

氏 名

寺田 忠徳

論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと)

Antinociceptive effect of intrathecal administration of taurine in rat models of neuropathic pain

(ラット神経障害性疼痛モデルにおけるタウリン髄腔内投与の抗侵害効果)

論文要旨

【背景】神経障害性疼痛は難治性で多くの患者が日常生活や仕事に支障を来し社会的損失を招いている。このため有効性が高く安全な治療薬の開発が待たれている。タウリンは生体のあらゆる組織に存在する非蛋白性アミノ酸で食事より摂取されるほかシステインやメチオニンから生合成される。細胞容積や浸透圧の調節、細胞膜安定化、細胞保護、抗酸化作用などの様々な生理的作用が認められる。中枢神経系には特に豊富に存在しており抑制性神経伝達物質としての役割が知られている。また急性疼痛および炎症性疼痛の動物モデルにおいてタウリンの抗侵害作用が報告されている。一方で神経障害性疼痛に対しては、糖尿病ラットにおいてタウリンを経口摂取させると神経障害性疼痛の関連行動である自傷行為が軽減するという報告はあるがその作用部位や作用機序については明らかにされていない。また脊髄後角は急性疼痛、炎症性疼痛、神経障害性疼痛における侵害受容伝達の重要な調節部位であり、特に抑制性神経伝達物質のグリシンと γ アミノ酪酸(GABA)は脊髄後角での侵害受容伝達の抑制に強く関与している。本研究は神経圧迫と代謝異常による、発生機転が異なる2種類の神経障害性疼痛モデルを作製し、神経障害性疼痛に対するタウリンの脊髄での抗侵害効果について行動薬理的に検討した。治療薬の副作用に関しては協調運動機能に対するタウリンの影響を調べた。

【方法】5週齢の雄 Sprague-Dawley ラット(170-260g)を用いて神経障害性疼痛モデルを作製した。

1. 坐骨神経絞扼モデル(chronic constriction injury : CCI) ; 麻酔下に左側坐骨神経を絹糸で4箇所(1 mm 間隔)緩く結紮した。

2. 糖尿病性ニューロパチーモデル(DM) ; ストレプトゾトシン(STZ) 75 mg/kg を腹腔内投与し1週間後と4-5週後に血糖値が250 mg/dl 以上のラットを糖尿病とした。

薬物を髄腔内投与するため行動実験の7日前に大槽からポリエチレンカテーテルを尾側に8.5 cm 挿入した。タウリン(100, 200, 400, 800 μ g)または生理食塩水(対照)を10 μ l 投与した。機械性アロディニア、機械性痛覚過敏、熱性痛覚過敏、協調運動機能を評価するためデジタル式 von Frey 試験、Paw pressure 試験、Plantar 試験、Rotarod 試験をそれぞれ行った。タウリンの抗侵害効果が発現する機序を調べるため脊髄で侵害受容伝達の調節に関与している受容体のアンタゴニスト(bicuculline 10 μ g : GABA_A 受容体、strychnine 5 μ g : グリシン受容体、yohimbine 30 μ g : α_2 アドレナリン受容体、ondansetron 30 μ g : 5-HT₃ 受容体、naloxone 10 μ g : μ -オピオイド受容体)を髄腔内に前投与し、タウリン(400 μ g)の機械性痛覚過敏に対する抗侵害効果が拮抗されるか Paw pressure 試験により調べた。測定結果は SPSS15.0、GraphPad Prism 5.02 を用いて統計解析した。

【結果】CCI ラットでは機械性アロディニア、機械性痛覚過敏、熱性痛覚過敏が発現した。DM ラットでは機械性アロディニア、機械性痛覚過敏が発現した。どちらのモデルもタウリンの髄腔内投与により用量依存性に機械性アロディニア、機械性痛覚過敏、熱性痛覚過敏を抑制した。作用時間は用量依存性に延長した。一方、CCI ラットでタウリンは用量依存性に協調運動機能を抑制した。タウリンの抗侵害効果は strychnine により完全に拮抗されたが、bicuculline、yohimbine、ondansetron、naloxone はどれも影響を与えなかった。

