

氏名	塚本 学
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
<p>Elcatonin prevents bone loss caused by skeletal unloading by inhibiting preosteoclast fusion through the unloading-induced high expression of calcitonin receptors in bone marrow cells. (非荷重環境では骨髄細胞中のカルシトニン受容体発現が亢進することによりエルカトニンは前破骨細胞の細胞癒合を抑制して骨量減少を防止する)</p>	
論文要旨	
【目的】	
<p>カルシトニンは、破骨細胞のカルシトニン受容体 (Calcr) を介して、骨吸収抑制作用を示すことが報告されているが、非荷重環境での効果は明らかではない。非荷重モデルマウスを用いて、カルシトニン製剤であるエルカトニン (EL; elcatonin) が非荷重環境の骨代謝動態に与える影響を明らかにすることが本研究の目的である。</p>	
【方法】	
<p>マウスの尾部を懸垂することで後肢を非荷重状態とした。7週齢 C57BL/6J 雄マウスの尾部懸垂を7日間行い、尾部懸垂 (TS; tail suspension) 群と非尾部懸垂 (GC; ground control) 群にそれぞれ EL 20 U/kg または Vehicle (veh) を day 0、3、6 に皮下投与した。GCveh 群、GCEL 群、TSveh 群、TSEL 群の4群で以下の評価項目を検討した。屠殺後の採血で骨吸収マーカーである血漿 TRACP-5b、pQCT 法により大腿骨遠位部の海綿骨骨密度 (BMD) を測定した。Villanueva 染色標本で脛骨近位部の二次海綿骨領域の骨量 (BV/TV)、TRACP 染色標本で TRACP 陽性多核細胞である成熟破骨細胞 (Oc. S/BS、Oc. N/BS) と TRACP 陽性単核細胞である前破骨細胞数 (POCs. N/BS) を評価した。また、後肢 (大腿骨と脛骨) から骨髄細胞を採取し、初代骨髄細胞培養を行った。7日間の培養後、TRACP 陽性単核細胞と TRACP 陽性多核細胞の細胞数をカウントした。その他、マウス後肢骨髄細胞中の遺伝子発現解析及びフローサイトメトリーによる Calcr 発現量の解析を行った。</p>	
【結果】	
<p>TSEL 群の大腿骨遠位部海綿骨 BMD や脛骨近位部 BV/TV は、TSveh 群に対し有意に高値であり、GCEL 群や GCveh 群と同等の値であった。TSveh 群に対し TSEL 群では、破骨細胞面 (Oc. S/BS) や破骨細胞数 (Oc. N/BS)、血漿 TRACP-5b が有意に低値を示していた。一方で、TSEL 群の POCs. N/BS は他の群と比べ有意に高値であった。初代骨髄細胞培養においても同様に、TSveh 群に対し TSEL 群では、TRACP 陽性多核細胞数の有意な減少と TRACP 陽性単核細胞の有意な増加を示した。TSveh 群の day 1 に後肢骨髄細胞中の Calcr mRNA 発現が GCveh 群に対し有意に上昇し、day 4 には Calcr 蛋白発現も有意に増加していた。そして、TSEL 群の day 4 では後肢骨髄細胞中の NFATc1、Cathepsin K、ATP6V0D2 mRNA 発現の有意な低下を認めた。</p>	
【考察】	
<p>エルカトニンは非尾部懸垂マウスよりも尾部懸垂マウスにおいて強力な骨吸収抑制効果を示した。尾部懸垂時のマウス後肢骨髄細胞中におけるカルシトニン受容体発現の亢進がその理由と思われた。TSEL 群では、成熟破骨細胞数が有意に減少している一方で、前破骨細胞数が著明に増加しており、前破骨細胞の細胞癒合に関わる重要因子である ATP6V0D2 mRNA の発現が抑制させていた。以上のことから、非荷重環境においてエルカトニンを投与すると前破骨細胞の細胞融合を抑制することによって骨吸収活性を有する多核の成熟破骨細胞への分化過程を抑制する、というメカニズムが示唆された。</p>	
【結論】	
<p>尾部懸垂マウスでは、後肢骨髄細胞中のカルシトニン受容体の発現が亢進することにより、エルカトニンが前破骨細胞の細胞癒合を抑制し非荷重に伴う骨量減少を防止する。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	塚 本 学				
論文審査委員	主査 所属	生体適応 系	生体機構 部門	東 華 岳	
	副査 所属	生体適応 系	生体構造 部門	中山 敏幸	
		生体情報 系	生殖生理情報部門	蜂須賀 徹	
		系	部門		
		系	部門		

論 文 題 目

Elcatonin prevents bone loss caused by skeletal unloading by inhibiting preosteoclast fusion through the unloading-induced high expression of calcitonin receptors in bone marrow cells
 (非加重環境では骨髄細胞中のカルシトニン受容体発現が亢進することによりエルカトニンが前破骨細胞の細胞融合を抑制して骨量減少を防止する)

学位論文審査結果要旨

カルシトニンは甲状腺C細胞から分泌され、破骨細胞と前破骨細胞に存在するカルシトニン受容体(Calcr)に作用して骨吸収を抑制する。しかし、非荷重環境下での骨代謝に対するカルシトニンの作用は不明である。申請者らは、カルシトニン製剤であるエルカトニン (EL ; elcatonin) を用いて、尾部懸垂による非荷重モデルマウスにおける骨代謝動態に与える影響を検討した。

実験では、7週齢のC57BL/6J系雄性マウスを尾部懸垂(TS; tail suspension)群と非尾部懸垂(GC; ground control)群に分けた。両群はそれぞれEL群とVehicle (vel)群に分け実験を行った。TS群では7日間のTSを行った。EL群では20U/kgのELを3回皮下注射した。実験終了後に、骨吸収マーカーである血漿TRACP-5bをELISA法により測定し、大腿骨遠位部海綿骨の骨密度(BMD)をpQCT法により測定した。脛骨近位部のVillanueva染色標本で二次海綿骨の骨量(BV/TV)、TRACP陽性多核細胞である成熟破骨細胞数(Oc.N/BS)と破骨細胞面(Oc.S/BS)、およびTRACP陽性単核細胞である前破骨細胞数(POCs.N/BS)の定量評価を行った。また大腿骨と脛骨の骨髄細胞の初代培養を行い、TRACP陽性単核細胞とTRACP陽性多核細胞の細胞数を計測した。さらに骨髄細胞中の遺伝子発現の解析とフローサイトメトリーによるCalcr陽性細胞の定量解析を行い、細胞融合に関わる重要因子であるATP6V0D2の発現を検討した。

