

氏名

澁谷 亮

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

CAMTA1 is a useful immunohistochemical marker for diagnosing epithelioid haemangioendothelioma.
(CAMTA1 は類上皮血管内皮腫の診断における有用な免疫組織化学的マーカーである)

論文要旨

[研究の目的]

発生頻度の稀な類上皮血管内皮腫 (epithelioid haemangioendothelioma: EHE) の病理診断では、上皮様腫瘍細胞の存在や CD31 等の免疫染色所見における類似性などによりいくつかの異なる疾患が鑑別に挙がり、診断確定が困難な場合がある。EHE では、症例の約 90% で特異的な *WWTR1-CAMTA1* 融合遺伝子を有することが近年報告され、その結果転写因子 CAMTA1 が過剰発現していることが明らかとなっている。また、残る 10% の EHE では *YAPI-TFE3* 融合遺伝子が認められることが最近報告されており、同融合遺伝子を有する例では、免疫染色で TFE3 が腫瘍細胞の核にびまん性強陽性像を示すとされている。本研究では EHE の診断における CAMTA1 免疫染色の有用性について病理学的に検討すると共に、TFE3 の免疫染色との比較も行った。

[方法]

産業医科大学第1病理学教室および産業医科大学病院病理診断科で診断された16例のEHEおよび病理診断上鑑別が問題となり得る276例の上皮性・非上皮性腫瘍を対象とし、これらのホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて抗CAMTA1抗体による免疫染色を行った。16例のEHEでは抗TFE3抗体でも免疫染色を行った。16例のEHEのうち、7例ではRT-PCR法ないしFISH法を用いてホルマリン固定パラフィン包埋組織または凍結腫瘍検体からCAMTA1遺伝子再構成およびTFE3遺伝子再構成の検出も試みた。

[結果]

RT-PCR法ないしFISH法では、検索し得たEHE7例のうち5例でCAMTA1遺伝子再構成(融合遺伝子の転写産物あるいは1p36分離シグナル)を認めた。なお、TFE3遺伝子再構成は検出し得なかった。免疫染色上、16例中14例(87.5%)のEHEで腫瘍細胞の核にCAMTA1陽性像が認められ、いずれもびまん性に分布し強度(10例)ないし中等度(4例)の発現を示した。また、CAMTA1遺伝子再構成を認めた5例はいずれもCAMTA1が陽性であった。一方、276例の非EHE腫瘍では浸潤性乳管癌の1例にのみ局所的で弱いCAMTA1陽性像が認められたが(特異度99.6%)、同例では1p36分離シグナルは検出されなかった。正常組織におけるCAMTA1の発現は、腎メサンギウム細胞、小脳Purkinje細胞、乳管上皮細胞および皮膚扁平上皮細胞に局限していた。EHE16例中3例で局所的かつ弱いTFE3陽性像が認められた。この3例のうち2例ではCAMTA1遺伝子再構成を認め、残る1例では遺伝子再構成を検索し得なかったものの、CAMTA1のびまん性かつ強い陽性像が認められた。

[考察]

EHEの病理診断では、類似の組織形態を示し得る様々な上皮性ないし非上皮性腫瘍が鑑別診断として考慮され、時として診断の確定が困難なことがある。しかし、治療法や生物学的態度などが異なるため、正確な診断が要求されることは言うまでもない。本研究で用いた抗CAMTA1抗体は、EHEにおいて感度・特異度がともに高く、染色上明瞭な発現パターンを示すこと、および非特異的染色がほとんど見られないことにより、EHEの卓越した免疫染色マーカーといえる。一方、TFE3については本研究でその有用性を確認することが出来ず、これまでの報告でも種々の腫瘍で非特異的な陽性像を示すことが指摘されていることもあり、EHEの診断における同抗体を用いた染色結果の解釈には慎重を要すると考えられた。

[結論]

CAMTA1 は EHE の診断における有用な診断マーカーである。

学位論文審査結果要旨

氏 名	澁谷 亮			
論文審査委員	主査 所属	生体適応系	生体構造部門	森本 景之
	副査 所属	障害機構系	災害外科部門	平田 敬治
		生体情報系	生殖生理情報部門	蜂須賀 徹
		系	部門	部門
		系	部門	部門

論文題目

CAMTA1 is a useful immunohistochemical marker for diagnosing epithelioid haemangioendothelioma.
 (CAMTA1 は類上皮血管内皮腫の診断における有用な免疫組織化学的マーカーである)

学位論文審査結果要旨

診断病理において、組織型の類似する腫瘍では治療法や生物学的態度などが異なるため、正確な鑑別が要求される。類上皮血管内皮腫 (epithelioid haemangioendothelioma; EHE) は発症頻度の (極めて) 低い、稀な疾患であり、上皮様腫瘍細胞の存在や CD31 の所見等の類似性のため、時に病理診断の確定が困難な場合がある。一方、腫瘍において特徴的な融合遺伝子が検出される場合が知られており、EHE の約 90% の症例で、WWTR1-CAMTA1 融合遺伝子が認められ、転写因子 CAMTA1 が過剰発現していることが報告されている。また、残り約 10% の EHE では、YAP1-TFE3 融合遺伝子が認められ、腫瘍細胞の核はびまん性に TFE3 強陽性像を示すとの報告もある。本研究では、診断確定が困難な可能性のある EHE において、CAMTA1 および TFE3 の免疫組織化学的検証の有用性について検討を行った。

産業医科大学 第 1 病理学教室および、産業医科大学病院 病理診断科において診断された 16 例の EHE および、EHE との病理鑑別が困難な 276 例の上皮性・非上皮性腫瘍を対象とした。これらのホルマリン固定、パラフィン包埋標本について、抗 CAMTA1 抗体および、抗 TFE3 抗体による免疫組織化学を行った。また、EHE16 例のうち、7 例について、ホルマリン固定パラフィン包埋組織または、凍結腫瘍検体を用いて、CAMTA1 および TFE3 の遺伝子再構成を RT-PCR 法、または FISH 法で検出した。