【考察】ラット神経障害性疼痛モデルでタウリンは脊髄のグリシン受容体を活性化して抗侵害効果を発現することが示唆された。脊髄の GABA 神経系、ノルアドレナリン神経系、セロトニン神経系、オピオイド受容体は抗侵害効果にあまり関与していないと考えられた。タウリンは高用量では運動機能を抑制するが運動機能に影響を与えない低用量でも抗侵害効果が認められた。

【結論】タウリンの髄腔内投与により神経障害性疼痛モデルに発現したアロディニア、痛覚過敏症状が軽減された。本研究により神経障害性疼痛治療薬としてのタウリンの可能性が示唆された。

学位論文審査結果要旨

氏 名	寺田 忠徳					
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	環境・産業生態 系	環境適応医学 部門	上野 晋		
		生体情報 系	病態情報 部門	西澤 茂		
		系		部門		
		系		部門		
論文題目						
Antinociceptive effect of intrathecal administration of taurine in rat models of neuropathic pain (ラット神経障害性疼痛モデルにおけるタウリン髄腔内投与の抗侵害効果)						
学位論文審査結果要旨						
<p>神経障害性疼痛には、難治性である、病態解明が不十分である、現在処方されている薬剤では十分な効果が得られない、という大きな問題点がある。</p> <p>申請者は、神経障害性疼痛に対する新たな治療薬の可能性を見出すことを目的として、1) 神経障害性疼痛モデル動物の作成、2) 新たな治療薬の候補物質（本申請論文では、急性疼痛および炎症性疼痛モデル動物での疼痛抑制効果が報告されている“taurine（タウリン）”に着目している）の髄腔内投与法の確立、および3) その候補物質の疼痛抑制効果（本申請論文では“anti-nociceptive effect（抗侵害効果）”と表現している）を評価した。なお、タウリンは、先行研究において急性疼痛および炎症性疼痛モデル動物での抗侵害効果が報告されている。</p> <p>実験では、雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて、1) 2 種類の神経障害性疼痛モデル（坐骨神経絞扼(chronic constriction injury : CCI) およびストレプトゾトシン誘発糖尿病性 (DM) ニューロパチー）を作成した。2) 麻酔下でそれぞれのモデルラットの髄腔内にポリエチレンカテーテルを留置した。3) カテーテルを介してタウリン（100～800 μg）を髄腔内投与して抗侵害効果を評価した。さらに、侵害受容に関与することが知られている各種受容体（GABA_A 受容体、グリシン受容体、α2 受容体、5-HT₃ 受容体および μオピオイド受容体）アンタゴニストを髄腔内に前投与して、タウリンの抗侵害効果に対する影響を検討した。なお、抗侵害効果は、機械性アロディニア（デジタル式 von Frey 試験）、機械的痛覚過敏（Paw pressure 試験）、熱性痛覚過敏（Plantar 試験）を評価により行い、同時に協調運動機能（Rotarod 試験）も評価した。</p> <p>その結果、CCI ラットで生じた機械性アロディニア、機械的痛覚過敏、熱性痛覚過敏、および DM ニューロパチーラットで生じた機械性アロディニア、機械的痛覚過敏は、タウリンの髄腔内投与により容量依存的に抑制され、作用時間も容量依存的に延長した。タウリンの抗侵害効果は、本実験で用いた受容体アンタゴニストのうちグリシン受容体アンタゴニストのみで有意に拮抗された。なお、タウリンの高容量投与で協調運動機能が抑制された。</p> <p>以上より、CCI ラットの髄腔内に投与したタウリンは、脊髄のグリシン受容体を介して抗侵害効果を発揮することが示唆された。</p> <p>申請者が確立した神経障害性疼痛モデルラットおよび薬物の髄腔内投与による抗侵害効果の評価方法は、本論文が掲載された 2011 年以降も、申請者を含む研究グループによりヒポタウリン、GABA およびグリシントランスポーター阻害薬、ルテオニン等の薬物の評価に用いられて多に貢献している。したがって、本論文は本学博士論文として相応しくかつ適格であると判断した。</p>						
						平成 28 年 1 月 25 日

