

2010. 4

特集号



国立大学法人 高知大学学報

(題字：相良祐輔学長)

高知大学学位授与記録第三十九号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *

高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 101 号	濱田 史昌	Therapeutic effects of maternal melatonin administration on ischemia/reperfusion-induced oxidative cerebral damage in neonatal rats (出生後の酸化的脳障害を抑制可能な経母体的メラトニン投与時期)	1
甲医博第 102 号	佐竹 宏文	The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG 15) is overexpressed in human prostate cancer (前立腺癌で高発現している ISG15 の同定と機能解析)	6
甲医博第 103 号	秋森 豊一	Quantitative Distribution of Brush Cells in the Rat Gastrointestinal Tract: Brush Cell Population Coincides with NaHCO ₃ Secretion (NaHCO ₃ 分泌と対比したラット消化管における刷子細胞の分布の検討)	10
甲医博第 104 号	横山 麗子	Enantioselective construction of nitrogen-substituted quaternary carbon centers adjacent to the carbonyl group in the cyclohexane ring: first asymmetric synthesis of anesthetic (S)-ketamine with high selectivity (世界初の(S)-ケタミン不斉合成: シクロヘキサン環上のカルボニルに隣接する、窒素を持つ4級炭素の不斉構築)	14
甲医博第 105 号	Radhakrishnan Geethalakshmi	Intake of dissolved organic matter from deep seawater inhibits atherosclerosis Progression (海洋深層水由来難溶性有機物の摂取は動脈硬化の進行を抑制する)	19
甲医博第 106 号	足立 義博 トファー	Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer (Z e b 1によるT-カドヘリン抑制は胆嚢癌の浸潤性を高める)	25

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲医博第 107 号	石橋 綾子	Serum Fetuin-A is an Independent Marker of Insulin Resistance in Japanese Men (血中フェチインAは日本人男性におけるインスリン抵抗性の独立した指標である)	30
甲医博第 108 号	井上 紘輔	Cisplatin-Induced Macroautophagy Occurs Prior to Apoptosis in Proximal Tubules <i>in Vivo</i> (シスプラチンによって誘導される近位尿細管でのマクロオートファジーはアポトーシスに先行する)	35
甲医博第 109 号	岡崎 瑞穂	PPAR β/δ Regulates the Human SIRT1 Gene Transcription via Sp1 (SIRT1 遺伝子の発現は転写因子 PPAR β/δ により調節され Sp1 が仲介する)	40
甲医博第 110 号	谷口 義典	Positron Emission Tomography/Computed Tomography; a clinical tool for evaluation of enthesitis in patients with spondyloarthritides (PET/CT は、脊椎関節炎患者における付着部炎の評価のための有用な臨床的手法である)	45
甲医博第 111 号	西岡 千恵	Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells (mTORシグナルの阻害はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による急性骨髄性白血病の分化誘導能や細胞増殖抑制を高める)	50
甲医博第 112 号	田中 健二郎	Juvenile Social Experience Regulates Central Neuropeptides Relevant to Emotional and Social Behaviors (幼若期の社会環境が不安や社会性に関わる神経ペプチドに及ぼす影響)	56
甲医博第 113 号	西村 拡起	Mechanisms of γ -hydroxybutyric acid production during the early postmortem period (死後早期における γ -ヒドロキシ酪酸の産生機序)	61
甲医博第 114 号	堂野 純孝	Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants (乳幼児における Epstein-Barr ウイルスによる伝染性単核症の診断)	66
甲医博第 115 号	干場 浩	Isolation and characterization of a novel <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage Φ MR25 and its therapeutic potential (新規黄色ブドウ球菌バクテリオファージ Φ MR25 の分離、性状解析、およびその治療における可能性)	72

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 116 号	中村 久美子	<p>Presynaptic BK type Ca²⁺-activated K⁺ channels are involved in prostanoid TP receptor-mediated inhibition of noradrenaline release from the rat gastric sympathetic nerves (プロスタノイド TP 受容体を介したラット胃交感神経からのノルアドレナリン遊離抑制には、神経終末に存在する Ca²⁺ 依存性 BK 型 K⁺チャンネルが関与する)</p>	77
甲医博第 117 号	Wickramage Don Susiji Jayanath Wickramasinghe	<p>Molecular biological studies on phosphagen kinase gene in <i>Toxocara canis</i>, one of the causative agents of zoonosis (人獣共通感染症の原因病原虫である犬回虫のフォスファゲンキナーゼに関する分子生物学的研究) [1] <i>Toxocara canis</i>: Molecular cloning, Characterization, expression, and comparison of the kinetics of cDNA-derived arginine kinase (犬回虫: アルギニンキナーゼ遺伝子の cDNA クローニング並びに組替えタンパク質の発現とその酵素機能) [2] Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of <i>Toxocara canis</i> for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model (アルギニンキナーゼ組替えタンパク質を利用した犬回虫内臓幼虫移行症の高感度 ELISA 法の開発)</p>	82

氏名(本籍)	濱田 史昌(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第101号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年1月29日
学位論文題目	Therapeutic effects of maternal melatonin administration on ischemia/reperfusion-induced oxidative cerebral damage in neonatal rats (出生後の酸化的脳障害を抑制可能な経母体的メラトニン投与時期)
発表誌名	Neonatology, 2010; 98: 33-40

審査委員	主査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	脇口	宏
	副査	教授	杉浦	哲朗

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 濱田 史昌

論文題目

Therapeutic effects of maternal melatonin administration on ischemia/reperfusion-induced oxidative cerebral damage in neonatal rats. (出生後の酸化的脳障害を抑制可能な経母体的メラトニン投与時期)

(論文要旨)

【目的・背景】出生後の中枢神経機能障害は、医学的のみならず社会的にも重要な問題点であるが、その発症機序の解明と予防法は未だ確立していない。我々のこれまでの検討によれば、胎仔脳は活性酸素で障害されやすく、脳内の脂質のみならずDNAも酸化変性させ、ATP合成の中心であるミトコンドリア機能をも障害することをラットにおいて明らかにしてきた。メラトニンは、脳の松果体より分泌されるホルモンで、強力な抗酸化作用を有し、胎盤通過性も良好であることが知られている。これまで、メラトニンを予防的に経母体的に前投与し、胎仔期に酸化ストレスを受けて出生した新生仔ラット脳ミトコンドリアの機能、形態、行動障害に及ぼす影響を検討することで、酸化的脳障害に対するメラトニンの予防効果を検討した。しかし、実際の臨床においては、虚血や低酸素などのエピソード発症後に治療を要することがほとんどである。そこで、次に酸化ストレスを発生させた後、経時的にメラトニンを経母体投与し、出生後の新生仔ラット脳ミトコンドリアの機能及び脳の組織障害を評価することで、酸化的脳障害に対するメラトニンの therapeutic period を検討した。

【方法】胎仔に酸化ストレスを加えるため、妊娠16日目のラットの子宮動静脈を30分間虚血後、再灌流させた虚血・再灌流(IR)群、sham opを施行したcontrol(C)群、妊娠16日目に虚血・再灌流し、再灌流直後(0時間後)と1、3、6、12時間後に10mg/kgのメラトニンをラットの腹腔内に注入後、20 μ g/mlのメラトニン水を自由飲水させたメラトニン(M)群の3群に分別した。自然分娩した日令1のラットから脳の組織を採取し、メラトニンの呼吸機能の指標であるrespiratory control index(RCI)を酸素電極法で測定した。また日令1のラットの脳を摘出し、海馬のCA1、CA3領域の組織学的変化を検討した。組織障害の程度は100 \times 100 μ mの範囲の正常細胞/全細胞の比で評価した。


【成績】RCIはC群の 2.47 ± 0.24 に比較し、IR群では 1.80 ± 0.10 と有意に低値を示したが、M群では虚血再灌流した直後(0時間後)、1時間後投与では0hr; 2.43 ± 0.07 、1hr; 2.22 ± 0.14 とIR群より有意に高値であった。しかし、虚血再灌流した3、6、12時間後は3hr; 1.89 ± 0.09 、6hr; 1.94 ± 0.11 、12hr; 1.93 ± 0.08 とC群より有意に低値でIR群と同様のレベルであった。海馬のCA1領域の正常細胞の比は、C群の 0.93 ± 0.01 に比較し、IR群では 0.46 ± 0.03 と有

意に低値を示したが、M群では虚血再灌流した直後(0時間後)、1、3時間後は 0hr ; 0.92 ± 0.01 、1hr; 0.86 ± 0.02 、3hr; 0.80 ± 0.02 と IR 群より有意に高値であった。しかし、虚血再灌流した 6、12 時間後は 6hr; 0.50 ± 0.02 、12hr; 0.54 ± 0.03 と C 群より有意に低値で IR 群と同様のレベルであった。

海馬の CA3 領域の正常細胞の比は、C 群の 0.91 ± 0.01 に比較し、IR 群では 0.53 ± 0.02 と有意に低値を示したが、M 群では虚血再灌流した直後(0 時間後)、1、3 時間後は 0hr ; 0.90 ± 0.02 、1hr; 0.86 ± 0.01 、3hr; 0.77 ± 0.03 と IR 群より有意に高値であった。しかし、虚血再灌流した 6、12 時間後は 6hr; 0.54 ± 0.04 、12hr; 0.55 ± 0.01 と C 群より有意に低値で IR 群と同様のレベルであった。

【結論】 今回の研究結果から、妊娠中の酸化ストレス発生後 1 時間以内に経母体的にメラトニンを投与すると、新生仔ラットの脳ミトコンドリア呼吸機能障害と海馬の組織障害を抑制できた。このことから、酸化ストレス発生後 1 時間以内のできるだけ早期にメラトニンを母体に投与することにより出生後の酸化的脳障害を抑制的できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏名	濱田史昌
審査委員	主査氏名 佐藤隆幸	
	副査氏名 脇口宏	印
	副査氏名 杉浦哲朗	印

題目 Therapeutic effects of maternal melatonin administration on ischemia/reperfusion-induced oxidative cerebral damage in neonatal rats
 (出生後の酸化的脳障害を抑制可能な経母体的メラトニン投与時期)

著者 Fumiaki Hamada, Kazushi Watanabe, Akihiko Wakatsuki, Ryuhei Nagai, Koichi Shinohara, Yoshihiro Hayashi, Rina Imamura, Takao Fukaya

発表誌名、巻(号)、ページ(～)、年月
 Neonatology (in press)

要旨

妊娠高血圧症候群や子宮虚血などは、胎盤組織の重大な酸化ストレスをひきおこし、胎児の中樞神経機能障害の原因になる。申請者が所属するグループは、これまでに、松果体ホルモン、メラトニンの母体への投与によって胎盤組織内酸化ストレス反応や子宮内胎児発育遅延が軽減可能であることを見出しているが、本研究では、これらの成果を背景に、胎盤酸化ストレスによる胎児の中樞神経機能障害を母体へのメラトニン投与によって予防できるか否かを動物モデル実験で検証した。

胎盤酸化ストレスは、妊娠16日目のラット子宮動静脈を30分間クランプした後、に解除する方法により作製し、その後妊娠を継続させた。治療群では、子宮の虚血再灌流後にメラトニン含有水(20 μ /mL)を与えるとともに、直後、1、3、6、12時間後のいずれかの時期に体重1kg当たり10mgのメラトニンを腹腔内投与した。中樞神経障害の評価は、自然分娩された日齢第一日目の脳組織を採取し、ミトコンドリアの呼吸活性を酸素電極法で測定するとともに、海馬CA1およびCA3の組織学的変化を光学顕微鏡で観察した。

その結果、(1)胎盤に酸化ストレスを加えると脳組織ミトコンドリアの呼吸活性が低下するが、ストレス後1時間以内のメラトニン腹腔内投与によって呼吸活性の低下が防止されること、(2)胎盤酸化ストレスによって誘発される海馬CA1およびCA3領域の錐体細胞傷害は、ストレス後3時間以内のメラトニン腹腔内投与によって防止されることがあきらかになった。

以上の結果から、申請者は、胎盤酸化ストレスによってひきおこされる胎児の中樞神経障害が、メラトニンの母体への投与をストレス直後から1時間以内に行うことによって防止しうると結論付け、将来、臨床例での検証研究につなげていきたいとその展望を述べた。

審査員一同は、これらの知見が、胎児の中樞神経機能障害を防止する新規治療法の開発につながるものであると高く評価し、申請者の論文が、高知大学博士(医学)の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(本籍)	佐竹 宏文(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第102号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年2月26日
学位論文題目	The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG 15) is overexpressed in human prostate cancer (前立腺癌で高発現している ISG15 の同定と機能解析)
発表誌名	Oncology Reports, 23(1): 11-16, 2010年1月

審査委員	主査	教授	山本	哲也
	副査	教授	李	康弘
	副査	教授	横山	彰仁

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 佐竹 宏文

論 文 題 目 The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15
(ISG 15) is overexpressed in human prostate cancer
(前立腺癌で高発現している ISG15 の同定と機能解析)

(論文要旨)



【目的】前立腺癌の早期発見・治療において前立腺特異抗原(PSA)は有用であり、予後改善に大いに貢献している。しかし問題点として、①PSA が悪性度(Gleason score)や進行度(臨床病期)と必ずしも相関しないこと、また②癌特異的なマーカーではない為、限局性前立腺癌に対する部分的治療(focal therapy)の効果判定がPSAでは困難であることがあげられる。今後、悪性度や進行度また治療効果を正確に判定できるような癌特異的なバイオマーカーの開発が必要になると推察される。そこで我々は、前立腺癌の新規治療法やバイオマーカーの開発につながる遺伝子の同定を目的として、以下のマイクロアレイを用いての研究をおこなった。

【対象と方法】前立腺針生検により得られた未治療の進行前立腺癌10症例を対象とした。凍結切片からLaser Microbeam Microdissection(LMM)法を用いてGleason score8-9の悪性度の高い癌細胞のみを選択的に採取し、cDNAマイクロアレイ解析を行った。また同時に正常前立腺上皮細胞もLMMにて選択的に採取し、正常前立腺5例分のmixtureをcDNAマイクロアレイのコントロールに使用した。

【結果】進行前立腺癌 10 症例の遺伝子発現解析を行ない、50%以上の症例で5倍以上の発現上昇を認めるものとして384遺伝子を抽出した。さらにその中から癌での報告のない分泌蛋白に絞り込んだ結果、Ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG 15)を同定した。ISG15pAbを用いて、前立腺癌 57 症例の前立腺全摘標本を用いて免疫組織染色を行なった結果、正常前立腺上皮細胞と比較して前立腺癌細胞で ISG15 の高発現を確認した。さらにヒト前立腺癌細胞株 22Rv1 を用いて ISG15 の安定発現細胞株を樹立したところ細胞増殖の促進が観察され、逆に siRNA で ISG15 の遺伝子発現を Knock down すると顕著な細胞増殖の抑制が観察された。また培養上清を用いた WB により ISG15 が分泌蛋白であることを確認した。

【まとめ】LMM ならびに cDNA マイクロアレイを用いて、進行前立腺癌の正確な遺伝子発現プロファイルを作製した。前立腺癌で高発現している ISG15 は、前立腺癌細胞の増殖や生存に重要な役割を担っていると考えられ、新規治療法やバイオマーカーの開発につながる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名		佐 竹 宏 文
審 査 委 員	主 査 氏 名	山 本 哲 也	
	副 査 氏 名	李 康 弘	
	副 査 氏 名	横 山 彰 仁	印

題 目 The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG 15) is overexpressed in human prostate cancer
(前立腺癌で高発現している ISG15 の同定と機能解析)

著 者 Hirofumi Satake, Kenji Tamura, Mutsuo Furihata, Takashi Anchi, Hatsune Sakoda, Chiaki Kawada, Tatsuo Iiyama, Shingo Ashida, Taro Shuin

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Oncology Reports, 23(1): 11-16, 2010年1月

要 旨

【背景・目的】前立腺癌の早期発見・早期治療において前立腺癌特異抗原 (PSA) は有用なマーカーであり、予後の改善に大いに貢献している。しかしながら、PSA は病理組織学的悪性度 (Gleason score) や進行度 (臨床病期)、予後とは必ずしも相関せず、また、癌特異的マーカーではないため早期の限局性前立腺癌に対する部分的治療の効果を反映しないこともある。前立腺癌の治療においては組織学的悪性度の強い進行性前立腺癌やホルモン療法不応前立腺癌に対する治療法の開発が望まれるが、そのためには前立腺癌の特異的バイオマーカーや新規治療法の開発が必要と考えられる。そこで、前立腺癌の特異的バイオマーカーや新規治療法の開発に繋がる遺伝子を同定すべくマイクロアレイ解析を行った。

【対象と方法】Gleason score が 8 以上の高悪性を呈する未治療の進行前立腺癌 10 例を対象に、針生検にて得られた凍結切片より Laser microbeam microdissection (LMM)法を用いて癌細胞のみを採取し、RNA を抽出後、Affymetrix 社製の GeneChip を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、候補遺伝子を同定した。

その際、5例の正常前立腺より LMM 法にて採取した上皮細胞から抽出した RNA の Mixture をコントロールとして用いた。

同定した候補遺伝子の発現を半定量 RT-PCR 法にて確認するとともに、その遺伝子産物の発現を前立腺癌 57 例の前立腺全摘標本を用いて免疫組織化学的に検討した。さらに、候補遺伝子の siRNA 発現ベクターあるいは発現ベクターをヒト前立腺癌細胞株 22Rv1 に導入後、コロニー形成能および細胞増殖能を調べるとともに、遺伝子産物が培養上清中に分泌されるか否かを Western blotting 法にて検討した。

【結果】 cDNA マクロアレイ解析において 50%以上の症例でコントロールの 5 倍以上の発現上昇を認めた 384 遺伝子の中から分泌蛋白をコードする遺伝子を抽出し、その中で前立腺癌における報告がない Ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) を候補遺伝子として同定した。ISG15 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、ISG15 は正常前立腺上皮細胞ではほとんど発現されていなかったものの前立腺癌細胞では強くされていた。しかしながら、前立腺癌組織における ISG15 発現程度と Gleason score との間に相関は認められなかった。

ISG15-siRNA 発現ベクターを導入した 22Rv1 細胞ではコロニー形成能ならびに増殖能が有意に抑制され、逆に、ISG15 発現ベクターを導入した 22Rv1 細胞では増殖能が有意に増強され、その培養上清中には ISG15 蛋白質が分泌されていることが確かめられた。

【まとめ】 以上より、前立腺癌細胞においては IFN 誘導性ユビキチン様蛋白質である ISG15 が強く発現されており、この ISG15 は前立腺癌細胞の生存・増殖に重要な役割を演じていることが明らかとなった。ISG15 は分泌蛋白質であることより前立腺癌のバイオマーカーとなり得る可能性があるとともに、前立腺癌における ISG15 発現誘導機構の解明ならびに ISG15 が修飾する標的蛋白質の同定は前立腺癌の新規治療法の開発に繋がる可能性が示唆された。

氏名(本籍)	秋森 豊一 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第103号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Quantitative Distribution of Brush Cells in the Rat Gastrointestinal Tract: Brush Cell Population Coincides with NaHCO ₃ Secretion (NaHCO ₃ 分泌と対比したラット消化管における刷子細胞の分布の検討)
発表誌名	Medical Molecular Morphology, (in press)

