

学位（博士）授与の記録

おか
岡

りょう
了

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第529号

学位授与の日付：平成28年3月29日

主論文：Effect of androgen deprivation therapy on arterial stiffness and serum lipid profile changes in patients with prostate cancer: A prospective study of initial 6-month follow-up

（前立腺癌患者におけるアンドロゲン除去療法施行時の動脈硬化ならびに血清脂質変化に与える影響についての初期6カ月前向き研究）

著者：Oka R, Utsumi T, Endo T, Yano M, Kamijima S, Kamiya N, Shirai K, Suzuki H

公表誌：Int J Clin Oncol 21: 389-396, 2016 (DOI: 10.1007/s10147-015-0891-7)

論文内容の要旨

【目的】近年、前立腺癌患者の増加に伴い、進行症例や手術不適合症例に対するアンドロゲン除去療法（androgen deprivation therapy：ADT）は増加しており重要かつ効果的な治療法であることは衆目の一致するところである。一方、ADTによるさまざまな副作用についても知られるようになってきており、特に動脈硬化を伴う心血管疾患（cardiovascular disease：CVD）の増加は前立腺癌患者の予後について規定する重要な問題である。われわれは動脈硬化の指標である、cardio-ankle vascular index（CAVI）やCVDの発症と強く相関するとされる血清脂質の変化についてADT前とその後について比較することで、ADTが血管系に与える影響について検討した。

【対象と方法】2012年3月～2014年12月に東邦大学医療センター佐倉病院にてADT療法を施行された58症例に対してADT開始前、開始後1, 3, 6カ月後における、CAVI値ならびに血清生化学データを比較検討した。全症例中、35症例は初回ADT単独治療、18症例は放射線療法前ADT、5症例は前立腺全摘除術後の生化学的再発の患者であった。ADTの内容は22症例でゴセレリン+ピカルタミド、21症例でリュープロレリン+ピカルタミド、5症例でデガレリクス単独であった。測定された項目は、前立腺特異抗原（prostate-specific antigen：PSA）、テストステロン、estimated glomerular filtration rate（eGFR）、トリグリセリド（triglyceride：TG）、総コレステロール（total cholesterol：TC）、HDLコレステロール（high density lipoprotein cholesterol：HDL-C）、LDLコレステロール（low density lipoprotein cholesterol：LDL-C）、CVDの増加と相関のあるとされるLDL-C/HDL-C比、C-reactive protein（CRP）、diacron-reactive oxygen（d-ROMs）、CAVI値などであった。

【結果】CAVI値のベースラインは既往に高血圧や糖尿病がある患者で有意に高値であった。また年齢、血圧、HbA1cと正の相関関係を認めた。PSAやテストステロンはADT後1カ月で有意な低下を認めた（ $p < 0.001$ ）。また1カ月後にTC、HDL-C、LDL-Cはそれぞれ平均185.5（ ± 34.1 ）mg/dlから206.2（ ± 33.6 ）mg/dl（ $p < 0.001$ ）、51.2（ ± 11.3 ）mg/dlから59.0（ ± 15.0 ）mg/dl（ $p < 0.001$ ）、108.1（ ± 33.6 ）mg/dlから119.2（ ± 32.9 ）mg/dl（ $p < 0.001$ ）と有意な上昇を認め、同様に3, 6カ月後であってもベースラインと比較して有意に高値であった。その他eGFR、TG、LDL-C/HDL-C、CRP、d-ROMs、CAVI値などは有意な変化を認めなかった。また、6カ月後にCAVIが増加した群32症例と増加しなかった群26症例について比較検討すると、LDL-C/HDL-Cは有意とまではいかないが、CAVI値増加群で高い傾向にあった（2.4（ ± 0.9 ）対2.0（ ± 0.7 ）， $p = 0.083$ ）。

【考察】CAVIは血圧に影響されない、動脈硬化指標である。本研究は前立腺癌患者に対するADTによる影響をCAVIを用いて評価した初めてのものである。近年の研究ではADTが糖尿病や高コレステロール血症等のメタボリックな変化を引き起こすことが報告されている。このような病態が心血管イベントの増加に関与すると考えられる。今回の6カ月間の観察期間ではCAVIの有意な上昇は認めず、新規の心血管イベントの発生も確認されなかった。ただしLDL-C、HDL-C

やTCは有意な上昇を認め、これは他の研究でも報告されている。俗に言われる、良いコレステロールと悪いコレステロールの双方が上昇したため、血管系への影響が抑えられた可能性も考えられる。有意ではないがCAVI上昇群では、CVDの増加に関与するLDL-C/HDL-Cがベースラインで高い傾向にあり、長期的には影響を与える可能性は考えられる。本研究にはいくつかの限界があり、観察期間が6カ月と短いこと、また症例数が少ないこと、糖尿病やインシュリン抵抗性の影響を検討できていないこと（ただし新規の糖尿病発症は認めなかった）、使用したADTの種類が統一されていないことなどである。少なくとも短期間のADTは動脈硬化を有意に増やすことはないが、LDL-C/HDL-Cベースラインが高いことが動脈硬化を進展させるハイリスクになる可能性が示唆された。

やま ぐち かず ひさ
山 口 和 久

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第530号

学位授与の日付：平成28年3月29日

主 論 文：A single-arm phase II trial of combined chemotherapy with S-1, oral leucovorin, and bevacizumab in heavily pre-treated patients with metastatic colorectal cancer
(標準治療終了後の大腸癌症例に対するS1+ロイコボリン+ベバシズマブ併用療法の第II相試験)

