

学位（博士）授与の記録

たか やま わたる
高 山 渉

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第459号

学位授与の日付：平成24年5月30日

主 論 文：大動脈弓部置換手術中の低体温循環停止に起因する可逆的血小板減少

著 者：高山 渉, 小林 佳郎, 落合 亮一

公 表 誌：東邦医会誌 59: 2-8, 2012

論文内容の要旨

【目的】低体温循環停止（deep hypothermic circulatory arrest：DHCA）を用いる胸部大動脈手術において、術後の出血はいまだに解決されない重要な問題である。DHCAと出血傾向の関連性については、さまざまな因子が挙げられている。

われわれは日々の臨床で、DHCA症例の低体温時の急激な血小板数低下と、復温後のほぼ完全な回復をしばしば経験するが、これに関して、網内系へのsequestrationが原因と考えられる動物研究結果が報告されている。しかし、臨床症例においては検討が少ない。その1つの研究ではDHCA手術で有意な血小板数低下を認めたが、この現象が可逆的か否かは不明であった。今回の観察研究の目的は、DHCAを用いた胸部大動脈手術中の血小板動態とその関連因子を調査することである。

【対象と方法】今回の観察研究は川崎幸病院倫理委員会で承認を受け、各患者に書面での説明と同意の取得がなされた。DHCA下に大動脈弓部置換術を予定された患者を対象とした。術前の凝固能障害、血小板減少症、肝硬変、肝機能障害、cardiopulmonary bypass（CPB）中に血小板輸血を実施した患者を解析から除外した。麻酔方法と手術手技は当施設の標準的なものを用いた。

胸骨正中切開後、ヘパリンを投与しCPBが開始された。目標体温20℃でDHCAとされ、選択的脳灌流（selective cerebral perfusion：SCP）を開始した。脳以外の全身臓器はDHCAの状態となり（lower body circulatory arrest：LBCA）、LBCAは人工血管遠位-下行大動脈の吻合と弓部三分枝吻合が終了するまで継続した。この後、CPBが再開され、人工血管近位吻合終了後、患者は脱血温36℃まで復温され、CPBを終了した。プロタミンでヘパリンを拮抗し、止血確認後に閉胸され、患者は集中治療室に搬送された。

採血のポイントは以下の4点で、右橈骨動脈カテーテルから血液2mlを採取した。T1：CPB開始2分後、T2：DHCA直前、T3：DHCA終了・CPB再開2分後、T4：CPB終了時。血小板数は自動血球数測定装置で測定した。

統計学的検討に関しては、血小板数の動態との関連因子の検討では、以下の患者因子と血小板数変化との関係を解析した。患者年齢、身長、体重、性；術前抗血小板療法の有無；ヘパリン投与総量、CPB時間、大動脈遮断時間、DHCA時間；冷却時間、加温時間；CPB中の血液希釈度；膀胱温とCPB脱血温の最低値；CPB中の血液喪失量；CPB中の輸血量。血小板数の経時的変化の検討には、repeated measures analysis of variance（ANOVA）を用い、post-hoc testにBonferroni法を適用した。さらに、血小板変化の可逆性に関する相関分析として、血小板数T1値とT1-T3までの血小板変化（減少値）との間、T1値とT3-T4までの変化（増加値）との間の関係性を、その他、T1-T4の血小板数変化と各種パラメータとの間の相関関係を検討した。それぞれ $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

【結果】37人の患者のうち2名は解析から除外され、残る35名に対して解析を施行した。また、すべての患者はCPB中（主にT3-T4間）に濃厚赤血球（平均7.6単位）と新鮮凍結血漿（平均1.2単位）を輸血した。出血による再開胸は1名。すべての患者で血小板数はT3において最低値を示した（ $p < 0.05$ ）。T2での血小板減少もT1に比して有意であった。T3、つまりSCPとLBCAの状態を経た後、更なる低下を示した。4名の患者でT3に著明な血小板減少をきたした（ $20000/\text{mm}^3$ 以下、T1値の10.7%まで）が、T4ではほぼ完全に回復した。術後に出血合併症は認めなかった。

すべての患者で、血小板数のT1値とT1-T3間の減少の間に有意な相関を認めた（ $r=0.72$, $p < 0.05$ ）。そして、T1-T3間の減少とT3-T4間の回復の間に有意な相関を認めた（ $r=0.64$, $p < 0.05$ ）。一方、T1値とT3-T4間の回復の間には相関

関係は認められなかった ($r=0.23$)。T1-T3 間の血小板数減少と DHCA 時間 ($r=0.03$)、冷却時間 ($r=-0.13$) などを含むいかなる解析パラメータとの間に有意な相関は認めなかった。同じく、DHCA・CPB 前後つまり、T1-T4 の間での血小板数の変化率 (%) と、CPB 時間 ($r=-0.15$)、DHCA 時間 ($r=-0.097$)、冷却時間 ($r=-0.19$)、加温時間 ($r=0.054$) との間に有意な相関は認めなかった。

【考察および結論】DHCA 手術時の血小板数の動態に関して検討した。深部温 20°C の DHCA・SCP・LBCA で血小板数の著明な低下を認めたが、復温時にはほぼ前値に回復した。動態予測因子として、低体温時の血小板数の低下が高度であるほど、復温後の回復も大きい傾向がみられた。低体温にともなう可逆的な sequestration の可能性が示唆された。

DHCA、SCP を用いる大動脈弓部置換術は、高度な手術手技を必要とするため、難手術であるとされている。常に出血性合併症が問題となり、DHCA と出血傾向の関連性については、再開胸率が 15.4% であるなかで、60 分以上の DHCA 例では 33% に増加したと報告している。このため出血傾向に関するメカニズムを明白にすることが必要であり、解明の 1 つとして、今回われわれは、安定した手技で施行される大動脈弓部置換術中の、経時的血小板数変化を調査し、上述の結論を得た。

主に動物研究では体低体温に起因する血小板減少は、肝臓もしくは肺や小腸への sequestration の結果生じ、復温時には、低体温時に循環中から sequestration された血小板が解離し、循環血液中に再出現し、血小板数が増加・回復すると考えられている。臨床例では偶発的低体温症例の可逆的血小板減少の報告がある。麻酔下のイヌを用いた研究では sequestration の主座は肝臓であることが ^{51}Cr 標識血小板を用いて確認されている。イヌの全身の冷却と加温と、腹腔内の局所の冷却加温の方法を比較した検討では、ともに低体温時の血小板減少と加温後の回復を同程度に認めた。抗血小板薬の使用の有無は可逆的動態に関与しないことや、冷却血小板には形態変化が生じることも同じく報告されている。しかし、温水群では加温につれて血小板数が増加したのに対し、腹腔内灌流群では加温開始直後まだ体温が低い時期から血小板数が急増した。これは肝臓などが局所的に温められて、sequestration された血小板が解離、再出現したことを示唆している。本臨床研究でも同様の事象が起きたのではないかと考えた。このメカニズムでは、網内系にとりこまれて循環から退避した血小板は、CPB 回路等の接触により消費されず、復温時に循環に再出現する可能性が考えられた。つまり、sequestration の程度が大きいほど、復温時の血小板の再出現および数の回復の可能性が高いと考えられた。