審査委員	主査	教授	西原	利治
	副査	教授	由利	和也
	副査	教授	佐藤	隆幸

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 秋森豊一

論文題目

Quantitative Distribution of Brush Cells in the Rat
Gastrointestinal Tract: Brush Cell Population Coincides
with NaHCO_3 Secretion

(NaHCO_3 分泌と対比したラット消化管における刷子細胞の分布の検討)

(論文要旨)

【背景】刷子細胞 Brush cell(BC)は細胞先端の長い絨毛によって特徴づけられる。稀な細胞だが、消化管や呼吸器に広く存在している。我々は、ラット総胆管や盲腸の BC は NaHCO_3 分泌において重要な役割をはたしていると報告してきた。

【目的】BC の特異的マーカーであるサイトケラチン 18(CK18)での免疫染色でラットの消化管での BC と上皮細胞の対比をし、BC の消化管での分布を明らかにする。BC において HCO_3^- の分泌に重要なタンパク-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR)の組織での一致と、pH テス紙により胃粘膜表面でのアルカリの分泌を調べることを目標とした。

【材料と方法】pHテスト: Long-Evans 雌ラット(12週)をバルビタールで麻酔後、開腹。胃の前壁を開き後壁に $2 \times 25\text{mm}$ の pH テス紙を gastric groove をまたぐように置きテトラガストリンを注入した上で、毎分 pH テス紙の色調の変化を写真撮影した。




消化管での分布:(免疫蛍光染色)BC の特異的マーカーであるサイトケラチン 18(CK18)と CFTR で二重免疫染色を行った後、蛍光は Alexa Fluor 546 ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて行い、レーザー顕微鏡で観察しそれぞれの位置の対比をした。

3匹のラット消化管の16部位(gastric groove、胃噴門部、胃体部、胃幽門部、十二指腸の幽門輪直近、十二指腸球部、十二指腸下行部、十二指腸水平部、空腸起始部、空腸回腸移行部、回腸末端部(パイエル板部、絨毛部)、盲腸、近位結腸、遠位結腸、直腸)を2.0%ホルムアルデヒドのPLP固定液で 4°C 、4時間固定後、 $6\mu\text{m}$ の厚さで薄切した。5%ヤギ血清と1%牛アルブミンを60分間浸して非特異的反応を抑えた後、BCの特異的マーカーであるサイトケラチン18(CK18)で免疫染色を行った後、蛍光は Alexa Fluor 546 ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて行い、レーザー顕微鏡で観察しそれぞれの部位の BC 数を計測した。また、4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)での二重染色で細胞核を染色し、同部位の上皮細胞数も同時に計測した。

【結果】gastric groove をまたいで置いた pH テス紙は、テトラガストリンを注入し10分経過して胃幽門部が pH3 になっても、gastric groove の上は pH9 を示した。

近位結腸での免疫組織化学的検討ではサイトケラチン18(CK18)と CFTR は BC に染まったが上皮吸収細胞には染まらなかった。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	秋 森 豊 一
審 査 委 員	主 査 氏 名	西 原 利 治 
	副 査 氏 名	由 利 和 也 
	副 査 氏 名	佐 藤 隆 幸 

題 目 Quantitative Distribution of Brush Cells in the Rat Gastrointestinal Tract: Brush Cell Population Coincides with NaHCO₃ Secretion
 (NaHCO₃分泌と対比したラット消化管における刷子細胞の分布の検討)

著 者 Toyokazu AKIMORI, Kazuhiro HANAZAKI, Takehiro OKABAYASHI,
 Ken OKAMOTO, Michiya KOBAYASHI, Takuro OGATA

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Medical Molecular Morphology, (in press)

要 旨

消化管は摂食した糖・蛋白質・脂質などの栄養素を消化吸収する臓器で、糖は中性、蛋白質は酸性の至適な pH の下で酵素により分解され、吸収される。消化管の pH は胃酸や胆汁・膵液といった消化液によって調節されており、胃の壁細胞 parietal cell は胃酸を分泌することで有名である。他方、消化管には重炭酸ナトリウムを分泌する刷子細胞 Brush cell も存在するが、その意義については未だ十分に理解されているとは言い難かった。また、刷子細胞は長い絨毛を持つという形態学的特徴を有し、gastric groove に多数存在することは知られてきたが、他の部位の消化管上皮における分布については系統的な検討がほとんどなされていない。

そこで、申請者らは重炭酸塩の分泌に重要な役割を果たす刷子細胞の特徴に着目し、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator とサイトケラチン 18 との発現が消化管上皮内では刷子細胞に局在することを利用して、12 週齢の Long-Evans 雌ラットの消化管における刷子細胞の分布密度を免疫組織学的手法により検討した。また、この細胞が gastric groove に多数存在することの生理的意義を胃酸分泌刺激剤であるテトラガストリンの負荷試験により明らかにした。

その結果、次のような成績が得られた。

- 1) 刷子細胞は十二指腸球部と十二指腸下行部を除く消化管上皮で幅広く観察された。
- 2) 刷子細胞の分布密度は gastric groove で最も高く、上皮細胞の 32.3% を占

め、他の消化管上皮における密度の10-100倍に達した。

- 3) テトラガストリンを負荷して胃幽門部のpHを3に低下させても、gastric groove部のpHは9に保たれた。

以上の成績は、Long-Evans 雌ラットの消化管における刷子細胞の分布密度を系統的に観察した最初の報告である。また、胃酸の分泌によって胃内が酸性化する中でも、刷子細胞の分布密度の高いgastric grooveではpHを高く保つことができることを示す所見は、ラットにおけるgastric grooveの存在意義を明確に示す重要な所見と考えられた。

以上より、申請者の論文は、Long-Evans 雌ラットにおける刷子細胞の消化管上皮における系統的な分布を検討した最初の論文であるのみならず、gastric grooveの生理的存在意義を明らかにするものとなった。よって、審査員一同は本論文を高知大学博士(医学)に相応しい価値あるものと認定した。

氏名(本籍)	横山 麗子(香川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第104号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Enantioselective construction of nitrogen-substituted quaternary carbon centers adjacent to the carbonyl group in the cyclohexane ring: first asymmetric synthesis of anesthetic (S)-ketamine with high selectivity (世界初の(S)-ケタミン不斉合成:シクロヘキサン環上のカルボニルに隣接する、窒素を持つ4級炭素の不斉構築)
発表誌名	Tetrahedron, 65(2009), 5181-5191, 2009年7月

審査委員	主査	教授	横谷 邦彦
	副査	教授	麻生 悌二郎
	副査	教授	谷 俊一
	副査	教授	宮村 充彦

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 横山麗子

論文題目

Enantioselective construction of nitrogen-substituted quaternary carbon centers adjacent to the carbonyl group in the cyclohexane ring:

first asymmetric synthesis of anesthetic (*S*)-ketamine with high selectivity

世界初の(*S*)-ケタミン不斉合成:

シクロヘキサン環上のカルボニルに隣接する、窒素を持つ4級炭素の不斉構築

(論文要旨)

ケタミン塩酸塩は $C_{13}H_{16}NClO$: [2-(2-chlorophenyl)-2-(methylamino)-cyclohexanone HCl] の構造を持つフェンサイクリジン系麻酔薬のひとつであり、世界中で多用されている。ケタミン塩酸塩は、ラセミ体として、ケタラール®名で購入できる。しかし、ケタミンによる麻酔からの覚醒時の、倦怠感、精神的興奮、幻覚などからその臨床利用が制限されることがある。ケタミンは C-2 に不斉中心を持っており、これらの両鏡像異性体間 (*S*体と*R*体) での薬理作用の差異が指摘されてきた。*S*体は*R*体に比較して鎮痛作用が 3-4 倍強く、倦怠感、精神的興奮、幻覚といった副作用が少ない。ヨーロッパでは、*S*-ケタミンが入手可能で臨床でも利用されることがあるが、その *S*-ケタミンは上記のラセミケタミンの光学分割により得られたものである。したがって、この方法では不必要な*R*-ケタミンも得られる。経済的また環境に負荷を与えない合理的な*S*-ケタミンの入手方法が求められる。そこで、いままで誰も成功しなかった*S*-ケタミンのみを与える不斉合成について研究し、それに成功した。

研究は2つの部分に分けられる。




(1)いかにしてその困難な4級炭素の不斉構築を達成するか? あらかじめ光学活性部位をアセタール基として導入しておき、その不斉環境下で CN 二重結合への RM の付加反応を行うことで、キラルな窒素を持つ4級不斉炭素を構築する新しい戦略を計画した。 α -キラルケトオキシムエーテルアセタールに対してフェニルリチウムを $-78^{\circ}C$ の低温下で作用させると、その求核反応が進行し、82%ジアステレオ選択性で目的化合物を得ることができた。さらにその主生成物を酸加水分解すると、キラルアセタール部位は取り除かれ、カルボニル基が復元した。そこで、ケタミン不斉合成完了を期待して、ケタミンにとって必要なフェニル基のオルト位にクロル基を持つ求核剤で同様の反応を試みた。しかしこの反応はそれ以上進行せず断念した。クロル基による避けることのできない立体障害のためである。

(2)新しい不斉転位反応の利用による合成戦略。アリルカルバメートを脱水するとアリルシアネートになるが、その過程で反応はさらに進行し、転位反応が起こりイソシアネートへ変換される。アリルカルバメートの C1 の部位にある不斉炭素はこの反応を経由してイソシアネートの C3 の部位へ変換される。

まず、あらかじめオルトクロル基を導入したケトエステルから 4 ステップを経て合成中間体であるケトンを作成した。続いて、ケタミン不斉合成において最も重要な高純度の光学活性アルコールを得るために野依教授の不斉還元反応をケトンに適用させた。この還元剤はリチウムアルミニウムヒドライドを光学活性軸不斉ピナフトールで不斉修飾したものである。これにより、85%収率できわめて高いエナンチオ選択的に不斉還元が進行し、ほとんど純品に近い(*S*)-アルコールを得ることができた。その(*S*)-アルコールはカルバメートへ変換されて、さきに述べた転位反応によって完全に立体化学が保持された(*R*)-イソシアネートを高収率で得た。続いて、(*R*)-イソシアネートは還元されてケタミンに必要なメチルアミン基へと変換された。その後、アミンの塩酸塩の状態にて二重結合のオゾン分解反応を行ったところ、反応は円滑に進行し(*S*)-ケタミンを高収率に単離した。得られた(*S*)-ケタミンは、キラルカラムの高速液体クロマトグラフィーにより、1本のピークをもつ(*S*)-エナンチオマーのみが確認され、完全なかたちでのケタミン不斉合成が完成した。

以上の成功により、有効に(*S*)-ケタミンを供給する道がひらかれた。もちろん(*R*)-ケタミンを単独に得ることもできる。したがって、大量入手できる両光学異性体を用いて詳細な薬理研究が可能となる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	横 山 麗 子
審 査 委 員	主 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	麻 生 悌 二 郎 印
	副 査 氏 名	谷 俊 一 
	副 査 氏 名	宮 村 充 彦 

題 目 Enantioselective construction of nitrogen-substituted quaternary carbon centers adjacent to the carbonyl group in the cyclohexane ring: first asymmetric synthesis of anesthetic (*S*)-ketamine with high selectivity
 (世界初の(*S*)-ケタミン不斉合成：シクロヘキサン環上のカルボニルに隣接する、窒素を持つ4級炭素の不斉構築)

著 者 Reiko Yokoyama, Satoshi Matsumoto, Satoshi Nomura, Takefumi Higaki, Takeshi Yokoyama, Shun-ichi Kiyooka

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Tetrahedron, 65(2009), 5181-5191, 2009年7月

要 旨

ケタミンはフェンサイクリジン系麻酔薬のひとつであり、解離性麻酔薬として世界中で多用されている。しかし、ラセミ体のケタミンには覚醒時の倦怠感、精神的興奮、悪夢、幻覚などの副作用がある。ケタミンは C-2 に不斉中心を持つことから、*S*体と*R*体の鏡像異性体が存在する。*S*体は*R*体よりも鎮痛作用が3-4倍強く副作用も少ないことから、ヨーロッパでは*S*-ケタミンが臨床で用いられている。しかし*S*-ケタミンは高温下で合成されたラセミ体から光学分割により得られることから、より経済的で環境に優しい合成法が求められている。光学活性な化合物の合成法として、①ジアステレオ選択的な合成法と、②エナンチオ選択的な合成法とがある。そこで今回、二つの合成法を試み、②による不斉触媒を用いた新たな*S*-ケタミン合成法を開発した。

① ジアステレオ選択的な合成法

あらかじめ光学活性部位にアセタール基を導入しておき、その不斉環境下で CN 二重結合への RM の付加反応を行うことで、キラルな窒素を持つ 4 級不斉炭素を構築する合成戦略を試みた。 α -キラルケトオキシムエーテルアセタールにフェニルリチウムを -78°C の低温下で作用させると求核反応が進行し、82%ジアステレオ選択性の目的化合物を得た。さらにその主生成物を酸加水分解すると、キラルアセタール部位は取り除かれカルボニル基が還元した。そこで、ケタミンに必要なフェニル基のオルト位にクロル基を持つ求核剤でケタミン不斉合成を試みたが、反応は進行しなかった。

② エナンチオ選択的な合成法

アリルカルバメートを脱水するとアリルシアネートになるが、その過程で反応はさらに進行し、転位反応が起こりイソシアネートへ変換される。アリルカルバメートの C-1 の部位にある不斉炭素はこの反応を経由してイソシアネートの C-3 の部位へ変換される (1,3 キラリティー・トランスファー) (高知大、市川教授の合成法)。はじめに、一般的に用いられている合成法により、あらかじめオルトクロル基を導入したケトエステルから 4 ステップを経て合成中間体であるケトンを作成した。続いて、ケタミン不斉合成において最も重要な高純度の光学活性アルコールを得るために、名古屋大、野依教授の不斉還元反応をケトンに適用した (この反応に用いた還元剤はリチウムアルミニウムヒドライドを光学活性軸不斉ビナフトールで不斉修飾したものである)。これにより、85%収率の *S*-アルコールを得た。この *S*-アルコールをカルバメートに変換し、さきに述べた 1,3 キラリティー・トランスファーによって *R*-イソシアネートを得た。続いて、*R*-イソシアネートを還元しケタミンに必要なメチルアミン基へと変換した。その後、アミンの塩酸塩の状態で行った二重結合のオゾン分解反応を行い *S*-ケタミンを得た。得られた *S*-ケタミンは、キラルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより、1本のピークをもつ *S*-エナンチオマーとして確認された。

本学位論文は、*S*-ケタミンの高い収率を示す不斉合成法を世界で初めて報告したもので、医学的および社会的にも価値あるものである。よって審査員一同は、申請論文が高知大学博士 (医学) の学位授与に値するものと判断する。

氏名(国籍)	Radhakrishnan Geethalakshmi (インド)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第105号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Intake of dissolved organic matter from deep seawater inhibits atherosclerosis Progression (海洋深層水由来難溶性有機物の摂取は動脈硬化の進行を抑制する)
発表誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.387, 25-30 2009年6月18日

審査委員	主査	教授	宮村	充彦
	副査	教授	本家	孝一
	副査	教授	杉浦	哲朗

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 ラダキルスナン ギータラクスマ

論文題目 Intake of dissolved organic matter from deep seawater inhibits atherosclerosis progression

(海洋深層水由来難分解性有機物の摂取は動脈硬化の進行を抑制する)

(論文要旨)

目的 海洋深層水(DSW)には抗アレルギー効果、抗動脈硬化作用等の生理活性を有することが報告されている。DSW 中には海洋細菌由来の大量の難分解性有機物(DOM)が存在する。DOMは0.46-0.1 μ m未満の孔径のフィルターで濾過される有機物質であり、海洋細菌により光合成藻類とバクテリアを含む植物プランクトンが様々な有機物に分解され、それが難分解性有機物として海水中に含有されているものである。本研究では、室戸岬沖より取水されるDSW中のDOMが示すこれら生理活性のメカニズムにつき検討した。

方法

① DOMの分離

DSWは室戸岬沖の深度374mの中深海層から取水した。DSWを0.2 μ mの孔径のフィルターで濾過し、さらに3Mエンボア™オクタデシルC18フィルターで濾過することで有機成分をフィルターに吸着しC18-DOMを分離した。

② 動物実験

- i. 家兔頸動脈血管内皮傷害モデルを用い以下5群で動脈硬化巣の発現を病理学的に検討した。
①50ml/日の蒸留水 ②50ml/日の表層海水 ③50ml/日 Inorganic-DSW ④50ml/日 1% DSW
⑤C18-DOM 200 μ l/日。
- ii. 家兔を用い以下3群でDSWの血小板凝集能を比較検討した。①50ml/日の Inorganic-DSW
②50ml/日の 1% DSW ③C18-DOM 200 μ l/日。

③ 生化学実験

- i. C18-DOMの①ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)発現誘導をヒト臍静脈血管内皮細胞を用いて検討した ②シクロオキシゲナーゼ1(COX-1)の活性阻害についてインビトロにて検討した ③P-セレクチン発現抑制効果を家兔血小板を用いて検討した。
- ii. 生体分子相互作用のモニタリングが可能なビアコア法を用いて、COX-1とC18-DOMとの分子間結合を検討した。
- iii. ^1H , ^{13}C -NMR分光法、ESI-TOF-質量分析法(MS)分析によりDOMの解析を行った。

結果

- i. 動脈硬化誘発実験においてC18-DOMを含有する⑤群で有意に内膜/中膜比を減少させた




($p < 0.05$).