RT-PCR 法ないし、FISH 法の結果、EHE7 例中 5 例において、CAMTA1 遺伝子再構成 (融合遺伝子の転写産物、あるいは、1p36 分離シグナル) を認め、TFE3 遺伝子再構成は検出されなかった。免疫組織化学的検索の結果、EHE16 例中 14 例 (87.5%) で腫瘍細胞の核にびまん性に CAMTA1 陽性像が認められた (強度 10 例、中等度 4 例)。CAMTA1 遺伝子再構成が認められた 5 例については、いずれも免疫組織化学で陽性を示した。また、EHE16 例中 3 例で限局的に弱い TFE3 陽性像が認められ、そのうち 2 例では CAMTA1 遺伝子再構成が検出され、1 例で CAMTA1 強陽性像が認められた。正常組織では、腎メサンギウム細胞、小脳プルキンエ細胞、乳管上皮細胞および、皮膚扁平上皮細胞に CAMTA1 の発現が認められたが、EHE に比べてその発現は極めて微弱であった。一方、EHE との病理鑑別が困難な 276 例の上皮性・非上皮性腫瘍においては、浸潤性乳管癌 (1 例) で局所的に CAMTA1 陽性像が弱く認められた (特異度 99.6%)。しかし、同癌では、CAMTA1 遺伝子再構成は検出されなかった。

EHE は様々な上皮性ないし、非上皮性腫瘍と類似の組織型を示す場合があり、時として病理診断の確定が困難である。本研究の結果、EHE において、CAMTA1 の免疫組織化学的検出は感度、特異性共に高く、明瞭な発現パターンを示したことから、EHE のマーカーとして非常に有用であることが明らかとなった。一方、TFE3 の免疫組織化学についてはその有用性を確認することはできなかった。免疫組織化学法は RT-PCR 法ないし、FISH 法に比べて、その運用や導入が比較的容易である。CAMTA1 の検出に免疫組織化学法を用いることで、EHE に関する確実な診断を可能とすることは、その後の治療にも大きな影響を与える。この成果は、産業医学の観点からも重要であり、本論文を学位論文として適格であると判断した。

平成 27 年 10 月 27 日

氏 名

松浦 孝紀

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

Fluorescent visualisation of oxytocin in the hypothalamo-neurohypophysial/-spinal pathways after chronic inflammation in oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rats

(オキシトシン-単量体赤色蛍光タンパク 1 トランスジェニックラットにおける慢性炎症後の視床下部-神経下垂体/-脊髄経路でのオキシトシンの蛍光可視化)

論文要旨

【目的】

下垂体後葉ホルモンの一つであるオキシトシン (oxytocin: OXT) は、視床下部室傍核 (paraventricular nucleus: PVN)、視索上核 (supraoptic nucleus: SON) の大細胞性神経分泌ニューロンで産生され、下垂体後葉 (posterior pituitary: PP) に投射した軸索終末より血中に分泌される。OXT の生理的役割として子宮収縮、乳汁分泌が知られているが、近年では社会形成、信頼関係、摂食などにも関与していることが明らかとなってきた。最近、OXT は疼痛調整にも関与すること、さらにオキシトシン受容体が、侵害受容の求心性線維である1次ニューロンおよび2次ニューロンのシナプス伝達部位の脊髄後角に存在することが報告された。PVN の大細胞領域の神経分泌ニューロンで産生された OXT は PP より血中に分泌される。一方、PVN の小細胞領域の OXT ニューロンは延髄および脊髄にもその軸索を投射しており、自律神経系や疼痛調整にも関与していると考えられているが、詳細は不明である。本研究では、視床下部で産生されるオキシトシンを単量体赤色蛍光タンパク 1 (monomeric red fluorescent protein 1: mRFP1) により標識することで、OXT ニューロンを可視化した遺伝子改変動物を用いた。本研究の目的は、OXT-mRFP1 トランスジェニックラットを用いて、慢性炎症・疼痛モデルであるアジュバント関節炎 (adjuvant arthritis: AA) を作製し、PVN・SON・脊髄・PP における OXT-mRFP1 融合遺伝子の発現動態を可視化・定量化することである。

【方法】

成熟雄性 OXT-mRFP1 トランスジェニックラットを用いて、結核死菌 (*Mycobacterium butyricum*) を、流動パラフィンにて溶解後 25G 注射針を使用してトランスジェニックラット尾根部皮下に投与し、AA を誘発させた。コントロール群には流動パラフィン単独で尾根部皮下に接種した。(1) 抗原接種後、隔日で arthritis index・体重・食餌量を代謝ゲージ用いて計測した。(2) 抗原接種後、経時的 (1、15 ならびに 22 日後) に脳・脊髄・PP を摘出し、切片を作成した。PVN および SON、脊髄後角ならびに PP においては、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて mRFP1 赤色蛍光を定量評価した。定量評価時、PVN は大細胞領域・小細胞領域を区別して解析し、SON は大細胞領域のみからなるため全体を解析した。(3) 視床下部および脊髄スライス切片を用いて、赤色蛍光の発現について確認した。(4) PVN および SON での mRFP1 mRNA および OXT mRNA レベルを調べるため、抗原接種後 15 日ならびに 22 日後に *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、定量評価した。






【結果】

抗原接種後のトランスジェニックラットでは、(1) 接種後 10 日目から AA を発症し、同時期から体重増加は有意に抑制され、食餌量は接種後 12 日目から有意に減少した。(2) mRFP1 赤色蛍光は PVN の大細胞領域・小細胞領域、SON、脊髄後角ならびに PP で抗原接種 15 日および 22 日後において有意に増加した。(3) *in vitro* 標本においても、mRFP1 赤色蛍光の発現が検出できた。(4) 抗原接種後 15 日ならびに 22 日後の PVN の大細胞領域・小細胞領域、ならびに SON において、mRFP1 mRNA ならびに OXT mRNA レベルでも有意な増加を認めた。