また、今回の血小板動態では、最低値は DHCA 開始時 (T2) ではなく、CPB 再開時 (T3) であった。Sequestration 等による低下に加え、T3 では「循環停止状態」がさらなる低下に寄与した可能性がある。つまり、低体温と循環停止により鬱滞している血管床で sequestration が生じている可能性が高く、CPB 回路との接触による消費の影響は少ないとも考えられる。

本研究および過去の研究結果から、われわれは DHCA 手術での血小板数の動態は、低体温時の sequestration と復温時の臓器からの解離、再出現が寄与するところが多いと考えた。本研究では DHCA に伴う血小板数の動態や可逆性に関連する因子を見いだすことはできなかったが、肝機能を含めてその機序について更なる研究が必要と考えた。

また、今回の研究は周術期の出血性合併症についての、血小板数のみの検討であり、血小板機能については明らかではない。実際、血小板機能に関して、ベッドサイドで短時間に測定可能な血小板凝集能測定装置 [全血式 WBA カルナ; アイ・エム・アイ (株)、越谷] の利用を試みたが、個人内の血小板数に多大な変動が生じる今回の条件では測定が困難であった。

われわれの研究対象である定型的 DHCA 手術においては術中データから血小板動態の予測はある程度可能であることがわかった。がしかし、臨床的意義を見いだすためにも血小板機能評価 (特に止血困難状況が患者予後に大きな影響を与えるだろう復温後に) をはじめとする更なる研究を必要とする。

は にゅう ゆ り
羽 生 有 里

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第460号

学位授与の日付：平成24年6月27日

主 論 文：大腸腺腫扁平上皮化生の免疫組織学的研究

著 者：羽生 有里，味岡 洋一，五十嵐良典

公 表 誌：東邦医会誌 59: 60-67, 2012

論文内容の要旨

【背景および目的】大腸腺腫は腺上皮に由来する良性腫瘍であるが、腺腫細胞が細胞間橋や角化傾向を持つ明らかな扁平上皮細胞や、moruleと呼ばれる扁平上皮様細胞など、発生母地である腺上皮とは異なる細胞系列への分化を示すことがあり、これらの病巣は、腺腫の扁平上皮化生と呼ばれている。大腸腺腫の扁平上皮化生に関するこれまでの検討は症例報告が主であり、多数例を用いた検討は1984年のBansal et al.の報告があるだけである。Bansal et al.は、4664例の大腸腺腫の0.4%に扁平上皮化生がみられたとしている。しかし、Bansal et al.の検討はhematoxylin-eosin (HE)染色標本を用いた検索であり、微小な扁平上皮化生巣やその初期段階は認識されていない可能性がある。他方、頻度は0.05~0.5%ときわめてまれながら、大腸には腺扁平上皮癌や扁平上皮癌が発生することがある。これらの癌の発生母地の1つとして化生扁平上皮が想定されているが、化生扁平上皮に発癌ポテンシャルがあるかどうかについての検討は今まで行われていない。本研究は、扁平上皮系細胞に発現する高分子サイトケラチンであるcytokeratin-5 (CK5)免疫染色を用いて、扁平上皮細胞への分化をきたした大腸腺腫細胞を網羅的に検索し、扁平上皮化生の頻度、扁平上皮化生を伴う腺腫の臨床病理学的特徴、および扁平上皮化生の組織像の解析を目的とした。

【材料および方法】大腸腺腫1238例を対象に、CK5免疫染色で扁平上皮細胞への分化を示す腺腫細胞を同定し、HE染色標本でその組織学的特徴を、involucrin免疫染色で角化傾向の有無を、Ki-67免疫染色で細胞増殖活性を、p53免疫染色でp53蛋白過剰発現の有無を解析した。

【結果】大腸腺腫の18.7%でCK5陽性細胞が認められた。CK5陽性細胞腺腫は、10 mm以上の大きさ、絨毛または管状絨毛の組織型、高異型度併存、隆起型、有茎性が有意に多かった。

CK5陽性細胞は以下の4つの型に分類された。Type 1：CK5陽性細胞が腺腫腺管内に単個または複数個が連続して存在する。HE標本との対比では、CK5陽性細胞は円柱上皮としての極性を保っており、CK5陰性腺腫細胞との間に組織学的差異は認められない。Type 2：CK5陽性細胞が腺腫腺管内で充実胞巣を形成する。HE標本との対比では、CK5陽性細胞は小型円形~卵円形核と好酸性細胞質からなり、細胞は円柱上皮としての極性を失い平面状に配列していた。Type 3：CK5陽性細胞が腺腫腺管内で充実胞巣を形成し、それが腺管内腔に向かって突出する。HE標本との対比では、CK5陽性細胞は腫大円形~卵円形核と好酸性で重厚感のある細胞質からなり、細胞は円柱上皮としての極性を失い、平面状に配列していた。細胞間橋や角化が疑われる細胞も散見された。なお、Type 2か3かの判別が困難なものはType 2とした。Type 4：CK5陽性細胞が腺腫腺管から間質に向かって充実胞巣を形成、または充実胞巣が間質内に遊離して存在する。それらの中で、CK5陽性細胞が充実胞巣を形成するType 2, 3, 4が、組織学的所見からも扁平上皮化生巣と考えられたが、出現頻度はそれぞれ1.3, 0.7, 3.3%であった。Involucrin陽性率は、Type 3, 2, 4の順に高かった。Ki-67陽性率は、Type 2がType 3, 4に比べ有意に高かったが、いずれの型も周囲腺腫部分に比べ有意に低値であった。p53蛋白過剰発現を示した病巣はなかった。