その結果、TSvel群に比べTSEL群では大腿骨遠位部海綿骨のBMDと脛骨近位部海綿骨のBV/TVは有意に高値を示し、血漿TRACP-5b、Oc.N/BS、Oc.S/BSは有意に低値を示した。GCEL群とGCveh群との間に有意差はみられなかった。TSEL群のPOCs.N/BSは他の群に比し有意に高値であった。TSEL群の初代骨髄細胞培養において、TRACP陽性多核細胞数の有意な減少とTRACP陽性単核細胞数の有意な増加を示した。1日目の骨髄細胞中のCalcr mRNA発現が有意に上昇し、4日目のCalcr陽性細胞も有意に増加した。また、TSEL群の骨髄細胞中のATP6V0D2 mRNA発現が有意に低下した。

以上より、尾部懸垂マウスにおいてELはCalcrを介し骨吸収抑制効果を示した。また、TSEL群の前破骨細胞数が増加し、成熟破骨細胞数が減少し、ATP6V0D2の発現が低下していることから、ELは尾部懸垂マウスの前破骨細胞の細胞融合を抑え、成熟破骨細胞への分化過程を抑制することが示唆された。

申請者が非荷重モデルである尾部懸垂マウスに対するカルシトニン製剤ELの骨吸収抑制効果を明らかにした。ELはCalcrの発現が亢進することにより、前破骨細胞の細胞融合を抑制し、非荷重に伴う骨量減少を防止することを解明した。本研究で得られた結果はヒトの長期ベッドレストにおいて発症する骨粗鬆症の治療に有用である可能性を示唆するものであり、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成28年 9月20日

氏 名	Thuy Thi Nguyen
<p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと) Significance of p53 expression in background endometrium in endometrial carcinoma (子宮内膜癌背景内膜における p53 蛋白質発現の意義)</p> <p>論文要旨</p> <p>【目的】 子宮内膜癌は、エストロゲン依存性子宮内膜癌 (Type I) とエストロゲン非依存性子宮内膜癌 (Type II) がある。前者は閉経前発生が多く予後良好であり、子宮内膜増殖症を前癌病変として RAS, PTEN が関与する。後者は高齢者に多く発生し予後不良の癌であり、de novo 発癌でそのほとんどに TP53 変異があることが知られている。近年 Type II の代表的組織型である子宮内膜漿液性腺癌(USC)の検討から細胞異型を伴わない p53 蛋白質強発現の子宮内膜線を p53signature (p53S)として USC 発癌の潜在的前癌病変とする仮説が報告されている。今回子宮内膜癌背景内膜の p53S の意義について検討した。</p> <p>【方法】 産業医科大学産婦人科で手術された子宮内膜癌 351 例(1990 年から 2011 年)のうち、子宮摘出標本にて背景内膜が十分確認できた 225 例を対象として p53、Ki-67、エストロゲン受容体(ER)を免疫組織学的に検討した。p53S が確認できた症例では PTEN、β-catenin、IMP2、p16 の発現を検討した。またリンチ症候群であった 2 例については、hMSH2、hMLH1 を検討した。p53S を背景に有する 5 例の子宮内膜癌について、laser capture microdissection (LCM)にて癌、前癌病変、p53S それぞれについて検体を採取し、TP53 エクソン 5 から 9 までの遺伝子解析を行い変異について検討した。</p> <p>【成績】 p53S を認めた症例は 22 例で平均年齢は 64.2 歳であった。Ki-67 指数は中央値 4.0%であり、すべての p53S で ER 陽性であった。背景内膜に増殖症を伴う 34 例と増殖症を伴わない 191 例に分けると、それぞれ平均年齢は 47 歳と 61 歳であった。前者では p53S は類内膜腺癌 (grade 1)の 2 例に認めた。この 2 例は家族歴にリンチ症候群があり、p53S は 1 例で hMSH2 陰性、hMLH1 陽性であり、他の 1 例は hMSH2、hMLH1 とともに陽性であった。後者では p53S と endometrial intraepithelial carcinoma (EIC)は、それぞれ類内膜腺癌(152 例)の 12 例(7.9%)と 0 例、USC (21 例)の 5 例(23.8%)と 9 例(42.9%)、明細胞癌(3 例)の 0 例と 2 例(66.7%)、癌肉腫(15 例)の 3 例(20.0%)と 9 例(60%)に認めた。EIC と p53S の合併は非類内膜癌のみで認め合併率は 87.5%であった。P53 遺伝子変異の検討では、2 例で PCR による遺伝子増幅が可能であり、類内膜腺癌に関連した p53S は wild type であり、USC に関連した p53S ではエクソン 5 のコドン 183 にミスセンス変異を、EIC にはエクソン 5 の nucleotide 559 に変異を認めた。PTEN、β-catenin、IMP2、p16 染色では、一定の傾向を p53S に認めることはできなかった。</p> <p>【考察】 USC の組織発生は p53S を潜在的前癌病変として EIC をへて USC になるとする発がん過程が提案されているが、p53S は増殖症を背景とした 2 例の類内膜線癌にも認められた。この 2 例は、リンチ症候群と関連しており p53S がリンチ症候群のサインとなる可能性が指摘された。増殖症を伴わない子宮内膜癌においても p53S は、類内膜癌、非類内膜癌にかかわらずその背景内膜に認めた。しかし USC を初めとする非類内膜癌でその頻度が高く EIC と p53S の同時存在は非類内膜癌のみで認めた。P53S の TP53 遺伝子変異検索では、類内膜癌の p53S は wild type であり、USC の p53S には TP53 遺伝子変異を認めた。p53S には、遺伝子変異があるものと、ないものがあることが示唆された。</p> <p>【結論】 p53S は、類内膜癌、非類内膜癌にかかわらずその背景内膜に認めた。しかし、EIC と p53S の合併は非類内膜腺癌のみで認め、p53S は非類内膜癌の一部において前癌病変である可能性が指摘できた。一部の論文では、子宮内膜生検標本で p53S を認めたら積極的に子宮摘出手術を推奨しているが、さらなる検証が必要と考えられる。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	Thuy Thi Nguyen			
論文審査委員	主査 所属	障害機構系	災害医学部門	藤本 直浩
	副査 所属	障害機構系	病態機構部門	久岡 正典
		障害機構系	災害外科部門	平田 敬治
		系	部門	
		系	部門	

論文題目

Significance of p53 expression in background endometrium in endometrial carcinoma
 (子宮内膜癌背景内膜における p53 蛋白質発現の意義)

学位論文審査結果要旨

【背景】子宮内膜癌 Type II は高齢者に多く予後不良であり、その発癌過程は明らかではない。子宮内膜癌 Type II では、その多くに p53 蛋白質の高発現や TP53 の変異があるとされ、最近子宮内膜癌 Type II の代表的組織型である子宮内膜漿液性腺癌(USC)の検討から細胞異型を伴わない p53 蛋白質高発現の子宮内膜腺管を p53 signature (p53S)として USC 発癌の潜在的な前癌病変とする仮説が報告されている。

