

# 高知大学学位授与記録

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
甲総医博第139号	青山 直樹	A Novel Rat Model to Study Postsurgical Pain After Joint Replacement Surgery (関節置換手術後の術後痛を研究するための新しいラットモデル)	1
甲総医博第140号	古月 拓己	Additional benefit of ultrasonography to evaluate nerve root condition of degenerative cervical spine disease (超音波診断を用いた頸椎変性疾患における神経根評価の有用性についての検討)	6
甲総医博第141号	LAI SYLVIA CHIN SEE	NF90-NF45 is essential for $\beta$ cell compensation under obesity-inducing metabolic stress through suppression of p53 signaling pathway (NF90-NF45がp53経路の抑制を介し、肥満誘発性代謝ストレスによる膵 $\beta$ 細胞の代償性肥大を促進する)	11
甲総医博第142号	ZOU SUO	Protective effects of hydrogen sulfide pretreatment on cyclophosphamide-induced bladder dysfunction in rats via suppression of bladder afferent nerves (硫化水素は膀胱求心性神経の抑制を介してシクロホスファミド誘発性膀胱機能障害を予防する)	17
甲総医博第143号	西森 大洋	Development of a novel cell line-derived xenograft model of primary herpesvirus 8-unrelated effusion large B-cell lymphoma and antitumor activity of birabresib <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (ヒトヘルペスウイルス8型陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫の新規細胞株に由来する異種移植モデルの樹立とビラブレシブの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> における抗腫瘍活性)	22

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第144号	川田 敬	Yokukansan suppresses neuroinflammation in the hippocampus of mice and decreases the duration of lipopolysaccharide and diazepam-mediated loss of righting reflex induced by pentobarbital  (抑肝散はマウスの海馬の神経炎を抑制し、リポ多糖およびジアゼパムにより延長されたペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を短縮する)	27
甲総医博第145号	杉浦 健太	Very long-term prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy : a longitudinal study with a period of 20 years  (肥大型心筋症患者の超長期予後についての20年間の縦断的研究)	32
甲総医博第146号	横田 啓一郎	Anti-Glypican-1 Antibody-drug Conjugate as Potential Therapy Against Tumor Cells and Tumor Vasculature For Glypican-1-Positive Cholangiocarcinoma  (Glypican-1を標的とした抗体薬物複合体(ADC: Antibody-drug conjugate)による胆管癌の新規治療開発)	37
甲総医博第147号	盛實 篤史	<i>Staphylococcus aureus</i> nasal colonization increases the risk of cedar pollinosis  (黄色ブドウ球菌の鼻腔内定着がスギ花粉症のリスクとなる)	42
乙総医博第66号	久野 貴平	5-Aminolevulinic acid has the potential to prevent bladder dysfunction in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis  (5-アミノレブリン酸はシクロホスファミド誘発性出血性膀胱炎による膀胱機能障害を予防する可能性を有する)	47
乙総医博第67号	明間 陵	Perceptual and objective physical quality of chest images: a comparison between digital radiographic chest images processed for cancer screening and pneumoconiosis screening in Japan  (本邦における検診用胸部デジタルX線画像に係るじん肺検診用画像と肺癌検診用画像の物理的及び視覚的な画質の比較検討)	52



氏名(本籍)	青山 直樹 (徳島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第139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	令和5年2月10日
学位論文題目	A Novel Rat Model to Study Postsurgical Pain After Joint Replacement Surgery  (関節置換手術後の術後痛を研究するための新しいラットモデル)
発表誌名	Journal of Pain Research 2022:15 2911-2918 2022年9月
	<b>審査委員</b>
	主査 教授 河野 崇
	副査 教授 小林 道也
	副査 教授 渡橋 和政

**論文の内容の要旨**

**論文審査の結果の要旨**

# 学位論文要旨




論文題目	氏名 青山 直樹  A Novel Rat Model to Study Postsurgical Pain After Joint Replacement Surgery (関節置換手術後の術後痛を研究するための新しいラットモデル)
(論文要旨)  <p>【背景】: 関節置換術は進行した関節疾患をもつ患者に広く行われている手術であり、本邦では高齢化社会によって手術件数は今後も増大すると予測されている。関節置換術後に問題となるものの一つに慢性化する術後痛がある。最近の報告では、術後急性期の痛みの治療が不十分な場合、術後痛が遷延化することが明らかになっている。術後痛に対して、より効果的な治療戦略を確立するためには、術後急性期のメカニズムを明らかにすることが必須である。しかし、術後痛のメカニズムは複雑で、術後痛を評価した動物モデルはほとんどない。我々は関節置換術後痛のメカニズムの解明を目的に、ラット股関節を用いて関節置換モデルを作製し、術後痛の回復過程を評価した。</p> <p>【方法】: 17-19 週の雄の SD ラットの左股関節を用いて関節包のみ切開した sham モデル・大腿骨頭を除去した関節破壊(JD)モデル・大腿骨を基に作製したインプラントを置換した関節置換(JR)モデルを各群 5 匹ずつ作製した。術後観察期間は 42 日間とし、dynamic weight-bearing 装置を用いた後肢の荷重比・単純 X 線でのインプラントの脱転・股関節脱臼を各週評価した。また、術後左 L3,L4 後根神経節(DRG)を用いて CGRP 陽性細胞の発現率を評価した。免疫組織学的評価は術後 28 日・42 日目で左第 3,第 4 腰椎腰髄の後根神経節(DRG)を用いて CGRP 陽性細胞の発現率を評価した。</p> <p>【結果】: JR 群の後肢の荷重比は、術後 14 日目から徐々に回復し、術後 42 日目では sham 群と同じレベルにまで回復した。JD 群と比較すると術後 7 日目から有意に荷重比は高値であった。単純 X 線写真では、術後 21 日目までインプラントの求心性移動所見を認め、術後 28 日目以降では、白蓋の骨リモデリングを認めた。JR 群の CGRP 陽性細胞の発現率は、JD 群と比べて有意に低値であった。</p> <p>【考察】: 関節置換術後の慢性化した術後痛のメカニズムは複雑でまだ明らかになっていない。過去の臨床研究では、慢性化した術後痛のリスク因子は術前の痛みの強度・痛みの感作・急性期の術後痛に対する疼痛ケアなどが報告されているが、基本的なメカニズムについては言及されていない。そのため、術後痛の評価に対して関節置換を模倣した動物モデルの作製が不可欠である。</p> <p>今回の結果からは、我々のモデルは臨床で遭遇する術後痛み行動の回復過程を示していると考えられる。痛み行動評価では、術後 14 日目以降で徐々に回復し、X 線学評価では、術後 21 日目まではインプラントの求心性移動を認めていた。白蓋とインプラントとの関節適合性が不十分であるため、インプラントの摩耗と炎症性反応で荷重比が低下したと考える。術後 28 日目からは白蓋の骨リモデリングを認め、股関節安定化・炎症の鎮静化の結果、荷重比が回復したと考える。CGRP 陽性細胞の発現率については JR 群と sham 群の陽性率は同等であり、JD 群と比べて有意に低値であった。我々のモデルはシンプルで再現性が高く、術後痛み行動の経過が臨床と類似していた。今後は、術後合併所に</p>	

対する研究への応用が期待できる。しかし、臼蓋とインプラントの関節適合性が不十分・観察期間が短い・インプラントサイズのバリエーションが不十分であり、改良が必要である。

**【結論】**:我々が作製した関節置換モデルは術後 42 日で術前レベルにまで回復した。我々のモデルは、関節置換術後痛のメカニズムの解明に貢献できると考える。



## 論文審査の結果の要旨

	氏名	青山 直樹
審査委員	主査氏名 河野 崇	
	副査氏名 小林 道也	
	副査氏名 渡橋 和政	

題目 A Novel Rat Model to Study Postsurgical Pain After Joint Replacement Surgery  
(関節置換手術後の術後痛を研究するための新しいラットモデル)

著者 Naoki Aoyama, Masashi Izumi, Toru Morimoto, Hiroyuki Wada, Junpei Dan,  
Yusuke Kasai, Yoshinori Satake, Koji Aso, Masahiko Ikeuchi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Journal of Pain Research 2022:15 2911-2918 2022年9月

### 要 旨

【背景】関節置換術は進行した変形性関節症の治療として広く行われている。特に、本邦では高齢化社会によってその手術件数は今後も確実に増大する。関節置換術の課題として強い術後痛があり、術後のQOL低下の原因となっている。最近の報告では、術後急性期の不十分な疼痛管理と術後痛遷延痛が関連することも明らかとなっている。しかし、関節置換術後痛の機序は複雑と考えられ、動物モデルも存在しないためその機序解明の研究も進んでいないのが実情である。そこで本研究課題では、疼痛評価が可能な新規のラット股関節置換術モデルを作製することを目的とした。

【方法】17-19週齢雄性SD系ラットを用いた。グループ分けは、左股関節包のみ切開したshamモデル、大腿骨頭を除去した関節破壊(JD)モデル、試行錯誤の上自作したインプラントを置換した関節置換(JR)モデルの3群とし、それぞれn=5とした。術後観察期間は42日間とし、関節置換術モデルは週に一度単純X線写真でインプラントの脱臼や股関節脱臼・骨折や感染所見などの有無を評価した。術後痛はdynamic weight-bearing装置を用いた後肢の荷重比を用いた。さらに、術後28日および42日目でラットを安楽死させ、左第3,第4腰椎の後根神経節(DRG)のCGRP陽性細胞の発現率を評価した。

【結果・考察】単純X線写真では、術後21日目までインプラントの求心性移動所見を認めていた。術後28日目以降では、臼蓋内板の骨形成を認めており、関節置換術を行ったすべてのラットで同様の経過をたどり、関節を温存できたラットの作製に成功した。JRモデルの後肢荷重比は、術後14日目から徐々に回復し、術後42日目ではshamモデルと同じレベルにまで回復した。回復が遅延した原因としては、臼蓋とインプラントとの関節適合性が不十分であるため、インプラントの摩耗と炎症性反応で荷重比が低下したと考えられた。術後28日目からは臼蓋の形成を認め、股関節安定化・疼痛の軽減・炎症の鎮静化の結果、荷重比が回復したと推測される。実際、JDモデルと比較すると術後7日目から有意に荷重比は高値であった。免疫組織学的評価では、JRモデルのCGRP陽性細胞の発現率は、術後28日目および42日目ともにJDモデルと比べて有意に低値であり、shamモデルと同程度であった。本モデルは、簡易で再現性が高く、術後痛み行動の経過が臨床と類似しており、術後遷延痛に対する基礎研究への応用が期待できる。一方、臼蓋とインプラントの関節適合性が不十分、観察期間が短い、インプラントサイズのバリエーションが不十分であるなど、さらなる改良も必要と考えられた。

【結論】術後痛の評価可能かつ再現性の高いラット関節置換モデルの作成に成功した。本モデルを応用することにより、関節置換術後痛の機序解明が進むことが期待される。

以上のように、本論文は高齢化に伴い今後も増加することが見込まれている関節置換術に対して、臨床への外挿性の高い関節置換術後痛モデル動物を作製した最初の報告であり、医学的に高い価値を有するものである。

よって、審査委員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	古月 拓己 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第140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	令和5年3月3日
学位論文題目	Additional benefit of ultrasonography to evaluate nerve root condition of degenerative cervical spine disease  (超音波診断を用いた頸椎変性疾患における神経根評価の有用性についての検討)
発表誌名	Spinal Cord press
	<b>審査委員</b>
	主査 教授 山上 卓士
	副査 教授 上羽 哲也
	副査 教授 松下 拓也

## 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	古月 拓己
論 文 題 目	Additional benefit of ultrasonography to evaluate nerve root condition of degenerative cervical spine disease (超音波診断を用いた頸椎変性疾患における神経根評価の有用性についての検討)	
(論文要旨)		
<p><b>【背景】</b>          頸椎変性疾患は筋萎縮症,神経根症,脊髄症など多彩な神経学的症状を呈し,それらの鑑別は神経所見やMRIなどの画像所見に基づいて行われるが,無症候性病変の存在により画像診断は時に困難である。近年,超音波診断(US)を用いた,神経根の評価が試みられており,同検査による頸椎症性神経根症々例における罹患神経根の腫脹の報告がされている。しかし,頸椎症性脊髄症,筋萎縮症などの他の頸椎変性疾患におけるUSの報告はなく,また同検査とMRI,電気生理学的検査との関連についても明らかにされていない。これらを検討し明らかにすることが本研究の目的である。</p> <p><b>【対象と方法】</b>          2019~2021年に当院で治療を行った頸椎症性筋萎縮症(CSA)13例,頸椎症性神経根症(CR)26例,頸椎症性脊髄症(CSM)12例,頸椎疾患の既往のない健常者29名を対象に,神経学的評価を行ったのちにUSを用いてC5,6神経根の断面積を計測し,患健側,疾患ごとの比較を行った。          また,神経伝導検査を行い三角筋,上腕二頭筋の複合筋活動電位(CMAP)を計測し,更にCSA,CR,CSM群に対して頸椎MRI検査を行いC4/5,5/6椎間孔の前後径を計測し,それらの得られた値とUS断面積との関連を検討した。</p> <p><b>【結果】</b>          USにおいてCR群の罹患側のC6神経根断面積(<math>0.12 \pm 0.033 \text{mm}^2</math>)は,健側(<math>0.090 \pm 0.020 \text{mm}^2</math>)や他群の罹患側(CSA群:<math>0.073 \pm 0.02 \text{mm}^2</math>,CSM群:<math>0.080 \pm 0.02 \text{mm}^2</math>,健常群:<math>0.072 \pm 0.02 \text{mm}^2</math>)との比較において,有意に大きかった(<math>p &lt; 0.001</math>)。CSA群の患側C5根の断面積は,大きい群,小さい群の二峰性の分布を認めた。CSM群は健常者と比較して神経根の断面積に有意差を認めなかった。          神経根断面積と三角筋,上腕二頭筋の複合活動電位(CMAP)振幅に有意な相関は認めなかった。また,同断面積とMRIにおける椎間孔前後径に有意差な相関関係を認めなかった。</p> <p><b>【考察】</b>          今回の結果ではCR群において罹患神経根の断面積が大きかったが,過去の動物実験の報告では神経根の圧迫により神経血液関門の破綻が生じ血管透過性の亢進することによってマクロファージ, mast cellが集まるという機序が報告されており,これによって腫脹が生じたと考えられた。          またCSA群は患側のC5神経根の形態に有意差をみとめなかったものの健常値とされる値を上回る症例の占める割合が他群より多かった。CSAの責任病巣には脊髄説,神経根説があり,これらの群についてはCR群のように神経根病変を示している可能性がある。さらにCSA群の患側C6根では健常者の最小値を下回る症例がいた。変性により神経根萎縮していたとの過去の報告があることや本検討のCSA群はCMAP振幅の著大な低下をしていることから,この所見は高度な軸索変性を示している可能性が考えられる。          CSM群についてはUS所見に有意差は認めなかった。本検討でのCSM症例は索路障害が中心であり,同障害では神経根の腫脹は起きないことが考えられた。          さらに今回,超音波と,MRI所見,電気生理学的所見に相関関係を認めなかった。MRI上の圧迫所見は無症状例にもみられ,また神経学的評価は困難な症例があり,USは診断の一助になり得ると考えられた。また,CMAP振幅は機能する軸索数を反映し,US所見は神経根の形態を反映しており,これらの検査を併</p>		




用した多面的な評価が病態の把握に役立つ可能性が考えられた。

**【結語】**

超音波診断を用いた頸椎変性疾患における神経根評価の有用性についての検討を行った。電気生理学的検査、画像検査に加え神経根の超音波検査を活用することで神経根の病変の評価をするのに役立つと考えられた。



## 論文審査の結果の要旨

	氏 名		古月 拓己
審 査 委 員	主 査 氏 名	山上 卓士	
	副 査 氏 名	上羽 哲也	
	副 査 氏 名	松下 拓也	

題 目 Additional benefit of ultrasonography to evaluate nerve root condition of degenerative cervical spine disease

( 超音波診断を用いた頸椎変性疾患における神経根評価の有用性についての検討 )

著 者 Hiroki Kozuki, Nobuaki Tadokoro, Naoki Aoyama, Katsuhito Kiyasu, Ryuichi Takemasa and Masahiko Ikeuchi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Spinal Cord、In press

