) and poor prognosis (n = 20) groups. We also evaluated the gene expression patterns of 21 adjacent non-cancerous tissues from HCC patients, as well as 15 adjacent normal liver tissues from metastatic liver cancer patients for the construction of a reference network. Co-expression molecular networks were predicted using GENIE3 R statistical software package (version 3.1.1).

Here, I introduced a method to evaluate an adequate cut-off score for the predicted networks using GINIE3 by calculating a distribution of false discovery rates (FDRs) based on the simulated networks of randomly chosen genes. First, a pathway based on the known biomarker of HCC was evaluated. A co-expression network structure among genes, such as PI3K, AKT, and mTOR, was observed in cancer tissues, whereas the higher expression correlation in genes associated with the p53 tumor suppressor gene was detected in the non-cancerous and the normal liver tissues.

Next, I conducted an exploratory analysis to find further potential pathway biomarkers using curated sets of gene functions such as the Gene Ontology and the KEGG pathway database. A co-expression network was predicted for each of curated gene sets, and the co-expression modules of

a gene set were extracted using pvclust software. Subsets of genes related to telomere maintenance, tyrosine metabolic pathway, downstream of the transcription factor E2F, and aurora kinase B (AURKB) pathway were identified as candidate co-expression modules that could contain the novel pathway biomarkers.

Among them, AURKB has been reported as a prognostic biomarker in HCC, and it has been shown that the E2F family genes are associated with carcinogenesis and cell proliferation. Furthermore, the network visualization could provide additional information to investigate candidate molecules in co-expression modules. Therefore, the proposed method can be utilized to obtain candidate targets based on consistent co-expression modules in a comprehensive gene expression database.

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	佐竹　紀彦
論文審査担当者	主査：石川　俊平 副査：仁科　博史 副査：三木　義男 副査：由良　敬
論　文　題　目	**Investigation of pathway biomarkers of hepatocellular carcinoma based on gene regulatory networks** (遺伝子制御ネットワークに基づく肝細胞癌のパスウェイ・バイオマーカーの探索)

（論文審査の要旨）

本博士論文研究は、肝細胞癌（HCC）患者のがん組織・非がん肝組織等の遺伝子発現プロファイルを用いて、肝細胞癌に特徴的な分子ネットワークを見いだすことを目的とした研究である。

申請者は肝細胞癌（HCC）患者のがん部・非がん部等の遺伝子発現プロファイルを用いて、遺伝子情報ネットワーク(GRN)ソフトの一つである GENIE3 を用いて共発現ネットワークの解析を行った。解析対象としては文献等で明らかになっている肝細胞癌のパスウェイデータに加えて、様々なアノテーションのついた遺伝子セットのデータベースである MSigDB 内のデータを解析することにより肝癌に関連する新規の共発現ネットワークの探索を行った。

その結果　HCC の既知のバイオマーカーに基づく経路の評価においては癌組織では PI3K、AKT、mTOR などの遺伝子間の共発現ネットワーク構造が観察された。また MSigDB 内のデータを使った探索では、テロメア維持関連のパスウェイ遺伝子セット、チロシン代謝経路の遺伝子セット、転写因子 E2F のモチーフの遺伝子セット、AURORA Bパスウェイの遺伝子セットについて、肝癌に関連する共発現ネットワークとして同定した。

細胞癌の臨床的に用いられている分子標的治療薬は少なく、肝細胞癌治療薬の開発は、乳がんや大腸がんなどの他の腫瘍よりも遅れている現状がある。このような背景の下、申請者は肝細胞癌の遺伝子発現プロファイルから推定した共発現ネットワークに基づいて、パスウェイバイオマーカーを探索しており、今後の肝細胞癌のマーカーや治療法の開発に資する研究結果と考えられる。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	出未　誉恵
論文審査担当者	主査：田中　光一 副査：石野　史敏 副査：西村　栄美
論　文　題　目	**Analysis of the function of stress-activated protein kinase MKK7 in adult nervous system** (成体神経系におけるストレス応答性キナーゼ MKK7 の機能解析)

（論文内容の要旨）

[Introduction]

c-Jun N-terminal kinase (JNK) is a member of mitogen-activated protein kinase family. The mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is specific upstream activator of JNK. The activation of JNK leads to the phosphorylation of various substrates and controls diverse physiological processes. It is reported that JNK regulates important roles in neural development such as apoptosis, neural migration and axonal elongation. However, post-developmental functions of MKK7-JNK signal in nervous system have not been elucidated.

[Methods]

For generation of MKK7 deficient adult mouse model (MKK7 cKO), *Mkk7*$^{flox/flox}$ mice were crossed to *Synapsin-Cre* transgenic mice, which express *Cre* in differentiated neurons. For behavioral rhythm analysis, locomotor activity was recorded with an infrared radiation sensor and plotted to actograms. For motor function analysis, hind-limb reflex and footprint were measured. For comprehensive analysis of phosphorylated proteins, mouse brain extracts were subjected to 2D-PAGE and detected by immunoblotting of anti-phospho-Thr-Pro. Mass spectrometry analysis was performed using LC-FT-MS/MS.

[Results]

From activity monitoring, I found that MKK7 cKO mice showed extended period of behavioral rhythms at 2.5 month-old. Analysis of hind-limb reflex and footprint revealed that MKK7 cKO mice showed age-dependent motor dysfunctions, which started from 8 months. Further, by comprehensive analysis of phosphorylated proteins, I found several candidate proteins including collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) as novel targets of MKK7-JNK signal.

[Conclusion]

These results indicate that MKK7-JNK signaling pathway plays physiological roles in regulating circadian rhythm and neural maintenance in adult nervous system.