- ii. 血小板凝集能は C18-DOM 投与群のみ抑制された ($p < 0.05$).
- iii. 血管内皮細胞の HO-1 の発現は C18-DOM の投与量に比例し増強した。
- iv. C18-DOM は濃度依存性に P-セレクチンの発現を抑制し ($p < 0.01$) COX-1 の酵素活性を減弱した ($p < 0.05$).
- v. ビアコア法により、C18-DOM が COX-1 と直接結合することを確認した。
- vi. MS 分析では C18-DOM の分子量は 50~1000amu にピークを有していた。¹H-NMR 分光法では、フェノール誘導体の芳香族化合物群が存在していることが分かった。また ¹³C-NMR 分光法ではカルボキシル基を多く含む脂環式化合物が存在していることが分かった。

考察および結論 動物実験において C18-DOM は アスピリンに類似した血小板凝集阻害と抗動脈硬化作用を有していた。生化学実験でも COX-1 抑制、P-セレクチン発現抑制、HO-1 発現増加等、アスピリン類似抗炎症作用を有することを確認した。また NMR 分光法における検討によって C18-DOM にフェノール誘導体およびカルボキシル基を多く含む脂環式化合物が存在することが判明した。アスピリンはカルボキシル基とアセチル化ヒドロキシル基側鎖を有する芳香族化合物成分であることが知られている。今回の我々の検討より、C18-DOM 中には、生理活性としても、また構造的にもアスピリンに類似した芳香族化合物が存在することが考えられた。

本研究は、海洋物質の生物学的応用についての先駆的な研究であり、医学と海洋学を融合した新しい分野に発展しうるものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Radhakrishnan Geethalakshmi
審 査 委 員	主 査 氏 名	宮 村 充 彦 
	副 査 氏 名	本 家 孝 一 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 Intake of dissolved organic matter from deep seawater inhibits atherosclerosis Progression
 (海洋深層水由来難溶性有機物の摂取は動脈硬化の進行を抑制する)

著 者 Geethalakshmi Radhakrishnan, Morio Yamamoto, Hironori Maeda, Aimi Nakagawa, Rajesh Katare Gopalrao, Hironobu Okada, Hideaki Nishimori, Seiichiro Wariishi, Eiji Toda, Hiroshi Ogawa, Shiro Sasaguri

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.387, 25-30
 2009年6月

要 旨

海洋深層水 (DSW) は、様々な無機及び有機物質を含有する富栄養性を有すること、また、清浄性にも富むことなどから、新たな医療資源として注目されており、既に、抗アレルギー効果、抗動脈硬化作用等の生理活性を有することが報告されている。DSW 中には、海洋細菌等に由来する難分解性有機物 (DOM) の存在することが、明らかとなっている。DOM は、0.46-1 μ m 未満の孔径のフィルターで濾過される有機物質であり、海洋細菌により光合成藻類とバクテリアを含む植物プランクトンが様々な有機物に分解され、それが難分解性有機物として海水中に含有されているものである。

本研究では、高知県室戸市の室戸岬沖にて取水される DSW 中より抽出した DOM の血小板凝集抑制及び動脈硬化の進展抑制効果について、その有用性及びメカニズムについて検討した。

まず、本研究の key となる DSW から DOM の分離方法についてであるが、DSW は、室戸岬沖の深度 374m の中深海層から取水したものをを用い、これを $0.2\ \mu\text{m}$ の孔径のフィルターで濾過、さらに 3M エンポアTM オクタデシル C18 フィルターにアプライし、DSW 中の有機成分をフィルターに吸着させ、エタノール処理により、難分解性有機物(C18-DOM)を分離した。この C18-DOM を、以下の動物実験及び *in vitro* での実験に供した。

C-18DOM の動脈硬化の進展抑制効果については、1% コレステロール含有飼料負荷した家兔頸動脈血管内皮損傷モデルを用い、①50mL/日の蒸留水②50mL/日の表層海水③50mL/日の Inorganic-DSW④50mL/日の 1%DSW⑤200 μL /週の C-18DOM、それぞれの投与群における動脈硬化巣の発現を病理学的に検討した。なお、C-18DOM の投与間隔等の決定については、事前に予備実験を行い決定した。その結果、C-18-DOM を含有する④及び⑤の群において、蒸留水を投与したコントロール群①に比べ、動脈硬化巣の内膜/中膜比が、有意に減少した。(P < 0.05) 特に、C-18DOM 投与群は、週 1 回投与にも関わらず、強力な動脈硬化進展抑制効果を有することが認められた。一方、C-18DOM を含有しない、表層海水投与群②、及び C18-DOM を除去した主に無機物質を含有する深層水投与群③では、動脈硬化の進展抑制効果は、全く認められなかった。

C-18DOM の血小板凝集抑制能の検討については、同じく家兔を用い、①200 μL /週の C-18DOM②50mL/日の 1%DSW③50mL/日の Inorganic-DSW、それぞれの投与群における血小板凝集抑制能を検討した。その結果、動脈硬化の進展抑制効果の結果と同様に、C18-DOM を含有する①及び②の群において、血小板凝集抑制効果を示した。一方、C18-DOM は、コレステロール負荷家兔の血中総コレステロール値、LDL-コレステロール値に対して、減少効果は示さなかった。

さらに、C18-DOM の血小板凝集抑制能について検討したところ、C18-DOM は、用量依存的に、公知の薬物 aspirin と同様に、ADP による血小板 P-selectin 発現誘導を抑制し、*in vitro* で cyclooxygenase (COX) 活性を抑制した。また、heme oxygenase-1(HO-1)発現誘導について、ヒト臍静脈血管内皮細胞を用いて検討したところ、血管内皮細胞の HO-1 の発現は C18-DOM の投与量に比例し増大した。さらに、BIACORE 法による検討により、C18-DOM が、aspirin と同様の強度で COX-1 と直接分子間結合することを確認した。

C18-DOM 中の難分解性有機物活性本体へのアプローチについては、¹H-NMR、¹³C-NMR 及び ESI-TOF-MS 等の機器分析により C18-DOM 及びその fractionate の構造解析を行っている。その結果、C18-DOM 及びその fractionate 中には、aspirin に構造が類似した分子量 50~1000 の範囲のフェノール性芳香環を有する化合物

群及びカルボキシル基を多く含む脂環式化合物群が存在していることが推察された。

以上の結果より、C18-DOMは、強力な血小板凝集抑制と抗動脈硬化作用を有していた。また、C18-DOMは、COX-1抑制、P-selectin発現抑制、HO-1発現増加等、aspirinと類似した抗炎症作用を有することを確認した。さらに、C18-DOM中の有効成分として、aspirinと類似した構造を持つ化合物群が存在することが推察された。

本学位論文は、海洋深層水由来の難分解性有機物の血小板凝集抑制、動脈硬化進展抑制作用及び活性本体の化学的構造について検討したもので、海洋由来物質の医療への適用に関する先駆的な研究である。さらに、本研究は、医学、海洋学を融合した分野を開拓した視点に立脚したことより、社会的にも価値あるものである。よって審査員一同は、申請論文が高知大学博士（医学）の学位授与に値するものと判断する。

氏名(本籍)	足立 義博クリストファー (京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第106号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer (Zeb1によるT-カドヘリン抑制は胆嚢癌の浸潤性を高める)
発表誌名	FEBS Letters, Vol.583: 430-436, 2009年1月22日
審査委員	
	主査 教授 李 康弘
	副査 教授 麻生悌二郎
	副査 教授 寺田 典生

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 足立 義博クリストファー

論文題目

Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer.

(Zeb1によるTカドヘリン抑制は胆嚢癌の浸潤性を高める)

(論文要旨)

はじめに

多くの場合、癌細胞の発生当初は上皮細胞の性格をもっている。しかし、進行するにしたがい上皮細胞としての表現形質を失い、むしろ線維芽細胞や未熟間葉細胞の性格を有するようになり浸潤・転移能力をもつようになると考えられている。この変化は Epithelial- mesenchymal transition (EMT) と呼ばれており癌細胞が徐々に上皮細胞に特徴的な分子、細胞間接着、上皮細胞の極性をつかさどる分子群を失い、遊離増殖に寄与する分子群を発現することが、原因とされる。たとえば、Ca 依存性に homophilic adhesion 機能をもつカドヘリン分子の代表的である E-cadherin も EMT に際して多くの癌細胞で発現が低下する。

T-cadherin は E-cadherin などの典型的な cadherin 分子とは異なり細胞質内領域を欠く。つまり T-cadherin は homophilic な接着機能に必須な細胞質領域を欠いており、生理的な条件では細胞接着因子としては機能しないと考えられている。その一方で細胞表面膜の情報伝達分子のプラットフォームである、lipidraft に局在するため情報伝達因子としての機能するのではないかと考えられてきた。

興味深いことに、epigenetic な解析より T-cadherin は乳癌、肺癌、大腸癌、皮膚癌など広範な癌細胞で発現が進行につれて低下していることが明らかになってきた。しかし、その発現低下が及ぼす個々の癌細胞での影響、特に EMT に関係しているのかは不明であった。

本学位申請研究で、申請者は EMT を引き起こしやすく、従って浸潤能力が強い腫瘍としてしられる胆嚢癌をモデルとして T-cadherin 発現喪失と EMT、ひいては浸潤能増強、の関係を検討した。

方法)

EMT を引き起こすマスター分子のひとつである Zeb1 転写抑制因子の結合配列である E2-box モチーフ (5'-CACCTG-3') が T-cadherin プロモーター領域に存在することを見出した。

抗 Zeb1 抗体を作成し、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降を行い、Zeb1 が T-cadherin のプロモーター領域に結合するのか、また実際に T-cadherin の発現を低下させるのか、その制御様式を検討した。胆嚢癌組織において T-cadherin、Zeb1 の発現を免疫組織学的に検討した。また 2 種類の胆嚢癌培養細胞、上皮系の表現形質をもつ OBUG-1、間葉系の性格をもつ NOZ を用い Zeb1 発現、T-cadherin 発現と浸潤能力の関係を検討した。更に T-cadherin が胆嚢癌培養細胞浸潤を抑制するの

かを検討した。

結果)

クロマチン免疫沈降と引き続いてのウエスタンブロット、さらにゲルシフトアッセイを用い、Zeb1 が、実際に T-cadherin プロモーター領域、特に E2-box モチーフ (5'-CACCTG-3') に結合し T-cadherin の発現を抑制することが、明らかになった。

胆嚢癌組織標本で、Zeb1 は非腫瘍性胆嚢上皮および非浸潤性胆嚢癌では発現が免疫組織学的に検出できなかったのに対して浸潤性胆嚢癌の多く (23/30 症例) では過剰発現がみられた。この Zeb1 発現に逆相関に T-cadherin は非腫瘍性胆嚢上皮、非浸潤性胆嚢上皮では発現がみられたのに対して、浸潤性胆嚢癌では発現が低下していた。

以上の結果は Zeb1 発現により T-cadherin 発現が抑制され胆嚢癌の浸潤能力が、亢進することが示唆された。


このことを *in vitro* で検証するために特異 siRNA を持いて T-cadherin 発現抑制、また Zeb1 発現による T-cadherin 発現抑制を胆嚢癌培養細胞に引き起こさせた。その結果、形態的にも Zeb1 発現亢進、T-cadherin 発現抑性は EMT 様変化をもたらす浸潤能力を高めることが明らかになった。

考察)

EMT を引き起こすマスター分子である Zeb1 転写抑制因子による T-cadherin 発現低下メカニズムが明らかになった。T-cadherin 抑制が胆嚢癌の上皮系細胞から間葉系細胞への形態変化につながり、浸潤性が、著しく強まることが明らかになった。

さらに申請者は参考論文で T-cadherin は情報伝達因子として複数の腫瘍抑制メカニズムに関与する可能性を示唆した。脱メチル化薬剤などによる T-cadherin 発現が主に国外で盛んに研究されているが、申請者も脱メチル化薬剤で培養胆嚢癌細胞に T-cadherin 発現がもたらされることを参考論文で報告しており、T-cadherin 発現制御を目指した分子標的薬剤および遺伝子治療は胆嚢癌を含む浸潤性腫瘍 (特に T-cadherin 発現抑性が報告されている肺癌、乳癌など) においても有望な新しい治療法になる可能性を萌芽していると考えている。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	足立 義博 クリストファー
審 査 委 員	主 査 氏 名	李 康 弘 
	副 査 氏 名	麻 生 悌二郎 印
	副 査 氏 名	寺 田 典 生 印

題 目 Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer
(Zeb1によるT-カドヘリン抑制は胆嚢癌の浸潤性を高める)

著 者 Yoshihiro Adachi, Tamotsu Takeuchi, Tomoko Nagayama, Yuji Ohtsuki, Mutsuo Furihata

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
FEBS Letters, Vol. 583: 430-436, 2009年1月22日

要 旨

【背景と目的】上皮に由来する悪性腫瘍は少なくともその発生初期には上皮形質を保持していることが多い。しかしながら、時間の経過とともに上皮形質を徐々に失い、線維芽細胞に代表される間葉系細胞に類似の形質を帯びてくる場合がある。この現象はepithelial- mesenchymal transition (EMT) と呼ばれ、悪性腫瘍細胞の浸潤能、転移能の増加を随伴する。EMTの分子機構については不明な点も多いが、細胞接着因子、細胞極性制御因子などの上皮特異的蛋白の減少ならびに細胞の分散、増殖に関与する蛋白の増加がその原因と考えられている。例えば、典型的な細胞接着因子である E-cadherin は EMT に伴ってしばしば発現が低下する。

本研究で精査される T-cadherin は、E-cadherin と同じ分子種に属しながら、接着に必須とされる細胞質内領域を欠く。よって、生理条件下の T-cadherin は細胞接着機能を欠損するものと考えられ、むしろ情報伝達因子としての機能が推測されている。興味深いことに、乳癌、肺癌、大腸癌、皮膚癌などの EMT に際し、T-cadherin は E-cadherin と同様の発現低下を示す。その原因としては、T-cadherin 遺伝子のプロモーター領域のメチル化や loss of heterozygosity が指摘されてきた。しかし、発現低下を呈する症例では、低メチル化状態の正常 T-cadherin 遺伝子が残存していることも多く、何らかの転写抑制因子を介した機序も想定され得る。

申請者らは、EMT 誘発に関与する重要な転写抑制因子として知られる Zeb1 に着目した。T-cadherin 遺伝子のプロモーター領域に Zeb1 特異的結合配列が存在することを手がかりとし、Zeb1 による T-cadherin の転写制御と EMT の関係について、ヒト胆嚢癌の細胞培養系および外科切除組織を利用して詳細な検討を加えた。

【方法と結果】 T-cadherin 遺伝子の塩基配列を調査し、Zeb1 転写抑制因子の結合配列である E2-box モチーフ (5'-CACCTG-3') がそのプロモーター領域に存在することを見出した。独自に作製した抗 Zeb1 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降、ゲルシフトアッセイを行なったところ、Zeb1 が T-cadherin の E2-box に結合することが確認された。さらに、Cos7 培養細胞を使用したプロモーター活性の評価により、Zeb1 が T-cadherin プロモーターの転写活性を強く抑制することが証明された。

ヒト胆嚢癌由来の細胞株である OCUG-1 と NOZ はそれぞれ上皮形質、間葉形質を優位に発現している。Zeb1、T-cadherin の mRNA および蛋白の発現を RT-PCR 法、ウェスタンブロット法で調べたところ、上皮形質を示す OCUG-1 では Zeb1 の発現が低く、T-cadherin の発現が高かった。間葉形質を示す NOZ では全く逆の傾向を認めた。OCUG-1 細胞に対して siRNA による T-cadherin 発現抑制を行なうと、細胞増殖率に変化はなかったが、間葉形質の発現とともに、コラーゲン浸潤アッセイで浸潤能の亢進が観察された。また、OCUG-1 にテトラサイクリン誘導性 Zeb1 発現ベクターを導入し、Zeb1 の強制発現による T-cadherin 発現抑制を惹起しても、同様の現象が確認された。一方、NOZ 細胞にて T-cadherin の強制発現ないし siRNA による Zeb1 の発現抑制実験を行なうと、上皮形質の発現と浸潤能の抑制が見られた。

外科切除されたヒト胆嚢癌組織を用いて、Zeb1 蛋白の免疫染色を行なったところ、非腫瘍性胆嚢上皮および非浸潤性胆嚢癌では発現が検出できなかったが、浸潤性胆嚢癌の 77% (23/30 症例) で有意な発現が認められた。同様に T-cadherin を免疫染色すると、非腫瘍性胆嚢上皮、非浸潤性胆嚢上皮では強い発現がみられたのに比し、浸潤性胆嚢癌では発現低下が明らかであった。

【考察】 EMT 誘発因子である Zeb1 が、胆嚢癌細胞において T-cadherin の発現を抑制する分子機序が明らかとなった。また、T-cadherin の発現抑制が胆嚢癌細胞に EMT を惹起するとともに、*in vitro* および *in vivo* の腫瘍性浸潤能を亢進させることも判明した。T-cadherin の下流において如何なる機構が働き、最終的な EMT の修飾に至るかは未だ不明である。しかし、申請者らは、NOZ 細胞における T-cadherin の強制発現が、細胞骨格の改変を通じて EMT を誘導する CDC42BPA の発現を低下させ、かつ、細胞増殖の促進および細胞死の抑制を担う Akt3 蛋白ならびに Akt 分子群のリン酸化を低下させることを後に見出している (参考論文)。よって、これらの機序が T-cadherin の下流で EMT に関わる可能性がある。

一方、申請者らは薬剤による EMT 抑制に基づいた上皮性悪性腫瘍の治療法の開発を試みている。NOZ 細胞を脱メチル化剤で処理すると、T-cadherin の発現が誘導されるとともに、EMT の抑制が生じる (参考論文)。このようなアプローチは、胆嚢癌を始めとする様々な浸潤性腫瘍に対する分子標的治療への発展性を秘めている。

【審査結果】 本研究は Zeb1 転写抑制因子による T-cadherin 発現抑制機構を初めて明らかにし、上皮性悪性腫瘍の EMT を理解する上で新たな視点を提供した。悪性腫瘍の新規治療法開発への応用も期待される成果であり、審査員一同は本研究の内容が高知大学博士 (医学) の学位に値するものと結論した。

氏名(本籍)	石橋 綾子(石川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第107号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Serum Fetuin-A is an Independent Marker of Insulin Resistance in Japanese Men (血中フェチュインAは日本人男性におけるインスリン抵抗性の独立した指標である)
発表誌名	Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, (in press)
	審査委員 主査 教授 西原 利治 副査 教授 杉浦 哲朗 副査 教授 高尾 俊弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 石橋 綾子

論文題目 Serum Fetuin-A is an Independent Marker of Insulin Resistance in Japanese Men (血中フェチュイン A は日本人男性におけるインスリン抵抗性の独立した指標である)

(論文要旨)

【目的】近年、生活習慣の変化によりインスリン抵抗性を基盤とするメタボリックシンドロームや2型糖尿病が急増している。インスリンはインスリン受容体を介してその作用を発揮する。インスリンが受容体に結合すると、内在するチロシンキナーゼの活性化により自己リン酸化が起こり、細胞内分子にシグナルが伝達される。われわれは、肝で合成される糖蛋白の一つであるフェチュイン A がインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害することに着目し、健診受診者において血中フェチュイン A 濃度を測定し日本人における本蛋白の臨床的意義を検討した。




【方法】対象は、健康診断にて 75g 経口ブドウ糖負荷試験 (75gOGTT) を実施した日本人男性のうち、既知の慢性疾患を有する者や何らかの薬物治療中の者を除外した 300 名 (平均年齢 52 ± 11 歳) である。75gOGTT の結果、正常型 194 名、境界型 91 名、糖尿病型 15 名に分類された。血中フェチュイン A 濃度は酵素免疫測定法で測定し、肥満度、血糖値、脂質濃度、インスリン (IRI)、HOMA インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) との関連を検討した。また、脂肪細胞で合成・分泌されるアディポサイトカインのうち、インスリン感受性亢進作用や抗動脈硬化作用を有するアディポネクチンおよび食欲やエネルギー調節に重要な役割を持つレプチンを測定し、これらとフェチュイン A との関連についても検討した。

【結果】糖尿病型における血中フェチュイン A 濃度は、非糖尿病型 (正常型+境界型) に比べて有意に高かった (30.4 ± 7.6 vs. 27.0 ± 6.1 mg/dL, $P < 0.05$)。フェチュイン濃度により四分位階級に分け背景因子を比較すると、フェチュイン濃度が最も高い群では最も低い群に比べ、IRI および HOMA-IR が有意に高く、逆に、HDL コレステロールおよびアディポネクチン濃度が有意に低かった。フェチュイン A 濃度は、IRI ($r = 0.269$, $P < 0.001$)、HOMA-IR ($r = 0.274$, $P < 0.001$)、LDL コレステロール ($r = 0.172$, $P < 0.01$) と有意な正相関を示し、HDL コレステロールとは負の相関 ($r = -0.191$, $P < 0.001$) を示した。また、フェチュイン A 濃度は、レプチン濃度と正相関 ($r = 0.150$, $P < 0.01$) し、

