

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

令和2年4月～令和3年3月

和歌山県立医科大学

目次

令和2年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏名)	(論文題目)	(頁)
博(医)甲第 610号	中山 宣昭	Linear polyubiquitin chain modification of TDP-43-positive neuronal cytoplasmic inclusions in amyotrophic lateral sclerosis (筋萎縮性側索硬化症におけるTDP-43陽性神経細胞質内封入体に生じるリニアポリユビキチン修飾)	1
博(医)甲第 611号	稲垣 優子	The influence of thyroid autoimmunity on pregnancy outcome in infertile women: a prospective study (不妊症女性における甲状腺自己免疫が妊娠アウトカムに及ぼす影響：前向き研究)	4
博(医)甲第 612号	竹内 昭博	Loss of CEACAM1 is associated with poor prognosis and peritoneal dissemination of patients with gastric cancer (胃癌におけるCEACAM1 発現の意義に関する基礎的臨床的研究)	7
博(医)甲第 613号	武用 百子	Metabolic syndrome and cognitive function: cross-sectional study on community-dwelling non-demented older adults in Japan (本邦の地域在住の非認知症高齢者におけるメタボリックシンドロームと認知機能の関連)	9
博(医)甲第 614号	安田 慎吾	Loss of Sphingosine 1-phosphate receptor 3 gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in a mouse cornea (スフィンゴシン1-リン酸受容体3遺伝子喪失による、マウス角膜血管新生抑制)	11
博(医)甲第 615号	恵中 まゆ	The gain-of-function mutation p53R248W suppresses cell proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma through the down-regulation of KRT17. (p53R248W変異はケラチン17の発現調節を介して口腔扁平上皮癌の増殖能と浸潤能を抑制する)	13
博(医)甲第 616号	山下 友佑	Targeting Adaptive IRE1 α Signaling and PLK2 in Multiple Myeloma: Possible Anti-Tumor Mechanisms of KIRA8 and Nilotinib (多発性骨髄腫における小胞体ストレスセンサーIRE1 α シグナルとPLK2を標的としたKIRA8とニロチニブの抗腫瘍効果の検討)	16
博(医)甲第 617号	山下 真平	Essential roles of oncostatin M receptor β signaling in renal crystal formation in mice (マウスの腎結晶形成過程におけるオンコスタチンM受容体 β シグナリングの役割)	19
博(医)甲第 618号	岸本 祥平	Bilateral atrophy of the extensor digitorum brevis muscle might be a useful sign for diagnosing diabetic polyneuropathy in Japanese men who do not sit in the traditional “seiza” style (短趾伸筋の両側の萎縮は正座習慣のない日本人男性において糖尿病性多発神経障害を診断するうえで有用な身体徴候の可能性はある)	23
博(医)甲第 619号	青石 裕香	Risk factors for breast cancer-related lymphedema: correlation with docetaxel administration (乳がん関連リンパ浮腫の危険因子: ドセタキセル投与との相関)	26

目 次

令和2年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 620号	木下 利喜生	Mobilization within 24 hours of new-onset stroke enhances the rate of home discharge at 6-months follow-up: a prospective cohort study (脳血管障害発症24時間以内の離床は6ヵ月後の在宅退院率を高める：前向き観察研究)	… 29
博(医)甲第 621号	津村 亜矢子	Surgical indication for intraductal papillary mucinous neoplasm without mural nodule ≥ 5 mm (壁在結節径5mm未満のIPMN症例に対する手術適応の検討)	… 32
博(医)甲第 622号	横山 真央	A Biodegradable Microneedle Sheet for Intracorporeal Topical Hemostasis (生体内局所止血を目的とした生体内分解性マイクロニードルシートの開発)	… 35
博(医)甲第 623号	野口 智子	Comprehensive Gene Mutation Profiling of Circulating Tumor DNA in Ovarian Cancer: Its Pathological and Prognostic Impact. (卵巣癌における血中循環腫瘍DNAによる遺伝子変異プロファイリングと臨床病理学的因子や予後との関連)	… 38
博(医)甲第 624号	橋本 大輝	Dynamic erectile responses of a novel penile organ model utilizing two photon excitation microscopy (TPEM) (陰茎海綿体動態解析のための二光子顕微鏡を用いた新規培養系の樹立)	… 41
博(医)甲第 625号	寺田 幸誠	NIRS-IVUS for Differentiating Coronary Plaque Rupture, Erosion and Calcified Nodule in Acute Myocardial Infarction	… 44
博(医)乙第 992号	井澤 大輔	Efficacy of Middle Meningeal Artery Embolization for Organized Chronic Subdural Hematoma (器質化慢性硬膜下血腫に対する中硬膜動脈塞栓術の有効性)	… 46
博(医)乙第 993号	徳留 なほみ	Differential significance of molecular subtypes which were classified into EGFR exon 19 deletion on the first line afatinib monotherapy (EGFR exon 19 deletionの分子生物学的サブタイプのアファチニブ単剤療法に与える影響)	… 48
博(医)乙第 994号	小向 賢一	Effect of Atorvastatin Therapy on Fibrous Cap Thickness in Coronary Atherosclerotic Plaque as Assessed by Optical Coherence Tomography: The EASY-FIT Study (光干渉断層法を用いた冠動脈硬化性プラークの線維性被膜に対するアトルバスタチン治療効果の検討)	… 52

目 次

令和2年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第 995 号	里神 慶亮	Impact of Plaque Rupture Detected by Optical Coherence Tomography on Transmural Extent of Infarction After Successful Stenting in ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction (ST上昇型心筋梗塞において光干渉断層法にて評価されたプラーク破裂と心臓MRIで評価された梗塞壁深達度との関連)	... 55
博(医)乙第 996 号	森本 順子	Preoperative left atrial minimum volume as a surrogate marker of postoperative symptoms in senile patients with aortic stenosis who underwent surgical aortic valve replacement (高齢大動脈弁狭窄症患者に対する外科的大動脈弁置換術後の有症状のサロゲートマーカーとしての術前最小左房容量)	... 58
博(医)乙第 997 号	西山 大介	Prediction of pelvic inclination in the sitting position after corrective surgery for adult spinal deformity (成人脊柱変形矯正固定術における術後座位骨盤傾斜予測)	... 61
博(医)乙第 998 号	中島 強	The effect of positive-end-expiratory pressure on stroke volume variation: An experimental study in dogs (一回拍出量変化における呼気終末陽圧の影響：実験犬を用いた研究)	... 64
博(医)乙第 999 号	東裏 将己	Correlation between haemoglobin level and type of erythropoiesis-stimulating agent at initiation of haemodialysis (血液透析導入時におけるヘモグロビン値と赤血球造血刺激因子製剤の特製差との関連性)	... 66
博(医)乙第 1000 号	池崎 みどり	Calreticulin protects insulin against reductive stress in vitro and in MIN6 cells (カルレティキュリンは試験管内及び膵β細胞においてインスリンを還元ストレスから保護する)	... 69
博(医)乙第 1001 号	高 真守	Increased large-scale inter-network connectivity in relation to impulsivity in Parkinson's disease (パーキンソン病の衝動性に関連した大規模ネットワーク間の機能的結合性変化に関する研究)	... 72
博(医)乙第 1002 号	田中 佑典	Association between serum lipids, polyunsaturated fatty acids, and prognosis in maintenance hemodialysis patients (血液透析患者における脂質、多価不飽和脂肪酸と予後との検討)	... 73
博(医)乙第 1003 号	利光 充彦	Clinical Presentation of Preterm Infants with Ventricular Septal Defect (心室中隔欠損症合併早産児の臨床的特徴)	... 76

目 次

令和2年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第 1004 号	垣田 真里	The prevalence of ulnar neuropathy at the elbow and ulnar nerve dislocation in recreational wheelchair marathon athletes ...	79
博(医)乙第 1005 号	高畑 昌弘	Prevalence, features, and prognosis of artery-to-artery embolic ST-segment-elevation myocardial infarction: an optical coherence tomography study (冠動脈間塞栓からのST上昇型心筋梗塞の頻度、特徴および予後：OCTによる検討) ...	82

学位記番号	博(医)甲第610号		
学位授与の日	令和2年4月21日		
氏名	中山 宜昭		
学位論文の題目	Linear polyubiquitin chain modification of TDP-43-positive neuronal cytoplasmic inclusions in amyotrophic lateral sclerosis (筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 陽性神経細胞質内封入体に生じるリニアポリユビキチン修飾)		
論文審査委員	主査	教授 村田 顕也	
	副査	教授 中尾 直之	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

【緒言】

筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、脳・脊髄において進行性に運動ニューロン変性が生じるものであるが、その病因は完全には解明されておらず、根本的な治療法も存在していない。ALSの神経病理学的特徴として、変性を認める部位の運動ニューロンに TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)陽性の神経細胞質内封入体(Neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs)が出現することが知られており、さらにこの NCIs はユビキチン化といわれる翻訳後修飾を受けている。ポリユビキチン分子には、その重合の形式によって8つの種類が存在し、それぞれが異なった生体内作用を発揮することが知られている。例えば、K48-linked polyubiquitin chain (K48-Ub)は基質タンパク質を ubiquitin proteasome system (UPS)にて分解する働きを、K63-linked polyubiquitin chain (K63-Ub)や Linear polyubiquitin chain (L-Ub)は基質タンパク質をオートファジーにて分解する働きを持つ。これまで、ALSのNCIsがユビキチン化されていることは知られていたが、このポリユビキチン鎖がどのタイプであるのかについては知見が存在していなかった。本研究では孤発性ALS(sALS)のユビキチン陽性NCIsにはどのようなタイプのポリユビキチン鎖が存在しているのかを明らかにすべく、タンパク質分解系に関与することが明らかとなっている K48-Ub、K63-Ub、L-Ubを対象として、sALSの病理検体を用いてこれらの存在を免疫組織化学的に研究した。

【対象と方法】

神経病理学的に sALS と診断された 12 例(平均年齢 62.5 歳)の剖検より得た胸髄・腰髄 17 検体と、これと年齢分布を揃えた神経学的に正常であった剖検例 6 例(平均年齢 64.6 歳)の脊髄検体(コントロール群)を免疫組織化学、蛍光二重免疫染色にて検討した。

【結果】

ALS 脊髄検体の連続切片を用いた免疫組織化学では、多くの NCIs が K48-Ub、K63-Ub、L-Ub の三重陽性であることが確認された。一方、コントロール群の脊髄運動ニューロンに同じ染色を行っても有意な所見は認められなかった。蛍光二重免疫染色にて検討すると、NCIs のうち太い部分には K48-Ub、L-Ub、K63-Ub の全てが認められるが、小さく細い断片状の NCIs は、K48-Ub のみ陽性で、L-Ub および K63-Ub 陰性となる傾向にあった。

次に、L-Ub とその合成酵素である linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC)との共局在について検討すると、脊髄運動ニューロン内の NCIs において、L-Ub と LUBAC の subunit である HOIP、SHARPIN とが共局在していることが確認された。

最後に、L-Ub が生体内作用を発揮する際に関連する分子であるリン酸化 NF- κ B p65(P-p65)、optineurin と L-Ub との局在について検討すると、脊髄運動ニューロン内の NCIs において、L-Ub、P-p65、optineurin が共局在している像が認められた。

【考察】

先行研究によると、sALS の TDP-43 陽性 NCIs は当初、小さく細い断片状の形態で形成され、その後、徐々に太った形態へと成熟していくとされている。このことを踏まえ、我々は以下の仮説を提

唱した。新規に TDP-43 陽性 NCI 形成された際、これがまだ小さく断片状の形態であるうちには K48 結合ポリユビキチン化を受け、UPS によるタンパク質分解にて処理されるよう誘導される。しかし、なんらかの理由によって UPS のみでは NCI は完全には分解されないため、TDP-43 陽性 NCI は太く成熟していくこととなり、結果 UPS による分解がより困難な状態となる。これに対し、K63 結合ポリユビキチン化およびリニアポリユビキチン化が誘導され、NCI を、オートファジーを介したタンパク質分解へと導く機序が働くのではないかと考えられる。

一方で、K63 結合ポリユビキチン化およびリニアポリユビキチン化を受けた NCI が病理組織に残存していることから、これらの本来持つ生体内作用が神経細胞内で過度に活性化されている可能性が考えられる。L-Ub は NF- κ B 活性化を生じ、P-p65 の生成を導くが、生成された P-p65 の核内への移行が妨げられると、tumor necrosis factor receptor (TNFR) complex II が形成され細胞死が加速することが知られている。本研究結果でも P-p65 は核内よりもむしろ NCI に局在しており、sALS においても上記の機序による神経細胞死の促進が生じている可能性がある。

【結論】

sALS の TDP-43 陽性 NCI に生じるリニアポリユビキチン化、K63 結合ポリユビキチン化は、K48 結合ポリユビキチン化によって誘導される UPS を介した異常凝集タンパク質分解が不完全であるときに、これをオートファジーによるタンパク質分解で補完するために引き起こされている可能性がある。NCI における L-Ub の病的な蓄積が神経細胞死促進に関与している可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 2 年 3 月 17 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、孤発性筋萎縮性側索硬化症(sporadic amyotrophic lateral sclerosis: sALS)の病理組織に出現する TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)陽性神経細胞質内封入体(Neuronal cytoplasmic inclusions: NCI)に生じるユビキチン修飾を明らかにすることである。

神経病理学的に sALS と診断された 12 例(平均年齢 62.5 歳)の剖検より得た胸髄・腰髄 17 検体と、これと年齢分布を揃えた神経学的に正常であった剖検例 6 例(平均年齢 64.6 歳)の脊髄検体 (control 群)を免疫組織化学、蛍光二重免疫染色にて検討した。

sALS 脊髄検体の連続切片を用いた免疫組織化学では、多くの NCI が K48-linked polyubiquitin chain (K48-Ub)、K63-linked polyubiquitin chain (K63-Ub)、Linear polyubiquitin chain (L-Ub)の三重陽性であった。一方、control 群の脊髄運動ニューロンに同じ染色を行っても有意な所見は認められなかった。蛍光二重免疫染色を行うと、NCI のうち太い部分には K48-Ub、L-Ub、K63-Ub の全てが認められるが、小さく細い断片状の NCI は K48-Ub のみ陽性で、L-Ub および K63-Ub 陰性となる傾向にあった。次に、L-Ub とその合成酵素である linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC)との共局在について検討すると、脊髄運動ニューロン内の NCI において、LUBAC の subunit である HOIP、SHARPIN と L-Ub とが共局在していることが確認された。最後に、L-Ub が生体内作用を発揮する際に関連する分子であるリン酸化 NF- κ B p65(P-p65)、optineurin と L-Ub との局在について検討すると、脊髄運動ニューロン内の NCI において、L-Ub、P-p65、optineurin が共局在している像が認められた。

本論文は、sALS において、K48 結合ポリユビキチン化によって誘導されるユビキチンプロテアソーム系を介した異常凝集タンパク質分解が不完全であると、補完的なオートファジーによるタンパク質分解を誘導するべくリニアポリユビキチン化及び K63 結合ポリユビキチン化が生じる可能性があること、また NCI における L-Ub の病的な蓄積が sALS における神経細胞死を促進している可能性があることを初めて示した報告であり、sALS の病態解明、治療法開発につながる可能性を示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。令和 2 年 3 月 17 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、孤発性筋萎縮性側索硬化症(sporadic amyotrophic lateral sclerosis: sALS)の病理組織に出現する TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)陽性神経細胞質内封入

体(Neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs)に生じるユビキチン修飾を明らかにすることである。

神経病理学的にsALSと診断された12例(平均年齢62.5歳)の剖検より得た胸髄・腰髄17検体と、これと年齢分布を揃えた神経学的に正常であった剖検例6例(平均年齢64.6歳)の脊髄検体(control群)を免疫組織化学、蛍光二重免疫染色にて検討した。

sALS脊髄検体の連続切片を用いた免疫組織化学では、多くのNCIsがK48-linked polyubiquitin chain (K48-Ub)、K63-linked polyubiquitin chain (K63-Ub)、Linear polyubiquitin chain (L-Ub)の三重陽性であった。一方、control群の脊髄運動ニューロンに同じ染色を行なっても有意な所見は認められなかった。蛍光二重免疫染色を行うと、NCIsのうち太い部分にはK48-Ub、L-Ub、K63-Ubの全てが認められるが、小さく細い断片状のNCIsはK48-Ubのみ陽性で、L-UbおよびK63-Ub陰性となる傾向にあった。次に、L-Ubとその合成酵素であるlinear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC)との共局在について検討すると、脊髄運動ニューロン内のNCIsにおいて、LUBACのsubunitであるHOIP、SHARPINとL-Ubとが共局在していることが確認された。最後に、L-Ubが生体内作用を発揮する際に関連する分子であるリン酸化NF- κ B p65(P-p65)、optineurinとL-Ubとの局在について検討すると、脊髄運動ニューロン内のNCIsにおいて、L-Ub、P-p65、optineurinが共局在している像が認められた。

本論文は、sALSにおいて、K48結合ポリユビキチン化によって誘導されるユビキチンプロテアソーム系を介した異常凝集タンパク質分解が不完全であると、補完的なオートファジーによるタンパク質分解を誘導するべくリニアポリユビキチン化及びK63結合ポリユビキチン化が生じる可能性があること、またNCIsにおけるL-Ubの病的な蓄積がsALSにおける神経細胞死を促進している可能性があることを初めて示した報告であり、sALSの病態解明、治療法開発につながる可能性を示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第611号		
学位授与の日	令和2年6月16日		
氏名	稲垣 優子		
学位論文の題目	The influence of thyroid autoimmunity on pregnancy outcome in infertile women: a prospective study (不妊症女性における甲状腺自己免疫が妊娠アウトカムに及ぼす影響：前向き研究)		
論文審査委員	主査	教授 井篁一彦	
	副査	教授 藤井隆夫	教授 村垣泰光

論文内容の要旨

【諸言】

甲状腺自己免疫 (TAI) は流産との関与が報告されており、甲状腺自己抗体陽性の潜在性甲状腺機能低下症 (SCH) 合併女性では、生殖補助医療 (ART) を受ける際に、甲状腺ホルモン (L-T4) 補充が推奨されている。本研究では甲状腺機能障害の影響が最小限の条件下で不妊女性の妊娠に対する TAI の影響を評価する目的で研究を行った。