著 者：Yamaguchi K, Taniguchi H, Komori A, Narita Y, Nitta S, Nomura M, Kadowaki S, Takahari D, Ura T, Andoh M, Muro K, Mori K, Igarashi Y

公 表 誌：BMC Cancer 15: 601, 2015 (DOI: 10.1186/s12885-015-1606-1)

論文内容の要旨

【背景】大腸癌における標準的化学療法は、殺細胞薬であるフルオロピリミジン、イリノテカン、オキサリプラチン、分子標的薬であるベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブである。しかしながら、それらの治療終了後の大腸癌症例の予後は5~6カ月とされており、新たな治療の開発が望まれる。

S1は経口のフルオロピリミジン系の抗癌剤であり、第II相試験において5-fluorouracil (5-FU)を含む標準的化学療法終了後の大腸癌症例に対して有効性が証明されている。ロイコボリンはthymidylate synthase (TS)を阻害することにより、5-FUの抗腫瘍活性を高めることが知られており、未治療の大腸癌症例においてS1+ロイコボリン併用療法は高い抗腫瘍効果を示すことが報告されている。ベバシズマブは抗vascular endothelial growth factor (VEGF)抗体であり、初回治療増悪後に二次治療においても継続投与することにより、生存期間が延長することが示されている。以上の背景より、S1、ロイコボリン、ベバシズマブの三剤を併用することにより、治療抵抗性となった大腸癌症例において臨床効果が得られるものと推測される。よって今回、われわれは標準治療終了後の大腸癌症例に対してS1+ロイコボリン+ベバシズマブ併用療法の効果および安全性につき前向きに検討を行った。

【対象および方法】対象は、標準的化学療法であるフルオロピリミジン、イリノテカン、オキサリプラチン、ベバシズマブ、セツキシマブまたはパニツムマブ (KRAS野生型)を含む治療に対して不応・不耐となった症例である。その他、20歳以上、組織学的に大腸腺癌が証明されていること、測定可能病変を有していること、Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS)が2以下、経口摂取が可能、S1内服歴がないこと、主要臓器機能が保たれていることである。

投与方法はS1 (body surface area (BSA) < 1.25 m² : 80 mg/日, 1.25 m² ≤ BSA < 1.50 m² : 100 mg/日, BSA ≥ 1.50 m² : 120 mg/日)とロイコボリン (50 mg/日)を1日2回、1週間経口投与、1週間休薬の2週を1コースとして繰り返した。ベバシズマブ (5 mg/kg)はday1のみ投与とした。主要評価項目は病勢コントロール率 (disease control rate : DCR)、副次評価項目は無増悪生存期間 (progression-free survival : PFS)、全生存期間 (overall survival : OS)、安全性、quality of life (QOL)とした。なお画像評価については施設外の放射線科医による独立判定とした。QOLは、EQ5Dを用いたアンケート調査を2週間ごとに行った。症例数の設定は、本試験の主要評価項目であるDCRにおいて期待値44%、閾値

22%, 片側検定 ($\alpha : 0.05$), 検出力 0.80 として計算したところ, 必要症例数は 28 例と算出された。

【結果】2012 年 10 月～2013 年 11 月に計 31 例が登録された。年齢中央値は 69 歳, 男性が 21 例 (68%), PS1 以下が 29 例 (94%), 原発切除後が 26 例 (84%), KRAS 変異が 13 例 (37%), BRAF 変異が 2 例 (7%) であった。評価可能であった 28 例のうち, complete remission (CR) は 0 例, partial remission (PR) は 2 例 (7%), stable disease (SD) は 18 例 (58%), progressive disease (PD) は 8 例 (26%) であり, 主要評価項目である DCR は 65% (95% CI, 45–81%) と良好な成績であった。PFS 中央値は 5.3 カ月 (95%CI, 2.1–9.3 カ月), OS 中央値は 9.9 カ月 (95%CI, 7.4–NA カ月) であった。なお KRAS 変異の有無における効果および生存期間に差は認めなかった。

投与コースの中央値は 9 コース (interquartile range : IQR, 4–13) であった。相対用量強度は, S1 およびロイコボリンが 78%, ベバシズマブが 87% であり認容性は保たれていた。有害事象は, 血液学的副作用に比べて非血液学的副作用がより高頻度に発現した。頻度の高かった grade3 以上の有害事象は, 口内炎 (26%) と下痢 (10%) であったが, 減量および休止期間を設けることにより十分に認容可能であった。1 例のみ原因不明の治療関連死を認めた。QOL に関しては, プロトコル治療期間中に変化は認めなかった。

【考察】本試験は, 主たる評価項目であった DCR において期待値 44% を上回る 65% を認め, 主要評価項目を達成した。生存期間においても優れ, 認容性も保たれていることが証明された。また近年, 承認されたサルベージラインでの新規抗癌剤であるレゴラフェニブや TAS02 のデータと比較しても良好な成績であった。以上より本試験治療は, 新たな治療法の可能性となることが示された。