【目的】子宮内膜癌発癌における背景内膜の p53S の意義につき検討した。

【方法】1990 年から 2011 年の間に切除術を施行された子宮内膜癌症例において、背景子宮内膜における p53、Ki-67、エストロゲン受容体 α (ERα) の発現を免疫組織化学的に検討した。p53S が確認できた症例では PTEN、β-catenin, IMP2, p16、リンチ症候群については、hMSH2, hMLH1 の発現を検討した。p53S を背景に有する 5 例の子宮内膜癌について、laser capture microdissection にて分離採取された癌、前癌病変、p53S のそれぞれについて TP53 の遺伝子変異の有無を解析した。

【結果】対象は手術を施行された子宮内膜癌 351 例のうち、摘出標本にて十分な背景子宮内膜の検討が可能であった 225 例である。p53S を認めた症例は 22 例、Ki-67 指数は中央値 4.0%、p53S を認めた全症例で ERα は陽性であった。背景内膜に増殖症を伴う 34 例と増殖症を伴わない 191 例に分けると、前者では p53S は類内膜腺癌の 2 例に認めた。この 2 例は共にリンチ症候群であり、1 例で hMSH2 陰性、hMLH1 陽性、他の 1 例は hMSH2、hMLH1 ともに陽性であった。増殖症を伴わない症例では p53S と endometrial intraepithelial carcinoma (EIC) は、それぞれ類内膜腺癌 152 例中 12 例 (7.9%)と 0 例、USC 21 例中 5 例 (23.8%)と 9 例 (42.9%)、明細胞癌 3 例中 0 例と 2 例 (66.7%)、癌肉腫 15 例中ではそれぞれ 3 例 (20.0%)と 9 例 (60%)に認めた。EIC と p53S の合併は非類内膜癌のみで認められ、合併率は 87.5%であった。TP53 遺伝子変異の検討では、2 例で PCR による遺伝子増幅が可能であり、類内膜腺癌に関連した p53S は wild type であり、USC に関連した p53S、EIC ではそれぞれエクソン 5 に変異を認めた。PTEN、β-catenin, IMP2, p16 の発現と p53S との有意な相関は認められなかった。

【結語】p53S は、類内膜癌、非類内膜癌にかかわらずその背景内膜に認められたが、p53S と EIC の合併は非類内膜腺癌周囲の背景内膜でのみ認められ、p53S がみられる子宮内膜は非類内膜癌の前癌病変である可能性が考えられた。

【審査結果】本研究では、子宮内膜癌背景内膜において p53S を認め、特に USC を初めとする非類内膜癌でその頻度が高く EIC と p53S の共存は非類内膜癌のみで認めた。これは非類内膜癌の発癌と p53S、EIC との関連性を示唆しており、非類内膜癌の発癌過程の解明につながる重要な知見であると考えられた。よって本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 28 年 9 月 3 日




氏 名	小泉弘樹
<p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)</p> <p>Increased permeability of the epithelium of middle ear cholesteatoma (真珠腫性中耳炎の上皮は透過性が亢進している)</p>	
<p>論文要旨</p> <p>【目的】中耳真珠腫は組織学的に内部にケラチン落屑物が貯留した半閉鎖腔を形成する表皮嚢胞で、隣接する骨組織を破壊しながら増大していく。20 世紀の中盤までは、真珠腫の骨吸収機序は圧迫吸収説が主な仮説であった。1970 年代に入ると真珠腫組織中に様々なサイトカインや炎症関連物質や酵素が同定され、これらが骨吸収を起こすのではないかとの報告がされている。最近我々は酸による化学的骨吸収説について研究を進めている。本研究はこの仮説を補足するために、真珠腫上皮の電気的透過性とタイト結合タンパクの発現について検討した。</p> <p>【方法】当科にて鼓室形成術を受けた真珠腫性中耳炎と慢性中耳炎の新鮮例を対象とし、組織コンダクタンスメータ (AS-TC100; ASAHI BIOMED) を用いて手術中に耳後部皮膚、外耳道皮膚、真珠腫上皮および乳突洞粘膜のインピーダンス測定を行った。測定に用いた条件は 12.5 mV 定電圧下に、交流 320 Hz と 30.7 kHz の 2 つの周波数を用いた。</p> <p>また、手術中に採取した真珠腫組織と耳後部皮膚を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、OCT コンパウンドで包埋、7・m に薄切し 1 次抗体として rabbit anti-human tricellulin antibody、mouse anti-human claudin-1 antibody、mouse anti-human claudin-3 antibody を用い 2 次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG(for tricellulin)、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG(for claudin-1 and 3)を使用した。Prolong gold antifade reagent containing DAPI を用いて封入し Carl Zeiss Axioskop 2 plus fluorescence microscope を用いて観察した。</p> <p>さらに手術中に採取した真珠腫組織と耳後部皮膚から、AGCP 法にて RNA を抽出した。Total RNA を逆転写して cDNA を作成し、StepOnePlus real-time polymerase reaction system (Applied Biosystem 社) を用いて定量的 RT-PCR を行った。耳後部皮膚、真珠腫組織から抽出精製した cDNA を用いてハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用い、MARVELD2、CLDN1、CLDN3 を target mRNA とした。mRNA の量は ΔCT 法を用いて計算した。</p> <p>【結果】320 Hz での各々の組織のインピーダンスは耳後部皮膚 1440.7\pm311.3 kΩ、外耳道皮膚 123.2\pm31.6 kΩ、真珠腫上皮 40.4\pm12.6 kΩ、乳突洞粘膜 65.1\pm27.4 kΩ であった。真珠腫上皮は耳後部皮膚、外耳道皮膚と比べ有意にインピーダンスの低下が認められた ($P<0.0001$)。30.7 kHz での各々の組織のインピーダンスは耳後部皮膚 733.2\pm138.5 kΩ、外耳道皮膚 241.9\pm26.9 kΩ、真珠腫上皮 18.4\pm3.5 kΩ、乳突洞粘膜 218.4\pm98.2 kΩ であった。真珠腫上皮は耳後部皮膚、外耳道皮膚、乳突洞粘膜と比べ有意にインピーダンスの低下が認められた ($P<0.0001$)。</p> <p>耳後部皮膚、真珠腫組織とも tricellulin、claudin-1、claudin-3 は顆粒層を中心に発現しており、角質層と有棘層にはこれよりも弱い発現が認められた。蛍光強度は、tricellulin では中等度、claudin-1 では弱く、claudin-3 では強かった。</p> <p>定量的 RT-PCR 法では tricellulin、claudin-1、claudin-3 のいずれも、耳後部皮膚に比べて真珠腫組織において有意に低下していた。 ($P=0.0117$、$P=0.0087$、$P=0.0087$)</p> <p>【考察】酸による化学的骨吸収は 1950 年台より報告があるが、単なる推察の域を出なかった。その後 1980 年代に入ってケラチン debris 内には多量の脂肪酸や乳酸などの有機酸が含まれていることや、ケラチン debris の酸性度が骨吸収に関与しているとの報告が散見されるようになった。最近のわれわれの研究でも真珠腫組織の pH は真珠腫上皮近傍の微小環境を含めて酸性であり、慢性中耳炎粘膜に比べて酸性度が高いことが明らかとなった。一般に表皮の最表層である角質層は、正常な状態で弱酸性の環境に保たれているが、強固な表皮組織のバリアによって表皮下には影響が及ばないと考えられている。今回の研究結果から、真珠腫上皮の透過性は亢進していることが明らかになった。このことにより表層の酸性度が基底側に浸透し、隣接する骨組織を脱灰・吸収するという可能性が示唆される。</p> <p>【結論】真珠腫上皮の透過性は亢進しておりバリア機能が低下していた。タイト結合タンパクの発現低下が原因の 1 つと考えられた。この結果は真珠腫における酸による化学的骨吸収説を支持するものである。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	小泉 弘樹					
論文審査委員	主査 所属	生体適応 系	機能調節 部門	上田 陽一		(印)
	副査 所属	生体適応 系	生体構造 部門	森本 景之		(印)
	副査 所属	障害機構 系	災害外科 部門	酒井 昭典		(印)
		系				(印)
		系				(印)
<p>論文題目</p> <p>Increased permeability of the epithelium of middle ear cholesteatoma (真珠腫性中耳炎の上皮は透過性が亢進している)</p> <p>学位論文審査結果要旨</p> <p>中耳真珠腫は、何らかの原因により中耳腔内に内陥して生じたケラチン落屑を含有する表皮嚢胞である。進行性の骨吸収によって内耳瘻孔が生じて種々の合併症を引き起こす。効果的な保存的治療法はなく、ほとんどの症例で外科手術が行われる。骨吸収の機序として、圧迫吸収説、炎症生成物説などが考えられてきたが、申請者らは酸による化学的骨吸収説を支持している。今回、申請者らは、手術症例から真珠腫上皮ではタイト結合タンパクの発現が低下することでその透過性が亢進し、酸による化学的骨吸収が促進している可能性を見出した。</p> <p>対象者および試料は、産業医科大学病院にて鼓室形成術を受けた初発の中耳真珠腫および慢性中耳炎の症例であった。手術中に、耳後部皮膚、外耳道皮膚および真珠腫上皮または乳突洞粘膜のインピーダンスを上皮組織の透過性の指標として測定した。次に、手術で採取した真珠腫組織と耳後部皮膚を用いて免疫組織化学的染色法および RT-PCR 法により、タイト結合タンパク (tricellulin (MARVELD2), claudin-1, claudin-3) の上皮での発現部位及び遺伝子発現量を検討した。</p> <p>その結果、1) インピーダンスは、耳後部皮膚及び外耳道皮膚と比べて真珠腫上皮で有意に低下していた。2) 耳後部皮膚、真珠腫上皮ともに 3 つのタイト結合タンパクが顆粒層を中心に発現していた。3) 真珠腫上皮では、耳後部皮膚よりも 3 つのタイト結合タンパクすべてで有意に低下していた。</p> <p>以上より、中耳真珠腫上皮では、正常皮膚と比較してインピーダンスが低下していることから上皮の透過性が亢進していること、今回検討した 3 つのタイト結合タンパクは上皮顆粒層を中心に発現しているものそれらの発現量は真珠腫上皮で正常皮膚と比較して有意に低下していることが明らかになった。</p> <p>申請者らの中耳真珠腫症例を対象とした研究は、真珠腫上皮でタイト結合タンパクの発現量が低下することで上皮の透過性が亢進し、酸による骨吸収を促進している可能性を見出したものであり、中耳真珠腫の成りおよび新たな治療法を考える上で重要な発見であると思われる。したがって、本学の学位論文に適格であると判断した。</p>						
平成 29 年 1 月 23 日						