【結論】

慢性炎症・疼痛モデルである AA ラットにおいて、視床下部 PVN の大細胞領域・小細胞領域、ならびに SON におけるオキシトシン合成が増加していることを明らかにした。PP および脊髄後角における軸索終末でのオキシトシンが増加していることも明らかにした。したがって AA ラットにおいて視床下部-神経下垂体/-脊髄経路が活性化し、これらの経路が侵害受容の疼痛調整に関与していることが示唆された。

学位論文審査結果要旨

氏 名	松浦 孝紀			
論文審査委員	主査 所属	生体適応系	生体構造部門	東 華岳 
	副査 所属	生体適応系	機能調節部門	井上 真澄 
		障害機構系	災害外科部門	佐伯 覚 
		系	部門	
		系	部門	
論文題目				
<p>Fluorescent visualisation of oxytocin in the hypothalamo-neurohypophysial/-spinal pathways after chronic inflammation in oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rats (オキシトシン-単量体赤色蛍光タンパク 1 トランスジェニックラットにおける慢性炎症後の視床下部-神経下垂体/-脊髓経路でのオキシトシンの蛍光可視化)</p>				
学位論文審査結果要旨				
<p>オキシトシン (oxytocin: OXT) は、視床下部の視索上核 (supraoptic nucleus: SON) と室傍核 (paraventricular nucleus: PVN) の大細胞性神経分泌ニューロンで合成され、下垂体後葉 (posterior pituitary: PP) に投射した軸索終末から血液中に放出される。一方、PVN の小細胞領域の OXT ニューロンは延髄および脊髄にもその軸索を投射しており、自律神経系や疼痛調整に関与していると考えられているが、詳細は不明である。申請者は、遺伝子改変技術を利用して OXT 遺伝子に単量体赤色蛍光タンパク 1 (monomeric red fluorescent protein 1: mRFP1) 遺伝子を挿入した融合遺伝子をもつトランスジェニックラットを用いて、慢性炎症・疼痛モデルとして知られているアジュバント関節炎 (adjuvant arthritis: AA) を作製し、OXT-mRFP1 の発現動態の定量解析を行い、慢性炎症・疼痛における OXT の役割を検討した。</p>				
<p>実験では、成熟雄性ウイスター系 OXT-mRFP1 トランスジェニックラットに流動パラフィンに溶かした結核死菌を接種し、AA を作製した。コントロール群には流動パラフィン単独を接種した。接種後に隔日で関節炎点数 (arthritis index) と体重を計測した。接種後 1 日、15 日と 22 日に PVN、SON、PP および脊髄後角における mRFP1 赤色蛍光を蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡で定量測定した。in vitro 標本でも mRFP1 赤色蛍光の発現を確認した。in situ ハイブリダイゼーション法にて PVN と SON における mRFP1 mRNA と OXT mRNA の定量評価を行った。</p>				
<p>その結果、結核死菌接種後 10 日目から関節炎点数が上昇し、体重増加が抑制された。コントロール群に比べ、結核死菌接種後 15 日と 22 日において、PVN の大細胞領域と小細胞領域、SON、PP および脊髄後角で mRFP1 赤色蛍光が有意に増加した。脳と脊髄の in vitro 標本で mRFP1 赤色蛍光の発現が検出された。PVN の大細胞領域と小細胞領域および SON における mRFP1 mRNA と OXT mRNA の発現の有意な増加が確認された。</p>				
<p>以上より、視床下部 PVN の大細胞領域と小細胞領域ならびに SON に局在する神経分泌ニューロンにおいて、AA の発症に伴い OXT 産生の増加を認め、PP と脊髄後角の軸索終末における OXT の増加も認めた。AA により視床下部-神経下垂体/-脊髓経路が活性化し、この経路が慢性炎症・疼痛の調節に関与することが示唆された。</p>				
<p>申請者が OXT に蛍光タンパクを標識することにより可視化したトランスジェニックラットを用いて、AA に対する OXT の関与を明らかにした。本研究で得られた結果は慢性炎症・疼痛における OXT の役割を解明していく上で大きな影響を与える。この成果は、産業医学の観点からも重要であり、本学の学位論文として適格であると判断した。</p>				
平成 28 年 2 月 8 日				