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	出耒　誉恵
論文審査担当者	主査：　田中　光一 副査：　石野　史敏 副査：　西村　栄美
論　文　題　目	**Analysis of the function of stress-activated protein kinase MKK7 in adult nervous system** (成体神経系におけるストレス応答性キナーゼ MKK7 の機能解析)

（論文審査の要旨）

申請者は､ストレス応答性キナーゼ MKK7 の成体の神経系における役割を解明するため､synapsin-Cre と floxed-MKK7 マウスを交配し conditional MKK7 欠損マウス(cKO)を作成し、表現型の解析を行った。cKO マウスは、脳重量の増加・概日リズム周期の伸長・加齢に伴う運動異常と骨格筋の萎縮など様々な異常を示すことを明らかにした。さらに、これらの表現型の分子機序を解明するため、MKK7-JNK のリン酸化基質の同定を行った。その結果、cKO マウスの脳でリン酸化レベルの低下している候補蛋白質を複数同定した。その中から、cKO マウスの表現型に関与する可能性の高い CRMP-2 を選び、リン酸化部位の詳細な解析を行い、CRAMP-2 の Ser304, Ser308, Thr313 が MKK7-JNK 依存的にリン酸化されることを明らかにした。

これらの結果は、MKK7 の成体の神経系における機能的役割を初めて明らかにしたものである。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	石原　えりか
論文審査担当者	主査：鍔田　武志 副査：三木　義男 副査：樗木　俊聡
論　文　題　目	**Elucidation of the molecular mechanisms underlying active YAP-induced apical extrusion in mammalian cells** (哺乳動物培養細胞を用いた活性型 YAP 誘導性細胞排除現象の分子機構の解明)

（論文内容の要旨）

[Introduction]

Cell competition is a cell-cell interaction by which a cell compares its fitness to that of neighboring cells. In previous study, when transformed epithelial cells expressing the active form of oncogene proteins K-Ras (G12V) or v-Src are surrounded by non-transformed cells, these transformed cells are losers and are removed by apical extrusion. Recently we reported that transformed cells expressing active form of Yes-associated protein (YAP) [YAP (5SA) cells] were extruded apically depending on the status of the neighboring non-transformed cells. However, the molecular mechanism underlying the apical extrusion of YAP (5SA) cells is unknown.

[Methods]

Apical extrusion assay

Triple-well glass base dishes were coated with collagen matrix. Cells were plated at 2 x10^6 per well onto the collagen matrix. YAP (5SA) cells were labeled with red dye and mixed with non-transformed MDCK cells at a ratio of 1:50. After incubation for 24 hr, 2 μg/ml Dox was added to induce cDNA expression. After incubation for 24 hr, Dox-treated cells on collagen were fixed and incubated with Hoechst stain and phalloidin to visualize extrusion., confocal microscopy was used to quantify the percentage of extruding cells.

[Results]

I analyzed mRNA expression by using microarray and screened chemical compounds by using chemical library to identify molecules involved in the apical extrusion. Microarray analysis revealed genes regulating cell proliferation are important for apical extrusion of YAP (5SA) cells. On the other hand, chemical screening revealed the involvement of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in inducing apical extrusion of YAP (5SA) cells. The suppression of apical extrusion of YAP (5SA) cells by Cox-2 inhibitor was rescued by addition of prostaglandin E2 (PGE2), which is produced by Cox-2. Furthermore, antagonist of PGE2 receptor EP2 or EP4 inhibited the apical extrusion of YAP (5SA) cells.

[Conclusion]

These results indicated that the apical extrusion of YAP (5SA) cells depends on cell proliferation and Cox-2-PGE2-EP2/4 signaling.

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	石原　えりか
論文審査担当者	主査：鍔田　武志 副査：三木　義男 副査：樗木　俊聡
論　文　題　目	**Elucidation of the molecular mechanisms underlying active YAP-induced apical extrusion in mammalian cells** (哺乳動物培養細胞を用いた活性型 YAP 誘導性細胞排除現象の分子機構の解明)

（論文審査の要旨）

細胞競合は適応度の低い細胞が組織から排除される現象で、がん細胞を排除することで発ガン抑制にも関わるとされている。申請者らは、組織の大きさの制御や発ガンなどに関わる Hippo Yap 経路の中心的なシグナル分子 YAP の活性型変異体を発現した細胞が細胞競合により排除される現象をすでに報告しており、本論文ではその分子メカニズムの解明を行なった。活性化型 YAP を強制発現し細胞競合を起こす細胞の発現マイクロアレイ解析により、細胞増殖に関わる遺伝子の発現増強が見られ、細胞増殖を薬剤で阻害すると細胞競合が見られなくなることから、細胞競合における細胞増殖の重要性を明らかにした。また、本学の化合物ライブラリーをスクリーニングすることで、細胞競合を制御する化合物を同定し、その化合物の活性から COX2 の関与が示唆された。さらに、COX2 阻害剤や PGE２受容体アンタゴニストでも細胞競合が阻害されることから、PGE2 の関与を明らかにした。細胞増殖や PGE2 がどのようなメカニズムで細胞競合を制御するのかは不明ではあるが、今後細胞競合の分子メカニズムを解明する上で重要な知見と考えられ、学位論文にふさわしいと判断した。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	Dilihumaer Ainiwaer
論文審査担当者	主査：玉村　啓和 副査：小嶋　聡一 副査：伊倉　貞吉
論　文　題　目	**Development of novel modulators for transcriptional co-activator TAZ involved Hippo pathway** (Hippo シグナル伝達系に関与する転写共役因子 TAZ の活性促進分子の開発)

（論文内容の要旨）

1.諸言

Hippo シグナル伝達系は、2005 年に発見されたショウジョウバエの癌抑制シグナル経路であり、細胞密度や細胞接着状態に応じて活性化し、下流の転写共役因子 YAP1（Yes-associatedprotein1）と TAZ（transcriptionalco-activatorwithPDZ-bindingmotif）のリン酸化の調節を介して細胞の数を規定して、器官の大きさの制御や発癌を制御している。[1)]その後、ヒトを含む哺乳類でも Hippo シグナル伝達系が保存されていることが示された。ヒトのがんではしばしば Hippo シグナル伝達系の破錠や YAP1、TAZ の遺伝子重複が認められており、このような癌では臨床予後が悪く、そのためがん治療薬の新たな分子標的として、YAP1 と TAZ の活性を直接、あるいは Hippopathway を介して間接的に阻害する化合物が注目されている。一方で、TAZ は間葉組織幹細胞の骨細胞、筋細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制するため、TAZ を活性化する化合物は骨粗鬆症、筋委縮症、肥満の治療への応用が期待できる。[2)]