氏名

松本 美香

論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと)

Impacts of icodextrin on integrin-mediated wound healing of peritoneal mesothelial cells
(腹膜中皮細胞におけるインテグリンを介した創傷治癒に対するイコデキストリンの影響)**論文要旨**

背景・目的: 透析療法には血液透析と腹膜透析がある。腹膜透析の欠点として、長期間の継続が困難であることが挙げられる。その原因として腹膜透析中の含有成分により腹膜組織の変性が生じることが考えられている。腹膜透析液は除水のための浸透圧物質として高濃度のブドウ糖を含んでいるが、ブドウ糖は腹膜組織において中皮細胞の変性や中皮下層の慢性炎症や線維化を引き起こす。そのため、近年、ブドウ糖に代わる浸透圧物質として D-グルコピラノースポリマー混合物のイコデキストリン含有透析液が開発された。この透析液の特徴として、水分管理が従来の腹膜透析液よりも優れていることが挙げられる。さらに、イコデキストリン透析液はブドウ糖を含まないので、腹膜劣化を減少させる可能性もある。腹膜の表面を覆う単層構造の中皮細胞は、腹膜透析の施行に伴い脱落と再生が持続的に生じている。この創傷治癒過程において重要な役割を果たす細胞接着受容体がインテグリンであるが、腹膜透析液成分がインテグリンを介した創傷治癒にどのような影響を与えるのかは明らかにされていない。今回、イコデキストリンとブドウ糖がインテグリンを介した腹膜中皮細胞の創傷治癒過程に与える影響について比較検討を行った。






方法: 初代培養のラット腹膜中皮細胞 (RPMC) を使用し、細胞を 10 μ g/ml の fibronectin でコーティングした Petri dish に播種した。細胞が confluent になったところで dish 中央部の細胞を剥ぎ取り創部を作成した。そこにブドウ糖またはイコデキストリンを添加して 24 時間培養し、傷部の辺縁から創部に向けて遊走した細胞数を定量した (*in vitro* 創傷治癒アッセイ)。また、細胞接着斑の形成を免疫蛍光法で評価した。インテグリンによる細胞内シグナル伝達に中心的な働きをする focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を Western blot 法で検討した。

結果: まず、ブドウ糖透析液とイコデキストリン透析液が創傷治癒に与える影響を検討した。ブドウ糖透析液の存在下では、腹膜中皮細胞の創傷治癒と細胞遊走が濃度依存性に抑制されたが、イコデキストリン透析液はわずかにしか抑制作用がなかった。ブドウ糖透析液には高濃度のブドウ糖以外にも様々な内容物が含有されているため、これらによる影響を除外するためさらに実験を行った。ブドウ糖透析液あるいはブドウ糖のみを培養液に添加した状態で、中皮細胞の遊走に与える影響を検討したところ、ブドウ糖単独でも細胞遊走は抑制されたが、ブドウ糖透析液では細胞遊走がさらに抑制された。そのため、ブドウ糖とイコデキストリンそのものの効果を評価する必要が生じたため、以後は培養液中にブドウ糖とイコデキストリンの粉末を溶解し実験を行うこととした。ブドウ糖は中皮細胞の創傷治癒を抑制したが、イコデキストリンは全く影響を与えなかった。ブドウ糖により細胞伸展が抑制され、これは FAK を含む細胞接着斑の形成抑制を伴っていた。一方で、イコデキストリンは細胞伸展や細胞接着斑形成への阻害作用は認めなかった。FAK のチロシンリン酸化に対してもブドウ糖は阻害作用を認めたが、イコデキストリンは影響を与えなかった。

考察: ブドウ糖は腹膜中皮細胞のインテグリンを介した創傷治癒、細胞伸展、接着斑形成を抑制したが、イコデキストリンはこれらに影響がないことが明らかとなった。以上の結果から、イコデキストリン透析液は従来のブドウ糖透析液よりも生体適合性に優れ、腹膜に対して保護的に作用する可能性があることが示唆された。イコデキストリンの使用により腹膜透析患者の腹膜劣化が予防できれば、長期にわたって安全に腹膜透析を継続できるようになる可能性があると思われる。