氏 名	小笠原 篤
<p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)</p> <p>Quantitative susceptibility mapping in patients with systemic lupus erythematosus: Detection of abnormalities in normal-appearing basal ganglia (全身性エリテマトーデス患者における脳定量的磁化率マッピング: 通常のMRIで正常を呈する基底核の異常検出)</p>	
<p>論文要旨</p> <p>【目的】 全身性エリテマトーデス (以下SLE) は、全身の多彩な炎症性病変を特徴とする自己免疫性疾患である。神経精神症状はループス腎炎と並んでSLEの重篤な病態であるが、通常の脳MRIでは異常を検出できない場合が多い。近年、開発された定量的磁化率マッピング (quantitative susceptibility mapping: QSM) は、組織の磁化率 (QSM値) を定量的に評価できる新たなMR撮像法であり、新たな情報を提供する。本研究では、通常の脳MRIで異常を認めないSLE患者を対象に、QSMを用いて脳の異常を検出できるかについて検討した。</p> <p>【方法】 ACR基準を満たすSLE患者41例 (神経精神症状を認めるSLE患者 [以下NPSLE] 18例、神経精神症状を認めないSLE患者 [以下nonNPSLE] 23例)、年齢と性別を適合させた正常コントロール (NC) 23例に対して、3T MRI装置でQSMとR2*マッピングを撮像した。2名の放射線科医が、regions of interest (ROI) 法を用いて、脳の9領域 (尾状核、被殻、淡蒼球外節および内節、視床、橋、大脳白質、脳梁の膨大部および膝部) のQSM値とR2*値を計測し3群間で比較した。また、計測者間一致率 (Kendall τ value) について、QSMとR2*マッピングを比較した。</p> <p>【結果】 被殻のQSM値は、nonNPSLE群とNC群に比べ、NPSLE群で有意に高かった ($p < 0.05$)。淡蒼球のQSM値は、NC群に比べ、nonNPSLE群とNPSLE群で有意に高かったが ($p < 0.05$)、NPSLE群とnonNPSLE群の間に有意差を認めなかった。被殻のQSM値は、NPSLEの罹患期間と正の相関関係を認めたが ($r = 0.49$, $p < 0.05$)、病気の活動性や重症度とは相関しなかった。R2*値において、NPSLE群とnonNPSLE群の間に有意差を認める脳領域はなかった。QSMの計測者間一致率は、R2*より優れていた (Kendall τ value: 0.690 vs 0.446)。</p> <p>【考察】 NPSLEの病因は、血管炎、代謝障害、虚血性脳障害など多彩である。磁化率に影響する生体内物質として鉄沈着、脱酸素化ヘモグロビン、ミエリン、石灰化などがあるが、今回のNPSLEの被殻におけるQSM値の変化は、炎症や微小血管障害などに伴う二次的な鉄沈着を反映していると考えられた。従来、鉄沈着など磁化率の変化を評価する最も鋭敏なMRI撮像法はR2*マッピングとされてきたが、定量性の低さやアーチファクトによる画質の低下が課題であった。今回、NPSLEとnonNPSLEの間で被殻のQSM値のみ有意差を検出できた理由として、QSMの高い定量性と基底核解剖の高い描出能がある。QSMの高い計測者間一致率は、被殻の解剖が明瞭に描出できたことによるROI測定精度向上が考えられた。</p> <p>過去にSingle Photon Emission Computed Tomography (SPECT) やPositron Emission Tomography (PET) を用いてSLE患者における脳血流や脳代謝の異常が報告されているが、SPECTやPETは、被曝を伴う、使用施設が限られるなどの制約がある。一方、QSM値を用いた磁化率変化の評価は、どの施設でも比較的簡便に施行でき、NPSLEの病態について有用な情報を提供することが示唆された。</p> <p>【結論】 QSMは、SLE患者の通常のMRIで正常を呈する基底核における磁化率変化を検出できる。さらにnonNPSLEに比べ、NPSLEにおける被殻のQSM値は有意に高値であり、被殻の磁化率変化がSLE患者の神経精神症状に関連することを示唆する。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	小笠原 篤					
論文審査委員	主査 所属	生体情報 系	病態情報 部門	西澤 茂		
	副査 所属	生体情報 系	生理情報 部門	藤木通弘		
	副査 所属	生体情報 系	病態情報 部門	鈴木秀明		
		系		部門		
		系		部門		

論文題目
 Quantitative susceptibility mapping in patients with systemic lupus erythematosus: Detection of abnormalities in normal-appearing basal ganglia
 (全身性エリテマトーデス患者における定量的磁化率マッピング：通常の MRI で正常を呈する基底核の異常検出)






学位論文審査結果要旨
 目的：全身性エリテマトーデス(SLE) は全身の炎症性病変を特徴とする自己免疫疾患で、神経精神症状を呈する時には重篤な状態である。しかし、神経精神症状を呈しても通常の撮像法を用いた MRI では異常を検出できないことが多い。申請者は脳における鉄の沈着に注目し、最近開発された新しい MRI 撮像法である定量的磁化率マッピング(quantitative susceptibility mapping: QSM) を用いて SLE 患者の脳の異常を検出できるか検討した。
 方法：SLE 患者 33 例で、神経精神症状(+)13 例、神経精神症状(-)20 例で検討した。正常者 23 例をコントロールとした。3T MRI で QSM と鉄沈着などによる磁化率変化を鋭敏に捉えるとされる R2*マッピングを撮像した。脳の 9 領域 (尾状核、被殻、淡蒼球外節および内節、視床、橋、大脳白質、脳梁膨大部および膝部) で ROI を作成し、QSM 値と R2*値を計測し 3 群間で比較した。
 結果：9 領域の内、被殻においてのみ QSM 値は神経精神症状を有する群で他の 2 群より統計的に有意に高値であった。淡蒼球ではコントロール群より SLE 患者で高値であったが、神経精神症状(+)(-)群間では有意差はなかった。被殻の QSM 値は神経精神症状を持つ SLE 患者の罹病期間と正の相関関係にあったが、病気の活動性、重症度とは相関しなかった。R2*値はどの領域においても神経精神症状(+群)と(-群)間で有意差を認めなかった。
 考察：生体内の磁化率に影響を与える物質には様々なものがあるが、最も大きな因子は鉄であり、今回の研究で得られた SLE 患者の QSM 値変化は脳内の鉄沈着を反映していると考えられる。これまで R2*マッピングが最も鋭敏に鉄沈着などの磁化率変化を評価できると考えられてきた。しかし、R2*マッピングの定量性に問題があること、アーチファクトによる画質の低下などが問題とされてきた。今回の研究で、新しい MRI 撮像法である QSM を用いると、脳、特に基底核が鮮明に撮像されることがわかり、さらに QSM 値で SLE 患者の神経精神症状(+)(-)群間で有意差を示すことができたことから定量性により高い信頼性が得られたことが明らかにできた。
 結論：神経精神症状を呈する SLE 患者で、大脳基底核の鉄沈着を QSM を用いた MRI ではっきりと捉えることができる。今後鉄沈着が SLE 患者の神経精神症状発現の病態解明に貢献できる可能性がある。

これまで神経精神症状を呈する SLE 患者で通常の MRI 検査ではなかなか異常を検出できなかったが、申請者が行った今回の研究で、大脳基底核、特に被殻に鉄が沈着していることが明らかにされた。今後の病態解明に本研究は大きく貢献できる可能性がある。したがって、本論文は本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 28 年 2 月 3 日