【対象・方法】

2013年1月～2015年12月に、うつのみやレディースクリニックを受診し、不妊症と診断された女性 595 名を対象とし、甲状腺自己抗体陽性者もしくは、甲状腺機能異常者は当院で再検査を施行した。TSH \geq 2.5 μ IU/mL であり、SCH と診断した患者は、L-T4 の補充を行った。5名のバセドウ病の患者は除外し、590名の妊娠・出産転帰をフォローし、2017年6月に妊娠アウトカム、2018年4月に出産アウトカムの評価を行った。統計分析には二元表は Fisher's exact test もしくは chi-square test を用い、2群間の比較は Student's t-test もしくは Mann-Whitney U test を用いて検討した。4群以上の比較は Kruskal-Wallis test にて検討した。流産の危険因子を特定するため、段階的変数選択法による多変量ロジスティック回帰分析を用いて検討した。

【結果】

バセドウ病患者を除いた 590 名の不妊症女性において、357 名が妊娠、308 名が出産、46 名は流産した。590 名中、SCH は 19.6%、顕在性甲状腺機能低下症(OH)は 1 名のみであり、TPOAb 陽性率 10.4%、TgAb 陽性率 15.1%であった。

甲状腺機能正常群と SCH 群を比較すると、適切な L-T4 補充により SCH 群も妊娠前には甲状腺機能正常群と同等の TSH となり、妊娠率・生産率は両群で有意差を認めなかった。一方で TPOAb の陽性率、抗体価は甲状腺機能正常群より SCH 群で有意に高かった。(7.4%対 37.2%、 $p<0.001$ 、 13.5 ± 42.4 IU/mL 対 87.4 ± 163.7 IU/mL、 $p<0.001$)。TgAb は両群で差を認めなかった。

また、妊娠アウトカムは不妊治療内容の影響を受けるため、自然妊娠 (NIT)・タイミング療法群 (TIM) を人工授精 (IUI)・生殖補助医療群とは分けて評価した。甲状腺に関連した因子と妊娠アウトカムの関連は認めなかった。

一方、出産アウトカムを評価すると、TPOAb 抗体価は生産群より流産群で有意に高値であった ($p=0.039$)。TPOAb 陽性率は生産群より流産群でやや高率も、有意差は認めなかった。

TPOAb 抗体価を不妊治療別にみると、IUI 群は他の治療群より高力価であったが、有意差は認めなかった。IUI 群では流産群の TPOAb 抗体価は生産群より有意に高力価であった (126.4 ± 156.8 IU/mL 対 19.9 ± 62.2 IU/mL、 $p=0.046$)。ART 群では生産群と流産群で TPOAb 抗体価に有意差を認めなかった。

ART において TPOAb 抗体価が出産転機に与える影響を明らかにするため、ART 群を 7 群に分けて評価した。体外受精にて新鮮胚移植を施行した群 (IVF 群) では、生産群より流産群で TPOAb 抗体価が有意に高値であった ($p=0.023$)。

【考察】

不妊症女性における SCH は 19.6%と一般人での罹患率より高い結果となった。SCH 群も適切な L-T4 補充により妊娠前には TSH が甲状腺機能正常群と同等に低下しており、その結果、妊娠・出産アウトカムも同等であった。よって、本研究では甲状腺機能の影響を除外した TAI の妊娠・出産アウトカムへの関与を検討しようと考えられた。

本研究では TAI の妊娠アウトカムへの影響は認めなかったものの、TPOAb 抗体価は生産群より流産群で高値となっており、不妊症女性においては、SCH に対し適切な治療を行った場合でも、TPOAb 抗体価高値は流産のリスク因子となる可能性が示唆された。

対照的に、TgAb は妊娠・出産アウトカムとの関連を認めなかった。また、SCH と TPOAb は関連性が認められたのに対し、TgAb は SCH との関連は認めなかった。この結果は、TPOAb が TgAb より甲状腺機能低下をもたらしやすいということを示唆すると考えた。

TAI が妊娠に影響を与える機序としては、3 つの仮説がある。〈仮説①〉TAI 合併女性は自己免疫のアンバランスが背景にあり、母体が胎児を拒否する可能性がある、〈仮説②〉TAI 合併女性は、妊娠後の母体環境の変化に伴う甲状腺ホルモンの需要に甲状腺が対応しきれない、〈仮説③〉TAI 合併女性は不妊症をきたしやすく、結果的に高齢出産となりやすいことが間接的に影響するといった仮説である。

本研究では SCH 合併女性に適切に L-T4 補充を行っており、仮説②の影響は最小限に抑えられたと考えた。TPOAb 抗体価が流産群で高値であることは、甲状腺のみならず母体の自己免疫反応が流産群でアクティブであることを示唆するものと考え、仮説①の機序の影響が反映されているのではないかと考えた。また、仮説③の機序の影響は完全には除外できなかった。

【結語】

TPOAb 抗体高力価が流産のリスク因子である可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 2 年 5 月 1 日、15 日に論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

甲状腺自己免疫 (TAI) は流産との関与が報告されており、甲状腺自己抗体陽性の潜在性甲状腺機能低下症 (SCH) 合併女性では、生殖補助医療 (ART) を受ける際に、甲状腺ホルモン (L-T4) 補充が推奨されている。

うつのみやレディースクリニックにて不妊症と診断された女性 595 名を対象に、甲状腺自己抗体及び甲状腺機能を測定し、抗体陽性もしくは甲状腺機能異常者は当院で再検査を施行した。TSH $\geq 2.5 \mu\text{IU/mL}$ であり、潜在性甲状腺機能低下症 (SCH) と診断した患者には、甲状腺ホルモン (L-T4) の補充を行った。5 名のバセドウ病の患者は除外し、590 名の妊娠・出産転帰をフォローし、2017 年 6 月に妊娠アウトカム、2018 年 4 月に出産アウトカムの評価を行った。統計分析には二元表は Fisher's exact test もしくは chi-square test を用い、2 群間の比較は Student's t-test もしくは Mann-Whitney U test 用いて検討した。4 群以上の比較は Kruskal-Wallis test にて検討した。流産の危険因子を特定するため、段階的変数選択法による多変量ロジスティック回帰分析を用いて検討した。

結果、バセドウ病患者を除いた 590 名の不妊症女性において、357 名が妊娠、308 名が出産、46 名は流産した。590 名中、SCH は 19.6%、TPOAb 陽性率 10.4%、TgAb 陽性率 15.1%であった。L-T4 補充は適切に行われ、甲状腺機能正常群と SCH 群の妊娠率・生産率は有意差を認めなかった。一方で TPOAb の陽性率、抗体価は甲状腺機能正常群より SCH 群で有意に高かった ($p < 0.001$)。TgAb は両群で差を認めなかった。甲状腺に関連した因子と妊娠アウトカムの関連は認めなかった。

一方、出産アウトカムを評価すると、TPOAb 抗体価は生産群より流産群で有意に高値であった ($p = 0.039$)。TPOAb 陽性率は生産群より流産群でやや高率も、有意差は認めなかった。

TPOAb 抗体価を不妊治療別にみると、人工授精 (IUI) 群は他の治療群より高力価であったが、有意差は認めなかった。IUI 群では流産群の TPOAb 抗体価は生産群より有意に高力価であった ($p = 0.046$)。ART 群では生産群と流産群で TPOAb 抗体価に有意差を認めなかった。

ARTにおいてTPOAb抗体価が出産転機に与える影響を明らかにするため、ART群を7群に分けて評価した。体外受精にて新鮮胚移植を施行した群(IVF群)では、生産群より流産群でTPOAb抗体価が有意に高値であった($p=0.023$)。

本研究ではTAIの妊娠アウトカムへの影響は認めなかったものの、TPOAb抗体価は生産群より流産群で高値となっており、不妊症女性においては、SCHに対し適切な治療を行った場合でも、TPOAb抗体価高値は流産のリスク因子となる可能性が示唆された。

本論文は、不妊症女性においてTPOAb抗体価高値は流産のリスク因子となる可能性を示す臨床的に意義深いものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第612号		
学位授与の日	令和2年7月21日		
氏名	竹内 昭博		
学位論文の題目	Loss of CEACAM1 is associated with poor prognosis and peritoneal dissemination of patients with gastric cancer (胃癌における CEACAM1 発現の意義に関する基礎的臨床的研究)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 井上 徳光	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【緒言】

CEACAM1(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)は CEA family 及び immunoglobulin superfamily に属する膜貫通型の糖蛋白であり、腫瘍増殖、感染、炎症などのさまざまな反応に関与する接着分子である。本研究では胃癌症例における CEACAM1 の発現および CEACAM cytoplasmic domain isoforms と予後・腹膜播種との関連とその機序について検討した。

【方法】

臨床的研究として 2005 年から 2006 年に和歌山県立医科大学第 2 外科にて胃癌に対し根治切除術を施行した 235 例を対象とし、CEACAM1 及び CEACAM1 long isoform (CEACAM1-L) または short isoform (CEACAM1-S) specific polyclonal antibody により免疫染色を行い、染色結果と染色範囲でスコア化し統計学的検討を行った。また、基礎的研究として CEACAM1 発現のない胃癌細胞株 NUGC3 に CEACAM1-4L または CEACAM1-4S を強制発現させ細胞浸潤分析、管腔形成能評価、皮下腫瘍モデルでの腫瘍増殖能を行った。

【結果】

予後不良因子について多変量解析を行ったところ、CEACAM1 (-)・深達度 T3 以深・リンパ節転移が独立した予後不良因子であり、腹膜播種による再発のリスク因子の多変量解析では、深達度 T3 以深と CEACAM1 (-) が独立したリスク因子あることが明らかとなった。基礎的研究では CEACAM1-4L または -4S を強制発現させた NUGC3 において、control と比べ、優位に浸潤能が抑制した。管腔形成能では CEACAM1-4L, -4S を強制発現させた NUGC3 において、CEACAM1-4L, -4S とともに control と比較し有意に管腔形成能が上昇し、増殖能を検討したところ CEACAM1-4L 発現によって腫瘍の大きさが有意に抑制された。

【考察】

CEACAM1 が胃癌の予後や腹膜播種に関与する機序として、CEACAM1 の発現変化および CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance によって、癌細胞の浸潤能、管腔形成能、および腫瘍増殖能を調整している可能性が示された

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年6月9日、10日に論文審査委員は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。これまで低分化消化器癌と CEACAM1 との関連についての報告はなく、胃癌における CEACAM1 および CEACAM1 cytoplasmic domain isoforms と予後との関連、腹膜播種と CEACAM1 との関連について検討を行った論文であった。その結果、CEACAM1 (-)・深達度 T3 以深・リンパ節転移が胃癌の独立した予後不良因子であり、CEACAM1(-)が腹膜播種の独立したリスク因子あることが明らかとなった。また基礎的実験によって CEACAM1 の発現が癌細胞レベルにおいて、浸潤能を抑制し、管腔形成能を示唆する結果となった。以上より、本論文は胃癌において CEACAM1 を発現しないこ

とが独立した予後不良因子、腹膜播種リスク因子であること、その機序として CEACAM1 の発現が癌細胞の浸潤能、管腔形成能、および腫瘍増殖能を調整している可能性について明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第613号		
学位授与の日	令和2年9月15日		
氏名	武用 百子		
学位論文の題目	Metabolic syndrome and cognitive function: cross-sectional study on community-dwelling non-demented older adults in Japan (本邦の地域在住の非認知症高齢者におけるメタボリックシンドロームと認知機能の関連)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 田島 文博	教授 藤吉 朗

論文内容の要旨

【緒言】

認知機能障害は当事者と家族の生活の質の低下を招き、また認知症患者の増加は社会経済の負担にもつながっている (Nakabe T 2019, Schaller S 2015) ため、超高齢社会の日本においては、特に高齢者の認知機能低下に対する予防的介入が重要である (Arai H 2015)。

メタボリックシンドローム (以下 **Mets** とする) は、認知機能障害の危険因子の1つであるが (Rouch I 2014, Yaffe K 2007)、先行研究における結果に一貫性はない。横断研究の分析では、**Mets** が軽度認知機能障害 (MCI) から認知症への移行を加速することが報告されており (Cooper C 2015)、**Mets** の管理が認知機能低下を予防する可能性を示唆している。しかし 13 件の縦断研究のメタ分析では、**Mets** と 70 歳以上の認知機能障害との関連性は認められていない (Frisardi V 2014)。

日本における調査では、**Mets** は非健忘性 MCI と関連していたが、中性脂肪が高いと男性の非健忘性 MCI が減少することが報告されている (Bae S 2017)。

【目的】

本研究では、60 歳以上の日本人の非認知症高齢者における **Mets** と認知機能の関係を検討した。研究の主な目的は、**Mets** とその構成要素が全般的な認知機能に及ぼす影響を明らかにすることである。また **Mets** の有無に関係なく、対象者の注意、論理的記憶、言語およびカテゴリ流暢性などの特定の認知機能の違いを明確にすることも目的とした。

【方法】

対象者は、和歌山医科医科大学が実施した地域住民コホート研究の参加者で、2011 年から 2016 年にかけて、和歌山県の 3 つの町で特定健診、動脈健診、後期高齢者健診を受けた 6782 人を対象とした。選定基準は 60 歳から 90 歳までとし、MMSE で 24 点以上の 2150 人を対象とした。なお、本研究は和歌山県立医科大学倫理審査委員会 (第 92 号) の承認を得ており、参加者全員の同意を得た。

【結果】

Mets の対象者 (n = 294、平均 MMSE 得点 = 27.89、標準偏差 = 1.925) と非 **Mets** の対象者 (n = 1856、平均 MMSE 得点 = 27.94、標準偏差 = 1.991) 間で MMSE 得点に有意差はなかった ($p = 0.672$)。ロジスティック回帰分析では、MMSE のスコアは腹囲と有意に負の関連があり、HDL-C と有意に正の関連があった。MMSE のスコアは男性では中性脂肪と有意に負の関連があり、女性では腹囲と有意に負の関連があった。D-CAT の Z スコアは、非 **Mets** の対象者と比較して **Mets** の対象者で有意に低かった。

【考察】

本研究では MMSE によって評価された全般的な認知機能は、**Mets** の対象者と非 **Mets** の対象者間で有意差はなかった。**Mets** と MMSE の関係を調査した先行研究において、75 歳未満の高齢者を対象とした研究では、**Mets** の対象者の方が非 **Mets** の対象者よりも MMSE が低かった (Viscogliosi G1 2012)。一方、85 歳以上を対象とした研究においては、**Mets** と MMSE との間に関連は認められてい

ない (Harrison SL 2015)。また他の先行研究においては、80 歳未満の対象者では Met の対象者が非 Met の対象者よりも有意に低い MMSE を示したが、80 歳以上の対象者間で Met の対象者と非 Mets の対象者間で MMSE に差はない (Liu M 2015)。このように、70 歳代までの高齢者では Mets と全般的な認知機能の関連が示唆されているが、それ以上の高齢者ではそうではない。本研究の対象者は 60 歳から 90 歳までと幅広く、Mets と全般的な認知機能との経時的な関係を検討するには、年齢別の解析が必要である。

Mets の構成要素に関しては、男性のより高い中性脂肪と女性のより太い腹囲の方が、全体的な認知機能は高いという可能性を示し、認知機能に対する代謝問題の逆説的な効果を示唆した。HDL-C はすべての対象者の MMSE と有意に関連していたが、男女別で有意差はなかった。生物学的根拠は完全には明らかにされていないが、一部の先行研究では、中性脂肪と認知機能の逆の関係が示唆されており (Luo L 2013, Leparo O 2009, He Q 2016, Yin ZX 2012, Lv YB 2019)、日本人を対象とした研究も含まれる (Bae S 2017)。また、高齢者では肥満が認知障害のリスクを低下させる可能性があることを示す研究もある (Hou Q 2019, Gunathilake R 2016)。本研究の結果は、日本人の高齢者における低栄養と認知障害の潜在的な関係に注意を払うべきであることを示唆した。

Mets の対象者は非 Mets の対象者と比較して、注意課題のパフォーマンスが大幅に低下した。オランダの調査では、注意と処理速度、および実行機能に関してより悪いパフォーマンスが示されたが、Mets の高齢者の記憶との関連は示されていない (Reijmer YD 2011)。本研究における結果はこれらの先行研究と一致しており、認知症ではない高齢の日本人集団では、記憶機能よりも注意が Mets によって実際に損なわれる可能性があることを示唆した。

学位記番号	博(医)甲第614号		
学位授与の日	令和2年11月17日		
氏名	安田 慎吾		
学位論文の題目	Loss of Sphingosine 1-phosphate receptor 3 gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in a mouse cornea (スフィンゴシン1-リン酸受容体3遺伝子喪失による、マウス角膜血管新生抑制)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 井上 徳光	教授 雑賀 司珠也

論文内容の要旨

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、スフィンゴシンキナーゼ 1 (SPK1) を介したスフィンゴシンのリン酸化によって生成される生物活性スフィンゴ脂質である。S1P 受容体は S1PR1-5 までの 5 つのサブタイプが同定されている。S1PR3 ノックアウトマウスでは野生型と比較して角膜熱凝固によって誘発される角膜血管新生は抑制されており、角膜内の VEGF-A と α SMA の mRNA 発現レベルが低下していた。マウス角膜上皮細胞とマウス眼線維芽細胞への Transforming growth factor1 (TGF β 1) 付加で SPK1 mRNA 発現レベルは上昇した。マウス角膜上皮細胞における VEGF mRNA 発現レベルは S1P で上昇し、その効果は S1PR3 阻害剤で抑制された。一方マウス眼線維芽細胞における VEGF mRNA 発現レベルは S1P, S1PR3 阻害剤では有意な変化はなかった。このことは S1PR3 発現が角膜上皮細胞では強い一方、眼線維芽細胞では弱いことに起因していると考えられる。まとめると角膜刺激によって誘発される TGF β 1 は SPK1 活性化を介して S1P 産生を増加させ、S1P の上昇は S1PR3 を介しマウス角膜における VEGF-A 発現レベルと血管新生を促進した。血管内皮細胞にも S1PR3 は発現しており、ヒト網膜微血管内皮細胞 (HRMEC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた実験を行なった。HRMEC に S1P を付加すると血管様管腔構造は拡大し、S1PR3 は縮小した。このことは HRMEC において S1P は S1PR3 を介して血管新生を促進していることを示している。この現象の解明のために HRMEC, HUVEC の両血管内皮細胞に S1P, S1PR3 を付加し細胞内の VEGF-A, VE-cadherin の mRNA 発現レベルを測定した。結果として S1P を付加すると VEGF-A, VE-cadherin の mRNA 発現レベルに変化はなかったが、S1PR3 阻害剤付加では低下した。このことから血管内皮細胞においては内因性の S1P は S1PR3 を介して VEGF-A, VE-cadherin に関与していることが示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年10月29日、11月2日及び4日に論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行なった。