氏名	李 曉佳
<p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと) Ikariside A inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis by suppressing nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in cultured bovine adrenal medullary cells (培養ウシ副腎髄質細胞においてイカリソサイド A はニコチン性アセチルコリン受容体を抑制してカテコールアミン分泌及び生合成を阻害する)</p> <p>論文要旨</p> <p>目的 イカリソウ (淫洋藪^{いんようかく}) は伝統中医学においては、強壯薬、補益薬や媚薬として用いられ、さらに薬理作用として抗リウマチ作用等があるとされている。イカリソウの活性成分の一つである ikarisoside A は抗炎症作用や抗酸化作用等の報告がある。しかし、ikarisoside A の作用には不明な点が多く、特にカテコールアミン(CA)神経系に対する作用に関してほとんど報告されていない。そこで本研究では、交感神経系のモデル実験系である副腎髄質細胞を用いて ikarisoside A の CA 生合成や分泌に及ぼす影響について検討した。</p> <p>方法 ウシ副腎髄質細胞はコラゲナーゼ処理により分離、培養した。Ikariside A 存在及び非存在下で CA 分泌、$^{22}\text{Na}^+$と $^{45}\text{Ca}^{2+}$の細胞内への流入、^{14}C-チロシンからの ^{14}C-CA 生合成やその律速酵素のチロシン水酸化酵素活性を測定した。さらに、アフリカツメガエル卵母細胞にニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体($\alpha_3\beta_4$)を発現させ、アセチルコリン(ACh)誘発電流に対する ikarisoside A の直接作用も検討した。</p> <p>結果 (1) Ikariside A (0.3-100 μM) は ACh 刺激によって引き起こされる CA 分泌や $^{22}\text{Na}^+$、$^{45}\text{Ca}^{2+}$細胞内への流入を濃度依存的に抑制した。(2) Ikariside A のアグリコン (10 μM) および他の3種類のフラボノイド(10 μM) は CA 分泌に対して影響しなかった。(3) nACh 受容体刺激による CA 分泌に対する ikarisoside A の抑制作用は ACh の濃度を増加させても回復しなかった。(4) Ikariside A (0.1-10 μM) は nACh 受容体($\alpha_3\beta_4$)を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞において ACh 誘発電流を濃度依存的に抑制した。(5) Ikariside A (1-100 μM) は ACh 刺激による ^{14}C-チロシンからの ^{14}C-CA 生合成やその律速酵素のチロシン水酸化酵素活性を濃度依存的に抑制した。</p> <p>考察 最近の社会を取り巻く変化や職場での様々なストレスは、交感神経の過剰な緊張を招く。特に、長期の強いストレスは脳皮質—視床下部を經由して腹部交感神経終末から ACh を遊離させ、この ACh は副腎髄質に作用して血中に大量の CA を放出する。過剰な CA は、高血圧、動脈硬化や血栓を生じさせ心臓血管系の重大な疾患を引き起こす。今回の研究によって、ikarisoside A が ACh 刺激で誘導した CA 生合成や分泌を抑制することを明らかにした。この結果は、ikarisoside A の抗ストレス効果を期待させるものであるが今後の in vivo の実験が待たれる。</p> <p>結論 Ikariside A はウシ副腎髄質細胞において、nACh 受容体の機能を抑制して Na^+や Ca^{2+}の細胞内への流入阻害、さらにはチロシン水酸化酵素の活性を阻害することにより各々 CA 分泌及び生合成を抑制することが示唆された。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	李 曉佳					
論文審査委員	主査 所属	環境・産業生態 系	環境適応医学 部門	吉村 玲児		
	副査 所属	生体適応 系	生体構造 部門	東 華岳		
		生体適応 系	機能調節 部門	井上 真澄		
論文題目						
<p>Ikarisoside A inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis by suppressing nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in cultured bovine adrenal medullary cells. (培養ウシ副腎髄質細胞においてイカリソサイド A はニコチン性アセチルコリン受容体を抑制してカテコールアミン分泌及び生合成を阻害する)</p>						
学位論文審査結果要旨						
導入						
<p>漢方薬は日本の臨床場面で広く用いられている。しかし、その作用機序に関して十分に解明されているとは言い難い。イカリソウ（淫<small>いんようかく</small>洋藿）は代表的漢方薬の一つである。しかしその薬理学的作用をカテコールアミン (CA) 神経系に焦点を当てて検討した研究はない。そこで申請者はイカリソウの活性成分の一つである ikarisoside A のカテコールアミン (CA) 神経系に対する作用についての検討を行った。具体的には、ikarisoside A の CA 生合成や分泌さらにはチロシン水酸化酵素 (TH) に対する影響について調べている。</p>						
方法および主たる結果						
<p>初代培養ウシ副腎髄質細胞を用いた。Ikarisoside A 存在及び非存在下で CA 分泌、$^{22}\text{Na}^+$ と $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内への流入、^{14}C-TH からの ^{14}C-CA 生合成、TH 活性を測定した。加えて、アフリカツメガエル卵母細胞にニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体 ($\alpha_3\beta_4$) を発現させたものに、アセチルコリン (ACh) 誘発電流に対する ikarisoside A の直接作用も検討して、以下の結果を得た。(1) Ikarisoside A は ACh 刺激誘発 CA 分泌、$^{22}\text{Na}^+$、$^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内への流入を濃度依存的に抑制した。(2) Ikarisoside A のアグリコンならびに他の 3 種類のフラボノイドは CA 分泌に影響しなかった。(3) nACh 受容体刺激誘発 CA 分泌に対する ikarisoside A の抑制作用は ACh の濃度を増加させても回復しなかった。(4) Ikarisoside A は nACh 受容体 ($\alpha_3\beta_4$) を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞において ACh 誘発電流を濃度依存的に抑制した。(5) Ikarisoside A は TH 活性を濃度依存的に抑制した。</p>						
考察						
<p>精神的ストレスは、交感神経の過剰な緊張を引き起こす。ACh は副腎髄質に作用することで大量の CA を血液中に放出する。その結果過剰な CA は、心臓血管系、糖尿病、うつ病を引き起こす。今回の研究によって、ikarisoside A が ACh 刺激で誘導した CA 生合成や分泌、TH 活性を抑制することが明らかになった。以上の事実から ikarisoside A が CA 神経系の抑制作用を介して精神的ストレスにより惹起させる様々な疾患を改善させる可能性が示唆された。</p>						
評価						
<p>申請者は ikarisoside A の CA 神経系への抑制作用が漢方薬であるイカリソウの薬理作用の一部である事を初めて明らかにした。今後 ikarisoside A の機序に関する分子薬理研究を期待したい。本研究は精神ストレス疾患治療薬開発のシーズとなる可能性があり、本学の学位論文として適格であると判断した。</p>						
平成 29 年 / 月 / 日						