氏名	野口 紘嗣
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
Depletion of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Prevents Bile Duct Ligation-Induced Necroinflammation and Subsequent Peribiliary Fibrosis (ASK1 欠損は、胆管結紮により惹起される肝壊死・炎症、およびそれに引き続く胆管周囲線維化の抑制に強く影響する)	
論文要旨	
<p>【目的】 Apoptosis signal-regulating kinase(ASK)1 は、様々な細胞障害性ストレスに反応して活性化する MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) ファミリーであり、かつ、シグナル伝達系の上流に存在し、全身に分布する重要な酵素群の一つである。また、ASK1 は、tumor necrosis factor-α等を含むサイトカイン等にも反応し、c-Jun N-terminal kinase (JNK)及び p38 MAPK 経路を活性化させ、ミトコンドリア依存性のカスパーゼ活性化によりアポトーシスを誘導し、サイトカインの放出や細胞の分化にも関与することが報告されている。</p> <p>これまで、肝線維化は、肝細胞壊死・炎症とそれに連続する形で引き起こされると報告されている。急性期から亜急性期の肝細胞障害として、総胆管結石などの胆管閉塞性肝障害が挙げられる。胆管閉塞による胆汁酸うっ滞が、肝内胆管及び肝細胞の壊死・炎症を引き起こすと考えられ、肝細胞アポトーシスを制御することが、肝線維化をも抑制すると仮説をたてた。胆汁うっ滞による胆管上皮障害を反映する細胆管増生と、胆汁酸調節障害による肝細胞アポトーシス、それに引き続く肝線維化について、<i>ASK1</i> knockout mouse (<i>ASK1</i>^{-/-}) を用い、アポトーシスと線維化について検討した。</p> <p>【方法】 8週齢の<i>ASK1</i>^{-/-}及び対照群として Wild Type mouse (WT, C57BL/6) を用い、開腹後に総胆管を2重結紮し、その中央の総胆管を切離することで胆管結紮モデルを作製した。術後3日目を急性期、14日目を亜急性期とし、肝、血清等を採取した。肝を中心に、HE染色や免疫組織化学染色等による病理組織学的検討を行い、炎症、線維化、アポトーシスや増殖能の程度を比較・検討した。肝のmRNA・蛋白を抽出し、炎症・アポトーシス関連分子等の発現を比較検討し、ASK1及び活性化されたASK1、JNK、p38の蛋白レベルでの発現を分析した。血清中の肝逸脱酵素、ビリルビン、胆汁酸及び、肝組織内の胆汁酸濃度も測定した。</p> <p>【結果】 WTでは<i>ASK1</i>^{-/-}と比し、活性化されたASK1、JNK、p38の発現が、肝細胞及び大型胆管上皮細胞で有意に認められた。術後3日目の<i>ASK1</i>^{-/-}ではWTと比較して、肝壊死巣が有意に減少しており、好中球やTリンパ球、マクロファージの浸潤も有意に抑制されていた。術後14日目の<i>ASK1</i>^{-/-}では、細胆管増生が有意に減少し、細胆管周囲のfibrogenic cellsの増殖も抑えられていた。術後3日目の血清では、肝逸脱酵素及びビリルビン、胆汁酸の上昇が有意に抑制されており、肝組織中の胆汁酸の上昇も抑えられていた。また、予測に反し、術後3・14日目のいずれにおいても、<i>ASK1</i>^{-/-}・WTともに肝細胞及び胆管上皮細胞でのアポトーシスは極めて少数であり、有意差は見られなかった。</p> <p>【考察及び結論】 胆管結紮による胆管閉塞性肝障害では、<i>ASK1</i>遺伝子欠損は、急性期の胆管周囲の炎症や亜急性期のfibrogenic cellsを伴う細胆管の増生を抑制していたが、当初考えていた肝障害を惹起させる胆汁酸代謝調節の制御や、アポトーシスについて有意差は認められなかった。肝保護作用はASK1欠損の抗炎症作用によるものが主体であり、胆管結紮モデル<i>ASK1</i>^{-/-}が最終的に肝線維化抑制に働く機序として、抗炎症作用による防御機能を示し得たものと推察される。胆管結紮による肝壊死・炎症とそれに引き続く線維化では、ASK1欠損は急性期から亜急性期の抗炎症作用に強く関与する可能性が示された。今回は、胆汁うっ滞による胆管及び肝細胞への炎症と、それに引き続く細胆管の増生が肝線維化を惹起させており、ASK1の慢性肝障害/肝硬変に寄与する重要性、さらにはASK1-blockerを含む治療応用への可能性を示唆することができた。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	野口 紘嗣							
論文審査委員	主査	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	原田 大	
			生体情報	系	病態情報	部門	川崎 貴士	
				系		部門		
				系		部門		

論文題目

Depletion of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Prevents Bile Duct Ligation-Induced Necroinflammation and Subsequent Peribiliary Fibrosis

(ASK1 欠損は、胆管結紮により惹起される肝壊死・炎症、およびそれに引き続く胆管周囲線維化の抑制に強く影響する)

学位論文審査結果要旨

肝臓において種々のストレスにより炎症から線維化へと組織変化や障害が進展していく過程で、アポトーシスの関与が議論されている。本申請者らは、アポトーシスの誘導において主軸的な役割を演じることで知られている apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)に着目し、ASK1 ノックアウトマウス (ASK1^{-/-}) および健常マウス(WT)に胆管結紮を施して肝障害モデルを作成し、結紮後の肝組織の変化を形態学および生化学的に両者で比較することにより、胆管閉塞に基づく肝病変でのアポトーシスや ASK1 の意義について検討した。