アディポネクチン濃度とは逆相関 ($r=-0.208, P<0.001$) した。IRI や HOMA-IR を目的変数とした多変量解析において、フェチュイン A 濃度は、肥満度、トリグリセリド、LDL コレステロール、レプチン、アディポネクチンと同様に独立した説明変数であった。

【考察】日本人男性において、血中フェチュイン A 濃度がインスリン抵抗性指標や動脈硬化惹起性脂質プロファイル、アディポサイトカインと有意に関連することを初めて明らかにした。また、多変量解析によりフェチュイン A とインスリン抵抗性の関連が他の因子と独立したものであることを示した。海外での観察研究において、血中フェチュイン A 濃度が高い群では糖尿病発症リスクが高いことが報告されている。今回の結果と合わせて考えると、フェチュイン A はインスリン作用を阻害することによりインスリン抵抗性を惹起するとともに、脂質代謝異常や低アディポネクチン血症とも関連しながら動脈硬化を促進させる可能性が考えられる。本研究で得られた結果は、フェチュイン A の合成や代謝を制御することが耐糖能異常や動脈硬化の進展抑止に有効な手段となり得る可能性を示している。今後、これらの機序をさらに明確にするとともに、フェチュイン A を抑制する物質のスクリーニングに取り組み、臨床応用に繋げたい。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	石 橋 綾 子
審 査 委 員	主 査 氏 名	西 原 利 治 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 
	副 査 氏 名	高 尾 俊 弘 

題 目 Serum Fetuin-A is an Independent Marker of Insulin Resistance in Japanese Men
 (血中フェチュインAは日本人男性におけるインスリン抵抗性の独立した指標である)

著 者 Ayako Ishibashi, Yukio Ikeda, Takashi Ohguro, Yoshitaka Kumon, Shigeo Yamanaka, Hiroshi Takata, Mari Inoue, Tadashi Suehiro, Yoshio Terada

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, (in press)

要 旨

インスリンはインスリン受容体に結合することにより内在するチロシンキナーゼを活性化し、自己リン酸化を通じて細胞内にインスリンシグナルを伝達する。肝臓で合成される糖蛋白の一つであるフェチュインAは、インスリン受容体の細胞外ドメインに作用して受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害することにより、インスリンシグナルの細胞内への伝達を抑制する。そこで申請者らは、健康診断にて75g経口ブドウ糖負荷試験を実施した日本人男性の内、既知の慢性疾患を有する者や何らかの薬物治療中の者を除外した300症例(正常耐糖能:194例、境界型91例、糖尿病型15例)を対象に、血中フェチュインA濃度を測定し、耐糖能との関連を検討した。また、年齢や肥満度などの計測値、血糖値、脂質濃度、空腹時インスリン値、HOMA-IRとの関連やアディポネクチンやレプチンといったインスリンに対する反応性を修飾するアディポサイトカインとの関連についても検討した。

その結果、次のような成績が得られた。

1) 血清フェチュインA値が高値を示した症例では糖尿病型の耐糖能を示す症例が多く、糖尿病型の耐糖能を示した群の血清フェチュインA値は糖尿病型を示さなかった群に比して有意に高値を示した。

2) 血清フェチインA値は空腹時インスリン値、HOMA-IR 値、LDL-コレステロール値と弱い正の相関を示し、HDL-コレステロール値と負の相関を示した。

3) 血清フェチインA値は血清レプチン値と弱い正の相関を示し、血清アディポネクチン値とは負の相関を示した。

4) 空腹時インスリン値やHOMA-IR を目的変数とした多変量解析において、血清フェチインA値は肥満度や血清トリグリセライド値、LDL-コレステロール値、レプチン値、アディポネクチン値などと共に、独立した説明変数であった。

以上の成績は、日本人男性において血清フェチインA値がインスリン抵抗性指標や動脈硬化惹起性脂質プロファイル、アディポサイトカイン濃度と関連していることを示すものであり、すでに報告されているフェチインAのインスリンシグナル阻害作用と相俟って日本人男性における動脈硬化を促進させる因子となる可能性を示している。

以上より、申請者の論文は、健康診断を受診した日本人男性における血清フェチインA値の分布を示すのみならず、空腹時インスリン値やHOMA-IR 値との関連を明らかにするものである。よって、審査員一同は本論文を高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと認定した。

氏名(本籍)	井上 紘輔 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第108号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Cisplatin-Induced Macroautophagy Occurs Prior to Apoptosis in Proximal Tubules <i>in Vivo</i> (シスプラチンによって誘導される近位尿細管でのマクロオートファジーはアポトーシスに先行する)
発表誌名	Clinical and Experimental Nephrology, (in press)

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	西原	利治
	副査	教授	執印	太郎

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 井上 紘輔

論文題目

Cisplatin-Induced Macroautophagy Occurs Prior to Apoptosis in Proximal Tubules *in Vivo*
(シスプラチンによって誘導される近位尿細管でのマクロオートファジーはアポトーシスに先行する)

(論文要旨)

【背景・目的】オートファジーは細胞の飢餓状態時に誘導され、バルク分解とも呼ばれる細胞内蛋白質の分解機構である。オートファジーは低酸素、虚血再灌流、トキシン、変性蛋白質等のストレスにより誘導され、細胞の生死に関与する。また、オートファジーのプロセスで変性した蛋白、細胞小胞体をつつむオートファゴソームに Light chain 3-II 蛋白(LC3-II 蛋白)が発現することが知られている。一方、アポトーシスは、急性腎障害(Acute Kidney Injury: AKI)時において、尿細管組織にて誘導され、腎障害を悪化させていることが知られているが、オートファジーの関与については明らかにされていない。今回我々は、シスプラチン投与による AKI モデルを用いて、オートファジーの腎障害への関与を検討した。

【方法】*in vivo* の実験系では LC3 プロモーターに緑色蛍光蛋白(Green Fluorescent Protein: GFP)を融合させた蛋白 (LC3-GFP) を発現するようにしたトランスジェニックマウスを用いた。トランスジェニックマウスにシスプラチンを 20mg/kg で投与し、投与後 0、12、24、48、72 時間後のマウスの腎臓を採取し、免疫染色で組織を解析した。また、同時に早期アポトーシスのマーカーである cleaved caspase 3 を用いて、アポトーシスの発現時期も解析した。


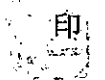

in vitro の実験系では、LC3-GFP 遺伝子を安定的に発現する NRK-52E 細胞 (ラット腎近位尿細管細胞) を用い、シスプラチン投与下での LC3-GFP の発現を各種オートファジーの阻害薬やオートファジーの課程で必要な beclin-1 蛋白の発現を抑える siRNA 存在下で共焦点顕微鏡にて観察した。また、ウェスタンブロッティングにて、LC3-II 蛋白や、cleaved caspase 3 の発現を解析した。

【結果】LC3-GFP トランスジェニックマウスの腎臓でオートファゴソームは、シスプラチン投与後 12 時間後から増え始めることが観察された。対して、アポトーシスは 24 時間後から認められ、オートファジーがアポトーシスに先行して起こることが示唆された。NRK-52E 細胞でも同様の結果が得られた。

さらに、オートファジー阻害薬の投与、あるいは beclin-1 発現を阻害する siRNA でオートファジーを阻害すると、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase 3 の抑制が認められた。

【結論】オートファジーはシスプラチン投与による AKI モデルのマウス、および、培養近位尿細管細胞において、アポトーシスに先行して誘導された。オートファジーは AKI における細胞障害のマーカーとなり、オートファジーを押さえることによって、アポトーシスを制御し、AKI の進行を抑制させる可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏名	井上 紘輔
審査委員	主査氏名	梶 秀人 
	副査氏名	西原 利治 
	副査氏名	執印 太郎 

題 目 Cisplatin-Induced Macroautophagy Occurs Prior to Apoptosis in Proximal Tubules *in Vivo*
 (シスプラチンによって誘導される近位尿細管でのマクロオートファジーはアポトーシスに先行する)

著 者 Kosuke Inoue, Hitoshi Kuwana, Yoshiko Shimamura, Koji Ogata, Yoshinori Taniguchi, Toru Kagawa, Taro Horino, Toshihiro Takao, Tatsuhito Morita, Sei Sasaki, Noboru Mizushima, and Yoshio Terada

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Clinical and Experimental Nephrology (in press)

要 旨

シスプラチンは多くのがん化学療法プロトコールの中心的薬剤の1つであるが、非常に強い副作用を持ち、中でも腎障害が深刻で投与上の大きな問題点とされている。しかし、シスプラチン急性腎障害の発症メカニズムについては未だ十分には解明されていない。最近、シスプラチン急性腎障害時にアポトーシスが尿細管組織に誘導され、腎障害を悪化させることが明らかになっている。アポトーシスはオートファジーと正、負の両面で結びついており、広範囲にわたるクロストークが両者間に存在することが注目されている。しかし、シスプラチン急性腎障害におけるオートファジーの関与については明らかにされていない。

そこで申請者らは、シスプラチン急性腎障害にオートファジーが関わるか否か *in vivo* と *in vitro* の実験系を用いて検討した。具体的には、*in vivo* の実験で、オートファゴソームに発現する light chain 3 (LC3) を可視化する目的で作成された LC3-GFP トランスジェニックマウスにシスプラチンを投与し、0、12、24、48、72 時間後のマウスの腎臓を採取し、免疫組織化学的解析を行った。また同時に早期アポトーシスの

マーカーである cleaved caspase 3 を用いて、アポトーシスの発現時期も解析した。in vitro の実験では、LC3-GFP を発現するラット腎近位尿細管 (NRK-52E) 細胞を用い、LC3-GFP 発現におけるシスプラチンの影響をオートファジー阻害剤や誘発剤、オートファジー関連遺伝子産物 beclin-1 の発現を阻害する siRNA の存在下で解析した。また、LC3-II や cleaved caspase 3 の発現もウェスタンブロットイングにて解析した。得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) LC3-GFP トランスジェニックマウスを用いた in vivo の実験で、オートファゴソームは、シスプラチン投与 12 時間後から増加し始めたが、アポトーシスは 24 時間後から認められ、オートファジーがアポトーシスに先行して起こることが判明した。
- 2) LC3-GFP を発現するラット腎近位尿細管細胞を用いた in vitro の実験でも同様の結果が得られた。
- 3) シスプラチンによるオートファゴソームと cleaved caspase 3 の増加は共に、オートファゴソーム阻害剤である 3-methyladenosine やリソソームプロテアーゼ阻害剤である E64d/pepstatin A によって減弱した。
- 4) シスプラチンによる cleaved caspase 3 の増加はまた、オートファジー関連遺伝子産物 beclin-1 の siRNA によっても減弱した。

以上の成績は、シスプラチンにより腎尿細管細胞にオートファジーがアポトーシスに先行して誘導されたことから、オートファジーが急性腎障害における細胞障害の指標となるとともに、オートファジーを巧みに操作することで、急性腎障害の進行を抑制できる可能性を示唆している。

以上より、申請者らの論文は、急性腎障害の発症メカニズムの解明のみならず、その治療法の開発にも寄与することが期待される。よって審査員一同は、本論文を高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと認定した。

氏名(本籍)	岡崎 瑞穂 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第109号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	PPAR β/δ Regulates the Human SIRT1 Gene Transcription via Sp1 (SIRT1 遺伝子の発現は転写因子 PPAR β/δ により調節され Sp1 が仲介する)
発表誌名	Endocrine Journal, (in press)

審査委員	主査	教授	高尾	俊弘
	副査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	土居	義典

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 岡崎 瑞穂

論文題目

PPAR β/δ Regulates the Human SIRT1 Gene Transcription via Sp1
(SIRT1 遺伝子の発現は転写因子 PPAR β/δ により調節され Sp1 が仲介する)

(論文要旨)

【背景・目的】

SIRT1はNAD依存性脱アセチル化酵素で、近年その抗老化・抗肥満作用が注目を集めている。SIRT1の作用は、1) 酵素活性 (resveratrol などによる活性化)、2) 遺伝子・蛋白の発現増強、の少なくとも2つのレベルで調節をうけるものと考えられるが、代謝調節因子を介した SIRT1 遺伝子発現の解析は過去に行われていない。

今回、我々は栄養状態に応じて活性が調節される核内受容体 (PPARs) の役割に焦点を当て、HuH7肝細胞を用いてヒトSIRT1 遺伝子の発現に関与する転写因子の同定、ならびに転写調節機序の解析を行った。

【方法】

ヒト SIRT1 遺伝子 5' 転写調節領域 約 1Kb をクローニングしたのち pA3Luc レポータープラズミドに組み込み、ヒト肝由来 HuH7 細胞に遺伝子導入した。

この条件下で最初に、代謝調節ホルモン(グルココルチコイド・インスリン、グルカゴン/cAMP)が SIRT1 遺伝子の転写活性に及ぼす効果を検討した。次に転写因子 PPAR ファミリー核内受容体 (α , γ , β/δ) が SIRT1 遺伝子の転写に及ぼす効果を評価した。さらに PPAR β/δ (以下 PPAR δ) の SIRT1 遺伝子プロモーター上の結合を変異プロモーター、EMSA および CHIP アッセイにより解析した。




【結果】

代表的な代謝調節因子であるグルココルチコイド、インスリン、forskolin (cAMP) は SIRT1 遺伝子の発現に影響を与えなかった。同様に、細胞内代謝センサーである PPAR 核内受容体ファミリーのうち、PPAR α 、 γ の共発現は SIRT1 遺伝子の発現に影響を及ぼさなかった。対照的に PPAR δ の共発現は SIRT1 遺伝子の転写活性を有意に増加させ、PPAR δ 特異的リガンド GW501516 (GW; 10 μ M) はこの効果をさら促進した。GW501516 は PPAR δ 発現下において、SIRT1 蛋白発現量も増加させた。一方 SIRT1 遺伝子転写調節領域に PPAR 応答配列 (PPRE) は存在せず、種を超えて保存された Sp1 結合配列を認めた。このため 実際に Sp1 が SIRT1 遺伝子の転写に関与すること、Sp1 が SIRT1 遺伝子 5' プロモーターへの結合することを EMSA 法、ChIP アッセイおよび Sp1 の共発現実験により確認した。興味深いことに GW501516 による PPAR δ 依存性転写促進作用は Sp1 阻害剤 mithramycin の存在下で消失したことから、PPAR δ の SIRT1 遺伝子転写に対する作用は Sp1 を介して生じているものと考えられた。

【考察】

PPAR δ は脂肪燃焼のマスターレギュレーターとされ、飢餓時に遊離脂肪酸を内因性リガンドとして活性化される。今回我々は、1) SIRT1 遺伝子が核内受容体 PPAR δ の特異的な標的の1つであること、2) PPAR δ は SIRT1 遺伝子の転写開始点近傍に存在する Sp1 を介してその作用を発揮する可能性が高いこと、など、代謝面における SIRT1 遺伝子の転写調節機構を初めて明らかにした。SIRT1 の活性化は脂肪酸酸化や個体の寿命延長と密接に関連していることから、今回の知見は、抗加齢・抗肥満を目的とした薬物の創出に貢献するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	岡 崎 瑞 穂
審 査 委 員	主 査 氏 名	高 尾 俊 弘 
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	土 居 義 典 

題 目 PPAR β/δ Regulates the Human SIRT1 Gene Transcription via Spl
(SIRT1 遺伝子の発現は転写因子 PPAR β/δ により調節され Spl が仲介する)

著 者 Mizuho Okazaki, Yasumasa Iwasaki, Mitsuru Nishiyama, Takafumi Taguchi,
Makoto Tsugita, Shuichi Nakayama, Machiko Kambayashi, Kozo Hashimoto,
Yoshio Terada

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
Endocrine Journal, (in press)

要 旨

【背景・目的】

カロリー制限は寿命の延長に結びつくことが知られている。この現象の分子機構に sirtuin protein family が関与していることが報告されるようになった。sirtuin は NAD 依存性の脱アセチル化酵素であるが、哺乳類の sirtuin は 7 つ (SIRT1-7) が存在する。このうち SIRT1 は数々の重要な転写因子を脱アセチル化することにより、近年その抗老化・抗肥満作用が注目を集めている。SIRT1 の作用は、1) 酵素活性 (resveratrol などによる活性化)、2) 遺伝子・蛋白の発現増強、の少なくとも 2 つのレベルで調節をうけるものと考えられるが、代謝調節因子を介した SIRT1 遺伝子発現の解析は過去に行われていない。

今回、申請者は栄養状態に応じて活性が調節される核内受容体 (PPARs) の役割に焦点を当て、HuH7 肝細胞を用いてヒト SIRT1 遺伝子の発現に関与する転写因子の同定、ならびに転写調節機序の解析を行った。

【方法】

ヒト SIRT1 遺伝子 5' 転写調節領域 約 1Kb をクローニングしたのち pA3Luc レポータープラスミドに組み込み、ヒト肝由来 HuH7 細胞に遺伝子導入した。

この条件下で最初に、代謝調節ホルモン (グルココルチコイド・インスリン、グルカゴン/cAMP) が SIRT1 遺伝子の転写活性に及ぼす効果をルシフェラーゼアッセイにて検討した。次に転写因子 PPAR

ファミリー核内受容体 (α , γ , β/δ)の共発現が SIRT1 遺伝子の転写に及ぼす効果を解析した。

さらに PPAR β/δ (以下 PPAR δ) の共発現および PPAR δ 特異的リガンドである GW501516 の SIRT1 遺伝子および蛋白に対する用量・時間依存性の効果について RT-PCR 法と Western blot 法を用いて検討した。また、PPAR δ は SIRT1 遺伝子プロモーターのどの部位に働きかけるのかを明らかにする目的で、SIRT1 遺伝子プロモーターの各種 deletion mutant を作成して検討した。

最後に PPAR δ の作用を仲介すると考えられる転写因子 Sp1 の SIRT1 遺伝子プロモーターへの結合を、変異を導入したプロモーター、EMSA および ChIP アッセイにより解析した。

【結果】

代表的な代謝調節因子であるグルココルチコイド、インスリン、forskolin (cAMP) は SIRT1 遺伝子の発現に影響を与えなかった。同様に、細胞内代謝センサーである PPAR 核内受容体ファミリーのうち、PPAR α , γ の共発現は SIRT1 遺伝子の発現に影響を及ぼさなかった。対照的に PPAR δ の共発現は SIRT1 遺伝子の転写活性を有意に増加させ、PPAR δ 特異的リガンド GW501516 はこの効果をさらに促進した。GW501516 は PPAR δ 発現下において、SIRT1 蛋白発現量も増加させた。

一方 SIRT1 遺伝子転写調節領域に PPAR 応答配列 (PPRE) は存在せず、種を超えて保存された Sp1 結合配列を認めた。このため 実際に Sp1 が SIRT1 遺伝子の転写に関与すること、Sp1 が SIRT1 遺伝子 5'プロモーターへの結合することを EMSA 法、ChIP アッセイおよび Sp1 の共発現実験により確認した。興味深いことに GW501516 による PPAR δ 依存性転写促進作用は Sp1 阻害剤 mithramycin の存在下で消失したことから、PPAR δ の SIRT1 遺伝子転写に対する作用は Sp1 を介して生じているものと考えられた。