ただし, 本試験は単施設の少数例による成績のため, プラセボを対象とした比較試験にて真の効果を検証する必要があると考えられる。

【結語】標準治療終了後の大腸癌症例に対して S1+ ロイコボリン + ベバシズマブ併用療法は有効な治療法であることが示された。

しかのこうたろう
鹿野 孝太郎

学位の種類：博士 (医学) 学位番号：甲第 531 号

学位授与の日付：平成 28 年 3 月 29 日

主論文：Efficacy of Vitamin K₂ for glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with systemic autoimmune diseases
(全身性自己免疫疾患患者におけるステロイド性骨粗鬆症に対するビタミン K₂ の有効性)

著者：Shikano K, Kaneko K, Kawazoe M, Kaburaki M, Hasunuma T, Kawai S

公表誌：Intern Med 55: 1997–2003, 2016 (DOI: 10.2169/internalmedicine. 55. 6230)

論文内容の要旨

【背景および目的】ステロイドは全身性自己免疫疾患 (膠原病) 患者の治療に広く使用されているが, 近年, 大量・長期使用による重篤な有害事象として骨粗鬆症が注目されている。骨粗鬆症により脊椎圧迫骨折や大腿骨頸部骨折を合併すると, 患者の日常生活動作は著しく低下することになる。2015 年に原発性骨粗鬆症の治療ガイドラインが改訂されたが, ビタミン K₂ (VK2) には骨密度の増加や骨折の発症抑制効果を示す報告があるため, 骨粗鬆症治療薬の 1 つとして推奨されている。しかし, ステロイド性骨粗鬆症に対する VK2 の有効性については必ずしも十分なエビデンスがあるとはいえない。VK2 の骨代謝改善機序としては, 骨芽細胞で産生される osteocalcin (OC) への作用が挙げられている。OC は γ -カルボキシル化され, GlaOC となって骨カルシウムと結合し, 骨石灰化が生じる。カルボキシル化されなかった OC は, undercarboxylated OC (ucOC) となり, そのまま血中へと放出される。この γ -カルボキシル化に関与する酵素は VK2 依存性であり, γ -カルボキシル化が活性化して GlaOC は増加し, ucOC は減少して骨石灰化が促進される。そこで, ステロイド性骨粗鬆症に対し, VK2 の有効性を検証することを本研究の目的とした。

【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リウマチ膠原病センター (膠原病科) 入院中のリウマチ膠

原病疾患患者 60 名（男性 20 名/女性 40 名）を対象とした。全例未治療の患者で、新たに prednisolone (PSL) 治療開始時にビスホスホネート製剤を併用した。それらの患者を後ろ向きに VK2 併用・非併用群に分類し、PSL 投与前、投与 1, 2, 3, 4 週後の血中 OC, ucOC およびその他の骨形成マーカー (type I procollagen N-terminal propeptide : P1NP, bone specific alkaline phosphatase : BAP)・吸収マーカー (type I collagen cross-linked N-telopeptide : NTX) を測定した。また、平均 1.5 年後に bone mineral density (BMD) の測定も行った。

【結果】血中 OC 濃度は PSL 投与後から両群で有意に減少し、また PSL 投与 3 週以降では VK2 併用群において血中 OC 濃度の減少が抑制された。血中 ucOC 濃度は PSL 投与後から両群共に前値に比べて有意に減少した。また、PSL 投与 1 週目では VK2 併用群で、VK2 非併用群に比べて有意に減少し、投与 2 週目以降では有意差はみられなかったが、VK2 併用群では非併用群に比べ、血中 ucOC 濃度は減少する傾向がみられた。一方、血清 P1NP 濃度は PSL 投与後から両群で有意に減少した。また、PSL 投与 4 週目には、VK2 併用群で血清 P1NP の減少は有意に抑制された。他の骨形成マーカーである血清 BAP 濃度と骨吸収マーカーである血清 NTX 濃度、両群ともに前値と PSL 投与後に変化はみられず、PSL 投与前後で両群ともに変化はみられなかった。また、臨床症状では、BMD には両群間に有意差はみられず、さらに VK2 併用群では 0/20 名、VK2 非併用群では 2/40 名で新規骨折の発症を認めたが、両群間で発症率に有意差はみられなかった。

【考察】VK2 はステロイド性骨粗鬆症に対し、骨代謝マーカーである血清 OC, ucOC および P1NP の改善作用を示した。VK2 は OC の産生、GlaOC へのシフトを促進させ、また I 型コラーゲンの産生を促進させることが報告されており、これらの作用が骨代謝マーカーの改善に関与したと考えられた。また、本研究の観察期間において、BMD には両群間で差がみられなかったものの、VK2 非併用群では 2 例の骨折が認められたのに対し、VK2 併用群では新規に骨折を発症した患者はみられず、VK2 の併用は骨折の発症率に対して有意差はないものの良い傾向がみられた。

【結語】ステロイド投与による強力な骨粗鬆症の進行に対し、VK2 の併用はステロイドによる一部の骨代謝マーカーに対して有意にその増悪を改善する効果がみられたものの、骨密度や骨折予防の改善作用は軽度にとどまることが示唆された。しかし、本研究の臨床症状の観察期間は平均 1.5 年であり、今後さらに長期の検討が必要である。

うら べ なお ひさ
ト 部 尚 久

学位の種類：博士 (医学) 学位番号：甲第 532 号

学位授与の日付：平成 28 年 3 月 29 日

主 論 文：Molecular epidemiological analysis of a *Pneumocystis* pneumonia outbreak among renal transplant patients
(腎移植患者における *Pneumocystis* 肺炎集団感染の分子疫学的解析)