すなわち、8 週齢の ASK1^{-/-}と WT に対して開腹下で総胆管を結紮後に同部を切離し、術後 3 日目（急性期）と 14 日目（亜急性期）に屠殺して、それぞれの肝組織や血清、尿を検体として採取した。なお、胆管結紮・切離を行わず開腹のみを施したマウスを対照 (Sham 群) とした。肝組織の光学顕微鏡的観察に加え免疫組織化学的観察や透過電子顕微鏡観察を行い、炎症や線維化、アポトーシス、細胞増殖の程度等を評価し、同組織から抽出した蛋白や mRNA を用いて炎症やアポトーシスに関連した種々の分子 (caspase-3, p-p38, p-JNK など) の発現についても比較検討した。さらに、血清中の肝逸脱酵素やビリルビン、胆汁酸、脂質に加え肝組織中での胆汁酸の値も測定した。






上記の胆管処置により WT では ASK1^{-/-}よりも肝細胞および大型胆管上皮細胞での活性化 AKS1 と、その細胞内シグナル伝達経路の下流で応答する p-JNK や p-p38 の発現が増加していることが確認された。術後 3 日目では散在性に壊死巣 (胆汁性梗塞) の出現が見られたが、ASK1^{-/-}では WT に比して壊死巣の面積は小さく、好中球等の炎症細胞浸潤も有意に軽かった。また、血清中の肝逸脱酵素やビリルビン、胆汁酸値や肝組織中の胆汁酸値も WT に比して有意に低かった。さらに術後 14 日目では、ASK1^{-/-}における細胆管の増生や胆管周囲の線維化、肝細胞や胆管上皮細胞の増生 (再生) が WT に比較して有意に抑制されていた。一方、肝細胞や胆管上皮細胞におけるアポトーシスの所見は術後 3 日、14 日も乏しく、両マウス間あるいは Sham 群と比較しても程度に差は認められなかったが、胆管結紮された WT では ASK1^{-/-}よりも肝小葉内に好酸性で膨化した孤在性の壊死性肝細胞 (oncotic necrosis) が有意に多く散見された。

以上の結果は、マウスにおける胆管閉塞後の肝障害では、肝細胞や胆管上皮のアポトーシスの関与は重要ではなく、胆汁うっ滞に直接起因したと考えられる肝組織の壊死・炎症性変化が主たる役割を演じている事を示唆していると共に、ASK1 を負に制御することによりそれらの変化を抑制して肝保護効果を得る事ができる可能性をも示している。本論文は、これまで検討の乏しかった ASK1 のアポトーシス誘導以外の生物学的機能 (壊死炎症と引続く線維化の誘導) に関する貴重な情報を提供しており、そのメカニズムの詳細については今後のさらなる検討が待たれるものの、胆管閉塞に基づく肝疾患の病態を一層理解し、将来の効果的治療法を探る上でも有用な知見を示していることから、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 28 年 2 月 29 日

氏 名	程 晓博
論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと)	
Hyaluronan Stimulates Pancreatic Cancer Cell Motility (ヒアルロン酸は膵癌細胞の遊走能を刺激する)	
論文要旨	
<p>目 的： ヒアルロン酸 (hyaluronan) は間質の細胞外マトリックスを構成する重要な構成因子である。正常組織では、ヒアルロン酸の量は、産生酵素 (hyaluronan synthase, HAS) と分解酵素 (hyaluronidase, HYAL) によって調整されている。一方、炎症、創傷治癒、および癌においてヒアルロン酸は過剰に産生されることが知られている。種々の癌において、ヒアルロン酸は主に間質に異常に蓄積し、癌の進行を促進すると報告されている。我々は、ヒアルロン酸が膵癌で過剰発現しており、予後と相関することを報告した。一方、ヒアルロン酸が膵癌の悪性形質にどのような影響を与えているかについては不明である。今回我々は、膵癌の遊走能におけるヒアルロン酸の機能的役割について異なるモデルを用いて検討した。</p>	
<p>方 法： 膵癌培養細胞株8種類を用いて、ヒアルロン酸阻害剤 (4-methylumbelliferone, 4MU)、およびヒアルロン酸刺激剤 (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA) で治療した。ヒアルロン酸を増加させるもう一つのモデルとして、膵癌と線維芽細胞を共培養した。また、高分子ヒアルロン酸 (400~600kDa) および低分子ヒアルロン酸 (25~75kDa) を膵癌細胞に直接添加した。培養上清中のヒアルロン酸の濃度は、ELISA 法にて測定した。細胞遊走能は、wound healing アッセイと transwell migration アッセイで測定した。また、Real-time RT-PCR を用いてヒアルロン酸合成酵素 (HAS1~HAS3)、ヒアルロン酸分解酵素 (HYAL1~HYAL3) の mRNA レベルでの発現を測定した。</p>	
<p>結 果： 4MU によるヒアルロン酸産生阻害は浸潤性膵管癌細胞の遊走能を有意に低下させた。一方 TPA によるヒアルロン酸産生増加は浸潤性膵管癌細胞の遊走能を有意に増加させた。線維芽細胞との共培養は、培養上清中のヒアルロン酸濃度を上昇させ、膵癌の遊走能を有意に増加させた。4MU によるヒアルロン酸産生阻害と TPA によるヒアルロン酸産生増加は、HAS3 の mRNA 発現の変化と相関していた。さらに、外因性ヒアルロン酸 (特に低分子ヒアルロン酸) は、浸潤性膵管癌細胞の遊走能を有意に増加させた。</p>	
<p>考 察： 本研究では、ヒアルロン酸が膵癌の遊走能に与える影響を異なったモデルを用いて検討した。我々の結果では、(1) 4MU によるヒアルロン酸阻害は膵癌の遊走能を低下させた。(2) TPA によるヒアルロン酸の産生促進は膵癌の遊走能を増加させた。(3) 膵癌と線維芽細胞との共培養は培養上清中のヒアルロン酸濃度を増加させ、膵癌の遊走能を増加させた。(4) 外因性の (特に低分子) ヒアルロン酸は膵癌の遊走能を増加させた。以上の結果より、ヒアルロン酸は膵癌の遊走能を刺激することが示された。本結果は、特に治療面で重要な所見である。4MU は膵癌の遊走能を阻害したことより、本薬剤は膵癌に対する新たな治療薬として期待できる。実際、4MU は海外では肝機能障害や胆道痙攣に対する薬剤としてすでに使用されており、また動物実験では様々な癌の進行を阻止することが報告されている。また、最近では PEGPH20 というヒアルロン酸分解酵素が、癌間質のヒアルロン酸を除去し、膵癌をはじめ種々の癌の抗癌剤治療の効果を高めることが報告された。このように、ヒアルロン酸をターゲットとした治療戦略はますます注目されつつある。</p>	
<p>結 論： ヒアルロン酸は膵癌細胞の遊走能を刺激することが明らかとなった。ヒアルロン酸は膵癌の治療ターゲットとして重要であることが示唆された。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	程 晓博					
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	障害機構 系	病態機構 部門	田中 良哉	
			障害機構 系	災害外科 部門	酒井 昭典	
			系	部門		
			系	部門		