以上より、SIRT1 の発現は飢餓状態で促進されることが知られているが、細胞内エネルギー枯渇時に活性化される PPAR δ が、SIRT1 の発現誘導を仲介している可能性あること、PPAR δ による SIRT1 遺伝子の転写誘導作用には、転写因子 Sp1 が何らかの形で関与していることが示唆された。

本論文は SIRT1 遺伝子が核内受容体 PPAR δ の特異的な標的の1つであること、および PPAR δ は SIRT1 遺伝子の転写開始点近傍に存在する Sp1 を介してその作用を発揮する可能性が高いことなど、代謝面における SIRT1 遺伝子の転写調節機構を初めて明らかにした。SIRT1 の活性化は脂肪酸酸化や個体の寿命延長と密接に関連していることから、今回の知見は、抗加齢・抗肥満を目的とした薬物の開発に役立つ可能性を示した。よって、本論文は高知大学博士 (医学) に値すると判断した。

氏名(本籍)	谷口 義典(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第109号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Positron Emission Tomography/Computed Tomography; a clinical tool for evaluation of enthesitis in patients with spondyloarthritides (PET/CTは、脊椎関節炎患者における付着部炎の評価のための有用な臨床的手法である)
発表誌名	Rheumatology 2010, 49, 348-354

審査委員	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	谷	俊一

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 谷 口 義 典

論 文 題 目

Positron Emission Tomography/Computed Tomography; a clinical tool for evaluation of enthesitis in patients with spondyloarthritis

(PET/CTは、脊椎関節炎患者における付着部炎の評価のための有用な臨床的手法である)

(論文要旨)

【背景・目的】血清反応陰性脊椎関節炎（以下、脊椎関節炎）は、筋/腱/靭帯/関節包などの（骨への）付着部炎や滑膜炎を主徴とする疾患であり、発症から診断されるまでに5-10年を要するといわれ、数々の治療薬に抵抗性を示す難治性疾患である。米国や欧州を中心に脊椎関節炎グループが形成され、その診断や治療の研究が報告されている。しかしながら関節リウマチで使用されている生物学的製剤（抗TNF製剤）をもってしても炎症による糜爛が存在する時点で治療を開始しても、炎症は抑制できても骨増殖は止まらなると報告されている。さらに寛解につながる早期診断方法、早期治療はまだ確立されていない状況である。

我々は、脊椎関節炎患者における付着部炎の存在を同定するための、¹⁸F FDG-PET/CT（以下、PET/CT）検査の有用性を評価する。




【方法】特に、関節（肩関節、胸鎖関節、仙腸関節、股関節、膝関節）ならびに付着部（腰椎棘突起、恥骨結合、坐骨結節）に注目し、8名の脊椎関節炎患者と7名の関節リウマチ患者のPET/CT所見を後ろ向きに比較検討した。PET/CTの非特異的所見や疑陽性所見を検討するため、20名の非リウマチ性疾患や20名の健常者からの画像も比較した。FDGの集積度合いの評価には、視覚的検討に加え、SUV max値を使用して、定量的に比較検討した(Mann-Whitney U検定)。また、脊椎関節炎患者については、従来の脊椎関節炎の診断方法で、現段階で感度の良い画像検査とされているMRIやガリウムシンチグラフィ検査などとの感度の比較検討も同時に行い、早期診断法としてのPET/CTの有用性を検討した(X^2 検定)。さらに、脊椎関節炎患者の治療前後のFDG集積の変化やSUV max値の変化についても、臨床症状や炎症反応所見との関連を含め、評価した。統計的には $P < 0.05$ を有意とした。

【結果】非リウマチ性疾患、健常者の計40名では、関節領域に有意な FDG 集積を認めず、SUV 値も低値であった。肩、股、膝関節の PET/CT 画像では、脊椎関節炎患者では付着部に、関節リウマチ患者では滑膜に、FDG の集積を認めた。脊椎関節炎患者の SUV max 値(mean ± SD)は、関節リウマチ患者に比較し、腰椎棘突起(4.83±1.15 vs 1.42±0.34; $P < 0.05$)、恥骨結合(3.93±0.87 vs 1.35±0.31; $P < 0.05$)、坐骨結節(4.76±1.50 vs 1.35±0.42; $P < 0.05$)と有意に高値を示した。

脊椎関節炎患者の PET/CT 検査による腰椎棘突起、坐骨結節の付着部炎陽性感度は、MRI や ガリウムシンチ検査によるものより有意に高かった($P < 0.05$)。脊椎関節炎患者で、腰椎棘突起、坐骨結節付着部における MRI 陰性かつ PET/CT 陽性の頻度は、それぞれ2/3例(66.6%)、3/5例(60%)であった。同様に腰椎棘突起、坐骨結節、胸鎖関節付着部におけるガリウムシンチ陰性かつ PET/CT 陽性の頻度は、それぞれ3/3例(100%)、3/3例(100%)、2/2例(100%)であった。また同様に、これら付着部炎同定において、PET/CT 陰性かつ MRI またはガリウムシンチ陽性頻度は0%であり、PET/CT が付着部炎診断に高い感度、特異度を有していることが示唆された。

【結論】MRI検査は、脊椎関節炎患者の付着部炎の同定に使用されているが定量的性に欠ける。PET/CT 検査は、付着部炎を同定するための、MRI検査に代わりうる有用な画像検査法であり、今後、脊椎関節炎の早期診断に貢献しうるものと思われる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	谷 口 義 典
審 査 委 員	主 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 
	副 査 氏 名	谷 俊 一 

題 目 Positron Emission Tomography/Computed Tomography; a clinical tool for evaluation of enthesitis in patients with spondyloarthritis (PET/CT は、脊椎関節炎患者における付着部炎の評価のための有用な臨床的手法である)

著 者 Yoshinori Taniguchi, Kaoru Arai, Yoshitaka Kumon, Mitsutaka Fukumoto, Takenao Ohnishi, Taro Horino, Toru Kagawa, Shigeto Kobayashi, Yasuhiro Ogawa, Yoshio Terada

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Rheumatology (Oxford) (in press)

要 旨

【背景・目的】血清反応陰性脊椎関節炎（以下、脊椎関節炎）は、筋/腱/靭帯/関節包などの（骨への）付着部炎や滑膜炎を主徴とする疾患であり、発症から診断されるまでに 5～10 年を要するといわれ、数々の治療薬に抵抗性を示す難治性疾患である。米国や欧州を中心に脊椎関節炎グループが形成され、その診断や治療の研究が報告されている。しかしながら関節リウマチで使用されている生物学的製剤（抗 TNF 製剤）をもってしても炎症による糜爛が存在する時点で治療を開始しても、炎症は抑制できても骨増殖は止まらなると報告されている。すなわち脊椎関節炎では、寛解につながる早期診断方法、早期治療はまだ確立されていない状況である。そこで本研究では、脊椎関節炎患者における付着部炎の存在を同定するための、¹⁸F FDG-PET/CT（以下、PET/CT）検査の有用性を評価することを目的とした。

【臨床材料と方法】特に、関節（肩関節、胸鎖関節、仙腸関節、股関節、膝関節）ならびに付着部（腰椎棘突起、恥骨結合、坐骨結節）に注目し、8名の脊椎関節炎患者と7名の関節リウマチ患者のPET/CT所見を後ろ向きに比較検討した。PET/CTの非特異的所見や疑陽性所見を検討するため、20名の非リウマチ性疾患や20名の健常者からの画像も比較した。FDGの集積度合いの評価には、視覚的検討に加え、SUV max値を使用して、定量的に比較検討した(Mann-Whitney U検定)。また、脊椎関節炎患者については、従来の脊椎関節炎の診断方法で、現段階で感度の良い画像検査とされているMRIやガリウムシンチグラフィ検査などとの感度の比較検討も同時に行い、早期診断法としてのPET/CTの有用性を検討した(X^2 検定)。さらに、脊椎関節炎患者の治療前後のFDG集積の変化やSUV max値の変化についても、臨床症状や炎症反応所見との関連を含め、評価した。統計的には $P < 0.05$ を有意とした。

【結果】非リウマチ性疾患、健常者の計40名では、関節領域に有意なFDG集積を認めず、SUV max値も低値であった。肩、股、膝関節のPET/CT画像では、脊椎関節炎患者では付着部に、関節リウマチ患者では滑膜に、FDGの集積を認めた。脊椎関節炎患者のSUV max値(mean \pm SD)は、関節リウマチ患者に比較し、腰椎棘突起(4.83 ± 1.15 vs 1.42 ± 0.34 ; $P < 0.05$)、恥骨結合(3.93 ± 0.87 vs 1.35 ± 0.31 ; $P < 0.05$)、坐骨結節(4.76 ± 1.50 vs 1.35 ± 0.42 ; $P < 0.05$)と有意に高値を示した。

脊椎関節炎患者のPET/CT検査による腰椎棘突起、坐骨結節の付着部炎陽性感度は、MRIやガリウムシンチ検査によるものより有意に高かった($P < 0.05$)。脊椎関節炎患者で、腰椎棘突起、坐骨結節付着部におけるMRI陰性かつPET/CT陽性の頻度は、それぞれ2/3例(66.6%)、3/5例(60%)であった。同様に腰椎棘突起、坐骨結節、胸鎖関節付着部におけるガリウムシンチ陰性かつPET/CT陽性の頻度は、それぞれ3/3例(100%)、3/3例(100%)、2/2例(100%)であった。また同様に、これら付着部炎同定において、PET/CT陰性かつMRIまたはガリウムシンチ陽性頻度は0%であり、PET/CTが付着部炎診断に高い感度、特異度を有していることが示唆された。

【結論】MRI検査は、脊椎関節炎患者の付着部炎の同定に使用されているが定量的性に欠ける。それに比較してPET/CT検査は、付着部炎を同定するためのMRI検査に代わりうる有用な画像検査法であり、今後、脊椎関節炎の早期診断に貢献しうるものと期待される。

氏名(本籍)	西岡 千恵 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第111号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells (mTORシグナルの阻害はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による急性骨髄性白血病の分化誘導能や細胞増殖抑制を高める)
発表誌名	Leukemia, 22(12): 2159-68, 2008年12月

審査委員	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	執印	太郎

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 西岡 千恵

論文題目

Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone-deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells. (mTOR シグナルの阻害はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による急性骨髄性白血病細胞の分化誘導能や細胞増殖抑制を高める。)

(論文要旨)

急性骨髄性白血病(AML)は造血幹細胞あるいは前駆細胞のレベルで分化が停止し、異常増殖をきたす予後不良な造血器悪性腫瘍である。近年の研究で、造血器悪性腫瘍の発症にはエピジェネティックなメカニズムが関与しているといわれている。最初に示されたのは、急性前骨髄球性白血病(APL)において染色体転座の結果生じる promyelocytic leukemia (PML)/retinoic acid receptor- α (RAR α) 融合蛋白にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が結合し、分化誘導に必要な遺伝子の転写を抑制している、というものであった。このような場合、HDAC を直接抑制する HDAC 阻害剤を用いると、抑制されていた遺伝子の転写が活性化され、分化が誘導されるようになるということが既に報告されており、HDAC 阻害剤は造血器悪性腫瘍に対する新たな治療薬剤として期待されている。

今回我々は、新規ベンズアミド系 HDAC 阻害剤 MS-275 と、RTK の下流シグナルである serine/threonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR)のシグナル阻害剤 RAD001との併用効果について AML 細胞株である HL60 細胞と APL 細胞株である NB4 細胞を用いて検討した。MS-275 はこれらの細胞において、mTOR の上流シグナル AKT や mTOR の下流シグナル p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K)を脱リン酸化し、それらの活性化を阻害することをウエスタンブロット法で確認した。そこで MS-275 を RAD001 と併用して、mTOR シグナルを更に阻害したところ相乗的な細胞増殖抑制効果が見られた。また、高濃度の MS-275 (1 μ M)と RAD001(10 nM)を併用するとアポトーシス誘導能が相乗的に増強することを細胞周期解析とアネキシン染色で確認した。一方、低濃度の MS-275(0.1, 0.3 μ M)と RAD001(10 nM)の併用では、アポトーシスは誘導されず、むしろ分化誘導能が増強される事を細胞表面上の CD11b 発現と NBT 還元法で確認した。そこで次に、分化誘導や細胞増殖と関わりがある核内転写因子 CCAAT enhancer-binding protein ϵ (C/EBP ϵ)や c-Myc、cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} に及ぼす影響についてウエスタンブロット法を用いて確認した。C/EBP ϵ と p27^{kip1} 発現はそれぞれ、MS-275 単剤あるいは RAD001 単剤でも誘導されたが、併用することによってその発現レベルは相乗的に増加した。一方、c-Myc の発現レベルは相乗的に低下した。




HDAC 阻害剤はヒストン H3 をアセチル化し、遺伝子発現を誘導することが確認されている。RAD001 は、MS-275 が誘導したヒストン H3 のアセチル化を増強する事をウエスタンブロット法で確認した。そこで次に Chromatin immunoprecipitation (ChIP)アッセイを用いて C/EBP ϵ のプロモータ

一領域におけるヒストン H3 のアセチル化について確認したところ、併用によって、C/EBP ϵ のプロモーター領域におけるヒストン H3 のアセチル化が増強した。つまり、RAD001 はエピジェネティックな修飾により、MS-275 が誘導した C/EBP ϵ の発現を増強していることが明らかになった。

更に、*in vivo* でも MS-275 と RAD001 の併用効果について検討した。ヒト AML 細胞を移植し腫瘍を形成したヌードマウスに、MS-275 あるいは RAD001 を経口投与した結果、それぞれ 60%あるいは 50%の腫瘍サイズ抑制効果を示したが、両剤を併用すると腫瘍サイズが 25%まで抑制された。

以上の結果から、RAD001 は、MS-275 が誘導した細胞増殖や分化を制御する分子の発現を調節し、その抗白血病細胞効果を更に増強している事が明らかとなった。mTOR 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は白血病治療において、有望な新規治療戦略と考えられる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	西 岡 千 恵
審 査 委 員	主 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	宇 高 恵 子 
	副 査 氏 名	執 印 太 郎 

題 目 Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells
 (mTORシグナルの阻害はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による急性骨髄性白血病の分化誘導能や細胞増殖抑制を高める)

著 者 C Nishioka, T Ikezoe, J Yang, HP Koeffler, A Yokoyama

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Leukemia, 22(12):2159-68, 2008年12月

要 旨

【目的】急性骨髄性白血病(AML)は造血幹細胞あるいは前駆細胞のレベルで分化が停止し、異常増殖をきたす造血器悪性腫瘍で、発症にはエピジェネティックなメカニズムの関与も示唆されている。急性前骨髄球性白血病(APL)においては、染色体転座の結果生じる promyelocytic leukemia (PML)/retinoic acid receptor- α (RAR α)融合蛋白にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が結合し、分化誘導に必要な遺伝子の転写を抑制しており、HDACを直接抑制するHDAC阻害剤を用いると、抑制遺伝子の転写が活性化され、分化誘導がされるようになり、HDAC阻害剤は造血器悪性腫瘍に対する新たな治療薬剤として期待されている。一方AML及びAPL細胞株においては、serine/threonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR)の上流に位置するAKTの活性化が観察される。今回我々は、新規ベンズアミド系HDAC阻害剤MS-275と、mTORのシグナル阻害剤RAD001との併用効果について検討した。

【方法】細胞株は AML 細胞株 HL60 細胞と APL 細胞株 NB4 細胞を用いた。細胞を 48 時間 MS-275、RAD001 各単剤あるいは併用の存在下で培養し、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法を用いて細胞増殖抑制効果を検討した。細胞周期解析、アポトーシス解析についてはフローサイトメトリーを用い、細胞分化誘導能については、マクロファージ、単球、顆粒球の細胞表面マーカーである CD11b 発現をフローサイトメトリーにて測定し、さらに顆粒球への分化指標となる NBT 還元能を測定した。蛋白質解析については細胞から抽出した全蛋白、核蛋白を用いてウエスタンブロット法で検討した。目的遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾については Chromatin immunoprecipitation (ChIP)法を用いて検討した。In vivo での MS-275 と RAD001 の効果については、BALB/c ヌードマウスに HL60 細胞を皮下移植し腫瘍形成した時点で、コントロール群、MS-275、RAD001 各単剤投与群あるいは両剤投与群の 4 つに分けて、その後薬剤を経口投与し、その効果を検討した。

【結果】MS-275 はこれらの細胞において、mTOR の上流シグナル AKT や mTOR の下流シグナル p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K)を脱リン酸化し、それらの活性化を阻害することを確認した。そこで MS-275 を RAD001 と併用して、mTOR シグナルを更に阻害したところ相乗的な細胞増殖抑制効果が見られた。また、高濃度の MS-275 (1 μ M)と RAD001(10 nM)を併用するとアポトーシス誘導能が相乗的に増強し、一方、低濃度の MS-275(0.1, 0.3 μ M)と RAD001(10 nM)の併用では、アポトーシスは誘導されず、むしろ分化誘導能が増強される事を認めた。そこで次に、顆粒球分化において重要な核内転写因子 CCAAT enhancer-binding protein ϵ (C/EBP ϵ)、細胞周期、細胞増殖と関わりがある c-Myc、cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} に及ぼす影響について検討し、C/EBP ϵ と p27^{kip1} 発現はそれぞれ MS-275 単剤あるいは RAD001 単剤でも誘導されたが、併用することによってその発現レベルは相乗的に増加した。一方、c-Myc の発現レベルは相乗的に低下した。次に、RAD001 が MS-275 のエピジェネティックな効果に対してどのような影響を及ぼすのかどうかを検討した。そこでまず、RAD001 が MS-275 の誘導したヒストン H3 のアセチル化に及ぼす影響について調べたところ、RAD001 が MS-275 の誘導したヒストン H3 のアセチル化を増強させた。次に C/EBP ϵ のプロモーター領域におけるヒストン H3 のアセチル化について検討した結果、併用によって、C/EBP ϵ のプロモーター領域におけるヒストン H3 のアセチル化が増強した。更に、in vivo で効果を検討した結果、MS-275 あるいは RAD001 各単剤投与群ではそれぞれ 60%あるいは 50%の腫瘍サイズ抑制効果を示したのに対して、両剤投与群の腫瘍サイズが 25%まで抑制され、併用による相乗効果が in vivo でも確認された。

【考察】低濃度の MS-275 と RAD001 を併用すると、MS-275 単剤のときよりも、顆粒球分化を誘導する C/EBP ϵ のプロモーター領域におけるヒストン H3 のアセチル化が増強した。このため C/EBP ϵ の転写活性が上昇し、発現が増強、結果的に細胞分化誘導能が増強したものと思われる。このことから、RAD001 が MS-275 のエピジェネティックな効果を高めている可能性が示唆された。更に、MS-275 と RAD001 の併用によって p70S6K の活性が相乗的に阻害され、結果的に c-Myc の発現が低下し、細胞増殖が阻害されたものと思われる。