角膜は透明な組織であるが、高度な炎症や外傷により瘢痕治癒をきたすことがあり、その一因として角膜内皮障害がある。通常、角膜内皮は軽度の損傷では遊走により再生し、角膜の透明治癒を施すが、高度の損傷では角膜内皮の線維化という形態的変化を伴い、機能不全となり角膜は混濁する。今回着目したスフィンゴシン-1-リン酸 (Sphingosine-1-phosphate:S1P) は脂質の一種であり、生体内で様々な生理活性を持つ重要な脂質メディエーターとして知られている。その受容体は Sphingosine-1-phosphate reseptor:S1PR と呼ばれており、現在までに S1PR1~5 のサブタイプが発見されている。既報では *in vitro* ではその中の1つのサブタイプである S1PR3 は血管新生に関与する因子であると言われているが、*in vivo* における実験はあまり行われていない。本研究では角膜創傷治癒の新規治療開拓として、マウス角膜新生血管における S1PR3 の役割を検討した。まず申請者は S1PR3 ノックアウトマウスを用いて角膜血管新生モデルを作成し表現型を確認した。S1PR3 ノックアウトマウスでは野生型と比較して角膜熱凝固によって誘発される角膜血管新生は抑制され、角膜内

の VEGF-A と aSMA の mRNA 発現レベルが低下していた。野生型マウスでは S1PR3 は血管内皮細胞と角膜上皮細胞に強く発現しており、血管新生抑制の機序解明の目的で血管内皮細胞とマウス角膜上皮細胞/線維芽細胞を用いて *in vitro* での検討を行なった。その結果、角膜刺激によって誘発される TGFb1 は SPK1 活性化を介して S1P 産生を増加させ、S1P の上昇は S1PR3 を介しマウス角膜における VEGF-A 発現レベルと血管新生を促進した。

以上のように、本論文は TGFb1 を契機とする S1PR3 を介した VEGF-A 産生についての一連のメカニズムを解明した初めての論文である。この経路の阻害が角膜内皮線維化抑制および角膜透明治癒に結びつくことが期待され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第615号		
学位授与の日	令和3年1月19日		
氏名	惠中 まゆ		
学位論文の題目	The gain-of-function mutation p53R248W suppresses cell proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma through the down-regulation of KRT17. (p53R248W 変異はケラチン17の発現調節を介して口腔扁平上皮癌の増殖能と浸潤能を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 村田 晋一	
	副査	教授 井上 徳光	教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

【緒言】

口腔扁平上皮癌 (OSCC) では正常口腔粘膜で発現するケラチン13が消失し、一方で正常では認められないケラチン17 (KRT17) が発現することが知られている。ケラチンは中間径フィラメントタンパクの一種で、細胞骨格の維持のみならず細胞内シグナルを刺激して代謝や細胞増殖、アポトーシスや移動能の調節に関与することが報告されている。また、KRT17の発現によりOSCCの増殖能や浸潤能が促進されることが報告されているが、その発現機構の詳細はいまだ不明である。

p53は最も代表的ながん抑制遺伝子のひとつであり、OSCCの65~85%で変異が報告されている。その半数以上がミスセンス変異であり、その変異により loss of function や dominant-negative または gain of function (GOF) といった機能変化をもたらす。p53ミスセンス変異ではいくつかのホットスポットが同定されており、今回着目した R248W および R248Q 変異もその一つである。

本研究ではOSCC細胞株におけるp53とKRT17の発現の関連に着目し、OSCC細胞株Ca9-22 (p53R248W変異)、HSC3 (p53ナンセンス変異) を用いてp53ミスセンス変異であるp53R248Wとp53R248QがOSCCにおけるKRT17の発現と悪性度に及ぼす影響の解明を試みた。

【方法】

1. KRT17mRNA発現量及びKRT17,p53タンパク発現の解析

OSCC細胞株4種においてウエスタンブロット法によりKRT17, p53発現量を解析した。そのうちp53R248W変異を持つCa9-22において著明なp53の強発現とKRT17の弱発現を認めたため、この変異に着目しCa9-22におけるp53ノックダウン (KD) 株、並びにHSC3におけるp53R248W変異、およびp53R248Q変異の強制発現 (OE) 株を作製し逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法でKRT17のmRNA量を、ウエスタンブロット (WB) 法でKRT17タンパク量を解析した。

2. 移動能、浸潤能の評価

Ca9-22 p53KD株並びにHSC3 p53R248W変異およびp53R248Q変異OE株の移動能および浸潤能の変化はトランスウェル法にて解析を行った。

3. MMP2、MMP9の発現ならびに活性の解析

HSC3 p53R248W変異およびp53R248Q変異OE株におけるMMP-2、MMP-9の発現並びに活性をリアルタイムRT-PCRならびにゼラチンザイモアッセイにて解析した。

4. p53変異体のKRT17プロモーター領域への結合の検索

KRT17プロモーター領域にてp53結合領域を4か所想定し、クロマチン免疫沈降法にてその結合を確認した。

5. ノードマウスへの異種移植による腫瘍能の解析

Ca9-22 Con株とp53R248W KD株、HSC3 Con株とp53R248W OE株、p53R248Q OE株をそれぞれノードマウス背部に接種しその増殖能を比較した。またHSC3 Con株とp53R248W OE株、p53R248Q OE株をそれぞれノードマウス舌に接種しその増殖能、生存期間、リンパ節転移の有無を比較、検討した。

【結果】

1. p53 変異の相違による KRT17 発現への影響

4 つの OSCC 細胞株、HSC3、SAS、Ca9-22、SAT における p53 と KRT17 のタンパク発現量を WB 法にて解析したところ、Ca9-22 は他の三種と比較し著明に p53 が発現している一方で KRT17 はほとんど発現していなかった。HSC3 と SAS は p53 にナンセンス変異を、Ca9-22 と SAT はそれぞれ R248W 変異、R110L 変異を持つことが報告されておりこの KRT17 の発現量の差は p53 変異の差異によるものと考えられた。

2. p53R248WKD による KRT17 の発現

Ca9-22 細胞で p53R248W の KD 株を樹立しその KRT17 の発現および悪性度の変化を解析した。KD 株では Con 株と比較し著明な KRT17 の強発現を認め、細胞の大きさも有意に増大していた。また増殖能、移動能、浸潤能ともに有意に亢進を認めた。

3. p53R248W および p53R248Q 強制発現による KRT17 の発現の変化

HSC3 細胞で p53R248W と p53R248Q の OE 株をそれぞれ樹立し KRT17 の発現および悪性度の変化を解析した。KRT17 の発現量は p53R248W OE 株では低下を、一方 p53R248Q OE 株では増加を有意に認めた。それに伴い細胞の大きさも p53R248W OE 株では Con より有意に小さく、また p53R248Q OE 株では Con より有意に大きい結果を示した。

4. p53R248W および p53R248Q 強制発現による悪性度の変化

HSC3 p53R248W OE 株では移動能、浸潤能ともに Con 株と比較し有意に低下を認め、HSC3 p53R248Q OE 株では浸潤能において Con 株と比較し有意に上昇を認めた。リアルタイム RT-PCR 法にて R248W OE 株および R248Q OE 株では Con 株と比較しともに MMP2、MMP9 の mRNA 発現量は有意に低下していた。またゼラチンザイモアッセイでも R248W OE 株では MMP2 酵素活性の低下を認め、これが移動能、浸潤能の低下に寄与している可能性が示された。

5. p53 変異体の KRT17 プロモーター領域への結合

p53 変異が直接 KRT17 プロモーター領域に結合するかを ChIP アッセイにて探索したところ、R248W OE 株では #1、#2、#3 で結合が、R248Q OE 株では #2、#3、#4 で結合が確認された。この結合の相違が KRT17 の発現の差に関与している可能性が示唆された。

6. In vivo において p53R248W は腫瘍増殖を抑制する

ヌードマウスへの背部皮下移植では Con 株と比較し Ca9-22 p53KD 株では増殖亢進が、HSC3 p53R248W OE 株では増殖抑制が有意に認められた。舌への移植モデルでは、腫瘍組織の免疫染色において p53R248W OE 株で有意に Ki-67 陽性率の低下が認められ、増殖能の低下が示唆された。また Con 群と比較し p53R248W OE 群では生存期間の有意な延長が認められた。一方頸部リンパ節転移では有意な差は示されなかった。

【考察】

本研究では口腔扁平上皮癌における p53 ホットスポット変異に着目しその影響を解析した。p53R248W 変異では KRT17 の発現が有意に減少し、細胞の増殖能、移動能、浸潤能が著明に低下した。in vivo においても腫瘍増殖能の低下並びに生存率の上昇を認め、p53R248W 変異は KRT17 の発現を抑制することで腫瘍の悪性度を低下させていることが示唆された。MMP2 の発現並びに活性が著明に低下しており、それが移動能、浸潤能の変化に影響を及ぼしていることが示唆された。また p53R248Q 変異では KRT17 の発現の増加と浸潤能の上昇が認められ p53R248Q 変異の GOF が示唆された。これらの結果から OSCC において p53R248W 変異を同定することにより、その腫瘍が低悪性度で予後良好の腫瘍であるということを判定できる可能性が示された。また、p53 変異による KRT17 発現調整の機序の詳細を明らかにすることで OSCC における KRT17 発現の機序やその抑制による治療法につながる可能性が示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年12月17日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文について審査を行った。

口腔扁平上皮癌（OSCC）ではケラチン17（KRT17）が発現し、これにより浸潤能や増殖能が亢進することが報告されている。しかしその発現機構の詳細はいまだ明らかでない。また p53 は最も代表的ながん抑制遺伝子の一つで、OSCC においても 65～85% で変異が報告されている。その変異による loss-of-function のみならず dominant-negative や gain-of-function といった機能変化が注目されている。そこで本研究では OSCC において p53 変異の違いによる KRT17 発現の関連性および OSCC に対する相互作用を明らかにすることを目的として実験を行った。

p53 に R248W 変異を持つ OSCC 細胞株 Ca9-22 は KRT17 の発現が低い一方で p53 の発現は亢進している。また p53R248W をノックダウンした Ca9-22 では KRT17 の発現亢進を認め、遊走能・浸潤能が有意に増加したことから p53R248W が KRT17 の発現を抑制することが考えられた。そこで p53 にナンセンス変異を持つ OSCC 細胞株 HSC3 に p53R248W と p53R248Q をそれぞれ強制発現(OE)させ、各細胞株の癌細胞としての性質の比較を行った。p53R248W-OE 株では KRT17 の発現が抑制され、移動能・浸潤能は低下した。それとは対照的に p53R248Q-OE 株では KRT17 の発現が上昇し、増殖能と浸潤能は亢進した。ゼラチンゼイモアッセイでは p53R248W-OE 株で MMP2 の活性低下を示し、また p53R248Q-OE 株で MMP9 の活性亢進を認めたことから、MMP2 と MMP9 が両者の浸潤能の相違に関連していると考えられた。また ChIP アッセイにおいて p53R248W の KRT17 遺伝子のプロモーター領域への結合が認められたことから、p53R248W 変異が KRT17 の発現を直接抑制していることが示唆された。これらの事より、R248W と R248Q は異なる gain-of-function を有し、KRT17 の発現制御を介して増殖能、浸潤能の点で相反する性質をもたらすことが明らかとなった。

さらに、ヌードマウスへの背部皮下移植においてコントロール株と比較し p53R248W ノックダウン株で増殖亢進が、p53R248W-OE 株で増殖抑制が有意に認められた。また p53R248W-OE 株の舌移植モデルでは、腫瘍組織の免疫染色で Ki-67 陽性率の減少が認められ、p53R248W による腫瘍増殖能の低下が示唆された。また p53R248W-OE 株を移植したマウスでは HSC3 株移植コントロール群と比較し生存期間の有意な延長が認められた。

以上より、本研究では p53R248W 変異が gain-of-function 作用により KRT17 の発現を抑制することで口腔扁平上皮癌の増殖能と浸潤能を抑制することを示した。これらの成果は p53R248W 変異を有する OSCC が予後良好な OSCC の 1 亜型として分類される可能性を示し、また p53 変異型による KRT17 の発現機構の解明が OSCC の診断と治療に向けた有用な知見となり得ることから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第616号		
学位授与の日	令和3年1月19日		
氏名	山下 友佑		
学位論文の題目	Targeting Adaptive IRE1 α Signaling and PLK2 in Multiple Myeloma: Possible Anti-Tumor Mechanisms of KIRA8 and Nilotinib (多発性骨髄腫における小胞体ストレスセンサーIRE1 α シグナルと PLK2 を標的とした KIRA8 とニロチニブの抗腫瘍効果の検討)		
論文審査委員	主査	教授 改正 恒康	
	副査	教授 神人 正寿	教授 園木 孝志

論文内容の要旨

【緒言】

小胞体ストレスとは、タンパク過剰産生や構造異常を有するタンパクの蓄積などによる小胞体への負荷が許容量を上回る状態であり、小胞体ストレス応答 (unfold protein response、UPR) を誘導する。小胞体膜上に存在する IRE1 α 、PERK、ATF6 の3つの主要なストレスセンサーがこれら不良タンパク質を感知することでUPRを始動する。小胞体ストレスが生じると、adaptive UPR (A-UPR) と呼ばれる防御システムにより、細胞生存・恒常性が維持される。一方で、小胞体ストレスが過度になると、細胞機能不全や細胞死・アポトーシスが引き起こされる。これを terminal UPR (T-UPR) と呼ぶ。がん細胞の生存・増殖においては、A-UPR が特に発達していると考えられている。

多発性骨髄腫は、新規薬剤の開発により治療成績は向上したが、未だ治癒が望めない難治性疾患である。骨髄腫細胞では、過剰な免疫グロブリン産生による慢性的な小胞体ストレスに曝される一方で、UPR が恒常的に活性化することにより、小胞体ストレスを回避して、腫瘍の生存・増殖を促す。現在、活性化した UPR を標的とした抗骨髄腫薬の開発が注目されている。最近、UPR における重要な小胞体ストレスセンサーである IRE1 α のキナーゼドメインに特異的な阻害作用を有する新規低分子化合物 KIRA8 が、ヒト骨髄腫細胞株に対して抗腫瘍活性を示すことが報告されたが、その分子メカニズムは不明な点が多い (Harnoss et al, PNAS, 2019)。今回、我々は、トランスレーショナル・リサーチを目的に、患者検体と骨髄腫細胞株を用いることで、多発性骨髄腫における UPR 活性の特徴、および、IRE1 α 阻害による抗腫瘍分子メカニズムについて検討を行った。

【方法】

1. 対象患者

2015年1月から2019年1月までの期間で、当科で多発性骨髄腫と診断された27例を対象とした。これらの中で除外基準を満たさない多発性骨髄腫11例と、正常骨髄であるびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を対照群とした6例の診断時の骨髄検体を本研究で使用した。

2. 細胞株・細胞培養

本研究では、ヒト骨髄腫細胞株 (IM-9、KMS-11、KMS-12PE、KHM-11) とラットインスリノーマ細胞株 INS-1 を使用した。細胞株は10%FBS 添加 RPMI-1640 培地で培養した。

3. 抗骨髄腫効果の検討

生細胞数は Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて、アポトーシスは Annexine V-FITC Apoptosis Detection Kit (シグマ・アルドリッチ) を用いて評価した。本研究で使用した試薬は、KIRA8 については共同研究者から提供を受けて、bortezomib、thapsigargin、nilotinib、GSK2606414、AMG PERK 44、TC-S 7005、DMSO については化学薬品販売業者から購入して使用した。

4. 遺伝子発現量の検討

患者骨髄液より密度勾配遠心法で分離した単核球、または、骨髄腫細胞株から RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成した。目的の遺伝子の発現量は CFX96 system (バイオ・ラッド) を用いて qRT-PCR 法で検討した。さらに、上記抽出した RNA から、TruSeq Standard mRNA Library Kit を用いて cDNA ライブラリーを作製し、次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 で遺伝子発現量を解析した。

5. 細胞周期の解析

各種試薬で処理した骨髄腫細胞株を氷冷 70%エタノールで固定し、プロピジウムイオダイドで染色し、FACSVerse (BD Bioscience) を用いて解析した。

6. タンパク質の解析

患者骨髄、骨髄腫細胞株、INS-1 細胞株における PLK2 蛋白の発現は、ウェスタンブロット法、免疫組織化学分析で検討した。抗体については、化学薬品販売業者から購入したものを使用した。

7. 統計解析

得られたデータの統計解析は、GraphPad Prism version 6.00 と JMP® Pro 14 を用いた。検定は、Student *t*-test と、一元配置分散分析後の Tukey's test で行い、有意水準は *p* 値 <0.05 とした。

【結果】

1. 未治療の多発性骨髄腫例の UPR シグナルの検討

未治療の多発性骨髄腫例の骨髄検体では、A-UPR マーカーである *sXBP1* と *BiP* の mRNA の発現が亢進していた。一方で、他の UPR マーカーである *ATF4*、*CHOP*、*TXNIP* の mRNA は有意な差を認めなかった。

2. IRE1 α 特異的阻害剤 KIRA8 と PERK 阻害剤の骨髄腫細胞株に対する生物学的効果の検討

KIRA8 は骨髄腫細胞株のアポトーシスを誘導し、生細胞数を低下させた。KIRA8 によって PERK 下流のアポトーシス誘導因子である *CHOP* の発現も亢進した。また、PERK 阻害剤の添加によって、IRE1 α 下流の *sXBP1* の発現が亢進し、生細胞数の低下も認められた。

3. 骨髄腫細胞株に対する ABL 阻害剤 nilotinib の抗腫瘍効果、プロテアソーム阻害剤 bortezomib の併用効果についての検討

慢性骨髄性白血病の分子標的薬 nilotinib は、ABL1 の細胞移動を阻害することで、IRE1 α の活性を低下させることが報告されている。骨髄腫細胞株に対し、KIRA8 と同様に nilotinib でも、アポトーシスが誘導され、生細胞数が低下した。さらに、KIRA8、および、nilotinib のアポトーシス誘導・抗腫瘍効果については、bortezomib の併用によって増強された。

4. 骨髄腫細胞株 IM-9 における KIRA8 によって誘導される遺伝子発現プロファイルの検討

網羅的な遺伝子発現解析により、骨髄腫細胞株 IM-9 に対し、KIRA8 単剤、KIRA8 と bortezomib の併用、KIRA8 と thapsigargin の併用の 3 群によって抑制される遺伝子群について注目した。その遺伝子群の中でも、細胞周期の制御に関わる Polo 様キナーゼファミリーメンバーの一つである PLK2 については、内因性の発現を十分確認でき、KIRA8 単剤でも強力な抑制効果を認めた。そして、骨髄腫細胞株で、KIRA8 による PLK2 の遺伝子・蛋白レベルでの発現量の抑制が確認できた。