【考察および結語】大腸腺腫の扁平上皮化生は従来考えられていたよりも高頻度に生じる現象で、扁平上皮化生は腺腫の大きさの増大に伴って生じる外的刺激により起きると考えられた。扁平上皮化生には角化傾向の強いもの（角化型）と弱いもの（非角化型）の2つのタイプが存在するが、いずれも細胞増殖活性は低く、p53蛋白過剰発現もないことから癌化ポテンシャルはきわめて低い病変と考えられた。また、CK5陽性細胞充実胞巣は、周囲腺腫とは異なり円形~卵円形核と好酸性細胞質を持ち、円柱上皮としての細胞極性も消失していることから、HE標本では癌巣と誤認される可能性があり、病理診断では注意が必要と考えられた。癌巣との鑑別には、CK5, Ki-67, p53免疫染色が有用であるが、扁平上皮化生が決してまれな存在ではないことを念頭に置き大腸腺腫の病理診断を行うことが重要と考えられた。

ばん 典 子
番 のり こ

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第461号

学位授与の日付：平成24年6月27日

主 論 文：Protective effect of probucol against oxidative cell damage induced by oxidized low-density lipoprotein and high glucose in human mesangial cells
(高血糖および酸化LDL培養下のメサンギウム細胞におけるNADPH oxidase発現とアポトーシスに対するプロブコールの効果)

著 者：Ban N, Saiki A, Endo K, Murano T, Tatsuno I, Shirai K

公 表 誌：J Med Soc Toho 59: 123-132, 2012

論文内容の要旨

【目的】糖尿病腎症は進行すると腎不全に至る病態で、その発症や進展は主に高血糖や血圧の関与が考えられているが、酸化ストレスの関与も近年注目されている。以前われわれは抗酸化作用を併せ持つ脂質低下剤プロブコールを第3～4期糖尿病腎症の患者に投与したところ、透析導入までの期間・血清クレアチニンや蛋白尿の増悪進行を有意に抑制したことを報告し、糖尿病腎症の進展に酸化脂質が関与している可能性を示した。今回高血糖または酸化脂質が、糖尿病腎症進展機序の1つである腎メサンギウム細胞アポトーシスに及ぼす酸化反応の影響と、これに対するプロブコールの抑制効果とその機序を検討した。

【方法】腎メサンギウム細胞として正常ヒトメサンギウム細胞を用い、10% FCS添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。酸化 low-density lipoprotein (LDL) は、健常者の血清から超遠心法で LDL を分離し、銅イオンで人工的に酸化させる方法で作成した。酸化の指標として nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase の p22phox の messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現を real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) で、p47phox の蛋白発現を western blot で測定し、fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて reactive oxygen species (ROS) 活性を測定した。アポトーシスの指標として caspase3 活性を測定した。細胞が 80% コンフルエントの状態に達した時点で培養プレートへ分割し正常糖 (100 mg/dl) および高糖 (500 mg/dl) の培養液に変更した。それぞれの糖濃度下で 24 時間培養した後プロブコール (1 μ M, 10 μ M) を添加しその 24 時間後に細胞を回収し、NADPH oxidase の各発現および ROS 活性、caspase3 活性を測定した。また同様に糖濃度を変更して培養した後、酸化 LDL とプロブコール (1, 10 μ M) をそれぞれ培養液中に同時添加し添加 24 時間後に細胞を回収し各種測定を行った。

【結果】正常糖下に比べ高糖培養下では NADPH oxidase の p22phox の mRNA 発現と p47phox の蛋白発現が増強し、ROS 活性、caspase3 活性が亢進していたことから高糖状態がメサンギウム細胞内での酸化亢進を促進することが示唆された。これらの変化はプロブコールを投与することで正常糖下で培養した状態まで抑制された。

また高糖下で培養後にさらに酸化 LDL を添加することで、NADPH oxidase の p22phox の mRNA 発現と p47phox の蛋白発現、ROS 活性、caspase3 活性反応は高糖下で培養時の反応よりも亢進した。プロブコールを投与することでいずれの反応も抑制される結果を得た。

【考察】高血糖と酸化 LDL のいずれも、メサンギウム細胞の NADPH oxidase の各コンポーネントの発現、ROS 活性の亢進を認めた。高血糖や酸化 LDL などの酸化ストレスがメサンギウム細胞内で酸化反応を亢進させることは以前から指摘されているが特に酸化反応の中でも NADPH oxidase や ROS の関与は多くの文献で報告されており本検討でも同様の結果を得た。

また、高血糖と酸化 LDL のいずれにおいても caspase3 活性の亢進を認めた。高糖状態やその他の酸化ストレスがメサンギウム細胞のアポトーシスを誘導することや誘導に NADPH oxidase, ROS が関与することも多くの文献で報告されており本検討も矛盾しない結果となった。また、これらの酸化反応の亢進およびアポトーシスをプロブコールは抑制した。プロブコールの一般的な抗酸化作用としてこれまでは酸化脂質の生成を抑制することで抗酸化作用を示すと考えられていたが、本検討の結果からはメサンギウム細胞内における酸化反応の抑制にも関与していることが考えられる。このようにプロブコールがメサンギウム細胞内の酸化反応の抑制に作用することに関する報告は本検討が初めての報告である。

結論として、本研究で糖尿病腎症進展の背景に高血糖や酸化LDLをはじめとした酸化ストレスによるメサンギウム細胞内のNADPH oxidaseの発現亢進とそれによるアポトーシス誘導が示唆された。プロブコールは酸化脂質の生成抑制の他にNADPH oxidaseの発現を抑制することで抗酸化作用を示しアポトーシス抑制にも関与することが示唆された。

た なか なほこ
田 中 菜穂子

学位の種類：博士(医学) 学位番号：甲第462号

学位授与の日付：平成24年7月26日

主 論 文：Resistin is associated with the inflammation process in patients with systemic autoimmune diseases undergoing glucocorticoid therapy: Comparison with leptin and adiponectin

(レジスチンはグルココルチコイド療法下の全身性自己免疫疾患における炎症病態と関連する：レプチンおよびアディポネクチンとの比較)

著 者：Tanaka N, Kusunoki N, Kusunoki Y, Hasunuma T, Kawai S

公 表 誌：Mod Rheumatol 23: 8-18, 2013

論文内容の要旨

【背景】脂肪組織は、interleukin (IL)-1, IL-1 receptor antagonist, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- α の他、レジスチン (resistin: RS), レプチン (leptin: LP), アディポネクチン (adiponectin: AD) などのアディポカインとして知られる生理活性物質を産生する内分泌組織であり、エネルギーバランスや糖ホメオスターシスの制御において重要な働きをしていることが知られている。最近ではアディポカインの免疫・炎症への関与も報告されている。多くの全身性自己免疫疾患の病因はいまだに解明されていないが、病態形成には種々の炎症性サイトカインの関与が示されている。アディポカインにおいても全身性自己免疫疾患の病態形成や炎症過程との関連を示唆する報告が散見されるようになったが、それらの多くは横断的検討であり詳細は不明である。したがって、全身性自己免疫疾患における血清アディポカイン濃度を縦断的に検討する必要があると考えた。