### 要 旨

#### 【背景・目的】

頸椎変性疾患は筋萎縮症、神経根症、脊髄症など多彩な神経学的症状を呈し、それらの鑑別は神経所見やMRIなどの画像所見に基づいて行われるが、無症候性病変の存在により画像診断は時に困難である。

近年、超音波診断(US)を用いた、神経根の評価が試みられており、同検査による頸椎症性神経根症々例における罹患神経根の腫脹の報告がされている。しかし、頸椎症性脊髄症、筋萎縮症などの他の頸椎変性疾患におけるUSの報告はなく、また同検査とMRI、電気生理学的検査との関連についても明らかにされていない。これらを検討し明らかにすることが本研究の目的である。

#### 【対象と方法】

2019~2021年に当院で治療を行った頸椎症性筋萎縮症(CSA)13例、頸椎症性神経根症(CR)26例、頸椎症性脊髄症(CSM)12例、頸椎疾患の既往のない健常者29名を対象に、神経学的評価を行ったのちにUSを用いてC5,6神経根の断面積を計測し、患健側、疾患ごとの比較を行った。

また、神経伝導検査を行い三角筋、上腕二頭筋の複合筋活動電位(CMAP)を計測し、更にCSA, CR, CSM群に対して頸椎MRI検査を行いC4/5, 5/6椎間孔の前後径を計測し、それらの得られた値とUS断面積との関連を検討した。

#### 【結果】

USにおいてCR群の罹患側のC6神経根断面積( $0.12 \pm 0.033 \text{mm}^2$ )は、健側( $0.090 \pm 0.020 \text{mm}^2$ )や他群の罹患側(CSA群: $0.073 \pm 0.02 \text{mm}^2$ , CSM群: $0.080 \pm 0.02 \text{mm}^2$ , 健常群: $0.072 \pm 0.02 \text{mm}^2$ )との比

較において、有意に大きかった( $p < 0.001$ )。CSA 群の患側 C5 根の断面積は、大きい群、小さい群の二峰性の分布を認めた。CSM 群は健常者と比較して神経根の断面積に有意差を認めなかった。神経根断面積と三角筋、上腕二頭筋の複合活動電位(CMAP)振幅に有意な相関は認めなかった。また、同断面積と MRI における椎間孔前後径に有意な相関関係を認めなかった。

#### 【考察】

今回の結果では CR 群において罹患神経根の断面積が大きかったが、過去の動物実験の報告では神経根の圧迫により神経血液関門の破綻が生じ血管透過性の亢進することによってマクロファージ、mast cell が集まるという機序が報告されており、これによって腫脹が生じたと考えられた。

また CSA 群は患側の C5 神経根の形態に有意差をみとめなかったものの健常値とされる値を上回る症例の占める割合が他群より多かった。CSA の責任病巣には脊髓説、神経根説があり、これらの群については CR 群のように神経根病変を示している可能性がある。さらに CSA 群の患側 C6 根では健常者の最小値を下回る症例がいた。変性により神経根萎縮していたとの過去の報告があることや本検討の CSA 群は CMAP 振幅の著名な低下をしていることから、この所見は高度な軸索変性を示している可能性が考えられる。

CSM 群については US 所見に有意差は認めなかった。本検討での CSM 症例は索路障害が中心であり、同障害では神経根の腫脹は起きないことが考えられた。

さらに今回、超音波と、MRI 所見、電気生理学的所見に相関関係を認めなかった。MRI 上の圧迫所見は無症状例にもみられ、また神経学的評価は困難な症例があり、US は診断の一助になり得ると考えられた。また、CMAP 振幅は機能する軸索数を反映し、US 所見は神経根の形態を反映しており、これらの検査を併用した多面的な評価が病態の把握に役立つ可能性が考えられた。

#### 【結論】

超音波診断を用いた頸椎変性疾患における神経根評価の有用性についての検討を行った。電気生理学的検査、画像検査に加え神経根の超音波検査を活用することで神経根の病変の評価するのに役立つと考えられた。

以上の発表の後、公開審査で質疑応答を行った。これらの内容をふまえ、審査委員一同は本論文が高知大学博士(医学)に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	LAI SYLVIA CHIN SEE (マレーシア)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第141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	令和5年3月3日
学位論文題目	NF90-NF45 is essential for $\beta$ cell compensation under obesity-inducing metabolic stress through suppression of p53 signaling pathway  (NF90-NF45がp53経路の抑制を介し、肥満誘発性代謝ストレスによる膵 $\beta$ 細胞の代償性肥大を促進する)
発表誌名	Scientific Reports, 12(1), 8837 2022年5月22日
	<b>審査委員</b>
	主査 教授 藤本 新平
	副査 教授 山口 正洋
	副査 教授 麻生 悌二郎

## 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	LAI SYLVIA CHIN SEE
論 文 題 目	<p>NF90-NF45 is essential for <math>\beta</math> cell compensation under obesity-inducing metabolic stress through suppression of p53 signaling pathway</p> <p>(NF90-NF45 が p53 経路の抑制を介し、肥満誘発性代謝ストレスによる膵 <math>\beta</math> 細胞の代償性肥大を促進する)</p>	
<p>(論文要旨)</p> <p>膵島は主に膵 <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\delta</math> 細胞により構成されている。これらの細胞群において膵 <math>\beta</math> 細胞は血糖を下げる唯一のホルモンであるインスリンを産生・分泌することで体内の血糖値の恒常性を維持する。従って、膵 <math>\beta</math> 細胞の機能脱落は糖尿病発症に直結する。現在、全世界において 11 人中 1 人が糖尿病に罹患している。糖尿病発症の過程において、膵 <math>\beta</math> 細胞が血糖値の恒常性を維持するために、膵 <math>\beta</math> 細胞が代償的に容積を肥大化することで(代償性肥大)、インスリンの産生・分泌量を上げる。従って、膵 <math>\beta</math> 細胞の代償性肥大が生じている状態であれば、糖尿病は発症しない。しかしながら、膵 <math>\beta</math> 細胞の代償性肥大化能力の破綻、あるいは、インスリン産生・分泌量の低下が糖尿病の発症の病因となる。一方で、膵 <math>\beta</math> 細胞の代償性肥大の分子機構に関しては不明な点が多く残されており、糖尿病の新規治療法の開発の礎となる当該分子機構の解明が求められている。</p> <p>DNA- and RNA-binding protein (DRBP)である Nuclear Factor 90 (NF90)-NF45 複合体(NF90-NF45)は、転写制御、mRNA 安定化、microRNA 生合成制御に関与することが見出されている。一方で、生体の生理機能における内在性 NF90-NF45 の作用に関しては不明な点が多い。</p> <p>そこで本研究において、申請者は生体の生理機能における内在性 NF90-NF45 の作用を明らかにするために、まず、マウスの各臓器における NF90-NF45 の発現を検討した。その結果、膵臓において内在性 NF90-NF45 の発現が認められた。さらに解析を進め申請者は、膵臓における NF90-NF45 の発現が膵島に局在することを見出した。これらの知見より申請者は、膵島の機能における NF90-NF45 の役割を明らかにするために、さらに解析を進めた。</p> <p>まず申請者は、膵島を構成する細胞群において大きな割合を占める <math>\alpha</math> 及び <math>\beta</math> 細胞における NF90-NF45 の発現を比較検討した。その結果、両細胞間で NF90-NF45 の発現量に差異は認められなかった。そこで本研究においては、申請者は糖尿病発症へ直結の要因となる「膵 <math>\beta</math> 細胞の動態」における NF90-NF45 の作用に着目し、その解明を進めた。</p> <p>本研究課題にアプローチするために、申請者は膵 <math>\beta</math> 細胞特異的 NF90-NF45 欠損マウスの作出を試みた。当該マウスの作出には Cre-loxP システムを用いた。ゲノム編集技術の一つである CRISPR-Cas9 法で NF45 flox ノックインマウスを作製後、膵 <math>\beta</math> 細胞特異的 Cre 発現マウスを交配させ、膵 <math>\beta</math> 細胞特異的 NF45 欠損 (<math>\beta</math>NF45<sup>-/-</sup>) マウスを作出した。これまでの知見により、NF90 と NF45 は互いに安定性を高めており、一方が欠損すると、もう一方の発現も低下することが知られている。そこで Western blot 法及び免疫蛍光染色法を用いて <math>\beta</math>NF45<sup>-/-</sup>マウスの膵島における NF90 の発現を解析した。その結果、当該マウスの膵島において NF90 の発現が顕著に低下していることが明らかとなった。これらの知見により、<math>\beta</math>NF45<sup>-/-</sup>マウスが <math>\beta</math> 細胞特異的に NF90-NF45 の発現が低下しているマウスであることが示唆された。</p>		






次に、 $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウスの表現型を解析するため、体重、血糖値及び血中インスリン濃度、膵島サイズを測定した。しかしながら、コントロールマウスと  $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウス間で当該測定項目に差異は認められなかった。そこで、高脂肪食(HFD-60)給餌による影響を検討した。その結果、高脂肪食給餌下における体重変動に関しては、コントロールマウスと  $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウス間で顕著な差異は認められなかった。一方で血糖値や血中インスリン濃度に関しては、コントロールマウスと比較し  $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウスの血糖値は有意に増加し、血中インスリン濃度は有意に低下することが明らかとなった。加えて、組織学的解析により、高脂肪食給餌下においてコントロールマウスの膵島は代償性肥大を引き起こすが、 $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウスの膵島は肥大化しないことが明らかとなった。さらに、高脂肪食給餌下におけるコントロールマウスと  $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウスの膵島において、細胞増殖促進マーカーである Histone H3 のリン酸化度合いを解析した。その結果、コントロールマウスと比較し、 $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウスの膵島において Histone H3 のリン酸化の低下が確認された。これらの解析結果より、高脂肪食給餌下における膵島の代償性肥大は「細胞増殖促進」に起因し、当該「細胞増殖促進」において内在性 NF90-NF45 は正に作用することが明らかとなった。

次にマウス膵  $\beta$  細胞株である BTC6 細胞を用いて NF90-NF45 による膵  $\beta$  細胞の増殖促進機構の解明を試みた。まず、BTC6 細胞において NF90-NF45 のノックダウン(KD)後、当該細胞における転写産物の網羅的発現解析を行なった。その結果、コントロール細胞と比較し NF90-NF45KD 細胞において発現量が 1.5 倍以上、1.5 倍以下に変動した転写産物数はそれぞれ 109 個と 103 個であった。そこでこれらの発現変動した転写産物群(212 個)を用いて pathway 解析を行った。その結果、pathway リストのトップに「p53 シグナル経路」が該当した。加えて、NF90-NF45KD 細胞において発現が変動する転写産物群において p53 シグナル経路に含まれる因子は、NF90-NF45KD により発現が上昇する転写産物(Cdkn1a、Pidd1、Zmat3、Casp3 及び Cngl)のみであることが明らかとなった。さらに qPCR 解析を用いて、NF90-NF45 の KD が当該転写産物(Cdkn1a、Pidd1、Zmat3、Casp3、Cngl)の発現を上昇させることを確認した。加えて、高脂肪食給餌下の  $\beta$ NF45 $^{-/-}$ マウスの膵島においても Cdkn1a、Zmat3、Casp3、Cngl の発現が上昇傾向であることが確認された。さらに、NF90-NF45KD が p53 の転写活性化を向上させるのか、否かを明らかにするために、p53 binding element もしくは mutated p53 binding element を含むルシフェラーゼレポータープラスミド(PG13-luc もしくは MG15-luc)を BTC6 細胞に導入し解析を行った。その結果、PG13-luc (p53 binding element) を導入した細胞において、NF90-NF45KD により luc 活性が上昇した。一方、MG15-luc (mutated p53 binding element)を導入した細胞では、コントロール細胞と比較し、NF90-NF45KD では luc 活性の有意な変動は認められなかった。これらの解析結果より、膵  $\beta$  細胞における NF90-NF45 の発現低下は p53 の転写活性化を向上させ、その下流のシグナル経路を活性化することが明らかとなった。

p53 シグナル経路の活性化は「細胞増殖抑制」を引き起こすことが知られている。そこで、NF90-NF45 の発現低下が p53 シグナル経路の活性化を介し膵  $\beta$  細胞の増殖を抑制するか、否かを検討するために、NF90-NF45 を KD した BTC6 細胞に dominant negative 型 p53 プラスミドを導入し、細胞増殖解析を行った。その結果、NF90-NF45 の KD によりコントロール BTC6 細胞と比較し BTC6 細胞の増殖が有意に低下することが明らかとなった。加えて、NF90-NF45 の KD による BTC6 細胞の増殖低下は dominant negative 型 p53 プラスミドの導入により回復することも明らかとなった。これらの解析結果より、膵  $\beta$  細胞における NF90-NF45 の発現低下は p53 シグナル経路を活性化することで、膵  $\beta$  細胞の増殖を抑制することが示唆された。

GEO データベースに登録された RNA-Seq データを用いた解析により、健常者と比較し 2 型糖尿病患者の膵島においては NF45 の発現が有意に低下していることが見出されている。我々の解析結果と共にこの臨床からの知見を考えた場合、高血糖状態においても、膵島で NF90-NF45 が発現している状態では、p53 シグナル経路が抑制され膵島の代償性肥大を引き起こすことで糖尿病態の発症を免れていると考えられる。一方で、何らかの要因で膵島における NF90-NF45 の発現が低下すると p53 シグナル経路が活性化し、膵島の代償性肥大が抑制され、糖尿病を発症するのではないかと考えられた。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	LAI SYLVIA CHIN SEE
審 査 委 員	主 査 氏 名	藤本 新平 
	副 査 氏 名	山口 正洋 
	副 査 氏 名	麻生 悌二郎 

題 目 NF90-NF45 is essential for  $\beta$  cell compensation under obesity-inducing metabolic stress through suppression of p53 signaling pathway.  
(NF90-NF45 が p53 経路の抑制を介し、肥満誘発性代謝ストレスによる膵 $\beta$ 細胞の代償性肥大を促進する)

著 者 Sylvia Lai, Takuma Higuchi, Masayuki Tsuda, Yasunori Sugiyama, Keiko Morisawa, Taketoshi Taniguchi & Shuji Sakamoto

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、 年 月  
Scientific Reports, 12(1), 8837  
2022年5月22日

要 旨

【背景・目的】

DNA- and RNA-binding proteinであるNuclear Factor 90 (NF90)-NF45複合体(NF90-NF45)は、転写制御、mRNA安定化、microRNA生合成制御に関与するが、生体の生理機能における内在性NF90-NF45の役割に関しては不明な点が多い。マウスの各臓器における内在性NF90-NF45の発現を検討したところ、膵島に発現が多いことを見出した。膵島における $\beta$ 細胞はインスリンの産生・分泌を介して体内の血糖の恒常性を維持しており、膵 $\beta$ 細胞におけるNF90-NF45の生体での役割を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法】CRISPR-Cas9法でNF45 floxノックインマウスを作製後、膵 $\beta$ 細胞特異的Cre発現マウスと交配させ、膵 $\beta$ 細胞特異的NF45欠損( $\beta$  NF45 $^{-/-}$ )マウスを作出した。肥満誘発性代謝ストレスとして高脂肪食(HFD)負荷を用いた。これらのマウスと対照として用いた( $\beta$  NF45 $+/+$ )マウスに標準食(ND)とHFDを与え耐糖能と組織学的な膵島サイズ・個数の評価を行なった。Histone H3のリン酸化度を細胞増殖促進マーカーとした。マウス膵 $\beta$ 細胞株であるBTC6細胞においてNF90-NF45のノックダウン(KD)後、当該細胞における転写産物の網羅的発現解析を行なった。p53の転写活性化能はp53 binding elementもしくはmut



ated p53 binding elementを含むルシフェラーゼ(luc)レポータープラスミド(PG13-lucもしくはMG15-luc)をBTC6細胞に導入し評価した。NF90-NF45をKDしたBTC6細胞にdominant negative型p53(p53DD)プラスミドを導入し、細胞増殖解析を行った。GEOデータベースに登録されたRNA発現データを用いた解析により、健常者と比較し2型糖尿病患者の膵島におけるNF45の発現を検討した。

【結果・考察】野生型マウスの単離膵島において内在性のNF90、NF45の発現が見られ、膵臓全体より発現が多いことをWestern blotで確認した。免疫組織学的検討では、NF90、NF45は膵β細胞の核に局在していた。