【結論】 RAD001 は、MS-275 が誘導した細胞増殖や分化を制御する分子の発現を調節し、その抗白血病細胞効果を更に増強していることが示唆された。従って、mTOR 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は AML 治療において、有望な新規治療戦略となりうる可能性がある。

氏名(本籍)	田中 健二郎 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第112号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Juvenile Social Experience Regulates Central Neuropeptides Relevant to Emotional and Social Behaviors (幼若期の社会環境が不安や社会性に関わる神経ペプチドに及ぼす影響)
発表誌名	Neuroscience, 166(2010) 1036-1042

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	高尾	俊弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 田中 健二郎

論文題目 Juvenile Social Experience Regulates Central Neuropeptides
Relevant to Emotional and Social Behaviors

(幼若期の社会環境が不安や社会性に関わる神経ペプチドに及ぼす影響)

(論文要旨)

[緒言]

幼児期をストレスの多い社会環境で過ごす、成長後に不安や気分、人格に関わるいくつかの精神疾患の発症するリスクが高まる。近年、哺乳類の情動や社会性にとって重要な生理活性物質としてバソプレシンやオキシトシンといったペプチドが報告され、Friesら(2005)は、乳幼児期に育児放棄された子供においてバソプレシンやオキシトシンの血中濃度が正常より有意に低いことを明らかにした。これは、幼児期に受ける社会的刺激が極端に乏しいと、バソプレシンやオキシトシンの神経内分泌系の発達が妨げられることを示唆している。そこで本研究では、幼若期ラットを社会的に隔離した環境で飼育し、視床下部室傍核におけるバソプレシンおよびオキシトシンの発現と、これらのペプチドが関与する行動を解析した。

[方法]

Long-Evansラットを用いて実験を行った。ラットは全て生後23日齢で離乳し、同時に単独飼育群と複数飼育群(同性同腹子2または3匹)に分け、少なくとも2週間それぞれの環境で飼育した。視床下部バソプレシンおよびオキシトシンの免疫組織化学的染色には40日齢(単独・複数の各飼育環境に移されて17日目)のラットを用いた。行動試験は、不安の程度を測定する試験(高架式十字迷路試験)と社会的認知能力を測定する試験(社会的認知試験)を38から48日齢の間(各飼育環境に移されて15から25日目)に行った。




[結果]

免疫組織化学的解析の結果、単独群は複数群と比較して視床下部バソプレシンおよびオキシトシン産生ニューロンに変化が認められた。単独群の雄は視床下部室傍核内側小細胞性領域腹側部におけるバソプレシン陽性細胞数が複数群と比較して有意に少なかった。単独群の雌では、視床下部室傍核内側小細胞性領域背側部におけるオキシトシン陽性細胞の数が複数群と比較して有意に少なかった。単独群は行動学的解析においても複数群と比較して違いが認められた。高架式十字迷路試験では、単独群の雄は複数群より有意に不安行動が増強していた。社会的認知試験では、雌雄ともに単独群において社会的認知能力が著しく低下していた。

[考察]

視床下部室傍核小細胞性領域に分布するバソプレシンおよびオキシトシンは、主に脳の扁桃体や中隔、側坐核といった辺縁系領域に作用し、情動や社会性を調節することが知られている。我々は本研究において、幼若期ラットにおける社会的隔離が視床下部室傍核小細胞性領域におけるバソプレシンまたはオキシトシン産生ニューロンの減少と、不安行動の増強や社会認知能力の低下といった行動学的変化を引き起こすことを示した。この結果は、幼若期における社会環境がバソプレシンおよびオキシトシン神経系とそれに関わる行動の発達に影響を及ぼす可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	田 中 健 二 朗
審 査 委 員	主 査 氏 名	桃 秀 人 
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	高 尾 俊 弘 

題 目 Juvenile Social Experience Regulates Central Neuropeptides Relevant to Emotional and Social Behaviors
 (幼若期の社会環境が不安や社会性に関わる神経ペプチドに及ぼす影響)

著 者 K. TANAKA, Y. OSAKO and K. YURI

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Neuroscience, (in press)

要 旨

幼児期の過度なストレスは、成長後に不安や気分、人格に関わるいくつかの精神疾患の発症リスクを高めることが知られている。乳幼児期の育児放棄というストレスが子どもにおけるバゾプレッシンとオキシトシンの血中濃度を有意に低下させるとの知見は、これらの神経ペプチドと精神疾患との関連性を示唆している。バゾプレッシンとオキシトシンは視床下部の室傍核と視索上核の大細胞性神経分泌細胞で合成され、下垂体後葉の軸索終末から血中に放出される。血中に放出されたバゾプレッシンは血漿浸透圧や血圧の調節に、オキシトシンは分娩や射乳に役割を果たしている。バゾプレッシンとオキシトシンはまた、主として室傍核の小細胞性ニューロンでも合成され、脳内に神経伝達物質や神経修飾物質として放出され、母性行動、父性行動、愛着形成、社会的認知など、多くの社会的行動に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

そこで申請者らは、幼若ラットを社会的に隔離した環境で飼育し、視床下部室傍

核におけるバゾプレッシンおよびオキシトシンの発現と、これらのペプチドが関与する行動を解析した。具体的には、Long-Evans 幼若ラットを生後 23 日齢で離乳させ、単独飼育群と複数飼育群（同性同腹子 2 または 3 匹）に分け、40 日齢において視床下部のバゾプレッシンとオキシトシンの免疫組織化学的染色を行った。また、不安の程度を測定する高架式十字迷路試験と社会的認知能力を測定する社会的認知試験を 38 から 48 日齢の間に行った。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 単独飼育群の雄では、視床下部室傍核内側小細胞性領域腹側部におけるバゾプレッシン陽性細胞数が複数飼育群の雄より有意に少なかった。
- 2) 単独飼育群の雌では、視床下部室傍核内側小細胞性領域背側部におけるオキシトシン陽性細胞数が複数飼育群の雌より有意に少なかった。
- 3) 高架式十字迷路試験において、複数飼育群の雄より単独飼育群の雄の不安行動が有意に増強していた。
- 4) 社会的認知試験において、雌雄とも複数飼育群より単独飼育群の社会的認知能力が有意に低下していた。

以上の成績は、幼若ラットにおける社会的隔離がバゾプレッシン神経系やオキシトシン神経系を含む神経回路網の形成過程に影響を与え、不安行動の増強や社会的認知能力の低下といった行動学的変化をもたらすことを示唆している。

以上より、申請者の論文は、脳内のバゾプレッシン神経系やオキシトシン神経系の脳機能に果たす役割の解明のみならず、その障害により生じうる精神疾患の病態の解明にも寄与することが期待される。よって審査員一同は、本論文を高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	西村 拓起 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第113号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位論文題目	Mechanisms of γ -hydroxybutyric acid production during the early postmortem period (死後早期における γ -ヒドロキシ酪酸の産生機序)
発表誌名	Forensic Toxicology, 27(2): 55-60, 2009年7月

審査委員	主査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	加藤	邦夫

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 西村 拡起

論文題目 Mechanisms of γ -hydroxybutyric acid production during the early postmortem period
(死後早期における γ -ヒドロキシ酪酸の産生機序)

(論文要旨)

はじめに

濫用薬物として欧米を中心に社会問題となっている γ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) が死後速やかに体組織中で産生されることが知られている。死後早期におけるGHB産生には死後も遺体内で残留する酵素活性による関与が指摘されているものの、その正確な機序および材料基質については未だ十分に解明されていない。

本研究では、ガスクロマトグラフ (GC) による血液および肝臓中GHBの分析法を考案し、死後早期の剖検例におけるGHB産生と遺体内残留酵素活性との関連性を明らかにするために、死亡時の高温曝露がその後のGHB産生に及ぼす影響について検討した。また、ウサギの肝臓ホモジェネートと諸種酵素阻害剤を用いて、死後早期におけるGHBの産生経路について検討した。

材料および方法

【GHBの抽出操作法】

血液または肝臓ホモジェネート (肝臓: 精製水=1:1) 1 mlを5%過塩素酸1 mlで除タンパク処理した。上清を1 ml採取し、5M NaOH 0.1 mlおよび108 μ g/ml α -メチレン- γ -ブチロラクトン (0.1M NaOH水溶液、内部標準) 0.1 mlを添加後、ジクロロメタン2 mlで水層を洗浄した。水層を採取し、濃硫酸0.4 mlを加え、GHBを γ -ブチロラクトンに変換後、ジクロロメタン6 mlで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、窒素気流により約20 μ lに濃縮し、その1 μ lをGCに注入した。

【剖検例の血液および肝臓における内因性GHB濃度】

GHBの摂取事実がない剖検30例 (死後経過時間: 28.1 \pm 11.0時間) を焼損群 (17例) および非焼損群 (13例) に分類し、両群の血液および肝臓における内因性GHB濃度を比較することで死後早期のGHB産生に及ぼす死亡時高温曝露の影響を検討した。

【動物実験】

ウサギ肝臓ホモジェネート [肝臓: 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) =1:1] 1mlに、ガバクリン (1 mg/ml、GABAアミノ基転移酵素阻害剤)、バルプロ酸 (10mg/ml、GABAアミノ基転移酵素阻害剤)、N-ホルミルグリシン (1mg/ml、コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素阻害剤)、ピラゾール (1 mg/ml、アルコール脱水素酵素阻害剤)、またはN,N-ジエチルジチオカルバミン酸 (1mg/ml、アルデ

ヒド脱水素酵素阻害剤)を各0.1 ml添加し、30℃で加温した。GHB濃度は加温直前および2時間後に測定(各n=3)し、阻害剤非添加ホモジェネートを対照にGHB産生の阻害率を検討した。




結果および考察

本GC法の精製水、血液および肝臓ホモジェネートにおける最小検出限界(S/N=3)は、それぞれ0.15、0.25および0.15 µg/mlであった。検量線は、いずれもGHB濃度が0.88~35.0 µg/mlの範囲で良好な直線性を示した($r=0.999$)。また、それら検量線の傾きはほぼ一致しており、抽出の際の試料マトリックスの影響は認められなかった。ターゲット濃度に対する分析誤差は概ね10%未満であった。同時再現性は、変動係数が0.2~2.3%と極めて良好であった。

焼損群の血液および肝臓における内因性GHB濃度は、非焼損群のそれらに比して低値を示しており、その主な原因としてGHBの死後産生に関わる酵素が高温に曝露されたことにより失活したことが考えられた。

ウサギ肝臓ホモジェネートにバルプロ酸、N-ホルミルグリシン、ピラゾールまたはN,N-ジエチルジチオカルバミン酸を添加したときのGHB産生の阻害率は、それぞれ10.4、74.0、17.7および12.8%であった。また、N-ホルミルグリシンおよびピラゾールを同時に添加した試料では、GHBの産生は91.1%阻害された。死後早期のGHB産生には、その基質としてコハク酸、GABA/プトレッシンおよび1,4-ブタンジオールがそれぞれ約70、10および20%の割合で関与している可能性が示唆された。一方、ガバクリンを添加した試料では、GHB産生が255%増加したが、その原因は現在のところ不明である。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	西 村 拓 起
審 査 委 員	主 査 氏 名 横 谷 邦 彦	
	副 査 氏 名 菅 沼 成 文	
	副 査 氏 名 加 藤 邦 夫	

題 目 Mechanisms of γ -hydroxybutyric acid production during the early postmortem period
 (死後早期における γ -ヒドロキシ酪酸の産生機序)

著 者 Hiroyuki Nishimura, Fumio Moriya, Yoshiaki Hashimoto

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Forensic Toxicology, 27(2): 55-60, 2009年7月

要 旨

γ -ヒドロキシ酪酸(GHB)は、生体内に微量に存在する短鎖脂肪酸であり、1960年に麻酔薬として合成された。その後、欧米ではナルコレプシー、カタレプシー、アルコール依存症などの治療に用いられたが、多幸、催眠などの中枢神経症状により若年層を中心に乱用が急増し、2000年にはFDA(アメリカ食品医薬品局)がスケジュールIの規制薬物に指定した。我が国においても2001年10月に麻薬指定されたが、今後GHBによる中毒死、乱用の増加が懸念されている。しかし、遺体内の内因性GHBは死後も増加するため、外来性GHBとの鑑別が困難である。そこで今回、死後におけるGHB増加機序を遺体内残留酵素との関連で明らかにした。

【方法と結果】

本論文は、①血液および肝臓中GHBの分析法の開発、②ヒト死後早期GHB産生への遺体内残留酵素の関与、③ウサギ肝臓を用いたin vitro実験によるGHB

産生経路の解析、から構成されている。

①血液および肝臓中 GHB の分析法の開発

血液または肝臓ホモジネートを過塩素酸で除タンパク処理し、上清に NaOH および α -メチレン- γ -ブチロラクトン (内部標準) を添加後、ジクロロメタンで水層を洗浄した。水層を採取し、濃硫酸により GHB を γ -ブチロラクトンに変換した後ジクロロメタンで抽出した。有機層を窒素気流により濃縮し、ガス・クロマトグラフィーを用いて測定した。精製水、血液、肝臓ホモジネートにおける最小検出限界は 0.15、0.25、0.15 $\mu\text{g/ml}$ であった。検量線は GHB 濃度が 0.88~35.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性 ($r=0.999$) を示し、分析誤差も 10% 未満、再現性は変動係数が 0.2~2.3% であり、優れた測定法といえる。

②ヒト死後早期 GHB 産生への遺体内残留酵素の関与

GHB の摂取事実がない剖検 30 例 (死後経過時間: 28.1 ± 11.0 時間) を焼損群 (17 例) および非焼損群 (13 例) に分類し、両群の血液と肝臓における内因性 GHB 濃度を比較した。焼損群の血液と肝臓における内因性 GHB 濃度は、非焼損群のそれらに比して低値を示しており、GHB の死後産生に関わる酵素の高温曝露による失活が考えられた。

③ウサギ肝臓を用いた *in vitro* 実験による GHB 産生経路の解析

ウサギ肝臓ホモジネートに、バルプロ酸 (GABA アミノ基転移酵素阻害薬)、N-ホルミルグリシン (コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素阻害薬)、ピラゾール (アルコール脱水素酵素阻害薬)、または N,N-ジエチルジチオカルバミン酸 (アルデヒド脱水素酵素阻害薬) を添加し 30°C でインキュベートした。GHB をインキュベーション直前および 2 時間後に測定した。GHB 産生の阻害率は、バルプロ酸 (10.4%)、N-ホルミルグリシン (74.0%)、ピラゾール (17.7%)、N,N-ジエチルジチオカルバミン酸 (12.8%) であった。従って GHB 産生の基質として、コハク酸 (70%)、GABA/プロレツシン (10%)、1,4-ブタンジオール (20%) が関与していることが示唆された。

この論文は、遺体内の内因性 GHB の死後増加に関与する代謝経路を遺体内残留酵素との関連で明らかにした優れたものである。今後 GHB の中毒死症例との鑑別にも役立つことから、審査員一同は申請論文を高知大学博士 (医学) の学位授与に値するものと判断する。

氏名(本籍)	堂野 純孝 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第114号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月31日
学位論文題目	Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants (乳幼児における Epstein-Barr ウイルスによる伝染性単核症の診断)
発表誌名	Pediatrics International, (in press)

審査委員	主査	教授	大畑	雅典
	副査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	横山	彰仁

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 堂野 純孝

論 文 題 目

Diagnosis of infectious mononucleosis caused by
Epstein-Barr virus in infants
(乳幼児における Epstein-Barr ウイルスによる伝染性単核症の
診断)

(論文要旨)

【背景・目的】

伝染性単核症 (以下 IM) の診断は、通常複数の抗体測定による血清診断に基づいて行うが、乳児では EB ウイルス (以下 EBV) 抗体の産生が弱く、VCA-IgM 抗体陰性例が多い。私たちは、IM 様症状発症早期に VCA-IgG 抗体、VCA-IgM 抗体を含む全ての EBV 抗体が陰性で、末梢血中に EBV ゲノムが検出された乳児を複数例経験した。今回、初診時ないし急性期に EBV 抗体が陰性の IM 症例の頻度、患者年齢別で高い診断率が得られる抗体測定を明らかにすることを目的として臨床研究を行った。

【方法】

Sumaya の診断基準で IM と診断された 104 例の小児患者について、後方視的に血清 EBV 抗体価と末梢血単核球中の EBV ゲノム量 (急性期 EBV ゲノム量の検討は 35 例に施行) を評価検討した。

患者は 1988 年~2003 年に高知大学医学部附属病院小児科を受診した生後 2 ヶ月から 13 歳の乳幼児、小児で、1 歳未満、1 歳、2~3 歳、4 歳以上の 4 群に分類して解析した。病期は発症後 3 週以内を急性期、4~8 週を回復期、9~28 週を前期治癒期、29 週以降を後期治癒期とした。

EBV 抗体は immunofluorescence assay (IF) で測定 (SRL) し、1:10 以上を陽性とし、EBV ゲノムの定量は EBV ゲノムの gp220 領域を標的にした PCR 法を用いた半定量法、LMP1 領域を標的にした real-time PCR 法で行った。

統計学的検討は、抗体価の幾何学的平均値については Mann-Whitney U-test を用いた。抗体陽性者と陰性者の有意差検定には、 χ^2 -test、Yates χ^2 -test、Fischer 検定を用いた。

【結果】

急性期における VCA-IgM 抗体陽性率は、4 歳以上の小児が 80%であったのに対し、2~3 歳は 64.7%、1 歳は 39.1%、1 歳未満では 25%と年齢が下がるに従って低下し、4 歳以上の小児と 1 歳、1 歳未満との間には有差 ($p < 0.01$) が見られた。VCA-IgM 抗体価の幾何学的平均値も 4 歳以上の小児は 1 歳未満に比して有意 ($p < 0.01$) に高値であった。

急性期における VCA-IgG 抗体陽性率は 92.3%と高く、4 歳以上の小児と 2~3 歳では 100%陽性であったのに対して、1 歳は 87.0%、1 歳未満は 79.2%で、乳幼児では急性期 VCA-IgG 抗体

陰性例が 13~20% 観察された。急性期 VCA-IgG 抗体価の幾何学的平均値も低年齢程低く、4 歳以上の小児は 1 歳未満に比して有意 ($P < 0.05$) に高値であった。ペア血清による抗体価の 4 倍以上の上昇による診断率については、1 歳未満が 73.7%、1 歳が 50%、2~3 歳が 33.3%、4 歳以上が 5.9% で、VCA-IgM 抗体陰性例が多い 1 歳未満では VCA-IgG 抗体ペア血清測定による診断率が高いことが判明した。

急性期における EA-IgG 抗体は、1 歳未満が 0% で、年齢と共に陽性率が上昇し、4 歳以上が 63.3% であったが、回復期以降にも陽性例が多く、血清診断には有用でないことが判明した。回復期以降に陽性化する抗 EBNA 抗体は、約 20% の例が陰性のままであった。