結論: イコデキストリンはブドウ糖とは異なり腹膜中皮細胞の再生に悪影響を与えず、腹膜組織への生体適合性が良好である可能性が考えられた。

学位論文審査結果要旨

氏 名	松本 美香				
論文審査委員	主査 所属	生体適応系	生体機構部門	岩井 佳子	
	副査 所属	障害機構系	災害医学部門	原田 大	
	副査 所属	生体情報系	病態情報部門	近藤 寛之	
		系	部門		
		系	部門		

論文題目

Impacts of icodextrin on integrin-mediated wound healing of peritoneal mesothelial cells.
 腹膜中皮細胞におけるインテグリンを介した創傷治癒に対するイコデキストリンの影響

学位論文審査結果要旨

<目的> 腹膜透析液は浸透圧物質として高濃度のブドウ糖液を含むが、ブドウ糖は腹膜中皮細胞の変性や中皮下層の慢性炎症、線維化を引き起こすことが知られている。腹膜中皮細胞は透析中に脱落と再生を持続的に繰り返すが、この創傷治癒過程において細胞接着分子のインテグリンが重要な役割を果たしている。近年、ブドウ糖に代わる浸透圧物質として D-グルコピラノースポリマー混合物のイコデキストリンを含む透析液が開発されたが、イコデキストリンの創傷治癒に対する影響については知られていない。そこで本研究では、初代培養ラット腹膜中皮細胞 (Rat peritoneal mesothelial cells: RPMC) を用いて、イコデキストリンがインテグリンを介した創傷治癒過程に与える影響について解析を行った。

<方法> (1) RPMC を単層培養し、創傷 (ギャップ) を作製して、イコデキストリン、ブドウ糖の存在下および非存在下で遊走細胞数を測定した (創傷治癒アッセイ)。 (2) イコデキストリン、ブドウ糖の存在下および非存在下で RPMC を単層培養し、抗 FAK 抗体を用いた免疫組織染色により細胞接着斑形成を評価した。 (3) (2) と同様の実験を行い、FAK のリン酸化を Western blot により解析した。

<結果> (1) ブドウ糖は RPMC の細胞遊走を抑制したが、イコデキストリンは抑制しなかった。 (2) ブドウ糖は細胞接着斑の形成を抑制したが、イコデキストリンは抑制しなかった。 (3) ブドウ糖は FAK のリン酸化を抑制したが、イコデキストリンは抑制しなかった。

<考察> 以上の結果から、ブドウ糖はインテグリン下流の FAK リン酸を抑制して腹膜中皮細胞の創傷治癒および接着斑形成を抑制するのに対して、イコデキストリンではこれらの抑制効果がみられず、インテグリンを介した創傷治癒に対する影響が少ないことが示唆された。

本研究はこれまで知られていなかった腹膜透析浸透圧物質であるブドウ糖とイコデキストリンの腹膜中皮細胞の創傷治癒に対する作用の違いを明らかにしたもので、本学の学位論文として適格であると判断した。

論文要旨

氏名

矢原 勝哉

論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと)

Definitive radiotherapy plus regional hyperthermia for high-risk and very high-risk prostate carcinoma: Thermal parameters correlated with biochemical relapse-free survival.

(高リスクおよび超高リスク前立腺癌に対する領域加温による温熱療法を併用した根治的放射線治療: 温度因子は生化学的非再発率と相関する)

論文要旨

<目的>

高リスクおよび超高リスク前立腺癌の標準的治療として、内分泌療法と根治的放射線治療の併用療法が選択されることが多いが、約30-50%に生化学的再発を生じ救済的な治療が必要となる。放射線治療の抗腫瘍効果の改善を目的に、放射線治療と温熱療法の併用治療(温熱放射線療法)が試みられている。前立腺癌に対する温熱放射線療法の第1相および第2相前向き臨床試験では、重篤な合併症なく有望な治療成績が得られている。また、基礎研究および臨床例の治療効果解析において良好な温度因子と抗腫瘍効果の相関が示されている。しかし、前立腺癌における温熱放射線療法の温度因子と生化学的再発の関連性を検討した報告は乏しい。本研究の目的は、高リスクおよび超高リスク前立腺癌に対する温熱放射線療法の治療効果を評価し、より高い温度因子による温熱療法が生化学的再発へもたらす影響を検討することである。