5. IRE1 α と PLK2 の相互作用、PLK2 阻害剤の骨髄腫細胞株に対する生物学的効果の検討

ドキシサイクリン存在下で目的の遺伝子を強制発現することができる Tet-on システムを用いて、INS-1 細胞株に IRE1 α を強制発現することで PLK2 の発現は有意に増加し、KIRA8 により完全に抑制された。また、PLK2 阻害剤である TC-S 7005 を骨髄腫細胞株に添加すると、アポトーシスが誘導され、生細胞数が低下した。

6. 未治療の多発性骨髄腫例の骨髄検体の PLK2 発現の検討

未治療の多発性骨髄腫例のうち、寛解に至った症例の診断時の骨髄では、PLK2 mRNA の発現が亢進していた。また、骨髄腫症例の骨髄液クロット標本（ホルマリン固定後パラフィン包埋処理）の免疫染色を行い、CD138 陽性の骨髄腫細胞で PLK2 の発現を確認できた。

【考察】

多発性骨髄腫における UPR 機構は、分子標的治療の一候補として考えられ、様々な基礎・臨床研究が行われてきた。しかしながら、多発性骨髄腫の症例における UPR マーカーの検索は、これまで詳細に検討されていなかった。本研究の結果より、未治療の骨髄腫例の骨髄検体では、adaptive IRE1 α 経路が優位であることが明らかになった。

先行する報告 (Harnoss et al, PNAS, 2019) と同じく、本研究結果でも、KIRA8 の抗骨髄腫効果が確認できた。一方で、本研究では、KIRA8 により PERK 経路のアポトーシス誘導因子 *CHOP* の発現が亢進されていることが明らかになった。さらに、PERK 阻害剤は *sXBP1* 誘導と抗骨髄腫効果を示した。したがって、骨髄腫細胞の生存増殖には、IRE1 α 経路と PERK 経路の両者が関連していると考えられた。

プロテアソーム阻害剤 bortezomib は、多発性骨髄腫の標準治療薬として使用されている。我々の研究では、骨髄腫細胞株に対し、bortezomib と KIRA8 の併用は、強力なアポトーシス誘導効果を示した。実臨床では、bortezomib は、様々な薬剤と併用されているが、KIRA8 も有望な併用薬になる可能性が示唆された。

Nilotinib は、慢性骨髄性白血病の原因となる BCR-ABL の阻害作用が imatinib の約 20 倍強力である。

また、Nilotinib は、ABL 阻害作用を介して IRE1 α 経路を抑制することが知られている。本研究では、骨髄腫細胞株に対し、nilotinib が IRE1 α 経路を抑制することで、抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。Nilotinib は、現在、多発性骨髄腫の適応薬ではないが、今回のトランスレーショナル・リサーチの結果により、骨髄腫の領域への適応拡大が期待される。

KIRA8 処理した骨髄腫細胞における網羅的な遺伝子発現解析により、細胞周期を制御する PLK2 が IRE1 α 経路の重要な分子標的であることが明らかになった。さらに、KIRA8、および、PLK2 阻害剤は、細胞周期で G2/M 期への移行が抑制されることが確認できた。本研究では、サンプル数は少ないが、骨髄腫例の骨髄検体では PLK2 の発現が亢進していることが示された。PLK2 阻害剤は、骨髄腫細胞株でアポトーシスの誘導を認めており、新たな抗骨髄腫薬としての可能性を示すことができた。また、大腸癌の症例では、PLK2 発現が予後因子の一つであると報告されている。多発性骨髄腫の症例においても、PLK2 が予後予測のバイオマーカーになる可能性が考えられた。

【結語】

本研究の結果より、分子学的・病理学的な観点から、KIRA8 や nilotinib などの IRE1 α 阻害作用を有する低分子化合物が、多発性骨髄腫の新規治療薬になり得る可能性を示すことができた。さらには、IRE1 α キナーゼドメイン特異的な阻害により、アポトーシス誘導因子 CHOP の発現亢進や PLK2 発現抑制による細胞周期制御が、抗腫瘍効果に関わるという新知見を見出すことができた。多発性骨髄腫に対する IRE1 α を標的とした新規治療薬の実現に向けて、xenograft mouse model などの *in vivo* の系で有効性・安全性を十分に検討したうえで、ヒトへの臨床研究に移行する計画予定である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年12月22日、25日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

多発性骨髄腫は、新規薬剤の開発により治療成績は向上したが、未だ治癒が望めない難治性疾患である。骨髄腫細胞では、過剰な免疫グロブリン産生による慢性的な小胞体ストレスに曝される一方で、小胞体ストレス応答(unfold protein response, UPR) が恒常的に活性化しており、活性化した UPR を標的とした抗骨髄腫薬の開発が注目されている。本研究では、患者検体と骨髄腫細胞株を用いることで、多発性骨髄腫における UPR 活性の特徴、および、UPR における重要な小胞体ストレスセンサーである IRE1 α の阻害による抗腫瘍分子メカニズムについて検討を行った。

患者検体は、2015年1月から2019年1月までの期間で、当科で多発性骨髄腫と診断された11名と対照患者6名の骨髄検体を使用し、細胞株はヒト骨髄腫細胞株(IM-9, KMS-11, KMS-12PE, KHM-11)等を使用した。それらの RNA を抽出し、UPR に関連する遺伝子発現量を qRT-PCR 法で検討した。また、IRE1 α 阻害剤である KIRA8 や、ABL 阻害作用によって IRE1 α 活性を阻害する Nilotinib、多発性骨髄腫の治療薬である Bortezomib や PLK2 阻害剤などを用いて、ヒト骨髄腫細胞株に対する抗腫瘍効果や、UPR に与える影響等を検討した。さらに、KIRA8 等を投与した骨髄腫細胞株から抽出した RNA を用いて、RNA シーケンス法で遺伝子発現プロファイルを検討した。

未治療の多発性骨髄腫患者の骨髄検体では adaptive UPR マーカーである *sXBP1* と *BiP* の mRNA の発現が亢進していることが分かった。KIRA8 および Nilotinib は、ヒト骨髄腫細胞株のアポトーシスを誘導し、生細胞数を低下させることが分かった。さらに、KIRA8 および Nilotinib のアポトーシス誘導・抗腫瘍効果は、Bortezomib によって増強されることが分かった。また、KIRA8 によって抑制される遺伝子群を明らかにし、抑制される遺伝子の1つである PLK2 に注目し、遺伝子レベルだけでなく、蛋白レベルでの発現量の抑制も確認できた。PLK2 阻害剤による検討で、ヒト骨髄腫細胞株に対する抗腫瘍効果や細胞周期への影響を確認できた。さらに、骨髄腫患者の骨髄検体での PLK2 の発現を確認し、経過良好であった骨髄腫患者の診断時骨髄検体で PLK2 mRNA の発現が亢進していることが分かった。

以上の結果から、本研究は、KIRA8 や Nilotinib などの IRE1 α 阻害作用を有する低分子化合物が、多発性骨髄腫の新規治療薬になり得る可能性や、KIRA8 および Nilotinib の抗腫瘍効果の機序についての新知見、PLK2 が多発性骨髄腫の新規治療ターゲットや予後予測のバイオマーカーとなる可能性を示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第617号		
学位授与の日	令和3年2月16日		
氏名	山下 真平		
学位論文の題目	Essential roles of oncostatin M receptor β signaling in renal crystal formation in mice (マウスの腎結晶形成過程におけるオンコスタチン M 受容体 β シグナリングの役割)		
論文審査委員	主査	教授 井上 徳光	
	副査	教授 森川 吉博	教授 原 勲

論文内容の要旨

【緒言】

2015年の尿路結石全国疫学調査の結果から、本邦における尿路結石症の年間罹患率は人口10万人当たり137.9人(男性191.9人, 女性86.9人)であり、1965年と比較すると約3.2倍、1995年と比較しても約1.7倍の増加がみられている¹。また、その5年再発率は40-50%と極めて高く、医療経済を圧迫する社会問題となっている。代表的な尿路結石であるシュウ酸カルシウム結石の治療法は内服薬による排石促進や外科的治療による結石破砕が主であり、結石溶解療法は未だ確立されていない。尿路結石形成の予防や結石溶解療法の確立には、結石形成の分子生物学的機序の解明が不可欠であるが、未だ不明な点が多いのが現状である。

今回、我々は、インターロイキン6 (IL-6) ファミリーに属するサイトカインであるオンコスタチンM(OSM)に着目した。近年、尿路結石症の発症には炎症が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている²。一方で、OSMは、機能的に種々の炎症性疾患に関わることが知られている³。このような背景から、OSMが腎においても炎症を惹起し、尿路結石形成を促す可能性があるという仮説を立てた。本研究は、結石モデルマウスを用いた基礎研究により、尿路結石形成におけるOSMの役割を明らかにすることを目的とする。

【方法】

本研究では、8週齢雄性マウス(C57BL/6)にシュウ酸前駆物質であるGlyoxylate(GOx)を80mg/kg連日腹腔内投与する腎結石モデルを使用した。本モデルでは、GOx投与開始後、3日目より腎にシュウ酸カルシウム結晶の形成が認められ、6日目に形成量がピークとなり、その後15日目にかけて徐々に消失することが報告されている⁴。day0をGOx投与初日とし、day0のサンプルは投与前のマウスから採取、day3、day6、day9のサンプルは、それぞれ、GOxを3日間、6日間、9日間連日腹腔内投与した後、最終投与から24時間後にマウスから採取した。

実験1. 結石モデルマウスの腎組織におけるOSM/OSMR β 発現量の経時的検討

野生型マウスを用いて結石モデルを作成し、その腎組織におけるOSMおよびOSMR β (OSM受容体を形成する特異的サブユニット)の遺伝子発現量を、RT(real time)-PCR法を用いて経時的に検討した。また、それぞれの蛋白発現量の経時変化をWestern blot法を用いて検討した。

実験2. 野生型マウスとOSMR β マウスのシュウ酸カルシウム結晶形成量の比較

野生型マウスおよびOSMR β マウス(OSMR β 遺伝子欠損マウス)を用いて結石モデルを作製し、day0、day3、day6の腎組織におけるシュウ酸カルシウム結晶形成量を、Pizzolato染色を用いて比較・検討した。結晶形成量は、腎組織の断面全体の面積に対する結晶沈着部位の面積の割合で定量化した。

実験3. 野生型マウスとOSMR β マウスの腎組織における結晶結合分子・炎症関連因子・腎障害/線維化マーカー発現量および腎マクロファージ数の比較

野生型マウスおよびOSMR β マウスを用いて結石モデルを作製し、day0、day3、day6の腎組織における結晶結合分子(OPN、ANXA1、ANXA2)や炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)、マクロファージマーカー(F4/80)、マクロファージ走化性因子(MCP-1)、腎障害/線維化マーカー(KIM-1、TGF- β 、Col1a2、 α SMA、Timp2)の遺伝子発現量をRT-PCRを用いて両群間で比較・検討した。さらに、それぞれの蛋白発現量をWestern blot法を用いて比較した。また、day0、day3、day6の腎マクロフ

アージュ数(総マクロファージ数、M1/M2 マクロファージ数)を、flow cytometry 法を用いて比較した。
実験 4. 野生型結石モデルマウスの腎組織における OSM および OSMR β 発現細胞の同定

Day3 の野生型マウスの腎組織における OSM および OSMR β の発現部位について、二重免疫組織染色法を用いて検討した。

実験 5. 腎尿細管上皮細胞および腎間質線維芽細胞に対する OSM の直接的作用の検討

Day3 の野生型マウスの腎を摘出し、OSMR β が発現している尿細管上皮細胞および間質線維芽細胞を分取・培養し、OSM 刺激による結晶結合蛋白、炎症性サイトカインおよび線維化マーカーの遺伝子発現量の変化を RT-PCR で検討した。また、それぞれの蛋白発現量の変化を Western blot 法を用いて検討した。

【結果】

結果 1. OSM および OSMR β の遺伝子発現量は、各々 day6、day3 をピークに増加し、その後、day9 にかけて緩徐に低下した。Day3 および day6 における OSM および OSMR β の蛋白発現量は、day0 に比べて有意に増加していた。

結果 2. 野生型マウス、OSMR β ⁺マウスのいずれにおいても、day3 に尿細管内のシュウ酸カルシウム結晶沈着を認めたが、両者の結晶形成量には有意な差は認めなかった。野生型マウスでは、day6 に著明な結晶形成量の増加を認めたが、OSMR β ⁺マウスでは、野生型マウスに比べ、day6 のシュウ酸カルシウム結晶形成量は有意に少なかった。

結果 3. ①結晶結合分子発現量の比較：OSMR β ⁺マウスでは、野生型マウスに比べ、day3 および day6 における結晶結合分子(OPN、ANXA1、ANXA2)の遺伝子発現量は有意に減少していた。また、OSMR β ⁺マウスにおけるこれらの結晶結合分子の蛋白発現量は、day3、day6 のいずれにおいても有意に抑制されていた。②炎症関連因子の比較：OSMR β ⁺マウスでは、野生型マウスに比べ、day6 における TNF- α 、IL-1 β 、F4/80、MCP-1 の遺伝子発現量は有意に減少していた。さらに、day3 における TNF- α 、IL-1 β の遺伝子発現量も有意に減少していたが、F4/80、MCP-1 の遺伝子発現量は両群間で有意な差は認めなかった。また、蛋白発現量においても、OSMR β ⁺マウスでは野生型マウスに比べ、day3 で TNF- α 、IL-1 β が、day6 で TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 が有意に抑制されていた。Flow cytometry の結果、day3 においては総マクロファージ数、M1/M2 マクロファージ数のいずれにおいても両群間で有意な差は認めなかったが、day6 においては、OSMR β ⁺マウスでは野生型マウスに比べ、総マクロファージ数、M1/M2 マクロファージ数はいずれも減少していた。③腎障害/線維化マーカーの発現量の比較：OSMR β ⁺マウスでは、野生型マウスに比べ、day3 および day6 において、腎障害マーカーである KIM-1 の遺伝子発現量は有意に減少していた。さらに、day3 において、線維化マーカーである TGF- β 、Col1a2、 α SMA の遺伝子発現量は有意に減少していた。Timp2 の遺伝子発現量は、day3、day6 のいずれにおいても、両群間で有意な差は認めなかった。また、OSMR β ⁺マウスでは、野生型マウスに比べ、day3 における TGF- β 、Col1a2 の蛋白発現量は有意に抑制されていた。

結果 4. 二重免疫組織染色の結果、day3 の野生型マウスの腎組織において、OSM は EpCAM 陰性の尿細管上皮細胞に強く発現していた。一方、OSMR β は EpCAM 陽性の尿細管上皮細胞に発現しており、これらの尿細管上皮細胞において OPN の発現を認めた。また、OSMR β は、PDGFR β 陽性の間質線維芽細胞にも発現していた。しかし、F4/80 陽性マクロファージには OSMR β の発現は認められなかった。

結果 5. 上記の結果を踏まえ、day3 の野生型マウスの腎組織から分取・培養した EpCAM 陽性の尿細管上皮細胞および PDGFR β 陽性の間質線維芽細胞を OSM で刺激したところ、尿細管上皮細胞においては結晶結合分子(OPN、ANXA1、ANXA2)および線維化マーカー(TGF- β)の遺伝子発現が増加し、間質線維芽細胞においては、結晶結合分子(OPN、ANXA1、ANXA2)、炎症性サイトカイン(TNF- α)および線維化マーカー(Col1a2)の遺伝子発現が増加した。また、OSM の刺激によって、尿細管上皮細胞および間質線維芽細胞において、これらの分子の蛋白発現も増加していることが確認できた。

【考察】

OSM は、様々な炎症性疾患(慢性関節リウマチ、多発性硬化症、虚血性大腸炎など)との関連性が報告されている他、造血、肝、及び知覚神経の発生や動脈硬化を促進する作用も報告されている多機

能サイトカインである。腎においては、OSM が上皮間葉移行を促進することや、腎の線維化に関与している可能性などが報告されているが、結石形成過程における OSM の作用については未だ不明な点が多い^{5,6}。

本研究によって、OSMR β マウスでは尿路結石形成が抑制され、結晶結合分子や炎症性サイトカインの発現量が低下していることから、OSM は結石形成を促進している可能性が考えられる。従来から、尿路結石の形成には尿細管障害による間質の炎症が重要であると考えられており、近年、腎における M1 型マクロファージによる炎症反応増加が尿路結石形成を促進することが報告された²⁷。しかしながら、マクロファージには OSMR β の発現は認められなかったことから、OSM は従来とは異なる機序により炎症を惹起している可能性が考えられる。また、OSMR β は尿細管上皮細胞に発現しており、尿細管上皮細胞を OSM によって刺激することにより、結晶結合分子や線維化マーカーの発現が増加したことから、OSM は結石形成に重要であるとされている尿細管上皮細胞に作用し、結晶結合分子の発現や間質の線維化を制御している可能性が考えられる。さらに、これまでは尿路結石の形成と間質線維芽細胞との関連性は明らかになっていなかったが、OSMR β は腎の間質線維芽細胞に発現しており、線維芽細胞を OSM で刺激することにより、結晶結合分子や炎症性サイトカイン、線維化マーカーの遺伝子発現が増加したことから、線維芽細胞における OSM を介した間質の炎症や炎症以外の機能(結晶結合分子の発現や間質の線維化)が、結石形成に重要な役割を果たしている可能性も示唆される。

本研究結果は、今後、詳細な尿路結石形成機序の解明、新規分子標的治療薬の開発に貢献できる可能性がある。また、腎の線維化において重要な役割を担う腎間質線維芽細胞に OSMR β が発現していたことから、今後腎線維化メカニズムの解明や他の腎疾患への波及も期待される。

【結論】

OSM は、尿細管上皮細胞や間質線維芽細胞に作用し、結晶結合蛋白・炎症性サイトカインの産生を促し、尿路結石形成を促進する新規分子である。

【引用文献】

1. Sakamoto, S., Miyazawa, K., Yasui, T. et al.: Chronological changes in the epidemiological characteristics of upper urinary tract urolithiasis in Japan. *Int J Urol*, **25**: 373, 2018aa
2. Yasui, T., Okada, A., Hamamoto, S. et al.: Pathophysiology-based treatment of urolithiasis. *Int J Urol*, **24**: 32, 2017
3. Jones, S. A., Jenkins, B. J.: Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol*, **18**: 773, 2018
4. Okada, A., Yasui, T., Fujii, Y. et al.: Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice: Detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation. *J Bone Miner Res*, **25**: 2701, 2010
5. Pollack, V., Sarközi, R., Banki, Z. et al.: Oncostatin M-induced effects on EMT in human proximal tubular cells: differential role of ERK signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*, **293**: F1714, 2007
6. Elbjairami, W. M., Truong, L. D., Tawil, A. et al.: Early differential expression of oncostatin M in obstructive nephropathy. *J Interferon Cytokine Res*, **30**: 513, 2010
7. Taguchi, K., Okada, A., Kitamura, H. et al.: Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. *J Am Soc Nephrol*, **25**: 1680, 2014