著 者：Urabe N, Ishii Y, Hyodo Y, Aoki K, Yoshizawa S, Saga T, Murayama SY, Sakai K, Homma S, Tateda K

公 表 誌：Clin Microbiol Infect 22: 365-371, 2016

論文内容の要旨

【背景】*Pneumocystis pneumonia* (PCP) は、*Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) を起因菌とした日和見感染症であり、時に重症化して致命的な経過も取り得る。現時点において *P. jirovecii* は培養検査が不可能であるため、伝播様式や感染症発症様式、病原因子などの詳細は解明されていない。近年、腎移植患者に対する集団感染が各国で報告されており、活動性 PCP 患者からの人-人感染が示唆されている。東邦大学医療センター大森病院 (当院) 腎センター (腎センター) において、2011 年 11 月 18 日～12 月 7 日の 3 週間に 5 名の腎移植後の患者が PCP の発症を認めた。われわれはこの 5 名の患者が同一株の *P. jirovecii* による感染かどうかを、分子疫学的手法を用いて解析した。

【方法】腎センターで集団発生した 5 名に加えて、2007～2014 年の 8 年間に当院で PCP を発症した 20 名の患者から得られた気管支肺胞洗浄液残余検体から抽出した DNA を鋳型として multilocus sequence typing を実施し、得られた DNA 塩基配列情報を結合し、近隣結合方にて系統解析を実施。 *P. jirovecii* の遺伝的類似性を比較した。また、サンガー法による

DNA塩基配列決定の際にDNA塩基が重複して判別できなかった箇所について、次世代シーケンサーを使用して重複した塩基の種類とその比率について解析した。

【結果】腎センターで3週間の期間にPCPを発症した5名の患者のうち4名の患者および、集団感染から2年後の2013年に腎センターでPCPを発症した腎移植後の患者2名の気管支肺胞洗浄液中の*P. jirovecii*に由来するDNA塩基配列は同一性が高かった。また、サンガー法にてDNA塩基が重複し塩基を決定することができなかった遺伝子は14箇所認められた。次世代シーケンサーによる重複塩基の解析結果から、2種類の異なる塩基がほぼ同一の割合で含まれていた。

【考察】腎センター外来通院患者で2011年9月にPCPを発症し、11～12月にかけてのPCP集団発症患者との外来接触が確認されている1人のPCP患者が存在する。この患者は、気管支肺胞洗浄液の保存検体が存在していなかったため遺伝子解析は施行できていないが、PCPを集団発症した5名の患者と外来ブースを共有している。*P. jirovecii*の遺伝子型の同一性が高い4名の患者はこの活動性PCP患者から感染したと考えれば、潜伏期は11～12週間であり過去の報告と一致する。また、2011年から2年経過した2013年にPCPを発症した2名の患者は、2011年に集団発症した患者と遺伝子型の同一性は高かったが、これらの患者と腎センター外来受診日を共有していなかった。この2名の患者は、医療従事者など無症状キャリアーからの感染や、待合室の環境からの感染、2011年に同一株*P. jirovecii*に感染したが、発症せず保菌状態であった患者を介しての感染などが考えられたが、PCPの発症様式は、保菌株の再賦活化ではなく新規感染と考えられており、2013年の発症直前に感染した可能性が高いと考える。今回対象とした遺伝子のDNA塩基配列は、サンガー法にて2種類の異なる塩基が重複し判読できなかった箇所が認められた。次世代シーケンサーを使用した解析結果から、重複した2種類の塩基はほぼ同じ割合であった。今回の結果から、多くの遺伝子で2種類の異なる塩基はほぼ同じ比率で含まれることが明らかとなった。この結果は*P. jirovecii*がdiploid cellであるため、2組の染色体遺伝子がそれぞれ別の塩基で構成されていたことに起因する可能性が示唆された。

【結論】当院で経験したPCP集団発症が同一株によるout breakである可能性が高いことを示した。さらに、2種類の異なる塩基の存在は、*P. jirovecii*がdiploid cellであることに起因すると思われた。

し みず とし ひろ
清 水 俊 博

学位の種類：博士(医学) 学位番号：甲第533号

学位授与の日付：平成28年3月29日

主 論 文：Derivation of integration-free iPSCs from a Klinefelter syndrome patient
(遺伝子挿入のないクラインフェルター症候群患者からのiPS細胞の誘導)

著 者：Shimizu T, Shiohara M, Tai T, Nagao K, Nakajima K, Kobayashi H

公 表 誌：Reprod Med Biol 15: 35-43, 2016 (DOI: 10.1007/s12522-015-0213-9)

論文内容の要旨

【目的】クラインフェルター症候群(Klinefelter syndrome: KS) (47, XXY)はヒトにおいて最も一般的な性染色体異常である。KSは多彩な臨床的症状に加え、非閉塞性無精子症(non-obstructive azoospermia: NOA)による不妊症と関連があるとされる。NOAの基礎となるメカニズムはいまだ理解されておらず、現在特定の治療方法もない。顕微鏡的精巣精子抽出手術(microdissection testicular sperm extraction: マイクロTESE)後の体外受精が妊娠の成功をもたらすことができる唯一の方法である。