本学医学部・畑裕教授らは、TAZ を活性化する薬剤探索のスクリーニング系を培養細胞で構築し、本学医療機能分子開発室所有の化合物ライブラリー約 18,458 種の化合物を用いて TAZ 活性化物質の 3 段階のスクリーニングを行った。その結果、化合物 IBS008738（1）がマウスの筋肉の損傷時の修復を促進し、ステロイドで惹起されたマウス下肢の筋委縮を抑制することを見出した。[3)]以上の背景をもとに、私は、病的あるいは加齢による筋委縮の改善・治療を目指し、IBS008738（1）をリード化合物として、より高活性な TAZ 活性化剤の探索を行った。

2.IBS0087371(1)をリード化合物とした構造展開

構造活性相関研究を行うに際し、まず、化合物ライブラリーに登録された IBS008738（1）の構造と活性の確認および誘導体合成法の確立を目的に、IBS008738（1）を合成した。文献[4)]の方法に従い、p-トルイジンから 3 工程で合成した 4-amino-5-benzoyl-1-(p-toluyl)imidazole（4）と *N*-formylmorpholine とを縮合させて、IBS008738（1）の化学構造に相当する化合物を合成した。合成品を用いて活性評価した結果、化合物ライブラリー中の IBS008738（1）と同等のマウス筋芽細胞 C2C12 の筋細胞分化誘導活性を有することを確認した。

次に、IBS008738（1）をリード化合物として種々の誘導体を設計、合成した。新規化合物の生物活性はマウス筋芽細胞 C2C12 の筋細胞分化能により評価した。まず、IBS008738（1）のイミダゾール 4 位アミジノ基およびモルフォリン基の変換および 1 位フェニル基上の置換基の効果を検討する目的で、これら

の置換基を変換した化合物 5-15 を合成した。その結果、IBS008738（1）のモルフォリンを他のアミノ基に変えた化合物（9、15）およびアミジノ基をイミノ基に変えた化合物 10 は活性が低下した。また、1-フェニル基上の置換基の変換については、IBS008738（1）よりも高活性な化合物は得られなかった。従って、IBS008738（1）のアミジノ基や芳香環上の置換基変換などの構造展開によっては、活性は向上しなかった。一方、IBS008738（1）の合成中間体であるアミノ体(4)がリード化合物である IBS008738（1）よりも高い活性を有することがわかった。両者の EC50 を比較したところ、それぞれ 1.2 および 2.6□M であり、化合物 4 が約 2 倍強い活性を有していることがわかった。更に、化合物 4 の 4 位をアシル化した化合物（化合物 16、17）もしくはアルキル化した化合物（化合物 18、19）およびアミノ基を水素（化合物 20）では活性が低下したが、4 位のアミノ基を水酸基（化合物 27）に変換した化合物は化合物 4 と同程度かそれ以上の活性を示した。水酸基をメトキシ基に変えた化合物 28 の活性が低下した。

活性発現と化合物の立体構造との関係を調べる目的で、合成した化合物の結晶構造解析を行った。化合物 4 では 4 位のアミノ基と 5 位のカルボニル基の間で水素結合が形成され、2 つのフェニル基が向かい合う立体構造をとっていた。一方、IBS008738(1)、イミダゾールの 4 位が無置換の化合物 20，水酸基を持つ化合物 27,メトキシ基を持つ化合物 28 では 5 位のベンゾイル基の向きが化合物 4 とは異なる方向に位置していた。各化合物の ^{1}HNMR の解析から、化合物 4 は溶液（$CDCl_3$）中でも結晶構造と類似の構造で存在していることが示唆された。一方、もう一つの高活性化合物 27 については、溶解性が悪く、DMSO-d_6 中での ^{1}HNMR しか測定できず、詳細な解析はできなかった。現時点では、いずれの立体構造が活性構造であるかの特定はできていないが、イミダゾール 4 位官能基の水素結合ドナー性が活性に重要であると考えている。

3.化合物 4 をリードとした構造展開

前章で述べたように、リード化合物である IBS008738（1）の合成中間体である 4-amino-5-benzoyl-1-(*p*-toluyl)imidazole（4）が IBS008738（1）と同程度かそれ以上の活性を示した。そこで、化合物 4 を第 2 のリード化合物として約１００種類の化合物を合成し、詳細な構造活性相関を明らかとした。

4.標的分子探索プローブの作成

今回合成した化合物の TAZ 活性化機能における標的分子を探索、同定する目的で、これまでの構造活性相関の結果をもとに、アフィニティークロマトグラフィー用の分子プローブの設計と合成を行った。本プローブを磁気ビーズに固定化した化合物を創製し、現在、共同研究者による標的分子の探索が検討されている。

5.総括

本研究では、転写共役因子 TAZ の活性化剤探索のスクリーニングにより、化合物ライブラリー中から見つかった IBS008738（1）をリード化合物として構造展開を行い、高活性な TAZ 活性化化合物の探索研究を行った。その結果、構造活性相関を明らかとするとともに、リード化合物よりも高活性な化合物を数種見いだすことに成功した。また、これらの活性発現の標的となる生体分子を同定するためのアフィニティークロマトグラフィー用の分子プローブを設計、合成した。本プローブを用いた標的分子の探索が進行中である。本研究で得た構造活性相関の知見と、高活性な TAZ 活性化剤は、TAZ の基礎および医薬応用研究に有用であると考えている。

【参考文献】

1) (a) Jianbin, H. ; Shian , W.; Jose, B. *Cell*. **2005**, *12*, 421-434

(b) Halder, G.; Johnson, RL. *Development*. **2011**, *138*, 9-22

(c)Hata, Y. 細胞工学、Vol. 30, *No.9*, 911-915

2)12) Sawada, A.; Kiyonari, H.; Ukita, K.; Nishioka, N.; Imuta, Y.; Sasaki, H.; *Mol Cell Biol.* **2008**, *28*, 3177-3189.