βNF45<sup>-/-</sup>マウスの膵島では、NF45のみならずNF90も見られないことをWestern blotで確認した。ND、HFD(25-30週)における対照(βNF45<sup>+/-</sup>)マウスとβNF45<sup>-/-</sup>の比較で体重には差が見られなかった。随時の血中グルコースとインスリンは、NDでは両者間で差はなかったが、HFDにおいて血中グルコースはβNF45<sup>-/-</sup>で有意に高値であり、HFDで誘発される高インスリン血症は、βNF45<sup>-/-</sup>で有意に抑制されていた。組織学的解析により、HFDにおいて対照マウスの膵島は代償性肥大が見られたが、βNF45<sup>-/-</sup>マウスでは見られなかった。さらに、対照マウスと比較し、βNF45<sup>-/-</sup>の膵島においてHistone H3のリン酸化の低下が確認された。これらの解析結果より、HFDによる代謝ストレス下で、β細胞におけるNF90-NF45欠損は膵島の代償性肥大を抑制し耐糖能障害をきたすこと、細胞増殖促進において内在性NF90-NF45は正に作用することが明らかとなった。

BTC6細胞においてNF90-NF45のKD後、転写産物の網羅的発現解析を行なった。対照細胞と比較しNF90-NF45 KD細胞において発現量が1.5倍以上、1.5倍以下に変動した転写産物数はそれぞれ109個と103個であった。そこでこれらの発現変動した転写産物群(212個)を用いてpathway解析を行い、pathwayリストのトップにp53シグナル経路が該当した。加えて、NF90-NF45 KD細胞において発現が変動する転写産物群においてp53シグナル経路に含まれる因子は、NF90-NF45 KDにより発現が上昇する転写産物(Cdkn1a、Pidd1、Zmat3、Casp3及びCngl)のみであることが明らかとなった。さらにqPCR解析を用いて、NF90-NF45のKDが当該転写産物(Cdkn1a、Pidd1、Zmat3、Casp3、Cngl)の発現を上昇させることを確認した。加えて、HFD下のβNF45<sup>-/-</sup>マウスの膵島においてもCdkn1a、Zmat3、Casp3、Cnglの発現が上昇傾向であることが確認された。さらにPG13-lucを導入したBTC6細胞において、NF90-NF45 KDによりluc活性が上昇した。一方、MG15-lucを導入した細胞では、NF90-NF45 KDによりluc活性の変動は認められなかった。これらの解析結果より、膵β細胞におけるNF90-NF45の発現低下はp53の転写活性化能を向上させ、その下流のシグナル経路を活性化することが明らかとなった。

p53シグナル経路の活性化は細胞増殖抑制を引き起こすことが知られており、NF90-NF45の発現低下がp53シグナル経路の活性化を介し膵β細胞の増殖を抑制するかを検討した。BTC6細胞においてはNF90-NF45 KDにより細胞増殖が有意に低下し、その増殖低下はp53D導入により回復した。これらの解析結果より、膵β細胞におけるNF90-NF45の発現低下はp53シグナル経路を活性化することで、膵β細胞の増殖を抑制することが示された。2型糖尿病の発症機序としてインスリン抵抗性に対するインスリン分泌の代償不全が重視されており、p53活性化は膵β細胞の老化と関連することが知られている。また健常者

と比較し2型糖尿病患者の膵島においてはNF45の発現が有意に低下していることがGEOデータベースで確認できた。これらの知見よりNF90-NF45は2型糖尿病の老化関連の発症因子である可能性も提示できる。

【結論】膵β細胞におけるNF90-NF45はp53経路抑制を介し肥満誘発性代謝ストレスによる膵β細胞の代償性肥大を促進し、耐糖能障害発症抑制において重要な役割を果たしている。

本論文は2型糖尿病発症において重要な膵β細胞の代償不全の新たな機序を明らかにしており、2型糖尿病発症予防の新規介入方法の開発にも寄与しうる知見である。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)	ZOU SUO	(中華人民共和国)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	甲総医博第142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	令和5年3月23日	
学位論文題目	Protective effects of hydrogen sulfide pretreatment on cyclophosphamide-induced bladder dysfunction in rats via suppression of bladder afferent nerves  (硫化水素は膀胱求心性神経の抑制を介してシクロホスファミド誘発性膀胱機能障害を予防する)	
発表誌名	Nitric Oxide 127:54~63, 2022年 10月	
	<b>審査委員</b>	主査 教授 井上 啓史 副査 教授 宮村 充彦 副査 教授 小島 研介

### 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	ZOU SUO
論文題目	Protective effects of hydrogen sulfide pretreatment on cyclophosphamide-induced bladder dysfunction in rats via suppression of bladder afferent nerves (硫化水素は膀胱求心性神経の抑制を介してシクロホスファミド誘発性膀胱機能障害を予防する)
<p>(論文要旨)</p> <p><b>【背景・目的】</b>          抗がん薬であるシクロホスファミド(CYP)を用いたがん化学療法において、CYP 代謝物であるアロクレインが尿中に排泄されて直接膀胱粘膜を障害することで発症する出血性膀胱炎が副作用として問題となっている。CYP による出血性膀胱炎は、炎症による膀胱排尿筋過活動ならびに頻尿を引き起こし、これら症状は患者の化学療法継続および治療予後に大きな影響を与える。しかしながら、現状の CYP 誘発性出血性膀胱炎に対する予防・治療法は膀胱炎に対する対症療法しかない。このため、CYP 誘発性出血性膀胱炎に対する新たな治療および予防戦略が必要とされている。</p> <p>硫化水素 H<sub>2</sub>S は、卵の腐敗臭のする毒ガスとしてよく知られている。しかしながら近年、H<sub>2</sub>S がアミノ酸のシステインから生合成され、一酸化炭素および一酸化窒素に次ぐ第3のガス状シグナル分子として機能することが明らかにされている。我々はこれまでにガス状シグナル分子・H<sub>2</sub>S が膀胱における内因性の弛緩因子であることを明らかにしてきた。この H<sub>2</sub>S が抗炎症作用、細胞保護作用、神経調節作用など多彩な生理作用を有するとの報告から、CYP 誘発性出血性膀胱炎に対して H<sub>2</sub>S が保護的作用を有する可能性を考え、本研究的にて実験的に検証することを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b>          9週齢の雄性 Wistar 系ラットを実験に用いた。</p> <p><b>【実験1】</b>NaHS (H<sub>2</sub>S 供与薬、3、10 μmol/kg)または Vehicle (saline、1 ml/kg)は1日1回7日間連日腹腔内投与し、CYP (150 mg/kg)または saline (5 ml/kg)は6日目に腹腔内投与した。NaHS 投与終了翌日に膀胱内圧測定(CMG)を行い、排尿機能を評価した。その後摘出した膀胱組織にて病理学的評価および酸化ストレスマーカー(マロンジアルデヒド、MDA)・炎症性サイトカイン[インターロイキン-6 (IL-6)、ミクロペルオキシダーゼ (MPO)、腫瘍壊死因子 α (TNF-α)]レベルの測定を行った。</p> <p><b>【実験2】</b>カプサイシン(CAP)による膀胱求心性神経の脱感作が CYP 誘発性頻尿に対する NaHS の効果に与える影響を検討するため、下記4群にて検討した:CAP(-)+Vehicle+CYP 群、CAP(-)+NaHS+CYP 群、CAP(+)+Vehicle+CYP 群、CAP(+)+NaHS+CYP 群。NaHS (10 μmol/kg)および CYP 投与は実験1と同様に行い、CAP (125 mg/kg)は NaHS 投与3-4日目に皮下投与し、CAP 投与終了4日後、実験1と同様に CMG にて排尿機能評価を行った。</p>	

### 【結果】

【実験1】: 対照群に比してCYP投与群では、有意な排尿間隔(ICI, 排尿頻度の指標)の短縮、膀胱コンプライアンス(Comp, 膀胱伸展性の指標)の減少、non-voiding contraction [NVC, 排尿筋過活動の指標]数の増加、膀胱組織における各病理学的スコア(好中球浸潤、浮腫、出血)の上昇およびMPO増加が認められた。また統計的有意差は見られなかったがCYPにより膀胱組織中のTNF- $\alpha$ が増加する傾向が観察された。NaHS 3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  前処置は、CYPによるNVC数増加を有意に改善した。NaHS 10  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  前処置は、CYPによるICI短縮、Compの減少およびNVC数増加を有意に改善した。一方、NaHS前処置はCYPによる好中球浸潤、浮腫、出血スコア上昇およびMPO、TNF- $\alpha$ 増加に対しては有意な影響を示さなかった。また膀胱組織中のMDAおよびIL-6レベルは各群間に有意差を認めなかった。

【実験2】: CAP(-)+Vehicle+CYP群に比してCAP(+)+Vehicle+CYP群では、有意な一回排尿量および膀胱容量の増加、ICI延長およびNVC数減少傾向が認められた。またCAP(-)+NaHS+CYP群ではCAP(-)+Vehicle+CYP群に比して有意な一回排尿量の増加、ICI延長およびNVC数減少が認められた。一方、CAP(+)+Vehicle+CYP群—CAP(+)+NaHS+CYP群間で一回排尿量、膀胱容量、ICI、CompおよびNVC数に有意差を認めなかった。なお4群間で残尿量には有意な差は見られなかった。

### 【考察】




各排尿パラメーターのデータからNaHS前投与はCYP誘発性の膀胱機能障害、頻尿・膀胱伸展性減弱・排尿筋過活動、を改善させることが明らかとなった。しかしながらCYPによる膀胱組織中の病理学的スコア上昇、MPOおよびTNF- $\alpha$ 増加に対しNaHS前投与は有意な影響を与えなかったことから、NaHSによる膀胱機能障害改善作用は膀胱炎改善作用とは異なる機序を介することが分かった。そしてこのNaHSによる改善作用はCAP前処置により消失したことから、CAP感受性膀胱求心性神経の過剰興奮抑制に起因する可能性が示唆された。以上から、H<sub>2</sub>Sが膀胱求心性神経の過剰興奮抑制を介しCYP誘発性の膀胱機能障害に対する予防効果を示すことが明らかとなった。

今回の研究成果は、CYPによるがん化学療法時の副作用予防および軽減にH<sub>2</sub>Sを標的とした薬物が有用である可能性を示唆しており、同薬物開発の基礎資料になるものと期待される。



## 論文審査の結果の要旨

氏名 ZOU SUO

審査委員	主査氏名	井上啓史	
	副査氏名	宮村充彦	
	副査氏名	小島研介	

題目 Protective effects of hydrogen sulfide pretreatment on cyclophosphamide-induced bladder dysfunction in rats via suppression of bladder afferent nerves  
(硫化水素は膀胱求心性神経の抑制を介してシクロホスファミド誘発性膀胱機能障害を予防する)

著者 Suo Zou, Takahiro Shimizu, Atsushi Kurabayashi, Masaki Yamamoto, Shogo Shimizu, Youichirou Higashi, Nobutaka Shimizu, Takashi Karashima, Motoaki Saito

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Nitric Oxide 127: 54~63, 2022年 10月

### 要旨

#### 【背景・目的】

抗がん薬であるシクロホスファミド(CYP)を用いたがん化学療法において、CYP 代謝物であるアロクレインが尿中に排泄されて直接膀胱粘膜を障害することで発症する出血性膀胱炎が副作用として問題となっている。CYP による出血性膀胱炎は、炎症による膀胱排尿筋過活動ならびに頻尿を引き起こし、これら症状は患者の化学療法継続および治療予後に大きな影響を与える。しかしながら、現状の CYP 誘発性出血性膀胱炎に対する予防・治療法は膀胱炎に対する対症療法しかない。このため、CYP 誘発性出血性膀胱炎に対する新たな治療および予防戦略が必要とされている。

硫化水素 H<sub>2</sub>S は、卵の腐敗臭のする毒ガスとしてよく知られている。しかしながら近年、H<sub>2</sub>S がアミノ酸のシステインから生合成され、一酸化炭素および一酸化窒素に次ぐ第3のガス状シグナル分子として機能することが明らかにされている。我々はこれまでにガス状シグナル分子・H<sub>2</sub>S が膀胱における内因性の弛緩因子であることを明らかにしてきた。この H<sub>2</sub>S が抗炎症作用、細胞保護作用、神経調節作用など多彩な生理作用を有するとの報告から、CYP 誘発性出血性膀胱炎に対して H<sub>2</sub>S が保護的作用を有する可能性を考え、本研究的にて実験的に検証することを目的とした。

#### 【方法】

9週齢の雄性 Wistar 系ラットを実験に用いた。

【実験1】NaHS (H<sub>2</sub>S 供与薬、3、10 μmol/kg)または Vehicle (saline、1 ml/kg)は1日1回7日間連日腹腔内投与し、CYP (150 mg/kg)または saline (5 ml/kg)は6日目に腹腔内投与した。NaHS 投与終了翌日に膀胱内圧測定(CMG)を行い、排尿機能を評価した。その後摘出した膀胱組織にて病理学的評価および酸化ストレスマーカー(マロンジアルデヒド、MDA)・炎症性サイトカイン[インターロイキン-6 (IL-6)、ミエロペルオキシダーゼ (MPO)、腫瘍壊死因子 α (TNF-α)]レベルの測定を行った。

【実験2】カプサイシン(CAP)による膀胱求心性神経の脱感作が CYP 誘発性頻尿に対する NaHS の効果に与える影響を検討するため、下記4群にて検討した: CAP(-)+Vehicle+CYP 群、CAP(-)+NaHS+CYP 群、CAP(+)+Vehicle+CYP 群、CAP(+)+NaHS+CYP 群。NaHS (10 μmol/kg)および CYP 投与は実験1と同様にを行い、CAP (125 mg/kg)は NaHS 投与3-4日目に皮下投与し、CAP 投与終了4日後、実験1と同様に CMGにて排尿機能評価を行った。

## 【結果】

【実験1】: 対照群に比して CYP 投与群では、有意な排尿間隔(ICI, 排尿頻度の指標)の短縮、膀胱コンプライアンス(Comp, 膀胱伸展性の指標)の減少、non-voiding contraction [NVC, 排尿筋過活動の指標]数の増加、膀胱組織における各病理学的スコア(好中球浸潤、浮腫、出血)の上昇および MPO 増加が認められた。また統計的有意差は見られなかったが CYP により膀胱組織中の TNF- $\alpha$ が増加する傾向が観察された。NaHS 3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  前処置は、CYP による NVC 数増加を有意に改善した。NaHS 10  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  前処置は、CYP による ICI 短縮, Comp の減少および NVC 数増加を有意に改善した。一方, NaHS 前処置は CYP による好中球浸潤、浮腫、出血スコア上昇および MPO、TNF- $\alpha$  増加に対しては有意な影響を示さなかった。また膀胱組織中の MDA および IL-6 レベルは各群間にて有意差を認めなかった。

【実験2】: CAP(-)+Vehicle+CYP 群に比して CAP(+)+Vehicle+CYP 群では、有意な一回排尿量および膀胱容量の増加、ICI 延長および NVC 数減少傾向が認められた。また CAP(-)+NaHS+CYP 群では CAP(-)+Vehicle+CYP 群に比して有意な一回排尿量の増加、ICI 延長および NVC 数減少が認められた。一方、CAP(+)+Vehicle+CYP 群—CAP(+)+NaHS+CYP 群間で一回排尿量、膀胱容量、ICI、Comp および NVC 数に有意差を認めなかった。なお4群間で残尿量には有意な差は見られなかった。

## 【考察】

各排尿パラメーターのデータから NaHS 前投与は CYP 誘発性の膀胱機能障害、頻尿・膀胱伸展性減弱・排尿筋過活動、を改善させることが明らかとなった。しかしながら CYP による膀胱組織中の病理学的スコア上昇、MPO および TNF- $\alpha$  増加に対し NaHS 前投与は有意な影響を与えなかったことから、NaHS による膀胱機能障害改善作用は膀胱炎改善作用とは異なる機序を介することが分かった。そしてこの NaHS による改善作用は CAP 前処置により消失したことから、CAP 感受性膀胱求心性神経の過剰興奮抑制に起因する可能性が示唆された。以上から、H<sub>2</sub>S が膀胱求心性神経の過剰興奮抑制を介し CYP 誘発性の膀胱機能障害に対する予防効果を示すことが明らかとなった。

今回の研究成果は、CYPによるがん化学療法時の副作用予防および軽減にH<sub>2</sub>Sを標的とした薬物が有用である可能性を示唆しており、同薬物開発の基礎資料になるものと期待される。