【目的】3種類のアディポカイン [RS, LP, high molecular weight (HMW)-AD] の全身性自己免疫疾患における炎症病態への関与、およびグルココルチコイド (glucocorticoid: GC) 療法の影響を明らかにすることを目的とした。

【対象および方法】本研究は東邦大学および北里研究所倫理委員会の承認を受け、すべての患者および健常対照者より文書同意を得て、東邦大学医療センター大森病院および北里研究所において遂行された。プレドニゾロン換算30 mg/日以上 GCにて初期治療を開始する活動期の患者52例(男性19例, 女性33例)を対象に、前向き観察研究を行った。治療開始前および開始4週間まで1週間ごとに患者の血清を採取し、血清アディポカイン濃度を各々のenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットを用いて測定した。治療前の血清濃度を健常対照者140例(男性22例, 女性118例)と比較するとともに、血清高感度C-reactive protein (CRP) 濃度、頸動脈プラークおよび頸動脈内膜中膜複合体厚を測定し、血清アディポカイン濃度の炎症病態および潜在性動脈硬化への関与を検討した。また、治療前後でのアディポカイン濃度の推移を観察し、GC療法の影響を検討した。さらに、健常者から得たヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)を用いて、lipopolysaccharide (LPS) およびデキサメサゾン刺激によるアディポカイン messenger ribonucleic acid (mRNA) および蛋白の発現を観察し、炎症病態下におけるアディポカイン産生へのGCの影響を *in vitro* でも検討した。mRNA発現はreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) およびreal-time PCRにて検討した。PBMC培養上清中の蛋白濃度はELISAキットを用いて測定した。

【結果】対象となった全身性自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス18例、血管炎症候群16例、多発性筋炎/皮膚筋炎14例および成人スティル病4例の計52例であり、平均GC初期投与量はプレドニゾロン換算46.7 mg/日であった。活動期未治療の患者における血清RS濃度 [男性: 中央値10.0 (5.0-27.4) ng/ml, $p < 0.05$; 女性: 中央値7.4 (1.3-16.9) ng/ml, $p < 0.001$] は、健常対照者 [男性: 中央値3.7 (3.3-5.1) ng/ml; 女性: 中央値3.5 (3.0-4.4) ng/ml] に比較して高値

であり、GC療法後に正常化した。In vitro の検討においてPBMCのRS産生はLPS刺激により増加し、デキサメサゾンにより抑制され、血清濃度の結果と一致した。また、血清RS濃度は高感度CRP濃度と有意な正相関を認め、動脈硬化指標である頸動脈内膜中膜複合体厚とは関連を認めなかった。一方、活動期末治療の女性患者における血清LP濃度〔中央値3.1 (1.9-10.0) ng/ml, $p < 0.01$ 〕および血清HMW-AD濃度〔中央値8.1 (2.4-11.9) $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.001$ 〕は、各々女性健常者〔LP: 中央値7.0 (3.8-12.0) ng/ml, HMW-AD: 中央値15.2 (9.7-21.6) $\mu\text{g/ml}$ 〕に比較して低値であり、治療後増加した。

【結語】血清RS濃度は活動期の全身性自己免疫疾患患者で増加し、GC療法により正常化した。すなわち、RSは炎症病態と密接に関連することが明らかとなった。

す え ま り こ 須 江 麻 里 子

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第464号

学位授与の日付：平成24年10月25日

主 論 文：Propylthiouracil increases sodium/iodide symporter gene expression and iodide uptake in rat thyroid cells in the absence of TSH
(PTUはラット甲状腺FRTL-5細胞においてTSH非存在下でNIS遺伝子発現とヨード取り込みを誘導する)

著 者：Sue M, Akama T, Kawashima A, Nakamura H, Hara T, Tanigawa K, Wu H, Yoshihara A, Ishido Y, Hiroi N, Yoshino G, Kohn LD, Ishii N, Suzuki K

公 表 誌：Thyroid 22: 844-852, 2012

論文内容の要旨

バセドウ病は20~50歳の成人における甲状腺機能亢進症の原因疾患の第1位を占め、その薬物療法には抗甲状腺薬のプロピオチオウラシル (propylthiouracil: PTU) とメチマゾール (methimazole: MMI) が広く用いられている。PTUとMMIはともにサイログロブリン (thyroglobulin: Tg) をヨード化し甲状腺ホルモン合成過程を担う甲状腺ペルオキシダーゼ (thyroid peroxidase: TPO) 活性を阻害することによって甲状腺ホルモン合成を抑制するが、MMIが甲状腺細胞において、抗原提示を行うことで免疫反応に関わり自己免疫性甲状腺疾患とも関連の深い主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex: MHC) 発現を抑制する一方、PTUは末梢組織においてサイロキシン (thyroxin: T4) からトリヨードサイロニン (triiodothyronine: T3) への変換を阻害することが知られている。またPTU投与患者で無顆粒球症や anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) 関連血管炎の発症が多いなど、その他の作用やそれぞれの分子構造は全く異なっている。われわれはPTUとMMIが、その分子構造の違いから甲状腺に対して、中でも甲状腺機能遺伝子発現や機能に異なる作用をもたらすと考え種々の検討を行った。その結果、同様に甲状腺ホルモン合成抑制作用を有するにもかかわらず、甲状腺ホルモン合成を司る輸送体に対して全く異なる影響を及ぼすことが明らかになり、興味ある知見を得たので報告する。

Thyroid stimulating hormone (TSH) 存在下および非存在下で培養したラット甲状腺FRTL-5細胞を5 mMのPTUおよびMMIで処理し、24時間後にribonucleic acid (RNA) を調整しdeoxyribonucleic acid (DNA) microarrayを行い抗甲状腺薬の影響を網羅的に解明した。PTU・MMIともに多数の遺伝子発現を抑制する一方で甲状腺機能遺伝子のほとんどが変化を示さなかったが、TSH非存在下においてPTUのみがsodium/iodide symporter (NIS) 遺伝子発現を強く誘導することが明らかとなった。NISは甲状腺濾胞細胞の基底膜側に位置し、ナトリウム勾配を利用して血中のヨードイオンを能動的に取り込むことで甲状腺ホルモン合成の最初の段階を司る輸送体である。Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) およびreal-time PCRでもPTUはNIS messenger RNA (mRNA) を誘導し、その作用は甲状腺機能関連遺伝子の中でもNISに特異的で、その発現誘導は未刺激時の約18倍とTSH刺激によるNIS遺伝子発現誘導とほぼ同等であった。ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いた検討により、PTUはNISのプロモーターを転写レベル