3)Yang, Z; Nakagawa, K; Sarkar, A; Maruyama, J; Iwasa, H; Bao, Y; Ishigami-Yuasa, M; Ito, S; Kagechika, H; Hata, S; Nishina, H; Abe, S; Kitagawa, M; Hata, Y. *Mol.Cell. Biol*. **2014**, *34*, 1607-1621

4)Karl, G.; Gudrun, H. Monatshefte für Chemie. **1976**, *318(2)*, 347-349

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	Dilihumaer Ainiwaer
論文審査担当者	主査：玉村　啓和 副査：小嶋　聡一 副査：伊倉　貞吉
論　文　題　目	**Development of novel modulators for transcriptional co-activator TAZ involved Hippo pathway** (Hippo シグナル伝達系に関与する転写共役因子 TAZ の活性促進分子の開発)

（論文審査の要旨）

申請者は Hippo シグナル伝達系は細胞死・細胞増殖を制御し、これに関与する転写共役因子 TAZ を標的とする活性化剤から筋萎縮治療薬の開発を目指した化合物合成展開研究を行った。具体的には、本学医学部の畑教授らが確立した TAZ 活性化剤による骨格筋組織幹細胞の賦活化作用に注目した C2C12 マウス筋芽細胞の融合を指標とする筋分化をモニターする細胞測定系を用い、本学所有の化合物ライブラリーのスクリーニングで得られた IBS008738 をリード化合物として、広範な構造展開を実施し、数種類の新規化合物の創製に成功した。その過程で、100 個以上の誘導体を合成して、より高活性な TAZ 活性化剤の探索を行った。次に、これらの化合物と TAZ との直接的な相互作用を解析するためのプローブの作製にも取り組み、カルボン酸部位を導入した活性誘導体を用いて FG ビーズに結合させたプローブを創製した。また、C2C12 マウス筋芽細胞の抽出液より、候補タンパク質の捕獲も行った。このように、申請者は Hippo シグナル伝達系に関与する TAZ の活性促進化合物の構造活性相関研究を行い、多数の新規化合物の設計・合成を行い、元の化合物よりも分化誘導活性が高い有用な化合物を得ることに成功した。さらに本化合物の標的分子探索用プローブを創製した。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	MEDZHIDOV　Nazim
論文審査担当者	主査：　清水　重臣 副査：　澁谷　浩司 副査：　石野　史敏
論　文　題　目	**Endosomal trafficking and persistence of the antigen-B cell receptor complex and their significance in B cell activation** (B 細胞活性化における抗原−B 細胞受容体複合体のエンドソーム輸送とその重要性)

（論文内容の要旨）

B-lymphocytes express antigen receptors of immunoglobulin family non-covalently associated with CD79α (Igα) and CD79β (Igβ) on their surface. Together this complex is named B cell receptor (BCR). Upon antigen engagement BCR transduces signaling via immune receptor tyrosine activation motifs (ITAMs) found of Igα and Igβ. BCR stimulation results in the activation of B cells, their proliferation and differentiation into antibody producing plasma cells. Upon antigen encounter BCR is endocytosed rapidly and enters endosomal pathway leading to receptor localization to LAMP1 positive lysosomes. Detailed mechanism of BCR trafficking is not yet understood.

Ubiquitination is a known mechanism to target cell surface receptors to endosomal/lysosomal pathway for degradation. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is the most studied receptor in terms of endocytosis. It is known that upon engagement with EGF, EGFR is activated and becomes strongly ubiquitinated. EGFR interacts with the subunits of the endosomal complex required for transport (ESCRT) machinery, which is a well-known mechanism of sorting cargo into intraluminal vesicles (ILVs) of multivesicular bodies (MVBs). There are four known ESCRT complexes (ESCRT-0, I, II, and III), with ESCRT-III acting in the final step of ILV formation.

Ubiquitination of BCR has been demonstrated, and it is thought that this mechanism controls signaling termination and rapid degradation of the receptor. However, results from our laboratory show that anti-IgM stimulated BCRs can be detected in the cells even after 24 hours post-stimulation. These results prompted us to investigate the mechanism by which BCR can stay in the cells for prolonged period. Studies showing BCR ubiquitination did not compare the extent of ubiquitination and we hypothesized that ubiquitination may not be very efficient and strong, thus favoring receptor persistence.

To address the extent of ubiquitination and downstream effects we expressed functional EGFR in mature mouse lymphoma Bal17 cell line and compared BCR and EGFR ubiquitination, sorting and degradation. Our data shows that EGFR is efficiently internalized in B cells and is able to transduce signals upon EGF treatment. We could observe strong ubiquitination of EGFR upon EGF stimulation in Bal17-EGFR cells at a level comparable to what we observed in HeLa cells. In contrast, ubiquitination of BCR in Bal17 cells could only be detected in the presence of deubiquitinase inhibitor in the lysis buffer, and the signal was low.

We addressed MVB formation by stably expressing in Bal17-EGFR cells GFP-CHMP4 fusion protein that is a component of ESCRT-III protein complex. When we stimulated Bal17-EGFR-GFP-CHMP4 cells with either anti-IgM antibody or EGF, we observed that EGF stimulated samples showed accumulation of GFP-CHMP4, whereas anti-IgM stimulated cells showed mostly diffuse pattern for GFP-CHMP4, similar to unstimulated cells. Furthermore, we addressed degradation of BCR and EGFR and found that BCR persists in the cells while EGFR is rapidly degraded. Together these results show that BCR is only marginally ubiquitinated, does not induce formation of MVBs and persists in the cells for prolonged period.