急性期においては、乳児の約 20%、1 歳の 13% は EBV 関連抗体が全て陰性であり、抗体検査を繰り返し施行する必要があった。

急性期の末梢血単核球中の EBV-DNA は、検討した 35 例全例で検出され、EBV-DNA 量と年齢、EBV 抗体価に相関はなかった。

【結語】

私たちは IM 様症状を呈し、急性期に EBV 抗体が全て陰性で、末梢血単核球中に EBV ゲノム陽性を認め、後に VCA-IgG 抗体が陽性となった乳児例を 3 例経験した。年齢によって抗体反応が著しく異なることが明らかとなった。IM 様症状を呈した乳児の急性期においては EBV 抗体陰性例の頻度が約 20% と高く、その診断には末梢血単核球中の EBV ゲノム量を評価することが有用であり、「急性期における、EBV 抗体陰性例での末梢血中の EBV ゲノム陽性」を診断基準に加える事が、特に IM 様症状を呈する乳幼児例において診断の感度向上に寄与すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	堂 野 純 孝
審 査 委 員	主 査 氏 名	大 畑 雅 典 印
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 印
	副 査 氏 名	横 山 彰 仁 印

題 目 Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus
in infants
 (乳幼児における Epstein-Barr ウイルスによる伝染性単核症の診断)

著 者 Sumitaka Dohno, Akihiko Maeda, Yoshihito Ishiura, Tetsuya Sato,
 Mikiya Fujieda, Hiroshi Wakiguchi

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、 年 月
 Pediatrics International, (in press)

要 旨

伝染性単核球症 (infectious mononucleosis : 以下 IM と略す) は Epstein-Barr (以下 EB と略す) ウイルスの初感染により引き起こされる急性感染症であり、発熱、咽頭扁桃炎、頸部リンパ節腫脹、肝脾腫などの症状を呈し、末梢血中に異型リンパ球の出現を特徴とする。IM の診断は、これら臨床症状に加え、EB ウイルスに対するさまざまな抗体測定による血清診断に基づいて行なわれる。思春期以降の成人の IM の診断は比較的容易であるが、乳児では EB ウイルス抗体の産生が弱く、ウイルスカプシド抗原 viral capsid antigen (VCA) に対する抗体、特に VCA-IgM 抗体陰性例が多いため、血清抗体測定による IM の診断が困難な場合があった。

申請者らは IM 様症状発症早期に VCA-IgG 抗体、VCA-IgM 抗体を含む全ての EB ウイルス抗体が陰性にもかかわらず、末梢血中に EB ウイルスのゲノムが検出された乳児を複数例経験した。そこで申請者らは、初診時ないし急性期に EB ウイルス抗体が陰性の IM 症例の頻度、および患者年齢別で高い診断率が得られる抗体測定方法を明らかにすることを目的として臨床研究を行った。

方法として、Sumaya らが提唱した IM の診断基準に基づき、IM と診断された 104 例の小児患者について、後方視的に血清 EB ウイルス抗体価の測定を行った。急性期における末梢血単核球中の EB ウイルスゲノム量解析は 35 例に施行した。

患者は 1988 年~2003 年に高知大学医学部附属病院小児科を受診した生後 2 ヶ月から 13 歳の乳幼児と小児であり、1 歳未満、1 歳、2~3 歳、4 歳以上の 4 群に分けて解析した。病期の規定として、発症後 3 週以内を急性期、4~8 週を回復期、9~28 週を前期治癒期、29 週以降を後期治癒期とした。

EB ウイルス抗体は immunofluorescence assay (IF) で測定し、10 倍以上を陽性とした。また EB ウイルスゲノム量の定量は、ウイルスゲノムの gp220 領域を標的にした PCR 法を用いた半定量法、もしくはウイルス膜蛋白をコードする LMP1 領域を標的にした real-time PCR 法で行った。

統計学的解析は、抗体価の幾何学的平均値については Mann-Whitney U-test を用いた。抗体陽性者と陰性者の有意差検定には χ^2 -test、Yates χ^2 -test、Fischer 検定を用いた。

IM 急性期における VCA-IgM 抗体陽性率は、4 歳以上の小児が 80%であったのに対し、2~3 歳児は 64.7%、1 歳未満では 25%と年齢が下がるに従って低下し、4 歳以上の小児と 1 歳児および 1 歳未満の小児の間には有意差 ($p < 0.01$) がみられた。また VCA-IgM 抗体価の幾何学的平均値も 4 歳以上の小児は、1 歳未満の小児と比べて有意差 ($p < 0.01$) をもって高値であった。

急性期における VCA-IgG 抗体陽性率は、92.3%と高く、4 歳以上の小児と 2~3 歳児では 100%陽性であったのに対して、1 歳児では 87%、1 歳未満では 79.2%であり、乳幼児では急性期 VCA-IgG 抗体陰性例が 13~20%認められた。また急性期 VCA-IgG 抗体価の幾何学的平均値も年齢が低いほど低値であり、4 歳以上の小児は 1 歳未満に比べて有意 ($p < 0.05$) に高値であった。Sumaya らの IM 診断基準にある、「ペア血清による VCA-IgG 抗体価の 4 倍以上の上昇」による診断率について解析した結果、1 歳未満が 73.7%、1 歳児が 50%、2~3 歳児が 33.3%、4 歳以上が 5.9%であり、VCA-IgM 抗体陰性例が多い 1 歳未満では VCA-IgG 抗体ペア血清測定による診断率が高いことが判明した。

急性期における早期抗原 early antigen (EA)-IgG 抗体に関しては、1 歳未満が 0%で、年齢と共に陽性率が上昇し、4 歳以上が 63.3%であったが、回復期以降にも陽性例が多く認められ、乳幼児の IM の診断に EA-IgG 抗体測定は有用でないことが判明した。回復期以降に陽性化する EB ウイルス核内抗原 EB virus nuclear antigen (EBNA) に対する抗体は、約 20%の症例が陰性のままであった。また急性期においては、乳児の約 20%、1 歳児の 13%は EB ウイルス関連抗体が全て陰性であり、抗体検査を繰り返し施行する必要があった。

急性期の末梢血単核球中の EB ウイルス DNA は、解析した 35 例の全例で検出された。しかし EBV-DNA 量と年齢、EB ウイルス抗体価の相関は認められな

かった。

以上まとめると、申請者らはIM様症状を呈し、急性期にEBウイルス関連抗体が全て陰性ではあるが、末梢血単核球中にEBウイルスゲノムを認め、後にVCA-IgG抗体が陽性となった乳児例3例を経験した。本研究により、年齢によってEBウイルスに対する抗体反応が著しく異なることが明らかにされた。またIM様症状を呈した乳児の急性期においては、EBウイルス抗体陰性例の頻度が約20%と高いことが示された。

申請者らの論文は、乳幼児におけるIMの診断には末梢血単核球中のEBウイルスゲノム量を評価することが有用であることが示したものである。申請者らは、「急性期におけるEBウイルス抗体陰性例での末梢血EBウイルスゲノム陽性」という項目を従来のIM診断基準に加えることを提唱しており、これによりIM様症状を呈する乳幼児例において診断の感度向上に寄与することが期待される。よって審査員一同は、本論文を高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	干場 浩(鹿児島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第115号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月31日
学位論文題目	Isolation and characterization of a novel <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage Φ MR25 and its therapeutic potential (新規黄色ブドウ球菌バクテリオファージ Φ MR25の分離、性状解析、およびその治療における可能性)
発表誌名	Archives of Virology, (in press)

審査委員	主査	教授	小林	道也
	副査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	執印	太郎

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 干場 浩

Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus*
Bacteriophage ϕ MR25 and its therapeutic potential

論文題目

(新規黄色ブドウ球菌バクテリオファージ ϕ MR25 の分離、
性状解析、およびその治療における可能性)

(論文要旨)

【背景】近年、抗菌薬耐性病原細菌が増大し、治療学的に問題となっている。その典型がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (黄色ブ菌) (MRSA) である。既に抗 MRSA 薬バンコマイシンに対する低感受性株 (VISA) や耐性株 (VRSA) も知られており、更に新薬ザイボックスに対する耐性菌出現も報告されている。これは、黄色ブ菌が、極めて高い薬剤耐性獲得能力を有することを示唆している。このような黄色ブ菌に対する新規抗菌薬開発と、それに続く耐性菌出現という悪循環を断ち切るためには、抗菌薬の適性使用とともに抗菌薬非依存的な細菌感染症制御法の開発が重要であると考えられる。

そのような抗菌薬非依存的な細菌感染症制御法の可能性一つに、バクテリオファージ (ファージ) の溶菌活性を利用する、いわゆるファージ療法があり、我々は種々の細菌感染症に対する本療法の可能性を検討してきた。

【目的】我々は、以前黄色ブ菌を溶菌可能なファージ ϕ MR11 を分離し、黄色ブ菌感染症に対するファージ療法の有効性を動物実験において示した。しかし、 ϕ MR11 が感染可能な黄色ブ菌株 (宿主域) は 40% 程度とどまるため、本報告では、(1) ϕ MR11 とは生物学的に異なり、(2) ϕ MR11 より多くの菌株に感染可能 (広宿主域) で、かつ (3) 黄色ブ菌マウス感染モデルで致死抑制活性を示す新規ファージを探索した。

【方法】ファージ ϕ MR25 は、黄色ブ菌株 MR25 の培養にマイトマイシン C を添加、誘発後、単一プラーク分離法で分離した。形態は 2% ウラニル酢酸で染色後、透過型電子顕微鏡で検討した。ファージ DNA は、*Hind*III 断片をクローニングした pUC18 またはファージ DNA 自体を鋳型としたシーケンシングにより塩基配列を解読し、ORF の特定および相同性解析を行った。Repressor 遺伝子の存否確認、attachment site 特定は PCR により行った。ファージ投与効果は、BALB/c マウス腹腔に致死量の黄色ブ菌 SA37 を接種後、各 MOI (接種菌数に対する投与ファージの相対数) のファージを腹腔投与し、1 週間後の生存率をみることで検討した。

【結果】(1) ϕ MR25 は、直径 57 nm の正 20 面体の頭部、長さ 198 nm の非収縮性尾部からなるファージで、family *Siphoviridae* の morphotype B1 に属するファージであった。ビリオンタンパク質の SDS-PAGE のパターンから、 ϕ MR25 および ϕ MR11 はいずれもブドウ球菌ファージの serogroup B に属すると予想されたが、属する溶菌グループ (lysogroup) は相互に異なると考えられた。

(2) ϕ MR25 の宿主域は約 66% で、 ϕ MR11 (約 40%) よりかなり広がった。また、 ϕ MR11 の溶原株 SA37/ ϕ MR11 をも溶菌可能であった。各種黄色ブ菌株の DNA を鋳型とした repressor 遺伝子領域の PCR により、 ϕ MR25 タイプの repressor を有するファージの溶原株は、 ϕ MR11 タイプの repressor を有するファージの溶原株より低頻度であることが明らかとなり、これが ϕ MR25 の広宿主域の原因の 1 つと考えられた。

(3) ϕ MR25 のゲノム DNA は 44,342 bp で、70 個の open reading frame (ORF) の存在が予想された。 ϕ MR25 と ϕ MR11 の DNA は、DNA 複製・代謝に関連する遺伝子領域や尾部遺伝子領域の後半部、溶菌に関連する遺伝子の領域は、相互に高い相同性を示した。一方、溶原性関連遺伝子領域 (integrase、repressor、attachment site 等)、頭部遺伝子領域、尾部遺伝子領域の前半部は、相互に殆ど相同性が認められなかった。また、 ϕ MR25 の DNA 上には、ファージ療法に不利となる遺伝子 (毒素遺伝子、薬剤耐性遺伝子等) は見いだされなかった。



(4) 主要頭部タンパク質 (MCP) の N 末端アミノ酸配列の解析により、 ϕ MR25 は N 末端 14 個のアミノ酸残基が切断されて成熟すると予想されたが、 ϕ MR11 は最初の 1 残基のみが切断されると予想され、頭部構築の様式が両者で異なることが示唆された。

(5) 致死量の黄色ブ菌をマウス腹腔に接種すると、全頭のマウスが死亡したが、菌投与後、MOI 0.1 以上の ϕ MR25 投与で有意の致死抑制効果が認められた。一方、 ϕ MR25 ファージの単独投与は、マウスの全身状態や生存率に影響を与えなかった。

【考察】以上から、 ϕ MR25 は以前報告した ϕ MR11 とは生物学的性状が異なり、広宿主域でかつ黄色ブ菌感染マウスに対する致死抑制効果を示すことから、より汎用性の高い治療用ファージ候補であると期待される。

一般的に、溶原ファージ (自己ゲノムを菌ゲノムに挿入する能力を有するファージ) よりも溶菌ファージ (溶原化しないファージ) の方が、ファージ療法に適していると考えられている。しかし、 ϕ MR25 および ϕ MR11 は溶原ファージであるにもかかわらず、強力な溶菌活性を有しかつ両者とも感染動物実験において致死抑制活性が認められる。それゆえ、黄色ブ菌のように溶菌ファージの種類が極めて少ない種においては、 ϕ MR25 や ϕ MR11 のように強力な溶菌活性を有する溶原ファージも、治療用ファージ候補に加える可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

	氏名	干場 浩
審査委員	主査氏名	小林道也 
	副査氏名	横谷邦彦 
	副査氏名	執印太郎 印

題目 Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* Bacteriophage Φ MR25 and its therapeutic potential
(新規黄色ブドウ球菌バクテリオファージ Φ MR25 の分離、性状解析、およびその治療における可能性)

著者 Hiroshi Hoshiba, Jumpei Uchiyama, Shin-ichiro Kato, Takako Ujihara, Asako Muraoka, Masanori Daibata, Hiroshi Wakiguchi, and Shigenobu Matsuzaki

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Archives of Virology, (in press)

要 旨

【背景】近年、抗菌薬耐性病原細菌が増加し、治療学的に問題となっている。その典型がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(黄色ブ菌)(MRSA)である。既に抗MRSA薬バンコマイシンに対する低感受性株(VISA)や耐性株(VRSA)も知られており、更に新薬ザイボックスに対する耐性菌出現も報告されている。これは、黄色ブ菌が、極めて高い薬剤耐性獲得能力を有することを示唆している。このような黄色ブ菌に対する新規抗菌薬開発と、それに続く耐性菌出現という悪循環を断ち切るためには、抗菌薬の適性使用とともに抗菌薬非依存的な細菌感染症制御法開発が重要であると考えられる。

そのような抗菌薬非依存的な細菌感染症制御法の一つに、バクテリオファージ(ファージ)の溶菌活性を利用する、いわゆるファージ療法があり、申請者らは種々の細菌感染症に対する本療法の可能性を検討してきた。

【目的】申請者らは、以前、黄色ブ菌を溶菌可能なファージ ϕ MR11を分離し、黄色ブ菌感染症に対するファージ療法の有効性を動物実験において示した。しかし、 ϕ MR11が感染可能な黄色ブ菌株(宿主域)は40%程度にとどまるため、本報告では、(1) ϕ MR11とは生物学的に異なり、(2) ϕ MR11より多くの菌株に感染可能(広宿主域)で、かつ(3)黄色ブ菌マウス感染モデルで致死抑制活性を示す新規ファージを探索した。

【方法】ファージ ϕ MR25は、黄色ブ菌株MR25の培養にマイトマイシンCを添加、誘発後、単一プラーク分離法で分離した。形態は2%ウラニル酢酸で染色後、透過型電子顕微鏡で検討し

た。ファージ DNA は、*Hind*III 断片をクローニングした pUC18 又はファージ DNA 自体を鋳型としたシーケンシングにより塩基配列を解読し、open reading frame (ORF) の特定及び相同性解析を行った。Repressor 遺伝子の存否確認、attachment site 特定は PCR により行なった。ファージ投与効果は、BALB/c マウス腹腔に致死量の黄色ブ菌 SA37 を接種後、各 MOI (接種菌数に対する投与ファージの相対数) のファージを投与し、1 週間後の生存率をみることにより検討した。

【結果】(1) ϕ MR25 は、直径 57 nm の正 20 面体の頭部、長さ 198 nm の非収縮性尾部からなるファージで、family *Siphoviridae* の morphotype B1 に属するファージであった。SDS-PAGE 電気泳動のパターンから、 ϕ MR25 及び ϕ MR11 はいずれもブドウ球菌ファージの serogroup B に属すると予想されたが、溶菌グループ (lysogroup) は相互に異なると考えられた。

(2) ϕ MR25 の宿主域は約 66% で、 ϕ MR11 (約 40%) より広がった。また、 ϕ MR11 の溶原株 SA37/ ϕ MR11 をも溶菌可能であった。各種黄色ブ菌株の DNA を鋳型とした repressor 遺伝子領域の PCR により、 ϕ MR25 タイプの repressor を有するファージの溶原株は、 ϕ MR11 タイプの repressor を有するファージの溶原株より低頻度であることが明らかとなり、これが ϕ MR25 の広宿主域の原因の 1 つと考えられた。

(3) ϕ MR25 のゲノム DNA は 44,342 bp で、70 個の ORF の存在が予想された。 ϕ MR25 と ϕ MR11 の DNA は、DNA 複製・代謝に関連する遺伝子領域や尾部遺伝子領域の後半部、溶菌に関連する遺伝子の領域は、相互に高い相同性を示した。一方、溶原性関連遺伝子領域 (integrase, repressor, attachment site 等)、頭部遺伝子領域、尾部遺伝子領域の前半部は、相互に殆ど相同性が認められなかった。また、 ϕ MR25 の DNA 上には、ファージ療法に不利となる遺伝子 (毒素遺伝子、薬剤耐性遺伝子等) は見いだされなかった。

(4) 主要頭部タンパク質 (MCP) の N 末端アミノ酸配列の解析により、 ϕ MR25 は N 末端 14 個のアミノ酸残基が切断されて成熟すると予想されたが、 ϕ MR11 は最初の 1 残基のみが切断されると予想され、頭部構築の様式が両者で異なることが示唆された。

(5) 致死量の黄色ブ菌をマウス腹腔に接種すると、全頭のマウスが死亡したが、菌投与後、MOI 0.1 以上で有意の致死抑制効果が認められた。一方、 ϕ MR25 ファージの単独投与は、マウスの全身状態や生存率に影響を与えなかった。

【考察】以上から、 ϕ MR25 は以前報告した ϕ MR11 とは生物学的性状が異なり、かつ広宿主域および黄色ブ菌感染マウスに対する致死抑制効果を示すことから、より汎用性の高い治療用ファージ候補であると期待される。

また、一般的に溶原ファージ (自己ゲノムを菌ゲノムに挿入する能力を有するファージ) よりも溶菌ファージ (溶原化しないファージ) の方が、ファージ療法に適していると考えられている。しかし、 ϕ MR25 および ϕ MR11 は溶原ファージであるにもかかわらず、強力な溶菌活性を有し、かつ感染動物実験において致死抑制活性が認められる。それゆえ、黄色ブ菌のように溶菌ファージの種類が極めて少ない菌種においては、 ϕ MR25 や ϕ MR11 のように強力な溶菌活性を有する溶原ファージは、治療用ファージ候補になる可能性があると考えられた。

申請者らは近年、医療現場で問題となっている高い薬剤耐性獲得能力を有する黄色ブ菌感染症に対する抗菌薬非依存的な感染制御法開発の可能性を示した。これらの知見は学術的評価も高く、本論文は高知大学医学部博士 (医学) に値すると評価した。