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)の発展は、再生医療においても多くの可能性を秘めている。KS患者由来のiPS細胞の樹立は、KSの病原性メカニズムの研究および新規治療法獲得のために有用となり得る。今回の研究では、OCT4, SOX2, KLF4, C-MYCの4つの転写因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを使用し、KS患者の精巣組織に由来するiPS細胞の誘導を行った。さらに心筋様細胞に分化する能力を実証することにより、今回得られたiPS細胞の多能性を確認した。

【方法】KS患者の精巣組織は、マイクロTESEにより得た。得られた精巣組織を分析した結果、セルトリ細胞、ライ

ディヒ細胞, および線維芽細胞で構成されており, 精子細胞の存在は確認できなかった。

組織を酵素消化し, 解離した細胞を標準的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地において, 5%CO₂ を含む 37°C 加湿大気条件下で 14 日間培養し, KS 精巣由来線維芽細胞株を得た。得られた線維芽細胞に対し, OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC の 4 つの転写因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを使用し遺伝子導入を行った。

KS 由来精巣線維芽細胞は, センダイウイルス含有培地において, 標準的培養液で 24 時間培養し, 7 日後にトリプシン処理により回収した。4 ng/ml の basic fibroblast growth factor (bFGF) を加えた霊長類 ES 細胞培地を, mouse embryonic fibroblast (MEF) フィーダー細胞を配した 10 cm のディッシュに入れ, ここに回収した細胞を 5×10⁴ 個配置した。導入された細胞において, 未分化幹細胞マーカーである OCT4, NANOG の発現状況を reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い確認した。

続いて, 得られた細胞の多能性について検証を行った。生体外 (*in vitro*) 試験として, 細胞を 8 日間浮遊培養し胚葉体を形成, これに免疫細胞学的検査を行うことで, 分化マーカーの発現状況を調べ, 分化能力を確認した。

生体内 (*in vivo*) 試験として, SCID マウス精巣内へ細胞の移植を行った。3 カ月間腫瘍形成を確認し, 組織学的検証を行った。

さらに細胞分化能の質の確認のために, 心筋様細胞への分化誘導実験を追加した。

【結果】導入約 15 日後に iPS 細胞様コロニーを視認した。G バンディング検査を行い, コロニーの染色体が 47XXY であることを確認した。

RT-PCR にて KS 患者由来 iPS 様細胞が OCT4 および NANOG を発現していることを確認した。免疫細胞学的検査にて NANOG, OCT4, および SSEA-4 の発現を確認した。加えて, 細胞が外因性の導入遺伝子やセンダイウイルス由来の遺伝子を発現していないことを確認した。形成した胚葉体は平滑筋アクチン, α-フェトプロテイン, および b III チューブリンを発現しており, 三胚葉への分化能を示した。SCID マウスの精巣内移植により奇形腫を形成し, 組織学的分析を行った結果, KS 由来の iPS 細胞が生体内 (*in vivo*) においても三胚葉に分化可能なことを示した。分化誘導実験において, 培養 14 日後に, 心筋様細胞コロニーの存在と, 細胞の拍動を確認した。

【考察】遺伝子修飾のない KS 由来の iPS 細胞の樹立に成功した。

われわれは以前レンチウイルスベクターを用いて正常および KS ヒト精巣組織由来の iPS 細胞を樹立した。しかしレンチウイルスは, 宿主ゲノムに統合され, 強力な導入遺伝子の発現をもたらす性質があり, C-MYC のゲノムへの組み込みによる腫瘍発症可能性の増加が示唆されている。

センダイウイルスは, マイナス鎖一本鎖 ribonucleic acid (RNA) ウイルスで, 宿主ゲノムに統合を行うことなく細胞質内で複製し, 効率よく iPS 細胞を誘導する。この性質により遺伝子修飾のない iPS 細胞の樹立が可能となった。

最近の研究にて, ヒト体細胞や iPS 細胞は, エピジェネティックな改変と遺伝子変異の両方を蓄積することが示されており, このことは細胞の質に影響を与えると考えられる。よって今後は iPS 細胞を研究や臨床試験で使用する際に, 質の評価が必要となる。

われわれは iPS 細胞の質の評価のため, 生体外 (*in vitro*) での心筋様細胞に分化する能力を試験し, これに成功したことで, 今回の細胞の多能性の可能性を強く示唆した。さらに生体外で胚様体形成, 生体内で三胚葉を含む腫瘍を形成することが可能なことも示した。以上の結果より今回のわれわれの KS 由来 iPS 細胞が高品質の多能性 iPS 細胞であることを示した。

た なか ひで き
田 中 英 樹

学位の種類: 博士 (医学) 学位番号: 甲第 534 号

学位授与の日付: 平成 28 年 3 月 29 日

主 論 文: A mathematical model of the pathophysiology of reflux esophagitis
(数理モデルにおける逆流性食道炎の検討)

著 者: Tanaka H, Urita Y, Kawagoe N, Sasaki Y, Watanabe T, Kawaguchi T

公 表 誌: Toho J Med 2: 8-15, 2016

論文内容の要旨

【背景】数理モデルであるセルオートマトンとは、有限個の状態をとるセルから構成され、次の時間のセル状態が、現在のセルおよび隣接するセルの状態によって決定される、局所法則により全体および未来を予測するモデルである。連続性が必要な微分方程式で対応不可能な、離散的で複雑な現象の予測に有用である。特に時間軸によってダイナミックに変化する生命の複雑な反応の予測に有用であるが、これまで臨床医学での応用はほとんどない。