Keywords: BCR, EGFR, Ubiquitination, MVB, persistence.

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	MEDZHIDOV　Nazim
論文審査担当者	主　査　　清水　重臣 副　査　　石野　史敏 副　査　　澁谷　浩司
論　文　題　目	**Endosomal trafficking and persistence of the antigen-B cell receptor complex and their significance in B cell activation** (B 細胞活性化における抗原–B 細胞受容体複合体のエンドソーム輸送とその重要性)

（論文審査の要旨）

本研究は、B 細胞活性化の程度に、抗原-B 細胞受容体(BCR)複合体の細胞内での安定性が関わっていることを示そうとしたものである。

申請者は、IgM-BCR複合体の動態を、Epidermal Growth Factor (EGF)-EGF受容体(EGFR)複合体の動態と比較して検討した。その結果、EGF-EGFR複合体はユビキチン化を受けてmultivesicular bodyに移動し速やかに分解されるのに対し、IgM-BCR複合体はユビキチン化が軽度であり後期エンドソームに長く停留していることが見出された。また、この分解速度の違いが、BCRシグナルの遷延性に関与している可能性が示された。さらに、BCRに対する抗原の安定性とB細胞活性化との関連を調べたところ、抗原のリソソームでの分解を抑制することにより、B細胞の活性化が増強されることを見出した。これらの結果は、抗原やBCRの細胞内での安定性（特にリソソームを介した分解）がB細胞の活性化を制御していることを示したものである。これらの研究は、B細胞の活性化調節機構の一端を明らかにしたもので、一定の評価ができる。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	平松　健一
論文審査担当者	主査：影近　弘之 副査：細谷　孝充 副査：岸田　晶夫
論　文　題　目	**Fluorination with Anionic Phase-Transfer Catalysts** （アニオン性相間移動触媒を用いたフッ素化反応）

（論文内容の要旨）

<u>序論</u>

生命体のアミノ酸や糖はキラル化合物であり、それらによって構成されるタンパク質や核酸などもキラリティーを有する（ホモキラリティ）。こうした分子によって構築されているヒトの体は、様々な疾患に対する医薬化合物のキラリティーを認識するため、現代の医薬品の研究開発においてキラル化合物を合成することは重要である。触媒的不斉合成反応は効率よくキラル化合物を得ることができる方法であり、遷移金属触媒や有機触媒による不斉合成（キラル４級アンモニウムカチオン相間移動触媒反応など）が精力的に開発されてきた（図 P-1）。一方、医薬品化学において重要となるフッ素化反応に関しても、遷移金属触媒や有機触媒によるエノール基質の不斉合成反応や、種々のフッ素化試薬を用いた反応が開発されてきたが、特にドラッグライクな構造の基質に対する、より有用なフッ素化反応の開発が望まれている。

<u>アニオン性相間移動触媒</u>

キラルリン酸アニオン相間移動触媒を用いた不斉フッ素化反応は、非極性溶媒に溶解しないフッ素化剤(selectfluor)の対アニオンを脂溶性の高いキラルリン酸アニオンと交換することによって反応溶媒に溶解させる反応である（式 1-1）。2011 年にカリフォルニア大学バークレー校の Toste らにより初めて報告され、私も本反応の開発に貢献した（式 1-3）[(1)]。私はこのコンセプトを応用して、以下に示す２つの研究を実施した。

<u>フッ素化により開始される不斉環化反応を用いたエナンチオ選択的なフルオロジヒドロキナゾロンとフルオロベンゾオキサジノンの合成[(2)]</u>

ジヒドロキナゾロンとベンゾオキサジノンは、医薬品化学においてよく用いられるドラッグライクな骨格である。近年、アントラニル酸アミドまたはサリチル酸アミド、アルデヒド、キラルリン酸触媒を用い、プロトン化により開始される不斉環化反応による合成法が報告されているが（式 2-1）、得られる骨格は代謝的に不安定なアミナール構造を有する。その近傍にフッ素を導入すれば安定になることが知られているが、原料となる α-フルオロアルデヒドが不安定なため、従来の手法によるそのような化合物の合成は不可能であった。そこで私は、オルト位に求核剤（フェノール性水酸基やアニリン性アミノ基）を配置したベンズエナミドを基質に用いてキラルリン酸アニオン相間移動触媒を用いたフッ素化反応を行えば、中間体として生成する α-フルオロイミンに求核剤が付加する不斉フルオロ環化反応が進行し、フッ素化された

これらの骨格が得られると考えた（式 2-1）。トルエン溶媒中、ジメチルエナミドとアニリン性アミノ基を持つ基質に対し種々のキラルリン酸アニオン触媒を用いて検討したところ、(*R*)-PhDAP 触媒を用いた際にエナンチオ選択的に不斉フルオロアミノ化が進行し、フッ素化された種々のジヒドロキナゾロンを合成できることがわかった（表 2-1）。本反応における基質構造は、芳香環や求核剤となるアミノ基に種々の置換基が許容されることも明らかとなった（表 2-2, 2-3）。2 つの不斉点を持つジヒドロキナゾロンのエナンチオかつジアステレオ選択的な合成においては、(*R*)-PhDAP 触媒に加え、より不斉環境を大きく構築できるように新規にデザインし合成した(*R*)-4-Ph-PhDAP 触媒を用いた際に、エナンチオかつジアステレオ選択的に目的物が得られることを見出した（表 2-4, 2-5）。なお、化合物の立体化学は X 線結晶解析により決定した（図 2-2, 2-3）。不斉誘起のメカニズムとしては、Goodman や Toste らの不斉リン酸触媒を用いた反応の立体モデルを基に、触媒の立体、水素結合、イオン対相互作用により制御されるモデルを提唱した（図 2-4）。一方、不斉オキシフッ素化反応によるベンゾオキサジノンの合成では、先述の触媒を用いた条件では立体選択性が低かった。これは、求核剤がアニリンからフェノールになることで基質と触媒の相互作用が変わったためだと考え、π-π スタッキングによる相互作用の変化を企図して(*R*)-OCyDAP を触媒として用いたところ、高いエナンチオ選択的な反応を構築することができた（表 2-6）。本反応を立体的に嵩高い基質などに用いると、立体選択性と収率が低下したが、これは触媒との適切な相互作用をとれなくなったことや化合物の安定性が原因によるのではないかと考えられる。