氏 名	石松菜那
<p>論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと) High glucose concentration-induced expression of pentraxin-3 in a rat model of continuous peritoneal dialysis. (腹膜透析モデルラットにおける、高濃度グルコースによるペントラキシン3の発現)</p>	
<p>論文要旨</p> <p>【研究の目的】腹膜透析 (peritoneal dialysis ; PD) は、外来で行うことができる透析療法で、就業を含めて患者の生活の質を保つことができる有用な治療法である。一方で、非生理的な透析液 (低 pH、高浸透圧、高濃度グルコース、乳酸などを含む) にさらされることで、腹膜に微小な炎症が惹起されることが知られている。また、長期にわたる PD は、腹膜中皮層の消失、中皮下結合組織の肥厚・線維化などをきたし、限外濾過能の低下や被嚢性腹膜硬化症などの重篤な合併症の原因となる。我々は、この微小な炎症を早期に診断できれば、PD 患者の合併症の発症を減少させ、PD 施行期間を延長できると考えた。そこで、炎症局所で産生され、早期に微小な炎症を検出できるマーカーとして期待されている急性相蛋白 pentraxin3 (PTX3) に着目し、腹膜透析モデルラットを作成し、腹膜における PTX3 の発現を検討した。</p> <p>【方法】8 週齢 Wistar 系ラットを用い、3.86%グルコース透析液、または生理食塩水を 8 週間腹腔内に注入した。壁側腹膜について組織学的観察を行い、RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法、Western Blotting 法で、PTX3 の mRNA および蛋白発現について比較した。また、PTX3 の発現細胞を同定するため、腹膜組織に対する免疫組織化学法、および培養ラット腹膜中皮細胞 (Rat peritoneal mesothelial cells ; RPMCs)、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7)、マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) にグルコース負荷を行い、Western Blotting 法により解析した。</p> <p>【結果】透析液群の壁側腹膜において、腹膜中皮下の組織が肥厚し、中皮下の結合組織の肥厚、線維化および血管新生が認められた。また、RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法、Western Blotting 法により PTX3 の mRNA および蛋白の発現を検出し、その発現量は透析液群において有意に高かった。免疫組織化学では透析液群の腹膜に PTX3 蛋白の発現を認め、それらは中皮細胞、マクロファージ、線維芽細胞マーカー蛋白と共局在を示した。さらに、使用した RPMC、RAW264.7、NIH-3T3 の全てで、グルコース負荷により濃度依存的に PTX3 蛋白の発現が検出された。</p> <p>【考察】PTX3 は局所の炎症部位で様々な細胞から生成され、心血管系疾患・敗血症・慢性腎臓病などで早期の炎症マーカーとして有用であることが報告されている。今回我々は、ラット腹腔内に透析液を注入することで、腹膜肥厚を起こすモデル動物作成に成功した。その腹膜透析モデルラットと培養細胞を用いて、腹膜局所の微小炎症を早期に検出するために PTX3 が有用である可能性を報告した。</p> <p>高濃度のグルコースは中皮細胞において様々な前炎症性サイトカイン (TNF-α、IL-6 など) を誘導する。ヒト線維芽細胞において TNF-α の刺激は、NF-κB を介して PTX3 発現に関与していることや、透析液に含まれる終末糖化産物 (Advanced Glycation End Products ; AGE) は、AGE 受容体 (Receptor for Advanced Glycation End Products ; RAGE) と相互作用し、NF-κB を活性化することも知られており、今後検討が必要である。</p> <p>【結論】腹膜透析液、特に高濃度グルコースによる腹膜局所の微小炎症の早期発見に、PTX3 が有用であることが示唆された。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	石 松 菜 那					
論文審査委員	主査	所属	生体情報系	生殖生理情報部門	蜂須賀 徹	㊟
	副査	所属	障害機構系	病態機構部門	久岡 正典	㊟
	副査	所属	障害機構系	災害医学部門	中村 元信	㊟
			系	部門		㊟
			系	部門		㊟

論文題目

High glucose concentration-induced expression of pentraxin-3 in a rat model of continuous peritoneal dialysis.