一方、逆流性食道炎は胃酸が食道内に逆流して惹起される病態であるが、その内視鏡所見は多彩である。また、症状と内視鏡所見の乖離について、多くの研究が行われているにもかかわらず、一定の見解は得られていない。

今回、時間的に傷害部位の進展方向が明らかにされている逆流性食道炎の病態について、セルオートマトンモデルを用いて解析を試みた。

【方法と結果】MS Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) を使用して、0 および 1 の 2 状態、注目セルと両隣の 3 近傍で定義される一次元セルオートマトンを作成した。3 セルを基本単位とし、時間 t のときの中央セルを注目セル (次世代で変化するセル) とし、その状態を $C_i(t)$ とする。両隣の状態はそれぞれ $C_{i-1}(t)$, $C_{i+1}(t)$ と表記され、次世代注目セルは $C_i(t+1)$ となる。 $C_i(t+1)$ を決めるのは注目セルと両隣の 3 セルの状態の組み合わせであることから、その場合の数は、各セルが 2 状態をとるため、 $2^3=8$ 通りある。すなわち、次の状態を決定する 3 近傍の組み合わせが 8 通りである。ある法則では 3 近傍の組み合わせ 8 通りが、それぞれ次の時間で 2 状態をとり得ることから、 $C_i(t+1)$ を決定する法則は $2^8=256$ 通りであり、2 状態 3 近傍一次元セルオートマトンにおいて、その遷移表は 256 通りで構成される。遷移表で $t+1$ の行を構成する状態を表す数字 (0,1) の並びを 2 進法数字と考え、それを 10 進法へ変換した数値を遷移法則の名称とした。両側近傍と注目セルの状態の組み合わせによって、次世代の状態が決まる。 t_1, t_2, t_3, \dots と時間が経過するに従い、2 次元図形が形成されていく。遷移法則を変化させて得られる 2 次元画像を解析し、逆流性食道炎の内視鏡所見と比較検討し、適合する遷移法則から逆流性食道炎の病態解析を行った。

結果として、実在する逆流性食道炎の内視鏡所見と一致したのは、全 256 ルール中、23 のルール (9%) であった。これは内視鏡検査で検討された逆流性食道炎の罹患率 2.0% から 17.2% とほぼ一致する数値であった。3 近傍中 1 セル傷害のみで次世代が傷害される法則、3 セル中 1 セルおよび 2 セルが傷害された場合に次世代でも傷害される法則では、内視鏡所見と一致しなかった。すなわち、逆流性食道炎の内視鏡所見に一致した粘膜傷害が引き起こされるためには、胃酸の逆流方向と一致する縦軸方向だけでなく、水平方向の近傍状態との相互作用が必要と考えられた。また、3 セルのすべてが傷害されたときのみとき次世代の注目セルが傷害される法則では、grade A は形成されたが、それ以外の所見は描出できなかった。

3 セル中 3 セル傷害および 2 セル傷害で次世代の注目セルが傷害される法則では grade A および B の描出が可能であり、内視鏡所見をもっとも忠実に反映していた。このとき 2 セル傷害が左右いずれかの片側のみでは生じない法則へ変更すると、粘膜傷害が長く伸びる grade B 様の変化は得られず、両側 2 セル傷害が grade B 食道炎成立に必要な条件と考えられた。粘膜傷害のない non-erosive reflux esophagitis (NERD) は、3 セル傷害で次世代の注目セルが傷害されない法則で、表現可能であった。

【考察と結論】セルオートマトンを用いた数理モデルより得られる 2 次元画像は、近傍状態の変化および遷移法則により大きく異なっていた。近傍細胞が傷害されなければ、注目セルの傷害が口側へ進展することは困難であり、注目セル近傍の一方が傷害される場合には、容易に口側へ進展することが明らかとなった。酸の侵襲を増やしても粘膜傷害が生じない法則も表現可能であった。近傍細胞の状態を考慮することで粘膜傷害が伸展する内視鏡画像を描出できることから、細胞間の水平方向の相互作用および局所の防御機構が、粘膜傷害の伸展に寄与していると考えられた。数理モデルから得られる情報から仮説を構築し、実際の臨床データとの整合性を検討する手法は複雑系科学において一般に行われている。今回のモデルによる逆流性食道炎の発症率は、実臨床での有病率と極めて近似しており、局所法則が逆流性食道炎の内視鏡像に寄与していると考えられる。病変の伸展方向が明らかな逆流性食道炎において、セルオートマトンモデルの適応は有用と考えられ、今後多くの領域で応用可能と思われた。

ふく たけ かつ のり
福 武 勝 典

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第536号

学位授与の日付：平成28年3月29日

主 論 文：Investigation of ossification in the posterior longitudinal ligament using micro-focus X-ray CT scanning and histological examination
(マイクロCTおよび組織学的検索による後縦靭帯内骨化の解析)

著 者：Fukutake K, Ishiwatari T, Takahashi H, Tsuchiya K, Okubo Y, Shinozaki M, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K, Wada A

公 表 誌：Diagn Pathol 10: 205, 2015 (DOI: 10.1186/s13000-015-0440-8)