以上の研究により私は、18 種類の基質に対して、最高で 98% *ee*, ジアステレオ比 20:1 以上の立体選択性、中程度から高収率で目的とする化合物群を得ることに成功した。

<u>脂溶性アニオン相間移動触媒を用いたピロールの緩和な直接的フッ素化反応 (3)</u>

ピロールは電子豊富で反応性が高い特徴を有しているが、嵩高い置換基や電子求引基を導入した骨格は、医薬品の骨格として汎用されている（図 3-1）。フルオロピロールの合成には、ピロールを直接フッ素化する反応や縮環反応が用いられるが、より簡便かつ多様なフルオロピロール誘導体を合成可能な反応の開発が望まれている。近年、各種フッ素化反応に関しては、取り扱い容易な selectfluor が汎用されているが、ピロール誘導体のフッ素化反応に *N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）などの均一系の極性溶媒中で用いた際、その高い反応性のために反応が複雑化し極めて収率が低くなるという問題があった。そこで私は、アニオン性相間移動触媒のコンセプトを応用したピロールのフッ素化反応を考案した。selectfluor は非極性溶媒には溶解しないが、脂溶性の高いアニオンが対イオンとなることで反応溶媒に溶解するようになり、緩和な条件によるフッ素化が可能になると考えられる（式 3-1）。まず、ピロール-3-カルバルデヒドを用いて反応条件を検討した。ステアリン酸触媒を用いた条件では低収率だったため、より酸性度の強いリン酸触媒を用いて種々検討したところ、selectfluor 、(*R*)-PhDAP 触媒、塩基としてリン酸ナトリウムをテトラヒドロフラン（THF）溶媒中で用いる条件が最適であることを見出した（表 3-1）。本条件により、3 位に電子求引基、窒素原子上に水素原子またはアルキル基を持つ 15 種類のピロールの基質に対して、中程度の収率で 2 位または 5 位をフッ素化した目的物を得ることができた。3 位が無置換の *N*-メチルピロールを用いた反応においても、2-フルオロ-*N*-メチルピロールを得ることに成功した（表 3-2）。本反応の進行には、触媒および塩基が必要であったことから、脂溶性の高いリン酸アニオンが selectfluor の対アニオンになることにより、緩和な条件でのフッ素化が行われる触媒系が関与していることが示唆される。3 位にアミドの水素結合供与基を持つピロールを基質とする反応では、位置選択性が若干変わったが、これは置換基が触媒と相互作用していたためと考えられる。また、非常に強い電子求引基や嵩高い置換基を持つ基質では、本反応はほとんど反応が進行しなかった（図 3-2）。

結論

私は、アニオン性相間移動触媒を用いることによって、フッ素化により開始される不斉フルオロ環化反応を開発し、立体選択的にフッ素化された種々のジヒドロキナゾロンやベンゾオキサジノンを得ることに成功した。ドラッグライクなこれらの化合物は、医薬品化学研究において有用となる。本コンセプトを応用することで、プロトン化によって開始される種々の不斉環化反応をフッ素化へと置き換えることができる可能性があり（式 4-1）、また、相間移動反応条件下、カチオン中間体とキラルリン酸との対イオンを形成させることで、種々の新規不斉反応開発へ発展する可能性があると考えている（式 4-2）。

また、アニオン性相間移動触媒を用いる同様の戦略により、反応性の高いピロール誘導体の緩和な条件下でのフッ素化反応の開発に成功した。本反応は位置選択的ではないが、触媒との相互作用が可能な置換基を持つ基質を適切に用いることにより、位置選択性が達成できる可能性がある。さらに、本反応により、構造が単純ながら新規となる構造が多数得られており、医薬品化学でのビルディングブロックとしての活用が期待される。また、この緩和な相間移動触媒反応のコンセプトは、カチオン性の酸化剤に適用することで、緩和な新規酸化反応の開発につながる可能性があると考えている（式 4-3）。

参考論文

(1) Phipps, R. J.; Hiramatsu, K.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8376−8379.

(2) Hiramatsu, K.; Honjo, T.; Rauniyar, V.; Toste, F. D. *ACS Catal.*, **2016**, *6*, 151−154.

(3) Hiramatsu, K.; Tamamura, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 3491−3494.

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	平松　健一
論文審査担当者	主　査　　影近　弘之 副　査　　細谷　孝充 副　査　　岸田　晶夫
論　文　題　目	**Fluorination with Anionic Phase-Transfer Catalysts** （アニオン性相間移動触媒を用いたフッ素化反応）

（論文審査の要旨）

不斉合成は生理活性物質など、光学活性機能性分子を効率よく合成する手法として有用であり、中でも、触媒的不斉合成は、不斉源を極わずかの量用いるだけで光学活性物質を得ることができることから様々な手法が開発されてきた。光学活性なアニオン性触媒を用いた触媒的不斉反応として、申請者が所属していた Toste 教授の研究グループ（米国カリフォルニア大学バークレー校）では、相関移動触媒を応用した画期的な方法を開発していた。申請者は、本新規触媒的不斉合成法のコンセプトを基盤として新しい反応を開発した。

まず、申請者は、本反応を、医薬品などの機能性分子においてよく用いられるジヒドロキナゾロンとベンゾオキサジノン骨格へ応用することを検討した。すなわち、オルト位に水酸基またはアミノ基を有するベンズエナミドの分子内不斉環化を、キラルリン酸アニオン相関移動触媒を用いて行うことで、フッ素化と同時に環化して光学活性なジヒドロキナゾロンもしくはベンゾオキサジノン骨格を構築する反応を設計した。新規キラルリン酸アニオン性相関移動触媒の開発も含む詳細な反応条件の検討により、広範な基質に対して高収率および高エナンチオ選択的に目的とする光学活性フッ素化合物を合成することに成功した。