論文題目

Hyaluronan Stimulates Pancreatic Cancer Cell Motility
(ヒアルロン酸は膵癌細胞の遊走能を刺激する)

学位論文審査結果要旨

ヒアルロン酸 (hyaluronan) は間質細胞外マトリックスを構成する重要な因子である。正常組織では、ヒアルロン酸の量は、産生酵素 (hyaluronan synthase, HAS) と分解酵素 (hyaluronidase, HYAL) により調整されている。炎症や創傷治癒、癌等においてヒアルロン酸は過剰に産生されることが知られており、種々の癌の進行を促進するとの報告がある。申請者は、膵癌におけるヒアルロン酸の過剰発現が患者予後と関連することを既に報告しているが、ヒアルロン酸が膵癌の悪性形質に及ぼす影響については未だ不明である。今回、膵癌の遊走能におけるヒアルロン酸の作用について検討を行った。

膵癌培養細胞株 8 種類を使用し、ヒアルロン酸阻害剤 (4-methylumbelliferone, 4MU)、及びヒアルロン酸刺激剤 (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA) にて処理した。細胞遊走能は、wound healing アッセイと transwell migration アッセイで測定した。4MU によるヒアルロン酸産生阻害は浸潤性膵管癌細胞の遊走能を有意に低下させ、TPA によるヒアルロン酸産生増加は遊走能を有意に増加させた。

また、膵癌細胞と間質線維芽細胞との関係を検討するため、膵癌培養細胞と線維芽細胞との共培養を行うと、培養上清中のヒアルロン酸濃度を上昇させ、膵癌の遊走能を有意に増加させた。

次に、高分子ヒアルロン酸 (400~600kDa) および低分子ヒアルロン酸 (25~75kDa) にて膵癌培養細胞の処理を行った。4MU によるヒアルロン酸産生阻害と TPA によるヒアルロン酸産生増加について、Real-time RT-PCR を用いて検討し、HAS3 の mRNA 発現の変化と相関が認められた。外因性ヒアルロン酸 (特に低分子ヒアルロン酸) は、浸潤性膵管癌細胞の遊走能を有意に増加させた。






以上より、ヒアルロン酸は膵癌の遊走能を亢進することが示された。

本研究は、膵癌の浸潤におけるヒアルロン酸の促進的作用を新たに示し、薬剤による癌細胞の浸潤促進や阻害の作用機序の一部を新たに示している。今後のヒアルロン酸を標的とする、新たな治療薬開発の可能性を強く示唆する結果であり、非常に重要と考えられた。以上より、本学学位論文として適格と判断した。