で活性化することが明らかとなった。NIS 蛋白発現も PTU 刺激下で増加したが、その分子量は糖化の差を反映して 87-110 kDa と広範囲に分布する TSH 刺激で誘導される蛋白よりも小さく、糖鎖修飾を受けていない未熟な蛋白である可能性が示唆された。また免疫蛍光染色では NIS 蛋白の細胞内での局在が細胞膜ではなく細胞質内への偏位を示した。PTU による NIS 蛋白発現誘導作用は PTU 刺激中止後も数日間残存した。PTU 刺激により放射性ヨード取り込みも増加したが、TSH 刺激のそれよりも弱かった。

NIS を介して甲状腺濾胞細胞内に取り込まれたヨードは、コロイド側に存在するペンドリン (pendrin : PDS) によって濾胞腔に排出される。ヨード、TSH により濾胞腔に放出された Tg および H_2O_2 の三者に TPO が作用しヨード化した Tg が、縮合して T3/T4 などの甲状腺ホルモンとなり濾胞内に貯蓄される。これら一連の甲状腺ホルモン合成過程は TSH によって刺激される。しかし今回の結果から、PTU は TSH 非存在下において、TSH とは異なる機序をもって NIS 遺伝子発現とヨード取り込みを誘導することが明らかになった。一方で NIS と同じく甲状腺細胞のヨード輸送に関わる PDS には何ら影響を及ぼさず、この効果は NIS 特異的であった。PTU による NIS プロモーター誘導の機序は明らかではないが、RT-PCR では甲状腺細胞の機能発現や分化に重要な役割を担っている重要な転写因子である thyroid transcription factor-1 (TTF-1)、TTF-2、Pax8 は誘導せず、PTU による NIS mRNA 発現誘導はこれらとは異なる転写因子や、epigenetic な機序が関与している可能性が考えられた。一方、FRTL-5 細胞において NIS 発現へ影響を与えるものとしては、神経伝達物質である adenosine やポリフェノールの一種である resveratrol の NIS 発現誘導作用や、HDAC 阻害薬 (histone deacetylase inhibitor : HDACI) による抑制作用などさまざまな報告がなされている。HDAC も甲状腺特異遺伝子である TTF-1、TTF-2 などを介さずに NIS を誘導することも報告されており、PTU の作用機序との類似性・相同性や差異などは今後検討の必要がある。PTU は MMI と同様な抗甲状腺作用を有するが、それ以外の甲状腺機能に与える影響は異なっており、それが治療効果や個々の副作用の違いに影響を及ぼす可能性が示唆された。

よし はら あや
吉 原 彩

学位の種類：博士 (医学) 学位番号：甲第 465 号

学位授与の日付：平成 24 年 10 月 25 日

主 論 文：Regulation of dual oxidase expression and H_2O_2 production by thyroglobulin
(サイログロブリンによる DUOX 発現と過酸化水素産生の調節)

著 者：Yoshihara A, Hara T, Kawashima A, Akama T, Tanigawa K, Wu H, Sue M, Ishido Y,
Hiroi N, Ishii N, Yoshino G, Suzuki K

公 表 誌：Thyroid 22: 1054-1062, 2012

論文内容の要旨

【背景】われわれは、甲状腺濾胞内に蓄積する thyroglobulin (Tg) は、単に甲状腺ホルモン生合成の基質であるだけでなく、甲状腺機能遺伝子発現や甲状腺細胞増殖を調節する強力な生理活性物質であることを報告してきた。特に、生理的濾胞内濃度の Tg はヨード輸送に関わる sodium/iodide symporter (NIS) や pendrin (PDS)、ホルモン合成に必要な thyroperoxidase (TPO) や Tg 遺伝子、およびそれらの発現に必要な転写因子群の発現を調節し、実際に *in vivo* でもヨードの輸送や有機化を阻害することを示した。ヨードの有機化は TPO によって H_2O_2 存在下で行われており、 H_2O_2 は主に dual oxidase 2 (DUOX2) により産生されることが近年明らかになっている。しかし、Tg による DUOX 遺伝子発現や H_2O_2 産生への影響についてはこれまで不明であった。今回われわれは、ヨード有機化に重要な DUOX 遺伝子発現や H_2O_2 産生における Tg の役割を明らかにするために検討を行った。

【方法】ラット甲状腺 FRTL-5 細胞を増殖培地に Tg (10 mg/ml) を加えて培養し、deoxyribonucleic acid (DNA) マイクロアレイによって DUOX1, DUOX2, DUOX1A1, DUOX1A2 の遺伝子発現変化を評価した。発現が変動する遺伝子は、real-time polymerase chain reaction (PCR) によって確認した。DUOX2 プロモーター活性をルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによって評価した。さらに、Tg による DUOX2 蛋白の産生量の変化を Western blotting にて解析し、

H₂O₂ 産生量の変化を, 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and acetyl ester (CM-H₂DCFDA) を用いた蛍光測定によって活性として評価した.

【結果】 Tg による DUOX2 遺伝子発現制御: DNA マイクロアレイでは, Tg を加えて 24 時間後の甲状腺機能遺伝子の発現量が, PDS は増加, NIS, TPO, Tg, thyroid transcription factor-1 (TTF-1), PAX-8 では減少をみとめ, これまでのわれわれの報告に矛盾しない結果であった. 一方, 今回初めて検討を行った DUOX2, DUOXA2 は, thyroid stimulating hormone (TSH), インスリンによって発現が増強し, Tg 処理によってそれぞれ前値の 0.08, 0.03 倍と著明な低下をみとめた. Real-time PCR においても, Tg 添加により ribonucleic acid (RNA) 発現量の低下をみとめ, Tg 濃度を変更して実験を行ったところ, 濃度依存性に発現量の低下をみとめた. また, Tg 添加 1 時間後より DUOX2, DUOXA2 遺伝子の発現量は低下し, 時間依存性に発現量の低下がみられた. Tg による DUOX2 プロモーター活性制御: Tg の DUOX2 遺伝子転写への影響について検討を行った. ヒト DUOX2 遺伝子上流 932bp と 626bp の領域を含むルシフェラーゼ reporter 遺伝子を FRTL-5 細胞に lipofection により導入し, Tg で刺激 48 時間後のルシフェラーゼ活性を評価したところ, DUOX2 プロモーター領域全長を含む construct において, Tg 濃度依存性にプロモーター活性が抑制された. 一方 5'-626 プロモーターは活性を示さなかったことから, DUOX2 プロモーターにおける Tg が作用する cis-element は 5'-932 から 5'-626 塩基間にあることが示唆された. Tg による DUOX2 蛋白発現制御: Tg による DUOX2 蛋白への影響を Western blotting により解析した. 増殖培地に Tg 10 mg/ml を添加したところ, 6 時間後より DUOX2 蛋白の産生量の低下がみられた. Tg による H₂O₂ 産生制御: H₂O₂ 産生量を, 細胞内に取り込まれた H₂O₂ と反応して蛍光発色をする CM-H₂DCFDA を用いて, 解析した. Tg 添加後, 遺伝子発現量, 蛋白産生量と同様に, Tg 添加した 12 時間後より H₂O₂ 産生量の低下をみとめ, Tg 添加により DUOX の活性低下がみられることが明らかとなった.