論文内容の要旨

【背景】後縦靭帯骨化症は、靭帯骨化が進行すると脊髄を圧迫して脊髄症を来す疾患で、本邦では厚生労働省指定難病の1つとなっている。過去に多くの研究がなされており、骨化に関連する因子として年齢、性別、body mass index (BMI)、インスリン、耐糖能異常、筋ジストロフィー、vitamin D (VitD) 抵抗性くる病、副甲状腺機能異常などが示されている。組織学的には、靭帯付着部 (enthesis) における線維軟骨層の拡大に伴う靭帯肥厚や、椎間板線維輪の微小な破綻による後縦靭帯の軟骨様組織形成などが観察されている。その初期過程で enthesis が重要な役割を果たすとされるが、詳細はいまだ明らかではない。本研究の目的は、非後縦靭帯骨化症剖検例の後縦靭帯に出現する微小な骨化を観察し、骨化メカニズムの一端を明らかにすることである。

【方法】2009年1月～2013年12月に東邦大学医療センター大森病院で行われた連続した病理解剖例を対象とした。脊椎が摘出されていない症例、後縦靭帯の観察に適さない症例は除外した。試料は正中断でホルマリン固定された第10胸椎～第5腰椎の中から、その中で最も後縦靭帯骨化の頻度が高いとされるL1/2椎間板を含むL1, L2椎体を摘出した。後縦靭帯から椎体までの厚さ10mm、正中矢状断面から外側10mmの部位を使用し、放射線学的、組織学的検索に供した。マイクロcomputed tomography (CT) 画像および再構築したthree-dimensional (3D) 画像により後縦靭帯に見られる微細な骨化を観察した。また各検体を脱灰処理した後に正中矢状断面をパラフィン包埋し、マイクロCTで観察された高吸収域に一致する切片を作成してhematoxylin-eosin (HE) 染色を施した。石灰化、骨化、靭帯近傍組織の変化を光学顕微鏡下に観察し、病理組織学的考察を行った。さらに、過去に報告されている骨化関連因子として年齢、性別、BMI、HbA1c、糖尿病、悪性腫瘍との関係を調査した。本研究は東邦大学医学部倫理委員会の承認を得て行った(#260242600825093)。

【結果】観察期間中に施行された全267剖検例のうち、後縦靭帯が観察可能であった103例を対象とした。生前に後縦靭帯骨化症の診断を受けた症例はなかった。103例中48例(46.6%)の症例で後縦靭帯内に0.1mm²以上の骨化を認め、その半数で成熟した骨梁構造が観察された。マイクロCTで観察された高吸収域は大きく3つの形態に分類された。椎間板後方椎体連続型(23例)は椎体隅角部から延長するように進展する形状であり、高吸収域内部には骨梁構造を認めることが多く、骨化率も高い傾向にあった。椎間板後方椎体遊離型(11例)は椎間板高位に遊離して存在し、一塊とした高吸収域というよりは、小さな病変の集まりとして捉えることができた。椎体後方型(29例)は最も靭帯の厚さや面積に変化がなく、靭帯内に限局して長軸方向に沿った高吸収域として認め、いずれの症例も骨との連続性は認めなかった。それぞれを組織学的に観察すると、椎間板後方連続型はenthesisとの連続性を認め、骨皮質、骨髄は既存骨と連続して延長するように存在し、その先端部では軟骨様組織への化生、石灰化を認めた。椎間板後方遊離型では、椎間板線維輪の破綻部や椎間板線維輪と軟骨終板の亀裂に脱出した髓核を認める他、線維化、石灰化、骨化を認めた。椎体後方型では、後縦靭帯内に長軸方向に伸びる線状の石灰化を認め、症例によってはその内部に骨組織を認めた。骨化関連因子では、骨化あり48例で年齢、HbA1c値がそれぞれ有意に高かった(p<0.01)。骨化率と骨化関連因子との相関では、年齢との間に正の相関(Pearson r=0.265, p<0.01)、HbA1c値との間に正の相関(Pearson r=0.294, p<0.01)を認めた。

【結論】剖検例103例をマイクロCT画像、組織切片を用いて解析を行い、以下の結論を得た。①0.1mm²以上の微細な後縦靭帯内骨化は48例(46.6%)で観察され、その半数では成熟した骨梁構造を認めた。②後縦靭帯骨化症との関連が指摘されている加齢、耐糖能異常と骨化率との間に関連を認めた。③3つの骨化メカニズムが想定された。椎間板後方に認

める2つの骨化形態は entheses の進展や椎間板線維輪の破綻によるものと捉えられた一方、椎体後方型は異栄養型の石灰化を介して化生骨が形成されたものであり、石灰化から異所性骨化への進展による骨化機序が想定された。

わた なべ ゆう だい
渡 辺 雄 大

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第537号

学位授与の日付：平成28年3月29日

主 論 文：Intravenous administration of apomorphine does not induce long QT syndrome: Experimental evidence from *in vivo* canine models

（Apomorphine は薬物性 QT 延長症候群を誘発しない：ハロセン麻酔犬モデルおよび慢性房室ブロック犬モデルでの評価）

著 者：Watanabe Y, Nakamura Y, Cao X, Ohara H, Yamazaki Y, Murayama N, Sugiyama Y, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Yamazaki H, Sugiyama A