氏名(本籍)	西森 大洋 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第143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	令和5年3月23日
学位論文題目	Development of a novel cell line-derived xenograft model of primary herpesvirus 8-unrelated effusion large B-cell lymphoma and antitumor activity of birabresib <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>  (ヒトヘルペスウイルス8型陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫の新規細胞株に由来する異種移植モデルの樹立とビラブレンブの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> における抗腫瘍活性)
発表誌名	Cancer Medicine、10(24)、8976～8987 2021年12月
	<b>審査委員</b> 主査 教授 佐竹 悠良 副査 教授 小林 道也 副査 教授 前田 長正

### 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	西森 大洋
論文題目	Development of a novel cell line-derived xenograft model of primary herpesvirus 8-unrelated effusion large B-cell lymphoma and antitumor activity of birabresib <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . (ヒトヘルペスウイルス8型陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫の新規細胞株に由来する異種移植モデルの樹立とビラブレシブの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> における抗腫瘍活性)	
(論文要旨)  <b>【背景と目的】</b> 原発性浸出液リンパ腫は原発性体腔液リンパ腫とも呼ばれ、胸腔や腹腔などの体腔内に原発し、顕著なリンパ腫性体腔液の貯留をきたすことを特徴とするが、初期にはリンパ節腫大や腫瘤形成を認めないユニークなB細胞リンパ腫である。通常はヒトヘルペスウイルス8型 (human herpesvirus 8, HHV8) の感染が原因となって発症する。一方、わが国で発症する多くの浸出液リンパ腫はHHV8陰性であり、臨床的および細胞分子生物学的差異からHHV8陽性例とは異なった疾患概念であることが提唱されている。すなわち、HHV8陽性原発性浸出液リンパ腫 (Primary effusion lymphoma, PEL) と異なり、HHV8陰性例では予後が比較的良好であり、B細胞マーカーであるCD20陽性の免疫表現型を示し、がん遺伝子である <i>c-MYC</i> 遺伝子座の異常も認められる。そのため、HHV8陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫 (Primary HHV8-unrelated effusion large B-cell lymphoma) あるいは原発性浸出液リンパ腫類似リンパ腫 (PEL-like lymphoma, PEL-LL) として区別されている。  HHV8陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫はいまだその病態が十分に解明されておらず、標準治療も確立されていない。その大きな原因の一つは有用な解析モデルの欠如である。本研究ではこの問題に対峙するため、新規細胞株を樹立し、本疾患の病態解明に資する細胞株由来異種移植モデルを作製することを目的にした。さらに、本リンパ腫の新規治療法開発に向けた基盤研究を推進することも目的にした。  <b>【方法】</b> HHV8陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫患者の腫瘍性体腔液からリンパ腫細胞を分離し、5%CO <sub>2</sub> 濃度、37℃の環境下で、20%牛胎仔血清含有RPMI-1640培地で培養した。3日ごとの部分的な培地交換を行うことで培養を継続した。本研究は、高知大学医学部倫理委員会の承認を受け、患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。  <b>【結果】</b> 培養開始から4週後に継代培養が可能となり、この細胞株をPell-1と名付けた。ショートタンデムリピートDNAフィンガープリンティング法により、患者リンパ腫細胞とPell-1細胞の遺伝子型が100%一致することが示され、Pell-1は患者リンパ腫細胞由来の細胞株であることが証明された。		

次に、Pell-1細胞 ( $3 \times 10^7$ 個) を生後6週のNOD/SCIDマウスの腹腔内に接種し、腫瘍性腹水の発生有無を接種後5週まで観察した。この条件ではPell-1細胞はマウスに生着しなかったが、マウスに放射線照射の前処置を施すことにより全てのマウスに多量の腫瘍性腹水をつくることができた。

次に、細胞移植後におけるマウスの経時観察を行った。移植後14日では可視腹水は認められなかったが、腹腔内洗浄によりリンパ腫細胞の回収が可能であり、病理学的にもリンパ腫細胞の腹膜浸潤が確認された。移植後21日では、明らかな腹水が観察され、その後は時間依存的に腹水量と腹腔内腫瘍細胞数が急速に増加した。移植後28日以降の後期になると、腹膜に播種性腫瘤病変や脾臓実質への腫瘍細胞の浸潤も認められた。

Pell-1には*c-MYC* 遺伝子再構成と*c-MYC*タンパク質の発現が認められたことから、*c-MYC* の発現を抑制するBETプロモドメインタンパク質阻害薬であるビラブレシブ (MK-8628/OTX015) とJQ1の*in vitro* における抗腫瘍効果を検討した。両薬剤ともに濃度依存的にPell-1細胞の増殖を抑制し、細胞周期G0/G1での停止とアポトーシスを誘導した。次に、マウスモデルを使って、生体内におけるビラブレシブの抗腫瘍活性を調べた。ビラブレシブの腹腔内投与によって、腹水量、腹水中の腫瘍細胞数、および腫瘍浸潤の有意な減少が認められた。


#### 【考察】

HHV8陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫患者の体内で認められる腫瘍性体腔液貯留という特異な現象をマウスで再現可能な異種移植モデルを世界で初めて創出することができた。さらに、このマウスモデルは、初期では腹膜での増殖、そして腹水の形成、後期には腹膜に播種性病変形成という、高悪性度のHHV8陰性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫が示す一連の臨床経過を模した*in vivo* 解析系を実現した。

したがって、この独自のマウスモデルは薬物前臨床薬効評価をも可能にした。本研究において、*c-MYC*の発現を阻害するBET阻害薬がHHV8陰性原発性浸出液大細胞型B細胞リンパ腫の腫瘍性体腔液貯留の進展を有意に抑制することが示された。これは標準治療が確立されていない本疾患の治療に新たな知見を提供するものである。今後はこのマウスモデルを使って、腫瘍性体腔液を誘導する責任分子の同定などを行い、さらなる特異的治療標的分子の探索へと発展させる。



## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	西森 大洋
審 査 委 員	主 査 氏 名 佐竹 悠良  副 査 氏 名 小林 道也  副 査 氏 名 前田 長正	

題 目 Development of a novel cell line-derived xenograft model of primary herpesvirus 8-unrelated effusion large B-cell lymphoma and antitumor activity of birabresib in vitro and in vivo  
 (ヒトヘルペスウイルス 8 型陰性原発性浸出液大細胞型 B 細胞リンパ腫の新規細胞株に由来する異種移植モデルの樹立とビラブレシブの in vitro および in vivo における抗腫瘍活性)

著 者 Tomohiro Nishimori, Tomonori Higuchi, Yumiko Hashida, Takako Ujihara, Ayuko Taniguchi, Fumiya Ogasawara, Naoya Kitamura, Ichiro Murakami, Kensuke Kojima, Masanori Daibata

発表誌名、巻 (号)、ページ ( ~ ), 年 月  
 Cancer Medicine、10(24)、8976~8987 2021 年 12 月

### 要 旨

#### 【背景・目的】

原発性浸出液リンパ腫 (Primary effusion large B-cell lymphoma, PELL) は、胸腔や腹腔などの体腔内に原発し、顕著なリンパ腫性体腔液の貯留をきたすことを特徴とする。通常はヒトヘルペスウイルス 8 型 (human herpesvirus 8, HHV8) の感染が原因となって発症するが、わが国で発症する多くの浸出液リンパ腫は HHV8 陰性であり、臨床的および細胞分子生物学的差異から HHV8 陽性例とは異なった疾患概念であることが提唱されており、HHV8 陰性原発性浸出液大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Primary HHV8-unrelated effusion large B-cell lymphoma) あるいは原発性浸出液リンパ腫類似リンパ腫 (PEL-like lymphoma, PEL-LL) として区別されている。

HHV8 陰性原発性浸出液大細胞型 B 細胞リンパ腫 (PEL-LL) はいまだその病態が十分に解明されておらず、標準治療も確立されていない。その大きな原因の一つは有用な解析モデルの欠如であり、本研究ではこの問題に対峙するため、新規細胞株を樹立し、本疾患の病態解明に資する細胞株由来異種移植モデルを作製すること、及び本リンパ腫の新規治療法開発に向けた基盤研究を推進することを目的にした。

#### 【方法】

HHV8 陰性原発性浸出液大細胞型 B 細胞リンパ腫 (PELL-LL) 患者の腫瘍性体腔液からリンパ腫細胞を分離し、5%CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の環境下で、20% 牛胎仔血清含有 RPMI-1640 培地で培養した。3 日ごとの部分的な培地交換を行うことで培養を継続した。本研究は、高知大学医学部倫理委員会の承認を受け、患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

#### 【結果・考察】

培養開始から 4 週後に継代培養が可能となり、この細胞株を Pell-1 と名付けた。ショートタンデムリピート DNA フィンガープリンティング法により、患者リンパ腫細胞と Pell-1 細胞の遺伝子型が 100% 一致することが示され、Pell-1 は患者リンパ腫細胞由来の細胞株であることが証明された。

次に、Pell-1 細胞 ( $3 \times 10^7$  個) を生後 6 週の NOD/SCID マウスの腹腔内に接種し、腫瘍性腹水の発生有無を接種後 5 週まで観察した。この条件では Pell-1 細胞はマウスに生着しなかったが、マウスに放射線照射の前処置を施すことにより全てのマウスに多量の腫瘍性腹水をつくることができた。

次に、細胞移植後におけるマウスの経時観察を行った。移植後 14 日では可視腹水は認められなかったが、腹腔内洗浄によりリンパ腫細胞の回収が可能であり、病理学的にもリンパ腫細胞の腹膜浸潤が確認された。移植後 21 日では、明らかな腹水が観察され、その後は時間依存的に腹水量と腹腔内腫瘍細胞数が急速に増加した。移植後 28 日以降の後期になると、腹膜に播種性腫瘍病変や脾臓実質への腫瘍細胞の浸潤も認められた。

Pell-1 には *c-MYC* 遺伝子再構成と *c-MYC* タンパク質の発現が認められたことから、*c-MYC* の発現を抑制する BET プロモドメインタンパク質阻害薬であるビラブレシブ (MK-8628/OTX015) と JQ1 の *in vitro* における抗腫瘍効果を検討した。両薬剤ともに濃度依存的に Pell-1 細胞の増殖を抑制し、細胞周期 G0/G1 での停止とアポトーシスを誘導した。次に、マウスモデルを使って、生体内におけるビラブレシブの抗腫瘍活性を調べた。ビラブレシブの腹腔内投与によって、腹水量、腹水中の腫瘍細胞数、および腫瘍浸潤の有意な減少が認められた。

#### 【結論】

HHV8 陰性原発性浸出液大細胞型 B 細胞リンパ腫 (PELL-LL) 患者の体内で認められる腫瘍性体腔液貯留という特異な現象をマウスで再現可能な異種移植モデルを世界で初めて創出することができた。さらに、このマウスモデルは、初期では腹膜での増殖、そして腹水の形成、後期には腹膜に播種性病変形成という、高悪性度の HHV8 陰性浸出液大細胞型 B 細胞リンパ腫 (PELL-LL) が示す一連の臨床経過を模した *in vivo* 解析系を実現した。

したがって、この独自のマウスモデルは薬物前臨床薬効評価をも可能にした。本研究において、*c-MYC* の発現を阻害する BET 阻害薬が HHV8 陰性原発性浸出液大細胞型 B 細胞リンパ腫 (PELL-LL) の腫瘍性体腔液貯留の進展を有意に抑制することが示された。これは標準治療が確立されていない本疾患の治療に新たな知見を提供するものである。今後はこのマウスモデルを使って、腫瘍性体腔液を誘導する責任分子の同定などを行い、さらなる特異的治療標的分子の探索へと発展させる。

以上の発表の後、公開審査で質疑応答を行った。これらの内容をふまえ、審査委員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	川田 敬 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第144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	令和5年3月23日
学位論文題目	Yokukansan suppresses neuroinflammation in the hippocampus of mice and decreases the duration of lipopolysaccharide and diazepam-mediated loss of righting reflex induced by pentobarbital  (抑肝散はマウスの海馬の神経炎を抑制し、リポ多糖およびジアゼパムにより延長されたペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を短縮する)
発表誌名	Journal of natural medicines, 76 (3), 634-644, 2022年3月
	<b>審査委員</b> 主査 教授 瀬尾 宏美 副査 教授 数井 裕光 副査 教授 河野 崇

## 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	川 田 敬
論 文 題 目	Yokukansan suppresses neuroinflammation in the hippocampus of mice and decreases the duration of lipopolysaccharide and diazepam-mediated loss of righting reflex induced by pentobarbital (抑肝散はマウスの海馬の神経炎を抑制し、リポ多糖およびジアゼパムにより延長されたペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を短縮する)	
(論文要旨)		
<b>【目的】</b> 手術などにより誘発される神経炎は過鎮静、せん妄などの認知機能の変化を引き起こす。せん妄は急性の認知機能の低下と定義され、入院期間の延長や死亡率の上昇と関連する。またせん妄は過活動型せん妄(激越、落ち着きのなさ、幻覚)と低活動型せん妄(過鎮静、反応性の低下、眠気)に分類され、過活動型せん妄は抗精神病薬による治療が一般的であるが、低活動型せん妄では有用な治療薬は開発されていない。 抑肝散は、本邦で医療用医薬品として承認されている漢方薬であり、神経症、不眠症、イライラ、幼児の興奮、認知症の周辺症状などの治療に広く使用されている。また近年、抑肝散は臨床において術後過活動型せん妄による周辺症状を効果的に改善することが報告されているが、その作用メカニズムは明らかではない。さらに、抑肝散の低活動型せん妄に対する効果の検証は行われていない。 本研究では、術後の神経炎状態を模倣した神経炎モデルマウスを用いて、Lipopolysaccharide (LPS) およびジアゼパムで延長したペントバルビタール誘発性体向反射消失時間に対する抑肝散の効果を検証することを目的とした。また、海馬における抑肝散の抗神経炎作用を評価した。さらに、抑肝散の有効成分および、LPS 刺激したマウスミクログリア由来 BV2 細胞に対する抑肝散の作用について検討した。最後に、抑肝散の成分のうち脳内移行性の報告がある Glycyrrhizic acid (GL) におけるペントバルビタール誘発性体向反射消失時間に対する効果を検証した。		
<b>【方法】</b> <b>動物実験：</b> ICRマウス(週齢9-11週、雄性)を用いた。抑肝散は株式会社ツムラより恵与された医療用漢方エキスを用いた。予防的に抑肝散(250, 500, 1,000 mg/kg)、抑肝散の成分であるGL (30, 50 mg/kg) 又は精製水を経口投与した。各群マウスにLPSを腹腔内投与することで脳内炎症を惹起させた。LPS投与24時間後にジアゼパムおよびペントバルビタールを腹腔内投与し、過鎮静を誘発させる神経炎モデルマウスを作成し、抑肝散およびGLの過鎮静に対する効果を体向反射消失時間の測定により評価した。またLPS 投与2時間後に海馬を摘出し、炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ ) の mRNA 発現量を定量PCR法にて測定し、さらにLPS 投与24時間後に神経炎によりミクログリア細胞に特異的に発現するIba1を免疫組織染色し、Iba1陽性細胞数を比較した。 <b>細胞実験：</b> マウスミクログリア由来BV2細胞を24wellディッシュに播種し、LPS(1 $\mu$ g/mL)で刺激し、同時に抑肝散(0-1,000 $\mu$ g/mL)またはポジティブコントロールのDexamethasone (1 $\mu$ M)で共刺激した。37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした後、培養上清を回収し、一酸化窒素 (NO) をGriess法で測定し、TNF- $\alpha$ およびIL-6についてELISA法を用いて測定した。		

#### 【結果・考察】




神経炎モデルマウスにおいて、LPS 投与群ではペントバルビタール誘発性体向反射消失時間が有意に延長した。これに対し、抑肝散投与群（500および1000mg/kg）ではペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を有意に短縮した。また LPS 投与2時間後、海馬における IL-6および TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量が有意に増加した。これに対し、抑肝散投与により IL-6および TNF- $\alpha$  の mRNA の発現量は有意に減少した。さらに LPS 投与により海馬の Iba-1陽性細胞数が有意に増加した。これに対し、抑肝散投与により、Iba1陽性細胞の増加が有意に抑制された。また抑肝散の成分である GL (50 mg/kg)を投与することで、ペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を部分的に減少させることが確認された。また、抑肝散は LPS 刺激 BV2細胞における NO、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を有意に減少した。