(腹膜透析モデルラットにおける、高濃度グルコースによるペントラキシン3の発現)

学位論文審査結果要旨

腹膜透析 (peritoneal dialysis ; PD) は、血液透析に比較して通院回数が少なく自宅で行うことができる。また循環動態への影響が少なく残腎機能が保たれるすぐれた透析療法であるが、カテーテル感染や腹膜炎などの感染症により腹膜の劣化がおこりその多くは血液透析に移行しているのが現状である。今回申請者は腹膜透析中に起こるこれらの炎症を早期に発見できれば、PD 患者の合併症の発症を減少させ、PD 施行期間を延長できる可能性があると考えた。そこで心血管系疾患・敗血症・慢性腎臓病などで早期の炎症マーカーとして有用であることが報告されている急性相蛋白 pentraxin3 (PTX3) に注目し、腹膜透析モデルラットを作成し、腹膜における PTX3 の発現を検討した。

方法は、8 週齢 Wistar 系ラットを用い、無処置群 (n=6)、生理食塩水を 1 日 2 回 8 週間腹腔内に投与した群 (n=5)、3.86% グルコース透析液を 1 日 2 回 8 週間腹腔内に投与した群 (n=6) の 3 群に分けて比較検討した。検討項目としては、壁側腹膜について組織学的観察を行った。RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法、Western Blotting 法で、PTX3 の mRNA および蛋白発現を検討した。また、免疫組織化学法、2 重蛍光免疫組織化学法にて PTX3 の局在を検討した。さらに培養ラット腹膜中皮細胞 (Rat peritoneal mesothelial cells ; RPMCs)、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7)、マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) にグルコース負荷を行い、PTX3 蛋白質の発現について解析した。






結果は、ヘマトキシリン・エオジン染色ではグルコース透析液群の壁側腹膜において、無処置群、生理食塩水群に比して有意に腹膜中皮下の組織が肥厚していた (P<0.05)、中皮下の結合組織の肥厚、線維化がその肥厚の原因と考えられた。また、PTX3 の mRNA および蛋白の発現についての検討では、その発現量はグルコース透析液群において有意に高かった (それぞれ P<0.001 と P<0.05)。免疫組織化学では PTX3 蛋白の発現は中皮細胞と中皮細胞下の線維細胞に陽性であり、その染色強度はグルコース透析液群において高かった。2 重蛍光免疫組織化学法では、中皮細胞、マクロファージ、線維芽細胞に PTX3 蛋白の存在を確認できた。さらに使用した培養細胞株すべてで、グルコース負荷により濃度依存的に PTX3 蛋白の発現が増強された。

今回申請者は、ラット腹腔内に透析液を注入することで、無処置群や生理食塩水群に比して有意に腹膜肥厚を起こすモデル動物を作成した。さらにその腹膜透析モデルラットの腹膜を詳細に検討することによりグルコース透析液が早期に誘発する腹膜の変化を捕えるのに PTX3 が有用である可能性を示すことができた。本研究によって、腹膜透析液、特に高濃度グルコースによる腹膜局所反応の早期発見に PTX3 が有用であることが示唆され、腹膜透析の適応拡大、また施行期間延長に寄与すると考えられることにより、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 29 年 1 月 16 日