平成 28年 3月 9日

氏 名	永田 泰史
論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと)	
Prognostic Value of LV Deformation Parameters Using 2D and 3D Speckle-Tracking Echocardiography in Asymptomatic Patients With Severe Aortic Stenosis and Preserved LV Ejection Fraction (左室駆出率の保たれた無症候性重症大動脈弁狭窄症患者における2次元および3次元スペックルトラッキング心エコー図法から求めた左室変形指標の予後因子としての意義)	
論文要旨	
<p>【目的】重症大動脈弁狭窄症(SAS)は、先進国において最もありふれた弁膜症であり、平均余命の延長に伴い爆発的に増加している。有症状または左室機能が低下した重症ASは、ガイドライン上大動脈弁置換術(AVR)の適応である。しかし、左室駆出率(LVEF)が保たれた無症候性SASにおいて、早期に手術をすべきか慎重な経過観察をすべきかどうかの結論はでていない。本研究の目的は、心エコーによる2次元(2D)及び3次元スペックルトラッキング法(3DSTE)から求めた左室変形の指標(ストレイン)のうち、どの方向のストレインが予後予測因子として最も有用か調べることである。</p> <p>【方法】2011年1月から2014年2月までに3次元心エコー図検査を施行されたAS患者のうち、無症候性、LVEFが50%以上、大動脈弁口面積指数が$0.6\text{cm}^2/\text{m}^2$未満の患者を対象とした。評価項目は、心血管危険因子、大動脈弁指標、左房左室容積、2DSTE法から求めたストレイン(長軸方向ストレイン(2DGLS)、円周方向ストレイン(2DGCS)、重心方向ストレイン(2DGRS))、3DSTEから求めたストレイン(長軸方向ストレイン(3DGLS)、円周方向ストレイン(3DGCS)、重心方向ストレイン(3DGRS)、3次元ストレイン(G3DS))とした。エンドポイントは、主要心臓イベント(MACE:心臓死、心不全入院、非致死性心筋梗塞、致死性不整脈、AVR)とし、追跡調査を行った。</p> <p>【結果】429例のASのうち選択基準を満たした104例を対象とした。中央値373日の追跡期間中33例がエンドポイントに達した。イベント発生群では、大動脈弁通過血流速度及び平均圧較差、左房容積指数が有意に大きく、2DGLS及び3DGLS、3DGRSがより障害されていた。MACEに対するROC解析では、曲線下面積(AUC)は、7つのストレイン指標のうち、3DGLS(AUC=0.78)が最も大きく、次いで3DGRS(AUC=0.66)、2DGLS(AUC=0.62)の順であった。これら3つのストレインに関して Kaplan-Meier 生存曲線による解析を行ったところ、いずれの指標も予後不良患者の階層化が可能であった。また、高圧較差群(平均圧較差40mmHg以上)、低圧較差群(平均圧較差40mmHg未満)の群で評価した場合、2DGLSと3DGLSは階層化が可能であった。COX比例ハザードモデルによる多変量解析では、7つのストレインのうち3DGLSのみが独立した予後予測因子であった。</p> <p>【考察】LVEFの保たれた無症候性SASの治療方針は、いまだ議論的である。無症候性であってもイベント発生は20~43%/年と報告されており、初回イベントが突然死である場合も1~6%/年に存在する。このようなハイリスク群を判別するために、心臓MRIや血液検査など様々な指標が用いられてきた。最近、出現した2DSTEは左室機能の定量化、予後予測に有用と言われており、2DGLSは無症候性SASの予後の階層化に有用であったと報告されている。しかし、2DSTEには3次元的な動きをする心臓の変化を正確に捉えることは困難であるといった制約が存在する。一方、3DSTEは理論上この制約を克服することが可能である。本研究では2D及び3DSTEを用い、いずれのストレインが最も予後予測に有用であるか比較検討し、結果、2DGLS、3DGLS、3DGRSが予後予測に有用であった。2D、3DともGLSが予後予測に有用である理由として、ASの心筋障害の進行の特性が考えられる。過去のMRIを用いた研究で、ASの心筋障害は心内膜側から始まり、外側へ進展すると報告された。心内膜側の心筋線維は長軸方向に走っており、そのため長軸方向ストレインは病初期の障害の検出に有効であると考えられる。本研究では単変量解析で既知の心エコー指標と2D及び3DGLS、3DGRSが算出されたが、多変量解析では3DGLSのみが独立した優れた予後予測の指標であった。LVEFの保たれた無症候性SASの予後予測因子には、BNPや大動脈弁の石灰化の程度など様々報告されているが、いずれの指標が最も適切か調べられていない。SASを評価する際には、これら既知の予後指標や本研究で示した3DGLSを評価し、複数の項目を満たせば、早期手術が勧められるべきと考えられた。</p> <p>【結論】LVEFの保たれた無症候性SAS患者において、3DGLSはMACEを予測する最も有用な指標のひとつである。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	永田 泰史					
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		
	副査 所属	生体適応 系	生体構造 部門	東 華岳		
	副査 所属	障害機構 系	災害医学 部門	藤本 直浩		
		系	部門			
		系	部門			
論文題目						
Prognostic value of LV deformation parameters using 2D and 3D speckle-tracking echocardiography in asymptomatic patients with severe aortic stenosis and preserved LV ejection fraction (左室駆出率の保たれた無症候性重症大動脈弁狭窄症患者における 2次元及び3次元スペックルトラッキング心エコー図法から求めた左室変形指標の予後因子としての意義)						
学位論文審査結果要旨						
<p>心臓弁膜症のうち大動脈弁狭窄症は、近年増加しており、他の心臓弁膜症と比較して死亡率が高い。大動脈弁機能が重度に障害されているにもかかわらず、臨床症状（狭心痛、失神、息切れなど）が見られない無症候性重症大動脈弁狭窄症患者には心臓突然死などを来すハイリスク群が含まれる。したがって、このハイリスク群を判別する指標を見出したいところである。今回、申請者らは、2次元及び3次元スペックルトラッキング心エコー図法から求めた左室変形指標（ストレイン）が左室駆出率が保たれた無症候性重症大動脈弁狭窄症患者の予後予測に有用であることを見出した。</p> <p>対象者は、産業医科大学病院を含む3施設において2011年1月から2014年2月までの期間に3次元心エコー図検査を施行された大動脈弁狭窄症患者429例のうち、無症候性かつ左室駆出率50%以上かつ大動脈弁口面積指数$0.6\text{cm}^2/\text{m}^2$未満の患者104例とした。評価項目は、心血管危険因子、大動脈弁指標、左房左室容積、2次元及び3次元スペックルトラッキング心エコー図法から求めたストレイン（2次元法：長軸方向、円周方向及び重心方向ストレイン；3次元法：長軸方向、円周方向、重心方向及び3次元ストレイン）とした。追跡調査期間は、60～730日（中央値：373日）、エンドポイントは主要心臓イベント（MACE：心臓死、心不全入院、非致死性心筋梗塞、致死性不整脈、大動脈弁置換術）とした。</p> <p>その結果、MACE33例に対するROC解析の曲線下面積は、7つのストレイン指標のうち3次元法長軸方向ストレインが最も大きく、次いで3次元法重心方向ストレイン、2次元法長軸方向ストレインの順であった。COX比例ハザードモデルによる多変量解析では、7つのストレイン指標のうち3次元法長軸方向ストレインのみが独立した予後予測因子であった。</p> <p>以上より、2次元及び3次元スペックルトラッキング心エコー図法から求めた7つのストレインのうち、単変量解析では2次元法、3次元法ともに長軸方向ストレインが予後予測に有用であること、多変量解析では3次元法長軸方向ストレインが独立した予後予測因子であることを明らかにした。</p> <p>申請者らの研究は、2次元及び3次元スペックルトラッキング心エコー図法を用いた検討により、左室駆出率が保たれた無症候性重症大動脈弁狭窄症患者にとって有用な予後予測因子を見出したものであり、本学の学位論文に適格であると判断した。</p>						
平成28年 2月29日						