【考察】 甲状腺ホルモンはいくつかの過程を経て産生される. 1) NIS による, 血中から甲状腺上皮細胞へのヨードの取り込み, 2) PDS による濾胞腔内へのヨード放出, 3) DUOX2 により産生された H₂O₂ を用い, TPO が触媒して Tg をヨード化, diiodotyrosine (DIT) と monoiodotyrosine (MIT) を形成後, 一部 DIT と MIT が縮合し T3, T4 を形成, 4) Tg の甲状腺濾胞上皮細胞への再吸収, 5) リソソームにより Tg が加水分解され T3, T4 が遊離し血中へ放出する. 前述のような甲状腺濾胞機能は, TSH により等しく調節されていると考えられるが, 個々の濾胞では甲状腺ホルモンの蓄積量や放射性ヨードの取り込み量が異なることが明らかになっている. われわれは, これまでに Tg が NIS, TPO, Tg, PDS などの甲状腺機能遺伝子の発現を調節し, 放射性ヨードの取り込みを抑制することを報告し, 濾胞内に蓄積する Tg が, 濾胞機能を自己調節していることを示してきた. 今回のわれわれの研究で, DUOX2, DUOXA2 遺伝子発現が, Tg によって転写レベルで強く抑制され, 蛋白量とともに, その機能である H₂O₂ 産生も実際に抑制されることが示された. Tg が甲状腺機能遺伝子の調節, ヨードの取り込み, 濾胞腔へのヨード輸送のみではなく, ヨードの有機化を抑制することが明らかになった. これらの甲状腺機能遺伝子の発現の変化が, 橋本病, バセドウ病, 甲状腺癌, 先天性疾患などのさまざまな甲状腺疾患においてみられている. DUOX を含め, 甲状腺機能調節機能が明らかになることで, 甲状腺疾患発症の原因解明や新たな治療薬の開発につながることを期待される.

【結論】 本研究によって, NIS, PDS, TPO, Tg などの甲状腺機能遺伝子発現だけでなく, DUOX の発現と機能調節において Tg が大きな役割を担っていることが判明し, 濾胞内 Tg が DUOX 発現を介してヨード有機化を調節することが初めて明らかとなった.

かね こ かい ち
金 子 開 知

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第466号

学位授与の日付：平成24年11月26日

主 論 文：Changes of serum soluble receptor activator for nuclear factor- κ B ligand after glucocorticoid therapy reflect regulation of its expression by osteoblasts
(ステロイド療法下の血清可溶性 RANKL の変動は骨芽細胞での発現調節を反映する)

著 者：Kaneko K, Kusunoki N, Hasunuma T, Kawai S

公 表 誌：J Clin Endocrinol Metab 97: E1909-1917, 2012

論文内容の要旨

【背景】ステロイド (glucocorticoid) には多くの重篤な副作用が知られている。その1つとして骨粗鬆症による骨折は頻度が高く、quality of life (QOL) の低下や合併症の誘発などステロイド療法の大きな課題となっている。ステロイド性骨粗鬆症の発症機序として骨芽細胞が発現する receptor activator for nuclear factor κ B ligand (RANKL) と osteoprotegerin (OPG) の破骨細胞への影響が注目されている。RANKL は、破骨細胞の前駆細胞表面に発現される受容体である RANK と結合することにより、成熟破骨細胞となり骨吸収が活発となる。一方、OPG は、RANK より高い親和性で RANKL に結合し RANKL を介する破骨細胞の活性化を抑制する、デコイ受容体である。RANKL と OPG は、それぞれ骨組織局所において骨吸収を調節する重要な骨代謝調節因子である。RANKL には、骨芽細胞表面に出現する RANKL と血液中に循環している可溶性 RANKL (soluble RANKL : sRANKL) が存在する。血清 sRANKL は、従来の報告では骨芽細胞膜上に発現した膜型 RANKL が、細胞膜上で酵素によって切断され、可溶性蛋白として遊離し血中に循環するか、活性化 T 細胞によって産生されると考えられている。しかしながら、血清に存在する sRANKL の存在意義についてはいまだ不明であり、特にステロイド性骨粗鬆症における血清 sRANKL についての報告はなされていない。

【目的】本研究では、未治療の活動性の高い膠原病患者を対象に、血清 sRANKL、OPG を前向きに測定することにより、ステロイド性骨粗鬆症の発症機序における血清 sRANKL、OPG の意義を明らかにすることを目的とした。さらに骨芽細胞レベルにおけるステロイドによる RANKL、OPG の産生を検討した。

【対象および方法】本研究は東邦大学医療センター大森病院および北里研究所倫理委員会の承認を受け、患者および健常対照者より文書同意を得て、東邦大学医療センター大森病院（患者）および北里研究所（健常者）において遂行された。未治療でプレドニゾロン 30 mg/日以上の治療を開始し、同時にビスホスホネート製剤を併用した活動期膠原病患者 60 例（全身性エリテマトーデス 21 例、血管炎 19 例、多発性筋炎/皮膚筋炎 15 例、成人スティル病 5 例、平均 55.2 歳、女性 40 例・閉経後 23 例）を対象に、ステロイド治療前、治療 1, 2, 3, 4 週後に、血清 sRANKL、OPG を経時的に測定した。また、年齢 (± 5 歳)、性別、閉経を一致させた健常者 60 例（平均 55.2 歳、女性 40 例・閉経後 23 例）の血清 sRANKL、OPG を治療前の膠原病患者と比較した。正常ヒト骨芽細胞を培養し、デキサメサゾン (10^{-6} ~ 10^{-8} M) や interleukin-6 (IL-6) 100 ng/ml と可溶性 IL-6 受容体 100 ng/ml を添加し reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) にて、各 RANKL、OPG messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現を検討した。正常ヒト骨芽細胞の培養上清中の RANKL、OPG の蛋白濃度は enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) キットを用いて測定した。