氏 名	藤井 正美
<p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと) Prediction of femoral neck strength in patients with diabetes mellitus with trabecular bone analysis and tomosynthesis images (骨梁解析およびトモシンセシス画像を用いた糖尿病患者における大腿骨頸部の骨強度予測)</p>	
<p>論文要旨 目的 糖尿病患者の大腿骨頸部強度評価におけるトモシンセシス画像を用いた骨梁解析の有用性を評価し、脊椎圧迫骨折群と非骨折群の骨梁パラメータを比較する。</p>	
<p>方法 対象は股関節の 2 重エネルギーエックス線吸収測定法 (DXA)、トモシンセシス、および第 10 胸椎から股関節までの CT を撮像した 50 歳以上の女性糖尿病患者 49 人である。大腿骨頸部のトモシンセシス画像上に、主抗張骨梁 (PT) と主抗圧骨梁 (PC) の 2 か所の関心領域を設定し、関心領域内の海綿骨体積比 (BV/TV)、骨梁総延長 (TSL)、および 5 つのテクスチャー指標 (homogeneity, entropy, correlation, contrast, variance) を算出した。一方、CT の DICOM データを用いて大腿骨頸部の 3 次元 CT 有限要素解析を行い、破壊荷重 (failure load) を算出して骨強度のゴールドスタンダードとした。ステップワイズ法による重回帰分析および F 検定による決定係数の有意差検定により、DXA から求めた骨密度 (BMD) 単独とトモシンセシスの骨梁パラメータを加えた場合との、骨強度に対する決定係数を比較した。また、CT 画像を用いて対象を脊椎圧迫骨折群と非骨折群に分け、BMD およびトモシンセシスの骨梁パラメータについて 2 群間比較を行った。</p>	
<p>結果 BMD に主抗張骨梁 (PT) の海綿骨体積比 (BV/TV) および主抗圧骨梁 (PC) の correlation を加えた指標が、3 次元 CT 有限要素解析から求めた破壊荷重 (failure load) と最も強く相関し ($r^2=0.83$)、BMD 単独 ($r^2=0.76$) と比べて、トモシンセシスの骨梁パラメータを加えることで有意な相関性の向上が認められた ($P<.001$)。また、脊椎圧迫骨折群における主抗張骨梁 (PT) の海綿骨体積比 (BV/TV) および entropy は非骨折群と比べて有意に低かったが ($P=0.017$ および $P=0.029$)、BMD は 2 群間に有意差を認めなかった。</p>	
<p>考察 骨強度は骨密度のみでなく、骨微細構造などの骨質とも強く関連しているため、DXA による BMD 測定のみでは骨折リスクを十分に予測し得ず、糖尿病患者では BMD が正常でも骨折リスクが高いことが知られている。本検討では BMD にトモシンセシスの骨梁パラメータを加えることで、3 次元 CT 有限要素解析から求めた破壊荷重 (failure load) との相関性が 7% 向上した。また、脊椎圧迫骨折群と非骨折群の 2 群間比較では、BMD に有意差はなかったが、トモシンセシスの骨梁パラメータである主抗張骨梁 (PT) の海綿骨体積比 (BV/TV) および entropy は骨折群で有意に低い値を示した。これらの結果より、トモシンセシス画像を用いた骨梁解析を行うことによって、DXA では得られない骨質情報を求めることができると考える。 トモシンセシスは複数枚の投影像を 5 秒以内で撮影し、画像再構成により多数の高分解能断層像が得られるエックス線断層撮影技術である。CT と比較して低被曝かつ低コストで撮像できることから、トモシンセシス画像を用いた骨梁解析は、糖尿病患者の骨強度評価法として有用かつ実践的な手法となる可能性がある。</p>	
<p>結論 トモシンセシス画像を用いた骨梁解析と DXA による BMD 測定を組み合わせることで、糖尿病患者における骨強度予測を行える可能性がある。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	藤井 正美				
論文審査委員	主査 所属	障害機構 系	災害外科 部門	酒井 昭典	
	副査 所属	生体適応 系	生体構造 部門	東 華岳	
		障害機構 系	災害外科 部門	佐伯 覚	
		系	部門		
		系	部門		
<p>論文題目</p> <p>Prediction of femoral neck strength in patients with diabetes mellitus with trabecular bone analysis and tomosynthesis images (骨梁解析およびトモシンセシス画像を用いた糖尿病患者における大腿骨頸部の骨強度予測)</p> <p>学位論文審査結果要旨</p> <p>【背景】 原発性骨粗鬆症における骨強度への寄与率は骨密度が約 70%で骨質（構造特性と材質特性）が約 30%といわれている。一方で、糖尿病患者の骨脆弱性は主に骨質の劣化によるといわれており、骨密度だけでは骨折を予測できないことが知られている。</p> <p>【目的】 著者らは、骨密度に骨質のパラメーターを付加することで糖尿病患者の骨強度を予測できるという仮説を立てて本研究を行った。糖尿病患者の大腿骨頸部における骨強度評価に対して、トモシンセシス画像を用いた海綿骨の骨梁解析が有用であるか否かを検討した。また、脊椎圧迫骨折の有無で 2 群に分けて、トモシンセシスのパラメーターを比較した。</p> <p>【対象と方法】 50 歳以上の 2 型糖尿病女性患者 49 名を対象とした。大腿骨頸部の骨密度を DXA (dualx-ray absorptiometry) 法を用いて測定した。トモシンセシス検査と第 10 胸椎椎体から股関節までの CT (computed tomography) 検査を行った。トモシンセシスから海綿骨の構造パターンを抽出し、大腿骨頸部に主抗張骨梁と主抗圧骨梁の 2 箇所に関心領域を設定した。トモシンセシスから抽出したパラメーターは、海綿骨体積比、骨梁総延長、および 5 つのテクスチャー指標 (homogeneity、entropy、correlation、contrast、variance) である。大腿骨頸部の骨強度を CT 有限要素法から決定した。得られた骨強度を目的変数として重回帰分析を行った。Genant の半定量法に従って脊椎圧迫骨折のあり群 (16 例) となし群 (33 例) に分けて、大腿骨頸部の骨密度とトモシンセシスの構造指標について 2 群間比較を行った。</p> <p>【結果】 DXA から得られた「骨密度」とトモシンセシスのパラメーターである「主抗張骨梁領域の海綿骨体積比」と「主抗圧領域の correlation」の 3 つの組み合わせが、CT 有限要素法で算出された骨強度と最も高い相関 ($r^2 = 0.83$) を示し、「骨密度」単独の相関 ($r^2 = 0.76$) よりも高かった ($p < 0.001$)。脊椎圧迫骨折のあり群における主抗張領域の海綿骨体積比と entropy は、脊椎圧迫骨折のなし群よりも低値であった (それぞれ、$p = 0.017$、$p = 0.029$)。しかし、骨密度は両群間に差がなかった。</p> <p>【結論】 トモシンセシスによる海綿骨解析は、技術的に実現性が高く、骨密度との組み合わせで糖尿病患者の骨強度を決定することに活用できる可能性がある。</p> <p>【審査結果】 本研究は、糖尿病患者の骨脆弱性の評価において、トモシンセシスから抽出した海綿骨の構造パラメーターが有用であることを示したはじめての論文である。骨密度とトモシンセシスの骨構造パラメーターの組み合わせが、糖尿病患者の骨折を予測できる可能性がある。重要な知見であると考えられ、本学の学位論文として適格であると判断した。</p>					
平成 29 年 1 月 23 日					

氏名

植田 邦裕

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

5-Aminolevulinic acid enhances mitochondrial stress upon ionizing irradiation exposure and increases delayed production of reactive oxygen species and cell death in glioma cells

(5-アミノレブリン酸は、グリオーマ細胞において、放射線照射によるミトコンドリアに対する負荷を増強することで遅発性活性酸素種産生を増加させ細胞死をきたす)

論文要旨

【研究の目的】悪性神経膠腫は、神経膠腫(グリオーマ)の中で最も予後の悪い腫瘍で、平均余命は約12-14か月であり、集学的治療を行っても有意な生存期間延長は認められていない。5-アミノレブリン酸(5-ALA)はその代謝産物であるプロトポルフィリンIX(PpIX)を悪性神経膠腫、特に細胞内ミトコンドリア内部に選択的に蓄積する性質を有している。我々は今までに5-ALAが放射線照射後の遅発性に発生する細胞内活性酸素種産生を増加することで放射線増感作用を示すことをつきとめた。近年、放射線照射は細胞内ミトコンドリアに作用し、様々な変化(ミトコンドリア量の増加、膜機能の活性化)を来し、結果として遅発性活性酸素種増加を誘導することが報告されている。以上から、我々は5-ALAが放射線照射下においてミトコンドリアに何らかの影響を及ぼし、放射線増感作用を示すという仮説を立て、ミトコンドリアの電子伝達系とミトコンドリア量に着目し、5-ALAの放射線増感作用の機序について検討した。

【方法】In vitro で、ラットおよびヒトグリオーマ細胞株(9L、U251)を用い、5-ALAから誘導されるPpIXの蓄積量を増強させる薬剤(シプロフロキサシン: CPFX)を使用した。最初に、グリオーマ細胞におけるCPFXの至適濃度をMTT assayにて検討した。次にCPFX前投与を行い5-ALAから誘導されるPpIXの細胞内蓄積量をフローサイトメトリー(FCM)により定量的に評価した。そして、CPFX、5-ALA投与後に放射線照射を行い、colony forming assayを行い、細胞生存率を測定した。次に、放射線照射後12時間での遅発性細胞内活性酸素種産生量を、FCMを使用し定量的に評価し、共焦点レーザー顕微鏡で発生した活性酸素種の局在を観察した。また放射線照射後のミトコンドリア量の変化もFCMを使用し定量的に評価した。最後に、遅発性活性酸素種発生に関与するミトコンドリアの電子伝達系活性をWestern blotting法で評価した。