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

2021年1月27日と1月29日に、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

尿路結石症の罹患率・再発率は高く、尿路結石形成の予防や結石溶解療法の確立が期待されているが、結石形成の分子生物学的機序については未だ不明な点が多いのが現状である。本研究では、機能的に種々の炎症性疾患に関わることが知られている、インターロイキン6 (IL-6) ファミリーに属するサイトカインであるオンコスタチンM(OSM)が、尿路結石形成においてどのような役割を果たすのかについて検討した。

本研究では、C57BL/6 マウスにシュウ酸の前駆物質である glyoxylate (GOx) を連日腹腔内投与する結石モデルマウスを用いた。まず、野生型マウスの腎組織における OSM および OSMR β (OSM 受容体を形成する特異的サブユニット) の遺伝子発現量の経時的变化を、RT-PCR を用いて検討したところ、OSM、及び OSMR β の発現量は、GOx 投与開始後、それぞれ day 6、day 3 をピークとして増加した。続いて、野生型マウスと OSMR β 遺伝子欠損マウスのシュウ酸カルシウム結晶形成量を比較したところ、OSMR β 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、day 6 での結晶形成量が有意に減少していた。また、両者間での結晶結合分子・炎症関連因子・腎障害/線維化マーカーの遺伝子発現量を RT-PCR を用いて比較したところ、OSMR β 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、day 3、day 6 における結晶結合分子(OPN、ANXA1、ANXA2)、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)、腎障害マーカー(KIM-1)の遺伝子発現量は有意に減少しており、day 3 における線維化マーカー(TGF- β 、Colla2、 α SMA)の遺伝子発現量も有意に減少していた。day 3 の野生型マウスの腎組織における OSM および OSMR β の発現部位について、免疫組織学的染色を用いた検討を行ったところ、OSM は EpCAM 陰性の尿細管上皮細胞に強く発現していたのに対し、OSMR β は EpCAM 陽性の尿細管上皮細胞、及び PDGFR β 陽性の間質線維芽細胞に発現していた。そこで、OSM の直接的作用を検討するため、day 3 の野生型マウスの腎組織から EpCAM 陽性の尿細管上皮細胞、及び PDGFR β 陽性の間質線維芽細胞を分取・培養し、OSM による刺激を行ったところ、尿細管上皮細胞においては結晶結合分子(OPN、ANXA1、ANXA2)および線維化マーカー(TGF- β)の遺伝子発現が増加し、間質線維芽細胞においては、結晶結合分子 (OPN、ANXA1、ANXA2)、炎症性サイトカイン (TNF- α) および線維化マーカー(Coll1a2)の遺伝子発現が増加した。

以上より、本論文は、OSM が近位尿細管上皮細胞や間質線維芽細胞に作用し、結晶結合蛋白・炎症性サイトカインの産生を促し、尿路結石形成を促進する新規分子であることを示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第618号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	岸本 祥平		
学位論文の題目	Bilateral atrophy of the extensor digitorum brevis muscle might be a useful sign for diagnosing diabetic polyneuropathy in Japanese men who do not sit in the traditional “seiza” style (短趾伸筋の両側の萎縮は正座習慣のない日本人男性において糖尿病性多発神経障害を診断するうえで有用な身体徴候の可能性はある)		
論文審査委員	主査	教授 廣西 昌也	
	副査	教授 佐々木 秀行	教授 松岡 孝昭

論文内容の要旨

【緒言】

下肢の異常感覚により QOL 低下をきたす対称性多発神経障害 (symmetric polyneuropathy: SPN) の原因として最も頻度が高い疾患は糖尿病である。通常、糖尿病多発神経障害 (diabetic symmetric polyneuropathy: DSPN) は感覚障害 (自覚症状や感覚鈍麻) で発症するが、運動神経が障害された進行期になると転倒、廃用の原因ともなる。短趾伸筋 (extensor digitorum brevis muscle: EDB) は最も遠位にある小筋群の一つで体表から触知することができる。糖尿病患者で同筋の萎縮が報告されているが、同筋の萎縮がどのような因子と関連するかは明らかにされていない。本研究は EDB 萎縮の DSPN を含む SPN の診断における有用性を検証することを目的とした。

【方法】

検討①

地域健康診断参加者 1893 人 (男性 794 人、女性 1099 人、年齢 40-75 歳) を対象とした。EDB を視診と触診で評価し、両側性萎縮のみを EDB 萎縮ありと判定した。年齢、性、身長、体重、腹囲、正座習慣、喫煙、飲酒習慣、糖尿病、高血圧、脂質異常の罹病歴の情報を収集した。神経機能検査として膝立位でアキレス腱反射 (ATR) を調べ、振動覚計 (AU-02B, リオン社) で定量的振動覚閾値 (QVT) を検査し、神経機能異常を示唆する自覚症状 (むずむず感、針で刺すような感覚、痛み) を問診で聴取した。また、一部の対象で腓腹神経の感覚神経活動電位 (AMP) と感覚神経伝導速度 (CV) を POCT 型神経伝導検査装置 (DPNCheckTM, フクダ電子) で測定し、日本人換算式による年齢の基準値で評価した。SPN 及び DSPN の診断は世界的に汎用されている Toronto consensus の probable DSPN の基準を使用し、両側の振動覚閾値異常を用いて客観的に判断した。統計学的には EDB 萎縮と関連する臨床因子を ANOVA, χ^2 検定で検討、EDB 萎縮を従属変数、臨床因子を独立変数とし多変量解析を行った。EDB 萎縮の SPN/DSPN を診断する妥当性は、感度・特異度および κ 係数により評価した。

検討②

和歌山県立医科大学病院の糖尿病外来に通院していた 133 人の糖尿病患者を対象に問診と身体診察を行った。正座習慣は聴取できなかったが年齢、性、身長、体重、血圧、脂質、糖尿病網膜症、尿蛋白、飲酒習慣の情報を収集した。全例で QVT 検査と自律神経機能検査として CVR-R、Head up tilt 検査での収縮期血圧較差 (Δ BP) を計測し、65 人においては神経伝導検査 (尺骨神経、脛骨神経の運動神経伝導速度: MCV、複合筋活動電位: CMAP、正中神経の SCV、感覚神経活動電位: SNAP) を計測した。DSPN の診断には Toronto consensus の probable DSPN 基準を用いた。統計学的検討は検討①と同じ方法を用い、EDB 萎縮と関連する臨床的、神経学的因子、DSPN を診断する際の EDB 萎縮の妥当性を検討した。

【結果】

検討①

EDB 萎縮は男性 20%、女性 44% で女性に有意に高頻度であり、男女別に解析を進めた。EDB 萎縮を従属変数とする多重ロジスティック回帰分析を行うと、男性では加齢、腹囲 (小)、正座習慣、糖尿

病、SPN が EDB 萎縮と有意に関連した。女性では加齢、低身長、高体重、正座習慣、SPN が有意な関連因子であった。

正座習慣は男女共通の関連因子であったので、正座習慣がない群(現在及び過去に日常的な正座習慣がない)に限定して男女を比較しても EDB 萎縮は男性 19%、女性 39%で女性に有意に高頻度であった。同群での多重ロジスティック回帰分析で EDB 萎縮の関連因子を調べたところ、男性では年齢、腹囲(小)、非喫煙、糖尿病、SPN が有意な関連因子であった。女性では年齢、低身長、高体重のみが関連因子であり、SPN は関連しなかった。

正座習慣と男性の糖尿病は EDB 萎縮の有意な関連因子であったので、正座習慣のない糖尿病患者(男性 117 人、女性 58 人)、正座習慣のない非糖尿病患者(男性 581 人、女性 708 人)において EDB 萎縮と神経機能の関連を調べたところ、糖尿病男性では、EDB 萎縮(+)群の AMP, CV, QVT は EDB 萎縮(-)群より有意に悪く、DSPN 有病率も有意に高値であった(21% vs 1%)。一方、糖尿病女性においては、EDB 萎縮(+)群は EDB 萎縮(-)群と比べて QVT 悪化を認めるのみで、DSPN 頻度は同等であった。糖尿病男性において EDB 萎縮が DSPN を診断する感度、特異度、陽性予測値、陰性予測値は各々 89%、72%、21%、99%で、 κ 係数は 0.2467 と fair agreement であった。

非糖尿病男性においては、EDB 萎縮(+)群の QVT は EDB 萎縮(-)群より有意に悪く、SPN 有病率も有意に高値であった(6% vs 1%)。しかし、非糖尿病女性では、EDB 萎縮(+)群と EDB 萎縮(-)群の SPN に有意差はなかった。非糖尿病男性において EDB 萎縮が DSPN を診断する感度、特異度、陽性予測値、陰性予測値は各々 46%、84%、6%、99%、 κ 係数は 0.0747 と slight agreement であった。

検討②

専門外来通院中の糖尿病患者で EDB 萎縮は女性(48%)のほうが男性(27%)よりも高頻度であった。多重ロジスティック回帰分析を行うと、EDB 萎縮の関連因子は性差(女性)、低 BMI、DSPN であった。男女別に EDB 萎縮(+)と(-)群で臨床因子と神経機能を比較すると、男性では EDB 萎縮(+)群の自律神経指標、神経伝導指標、QVT は EDB 萎縮(-)群より有意に悪く、DSPN の頻度も有意に高値(71% vs 33%)であった。DSPN を診断する際の EDB 萎縮の感度、特異度、陽性予測値、陰性予測値は各々 44%、87%、71%、67%で、 κ 係数は 0.3229 と fair agreement であった。一方、女性では 2 つの神経学的異常所見(安静時 CV-RR 脛骨神経 MCV)と EDB 萎縮が関連するのみで、DSPN の頻度は EDB 萎縮(+)群と EDB 萎縮(-)群で同等であった(23% vs 21%)。

【考察】

検討①では加齢、性別(女性)、正座習慣、SPN/DSPN が EDB 萎縮に関連すること、男性では糖尿病が有意な関連因子であることが判明した。加齢は筋肉量を減少させること、女性は生理学的に筋肉量が少なく、履物や生活習慣の特徴により EDB 萎縮が生じやすいと考えられる。正座習慣は足関節前面で深腓骨神経を損傷することが EDB 萎縮の原因と考えられる。SPN/DSPN は神経障害が末端から逆行性に進行するので、遠位の深腓骨神経が早期に障害されその支配筋である EDB 萎縮が出現すると考えられる。糖尿病は合併する DSPN により EDB 萎縮を惹起すると考えられる。

多くの因子が EDB 萎縮に関連するので、EDB 萎縮の SPN/DSPN 診断における有用性を調べるために、正座習慣のない集団を糖尿病の有無で分け、男女別に EDB 萎縮の関連因子を検討した。糖尿病男性において EDB 萎縮(+)群は萎縮(-)群に比べ、神経伝導指標、QVT は有意に悪く DSPN は有意に高頻度であった。EDB 萎縮が DSPN を判別する κ 係数は 0.2467 と fair agreement であった。非糖尿病男性では EDB 萎縮(+)群は萎縮(-)群に比べ、QVT は有意に悪く SPN は有意に高頻度であり、EDB 萎縮が SPN を判別する κ 係数は 0.0747 と slight agreement であった。一方、女性においては糖尿病患者でも非糖尿病患者でも EDB 萎縮と DSPN/SPN に有意な関連はみられなかった。

検討②では確立した糖尿病患者において EDB 萎縮で DSPN を診断する妥当性を評価した。男性では EDB 萎縮は種々の神経学的異常及び DSPN と有意に関連し、EDB 萎縮が DSPN を判別する κ 係数は 0.3229 と fair agreement であった。一方、女性では EDB 萎縮は DSPN と有意な関連を示さなかった。

このように正座習慣のない男性において EDB 萎縮は SPN/DSPN 診断に有用な指標と考えられた。糖尿病患者に高頻度に合併する DSPN は重症になると足潰瘍や足切断の原因となり、早期の診断は重要な臨床課題である。これまで、DSPN 診断は感覚神経障害の検査が中心であり、運動神経障害を調

べる簡便な診断法はなかった。運動神経障害の徴候である EDB 萎縮の確認はベッドサイドでの視診・触診により、短時間に簡便に施行でき、DSPN をスクリーニングする有用な方法と考えられる。一方で、EDB 萎縮は正座習慣の影響を強くうけることも明らかとなった。世界的には正座以外にも EDB 萎縮と関連する生活習慣が報告されており、EDB 萎縮を DSPN 診断の指標として使用する際には、地域の伝統的座式習慣を考慮する必要がある。

【結語】

EDB 萎縮は男性においては正座習慣を除外した上で、日常臨床の現場で簡便に対称性多発神経障害を評価できる有用な所見であり、特に糖尿病多発神経障害のスクリーニングに有効と考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年10月1日、10月2日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。末梢神経障害は QOL 低下、転倒・骨折の危険因子になる。そのため多発神経障害 (polyneuropathy: PN) の診断は重要で、自覚症状、腱反射や振動覚検査を診断に用いるが、多忙な日常診療では敬遠されがちである。短趾伸筋 (EDB) は外踝前方の足甲部に位置し、糖尿病性多発神経障害 (DPN) の指標となるが、非糖尿病患者での意義、EDB 萎縮と末梢神経機能や生活習慣等の関連は明確でない。今回我々は EDB 萎縮の、PN 特に DPN 診断での有用性を男女別に検討した。

検討1では地域健康診断受診者1893人（男性764、女性1099、平均年齢62.4歳）でEDB萎縮と年齢、性別、体格（身長、体重、腹囲）、生活習慣、生活習慣病、末梢神経機能との関連を調べ、EDB萎縮の臨床的意義を断面的に検討した。EDB萎縮は視診、触診で評価し、神経機能は①自覚症状、②両アキレス腱反射 (ATR) 低下、③両第1趾先端の定量的振動覚閾値 (QVT) 異常、④POCTの神経伝導検査 (DPN-Check) で腓腹神経の活動電位 (AMP)、伝導速度 (CV) を測定し評価を行い、PNの有病率やPNを診断する上でのEDB萎縮の妥当性を評価した。

検討2では糖尿病診療専門施設受療中の患者133人で研究1と同様の因子を検討し、神経伝導検査結果（運動神経伝導速度:MCV、複合筋活動電位:CMAP、感覚神経伝導速度:CV、感覚神経活動電位:AMP）、自律神経機能検査結果（心電図R-R間隔変動係数、head-up-tilt試験の収縮期血圧較差）とEDB萎縮の関連性を横断的に調べ、DPN診断における有用性を検討した。

結果：検討1：EDB 萎縮陽性率は男性 20%、女性 44%で、性別と正座習慣が強く関連した。男女別にかつ正座習慣の少ない群に限定すると男性では糖尿病、年齢、PN と関連を認めたと、女性では糖尿病、神経学的異常所見ともに関連を認めなかった。また正座習慣の少ない糖尿病の男性では EDB 萎縮のある群はない群に比べ AMP, CV, QVT の値が悪く、神経障害の頻度は有意に高率で、EDB 萎縮で DPN を診断する際の κ 係数は 0.2467 であった。しかし、女性では EDB の有無で神経障害の頻度に有意差がなく、DPN 診断の際の κ 係数も低値であった。非糖尿病群でも男性では PN を診断するうえで有意な κ 係数を呈したが、女性では関連を認めなかった。

結果：検討2：EDB萎縮陽性率は男性27%、女性48%で性差を認め、男性ではEDB萎縮は年齢、糖尿病罹病期間、低BMI、神経学的異常所見、神経伝導検査、自律神経検査の異常所見とも有意に関連したが、女性では少数の項目しか関連しなかった。男性ではDPN診断におけるEDB萎縮は κ 係数0.3229で妥当性を認めたが、女性はEDB萎縮の妥当性は認められなかった。

一般住民では EDB 萎縮には性別（女性に多い）、正座習慣、PN と関連し、男性では糖尿病とも有意に関連し、PN/DPN 診断には EDB 萎縮が有用とされた。確立した糖尿病患者でも EDB 萎縮は特に男性で DPN と密接に関連した。本論文は糖尿病・非糖尿病 2 群で男女別、生活習慣別に EDB 萎縮の意義を評価検討した。時間の限られる外来診療において多発神経障害を簡便にスクリーニングするために有用な理学的所見を示したもので、臨床的に意義深く、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第619号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	青石 裕香		
学位論文の題目	Risk factors for breast cancer-related lymphedema: correlation with docetaxel administration (乳がん関連リンパ浮腫の危険因子: ドセタキセル投与との相関)		
論文審査委員	主査	教授 園村 哲郎	
	副査	教授 朝村 真一	教授 西村 好晴

論文内容の要旨

【諸言】

乳癌による症状やその治療の合併症として上肢リンパ浮腫がみられる。中でも腋窩リンパ節郭清は最も重要なリスクであることが知られている。ACOSOG-Z0011 や AMAROS 試験の結果が報告されて以来、センチネルリンパ節転移陽性でも腋窩リンパ節郭清術を省略する症例が増えてきており、それに伴いリンパ浮腫発症は減少している。しかしながら、多数の腋窩リンパ節転移がある患者においては依然として腋窩リンパ節郭清術が治療の要であり、リンパ浮腫に関する知識は不可欠である。腋窩リンパ節郭清術や放射線照射、肥満が発症のリスク因子であると報告されてはいたが、認識されていても、以前は医療機関で十分な対応ができていなかった。2016年度の診療報酬改定でリンパ浮腫複合的治療算定として保険算定が可能となり、当院では2017年10月にリンパ浮腫外来を開設し、診療を開始した。リンパ浮腫外来で診療する中で、腋窩リンパ節郭清術施行後に化学療法を行った症例、特にドセタキセルの使用例においてリンパ浮腫の発症率が高い印象を受けた。ドセタキセルとパクリタキセルを合わせたタキサン系化学療法とリンパ浮腫のリスクとの相関関係についてはこれまでも報告はあるが、結果は一貫していなかった。リンパ浮腫は可逆性である早期に治療介入することが重要であり、発症リスクの高い患者背景を見出すため、特にドセタキセルの使用が、リンパ浮腫発症のリスク因子であるかどうかについて検討した。