ついで、申請者は、生理活性物質などの機能性分子の骨格として様々な複素環化合物が用いられている中で、特にフッ素化ピロールが合成の煩雑さ故に、その応用性が検討されていないことに着目し、上記関移動触媒を用いた反応により直接的にピロールをフッ素化する新規合成法の開発を検討した。その結果、中程度の収率ではあるが、目的とするフッ素含有ピロール類を合成できることを見いだした。反応効率や選択性などの改善すべき点はあるものの、フッ素含有ピロールの直接的な新規合成法として有用な反応である。

以上のように、申請者は、独自のアニオン性相関移動触媒を用いた新しいフッ素化反応を開発し、機能性分子開発に有用な骨格構築に成功した重要な研究成果である。

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	森田　隆太
論文審査担当者	主査：玉村　啓和 副査：伊藤　暢聡 副査：平野　智也
論　文　題　目	アライン中間体を経由した縮環型複素環化合物の合成法の開発

（論文内容の要旨）

【緒言】

最近、新たな生物活性化合物を見いだすための手法として、化合物ライブラリーを利用し、多数の化合物に関して生物活性を一挙に調べるハイスループットスクリーニングが盛んに行われるようになってきた。そのため、複雑な骨格や置換基を有する多様性に富んだ化合物群を少ない労力で創出できる手法がますます重要になってきている。なかでも、モジュールとなる分子を組み合わせてライブラリーを構築するモジュラー合成が注目されている。また、化合物ライブラリーを構成する上で privileged scaffold と呼ばれる化合物群が重要視されている。Privileged scaffold は、生物活性を示す化合物に散見される骨格群のことであり、多彩な縮環型複素環化合物が多く含まれている。また、複素環化合物は医薬品のみならず、農薬、触媒、反応試薬、機能性材料などとして、幅広い分野において重要な役割を担っている。しかし、複素環化合物の性質は、それぞれの複素環ごとに大きく異なることから、単環式の多置換ベンゼンと比べて、様々な置換基を有する多置換複素環化合物の合成は容易ではない。なかでも、縮環型複素環化合物の合成は困難であるため、これらを効率的に合成できる手法の開発が、有機合成化学における重要な課題となっている。これに対して、私は博士論文研究として、「アライン」の化学を深化させることで、縮環型複素環化合物の合成を実現する新しい手法の開発に取り組んだ。芳香族化合物のベンゼン環の一部が三重結合となったアラインは、極めて反応性の高い中間体として、縮環型のベンゼン類の合成に有用であることから注目されてきた。私は、本博士論文研究において、数あるアライン前駆体の中でもとくに σ ヨードアリールトリフラートの合成の容易さに着目し、privileged scaffold であるベンゾトリアゾール、ベンゾチオフェン、ベンゾフランに多彩な置換基を配置した複素環化合物の簡便合成法の開発を、2 種のアプローチで試みた。1 つ目のアプローチでは、privileged scaffold であるベンゾトリアゾール類の合成において、アラインを用いる手法を開発した。第 2 章では、繊細なアジド基を配置したアライン前駆体から対応するアラインを発生させる手法の開発と、これを利用する縮環型ベンゾトリアゾール類などの合成に関して述べる。また、2 つ目のアプローチでは、privileged scaffold の一部を三重結合にしたアライン中間体を利用する縮環型複素環化合物の合成法を開発した。第 3 章では、チエノベンザインを経る縮環型ベンゾ[*b*]チオフェン類の合成法の開発について、そして第 4 章では、フラノベンザインを経る縮環型ベンゾ[*b*]フラン類の合成法の開発について述べる。

【第 2 章】アジド基を有するアライン前駆体の分子内および分子間反応を利用したベンゾトリアゾール類の合成

ベンゾトリアゾールは、privileged scaffold の 1 つであり、アジドとアラインから簡便に合成できる生物活性の核となる骨格である。ベンゾトリアゾール骨格を有する様々な生物活性化合物が報告されているものの、多置換ベンゾトリアゾールそのなかでも縮環型ベンゾトリアゾールの合成は未だに容易ではない。以前に所属研究グループでは、ビストリアゾールライブラリーの構築を目指し、アジド–アライン、アジド–末端アルキン環化付加反応を連続的に、かつ望みの順番で行える手法を開発した。具体的には、末端アルキン部位を有するアライン前駆体に、アジド存在下でシリルメチル Grignard 反応剤を作用させると、末端アルキン部位を損なうことなく、アジド–アライン環化付加反応が効率よく進行することを明らかにした。続いて、銅触媒を用いた末端アルキンとアジドとの環化付加反応を行うことで、ベンゾトリアゾール部位と 1,2,3-トリアゾール部位を有するビストリアゾールを合成できた。また、順番を入れ替えて、先に銅触媒を用いた末端アルキンとアジドとの環化付加反応を行った後に、アジド–アライン環化付加反応を行った場合も効率よく進行した。これに対して、今回私は、さらなる化合物ライブラリーの拡充を目指して、この置換基の組み合わせを変え、末端アルキン部位の代わりにアジド基を有するアライン前駆体を設計した。すなわち、アジド基を有するアライン前駆体に対して、2 度の環化付加反応をそれぞれ区別して行うことで、ビストリアゾール化合物を簡便に合成できると期待した。さらに、アジド–アライン環化付加反応を分子内で行うことができれば、縮環型ベンゾトリアゾール類が合成できると考え、その検討を行った。その結果、共通する前駆体を用いて分子間反応でアジド–アルキン、アルキン–アジド環化付加反応を連続して行うことでビストリアゾール類が得られ、分子内環化付加反応で縮環型ベンゾトリアゾールを合成することができた。どちらの場合においても、シリルメチル Grignard 反応剤を利用すると多彩な官能基を損なうことなくベンゾトリアゾール類が得られた。ボロン酸とアルキンの 2 つの分子の縮環型ベンゾトリアゾールへの集積に成功し、反応相手であるモジュールを変えていくことで、幅広いドラッグライクな 4 環式のベンゾトリアゾール類を簡便に合成できることから、ライブラリーを効率よく拡充できる有用な手法になると期待される。