【結果】治療前の膠原病患者群と健常者群の血清 sRANKL、OPG は、いずれも患者群が健常者群と比べ有意に増加していた。前向き臨床研究において、ステロイド療法後に血清 sRANKL は変化を認めなかった。しかし、治療前 sRANKL 値の分布は二峰性であり、血清 sRANKL 値が 0.16 pmol/l 以上を高 sRANKL 群とし、患者を 2 群に分けて解析した。高 sRANKL 群においてステロイド療法後有意に減少し、低 sRANKL 群ではステロイド療法後有意に増加した。一方、ステロイド療法後の血清 OPG 濃度は全例有意に減少した。また、低 sRANKL 群のステロイド治療後の骨密度は、高 sRANKL 群よりも有意に低下した。正常ヒト骨芽細胞にデキサメサゾン単独を添加すると RANKL mRNA の発現は増加し、OPG mRNA の発現は減少した。正常ヒト骨芽細胞は、IL-6 と可溶性 IL-6 受容体の刺激により RANKL と OPG mRNA の発現はともに増加し、さらにデキサメサゾンを添加した際には RANKL と OPG mRNA の発現はともに減少した。細胞上清での RANKL の蛋白濃度は ELISA で検出できなかった。OPG の蛋白濃度は OPG mRNA の結果同様に、デキサメサゾンの

添加で減少し、IL-6 刺激により増加した OPG はデキサメサゾンで減少した。

【結語】OPG/RANKL/RANK system は、ステロイド性骨粗鬆症の病態機序に重要な役割を果たしており、血清 sRANKL は膠原病疾患におけるステロイド性骨粗鬆症の有用なマーカーの 1 つになることが示唆された。

かわ せ いさむ
河 瀬 勇

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第 467 号

学位授与の日付：平成 25 年 3 月 28 日

主 論 文：Aortic valve reconstruction of unicuspid aortic valve by tricuspization using autologous pericardium

（大動脈弁 1 尖弁に対する自己心膜を用いた大動脈弁 3 尖再建術）

著 者：Kawase I, Ozaki S, Yamashita H, Uchida S, Nozawa Y, Matsuyama T, Takatoh M, Hagiwara S

公 表 誌：Ann Thorac Surg 94: 1180-1184, 2012

論文内容の要旨

【背景】先天性大動脈弁 1 尖弁はまれな奇形であり、成人においては 0.02% 程度の発生率（保有率）と言われる。先天性大動脈弁 1 尖弁を有する場合、比較的若年期に狭窄症あるいは閉鎖不全症といった大動脈弁機能不全を発症しやすく重症の場合外科的治療を要することがある。本論文においては、弁膜症を発症した先天性大動脈弁 1 尖弁に対し、独自に開発したグルタルアルデヒド処理した自己心膜を用いた大動脈 3 尖再建術の効果が評価された。

【対象および方法】2007 年 4 月から 2011 年 1 月に 304 例の大動脈弁再建術を施行した。そのうち 9 例（約 3%）の先天性大動脈弁 1 尖弁症例を後ろ向きに調査し本術式の妥当性を検討した。9 症例のうち、8 例が男性、1 例が女性であった。平均年齢は 48.9 ± 19.9 歳（14 歳～78 歳）であった。6 症例が大動脈弁狭窄および閉鎖不全の混合病変であり、2 例が大動脈弁狭窄症、1 例が大動脈弁閉鎖不全症であった。併施手術には、3 例の上行・部分弓部大動脈人工血管置換術と 1 例の卵円孔閉鎖術が含まれていた（直径 45 mm を超える上行大動脈は将来の大動脈解離を予防する目的で人工血管置換を行っている）。先天性 1 尖弁には、unicommissural unicuspid aortic valve と acommisural unicuspid aortic valve が存在するが、今回は 9 症例とも成人例に多くみられる unicommissural unicuspid aortic valve であった。また、唯一存在する交連部の位置は左冠尖と無冠尖の間が 6 例、左冠尖と右冠尖の間が 3 例であり、これも一般に提唱されている傾向に一致していた。手術は、胸骨正中切開の後、自己心膜を採取して 0.6% グルタルアルデヒド溶液で 10 分間固定し、生理食塩水で 6 分間ずつ 3 回洗浄する。大動脈弁再建手技は、全例、全身麻酔下、体外循環下、心筋保護液投与による心停止下に行った。機能不全を起こした自己大動脈弁を切除し、石灰物質を cavitron ultrasonic surgical aspirator (CUSA) を用いて丁寧に除去する。その後、大動脈弁の各交連間距離を自己開発のサイザーで測り、その値に応じて自己開発したテンプレートを用いてグルタルアルデヒド処理した自己心膜から 3 弁尖をトリミングして作成する。次に 3 弁尖をそれぞれ独立して各弁輪に縫着するのであるが、先天性 1 尖弁の場合交連が 1 カ所しか存在せず、新たな交連を 2 カ所作成する必要がある。今回は全例が unicommissural unicuspid aortic valve であり、いずれも縫線 (raphe) が存在するタイプであったため、raphe に沿う形で 1 カ所存在する交連と同じ高さ（平面上）に新たな交連を設定した。Raphe のないタイプでは、冠動脈口的位置を考慮して自己開発したサイザーを利用して、まったく新しい縫合線と交連を作成する必要がある。交連の位置が決まれば、各弁輪の中央（底部）からその交連に向かって両方向性に縫い上がる形で自己心膜弁尖を縫着する。交連部では、交連形成を 1 針のみ追加して行う。3 弁尖とも同様に縫着して再建術を終了する。また、将来の交連部の大動脈拡大を予防するため、交連部平面の大動脈壁外周にフェルト・ストリップを巻くことにしている。

【結果】術後早期の死亡や重篤な合併症はみられなかった。術前には、3 度の大動脈弁逆流 (aortic regurgitation : AR) が 4 例にみられ、2 度の大動脈弁逆流が 3 例にみられ、大動脈弁狭窄症をもつ患者の経大動脈弁最大圧較差の平均値が 92.0 ± 31.2 mmHg であった。術後 1 週間に施行した心エコー評価では、大動脈弁狭窄症を持っていた患者の経大動脈弁最大圧

較差の平均値が 10.4 ± 3.5 mmHg であり, trivial AR (ごくわずかな大動脈弁逆流) が 3 例にみられたが, 他の 6 例に大動脈弁逆流は全くみられなかった. 平均 551.1 ± 51.4 日のフォローアップで 9 例全員が the New York Heart Association (NYHA) functional class 1 と良好な経過であり, 再手術症例やインターベンションを要した症例はみられていない. 術後 1 年の心エコー評価では, 術前に大動脈弁狭窄症と診断された患者の経大動脈弁最大圧較差の平均値は 8.8 ± 3.9 mmHg であり, trivial AR が 5 例で他の 4 例には全く AR が存在しなかった. 抗凝固薬 (ワーファリン) の投与を術後行うことなく, 血栓・塞栓症あるいは出血性合併症などは全くみられていない.