LPS によって誘発される炎症性サイトカインは、phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 経路を介して、海馬ニューロンにおける GABA<sub>A</sub> 受容体の表面発現の増加および、GABA 誘発性塩化物イオンを増加させ、GABA の活性を増強する。さらに催眠作用のあるバルビツール酸は、GABA による GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化を促進する。これらの反応は、低用量の GABA 受容体アゴニストであるジアゼパムでさらに増強される。このように、LPS による海馬の神経炎は、GABA 活性を介して睡眠時間に影響を与え、低用量のジアゼパム投与によりペントバルビタール誘発性体向反射消失の持続時間を延長させる。また、GABA 受容体作動薬は、実臨床において、炎症を誘発する手術や感染症時の鎮静や不眠の治療に頻用される。したがって、LPS およびジアゼパムにより延長したペントバルビタール誘発性体向反射消失の持続時間を評価することは、術後の神経炎によるせん妄の評価に利用できると思われる。

本研究では、神経炎モデルマウスにおいて、抑肝散投与により海馬における NO、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量の有意な抑制に伴い、Iba-1陽性細胞数が有意に減少したことが明らかとなった。このことから、抑肝散投与により、神経炎が抑制され、GABA 活性の過剰上昇が抑えられることで、LPS 投与によるペントバルビタール誘発性体向反射消失時間の延長を抑制したと考察している。また抑肝散の成分のうち、ペントバルビタール誘発性体向反射消失時間の抑制には GL の関与が大きいことが明確となった。これらの結果から、抑肝散、特に構成生薬である甘草の有効成分である GL が、神経炎誘導性の低活動性せん妄の有効な治療薬になりうるということが明らかとなった。



## 論文審査の結果の要旨

	氏 名		川田 敬
審 査 委 員	主 査 氏 名	瀬尾 宏美	
	副 査 氏 名	数井 裕光	
	副 査 氏 名	河野 崇	

題 目      Yokukansan suppresses neuroinflammation in the hippocampus of mice and decreases the duration of lipopolysaccharide and diazepam-mediated loss of righting reflex induced by pentobarbital  
 ( 抑肝散はマウスの海馬の神経炎を抑制し、リポ多糖およびジアゼパムにより延長されたペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を短縮する )

著 者      Kei Kawada, Tomoaki Ishida, Kohei Jobu, Shumpei Morisawa, Tetsushi Kawazoe, Motoki Nishida, Satomi Nishimura, Naohisa Tamura, Saburo Yoshioka, Mitsuhiro Miyamura

発表誌名      Journal of natural medicines, 76 (3), 634-644, 2022 年 3 月

### 要 旨

【目的】手術などにより誘発される神経炎は過鎮静、せん妄などの認知機能の変化を引き起こす。せん妄は急性の認知機能の低下と定義され、入院期間の延長や死亡率の上昇と関連する。またせん妄は過活動型せん妄（激越、落ち着きのなさ、幻覚）と低活動型せん妄（過鎮静、反応性の低下、眠気）に分類され、過活動型せん妄は抗精神病薬による治療が一般的であるが、低活動型せん妄では有用な治療薬は開発されていない。

抑肝散は、本邦で医療用医薬品として承認されている漢方薬であり、神経症、不眠症、イライラ、幼児の興奮、認知症の周辺症状などの治療に広く使用されている。また近年、抑肝散は臨床において術後過活動型せん妄による周辺症状を効果的に改善することが報告されているが、その作用メカニズムは明らかではない。さらに、低活動型せん妄に対する効果の検証は行われていない。本研究では、術後の神経炎状態を模倣した神経炎モデルマウスを用いて、Lipopolysaccharide (LPS) およびジアゼパムで延長したペントバルビタール誘発性体向反射消失時間に対する抑肝散の効果を検証することを目的とした。また、海馬における抑肝散の抗神経炎作用を評価した。さらに、抑肝散の有効成分および、LPS刺激したマウスミクログリア由来BV2細胞に対する抑肝散の作用について検討した。最後に、抑肝散の成分のうち脳内移行性の報告があるGlycyrrhizic acid (GL)におけるペントバルビタール誘発性体向反射消失時間に対する効果を検証した。

【方法】動物実験：ICRマウス（週齢9-11週、雄性）を用いた。抑肝散は株式会社ツムラの医療用漢方エキスをを用いた。予防的に抑肝散(250, 500, 1,000 mg/kg)、抑肝散の成分であるGL(30, 50 mg/kg)又は精製水を経口投与した。各群マウスにLPSを腹腔内投与することで脳内炎症を惹起させた。LPS投与24時間後にジアゼパムおよびペントバルビタールを腹腔内投与し、過鎮静を誘発させる神経炎モデルマウスを作成し、抑肝散およびGLの過鎮静に対する効果を体向反射消失時間の測定により評価した。またLPS投与2時間後に海馬を摘出し、炎症性サイトカイン(IL-6、TNF- $\alpha$ )のmRNA発現量を定量PCR法にて測定し、さらにLPS投与24時間後に神経炎によりミクログリア細胞に特異的に発現するIba1を免疫組織染色し、Iba1陽性細胞数を比較した。

細胞実験：マウスミクログリア由来BV2細胞を24wellディッシュに播種し、LPS(1 $\mu$ g/mL)で刺激し、同時に抑肝散(0-1,000 $\mu$ g/mL)またはポジティブコントロールのDexamethasone(1 $\mu$ M)で共刺激した。37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした後、培養上清を回収し、一酸化窒素(NO)をGriess法で測定し、TNF- $\alpha$ およびIL-6についてELISA法を用いて測定した。

【結果】神経炎モデルマウスにおいて、LPS投与群ではペントバルビタール誘発性体向反射消失時間が有意に延長した。これに対し、抑肝散投与群(500および1000mg/kg)ではペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を有意に短縮した。またLPS投与2時間後、海馬におけるIL-6およびTNF- $\alpha$ のmRNA発現量が有意に増加した。これに対し、抑肝散投与によりIL-6およびTNF- $\alpha$ のmRNAの発現量は有意に減少した。さらにLPS投与により海馬のIba1陽性細胞数が有意に増加した。これに対し、抑肝散投与により、Iba1陽性細胞の増加が有意に抑制された。また抑肝散の成分であるGL(50 mg/kg)を投与することで、ペントバルビタール誘発性体向反射消失時間を部分的に減少させることが確認された。また、抑肝散はLPS刺激BV2細胞におけるNO、IL-6、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量を有意に減少した。

【考察】LPSによって誘発される炎症性サイトカインは、phosphatidylinositol 3-kinase/Akt経路を介して、海馬ニューロンにおけるGABA<sub>A</sub>受容体の表面発現の増加および、GABA誘発性塩化物イオンを増加させ、GABAの活性を増強する。さらに催眠作用のあるバルビツール酸は、GABAによるGABA<sub>A</sub>受容体の活性化を促進する。これらの反応は、低用量のGABA受容体アゴニストであるジアゼパムでさらに増強される。このように、LPSによる海馬の神経炎は、GABA活性を介して睡眠時間に影響を与え、低用量のジアゼパム投与によりペントバルビタール誘発性体向反射消失の持続時間を延長させる。また、GABA受容体作動薬は、実臨床において、炎症を誘発する手術や感染症時の鎮静や不眠の治療に頻用される。したがって、LPSおよびジアゼパムにより延長したペントバルビタール誘発性体向反射消失の持続時間を評価することは、術後の神経炎によるせん妄の評価に利用できると考えられる。

【結論】神経炎モデルマウスにおいて、抑肝散投与により海馬におけるNO、IL-6、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量の有意な抑制に伴い、Iba1陽性細胞数が有意に減少したことが明らかとなった。このことから、抑肝散投与により、神経炎が抑制され、GABA活性の過剰上昇が抑えられることで、LPS投与によるペントバルビタール誘発性体向反射消失時間の延長を抑制したと考えられる。また抑肝散の成分のうち、ペントバルビタール誘発性体向反射消失時間の抑制にはGLの関与が大きいことが明確となった。これらの結果から、抑肝散、特に構成生薬である甘草の有効成分であるGLが、神経炎誘導性の低活動性せん妄の有効な治療薬になりうるということが明らかとなった。

以上の発表の後、公開審査で質疑応答を行った。これらの内容をふまえ、審査委員一同は本論文が高知大学博士(医学)に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	杉浦 健太 (三重県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第145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	令和5年3月23日
学位論文題目	Very long-term prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy : a longitudinal study with a period of 20 years  (肥大型心筋症患者の超長期予後についての20年間の縦断的研究)
発表誌名	ESC Heart Failure 2022;9(4):2618-2625. 2022年6月2日
	<b>審査委員</b> 主査 教授 渡橋 和政 副査 教授 瀬尾 宏美 副査 教授 安田 誠史

### 論文の内容の要旨

### 論文審査の結果の要旨






# 学位論文要旨

論文題目	<p>氏名</p> <p>杉浦 健太</p>
<p>(論文要旨)</p> <p>目的</p> <p>肥大型心筋症は、生涯にわたるリモデリングを通じて病態が経時的に変化する life-long disease とされている。元々は突然死や心不全、塞栓症などにより予後不良の疾患とされていた。しかし、植え込み型除細動器の登場や、新規の抗凝固薬、心臓移植など治療戦略の変化により、肥大型心筋症の予後は以前と比較すると改善してきているとされる。一方で、肥大型心筋症の予後を検討したこれまでの報告は、追跡期間が 10 年程度までのものがほとんどであり、本疾患の実態を捉えるためには、さらに長期の経過を追う必要があると考えられた。本研究は、10 年以上に渡る肥大型心筋症患者の予後を明らかにすることを目的とした。</p> <p>方法と結果</p> <p>2000 年 12 月 31 日までに高知大学医学部附属病院で診断された連続した 102 例の肥大型心筋症患者について、臨床情報、臨床経過についてレトロスペクティブに分析した。102 例中 93 例 (91%) について詳細な臨床記録が得られた。93 例中 63 例 (68%) が男性で、初回評価時の平均年齢は 51.5 ± 13.0 歳であった。平均追跡期間は 19.6 ± 8.1 年 (中央値 20.1 年) であった。本研究では肥大型心筋症関連死亡を突然死、心不全死亡、塞栓症関連死亡と定義した。追跡期間内に肥大型心筋症関連死亡が 20 例 (21% [1.1%/年]) に発生した。肥大型心筋症関連有害事象 (肥大型心筋症関連死亡および非致死性肥大型心筋症関連有害事象：心不全による入院、塞栓性脳卒中入院、血行動態破綻を伴う持続性心室頻拍、植え込み型除細動器の適切作動) は 45 例 (48%) に発生した。追跡期間中の初回肥大型心筋症関連有害事象は、初回評価からの 10 年間、10 年目から 20 年目までの 10 年間、20 年目から 30 年目までの 10 年間の各 10 年間でそれぞれ、約 20% の患者に発生していた。このことから、診断から 10 年以上経過して初めて、肥大型心筋症関連有害事象を生じる患者が少なくないことが明らかとなった。初回評価時に心房細動を有する患者、拡張相肥大型心筋症の患者は、肥大型心筋症関連死亡の発生が有意に多いという結果であった。また、47 人の患者 (51%) が最終フォローアップ時に心房細動が記録されていた。初回評価時に拡張相肥大型心筋症と診断されていた患者は 7 人であり、22 人 (24%) が追跡期間中に拡張相肥大型心筋症に進行していた。</p> <p>考察</p> <p>本研究では、肥大型心筋症が life-long disease であるとの観点から、平均追跡期間 20 年の患者における肥大型心筋症の臨床経過を明らかにした。肥大型心筋症関連の死亡率は年間 1.1% と既報と比較しても同等に良好であったが、一方で、超長期間の経過観察では、約半数の患者が重篤な肥大型心筋症関連有害事象に罹患していた。中には、診断から 20 年以上経過して初めて肥大型心筋症関連の有害事象を発症した患者も見られた。また、心房細動や拡張相肥大型心筋症は HCM 関連有害事象と強い関連性を示していた。さらに、多くの患者が 20 年の経過中に心房細動や拡張相肥大型心筋症に移行していた。これらの結果から、本疾患が生涯にわたるフォローアップを必要とすることを示していると考えられた。</p>	

#### 結論

我々の患者コホートでは、肥大型心筋症関連の死亡率は比較的良好であった。しかし、20年の追跡期間中に約半数の患者が肥大型心筋症関連有害事象に罹患していた。肥大型心筋症は生涯にわたるリモデリングを認める疾患であるため、肥大型心筋症患者を長期にわたって注意深くフォローアップすることが重要である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	杉浦 健太
審 査 委 員	主 査 氏 名	渡橋 和政 
	副 査 氏 名	瀬尾 宏美 
	副 査 氏 名	安田 誠史 

題 目 Very long-term prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy : a longitudinal study with a period of 20 years

( 肥大型心筋症患者の超長期予後についての20年間の縦断的研究 )

著 者 Kenta Sugiura, Toru Kubo, Yuri Ochi, Kazuya Miyagawa, Yuichi Baba, Tatsuya Noguchi, Takayoshi Hirota, Naohito Yamasaki, Yoshinori L Doi, Hiroaki Kitaoka

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
ESC Heart Failure 2022;9(4):2618-2625. 2022年6月2日

### 要 旨

#### 【背景・目的】

肥大型心筋症は、生涯にわたりリモデリングが進行し、病態が経時的に変化するため「life-long disease」ととらえられている。1980年頃までは、若年患者の突然死が問題となる悪性の疾患と認識され、中年期以降で診断される症例が増えるにつれ2000年頃からは心不全や塞栓症も重要な致死的合併症として認識されてきた。しかし、植え込み型除細動器、新規抗凝固薬、心臓移植など新たな治療法の登場により予後は次第に改善してきている。しかし、肥大型心筋症の予後を検討したこれまでの報告はいずれも追跡期間が10年程度までで、患者が生涯にわたってどのような経過をたどるかという本疾患の実態を捉えるには、さらに長期の経過を追う必要があると考えられた。そこで、本研究では10年以上を視野に入れた肥大型心筋症患者の超長期予後を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

2000年12月31日以前に高知大学医学部附属病院で肥大型心筋症と診断された、連続102例の患者の診断時の臨床情報と、2017年12月31日までの期間で最後に高知大学医学部附属病院または高



知県内の連携施設を受診した時までの臨床経過との関連をレトロスペクティブに解析した。102例中93例（91％）で、詳細な臨床記録が得られた。内訳は、93例中63例（68％）が男性、初回評価時の平均年齢は $51.5 \pm 13.0$ 歳であり、平均追跡期間は $19.6 \pm 8.1$ 年（中央値20.1年）であった。本疾患においてもっとも重要である「肥大型心筋症関連死亡」を、突然死、心不全死亡、塞栓症関連死亡と定義した。

#### 【結果】

追跡期間内に「肥大型心筋症関連死亡」を20例（21％ [1.1％/年]）に認め、心不全による入院、塞栓性脳卒中入院、血行動態破綻を伴う持続性心室頻拍、植込み型除細動器の適切作動など「非致命的肥大型心筋症関連有害事象」をこれに加えた「肥大型心筋症関連有害事象」は、45例（48％）に発生した。次に、肥大型心筋症関連有害事象の初回発症の時期を初回評価から10年間、10年目から20年目までの10年間、20年目から30年目までの10年間と3つの時期に分けて検討したところ、それぞれ約20％の患者に発生しており、診断から10年以上経過して初めて有害事象を生じる患者が少なくないことが明らかとなった。また、初回評価時に心房細動を有する患者、拡張相肥大型心筋症の患者は、肥大型心筋症関連死亡の発生が有意に多いという結果が得られ、最終フォローアップ時には47人の患者（51％）で心房細動が記録されていた。拡張相肥大型心筋症は、初回評価の時点ですでに7人に認められており、追跡期間中に22人（24％）が拡張相肥大型心筋症に進行していた。

#### 【考察】

肥大型心筋症がlife-long diseaseであるとの観点から、本研究では平均追跡期間20年の臨床経過を解析した結果、肥大型心筋症関連死亡率は年間1.1％と既報と同等だったが、超長期間の経過をみると、約半数で重篤な肥大型心筋症関連有害事象をきたしており、診断から20年以上経過して初めて肥大型心筋症関連の有害事象を発症した患者もあった。また、心房細動や拡張相肥大型心筋症は肥大型心筋症関連有害事象と強い関連性を示していた。さらに、多くの患者では、20年の経過中に心房細動や拡張相肥大型心筋症に移行していた。これらの結果は、本疾患が生涯にわたるフォローアップを必要とすることを示していると考えられた。