【結果】両細胞株においてCPFXの至適濃度を5 μ Mとした。5-ALA処理後にみられるPpIX上昇や放射線増感作用は、CPFX前投与することで有意に増強された。放射線照射後12時間での遅発性活性酸素種産生も5-ALA投与で有意に増加し、5-ALA処理前にCPFXを前投与することでその産生量はさらに増加した(9L:p=0.0382;U251:p=0.0199)。また、放射線照射後12時間でミトコンドリア量は有意に増加しており(9L:p<0.0001;U251:p=0.0011)、さらに5-ALAはその増加量を有意に増強していた(9L:p=0.0453;U251:p=0.0068)。共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、活性酸素種はミトコンドリアにて産生されており、5-ALA投与がミトコンドリア量および活性酸素種産生量を明らかに増強させていた。ミトコンドリアの電子伝達系においては、特にcomplex IIIの活性が放射線照射後12時間で増強しており(9L:p=0.0267;U251:p=0.3390)、更に5-ALA投与がcomplex IIIの活性を有意に増強させていた(9L:p=0.0365;U251:p=0.0019)。

【考察】今回の実験で、5-ALA投与前にCPFXを前投与することで、細胞内PpIXの産生量が増加し、遅発性活性酸素種産生量の増加につながり、5-ALAの有する放射線増感作用が更に増強されることが証明された。放射線照射後12時間で得られるミトコンドリア量の増加は5-ALAを前投与することでさらに増強され、放射線照射後に増強される遅発性活性酸素種産生は、ミトコンドリア内部で生じていることが判明した。更に、遅発性活性酸素種産生に関与するミトコンドリアの電子伝達系であるcomplex IIIが放射線照射後12時間で活性化しており、5-ALAがさらにその効果を高めていることがわかった。したがって、グリオーマ細胞株において、5-ALAが放射線照射により誘導されるミトコンドリアへの負荷を増強(ミトコンドリア量の増加、complex III活性化)し、細胞内遅発性活性酸素種産生量の増加を誘導し、結果として、細胞死を増加をさせることが推測された。

【結論】5-ALAは、グリオーマ細胞株において、放射線照射によるミトコンドリアに対する負荷を増強することで遅発性活性酸素種産生を増加させ細胞死をきたすことが本研究で明らかになった。

学位論文審査結果要旨

氏 名	植田 邦裕			
論文審査委員	主査 所属	生体適応系	生体機構部門	中山 敏幸
	副査 所属	環境・産業生態系	環境適応医学部門	上野 晋
		生体情報系	生理情報部門	興梠 征典
		系	部門	
		系	部門	
論文題目				
<p>5-Aminolevulinic acid enhances mitochondrial stress upon ionizing irradiation exposure and increases delayed production of reactive oxygen species and cell death in glioma cells (5-アミノレブリン酸は、グリオーマ細胞において、放射線照射によるミトコンドリアに対する負荷を増強することで遅発性活性酸素種産生を増加させ細胞死をきたす)</p>				
学位論文審査結果要旨				
<p>【背景及び目的】 中枢神経系に発生する神経膠腫(グリオーマ)の中で、悪性神経膠腫は最も予後が悪く、積極的治療を行っても生存期間の有意な延長は認められていない。近年では、放射線照射が細胞内ミトコンドリアに作用し、ミトコンドリア量の増加や膜機能の活性化等を誘導し、遅発性活性酸素種を増加することが報告されている。 5-アミノレブリン酸(5-ALA)はその代謝産物であるプロトポルフィリンIX (PpIX)を悪性神経膠腫、特に細胞内ミトコンドリア内部に選択的に蓄積する性質を有しており、これまでの研究で5-ALAが放射線照射後の遅発性に発生する細胞内活性酸素種産生を増加することで放射線増感作用を示すことが明らかとなっている。本研究では、ミトコンドリアの電子伝達系とミトコンドリア量等に着目し、5-ALAの放射線増感作用の機序について検討を行っている。</p>				
<p>【方法】 ラットおよびヒトグリオーマ培養細胞株(9L、U251)を用い、5-ALA及びシプロフロキサシン(CPFX: 5-ALAから誘導されるPpIXの蓄積量を増強させる薬剤)を使用した。 (1)CPFXの至適濃度についてcolony forming assayを行い、細胞生存率をMTT assayにて測定し、両細胞株の至適濃度を検討した。(2)CPFXを前投与し、5-ALAから誘導されるPpIXの細胞内蓄積量及びミトコンドリア量をフローサイトメトリー(FCM)により定量的に検討した。(3)発生した活性酸素種の細胞内局在と量的変化を共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。(4)遅発性活性酸素種発生に関与するミトコンドリアの電子伝達系をWestern blotting法により検討した。</p>				
<p>【結果】 (1)CPFXの至適濃度を、ラットおよびヒトグリオーマ培養細胞株どちらも5μMとした。(2)5-ALA処理後にみられるPpIX上昇や放射線増感作用は、CPFXの前投与により有意に増強され、放射線照射後12時間での遅発性活性酸素種産生も5-ALA投与で有意に増加し、5-ALA処理前にCPFXを前投与することで遅発性活性酸素種産生量は更に増加した(9L:p=0.0382;U251:p=0.0199)。ミトコンドリア量は、放射線照射後12時間で有意に増加し(9L:p<0.0001;U251:p=0.0011)、さらに5-ALA処理により有意に増加が認められた(9L:p=0.0453;U251:p=0.0068)。(3)活性酸素種はミトコンドリアにて産生が確認され、5-ALA投与によりミトコンドリア量および活性酸素種産生量が増加していた。(4)ミトコンドリアの電子伝達系において、特にcomplex IIIの活性が放射線照射後12時間で増強しており(9L:p=0.0267;U251:p=0.3390)、更に5-ALA投与によりcomplex IIIの活性亢進が有意に認められた(9L:p=0.0365;U251:p=0.0019)。</p>				
<p>【まとめ】 グリオーマ細胞株において、5-ALAが放射線照射によりミトコンドリア内complex III活性化やミトコンドリア量増加等のミトコンドリアへの負荷を増加し、細胞内遅発性活性酸素種産生量の増加を誘導することで、細胞死を増加させることが示唆された。 本研究では、CPFX前投与による5-ALAの放射線増感作用の更なる亢進が確認され、悪性神経膠腫の新たな治療開発の可能性を示唆する重要な結果である。よって、本学の学位論文として適格であると判断した。</p>				
平成 29 年 3 月 6 日				