氏名(本籍)	中村 久美子 (山口県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第116号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月31日
学位論文題目	Presynaptic BK type Ca^{2+} -activated K^+ channels are involved in prostanoid TP receptor-mediated inhibition of noradrenaline release from the rat gastric sympathetic nerves (プロスタノイド TP 受容体を介したラット胃交感神経からのノルアドレナリン遊離抑制には、神経終末に存在する Ca^{2+} 依存性 BK 型 K^+ チャンネルが関与する)
発表誌名	European Journal of Pharmacology, 629(2010): 111-117

審査委員	主査	教授	本家	孝一
	副査	教授	由利	和也
	副査	教授	椛	秀人

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 中村 久美子

論文題目

Presynaptic BK type Ca^{2+} -activated K^+ channels are involved in prostanoid TP receptor-mediated inhibition of noradrenaline release from the rat gastric sympathetic nerves

(プロスタノイド TP 受容体を介したラット胃交感神経からのノルアドレナリン遊離抑制には、神経終末に存在する Ca^{2+} 依存性 BK 型 K^+ チャンネルが関与する)

(論文要旨)

[はじめに]

中枢および末梢神経系において、神経伝達物質の遊離は神経終末に存在する種々の受容体を介して抑制的に調節されている。交感神経終末からのノルアドレナリン (NA) 遊離は節前性のアドレナリン α_2 受容体により自己抑制されるが、ムスカリン M_2 受容体などの異種性の節前性受容体によっても抑制される。申請者も、既に、ラット胃交感神経終末に存在するエンドセリン ET_A 受容体、プロスタノイド TP 受容体と EP_3 受容体等が電気刺激により引き起こされた NA 遊離を抑制することを報告している。しかし、これらの節前性受容体を介する遊離抑制機序の詳細は今なお明らかではない。プロスタノイド TP 受容体の刺激はホスホリパーゼ C (PLC) を活性化し、種々の作用を引き起こすことが報告されている。PLC による細胞膜リン脂質ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP_2) の加水分解はジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール 1,4,5-トリスリン酸 (IP_3) を生成する。DAG はプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し、 IP_3 は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫の 1 つである小胞体の IP_3 受容体を介して Ca^{2+} 流出を引き起こす。そこで今回、プロスタノイド TP 受容体を介する胃 NA 遊離抑制作用を PLC との関連で解析した。

[実験方法]

絶食した Wistar 系雄性ラットをウレタン麻酔した後、摘出血管灌流胃囊標本を作成した。開腹後に、大動脈に入れた切開部を介して腹腔動脈にカニューレを挿入し、95% O_2 と 5% CO_2 の混合ガスで飽和した Krebs-Ringer 液 (pH7.4) を流速 2.5 ml/min で灌流しながら胃を摘出し、37°C に加温したマグヌス管に静置した。門脈からの流出液を 2 分毎に氷上にて採取した。左胃動脈周囲の胃交感神経に、双極電極を用いて 2 回の電気刺激を行った (1.0 Hz, 2.0 msec-duration, 15 mA, for 1 min)。2 回目の電気刺激時にプロスタノイド TP 受容体刺激薬 (U-46619) を投与した。各種遮断薬は実験中持続性に投与した。実験後、速やかに胃をホモジナイズして遠心分離し、上清を組織中 NA 含有量の測定に用いた。流出液中 NA および胃含有 NA は、内部標準法を用いてアルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に定量した。電気刺激による胃 NA 遊離は、2 分毎の流出液中 NA 量を組織含有量に対する比 (% of tissue) で表した。1 回目の電気刺激後 12 分間の NA 遊離増加量を S_1 および 2 回目のそれを S_2 とし、薬物

の効果を S_2/S_1 比で表した。




〔実験結果〕

① U-46619 (TP 受容体刺激薬) (0.1 および 0.3 μM) は、電気刺激による NA 遊離を同程度に抑制した。② U-46619 (0.1 μM) による NA 遊離抑制は、PLC 阻害薬 U-73122 (3 μM) およびホスファチジルイノシトール特異的 PLC 阻害薬 ET-18-OCH₃ (3 μM) により消失した。③ PKC 阻害薬 Ro 31-8220 (1 および 3 μM) は、U-46619 の NA 遊離抑制作用には影響を与えなかった。④ IP₃ 受容体拮抗薬 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (75 μM) は、U-46619 の NA 遊離抑制作用を消失させた。⑤ 大コンダクタンスの Ca²⁺ 依存性 BK チャネル遮断薬である tetraethylammonium (1.0 mM) と charybdotoxin (0.03 μM) は U-46619 の NA 遊離抑制作用を消失および減弱させたが、小コンダクタンスの Ca²⁺ 依存性 SK チャネル遮断薬 apamin (0.3 μM) は影響を与えなかった。

〔結語〕

ラット胃交感神経終末に存在するプロスタノイド TP 受容体の刺激は、PLC の活性化による IP₃ 産生を引き起こし、さらに、IP₃ による小胞体からの Ca²⁺ 遊離が Ca²⁺ 依存性の BK チャネルを活性化して神経終末の細胞内電位を低下させる。このことにより、電気刺激により引き起こされた NA 遊離の抑制が引き起こされることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	中 村 久 美 子
審 査 委 員	主 査 氏 名	本 家 孝 一 
	副 査 氏 名	由 利 和 也 
	副 査 氏 名	梶 秀 人 

題 目 Presynaptic BK type Ca^{2+} -activated K^+ channels are involved in prostanoid TP receptor-mediated inhibition of noradrenaline release from the rat gastric sympathetic nerves
 (プロスタノイド TP 受容体を介したラット胃交感神経からのノルアドレナリン遊離抑制には、神経終末に存在する Ca^{2+} 依存性 BK 型 K^+ チャンネルが関与する)

著 者 Kumiko Nakamura, Kunihiko Yokotani

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 European Journal of Pharmacology, 629 (2010): 111-117

要 旨

【背景・目的】

神経伝達物質の遊離は、神経終末に存在する種々の受容体を介して抑制的に調節されている。交感神経終末からのノルアドレナリン遊離は節前性のアドレナリン α_2 受容体により自己抑制されるが、ムスカリン M_2 受容体などの異種性の節前性受容体によっても抑制される。申請者らは、これまで、ラット胃交感神経終末に存在するプロスタノイド TP 受容体と EP_3 受容体を介して電気刺激によるノルアドレナリン遊離が抑制されることを見出しているが、この遊離抑制機序は不明であった。本論文は、他の組織において TP 受容体の刺激によってホスホリパーゼ C (PLC) が活性化される事実に注目し、TP 受容体を介する胃ノルアドレナリン遊離抑制作用への PLC およびその下流経路の関与を薬理的に検討した。

【方法】

絶食した Wistar 系雄性ラットをウレタン麻醉した後、摘出血管灌流胃囊標本を作成した。開腹後に、大動脈に入れた切開部を介して腹腔動脈にカニューレを挿入し、95% O_2 と 5% CO_2 の混合ガスで飽和

した Krebs-Ringer 液 (pH7.4) を流速 2.5 ml/min で灌流しながら胃を摘出し、37°C に加温したマグヌス管に静置した。門脈からの流出液を 2 分毎に氷上にて採取した。左胃動脈周囲の胃交感神経に、双極電極を用いて 2 回の電気刺激を行った (1.0 Hz、2.0 msec duration、15 mA, for 1 min)。2 回目の電気刺激時にプロスタノイド TP 受容体刺激薬 (U-46619) を投与した。各種遮断薬は実験中持続性に投与した。実験後、速やかに胃をホモジナイズして遠心分離し、上清を組織中ノルアドレナリン含有量の測定に用いた。流出液中ノルアドレナリンおよび組織中ノルアドレナリンは、内部標準法を用いてアルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に定量した。電気刺激による胃ノルアドレナリン遊離は、2 分毎の流出液中ノルアドレナリン量の組織中ノルアドレナリン量に対する比 (% of tissue) で表した。1 回目の電気刺激後 12 分間のノルアドレナリン遊離増加量を S_1 、2 回目のそれを S_2 とし、薬物の効果を S_2/S_1 比で表した。

【結果・考察】

まず、TP 受容体刺激薬の U-46619 は、電気刺激によるノルアドレナリン遊離を抑制した。この U-46619 によるノルアドレナリン遊離抑制は、PLC 阻害薬 U-73122 およびホスファチジルイノシトール特異的 PLC 阻害薬 ET-18-OCH₃ によりキャンセルされた。この結果から、ホスファチジルイノシトール特異的 PLC が関与することが示唆された。

次に、PLC の作用で生じるジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸 (IP₃) の関与を調べた。ジアシルグリセロールによってプロテインキナーゼ C が活性化されるが、プロテインキナーゼ C 阻害薬 Ro 31-8220 は U-46619 のノルアドレナリン遊離抑制作用には影響を与えなかった。一方、IP₃ 受容体拮抗薬 2-アミノメトキシジフェニルホウ酸 は、U-46619 のノルアドレナリン遊離抑制作用を消失させた。この結果から、PLC の作用で生じた IP₃ が関与することが示唆された。

IP₃ は小胞体から Ca²⁺ イオンを細胞質に動員し、Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルは神経の興奮性を抑制する働きがあるので、次に、Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルの関与を調べた。Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルは、BK チャネルと SK チャネルに大別される。BK チャネル遮断薬であるテトラエチルアンモニウムとカリブドキシシン は、U-46619 によるノルアドレナリン遊離抑制作用を消失あるいは減弱させたが、SK チャネル遮断薬のアパミンは効果がみられなかった。この結果から、BK チャネルが関与することが示唆された。

以上の結果を総合すると、ラット胃交感神経終末に存在する TP 受容体の刺激は、PLC の活性化による IP₃ 産生を引き起こし、さらに、IP₃ による小胞体からの Ca²⁺ 動員が Ca²⁺ 依存性の BK チャネルを開放して神経終末の細胞膜電位を過分極させる。このことにより、電気刺激によるノルアドレナリンの遊離が抑制されることが示唆された。

本論文は、ラット胃交感神経終末におけるプロスタノイド TP 受容体の刺激がノルアドレナリン遊離を抑制する作用は、Ca²⁺ 依存性 BK 型 K⁺ チャネルを介することを明らかにした。よって、本論文は、本学の学位に値すると判断した。

氏名(国籍)	Wickramage Don Susiji Jayanath Wickramasinghe (スリランカ)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第117号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年3月31日
学位論文題目	Molecular biological studies on phosphagen kinase gene in <i>Toxocara canis</i> , one of the causative agents of zoonosis (人獣共通感染症の原因病原虫である犬回虫のフォスファージェンキナーゼに関する分子生物学的研究) [1] <i>Toxocara canis</i> : Molecular cloning, Characterization, expression, and comparison of the kinetics of cDNA-derived arginine kinase (犬回虫: アルギニンキナーゼ遺伝子のcDNAクローニング並びに組替えタンパク質の発現とその酵素機能) [2] Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of <i>Toxocara canis</i> for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model (アルギニンキナーゼ組替えタンパク質を利用した犬回虫内臓幼虫移行症の高感度ELISA法の開発)
発表誌名	[1] <i>Experimental Parasitology</i> , 117: 124-132, 2007年3月 [2] <i>Parasitology Research</i> , 103: 853-858, 2008年9月

審査委員	主査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	杉浦	哲朗

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 スシジ・ウイックラマシンハ

論 文 題 目

Molecular biological studies on phosphagen kinase gene in *Toxocara canis*,
one of the causative agents of zoonosis

(人獣共通感染症の原因病原虫である犬回虫のフォスファージェンキナーゼに関する分子生物学的研究)

アルギニンキナーゼ (AK) は、フォスファージェンキナーゼの遺伝子ファミリーの 1 メンバーである。フォスファージェンキナーゼ Phosphagen Kinase (PK) は Mg^{2+} の存在下で、ATP の高エネルギーリン酸基をグアニジノ化合物のグアニジノ基に転移する反応を可逆的に触媒する酵素であり、生体内の ATP エネルギー代謝において重要な役割を果たしている。




一方、イヌ回虫症は、人畜共通感染症の一つであり、ヒトにイヌ回虫の幼虫が寄生すると内臓幼虫移行症および眼幼虫移行症を惹起する。

我々は、犬回虫のフォスファージェンキナーゼである AK の cDNA の塩基配列を決定し、Expression vector pMAL プラスミッドにクローニングし、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌体内で発現させた。このタンパク質は分子量 45,376Da であり、等電点は 8.38 であった。犬回虫 AK のアミノ酸配列を他種の AK とアラインメントを行ったところ、線虫類の AK と高い相同性を示し、系統樹解析によっても線虫類の AK のクラスターに入ることが確認された。また、N 末端の塩基配列をコンピュータ解析したところ、細胞質あるいは、ER への輸送のシグナル配列を有することが示唆された。さらに本酵素の基質特異性を調べたところ、犬回虫 AK は L-アルギニンに対する高い活性を示した。測定したパラメータは、それぞれ $K_m = 0.12 \text{ mM}$ 、 $k_{cat} = 29.18$ 、 $K_d = 0.23 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 43.76 \text{ } \mu\text{mol Pi/min/mg protein}$ であった。また、基質アルギニンと ATP の結合様式に相乗効果も見られた ($K_d^{Arg}/K_m^{Arg} = 1.96$)。さらに本酵素は、他種と比較して、高い触媒効率をもつことが分かった ($k_{cat}/K_m^{Arg} = 248.19 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)。

人畜共通感染症の病原体である犬回虫のアルギニンキナーゼは、本研により、はじめて研究されたが、ヒトなどの哺乳類は、クレアチンキナーゼであることから、本酵素の高い基質特異性を利用した、新規の薬剤開発が期待される。

また、本研究では、本酵素を抗原とした ELISA 法により、内蔵型幼虫移行症 (VLM) の診断に利用できる可能性もマウスモデルにより示された。その結果を要約すると、6 週齢のウサギから得られた AK タンパク抗血清を用いて、犬回虫幼虫感染マウス (BALB/c と C57BL/6 系統) 血清と反応させ、コントロールと比較した結果、有意な ELISA の OD 値が得られたことが明らかとなった。これらの結果は、本症診断に利用できることを示した。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Susiji Wickramasinghe
審 査 委 員	主 査 氏 名	菅 沼 成 文 
	副 査 氏 名	栂 秀 人 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 Molecular biological studies on phosphagen kinase gene in *Toxocara canis*, one of the causative agents of zoonosis
 (人獣共通感染症の原因病原虫である犬回虫のフォスファージェンキナーゼに関する分子生物学的研究)

- [1] *Toxocara canis*: Molecular cloning, Characterization, expression, and comparison of the kinetics of cDNA-derived arginine kinase
 (犬回虫：アルギニンキナーゼ遺伝子の cDNA クローニング並びに組替えタンパク質の発現とその酵素機能)
- [2] Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model
 (アルギニンキナーゼ組替えタンパク質を利用した犬回虫内臓幼虫移行症の高感度 ELISA 法の開発)

著 者 [1] Susiji Wickramasinghe, Kouji Uda, Mitsuru Nagataki, Lalani Yatawara, R.P.V.J. Rajapakse, Yoshiya Watanabe, Tomohiko Suzuki, Takeshi Agatsuma
 [2] Susiji Wickramasinghe, Lalani Yatawara, Mitsuru Nagataki, Misa Takamoto, Yoshiya Watanabe, R.P.V.J. Rajapakse, Kouji Uda, Tomohiko Suzuki, Takeshi Agatsuma

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、年 月
 [1] Experimental Parasitology, 117: 124-132, 2007年3月
 [2] Parasitology Research, 103: 853-858, 2008年9月

要 旨

アルギニンキナーゼ (AK) は、フォスファージェンキナーゼの遺伝子ファミリーの 1 メンバーである。フォスファージェンキナーゼ Phosphagen Kinase (PK) は Mg^{2+} の存在下で、ATP の高エネルギーリン酸基をグアニジノ化合物のグアニジノ基に転移する反応を可逆的に触媒する酵素であり、生体内の ATP エネルギー代謝において重要な役割を果たしている。

一方、イヌ回虫症は、人畜共通感染症の一つであり、内臓幼虫移行症を呈する。すなわち、経口感染した幼虫が臓器に侵入し、組織や細胞の破壊がみられる。臨床症状としては、白血球増加、好酸球増多、喘息様咳、肝腫などがみられ、特に視力障害や失明などの眼症状の顕著な、眼幼虫移行症を惹起する。

本研究では、犬回虫のフォスファージェンキナーゼである AK の cDNA の塩基配列を決定し、Expression vector pMAL プラスミッドにクローニングし、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌体内で発現させた。このタンパク質は分子量 45,376Da であり、等電点は 8.38 であった。犬回虫 AK のアミノ酸配列を他種の AK とアラインメントを行ったところ、線虫類の AK と高い相同性を示し、系統樹解析によっても線虫類の AK のクラスターに入ることが確認された。また、N 末端の塩基配列をコンピュータ解析したところ、細胞質あるいは、ER への輸送のシグナル配列を有することが示唆された。さらに本酵素の基質特異性を調べたところ、犬回虫 AK は L-アルギニンに対する高い活性を示した。測定したパラメータは、それぞれ $K_m = 0.12 \text{ mM}$ 、 $K_{cat} = 29.18$ 、 $K_d = 0.23 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 43.76 \mu\text{mol Pi/min/mg protein}$ であった。また、基質アルギニンと ATP の結合様式に相乗効果も見られた ($K_d^{Arg}/K_m^{Arg}=1.96$)。さらに本酵素は、他種と比較して、高い触媒効率をもつことが分かった ($k_{cat} / K_m^{Arg}=248.19 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)。

一方、*Toxocara canis* AK の cDNA をクローニングして 1203bp の ORF を持つ本遺伝子を単離した。これは線虫類のイントロン部位と高い相同性が見られた。

また、人畜共通感染症の病原体である犬回虫のアルギニンキナーゼは、本研により、はじめて研究されたが、ヒトなどの哺乳類は、クレアチンキナーゼであることから、本酵素の高い基質特異性を利用した、新規の薬剤開発が期待される。本研究では、ピランテルパモエート、アルベンダゾールなど、これまでの寄生虫駆虫剤を用いて、阻害実験をしたところ、阻害効果は認められなかったが、インドやスリランカなどに生息する植物 *Azadirachta indica* の果実部、緑茶、紅茶が、それぞれ 5%、15%、25% の阻害効果を示すことが明らかとなった。しかし、これらの詳細なメカニズムは、まだ不明であり、今後の課題である。

本研究では、さらにいくつかのアミノ酸変異導入による酵素活性の影響を調べたが、今のところ、活性に影響のある変異は見いだされていない。今後さらに多くの変異導入を行い、その活性をワイルドタイプと比較して、酵素活性に重要な位置のアミノ酸を特定していく予定である。

さらに、本研究では、本酵素を抗原とした ELISA 法により、内臓型幼虫移行症 (VLM) の診断に利用できる可能性もマウスモデルにより示された。その結果を要約すると、6 週齢のウサギから得られた AK タンパク抗血清を用いて、犬回虫幼虫感染マウス (BALB/c と C57BL/6 系統) 血清と反応させ、コントロールと比較した結果、統計的に有意に異なる ELISA の OD 値が得られたことが明らかとなった。これらの結果は、本症診断への応用可能性が示唆された。