#### 【結論】

申請者らの患者コホートでは、肥大型心筋症関連の死亡率は比較的良好であった。しかし、20年の追跡期間中に約半数の患者が肥大型心筋症関連有害事象をきたしていた。肥大型心筋症は生涯にわたるリモデリングを認める疾患であるため、肥大型心筋症患者を長期にわたって注意深くフォローアップすることが重要である。

以上のように、本論文は、これまで報告のない肥大型心筋症患者の20年にわたる超長期予後を経過率91％という高いフォローアップ率のデータから解析し、診断後20年以上経過して初めて有害事象をきたす症例が少なくないことを明らかにしたものであり、本疾患が生涯を通じフォローアップすべきというエビデンスを初めて出しており、医学的に高い価値を有するものである。よって、審査委員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	横田 啓一郎 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第146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	令和5年3月23日
学位論文題目	Anti-Glypican-1 Antibody-drug Conjugate as Potential Therapy Against Tumor Cells and Tumor Vasculature For Glypican-1-Positive Cholangiocarcinoma  (Glypican-1を標的とした抗体薬物複合体(ADC: Antibody-drug conjugate)による胆管癌の新規治療開発)
発表誌名	Molecular Cancer Therapeutics 20(9):1713-1722, 2021年9月
	<b>審査委員</b>
	主査 教授 佐竹 悠良
	副査 教授 内田 一茂
	副査 教授 降幡 睦夫

### 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	横田 啓一郎
論文題目	Anti-Glypican-1 Antibody-drug Conjugate as Potential Therapy Against Tumor Cells and Tumor Vasculature For Glypican-1-Positive Cholangiocarcinoma ( Glypican-1 を標的とした抗体薬物複合体(ADC: Antibody-drug conjugate)による胆管癌の新規治療開発 )
<p>(論文要旨)</p> <p><b>背景・目的：</b>          胆管癌は難治性癌の一つであり、多くの患者で化学療法が行われている。しかし、その予後は不良であるため、胆管癌の新規治療の開発が必要とされている。我々は、抗体医薬に用いる新規癌抗原として、Glypican-1 (GPC1) を発見した。GPC1 は細胞表面の膜タンパク質であり、細胞の増殖や接着に関与している。また、我々は、GPC1 は膵癌や食道癌で高発現しており、予後不良因子と関連があることを報告した。そして、抗 GPC1 抗体にリンカーを介して抗癌剤を結合させた抗体薬物複合体 (ADC: Antibody-drug conjugate) を創薬し、膵癌や食道癌に優れた薬効を示すことを報告した。通常の抗癌剤治療では、薬剤を全身投与するため、正常組織への毒性を避けることができないが、GPC1-ADC を用いることで、GPC1 を発現している癌細胞特異的に抗腫瘍効果を発揮し、副作用を少なくすることが可能となる。本研究では、GPC1 を標的とした ADC によって難治性癌である胆管癌の新規治療開発を目的とした。</p> <p><b>方法：</b>          肝外胆管癌の臨床検体 49 例に対して免疫組織化学染色を行い、GPC1 の発現を評価し、予後との関連を解析した。胆管癌の細胞株においても、GPC1 の発現をフローサイトメトリーにて評価した。GPC1 陽性の胆管癌細胞株において、CRISPR/CAS9 システムを用いて GPC1 ノックアウト株を作成した。抗 GPC1 抗体に微小管重合阻害剤である MMAF (monomethyl auristain F) をコンジュゲートした GPC1-ADC を用いて、胆管癌細胞株に対する抗腫瘍効果を <i>in vitro</i> で評価した。また、これらの細胞株をマウスの皮下に移植し、xenograft モデルを作成して、<i>in vivo</i> における GPC1-ADC の効果を評価した。MMAF は微小管重合阻害剤であり、細胞周期を G2/M 期で停止させる作用があるため、GPC1-ADC 投与後の細胞周期についても解析を行った。</p> <p><b>結果・考察：</b>          肝外胆管癌の臨床検体 49 例に対して免疫組織化学染色を行うと、47%の症例で GPC1 が高度に発現しており、GPC1 の高発現群は Disease free survival、Overall survival とともに予後が不良であった。胆管癌細胞株において、フローサイトメトリーにて GPC1 が高発現していることを確認した。また、GPC1 をノックアウトした胆管癌細胞株を作成し、フローサイトメトリーで GPC1 の陰性を確認した。<i>In vitro</i> での薬効試験では、GPC1-ADC は GPC1 陽性の胆管癌細胞株に対して強い抗腫瘍効果を認めしたが、GPC1 ノックアウト細胞株に対しては抗腫瘍効果を認めなかった。また、<i>In vitro</i> において、GPC1-ADC は GPC1 陽性の胆管癌細胞株に対してアポトーシスを誘導すること、G2/M 期での細胞周期停止を誘導することを確認した。<i>In vivo</i> の薬効試験において、GPC1-ADC は GPC1 陽性腫瘍に対して用量依存的に増殖阻害効果を認めた。この腫瘍をマウスから摘出して、免疫組織化学染色を行い、GPC1-ADC が <i>in vivo</i> においても細胞周期を G2/M 期で停止させることを確認した。GPC1 ノックアウトの腫瘍に対して、GPC1-ADC は薬効を示さないと考えていたが、実際には部分的な抗腫瘍効果を認めた。この腫瘍をマウスから摘出し、蛍光顕微鏡で観察すると、腫瘍部分は GPC1 陰性であったが、マウス由来である腫瘍内の血管内皮細胞において GPC1 が発現していた。また、この腫瘍に対して、血管内皮細胞のマーカーである CD31 と G2/M 期のマーカーである phospho-Histone H3 (Ser10) で蛍</p>	






光二重染色を行い、GPC1-ADC の投与による血管内皮細胞の G2/M 期での細胞周期停止を認めた。GPC1-ADC は、腫瘍の血管新生を阻害することで間接的な抗腫瘍効果を有することが示唆された。

**結論：**

GPC1 は胆管癌の臨床検体・細胞株において発現していた。GPC1 を高発現する胆管癌は有意に予後不良であった。*In vitro/in vivo*において、GPC1 陽性の胆管癌細胞株に対する GPC1-ADC の抗腫瘍効果を確認した。GPC1-ADC は腫瘍細胞に対する直接的効果だけでなく、腫瘍血管の血管新生阻害による間接的効果も認めた。GPC1-ADC は胆管癌に対する新規治療となり得る可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	横田 啓一郎
審査委員	主査氏名	佐竹 悠良 
	副査氏名	内田 一茂 
	副査氏名	降幡 睦夫 

題目 Anti-Glypican-1 Antibody- drug Conjugate as Potential Therapy Against Tumor Cells and Tumor Vasculature For Glypican-1- Positive Cholangiocarcinoma

( Glypican-1 を標的とした抗体薬物複合体 (ADC: Antibody-drug conjugate) による胆管癌の新規治療開発 )

著者 Keiichiro Yokota, Satoshi Serada, Shigehiro Tsujii, Keisuke Toya, Tsuyoshi Takahashi, Takashi Matsunaga, Minoru Fujimoto, Sunao Uemura, Tsutomu Namikawa, Ichiro Murakami, Shogo Kobayashi, Hidetoshi Eguchi, Yuichiro Doki, Kazuhiro Hanazaki, Tetsuji Naka

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Molecular Cancer Therapeutics 20(9):1713-1722, 2021年9月

### 要 旨

#### 【背景・目的】

胆管癌は難治性癌であり、新規治療の開発が必要とされている。筆者らは既に細胞の増殖や接着に関与している細胞表面の膜タンパク質である Glypican-1 (GPC1) が膵癌や食道扁平上皮癌で高発現しており、予後不良因子であることを報告している。また、抗 GPC1 抗体にリンカーを介して微小管重合阻害剤である MMAF (monomethyl auristain F) を結合させた抗体薬物複合体 (ADC: Antibody-drug conjugate) を創製し、膵癌や食道癌に優れた薬効を示すことを報告した。本研究では、GPC1-ADC によって難治性癌である胆管癌の新規治療開発を目的とした。

#### 【方法】

肝外胆管癌の臨床検体 49 例に対して免疫組織化学 (IHC) 染色を行い、GPC1 の発現を評価し、予後との関連を解析した。胆管癌の細胞株においても、GPC1 の発現をフローサイトメトリーにて評価した。GPC1 陽性胆管癌細胞株において、CRISPR/Cas9 システムを用いて GPC1 ノックアウト株を作成した。GPC1-ADC を用いて、胆管癌細胞株に対する抗腫瘍効果を *in vitro* で評価した。また、これらの細胞株をマウスの皮下に移植し、xenograft モデルを作成し、*in vivo* における GPC1-ADC

の効果を評価した。

#### 【結果・考察】

肝外胆管癌の臨床検体 49 例に対して免疫組織化学(IHC)染色を行うと、96%の症例において GPC1 発現を認め、うち 47%は GPC1 高発現であり、GPC1 高発現群は低発現群に比し、Disease free survival、Overall survival とともに不良であり、予後不良因子であることが示唆された。

*In vitro* での薬効試験では、GPC1-ADC は GPC1 陽性の胆管癌細胞株に対して強い抗腫瘍効果を認めたが、GPC1 ノックアウト細胞株に対しては抗腫瘍効果を認めなかった。また、*In vitro* において、GPC1-ADC は GPC1 陽性の胆管癌細胞株に対してアポトーシスを誘導すること、G2/M 期での細胞周期停止を誘導することが確認された。

*In vivo* の薬効試験において、GPC1-ADC は GPC1 陽性腫瘍に対して用量依存的に増殖阻害効果を認めた。同腫瘍をマウスから摘出して、免疫組織化学染色を行い、*in vivo* における GPC1-ADC による G2/M 期での細胞周期停止を確認した。

一方、GPC1 ノックアウトの腫瘍に対して、GPC1-ADC は薬効を示さないと考えていたが、実際には部分的な抗腫瘍効果を認めた。同腫瘍をマウスから摘出し、蛍光顕微鏡で観察すると、腫瘍部分の GPC1 は陰性であったが、マウス由来である腫瘍内血管内皮細胞において GPC1 の発現を認めた。また、同腫瘍に対して、血管内皮細胞マーカーである CD31 及び G2/M 期マーカーである phospho-Histone H3(Ser10)による蛍光二重染色では、GPC1-ADC 投与による血管内皮細胞の G2/M 期での細胞周期停止を認め、GPC1-ADC は腫瘍の血管新生を阻害することで間接的な抗腫瘍効果を有することが示唆された。

#### 【結論】

GPC1は胆管癌の臨床検体・細胞株において発現していた。GPC1を高発現する胆管癌は有意に予後不良であった。*In vitro/in vivo*において、GPC1陽性胆管癌細胞株に対するGPC1-ADCの抗腫瘍効果を確認した。GPC1-ADCは腫瘍細胞に対する直接的効果だけでなく、腫瘍血管の血管新生阻害による間接的効果も示唆された。GPC1-ADCは胆管癌に対する新規治療となり得る可能性を示した。

以上の発表の後、公開審査で質疑応答を行った。これらの内容をふまえ、審査委員一同は本論文が高知大学博士(医学)に相応しい価値あるものと判断した。



氏名(本籍)	盛實 篤史	(高知県)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	甲総医博第147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	令和5年3月23日	
学位論文題目	<i>Staphylococcus aureus</i> nasal colonization increases the risk of cedar pollinosis (黄色ブドウ球菌の鼻腔内定着がスギ花粉症のリスクとなる)	
発表誌名	J Gen Fam Med. 2022 Mar 1;23(3):172-176. 2022年5月	
	<b>審査委員</b>	
	主査	教授 兵頭 政光
	副査	教授 藤枝 幹也
	副査	教授 菅沼 成文

### 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	盛實 篤史
論文題目	<p><i>Staphylococcus aureus</i> nasal colonization increases the risk of cedar pollinosis (黄色ブドウ球菌の鼻腔内定着がスギ花粉症のリスクとなる)</p>	
<p>(論文要旨)</p> <p><b>【背景】</b>            TSST-1やSEBなど黄色ブドウ球菌のスーパー抗原はアトピーに特異的なアレルゲンにさらされたアトピー患者のIgE応答を増強するという報告がある。スギ花粉症はアレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、結膜炎などの症状を示すIgE介在型I型アレルギーであり、黄色ブドウ球菌のスーパー抗原がスギ花粉症の発症を増強している可能性がある。したがって黄色ブドウ球菌が定着していることが、スギ花粉症の有病率上昇に寄与している可能性がある。</p> <p>黄色ブドウ球菌のスーパー抗原は制限修飾系の制御下で水平方向の遺伝子導入により得られ、標的特異性を担う構成遺伝子のhsdSはclonal complex (CC) と完全に相関し、スギ花粉症にスーパー抗原が関与しているとすればCCとの相関があると予想される。クオラムセンシングシステムであるアクセサリ遺伝子レギュレーター (Agr) は黄色ブドウ球菌のスーパー抗原の発現を制御し、黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子発現を変動させ、宿主のIgE応答に影響を与える。</p> <p><b>【目的】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 鼻腔内の黄色ブドウ球菌定着が、スギ花粉症の有病率を高めるかどうかを疫学的に検討する</li> <li>② スギ花粉症の有病率上昇に寄与していると考えられる黄色ブドウ球菌の集団構造をCC、Agrタイプを通じて検討する</li> </ol> <p><b>【方法】</b>            本研究は高知大学倫理委員会により承認、ヘルシンキ宣言に準拠して研究を実施し、被験者から研究へのデータ使用についてインフォームドコンセントを得たうえで、2008年の花粉飛散シーズン終了直後の6～7月に実施した。</p> <p>2つの地域を選択しA県、B県とした。A県は森林の55%がスギ、他にヒノキが花粉の生産源で、B県のスギ、ヒノキ林の面積はA県の7%である。スーパーマーケット従業員814名 (A県531名、B県283名、平均年齢はA県で43.8歳、B県で42.8歳、女性参加者の割合はA県で69%、B県で46%) に対し、質問票を用いてデータ (性別、年齢、スギ花粉症歴、症状の持続期間) を入手した。2008年シーズンに症状があった参加者のみを花粉症ありとした。</p> <p>鼻腔スワブを採取し黄色ブドウ球菌を検出した。培養にはブドウ球菌用培地 (Staphylococcus Medium 110, 5%egg yolk)、トリプチケースソイ羊血液寒天培地、MRSA選択培地を用いた。MRSA同定はAPI Staphを用い、fem A遺伝子とfem B遺伝子はPCRを行い同定し、MLST website でST typeを決定した。</p> <p>統計解析はSPSS version 19.0を用い、カイ二乗検定、Studentのt検定、重回帰分析により様々な状況での花粉症有病率を比較した。</p>		

**【結果】**

重回帰分析では女性、都道府県、黄色ブドウ球菌定着が独立してスギ花粉症リスクを増加した。

黄色ブドウ球菌の CC とスギ花粉症有病率の関連性に関して、CC30 (43%)、CC5 (0%) で有病率の高低が見られたが、全体として CC によるスギ花粉症の有病率に関して統計学的に違いはなかった。

黄色ブドウ球菌の Agr タイプとスギ花粉症有病率の関連性については、いずれの Agr タイプもスギ花粉症の有病率を増加させなかった。

黄色ブドウ球菌の集団構造に関して、両県で 18 以上の CC が観察されたが、CC508 を除き、両県で有意差は認められなかった。

黄色ブドウ球菌の定着率は、A 県または女性で高いというわけではなかった。

**【考察】**

女性、A 県在住、鼻腔内の黄色ブドウ球菌定着がスギ花粉症の独立した危険因子であることが分かった。一方 CC 間でリスクの強さに差はないことが分かった。これは他のクローンよりも疾患を引き起こす可能性が高い CC30 は日本での分離率が低く、研究結果に反映されなかった可能性がある。

また黄色ブドウ球菌のスーパー抗原はアレルギー疾患の発症に関与しており、病原性に関わる Agr タイプは黄色ブドウ球菌とスギ花粉症の相互作用の強さを反映していると予想したが、研究結果によると全ての Agr 株がほぼ同じスギ花粉症頻度を持つことを示し、病原性遺伝子の種類とスギ花粉症発生の相関は証明できなかった。

**【本研究の限界】**

本研究のコホートには 62 歳未満の人しか含まれておらず、サンプリングバイアスの可能性がある。さらにスギ花粉症の臨床診断は医師の診察ではなく書面で行われたため、他の疾患を分離することが困難な場合がある。また日本の 2 地域で実施した研究であり、国内の状況として一般化することが困難かもしれない。