【対象・方法】

2012年1月～2018年12月に乳癌と診断され当科で手術を施行した患者1299例のうち、①腋窩の手術はせず乳房手術のみの症例(93例)、②他院への通院など当科で経過観察できなかった症例(158例)、③乳癌再発によるリンパ浮腫発症例(5例)、④病勢急速進行のため手術から3ヶ月以内に死亡した症例(2例)を除外した1041例(1069 breasts)を対象とした。患者背景:年齢、BMI、左右、乳癌ステージ(TNM分類)、病理学的情報(組織型、サブタイプ)、治療内容:術式、化学療法の有無・種類、放射線照射の有無・照射範囲とリンパ浮腫発症の関係について後ろ向きに検討した。リンパ浮腫の診断は国際リンパ学会の病期分類に基づいて行った。ドセタキセル誘発性浮腫と続発性リンパ浮腫との鑑別についてであるが、ドセタキセル誘発性浮腫は投与終了後、経過とともに消失するものであり、両下肢浮腫と共に時間の経過とともに軽快した浮腫に関してはリンパ浮腫としていない。また、ドセタキセル投与中に両下肢浮腫や患側浮腫は認められることはあったが、健側上肢に浮腫が見られることはなかった。

【結果】

リンパ浮腫発症例はセンチネルリンパ節生検症例のうち6.6%(6/784)、腋窩リンパ節郭清術施行例で29.8%(85/285)であり($p<0.0001$)、腋窩リンパ節郭清術が影響していることは明確であった。さらなるリスク因子を探るため、郭清術症例に絞って解析を行った。以前よりリスク因子と考えられていたBMIは、本研究においては有意差が見られなかった。術後、ドセタキセルによる化学療法、抗HER2療法、放射線照射を行った症例でリンパ浮腫発症が有意であった。抗HER2療法単独ではリンパ浮腫の発症率に差はなく、ドセタキセルとの併用レジメンが多いため影響を受けていると考える。また、リンパ浮腫発症症例において、その契機と時期(術後からの発症までの期間)について検討し

た。ドセタキセルの使用は、リンパ浮腫の早期発症とよく相関しており、炎症/蜂巣炎、上肢への負荷は、遅発性の発症に関与している傾向が見られた。

【考察】

タキサン系化学療法とリンパ浮腫のリスクとの相関関係についてはこれまでも報告はあるが、結果は一貫していなかった。またそれらはドセタキセルとパクリタキセルを合わせた検討であった。本研究においてはパクリタキセルを含むレジメンとドセタキセルを含むレジメンを分類して検討し、ドセタキセル使用例でリンパ浮腫の発症率が高いという結果となった。ドセタキセルの反復投与により血管内皮に炎症が生じ、毛細血管の透過性が亢進し、間質にたんぱく質が蓄積すると考えられている。通常、ドセタキセル誘発性浮腫は投与終了後時間の経過とともに解消するが、一部の患者では長期に持続することがあり、化学療法後の放射線療法でさらに悪化する。組織への酸素と栄養素の供給は血管系によって提供され、毛細血管レベルで間質に体液が漏出している。リンパ系の主な機能は、この液体を収集して血液系に戻し、全体的な液体のバランスを維持することである。毛細血管壁からは血液の液体成分とタンパク質の一部が間質に漏れ出ており、リンパ系はこの水とタンパク質を回収し、最終的には静脈角から静脈循環に戻る。その経路で、すべてのリンパは少なくとも1つのリンパ節を通過する。腋窩リンパ節郭清術を施行された上肢では、体液の回収が通常より減少している状態であり、そこに放射線照射や上肢の圧迫によるリンパの回収率の低下、ドセタキセル投与による間質への体液貯留の増加がリンパ浮腫を引き起こす。ドセタキセル誘発性浮腫とリンパ浮腫に明確な鑑別はないが、血管系とリンパ系の循環から、リンパ浮腫発症の契機になり得ると考える。

【結語】

腋窩リンパ節郭清術を施行した症例において、放射線療法、術後化学療法、特にドセタキセルは、リンパ浮腫発症の契機となり得る。遅発性のリンパ浮腫は、多くの場合、患肢への負荷など、日常の習慣や生活様式によって引き起こされる。生活習慣の見直しもリンパ浮腫の予防・緩和に重要なことである。リスク因子を把握しておくことで可逆性である早期のうちに治療介入することができ、リンパ浮腫の悪化を防ぐことにつながると考える。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年10月28日、論文審査委員は学位申請者に出席を求め、上記論文の審査を行った。乳癌による症状やその治療の合併症として上肢リンパ浮腫がみられる。腋窩リンパ節郭清術施行後に化学療法を行った症例、特にドセタキセルの使用例においてリンパ浮腫の発症率が高い印象を受けた。ドセタキセルとパクリタキセルを合わせたタキサン系化学療法とリンパ浮腫のリスクとの相関関係についてはこれまでも報告はあるが、結果は一貫していなかった。本研究ではドセタキセル使用歴とリンパ浮腫発症の関連について検討した。2012年1月～2018年12月に乳癌と診断され当科で手術を施行した患者1299例のうち、①腋窩の手術はせず乳房手術のみの症例(93例)、②他院への通院など当科で経過観察できなかった症例(158例)、③乳癌再発によるリンパ浮腫発症例(5例)、④病勢急速進行のため手術から3ヶ月以内に死亡した症例(2例)を除外した1041例(1069 breasts)を対象とした。リンパ浮腫の発症はセンチネルリンパ節生検症例で6.6%(6/784)、腋窩リンパ節郭清術施行例で29.8%(85/285)であった($p<0.0001$)。腋窩リンパ節郭清術が影響していることは明確であったため、郭清術症例に絞ってさらに解析を行った。以前よりリスク因子と考えられていたBMIは本研究においては有意差が見られなかった。術後、ドセタキセルによる化学療法、抗HER2療法、放射線照射を行った症例でリンパ浮腫発症が有意であった。抗HER2療法単独ではリンパ浮腫の発症率に差はなく、ドセタキセルとの併用レジメンが多いため影響を受けているものと考えられた。またリンパ浮腫発症例において、その契機と時期(術後からの発症までの期間)について検討した。腋窩リンパ節郭清術を施行した症例において、ドセタキセルの使用はリンパ浮腫の早期発症とよく相関しており、遅発性のリンパ浮腫は多くの場合、患肢への負荷など日常の習慣や

生活様式によって引き起こされる。生活習慣の見直しもリンパ浮腫の予防・緩和に重要なことである。リスク因子を把握しておくことで可逆性である早期のうちに治療介入することができ、リンパ浮腫の悪化を防ぐことにつながるを考える。

本論文は、腋窩リンパ節郭清術後のドセタキセル使用が乳癌術後続発性リンパ浮腫の発症の高いリスク因子であることを明らかにしたものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第620号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	木下 利喜生		
学位論文の題目	Mobilization within 24 hours of new-onset stroke enhances the rate of home discharge at 6-months follow-up: a prospective cohort study (脳血管障害発症 24 時間以内の離床は 6 ヶ月後の在宅退院率を高める：前向き観察研究)		
論文審査委員	主査	教授 上野 雅巳	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 田島 文博

論文内容の要旨

【諸言】

発症早期からのリハビリテーション(リハ)医療の有効性が示され、本邦のガイドラインでも早期リハ提供が推奨されている。しかし、オーストラリアを中心とした大規模ランダム化比較試験の A Very Early Rehabilitation Trial (AVERT) 第 III 相では脳血管障害(cerebral vascular accident, CVA)患者に対し、発症早期から高頻度の離床を開始した群は、それ以降に開始した群よりも 3 か月後の Activities of daily living (ADL)の回復が不良であったことを示した。しかし、この論文ではリハ科医の診断も無く、療法士でない者がリハ医療を提供していたことに問題を感じた。そこで我々はリハ科医と熟練した療法士によるリハ医療(Physiatrist and registered therapist operating rehabilitation, PROr)を、発症 24 時間以内に開始した群は、それ以降に開始した群より 2~3 週間後の ADL 改善が良好であることを示した。しかし、リハ治療の目的は家庭復帰であり PROr の早期開始効果が家庭復帰に繋がっているか不明である。

【目的】

CVA 発症後 24 時間以内の PROr 開始の長期的効果を検証するために、発症 6 ヶ月後の自宅退院率、ADL 改善量、再発率、死亡率を調査した。

【対象と方法】

対象は 2014 年 6 月から 2015 年 4 月までの間に当院へ CVA により搬送され、リハ科に紹介された患者 233 名で、病前から歩行困難であった 5 例と、ターミナルケアであった 1 例が除外された。227 名は発症から PROr を 24 時間以内に開始した患者を very early mobilization(VEM n=47)群、24~48 時間を early mobilization(EM n=77)群、48 時間以降は later mobilization(LM n=103)群と群分けした。測定項目は PROr 開始時、当院転帰時・発症 6 か月後の Functional Independence Measure(FIM)、Glasgow Coma Scale(GCS)、modified Rankin Scale(mRS)、National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)、当院転帰時と 6 か月後の転帰先および死亡率、再発率とした。

【結果】

リハ開始時の FIM、mRS、GCS、NIHSS に群間差はなく、CVA の種類、脳梗塞のサブタイプ、入院期間、リハ実施時間、当院転帰時の退院先の分布にも有意差は認めなかった。調査期間中の自宅退院率は VEM 群 81%、EM 群 58%、LM 群 64%で、VEM 群は EM 群より有意に高く、LM 群よりも高くなる傾向を示した。当院転帰時の Total FIM および FIM 運動項目の改善量は VEM 群が他群よりも有意に高かった。発症 6 か月後では、CVA 再発率、死亡率に群間差はなく、mRS、GCS、NIHSS の改善量に群間差は認めなかった。しかし、Total FIM および FIM 運動項目の改善量において、VEM 群が LM 群よりも有意に高かった。

【考察】

今回、調査期間中の自宅退院率は VEM 群が他群よりも高く、死亡率および CVA 再発率は悪化しなかった。24 時間以内の PROr 開始は CVA 患者に長期的にも有益であった。

VEM 群は、他群よりも自宅退院率が約 20%高かった。CVA 患者の転帰は CVA の種類、入院時の FIM スコア、併存疾患が独立した予測因子であることが示されている。VEM 群の自宅退院率が高かった主な理由は、当院在院中の FIM 改善量が PROr によって他群よりも上昇したことにあると考えられる。何故なら FIM が 1 ポイント上昇するごとに、自宅退院率が高くなるためである。今回の結果は自宅退院率にまで有益な効果をもたらすことを示唆した。

AVERT では、CVA 発症後 18.5 時間 (IQR 12.8~22.3) からリハを開始することで、発症 3 ヶ月後の mRS がそれ以降に開始した群よりも不良であったと報告している。この研究ではコントロール群のリハ開始時間が 22.4 時間(IQR 16.5~29.3) であり、両群でのリハ開始時間による群分けが不明確であった。さらに、本研究のリハ実施時間が 1 日 70 分以上であるのに対し、AVERT では療法士と看護スタッフによる離床時間を合算しても約 31 分であった。先行研究ではリハ提供時間が CVA 患者の改善に重要な決定因子であることや、リハ科医が診察した大腿骨頸部骨折患者の機能回復が有意に良好であったとの報告もある。リハ科医と療法士は、CVA 患者の離床の遅れや安静臥床が全身状態を悪化させること、さらに運動生理学に精通し、立位や運動の臨床的利点を認識している。一方、心血管系や呼吸器系、脊椎、骨、関節障害時の離床に伴うリスク管理も熟知していることから、意識障害や人工呼吸器管理下にある患者に対しても、安全な離床を行える。今回の FIM 改善には、リハ科医指示の下、十分に訓練された療法士が 70 分以上の PROr を実施したことが重要な要因の一つであると考えた。

我々の研究では、死亡率、CVA 再発率に群間差はなく、発症早期からの PROr によってリスクを増加させないことが示唆された。

【結論】

CVA 発症後 24 時間以内に PROr を実施した場合、死亡率と CVA 再発のリスクが増すことなく、発症 6 ヶ月後の自宅退院率が向上した。自宅退院率が高いのは、24 時間以内の PROr 開始によって ADL がより大きく改善したことが要因であると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 2 年 11 月 26 日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

発症早期からのリハビリテーション(リハ)医療の有効性が示され、本邦のガイドラインでも推奨されている。しかし、これまでの報告はリハ科医の診断も無く、療法士でない者がリハ医療を提供していたことに問題を感じた。そこで申請者らはリハ科医と熟練した療法士によるリハ医療(Physiatrist and registered therapist operating rehabilitation, PROr)を、発症 24 時間以内に開始した群は、それ以降に開始した群より 2~3 週間後の Activities of daily living (ADL)改善が良好であることを示した。本研究は同様の患者を対象に、cerebral vascular accident (CVA)発症後 24 時間以内の PROr 開始の長期的効果を検証することを目的に、発症 6 ヶ月後の自宅退院率、ADL 改善量、再発率、死亡率を調査したものである。

対象は CVA により当院へ搬送され、リハ科に紹介された患者 233 名。発症から PROr を 24 時間以内に開始した患者を very early mobilization(VEM n=47)群、24~48 時間を early mobilization(EM n=77)群、48 時間以降は later mobilization(LM n=103)群と層別化した。測定項目は PROr 開始時、当院転帰時・発症 6 か月後の Functional Independence Measure(FIM)、当院転帰時と 6 か月後の転帰先および死亡率、再発率とした。

その結果、以下の知見が判明した。リハ開始時の FIM に群間差はなく、CVA の種類、脳梗塞のサブタイプ、入院期間、リハ実施時間、当院転帰時の退院先の分布にも有意差は認めなかった。自宅退院率は VEM 群 81%、EM 群 58%、LM 群 64%で、VEM 群は EM 群より有意に高く、LM 群よりも高くなる傾向を示した。さらに当院転帰時の FIM 改善量は VEM 群が他群よりも有意に高く、発症 6 か月後では、VEM 群が LM 群よりも有意に高かった。また CVA 再発率、死亡率に群間差は認めなかった。

CVA 患者に対する 24 時間以内の PROr 開始は長期的にも有益であった。VEM 群の自宅退院率が高い理由は、当院在院中の FIM 改善量が早期 PROr によって他群よりも上昇したことにあると考え

られる。何故なら FIM が 1 ポイント上昇するごとに、自宅退院率が高くなるためである。さらに国内における他の調査よりも VEM 群の死亡率は低かった。今回の結果は、発症早期からの PROr によってリスクを増すことなく、自宅退院率にまで有益な効果をもたらすことを示唆した。

本論文は CVA 患者への早期 PROr 開始の長期的な効果を調査した初めての論文であり、CVA 患者へのリハ効果を向上させることが期待できることから、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第621号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	津村 亜矢子		
学位論文の題目	Surgical indication for intraductal papillary mucinous neoplasm without mural nodule ≥ 5 mm (壁在結節径5mm未満のIPMN症例に対する手術適応の検討)		
論文審査委員	主査	北野 雅之 教授	
	副査	村垣 泰一 教授	山上 裕機 教授

論文内容の要旨

【諸言】

膵管内乳頭粘液性腫瘍(intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN)は、その悪性度により、病理学的に low-grade dysplasia(LDG)、high-grade dysplasia(HGD)、invasive intraductal papillary mucinous carcinoma (invasive IPMC)の3種類に分類される。IPMNの治療方針は、LDGは良性と判断し、半年毎に1度のフォローアップを行うが、HGDならびにinvasive IPMCは手術適応となる。また、invasive IPMCにおいては、通常型膵癌と同様に悪性度が高く、リンパ節郭清を含む手術が必要である。

これまでの多くの研究により、IPMNの手術適応となるHGD・invasive IPMCの予測因子の同定が行われてきた。なかでも、壁在結節は最も重要なHGD・invasive IPMC予測因子であることが多く報告され、IPMN国際診療ガイドラインでは、5mm以上の壁在結節をもつIPMNは、手術の絶対適応と提唱している。近年、超音波内視鏡検査(endoscopic ultrasonography; EUS)の診断率が向上し、IPMNにおける壁在結節径の診断率も上昇し、壁在結節径が5mm未満のIPMNはフォローアップとなる頻度が上昇している。

本研究では、壁在結節径5mm未満のIPMN症例におけるHGD・invasive IPMC頻度を明らかにし、その予測因子を同定することを目的とする。本研究により、壁在結節径5mm未満のIPMN症例の手術適応が明確になれば、IPMN患者の生存期間延長に貢献できる。

【目的】

壁在結節径5mm未満のIPMNにおける、HGD・invasive IPMCの頻度と予測因子の同定を目的とした。

【対象】

1999年～2018年に当科で外科的切除を行ったIPMN329例を対象とした。

【方法】

外科的切除したIPMN329例のうち、壁在結節径5mm以上のIPMN(壁在結節 ≥ 5 mm)は174例で、壁在結節径5mm未満のIPMN(壁在結節 < 5 mm)は155例であった。壁在結節 < 5 mm IPMNのうち、壁在結節を認めないIPMN(壁在結節(-))は131例、5mm未満の壁在結節を認めるIPMN(壁在結節(+) < 5 mm)は24例であった。それぞれの群で、HGD・invasive IPMCの頻度を比較した。

壁在結節 < 5 mm IPMN症例において、分枝嚢胞径・主膵管径・内視鏡的逆行性膵管造影(endoscopic retrograde pancreatography; ERP)により採取した膵液carcinoembryonic antigen(CEA)のカットオフ値をreceiver operating characteristic(ROC)曲線により同定した。壁在結節 < 5 mm IPMN症例におけるHGD・invasive IPMC予測因子を、 χ^2 検定による単変量解析とmultiple logistic regression modelによる多変量解析にて同定した。

【結果】

壁在結節 ≥ 5 mm群(n=152/174, 87.4%)は、壁在結節(-)群(n=59/131, 45.0%)ならびに壁在結節(+) < 5 mm群(n=9/24, 37.5%)よりも、HGD・invasive IPMCの頻度は高かった(P<0.001, P<0.001)。壁在結節 < 5 mm(壁在結節(-)群・壁在結節(+) < 5 mm群)IPMN155症例のうち43.9%(n=68/155)にHGD・invasive IPMC

を認めた。

ROC 曲線解析により、壁在結節<5mm の IPMN における分枝嚢胞径、主膵管径、膵液 CEA 値のカットオフ値を、それぞれ 40mm、7mm、30ng/ml と設定した。多変量解析により、分枝嚢胞径 \geq 40 mm (P=0.043, odds ratio [OR]; 3.57)、膵液細胞診陽性(P=0.050, OR; 13.40)、膵液 CEA \geq 30 ng/ml (P<0.001, OR; 13.89)の 3 因子が独立した壁在結節<5mm IPMN における HGD・invasive IPMC 予測因子であった。これらの 3 因子を用いた壁在結節<5mm IPMN における HGD・invasive IPMC 診断率は 71.0%であった。