公 表 誌：Basic Clin Pharmacol Toxicol 116: 468-475, 2015

論文内容の要旨

【背景および目的】パーキンソン病患者の治療において広く用いられるドーパミン D_1/D_2 受容体作動薬 apomorphine は、海外第 III 相臨床試験においては、顕著な QT 延長が2例で報告されており、また、市販後調査において心停止が3例、心不全が5例報告されている。しかし、承認申請時非臨床安全性試験においては、遅延整流性カリウム電流 (IKr) を抑制したが、覚醒下のイヌを用いた試験においては、軽度かつ一過性の血圧低下が認められたのみで、心拍数および心電図パラメータへの影響は認められておらず、現時点において apomorphine による QT 延長および心不全の発生機序は十分に検討されていない。

そこで今回われわれは、ハロセン麻酔犬モデルを用いて、apomorphine の心行動態および電気生理学的作用を詳細に評価した（実験1）。Apomorphine は強い催吐作用を有するが、本モデルを用いることで嘔吐による2次的な作用を除外し、正確に評価した。次に、torsade de pointes 検出モデルである慢性房室ブロック犬モデルを用いて、apomorphine の催不整脈リスクを定性的かつ定量的に検討した（実験2）。

【方法】実験1：ビーグル犬 (n=4) をチオペンタールナトリウムの静脈内投与で麻酔導入し、気管挿管後、1% ハロセン吸入で麻酔維持した。大腿動脈および大腿静脈を介して、ピッグテールカテーテルを左室に、スワンガンツカテーテルを右心系に留置した。心拍出量をスワンガンツカテーテルを用いて熱希釈法により算出した。ヒス束電位図を記録するために、電極カテーテルを大動脈弁無冠尖に留置した。単相性活動電位 (monophasic action potential: MAP) を右室心内膜に留置した電極カテーテルから測定し、有効不応期 (effective refractory period: ERP) をプログラム電気刺激により評価した。再分極終末相持続時間を、基本周期長 400 ms における MAP 持続時間から ERP を減じて算出した。さらに、体表面第 II 誘導心電図から PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔を測定し、補正 QT 間隔を Van de Water の補正式を用いて求めた (QT interval corrected using Van de Water's formula: QTcV)。投与前のコントロール値を測定した後、apomorphine を 0.01、0.1 および 1 mg/kg の用量で、それぞれ10分かけて20分間隔で静脈内に累積投与した。0.01 および 0.1 mg/kg 投与後は5、10、15、20 および 30 分後、一方、1 mg/kg 投与後は5、10、15、20、30 および 60 分後に心行動態および電気生理学的指標を測定した。

実験2：ビーグル犬 (n=4) の房室結節をカテーテルアブレーションで焼灼し、完全房室ブロックを誘発し、ブロック誘発後4週間以上経過させ、慢性心不全の状態にした。本モデルに Holter 心電図計を装着後、apomorphine 1 mg/kg を10分かけて静脈内投与し、合計24時間の心電図を記録した。心拍数、QT 間隔および Fridericia の補正式を用いて求めた補正 QT 間隔 (QT interval corrected with Fridericia's formula: QTcF) を投与前および投与後1、2、3、4、6、8、12 および 21 時間後に評価した。投与前および投与後1~1.7時間後の連続51拍の beat-to-beat 解析を行い、心室の再分極時間の時間的ばらつきの指標である short term variability (STV) および long term variability (LTV) を評価した。

【結果】実験1：Apomorphine 0.01, 0.1 および 1 mg/kg 投与における最大血中薬物濃度はそれぞれ 47 ± 9 , 452 ± 121 および $3,528 \pm 791$ ng/ml で、臨床有効血中薬物濃度の約 10 から 1000 倍であった。Apomorphine は 1 mg/kg においても、全例で嘔吐を認められなかった。Apomorphine 0.01 mg/kg は心拍数および左室内圧最大立ち上がり速度の増加を示した。Apomorphine 0.1 mg/kg から有効不応期の延長を認め、加えて apomorphine 1 mg/kg は左室内圧最大立ち上がり速度の減少を示し、その結果と考えられる心拍出量および平均血圧の低下を認め、電気生理学的作用に関しては、His-ventricular (HV) 間隔の延長が認められた。Apomorphine は 1 mg/kg においても、QTcV および MAP の延長を示さず、再分極過程への影響は認められなかった。

実験2：Apomorphine の投与後、全例で複数回の嘔吐が認められた。Apomorphine 1 mg/kg は心拍数、QT 間隔および QTcF に有意な変化を示さず、torsade de pointes も誘発されなかった。STV および LTV にも有意な変化は認められなかった。

【考察】Apomorphine による頻脈は、アトロピンによって消失することが報告されていることから、ハロセン麻酔犬モデルにおいて認められた心拍数の増加は、ムスカリン受容体の阻害を介した作用であると考えられた。また、apomorphine 0.01 mg/kg 投与における陽性変力作用の機序としては、心拍数の増加に伴う二次的な作用（陽性階段現象）である可能性が考えられた。さらに、apomorphine 投与により左室内圧最大立ち上がり速度の減少に加えて HV 間隔の延長が認められたことから、apomorphine は Na^+ チャネル阻害作用を有することが示唆された。

【結語】Apomorphine は臨床用量の 1000 倍の血中濃度においても QT 延長および催不整脈作用を示さないことが確認された。従って、臨床における顕著な QT 延長は併用薬による影響、あるいは伝導遅延に基づく 2 次性の T 波の変形の可能性が考えられた。一方で、apomorphine は、陰性変力作用および心室内伝導遅延作用を有することが明らかとなり、収縮同期不全を起こしやすく、それが心不全の原因となった可能性が考えられた。