なお MLST の識別力は黄色ブドウ球菌の多様性を判断するのに十分でない可能性があり、Multiplex PCR 法による SCCmec タイピングを含めることでデータの妥当性をより高めることができるかもしれない。




**【まとめ】**

黄色ブドウ球菌の鼻腔内定着がスギ花粉症のリスクファクターであることが分かった。

花粉症発症の直接的なメカニズムは今のところ不明で、より多くの地域、対象者で黄色ブドウ球菌の集団構造とスギ花粉症の有病率との関連性を解析する必要がある。



## 論文審査の結果の要旨

		氏 名	盛實 篤史
審 査 委 員	主 査 氏 名	兵頭 政光	
	副 査 氏 名	藤枝 幹也	
	副 査 氏 名	菅沼 成文	

題 目 Staphylococcus aureus nasal colonization increases the risk of cedar pollinosis (黄色ブドウ球菌の鼻腔内定着がスギ花粉症のリスクとなる)

著 者 Atsushi Morizane, Yoshio Uehara, Satoko Kitamura, Masahiro Komori, Masahide Matsushita, Seisho Takeuchi, Hiromi Seo

発表誌名 J Gen Fam Med. 2022; 23(3): 172-176. 2022年5月

### 要 旨

#### 【背景】

TSST-1 や SEB など黄色ブドウ球菌のスーパー抗原はアトピーに特異的なアレルゲンにさらされたアトピー患者の IgE 応答を増強するという報告がある。スギ花粉症はアレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、結膜炎などの症状を示す IgE 介在型 I 型アレルギーであり、黄色ブドウ球菌のスーパー抗原がスギ花粉症の発症を増強している可能性がある。したがって黄色ブドウ球菌が鼻孔部に定着していることが、スギ花粉症の有病率上昇に寄与している可能性がある。

黄色ブドウ球菌のスーパー抗原は制限修飾系の制御下で水平方向の遺伝子導入により得られ、標的特異性を担う構成遺伝子の hsdS は clonal complex (CC) と完全に相関し、スギ花粉症にスーパー抗原が関与しているとすれば CC との相関があると予想される。クオラムセンシングシステムであるアクセサリ遺伝子レギュレーター (Agr) は黄色ブドウ球菌のスーパー抗原の発現を制御し、黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子発現を変動させ、宿主の IgE 応答に影響を与える。

#### 【目的】

- ①鼻腔内の黄色ブドウ球菌定着が、スギ花粉症の有病率を高めるかどうかを疫学的に検討する
- ②スギ花粉症の有病率上昇に寄与していると考えられる黄色ブドウ球菌の集団構造を CC、Agr タイプを通じて検討する

#### 【方法】

高知大学倫理委員会により承認、ヘルシンキ宣言に準拠して研究を実施し、被験者から研究へのデータ使用についてインフォームドコンセントを得たうえで、2008年の花粉飛散シーズン終了直後の6~7月に実施した。

2つの地域を選択しA県、B県とした。A県は森林の55%がスギ、他にヒノキが花粉の生産源で、B県のスギ、ヒノキ林の面積はA県の7%である。スーパーマーケット従業員814名(A県531名、B県283名、平均年齢はA県で43.8歳、B県で42.8歳、女性の割合はA県で69%、B県で46%)に対し、質問票を用いてデータ(性別、年齢、スギ花粉症歴、症状の持続期間)を入手した。2008年シーズンに症状があった参加者のみを花粉症ありとした。

鼻腔スワブを採取し黄色ブドウ球菌を検出した。培養にはブドウ球菌用培地(Staphylococcus Medium 110, 5%egg yolk)、トリプチケースソイ羊血液寒天培地、MRSA 選択培地を用いた。MRSA 同定はAPI Staphを用い、fem A 遺伝子とfem B 遺伝子はPCRを行い同定し、MLST website でST typeを決定した。

統計解析はSPSS version 19.0を用い、カイ二乗検定、Studentのt検定、重回帰分析により様々な状況での花粉症有病率を比較した。

#### 【結果】

重回帰分析では女性、都道府県、黄色ブドウ球菌定着が独立してスギ花粉症リスクを増加した。黄色ブドウ球菌のCCとスギ花粉症有病率の関連性に関して、CC30(43%)、CC5(0%)で有病率の高低が見られたが、全体としてCCによるスギ花粉症の有病率に関して統計学的に違いはなかった。黄色ブドウ球菌のAgrタイプとスギ花粉症有病率の関連性については、いずれのAgrタイプもスギ花粉症の有病率を増加させなかった。黄色ブドウ球菌の集団構造に関して、両県で18以上のCCが観察されたが、CC508を除き、両県で有意差は認められなかった。

#### 【考察】

女性、A県在住、鼻腔内の黄色ブドウ球菌定着がスギ花粉症の独立した危険因子であることが分かった。一方CC間でリスクの強さに差はないことが分かった。これは他のクローンよりも疾患を引き起こす可能性が高いCC30は日本での分離率が低く、研究結果に反映されなかった可能性がある。また黄色ブドウ球菌のスーパー抗原はアレルギー疾患の発症に関与しており、病原性に関わるAgrタイプは黄色ブドウ球菌とスギ花粉症の相互作用の強さを反映していると予想したが、研究結果によると全てのAgr株がほぼ同じスギ花粉症頻度を持つことを示し、病原性遺伝子の種類とスギ花粉症発生の相関は証明できなかった。

#### 【本研究の限界】

本研究のコホートには62歳未満の人しか含まれていないこと、スギ花粉症の臨床診断は医師の診察ではなく書面で行われたため、他の疾患を分離することが困難な場合があることなどの問題がある。また日本の2地域で実施した研究であり、国内全体の状況として一般化することは困難かもしれない。なおMLSTの識別力は黄色ブドウ球菌の多様性を判断するのに十分でない可能性があり、Multiplex PCR法によるSCCmecタイピングを含めることでデータの妥当性をより高めることができるのではないかと考えている。

#### 【まとめ】

黄色ブドウ球菌の鼻腔内定着がスギ花粉症のリスクファクターであることが分かった。花粉症発症の直接的なメカニズムは今のところ不明で、より多くの地域、対象者で黄色ブドウ球菌の集団構造とスギ花粉症の有病率との関連性を解析する必要がある。

学位論文審査は2022年11月15日の18:00から約1時間にわたり対面形式で実施した。まず、公開にて研究内容の発表が行われ、それに対する質疑応答を行った。質疑では、被験者をスーパーの従業員とした理由、鼻腔内定着の基準、統計解析の手法およびその妥当性、黄色ブドウ球菌の有無によるアレルギー性鼻炎の重症度の違い、鼻孔部の除菌による症状改善の可能性などについて質問があり、申請者は概ね的確に回答し、あわせて今後の研究の発展性についても述べた。以上を踏まえ、審査委員一同は本論文が高知大学博士(医学)に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	久野 貴平 (大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第66号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	令和5年1月17日
学位論文題目	5-Aminolevulinic acid has the potential to prevent bladder dysfunction in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis  (5-アミノレブリン酸はシクロホスファミド誘発性出血性膀胱炎による膀胱機能障害を予防する可能性を有する)
発表誌名	International Journal of Urology, 2022 Aug;29(8):897-904 2022年8月 Epub:2022年5月18日
	<b>審査委員</b> 主査 教授 宮村 充彦 副査 教授 山口 正洋 副査 教授 北岡 裕章

### 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	久野 貴平
論 文 題 目	5-Aminolevulinic acid has the potential to prevent bladder dysfunction in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis (5-アミノレブリン酸はシクロホスファミド誘発性出血性膀胱炎による膀胱機能障害を予防する可能性を有する)	
(論文要旨)		
<p>[目的]</p> <p>シクロホスファミド (CYP) は最も広く使用されている化学療法薬の 1 つである。CYP の代謝産物であるアクロレインは尿中に排泄され、膀胱に蓄積して膀胱壁に毒性作用をもたらし、出血性膀胱炎 (HC) を引き起こす。現状 HC 予防には 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウムの投与と水分補給が最も頻繁に使用される方法だが、必ずしも効果的とは限らず、すべての患者に適応されるわけではない。CYP による化学療法は、この尿路毒性によってしばしば中断を余儀なくされるため、HC に対する新しい治療薬が望まれる。CYP 誘発性 HC は炎症プロセスによって仲介されるため、抗炎症作用を持つ化合物は、CYP 治療中の副作用軽減に有益な新規薬物となる可能性がある。</p> <p>5-アミノレブリン酸(5-ALA)は生体内に存在する天然のアミノ酸である。5-ALA はプロトポルフィリン IX(PpIX) に代謝され、鉄イオンが PpIX に挿入されることにより、ヘムとヘムタンパク質が生成される。これらの 5-ALA 由来分子は、ミトコンドリアにおけるエネルギー生成に重要な役割を果たしており、5-ALA とクエン酸第一鉄ナトリウム(5-ALA/SFC)の同時投与は、呼吸鎖に関与するヘムタンパク質の発現をアップレギュレートすることにより、ミトコンドリア機能を改善すると報告されている。さらに、5-ALA は抗酸化・抗炎症作用を有するヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の発現を亢進させることが報告されている。ミトコンドリアの代謝経路は、炎症経路の重要な調節因子であり、ミトコンドリアの機能不全は、老化や 2 型糖尿病、神経変性疾患、癌、炎症性疾患などの病状に関与している。このような細胞老化の一因として、ミトコンドリアの機能障害とそれに伴う活性酸素種の産生増加が考えられており、下部尿路機能障害 (LUTD) の病因の 1 つも、膀胱におけるミトコンドリアの機能障害による酸化ストレスの増加であると考えられている。そのため、炎症とミトコンドリア機能障害は、LUTD の治療標的となる可能性がある。以上を踏まえ本研究では、CYP 誘発性 HC における膀胱機能障害に対する 5-ALA/SFC 前処理の効果解明を目的とした。</p> <p>[方法]</p> <p>13～15 週齢の雄性 Wistar ラット (340～460g) をランダムに次の 4 群に分けた。(1)Vehicle-1+Vehicle-2(V1+V2)、(2)Vehicle-1+CYP(V1+CYP)、(3)低用量 5-ALA/SFC + CYP (ALA100+CYP)、(4)高用量 5-ALA/SFC+CYP(ALA300+CYP)。各ラットに、Vehicle-1 (生理食塩水、10ml/kg/日) または 5-ALA/SFC (低用量:100 および 157mg/kg/日、高用量:300 およ</p>		

び 471mg/kg/日) を 1 日 1 回 7 日間経口投与した。6 日目に、Vehicle-2(生理食塩水、5ml/kg) または CYP(150mg/kg) を腹腔内投与した。8 日目 (5-ALA/SFC または Vehicle-1 の最終投与の翌日) に、ウレタン麻酔 (0.8g/kg、腹腔内投与) 下に、膀胱内圧測定 (生理食塩水、4ml/h) を膀胱にカテーテルを刺入して実施した。膀胱内圧測定後、膀胱組織を摘出し、HE 染色、ELISA およびリアルタイム PCR を行った。

#### [結果]

CYP 群は、対照群に比して排尿間隔(ICI)を大幅に短縮し、膀胱コンプライアンス(Comp)を減少させ、排尿後の残尿量(Rv)を変えないことなく、排尿を伴わない膀胱収縮(NVC)数を増加させた。ICIからは排尿の頻度、Compからは膀胱の伸展性の程度を評価できる。NVCは8cmH<sub>2</sub>O以上の排尿圧を認めるも、排尿に至らなかった膀胱収縮と定義した。これらのCYPによるICIおよびNVC数の変化は、高用量5-ALA/SFC前処理によって有意に抑制され、V1+V2群とALA300+CYP群の間でCompに有意差は認めなかった。よって、CYPによるこれらパラメーターの異常が高用量5-ALA/SFC前処理により改善したことを受け、膀胱組織の組織学および*in vitro*解析は、V1+V2、V1+CYP、およびALA300+CYPの3群で行った。




組織学的分析では、CYP群は対照群に比して膀胱の病理学的スコア(好中球浸潤、出血、および浮腫)を増加させ、高用量5-ALA/SFC前処理は、CYP誘発性の好中球浸潤/出血スコア増加を有意に改善した。*In vitro*解析では、CYPは膀胱における好中球浸潤のマーカであるミエロペルオキシダーゼ(MPO)のタンパク質レベルを増加させたが、V1+V2群とALA300+CYP群の間でMPOレベルに有意差は認めなかった。CYP投与は膀胱内のHO-1 mRNAレベルに有意な変化を示さなかったが、HO-1レベルはV1+V群2よりもALA300+CYP群で有意に上昇した。

#### [結語]

5-ALA前処理は、HO-1のアップレギュレーションを介して膀胱の炎症を改善することにより、CYP誘発性HCによる膀胱機能障害に対する保護効果を有する可能性が考えられた。したがって、5-ALAはCYP化学療法によって誘発される副作用であるHCに対する新たな保護薬候補となる可能性が示唆された。



## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	久野 貴平
審査委員	主 査 氏 名 宮村 充彦	
	副 査 氏 名 山口 正洋	
	副 査 氏 名 北岡 裕章	

題 目 5-Aminolevulinic acid has the potential to prevent bladder dysfunction in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis  
(5-アミノレブリン酸はシクロホスファミド誘発性出血性膀胱炎による膀胱機能障害を予防する可能性を有する)

著 者

Takahira Kuno, Takahiro Shimizu, Chiaki Kawada, Atsushi Kurabayashi, Suo Zou, Hiroki Mogawa, Masayuki Tsuda, Motoaki Saito, Keiji Inoue

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
International Journal of Urology, 2022 Aug;29(8):897-904  
2022年8月 Epub:2022年5月18日

要 旨

### 【背景・目的】

シクロホスファミド (CYP) は最も広く使用されている化学療法薬の1つである。CYPの代謝産物であるアクロレインは尿中に排泄され、膀胱に蓄積して膀胱壁に毒性作用をもたらし、出血性膀胱炎 (HC) を引き起こす。現状 HC 予防には 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウムの投与と水分補給が最も頻繁に使用される方法だが、必ずしも効果的とは限らず、すべての患者に適応されるわけではない。CYP による化学療法は、この尿路毒性によってしばしば中断を余儀なくされるため、HC に対する新しい治療薬が望まれる。CYP 誘発性 HC は炎症プロセスによって仲介されるため、抗炎症作用を持つ化合物は、CYP 治療中の副作用軽減に有益な新規薬物となる可能性がある。

5-アミノレブリン酸(5-ALA)は生体内に存在する天然のアミノ酸である。5-ALA はプロトポルフィリン IX(PpIX) に代謝され、鉄イオンが PpIX に挿入されることにより、ヘムとヘムタンパク質が生成される。これらの 5-ALA 由来分子は、ミトコンドリアにおけるエネルギー生成に重要な役割を果たしており、5-ALA とクエン酸第一鉄ナトリウム(5-ALA/SFC)の同時投与は、呼吸鎖に関与するヘムタンパク質の発現をアップレギュレートすることにより、ミトコンドリア機能を改善すると報告されている。さらに、5-ALA は抗酸化・抗炎症作用を有するヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の発現を亢進させることが報告されている。ミトコンドリアの代謝経路は、炎症経路の重要な調節因子であり、ミトコンドリアの機能不全は、老化や 2 型糖尿病、神経変性疾患、癌、炎症性疾患などの病状に関与している。このような細胞老化の一因として、ミトコンドリアの機能障害とそれに伴う活性酸素種の産生増加が考えられており、下部尿路機能障害 (LUTD) の病因の 1 つも、膀胱におけるミトコンドリアの機能障害による酸化ストレスの増加であると考えられている。そのため、炎症とミトコンドリア機能障害は、LUTD の治療標的となる可能性がある。以上を踏まえ、学位



申請者は、本研究において、CYP 誘発性 HC における膀胱機能障害に対する 5-ALA/SFC 前処理の効果解明を目的として検討した。

#### 【方法】

13～15 週齢の雄性 Wistar ラット (340～460g) をランダムに次の 4 群に分けた。(1) Vehicle-1+Vehicle-2(V1+V2)、(2) Vehicle-1+CYP(V1+CYP)、(3) 低用量 5-ALA/SFC + CYP (ALA100+CYP)、(4) 高用量 5-ALA/SFC+CYP(ALA300+CYP)。各ラットに、Vehicle-1 (生理食塩水、10ml/kg/日) または 5-ALA/SFC (低用量:100 および 157mg/kg/日、高用量:300 および 471mg/kg/日) を 1 日 1 回 7 日間経口投与した。6 日目に、Vehicle-2 (生理食塩水、5ml/kg) または CYP (150mg/kg) を腹腔内投与した。8 日目 (5-ALA/SFC または Vehicle-1 の最終投与の翌日) に、ウレタン麻酔 (0.8g/kg、腹腔内投与) 下に、膀胱内圧測定 (生理食塩水、4ml/h) を膀胱にカテーテルを刺入して実施した。膀胱内圧測定後、膀胱組織を摘出し、HE 染色、ELISA およびリアルタイム PCR を行った。