【考察】

本研究では、壁在結節 \geq 5mm IPMN において 87.4%に HGD・invasive IPMC を認め、壁在結節(-) IPMN 45.0%、壁在結節(+)<5mm IPMN 37.5%に比べ、有意に高かった。この結果は、IPMN 国際ガイドラインにおいて、壁在結節 \geq 5mm IPMN が絶対的手術適応であるという提唱を支持する。近年、国際ガイドラインが広く普及し、また EUS による壁在結節径の診断が向上したため、結節壁在<5mm の IPMN は、高頻度にフォローアップとなる。しかしながら、本研究における結節壁在<5mm IPMN 155 例のうち 43.9%に HGD・invasive IPMC を認め、決して低い頻度ではなかった。

本研究により、分枝嚢胞径 \geq 40mm、膵液細胞診陽性、膵液 CEA \geq 30ng/ml の 3 因子が、壁在結節<5mm IPMN における HGD・invasive IPMC の独立予測因子であることがわかった。これまでの研究により、IPMN における分枝嚢胞径高値は HGD・invasive IPMC の予測因子であるという報告と、予測因子ではないという相反する報告があるが、本研究では、分枝嚢胞径の測定が壁在結節<5mm IPMN における手術適応の決定に重要であることが分かった。

膵液細胞診は、壁在結節<5mm IPMN における HGD・invasive IPMC の診断において、特異度が 98.6%と高いが、感度が 9.2%と極めて低かった。このことは、膵液細胞診のみでは、HGD・invasive IPMC を過小評価する可能性がある。本研究で同定した膵液 CEA \geq 30ng/ml の、壁在結節<5mm IPMN における HGD・invasive IPMC の診断率は 73.5%と最も高く、膵液 CEA 値の測定が、壁在結節<5mm IPMN の手術適応に有用であることが分かった。しかしながら、これらの因子に必要な ERP 検査は、侵襲が大きいため、ERP の適応については慎重に判断する必要がある。

本研究は、壁在結節<5mm IPMN における HGD・invasive IPMC の頻度と予測因子を初めて報告した。本研究により、壁在結節<5mm IPMN において、HGD・invasive IPMC の見落としを回避し、IPMN 患者の生存期間延長に貢献できる可能性がある。

【結語】

壁在結節径 5mm 未満の IPMN の 43.9%に HGD・invasive IPMC を認めた。分枝嚢胞径高値、膵液細胞診陽性、膵液 CEA 値高値は、壁在結節径 5mm 未満の IPMN において独立した HGD・invasive IPMC の予測因子であった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年11月30日に論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

本論文は壁在結節5mm未満の膵管内乳頭粘液性腫瘍(intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)) の手術適応に関して検討を行ったものである。

これまでの多くの研究により、IPMNの手術適応となるhigh-grade dysplasia (HGD)とinvasive intraductal papillary mucinous carcinoma (HGD/invasive IPMC)の予測因子の同定が行われてきた。なかでも、IPMNにおける壁在結節は、最も重要な悪性予測因子である。5mm以上の壁在結節をもつIPMNは、国際診療ガイドライン2017ではhigh risk stigmata、ヨーロッパガイドラインではabsolute surgical indicationとされ、手術適応とされている。一方、壁在結節が5mm未満のIPMNに対する手術適応に関する報告は少ないため、壁在結節5mm未満のIPMNにおける、HGD/invasive IPMCの頻度と予測因子の同定を行った。

まず、外科的切除を行ったIPMN329例を、壁在結節5mm未満のIPMN155例、壁在結節5mm以上の174例に分類した。その結果、壁在結節5mm以上のIPMNは、壁在結節5mm未満のIPMNよ

り、HGD/invasive IPMCの頻度は有意に高かった（87.4%,43.9%）。この結果は、IPMN国際ガイドラインにおいて、5mm以上の壁在結節を持つ IPMNが絶対的手術適応であるという提唱を支持する。また、壁在結節5mm未満のIPMNにおけるHGD/invasive IPMCの頻度は43.9%であり、決して低い頻度ではなかった。

次に、壁在結節5mm未満のIPMN155例におけるHGD/invasive IPMCの予測因子について検討した。結果、多変量解析では膵液CEA値 $\geq 30\text{ng/ml}$ 、膵液細胞診陽性、腫瘍径 $\geq 40\text{mm}$ の3因子が、独立したHGD/invasive IPMC予測因子であった。さらに、これらの因子を用いた壁在結節5mm未満のIPMNにおける、HGD/invasive IPMCの診断率は71.0%であった。国際診療ガイドライン2017のhigh risk stigmataを用いた場合の診断率は56.1%、ヨーロッパガイドラインのabsolute surgical indicationを用いた場合の診断率は58.1%であり、これらのガイドラインより、本論文で同定した予測因子を用いた診断率のほうが良好であった。

以上より、本論文の検討の結果、壁在結節 5mm 未満の IPMN において膵液 CEA 値 $\geq 30\text{ng/ml}$ 、膵液細胞診陽性、腫瘍径 $\geq 40\text{mm}$ は HGD/invasive IPMC の独立予測因子であり、診断率が良好であった。壁在結節 5mm 未満の IPMN 症例の手術適応が明確になれば、IPMN 患者の生存期間延長に貢献できる可能性が示唆され、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第622号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	横山 真央		
学位論文の題目	A Biodegradable Microneedle Sheet for Intracorporeal Topical Hemostasis (生体内局所止血を目的とした生体内分解性マイクロニードルシートの開発)		
論文審査委員	主査	教授	村垣泰光
	副査	教授	西村好晴
		教授	赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

手術中や外傷時の出血管理は、患者の転帰に影響するため非常に重要である。出血治療の際に利用される同種輸血の使用量と死亡率の間には、有意な正の相関が見られる。血液製剤の使用を最小限にするために、様々な止血製品が開発され利用されている。しかしそれらの製品は、保管性、感染リスク、アレルギー反応など、改善すべき問題が指摘されている。それらの問題を解決するために、マイクロニードル技術を利用した「マイクロニードル止血シート(microneedle hemostatic sheet: MHS)」を新たに開発した。MHSは、生体内分解性ポリマー製(ポリ乳酸 poly(lactic acid): PLA)で、マイクロニードルによりシートと組織を摩擦力で固定する。また組織の曲面に追従可能な柔軟性に優れたメッシュ構造になっている。

本研究では、MHSの止血効果、留置後の長期病理学的変化およびブタ心臓への応用を検討した。

【方法】

1) MHSによる止血効果の検討

無菌の8週齢の雄BALB/cマウスに維持麻酔を行ったのち、肝臓を露出した。メス刃を使用し幅2mm x 深さ2mmの創傷を作成した。出血を確認後、MHSを創傷部に留置した(MHS群、n=12)。またマイクロニードルのないメッシュシートを創傷に静置した群(メッシュシート群、n=12)、および創傷のみ作製した対照群(sham群、n=12)を作成し、出血時間を各群で比較した。

2) MHSの柔軟性の効果

臓器の曲面に追従可能か、MHSの柔軟性を測定し、サージカルテープと比較検討した。測定にはJIS基準に準じた見かけのヤング率を用いた。MHS群(n=5)、マイクロニードル付き厚さ200 μ mのポリ乳酸製の平面シート群(平面シート群、n=5)、サージカルテープを2枚貼りあわせたもの(サージカルテープ群、n=5)の見かけのヤング率を測定し、比較検討した。

3) MHS留置後の病理学的変化の検討

1)の検討後、閉腹し飼育した。3、8、18、および30週後に再び開腹し、マウスを安楽死させ肝臓を切除した(各群n=3)。通常の方法で前処理を行った後、マイクロニードルを含む厚さ6 μ mの切片を切り出した。ヘマトキシリンエオシン(H&E)染色を行った。単位面積あたりのコラーゲン量を評価するためマッソントリクローム染色を行った。また抗マウスマクロファージ抗体(Anti F4/80 antibody)を用い、単位面積あたりのマクロファージ浸潤を評価した。

4) ヒト大動脈への留置及び、光干渉断層法によるMHSの観察

MHSが大動脈の外膜側、内膜側、wetな状態下、動脈硬化性病変の存在下で固定可能かを観察した。また病理組織標本作成前の状況下でのMHSの固定様式の観察を行った。

5) ブタ冠動脈バイパス手術モデルでの検討

人の心臓サイズに近似するブタモデルでパイロット研究を行った。心臓外科医によりon-pumpバイパス手術

が施行された後、メス刃を利用して左心室壁に3箇所貫壁性切創を作成し出血を確認した。引き続き1つ目の切開部位にMHSを留置し、2つ目は何も止血処置しないコントロールとして用い、最後の一つはMHSを先に留置し通常のガーゼ圧迫を加えた。MHSは、約8mm×10mmの長方形に切り出し鑷子および用手的に心室壁に留置した。

【結果】

1) MHSによる止血時間の検討結果

MHSの出血時間は、メッシュシート群およびsham群と比較して有意に短縮していた(MHS群 6.2 [2.8–13.3]秒 vs メッシュシート群 35.4 [25.3–50.2]秒 vs sham群 59.5 [37.4–6.6]秒, $p=0.00001$)。Steel-Dwass テストを用いた多重検定結果では、マイクロニードルシート群の出血時間は他の群の出血時間よりも短く(MHS vs メッシュシート群, $p=0.001$ 、MHS vs sham群, $p=0.001$)、メッシュシート群とsham群の間で有意差を認めなかった($p=0.36$)。

2) MHSの柔軟性測定の結果

MHSは平面シート群と比較して、優れた柔軟性を示した(MHS 0.881 ± 0.20 MPa vs. 平面シート群 2.356 ± 0.92 MPa, $p=0.03$)。一方MHS群とサージカルテープ群では同等の柔軟性を示した(MHS 0.881 ± 0.20 MPa vs. サージカルテープ群 0.887 ± 0.07 MPa, $p=0.999$)。

3) MHS留置後の病理学的変化の検討結果

肉眼的にMHSは3週間で分解し始め、30週間でほとんど見えなくなった。HE染色では3週目でマイクロニードル周辺に炎症性細胞浸潤が見られ、8週目ではマイクロニードルの基底部周辺だけに認められた。18週間でシートの格子のみが観察され、30週目では格子は肝細胞にとり囲まれていた。単位面積あたりのマクロファージ数は、3週目でMHS群はsham群より低い傾向で(4.7 [39.4–45.7] vs 56.3 [45.7–70.0], $p=0.07$)、8週目では逆に多くなっていた(778.2 [500.7–887.7] vs 369.1 [337.0–413.3], $p=0.02$)が、18週目で有意差がなくなった。コラーゲン繊維は、3週間後にマイクロニードルの周囲に認められ、格子を囲んでいた。各時点でのMHS群の単位面積あたりのコラーゲン量は、各時点でsham群のそれよりも有意に大きかった。

4) ヒト大動脈への留置及び、光干渉断層法によるMHSの観察結果

ヒト大動脈サンプルの内膜側と外膜側にリン酸緩衝生理食塩水に浸し、それぞれMHSを留置しつつまみあげたが、MHSは留置されたままであった。また光干渉断層法で大動脈サンプルとその上に留置されたMHSを確認した。MHSは大動脈内膜側の湾曲に沿い、追従していた。またマイクロニードルは組織に刺入しており、周辺組織を押し広げていた。石灰化を伴う動脈硬化性病変の存在下でもマイクロニードルは大動脈外膜側に固定されていることが確認できた。

5) ブタ左心室壁モデルでの検証結果

MHSは拍動下のブタ左心室壁に容易に取り付けられた。MHSは、外科医の止血技術であるガーゼ圧迫時の滑らない足場として機能することが確認できた。

【考察】

本研究では、マイクロニードル技術に基づく生分解性止血シートという新しいコンセプトを実証し、その病理学的変化を確認した。メッシュシート群およびsham群と比較して、MHSはマウス肝臓創傷モデルの出血時間を短縮した。この知見は、マイクロニードル自体が止血プロセスにおいて重要な役割を果たしていることを示唆する。MHS静置後30週目でMHSは肉眼的に分解吸収されていたが、PLA製冠動脈ステントが移植後約8か月で吸収されたという研究結果と一致していた。MHS群の3週間での単位面積あたりのマクロファージ数は、sham群より低い傾向で、8週間で逆転したことから2つの異なる創傷治癒プロセスの存在が示唆された。MHS留置初期では、MHS群では、MHSによる機械的止血が加わったことで、sham群と比較し軽度な創傷ダメージとなり、その結果炎症も軽度になったが、引き続きPLAの生体吸収反応が起きたため、単位面積あたりのマクロファージ数はsham群と逆転したものと考えられた。MHSは柔軟で、組織追従性に

優れ、ヒト体腔内での局所止血に対し、外科的治療、血管内治療での応用が期待される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年12月16日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行なった。

現在様々な止血製品が利用されているが、それらの製品は感染リスクなど改善すべき問題がある。それらを解決すべく、学位申請者らはマイクロニードル技術を利用した「マイクロニードル止血シート (microneedle hemostatic sheet: MHS)」を開発した。MHSは、生体内分解性ポリマー (ポリ乳酸) 製で、組織曲面に追従し、柔軟性に優れたメッシュ構造になっている。

本論文は、MHSの止血効果、留置後の長期病理学的変化、およびブタ心臓への応用を検討したものである。マウス肝臓にメス刃で2mm x2mmの創傷を作成し、MHSを創傷部に留置した群(n=12)、マイクロニードルのないメッシュシートを静置した群(n=12)、対照群(n=12)で、出血時間を各群で比較した。MHSの出血時間は、メッシュシート群、sham群と比較し有意に短縮していた。この知見はマイクロニードル自体が止血プロセスにおいて重要な役割を果たしていることを示唆する。

次に臓器の曲面に追従可能か、JIS基準に準じた見かけのヤング率を用い、MHSの柔軟性が検討された。MHS群(n=5)、マイクロニードル付きの同じ厚さのポリ乳酸製平面シート群(n=5)、サージカルテープを2枚貼りあわせた群(n=5)の見かけのヤング率を測定し、比較検討した。MHSは平面シート群と比較して優れた柔軟性を示した。MHS群とサージカルテープ群では同等の柔軟性を示した。

そして、MHS留置後の3、8、18、30週後に肝臓を切除し(各群n=3)病理学的変化の検討を行った。HE染色、MT染色、及びまた抗F4/80抗体にて単位面積あたりのマクロファージ浸潤を評価した。肉眼的にMHSは3週間で分解し始め、30週間で殆ど可視不能となる。単位面積あたりのマクロファージ数は、3週目でMHS群はsham群より低い傾向で、8週目では逆に多くなっていた。これらは、2つの異なる創傷治療プロセスの存在が示唆された。MHS留置初期では、MHS群では、MHSによる機械的止血が加わったことで、sham群と比較し軽度な創傷ダメージとなり、その結果炎症も軽度になったが、引き続きポリ乳酸の生体吸収反応が起きたため、単位面積あたりのマクロファージ数はsham群と逆転したものと考えられた。MHSがヒト大動脈の内外面側、動脈硬化性病変の存在下で固定可能か光干渉断層法を用い、固定様式の観察を行った。MHSは大動脈内面側の湾曲に沿い、追従した。マイクロニードルは組織に刺入しており、周辺組織を圧迫していた。石灰化を伴う動脈硬化性病変の存在下でもマイクロニードルは大動脈外面側に固定されていることが確認された。さらに人の心臓サイズに近似するブタモデルでパイロット研究を行ったが、MHSは、通常の止血技術であるガーゼ圧迫時の滑らない足場として機能することが確認できた。

以上、本論文は、マイクロニードル技術に基づく生分解性止血シートという新しいコンセプトを実証し、その病理学的変化を報告したものである。MHSは柔軟で、組織追従性に優れ、ヒト体腔内での局所止血に対し、外科的治療、血管内治療での応用が期待され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第623号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	野口 智子		
学位論文の題目	Comprehensive Gene Mutation Profiling of Circulating Tumor DNA in Ovarian Cancer: Its Pathological and Prognostic Impact. (卵巣癌における血中循環腫瘍 DNA による遺伝子変異プロファイリングと臨床病理学的因子や予後との関連)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 井筒 一彦

論文内容の要旨

【背景】

卵巣癌は半数以上がⅢ/Ⅳ期で診断され、婦人科癌の中で最も死亡者数が多い疾患である。卵巣癌の基本的治療は手術療法と化学療法であるが、進行症例で完全切除が困難である場合は術前化学療法(NAC: Neoadjuvant chemotherapy)後に、減量手術を行うこともある。卵巣癌の分野においては他の固形癌と比べて、個々の癌遺伝子プロファイルに合わせた Precision medicine の研究が遅れており、新規バイオマーカーの開発が急務である。これまで腫瘍組織を用いた遺伝子変異解析は行われてきたが、進行卵巣癌では組織採取が困難であることも多い。近年のがんゲノム医療において、低侵襲で繰り返し採取可能な血中循環腫瘍由来 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) を用いた Liquid biopsy による遺伝子解析が注目されている。また遺伝子変異数の指標である TMB(Tumor Mutation Burden)が免疫チェックポイント阻害薬の指標として知られており、血中 ctDNA を用いた blood TMB (bTMB)の有用性が着目されている。本研究では、卵巣癌患者の血液検体を用いて、超高感度次世代シーケンサー法である CAPP-seq (cancer personalized profiling by deep sequencing)による ctDNA の網羅的遺伝子変異解析を行い、臨床病理学的因子や予後との相関、および治療モニタリングの有用性について検討を行った。

【方法】

1. 対象

当院にて2017年5月～2020年3月までに治療した卵巣癌51例(初回手術症例:35例、NAC症例:16例)を対象とした。Stage Iは15人、Stage IIは5人、Stage IIIは23人、Stage IVは8人であった。組織型別では、高異型度漿液性癌は24人、明細胞癌は13人、類内膜癌は5人、粘液性癌が3人、その他は6人であった。本研究は和歌山県立医科大学の倫理委員会(承認 No.2025)および共同研究施設である近畿大学医学部の倫理委員会(承認 No.29-066)の承認を得ており、インフォームドコンセントを行い、文書にて同意を得ている。