<方法>

2004年6月から2009年10月の間に、我々の施設で根治的放射線治療を施行し、予定された放射線照射量を完遂した高リスクまたは超高リスク前立腺癌患者の総146例を対象とし遡及的検討を行った。我々は、放射線治療効果の増感を目的に原則として温熱療法を併用しているが、146例中82例は温熱放射線療法が施行され、残りの64例は放射線治療単独で治療されていた。温熱療法が行われなかった主な理由は、肥満(20例)、高齢(12例)、患者の拒否(8例)、心疾患(6例)、その他(18例)であった。放射線治療は全例3次元照射で行い、142例(97%)において総線量は70Gy/35分割であった。温熱療法は8MHz誘電型加温装置を用いた深部領域加温法により総5回(中央値)、放射線照射直後に施行した。腫瘍内温度を推測するため82例中75例(92%)で直腸腔内温度を測定した。内分泌療法は全146例において放射線治療の施行前に9ヶ月間(中央値)、放射線治療の施行後には総20例で5ヶ月間(中央値)併用された。生化学的再発率に影響を及ぼす予後因子を同定するために、温度因子(CEM43°C T90, T90, T50)、患者の臨床的特徴や内分泌療法の期間に関して、単変量および多変量解析を行った。また、温度因子を左右する因子として患者の臨床的特徴、骨盤領域の皮下脂肪厚や体厚に関して統計学的に相関を解析した。

<結果と考察>





経過観察期間の中央値は61ヶ月であった。5年生化学的再発率は、温熱放射線療法群82例で78%、放射線療法単独群64例で72%であり、両群に有意差を認めなかった。直腸腔内温度を測定した75例の単変量解析では、より高い温度因子で加温された症例において生化学的再発率の有意な改善を認めた。同症例の多変量解析では、温度因子のCEM43°C T90高値群とT因子のT1-2が、良好な生化学的再発率の有意因子であった。CEM43°C T90高値群40例の生化学的再発率は、放射線治療単独群64例と比較し有意に良好であった。一方、CEM43°C T90低値群35例と放射線治療単独群64例の生化学的再発率に有意差を認めなかった。CEM43°C T90は、骨盤領域の腹側皮下脂肪厚と有意な負の相関を認めた。

本研究において、高リスクおよび超高リスク前立腺癌においても過去の温熱放射線療法の治療成績の解析結果と同様に、より高い温度因子による温熱療法の施行が良好な臨床転帰に関連することが確認された。低い温度因子での温熱放射線療法は、放射線治療単独例と生化学的再発率に差を認めず併用のメリットが乏しい可能性が示唆された。今後、第3相無作為比較臨床試験を施行する際には、患者選択要件として骨盤領域の皮下脂肪厚が薄いこと、あるいはテスト加温でCEM43°C T90の高値が得られることを考慮すべきと思われた。

<結論>

高リスクおよび超高リスク前立腺癌に対する根治的放射線治療において、より高い温度因子による温熱療法を併用することで、生化学的再発率が改善する可能性がある。より高い温度因子で加温可能な患者選択の重要性が示唆された。

学位論文審査結果要旨

氏 名	矢原 勝哉					
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	生体適応 系	生体機構部門	中山 敏幸	
	副査	所属	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

Definitive radiotherapy plus regional hyperthermia for high-risk and very high-risk prostate carcinoma: Thermal parameters correlated with biochemical relapse-free survival (高リスクおよび超高リスク前立腺癌に対する領域加温による温熱療法を併用した根治的放射線治療: 温度因子は生化学的非再発率と相関する)