#### 【結果・考察】

CYP 群は、対照群に比して排尿間隔 (ICI) を大幅に短縮し、膀胱コンプライアンス (Comp) を減少させ、排尿後の残尿量 (Rv) を変えることなく、排尿を伴わない膀胱収縮 (NVC) 数を増加させた。ICI からは排尿の頻度、Comp からは膀胱の伸展性の程度を評価できる。NVC は 8cmH<sub>2</sub>O 以上の排尿圧を認めるも、排尿に至らなかった膀胱収縮と定義した。これらの CYP による ICI および NVC 数の変化は、高用量 5-ALA/SFC 前処理によって有意に抑制され、V1+V2 群と ALA300+CYP 群の間で Comp に有意差は認めなかった。よって、CYP によるこれらパラメーターの異常が高用量 5-ALA/SFC 前処理により改善したことを受け、膀胱組織の組織学的および *in vitro* 解析は、V1+V2、V1+CYP、および ALA300+CYP の 3 群で行った。

組織学的分析では、CYP 群は対照群に比して膀胱の病理学的スコア (好中球浸潤、出血、および浮腫) を増加させ、高用量 5-ALA/SFC 前処理は、CYP 誘発性の好中球浸潤/出血スコア増加を有意に改善した。*In vitro* 解析では、CYP は膀胱における好中球浸潤のマーカーであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) のタンパク質レベルを増加させたが、V1+V2 群と ALA300+CYP 群の間で MPO レベルに有意差は認めなかった。CYP 投与は膀胱内の HO-1 mRNA レベルに有意な変化を示さなかったが、HO-1 レベルは V1+V 群 2 よりも ALA300+CYP 群で有意に上昇した。

#### 【結語】

5-ALA 前処理は、HO-1 のアップレギュレーションを介して膀胱の炎症を改善することにより、CYP 誘発性 HC による膀胱機能障害に対する保護効果を有する可能性が考えられた。したがって、5-ALA は CYP 化学療法によって誘発される副作用である HC に対する新たな保護薬候補となる可能性が示唆された。

以上のように、本論文は、申請者の教室において、既に膀胱癌の光学的診断に有用性を見出し、医薬品として適応追加まで発展させた 5-アミノレブリン酸の新たな臨床応用として、繁用されるがん治療薬であるシクロホスファミド治療時に頻発する有害事象である出血性膀胱炎に対する 5-アミノレブリン酸前投与による予防効果及びそのメカニズムを明確にし、治療の円滑化、患者の QOL 向上に寄与することを示した医学的に高い価値を有するものである。

よって、審査委員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	明間 陵 (東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第67号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	令和5年2月10日
学位論文題目	Perceptual and objective physical quality of chest images: a comparison between digital radiographic chest images processed for cancer screening and pneumoconiosis screening in Japan  (本邦における検診用胸部デジタルX線画像に係るじん肺検診用画像と肺癌検診用画像の物理的及び視覚的な画質の比較検討)
発表誌名	Industrial Health 未定 (in press)
	<b>審査委員</b>
	主査 教授 木村 智樹
	副査 教授 横山 彰仁
	副査 教授 畠山 豊

### 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	明間 陵
論文題目	<p>Perceptual and objective physical quality of chest images: a comparison between digital radiographic chest images processed for cancer screening and pneumoconiosis screening in Japan          (本邦における検診用胸部デジタルX線画像に係るじん肺検診用画像と肺癌検診用画像の物理的及び視覚的な画質の比較検討)</p>
<p>(論文要旨)</p> <p><b>【1. 緒言】</b></p> <p>現在診療施設において用いられている X 線撮影装置はデジタルシステムの普及が進んでおり、胸部 X 線検診においてもデジタル画像が多く用いられている。デジタル画像であっても、検診に供される画像は根拠に基づき規定された基準により精度管理されるべきであり、全国労働衛生団体連合会（以下「全衛連」という。）の胸部エックス線検査専門委員会によって定められたデジタル画像評価基準（以下単に「評価基準」という。）を基に官能評価を行うことにより画像の質を担保している。</p> <p>じん肺検診と、肺癌検診はともに胸部 X 線画像を用いて実施される。しかしながら、それぞれのデジタル画像における画像処理条件については、本邦において推奨される内容が異なる。じん肺検診では、じん肺特有の所見を読影する為に従来のアナログ写真に近似させること等を目的としており、適用可能な画像処理をほぼ用いず、オリジナル画像を加工しないことを意図した設定である。一方で、近年における胸部 X 線デジタル画像は、種々の画像処理を用いることにより、読影を容易にするとともに観察可能な領域を広げたものが主流であり、臨床における有用性はじん肺検診推奨条件よりも高いものと考えられる。全衛連においても、比較的強く種々の画像処理を適用することを推奨している。ただし、両条件の処理画像に関する画質や診断能を比較した研究は確認出来なかった。</p> <p>以上を踏まえて、本研究では、本邦のじん肺検診における推奨条件及び全衛連の胸部エックス線検査専門委員会が通常の胸部 X 線検診の画像処理として推奨する条件の両条件の画質の優劣を物理的評価（信号対ノイズ比（SNR）及びコントラスト対ノイズ比（CNR））及び官能評価により評価することを目的として実施した。また、臨床現場において容易に測定可能である SNR 及び CNR が、上述の精度管理評価を簡易的に反映し得る（一般化）ものであるか、併せて検討した。</p> <p><b>【2. 方法】</b></p> <p>高知大学医学部附属病院において 2017 年 1 月～10 月に撮影された異常陰影のない成人男性の胸部 X 線画像 30 画像を用い、じん肺検診推奨条件（P 条件）、全衛連推奨検診条件（Ca 条件）及び本院臨床提供の条件（H 条件）を同一画像に適用した 3 群計 90 画像を作成した。官能評価は、当該画像データセットについて、評価基準を用いて行った。関係領域の専門医 2 名により解剖学的評価（70 点満点）を、経験 8 年以上の診療放射線技師 2 名により物理的評価（30 点満点）を実施し、官能評価結果（VGS）を算出した。</p>	



SNRについては、関心領域 (ROI) を胸部全体 (ROI1)、右胸部全体 (ROI2) 及び右肺野 (ROI3) に設定し、ピクセル値の平均及び標準偏差 (SD) を取得した上で、ピクセル値平均値を SD で除算することで算出した。CNR については、第 7 胸椎体及び右第 6・7 肋間肺野 (ROI1)、左第 10・11 肋間心陰影及び左下葉肺野 (ROI2)、右横隔膜中央及び右下葉肺野 (ROI3)、並びに右肩甲骨付近及び右第 4・5 肋間肺野に ROI (ROI4) を設定し、各組織及び各組織近傍の肺野におけるピクセル値の平均を取得した。得られた各組織のピクセル値から、各肺野のピクセル値を減算した上で絶対値化し、胸部全体 (ROI5) の SD を除算することにより算出した。

また、本研究における SNR 及び CNR の一般化可能性について検討した。本検討には、多施設で撮影された画像を用いることが妥当であると考えた。全衛連では、各施設の診断精度向上を企図して胸部エックス線検査研修会 (以下単に「研修会」という。) を実施している。研修会では、上述の胸部エックス線検査精度管理調査に供出された画像の一部を用いて、診断能の高い画像及び診断能の低い画像の特徴等を講習する。したがって、研修会で使用する画像は、本邦の様々な施設で撮影された高評価及び低評価の両方の画像が含まれるものであり、本検討を行う画像として適切であると考えた。以上より、全衛連より承諾を得た上で、2014 年及び 2016 年研修会で使用した画像から高評価 (評価点数 90 点以上) の画像を 6 画像、低評価 (評価点数 75 点以下) の画像を 6 画像の計 12 画像を抜粋し、SNR 及び CNR を算出してその差を検討した。

### 【3. 結果】

Ca 条件画像の VGS 及び SNR は、P 条件画像及び H 条件画像よりも有意に高かった。CNR については各条件間で有意差は認められなかった。VGS と SNR の相関関係については各 ROI で認められ、ROI-I ( $r=0.77$ ,  $p<0.01$ ) 及び ROI-II ( $r=0.76$ ,  $p<0.01$ ) では、ROI-III ( $r=0.40$ ,  $p=0.01$ ) よりも相関が強かった。VGS と CNR の相関関係は認められなかった。

一般化可能性に関する検討については、高評価画像を低評価画像と比較すると、ROI-I 及び ROI-II で SNR が有意に高く ( $p<0.001$ )、ROI-4 で平均 CNR が高い ( $p<0.05$ ) 結果となった。

### 【4. 考察】




Ca 条件画像が他の条件に比べ、有意に画質が高いことが示された。これはダイナミックレンジ圧縮処理 (DR 処理) 及びマルチ周波数処理の有無及び程度の差に起因するものと考えられた。これら処理により、P 条件画像では観察が困難となることが多い縦隔陰影下の肺野陰影の観察が容易となり、VGS が有意に大きくなったものと考えられた。また、DR 処理がその過程から、原画像への加算処理を必要とすることから、その程度が粒状性、SNR 及び VGS に反映されたものと考えられた。

本研究手法における CNR は、その有用性を見いだせなかったが、SNR については一般化可能性の検討結果及び VGS との高い相関関係から、物理的評価手法としての妥当性を確認できた。このことから、専門家の判断が容易に得られない場合、SNR の測定が VGS の代替になり得る可能性があることが示唆された。

### 【5. 結語】

Ca 条件画像の方が P 条件画像よりも有意に画質が良いことが示された。ただし、じん肺の重症度の検出又は分類の精度を含めた、診断能に関する評価が実施できていないことが本研究の限界である。今後は当該事項の検討を進めることにより、Ca 条件の有用性をさらに確認していきたい。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	明間 陵
審 査 委 員	主 査 氏 名 木村 智樹 	
	副 査 氏 名 横山 彰仁 	
	副 査 氏 名 畠山 豊 	

題 目 Perceptual and objective physical quality of chest images: a comparison between digital radiographic chest images processed for cancer screening and pneumoconiosis screening in Japan  
(本邦における検診用胸部デジタルX線画像に係るじん肺検診用画像と肺癌検診用画像の物理的及び視覚的な画質の比較検討)

著 者 Ryo AKIMA, Naw Awn J-P, Kenji ITO, Shoko NOGAMI, Miki NISHIMORI, Kenta OOGI, Naoya HAYASHI, Narufumi SUGANUMA, Takuji YAMAGAMI, and the National Federation of Industrial Health Organization

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Industrial Health 未定 (in press)

### 要 旨

#### 【背景・目的】

現在診療施設において用いられている X 線撮影装置はデジタルシステムの普及が進んでいるが、デジタル画像であっても、検診に供される画像は根拠に基づき規定された基準により精度管理されるべきである。全国労働衛生団体連合会（以下「全衛連」という）の胸部 X 線検査専門委員会によって定められたデジタル画像評価基準（以下「評価基準」という）を基に官能評価を行うことにより画像の質を担保している。

じん肺検診と、肺癌検診はともに胸部 X 線画像を用いて実施されるが、それぞれのデジタル画像における画像処理条件は、本邦において推奨される内容が異なる。じん肺検診では、じん肺特有の所見を読影する為に従来のアナログ写真に近似させること等を目的としており、適用可能な画像処理をほぼ用いず、オリジナル画像を加工しないことを意図した設定である。一方で、近年における胸部 X 線デジタル画像は、種々の画像処理を用いることにより、臨床における有用性はじん肺検診推奨条件よりも高いものと考えられる。全衛連においても、比較的強く種々の画像処理を適用することを推奨しているが、両条件の処理画像に関する画質や診断能を比較した研究は確認出来なかった。

以上を踏まえて、本研究では、本邦のじん肺検診における推奨条件及び全衛連の胸部 X 線検査専門委員会が通常の胸部 X 線検診の画像処理として推奨する条件の両条件の画質の優劣を物理的評価（信号対ノイズ比（SNR）及びコントラスト対ノイズ比（CNR））及び官能評価により評価す



ることを目的とした。また、臨床現場において容易に測定可能である SNR 及び CNR が、上述の精度管理評価を簡易的に反映し得る（一般化）ものであるか、併せて検討した。

#### 【方法】

高知大学医学部附属病院において 2017 年 1 月～10 月に撮影された異常陰影のない成人男性の胸部 X 線画像 30 画像を用い、じん肺検診推奨条件（P 条件）、全衛連推奨検診条件（Ca 条件）及び本院臨床提供の条件（H 条件）を同一画像に適用した 3 群計 90 画像を作成した。官能評価は、当該画像データセットについて、評価基準を用いて行った。関係領域の専門医 2 名により解剖学的評価（70 点満点）を、経験 8 年以上の診療放射線技師 2 名により物理的評価（30 点満点）を実施し、官能評価結果（VGS）を算出した。

SNR については、関心領域（ROI）を胸部全体（ROI I）、右胸部全体（ROI II）及び右肺野（ROI III）に設定し、ピクセル値の平均及び標準偏差（SD）を取得した上で、ピクセル値平均値を SD で除算することで算出した。CNR については、第 7 胸椎体及び右第 6・7 肋間肺野（ROI1）、左第 10・11 肋間心陰影及び左下葉肺野（ROI2）、右横隔膜中央及び右下葉肺野（ROI3）、並びに右肩甲骨付近及び右第 4・5 肋間肺野に ROI（ROI4）を設定し、各組織及び各組織近傍の肺野におけるピクセル値の平均を取得した。得られた各組織のピクセル値から、各肺野のピクセル値を減算した上で絶対値化し、胸部全体（ROI5）の SD を除算することにより算出した。

また、本研究における SNR 及び CNR の一般化可能性について検討した。本検討には、多施設で撮影された画像を用いることが妥当であると考えた。全衛連より承諾を得た上で、2014 年及び 2016 年研修会で使用した画像から高評価（評価点数 90 点以上）の画像を 6 画像、低評価（評価点数 75 点以下）の画像を 6 画像の計 12 画像を抜粋し、SNR 及び CNR を算出してその差を検討した。

#### 【結果・考察】

Ca 条件画像の VGS 及び SNR は、P 条件画像及び H 条件画像よりも有意に高かった。CNR については各条件間で有意差は認められなかった。VGS と SNR の相関関係については各 ROI で認められ、ROI-I ( $r = 0.77$ ,  $p < 0.01$ ) 及び ROI-II ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.01$ ) では、ROI-III ( $r = 0.40$ ,  $p = 0.01$ ) よりも相関が強かった。VGS と CNR の相関関係は認められなかった。

一般化可能性に関する検討については、高評価画像を低評価画像と比較すると、ROI-I 及び ROI-II で SNR が有意に高く ( $p < 0.001$ )、ROI-4 で平均 CNR が高い ( $p < 0.05$ ) 結果となった。Ca 条件画像が他の条件に比べ、有意に画質が高いことが示された。これはダイナミックレンジ圧縮処理（DR 処理）及びマルチ周波数処理の有無及び程度の差に起因するものと考えられた。これら処理により、P 条件画像では観察が困難となることが多い縦隔陰影下の肺野陰影の観察が容易となり、VGS が有意に大きくなったものと考えられた。また、DR 処理がその過程から、原画像への加算処理を必要とすることから、その程度が粒状性、SNR 及び VGS に反映されたものと考えられた。

本研究手法における CNR は、その有用性を見いだせなかったが、SNR については一般化可能性の検討結果及び VGS との高い相関関係から、物理的評価手法としての妥当性を確認できた。このことから、専門家の判断が容易に得られない場合、SNR の測定が VGS の代替になり得る可能性があることが示唆された。

#### 【結論】

Ca 条件画像の方が P 条件画像よりも有意に画質が良いことが示された。ただし、じん肺の重症度の検出又は分類の精度を含めた、診断能に関する評価が実施できていないことが本研究の限界である。今後は当該事項の検討を進めることにより、Ca 条件の有用性をさらに確認していきたい。

以上の発表の後、公開審査で質疑応答を行った。これらの内容をふまえ、審査委員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。