【結語】 弁膜症を発症した先天性大動脈弁 1 尖弁をグルタルアルデヒド処理した自己心膜を用いた独自の 3 尖再建術で安全に治療することができた. 術後の心エコー評価による血行動態は良好であり, 患者の生活の質 (quality of life) も十分に保たれ良好な早期成績を得た. 本術式は, 先天性大動脈弁 1 尖弁といった特殊な解剖学的形態の病態にも十分応用可能であった. 今後, 長期の観察を続け, 本術式の妥当性をさらに追求する.

しも だいら かよこ
下 平 佳代子

学位の種類: 博士 (医学) 学位番号: 甲第 468 号

学位授与の日付: 平成 25 年 3 月 28 日

主 論 文: Gene expression analysis of a murine model with pulmonary vascular remodeling compared to end-stage IPAH lungs
(ヒト終末期特発性肺動脈性肺高血圧症と比較した肺血管改築誘発マウスモデルに関する遺伝子発現変動解析)

著 者: Shimodaira K, Okubo Y, Ochiai E, Nakayama H, Katano H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Tochigi N, Nemoto T, Saji T, Kamei K, Shibuya K

公 表 誌: Respir Res 13: 103 (online journal), 2012

論文内容の要旨

【背景および目的】 特発性肺動脈性肺高血圧症 (idiopathic pulmonary arterial hypertension: IPAH) は肺動脈の内膜・中膜の肥厚を特徴的な病理所見とする疾患群である. 罹患率は人口 100 万人対 2 人とまれな疾患であるものの, その多くは小児期や若年期に発症し, 無治療の場合の生存期間は約 3 年と予後不良の疾患である. 血管拡張薬の開発により IPAH の生命予後は飛躍的に改善してきたが, 根本的な治療法は肺移植以外にないのが現状である. IPAH の原因遺伝子として bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMP2) や activin-like kinase type 1 (ALK1), endoglin (ENG) 等の bone morphogenetic protein (BMP) signaling 関連遺伝子が注目されているが, 病態形成の機序はいまだ明らかでない. 病態解明の一助として, IPAH の病態に本質的に関与している signaling pathway を探索することを目的とし, 真菌誘発 PAH モデルマウスと IPAH との遺伝子発現変動様式の比較解析を行った. 本 PAH マウスモデルは, 一般環境内に広く存在する真菌の 1 つである *Stachybotrys chartarum* (*S. chartarum*) の気管内接種により右室圧の上昇を伴う IPAH 様の肺動脈病変が形成されることが確認されている.

【方法】 1) PAH モデルマウスの作製: 実験群と対照群 (各 3 匹) のマウスに対し, 実験群には *S. chartarum* の孢子懸濁液を, 対照群には懸濁液のみを経気管的に反復接種 (3-4 日ごとに合計 12 回) した. 最終接種日から 1 週間後に肺組織を採取した. 2) 肺動脈病変の形態学的評価: 病理切片上に観察されるすべての肺動脈 (1 個体につき 100 箇所以上) の最大径および内膜・中膜の距離を計測し, 肺動脈径に基づいて 3 群に分け, 肺動脈の内膜・中膜の肥厚の程度を算出し統計学的有意性検定を施行した. 3) 肺組織の網羅的遺伝子発現変動解析: 肺組織より抽出した ribonucleic acid (RNA) の遺伝子発現変動をマイクロアレイ法で網羅的に解析し, 統計学的に有意な発現変動があった遺伝子群に対して gene ontology (GO) 解析と pathway 解析を施行した. 4) 既報を用いた IPAH の遺伝子発現変動様式の集積および解析: IPAH の肺組織の遺伝子発現変動について報告されていた文献を可能な限り検索した. マイクロアレイの解析結果が公開されている文献からは情報を参照して GO 解析と pathway 解析を施行した. 個々の文献に記載されている遺伝子名とその発現様式の情報

報を集積し、各遺伝子が関連している pathway を検索した。得られた IPAH の遺伝子発現変動様式を PAH モデルマウスと比較した。

【結果】1) 肺動脈病変の形態学的評価：実験群では、肺動脈径によらず、内膜・中膜は有意に肥厚していた。炎症細胞浸潤はなかった。2) 肺組織の網羅的遺伝子発現変動解析：本モデルで有意に発現変動のみられた遺伝子数は840（発現上昇：337，発現低下：503）で、BMPR2, ALK1, ENG の遺伝子発現は有意に低下していた。GO 解析では、発現変動のみられた遺伝子の約8割は免疫応答に関連した遺伝子であり、その他にはエストロゲン、セロトニンの産生や代謝に関連する遺伝子等が含まれた。Pathway 解析では発現上昇していた遺伝子群からは hemostasis, Janus kinase-signal transducers and activators of the transcription (JAK-STAT) pathway 等が、発現低下していた遺伝子群からは BMP signaling や vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling, platelet-derived growth factor (PDGF) signaling 等が検出された。3) 既報を用いたヒト IPAH の遺伝子発現変動様式集積および解析：現在までに少なくとも3報のマイクロアレイを用いた解析と41種類の遺伝子の発現変動が報告されていた。マイクロアレイの解析結果を参照し、IPAH に共通する遺伝子発現変動解析を施行したが、該当する変動様式は検出できなかった。12種類の pathway について IPAH における発現変動様式を集積した。4) IPAH と PAH モデルマウスの遺伝子発現変動様式の比較：BMP signaling を含む5種類の pathway で両者の発現様式が一致していた。一方、発現変動様式の一致しない7種類の pathway には WNT/planar cell polarity (PCP) pathway やこの下流に位置する Ras homolog (Rho)/Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK) signaling pathway 等が含まれていた。

【考察】本モデルでみられる遺伝子発現変動は真菌接種という明らかな因子介入の結果であることから、本モデルと IPAH で発現変動様式が一致していたさまざまな pathway は、肺動脈のリモデリングにおいて二次的な変動であると考えられた。一方、本モデルと IPAH で発現変動様式の一致していなかった pathway の中にこそ、IPAH の病態に本質的に関連している pathway が含まれている可能性があり、中でも、WNT/PCP pathway は他の pathway よりも上流に位置しており、IPAH の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。