【第 3 章】チエノベンザインを利用した多置換ベンゾ[*b*]チオフェンの合成

ベンゾ[*b*]チオフェン類は、材料科学や創薬科学などで重要な役割を果たしている化合物群である。しかし、多置換ベンゾチオフェンの合成は容易ではなく、所望のベンゾチオフェン類を簡便に合成できる手法の開発が強く望まれている。これまで、多置換ベンゾチオフェンの合成には、ベンゾチオフェンに対する求電子置換反応などの芳香環の置換基を増やす手法が広く利用されてきたが、その位置選択性の制御が困難であるという問題があった。また、スルフィド類の環化反応も利用されるが、その基質適用範囲は必ずしも広くない。これに対して、今回私は、ベンゾチオフェン環の一部が三重結合になったチエノベンザイン中間体に着目した。最近、所属研究グループでは、シリルメチル Grignard 反応剤が o-ヨードアリールトリフラートからアラインを発生させる活性化剤として有用であることを見いだし、これを利用することで、ベンザインとチアゾールとが縮環したチアゾロベンザインの効率的な発生に成功した。さらに、発生させたチアゾロベンザインの環化付加反応や付加反応によって種々の多置換ベンゾチアゾールを合成できることを明らかにした。この知見をもとに、本研究では、6-ヒドロキシベンゾ[*b*]チオフェンから短工程で合成できる前駆体を用いてチエノベンザインの発生とこれを利用した多置換ベンゾチオフェンの合成に関して検討した。その結果、privileged scaffold であるベンゾチオフェンの一部がアラインとなったチ

エノベンザインの効率的な発生とその変換に成功し、多彩なベンゾチオフェン化合物を効率よく合成できることを明らかにした。さらに、本手法を利用し生物活性化合物の類縁体の合成にも成功した。本手法で、通常合成が容易でない縮環型ベンゾチオフェンライブラリーが構築できると期待される。

【第 4 章】フラノベンザインを利用した多置換ベンゾ[*b*]フランの合成

ベンゾ[*b*]フラン類は、医薬品や農薬、機能性材料などとして、重要な役割を果たしている化合物群である。しかし、多置換ベンゾフランの合成はいまだ容易ではない。これに対して、私は、第 3 章で述べたチエノベンザインの反応性を利用した多置換ベンゾ[*b*]チオフェン合成法を応用し、多置換ベンゾフラン類の簡便合成法の開発に取り組んだ。これまで、フラノベンザインについて、わずかに報告例があるものの、前駆体の合成が容易でないこともあり、詳細な検討は行われていなかった。これに対して、私は、合成容易な σ ヨードアリールトリフラート型のフラノベンザイン前駆体を合成し、フラノベンザインの発生法と様々なアライノフィルとの反応を検討した。その結果、ベンゾフランの一部がアラインとなったフラノベンザインを利用することで、縮環型のベンゾフランの簡便合成に成功した。さらに、本手法がフラン環が縮環した π 拡張分子の合成へと応用できることも明らかにした。今後、アラインの多彩な変換反応によって、多様性に富んだベンゾフランライブラリーを簡便に構築できると考えている。

【結論】

本博士論文研究において、アライン中間体を利用することで、幅広い縮環型複素環化合物を簡便に合成できることを明らかにした。まず、アジド基を有する σ ヨードアリールトリフラートのアライン前駆体を用いることで、分子間反応によってビストリアゾール類を簡便に合成できることを見いだすとともに、同じ前駆体から、分子内反応によって縮環型ベンゾトリアゾール類が効率よく得られることを明らかにした。このときシリルメチル Grignard 反応剤が活性化剤として最適であった。また、privileged scaffold の一部が三重結合となったチエノベンザイン、および、フラノベンザインを利用することで、従来法では合成困難な縮環型複素環化合物の合成法の開発に成功した。さらに、この手法が、生物活性化合物の類縁体や π 拡張型分子の合成にも応用できることを明らかにした。これらの結果は、ベンゾフラン、ベンゾチオフェンなどの性質の異なる複素環から対応するアラインを発生でき、これらを効率よく変換できることを示しており、本手法が、他のさまざまな縮環型複素環化合物の統一的な合成手法として発展することが期待される。加えて、今回開発した手法を用いることで、反応相手を変えるだけで複雑に置換された多彩な複素環化合物を効率よく合成できることから、化合物ライブラリーを簡便に拡充でき、そこから新たな生物活性分子などさまざまな機能性分子の発見へとつながると期待される。

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	森田　隆太
論文審査担当者	主査：玉村　啓和 副査：伊藤　暢聡 副査：平野　智也
論　文　題　目	アライン中間体を経由した縮環型複素環化合物の合成法の開発

（論文審査の要旨）

申請者は多様性を指向した有機合成を展開し、scaffold structure を基盤とした多様な化合物群を一挙に簡便に合成する手法の開発を目指した。具体的に、アライン中間体を用いた縮環型複素環化合物の合成法の開発、すなわち、アジド基を有するアライン、チエノベンザイン、フラノベンザインの 3 種を利用した合成を行い、それぞれにおいて、ベンゾトリアゾール、チエノベンザイン、フラノベンザイン等の複素環化合物の合成に成功した。種々の多環式化合物群の合成、従来法では困難な置換基の導入等に有用であると考えられ、実際のライブラリーへの多様な化合物群の供給へ展開できると思われる。

このように、申請者はアジド基を有するアライン前駆体の環化反応を用いたベンゾトリアゾール類の合成、ベンザイン誘導体を用いた多置換ベンゾチオフェンおよびベンゾフランの合成を行った。モジューラー合成、privileged scaffold の創出にも貢献している。