学位論文審査結果要旨

高リスクおよび超高リスク前立腺癌の標準的治療として、内分泌療法と根治的放射線治療の併用療法が選択されることが多いが、約 30-50%に生化学的再発を生じ救済的な治療が必要となる場合がある。そこで放射線治療の抗腫瘍効果の改善を目的に、放射線治療と温熱療法の併用治療(温熱放射線療法)が試みられており、前立腺癌に対する温熱放射線療法の第 1 相および第 2 相前向き臨床試験では、重篤な合併症なく有望な治療成績が得られている。また、基礎研究および臨床例の治療効果解析において良好な温度因子と抗腫瘍効果の相関が示されている。しかし、前立腺癌における温熱放射線療法の温度因子と生化学的再発の関連性を検討した報告は乏しい。本研究の目的は、高リスクおよび超高リスク前立腺癌に対する温熱放射線療法の治療効果を評価し、より高い温度因子による温熱療法が生化学的再発へもたらす影響を検討することである。

方法は、2004 年 6 月から 2009 年 10 月の間に、我々の施設で根治的放射線治療を施行し、予定された放射線照射線量を完遂した高リスクまたは超高リスク前立腺癌患者の総 146 例を対象とし検討を行った。146 例中 82 例は温熱放射線療法が施行され、残りの 64 例は放射線治療単独で治療されていた。温熱療法が行われなかった主な理由は、肥満(20 例)、高齢(12 例)、患者の拒否(8 例)、心疾患(6 例)、その他(18 例)であった。放射線治療は全例 3 次元照射で行い、142 例(97%)において総線量は 70Gy/35 分割であった。温熱療法は 8MHz 誘電型加温装置を用いた深部領域加温法により総 5 回(中央値)、放射線照射直後に施行した。腫瘍内温度を推測するため 82 例中 75 例(92%)で直腸腔内温度を測定した。内分泌療法は全 146 例において放射線治療の施行前に 9 ヶ月間(中央値)、放射線治療の施行後には総 20 例で 5 ヶ月間(中央値)併用された。生化学的再発率に影響を及ぼす予後因子を同定するために、温度因子(CEM43°C T90, T90, T50)、患者の臨床的特徴や内分泌療法の期間に関して、単変量および多変量解析を行った。また、温度因子に関連して患者の臨床的特徴、骨盤領域の皮下脂肪厚や体厚に関して統計学的に相関を解析した。

結果としては、対象症例の経過観察期間の中央値は 61 ヶ月であった。5 年生化学的再発率は、温熱放射線療法群 82 例で 78%、放射線療法単独群 64 例で 72%であり、両群に有意差を認めなかった。直腸腔内温度を測定した 75 例の単変量解析では、より高い温度因子で加温された症例において生化学的再発率の有意な改善を認めた。同症例の多変量解析では、温度因子の CEM43°C T90 高値群と T 因子の T1-2 が、良好な生化学的再発率の有意因子であった。CEM43°C T90 高値群 40 例の生化学的再発率は、放射線治療単独群 64 例と比較し有意に良好であった。一方、CEM43°C T90 低値群 35 例と放射線治療単独群 64 例の生化学的再発率に有意差を認めなかった。CEM43°C T90 は、骨盤領域の腹側皮下脂肪厚と有意な負の相関を認めた。

本研究において、高リスクおよび超高リスク前立腺癌においても過去の温熱放射線療法の治療成績の解析結果と同様に、より高い温度因子による温熱療法の施行が良好な臨床転帰に関連することが確認された。低い温度因子での温熱放射線療法は、放射線治療単独例と生化学的再発率に差を認めず併用のメリットが乏しい可能性が示唆された。今後、第 3 相無作為比較臨床試験を施行する際には、患者選択要件として骨盤領域の皮下脂肪厚が薄いこと、あるいはテスト加温で CEM43°C T90 の高値が得られることを考慮すべきと思われた。

本研究は、高リスクおよび超高リスク前立腺癌に対する根治的放射線治療において、より高い温度因子による温熱療法を併用することで、生化学的再発率が改善する可能性を示した。またより高い温度因子で加温可能な患者選択の重要性を示唆している。これらの結果は前立腺癌温熱放射線療法の治療において新しい有用な知見を与えるものであり、本学の学位論文として適格であると判断した。