2. cell-free DNA(cfDNA)抽出と遺伝子変異解析

治療前および一部の患者は治療中および治療後に cell-free DNA collection tubes を用いて採取し、1800g で5分間遠心し、分離した血漿4mlから AVENIO cfDNA isolation kit(Roche Diagnostics)を用いて DNA 抽出を行った。抽出した ctDNA は AVENIO ctDNA surveillance kit を用いてライブラリー調整を行い、Illumina NextSeq 500(Illumina, San Diego, CA, USA)にて解析を行い、197の標的領域の非同義体細胞変異、挿入、コピー数多型、融合領域の変異頻度を定量化した。

3. 腫瘍組織 DNA 抽出と遺伝子変異解析

手術時に摘出した腫瘍組織を AllPrep DNA/RNA FFPE kit(Qiagen)を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA は50種類の癌遺伝子を標的とする Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel (CHPv2)(Thermo Fisher Scientific)を用いてライブラリー調整を行い、Ion Torrent S5 instrument (Thermo Fisher Scientific)にて解析を行った。

4. 統計学的解析

統計はすべて JMP を用いて行った。群間比較は、Mann-Whitney U test または Kruskal-Wallis test

を用いた。無増悪生存期間 (Progression Free Survival:PFS) は、Kaplan-Meier 法にて解析、ログランク検定を用いた。P<0.05 を統計学的に有意差ありとした。

【結果】

1. 卵巣癌 51 例の血中 ctDNA の網羅的遺伝子変異解析

48 例(94%)に何らかの非同義体細胞変異を認めており、*TP53*(37.3%)、*APC*(17.6%)、*KRAS*(15.7%)、*EGFR*(13.7%)、*MET*(11.8%)、*PIK3CA*(11.8%)、*NPAP1*(11.8%)、*ALK*(9.8%)などを検出できた。組織型別にみると、高異型度漿液性癌では *TP53*(16/24, 66.7%)、明細胞癌では *APC*(4/13, 30.8%)、類内膜癌は *PIK3CA*(2/5, 40%)、粘液性癌では *KRAS*(2/3, 66.7%)が最も頻度の高い遺伝子変異であった。

2. 血中 ctDNA と腫瘍組織 DNA 間の遺伝子変異の一致の検討

高異型度漿液性癌症例のうち血液検体と腫瘍組織を採取できた 22 例を対象に、最も検出頻度の高かった *TP53*変異の一致について検討した。腫瘍組織 DNA で *TP53*変異を検出できた症例は 16/22(72%)であり、そのうち ctDNA においても同じ変異を検出された症例は 13/16(81%)であった。

3. cfDNA 濃度と臨床進行期分類/組織型との関連の検討

cfDNA 濃度の中央値は 2451 copies/ml であった。StageIVは Stage I に比べて有意に cfDNA 濃度が高かった(p<0.01)。組織型では有意差はなかった。

4. bTMB と臨床進行期分類/組織型との関連の検討

今回、bTMB は 1Mb あたりの非同義体細胞変異数とした。bTMB の中央値は 12.62/Mb であり、組織型や進行期による有意差はなかった。

5. ctDNA 遺伝子プロファイルと予後との関連の検討

予後因子の検討を行うため追跡できた 49 例を対象に cfDNA 濃度、病的変異の有無、bTMB を項目として検討を行った。全症例と進行期症例(III/IV期のみ)において、cfDNA 濃度が高い症例(≥2451copies/ml)は低い症例に比べて PFS が有意に短縮していた(p=0.01,0.005)。全症例において、何らかの病的変異が検出された症例は、未検出の症例に比べて PFS が有意に短縮していた(p=0.048)。bTMB は予後との関連は認めなかった。

6. NAC 症例の ctDNA 解析の治療モニタリングの有用性について検討

NAC 前後で血液検体を採取できた代表的な 2 症例について解析した。症例 1 は 42 歳、卵巣癌 Stage III C 期に対して NAC 3 コースを行い、NAC 反応良好症例であった。NAC 前の血中 ctDNA では、*TP53 R248W*が検出されていたが、治療効果とともに *TP53 R248W*が未検出となった。以後、病状が増悪するとともに、*TP53 R248W*が再度検出され、アレル頻度が再上昇していた。症例 2 は 59 歳、卵巣癌 III C 期に対して NAC 予定となり、NAC 前の血中 ctDNA では *TP53 E286K*, *V216M* を検出した。NAC3 コースまでは NAC 反応良好であったが、NAC5 コース後、治療抵抗性となり腫瘍が増大するに伴って、ctDNA では *TP53 E286K* のアレル頻度は減少していたが、*TP53 V216M* のアレル頻度は上昇していた。

【考察・結語】

卵巣癌において血中循環腫瘍 DNA を用いた CAPP-seq による組織型別の遺伝子変異プロファイリングが可能であることを示した。また化学療法前後の遺伝子プロファイルの変化(クローン進化)を検出でき、治療モニタリングにも有用である可能性を示した。本研究結果は、今後の卵巣癌の新規治療戦略としての Liquid biopsy を用いた Precision Medicine の開発へと繋がることが期待される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年1月15日、20日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。卵巣癌は半数以上が進行期で診断され、婦人科癌の中で最も死亡者数が多い疾患であり、新規バイオマーカーの開発が急務である。近年、低侵襲で繰り返し採取可能な血中循環腫瘍由来DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) を用いた Liquid biopsy による遺伝子解析が注目されている。組織採取不可能な進行・再発がんでは Liquid biopsy が有用であり、腫瘍内不均一性や治療による遺伝子プロファイルの変化(クローン進化)を反映できることが期待されている。本研究では、卵巣癌患者の血液検体を用いて、超高感度次世代シーケンサー法である CAPP-seq による ctDNA の網羅的遺伝子変異解析を行い、臨床病理学的因子や予後との相関、および治療モニタリングの有用性について検討を行った。卵巣癌 51 例（初回手術症例：35 例、術前化学療法(NAC)症例：16 例）の治療前および一部の患者は治療中および治療後の血液検体より DNA を抽出し、ライブラリー調整を行い、Illumina NextSeq 500 にて解析を行った。51 例中、48 例(94%)に何らかの非同義体細胞変異を認めていた。組織型別にみると、高異型度漿液性癌では *TP53* (66.7%)、明細胞癌では *APC* (30.8%)、類内膜癌は *PIK3CA* (40%)、粘液性癌では *KRAS* (66.7%) が最も頻度の高い遺伝子変異であった。高異型度漿液性癌の症例で、組織 DNA と ctDNA で *TP53* の変異を比較したところ、腫瘍組織 DNA で *TP53* 変異を検出できた症例は 16/22(72%)であり、そのうち ctDNA においても同じ変異を検出された症例は 13/16(81%)であり、高い一致率を示した。49 例を対象に cfDNA 濃度、病的変異の有無、bTMB (blood Tumor Mutation Burden) を項目として予後因子の検討を行った。全症例と進行期症例(III/IV期のみ)において、cfDNA 濃度が高い症例 (≥ 2451 copies/ml) は低い症例に比べて PFS が有意に短縮していた。全症例において、何らかの病的変異が検出された症例は、未検出の症例に比べて PFS が有意に短縮していた。bTMB については PFS との相関は認めなかった。NAC 症例では、化学療法前後での遺伝子変異のアレル頻度の変化や、化学療法抵抗症例ではクローン進化をとらえることができた。以上より卵巣癌において ctDNA を用いた CAPP-seq による組織型別の遺伝子変異プロファイリングが可能であり、また治療前後での治療モニタリングやクローン進化の検出に有用であることが示された。本研究結果は、今後の卵巣癌の新規治療戦略としての Liquid biopsy を用いた Precision Medicine の開発へと繋がることが期待され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第624号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	橋本 大輝		
学位論文の題目	Dynamic erectile responses of a novel penile organ model utilizing two photon excitation microscopy (TPEM) (陰茎海綿体動態解析のための二光子顕微鏡を用いた新規培養系の樹立)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 平井 秀一	教授 山田 源

論文内容の要旨

【緒言】

男性器の重要な機能の一つとして勃起機能があり、その異常である勃起不全(Erectile dysfunction; ED)の患者数は、生活習慣病や社会の高齢化などから近年増加している。しかしながら海綿体に関する研究は、大動物を用いた電気生理学的実験等が主体であり、その構造と動態に関する研究は、乏しい状況である。本研究では、海綿体及びその構成成分であるシヌソイドについて動態解析を行った。シヌソイドは、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞など様々な細胞群を含むが、協調して組織構造が変化する収縮/弛緩の動態についての適切な実験系が存在しなかった。本研究では、陰茎海綿体から微小な組織片(explant)を作成し、二光子顕微鏡や実体顕微鏡による time-lapse 撮影を行うことで、勃起時のシヌソイドの動態解析を行った。収縮/弛緩に関連するとされていた外来性因子を添加し、それらによる動態変化を解析した。また F-actin を可視化するトランスジェニックマウスである Lifeact-EGFP マウスを応用し、収縮/弛緩時の主要な細胞骨格成分である F-actin 陽性細胞の機能解析を行った。さらに複数回の収縮/弛緩反応を誘導することが今回の in vitro 系に於いて可能であるため、これらの連続した収縮/弛緩反応が細胞の応答に如何なる影響を与えるのかについても qPCR 解析を行った。

【材料及び方法】

実験動物

8週齢の雄 ICR マウス(日本クレア) また Lifeact-EGFP トランスジェニックマウスを頸椎脱臼により安楽死処分後、顕微鏡下にて陰茎海綿体を分離し、断片化した。

組織学的解析

陰茎組織を4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定後にパラフィン組織切片を作成した。免疫染色間接法を用いて CD31 (血管内皮), ACTA2 (平滑筋), NG2 (周皮細胞) の染色を行った。

陰茎海綿体の組織培養及び収縮/弛緩反応誘導

分離した陰茎海綿体を Matrigel にてガラスボトムディッシュに接着後 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 中で組織を培養した。

陰茎海綿体の収縮には、フェニレフリン (PE) を最終濃度 1 μ M で添加し、弛緩誘導には sodium nitroprusside (SNP) を最終濃度 100 μ M で添加した。

また PDE5 阻害剤添加実験には tadalafil (薬剤名シアリス) を最終濃度 30 nM で添加した。

Time-lapse 撮影

陰茎海綿体の動態解析には実体顕微鏡 Leica M165FC を用いて撮影間隔 10 秒で撮影を行った。またシヌソイドの動態解析は、京都大学 平島剛志講師の協力のもとで二光子顕微鏡 Olympus FV1200MPE-IX83 を用いて行った。

定量的リアルタイム PCR

収縮/弛緩反応を5回繰り返した陰茎海綿体から RNA を抽出し、低酸素マーカー遺伝子である Hif1a, Gpx1, Sod1、収縮弛緩のマーカー遺伝子である RhoA, Rock1, Rock2 を対象に PCR 反応及び定量化を行った。内在性コントロールとして Gapdh を用いた。

【結果】

1. 組織学的解析により、シヌソイドがマウス海綿体周辺の白膜 (tunica) 領域近傍に多数存在することが明らかとなった。
2. 収縮/弛緩及びシヌソイドの動態を解明する為に PE 及び SNP による収縮/弛緩反応の誘導により、陰茎海綿体が *in vitro* において収縮/弛緩することを観察した。
3. 二光子顕微鏡によるシヌソイドの動態解析では tunica 領域付近のシヌソイドが、収縮/弛緩反応を顕著に示すことが明らかとなった。また Lifeact-EGFP 陽性細胞は、海綿体内に不均一に存在していた。
4. Tadalafil の添加は、SNP による陰茎海綿体の弛緩反応を増強した。
5. 低酸素ストレス応答遺伝子である Hif1a, Gpx1 や収縮関連遺伝子である RhoA, Rock1, Rock2 遺伝子について、複数回の収縮/弛緩反応によりそれらの発現が有意に上昇した。

【考察】

本研究では、シヌソイドが陰茎外周付近に多く分布していることを見出された。従来から、tunica 領域には勃起時の陰茎内圧上昇制御の為に静脈閉塞の機能があると考えられており、本実験の結果からも海綿体外周の tunica 近傍が勃起に重要な働きを果たしていると推察された。よってこれらの領域における組織の異常は、シヌソイドの動態に影響を与えると推察される。本研究で樹立した培養系では PE や SNP などの外来因子を添加することで陰茎海綿体の収縮/弛緩が *in vitro* で誘導された。さらに tadalafil の添加により SNP 誘導性の弛緩反応が増強された。このことは、本培養系が海綿体の動態解析に有効であり、勃起過程に作用する薬剤の評価にも潜在的に有用であることを示唆していた。二光子顕微鏡を用いた詳細な組織構造変化の解析では、tunica 領域近傍のシヌソイドが収縮/弛緩反応を示した。中心動脈からラセン動脈を介して陰茎外周近傍に存在するシヌソイドに血液が供給されると従来示されている。Lifeact-EGFP 陽性細胞が全てのシヌソイドに分布していないことやその動きが一樣でないことからシヌソイドの動態は海綿体内で一樣ではないと推察された。本実験系において収縮/弛緩時に増減する因子の解析を行うために定量的 PCR 解析を行った。遺伝子発現解析により、収縮/弛緩の繰り返しによる低酸素マーカーや収縮弛緩関連遺伝子の発現が誘導されていることが判明した。

【結語】

本研究で樹立された陰茎海綿体組織培養系は、PE や SNP による収縮/弛緩反応誘導が可能であるだけでなく、tadalafil などの薬剤添加により弛緩機能の増強を評価することができる。また収縮/弛緩反応時のシヌソイドなどの微細構造の変化を観察することが可能であり、レポーターマウスを組み合わせることでシヌソイドの外来性因子に対する応答やその動態解析への今後の貢献が期待された。近年、プロスタグランジンを含め海綿体に直接作用する薬剤も報告されており、本実験系は、局所で作用する物質のスクリーニングについても応用できると推察された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和3年2月19日及び22日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

男性器の重要な機能として勃起機能があり、その異常である勃起不全 (Erectile dysfunction; ED) の患者は、高齢化社会と関連して近年増加している。勃起を担う器官である海綿体は、様々な細胞群を含有する大小様々なシヌソイドと呼ばれる類洞構造を有している。これまでに海綿体の組織構造が変化する収縮/弛緩の動態を解析することのできる実験系が存在しなかった。

本研究では、陰茎海綿体より組織片 (explant) を作成し、二光子顕微鏡や実体顕微鏡による time-lapse 撮影を行うことで、勃起時のシヌソイドの動態解析を行った。収縮/弛緩に関連するとされていた外来性因子 (フェニレフリン、ニトロプルシド) を添加し、その後の動態変化を解析した。また F-actin

を可視化するトランスジェニックマウスである **Lifect-EGFP** マウスを用いて、収縮/弛緩時の主要な細胞骨格成分である **F-actin** 陽性細胞の機能解析を行った。さらに複数回の収縮/弛緩反応を誘導することが本実験系において可能であるため、これらの連続した収縮/弛緩反応が細胞の応答に如何なる影響を与えるのかについて定量的 PCR 法により解析を行った。

本研究で樹立した培養系ではフェニレフリンやニトロプルシドなどの外来因子を添加することで陰茎海綿体の収縮/弛緩が誘導された。さらに ED 治療薬としても知られる **tadalafil** の添加によりニトロプルシド誘導性の弛緩反応が増強された。このことは、本培養系が海綿体の動態解析に有効であり、勃起過程に作用する薬剤の評価にも潜在的に有用であることを示唆していた。

二光子顕微鏡を用いた組織構造変化の解析では、海綿体 **tunica** 領域近傍のシヌソイドが収縮/弛緩反応を示した。また **Lifect-EGFP** 陽性細胞が全てのシヌソイドに分布していないことやその動きが一樣でないことからシヌソイドの動態は海綿体内で一樣ではないと推察された。

遺伝子発現解析により、収縮/弛緩の繰り返しによる低酸素マーカーや収縮弛緩関連遺伝子の発現が誘導されていることが判明した。

本論文で樹立された陰茎海綿体組織培養系は、収縮/弛緩反応時のシヌソイドなどの構造の変化を観察することが可能であり、レポーターマウスを組み合わせることでシヌソイドの外来性因子に対する応答やその動態解析が可能となった。また局所で作用する物質のスクリーニングについても応用が期待され、博士學位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第625号		
学位授与の日	令和3年3月17日		
氏名	寺田 幸誠		
学位論文の題目	NIRS-IVUS for Differentiating Coronary Plaque Rupture, Erosion and Calcified Nodule in Acute Myocardial Infarction		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 鈴木 啓之	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

緒言

【背景】

急性冠症候群の多くは、プラーク破綻(plaque rupture : PR), プラークびらん(plaque erosion : PE), 石灰化結節(calcified nodule : CN)から起こることが知られている。PRは、大きな脂質コア(necrotic core)の上にある薄い線維性被膜の破綻から起こる。PEは、内皮が欠落することで起き、厚い線維性被膜、脂質成分の乏しいプラークが特徴である。さらに、CNは、石灰化プレート上の線維性被膜の破綻により起こる。以上より、病理学的に3群間にはプラーク形態、組織性状に大きな違いがある。

これまでに、光干渉断層法(optical coherence tomography : OCT)による急性冠症候群の成因把握に関する報告がなされている。しかし、OCTでは血栓の存在下では近赤外線シグナルが減衰するため描出が不良で、実臨床では急性冠症候群の成因把握は必ずしも容易とは言えないのが現状である。今回、OCTによる分類をもとに、新たな血管内イメージングである近赤外線スペクトロスコピー血管内超音波(near-infrared spectroscopy intravascular ultrasound : NIRS-IVUS)によって急性心筋梗塞の成因把握の精度を検証した。

【方法】

急性心筋梗塞症例(n=244)の冠動脈責任病変をOCTとNIRS-IVUSで観察した。244例のうち、初めの156例をOCTにより急性冠症候群成因をOCT-PR、OCT-PE、OCT-CNの3群に分類した。3群間でのNIRS-IVUS結果を比較した。さらに結果をもとに3群を分類するアルゴリズムを作成した。続いて、88例を用いて上記アルゴリズムの診断精度を検証した。

【結果】

上記の定義をもとに急性心筋梗塞156例は、OCT-PR群112例(72%)、OCT-PE群29例(19%)、OCT-CN群15例(10%)に分類された。患者背景では、OCT-PE群の患者年齢が有意に若年であったことを除いて同様であった。冠動脈造影結果では、OCT-CN群で高度石灰化を認めることを除いて同様であった。IVUS結果では、プラーク空洞病変はOCT-PRのみに、内腔に突出する石灰化病変はOCT-CN群15例中14例に認め、特異的であった。また、OCT-PR群ではプラーク断面積(plaque burden)が大きく、陽性remodelingを高頻度に認めた。NIRSにて産出される、脂質含有量の指標であるmaximum lipid-core burden index 4 mm (max LCBI 4mm)値を比較した。OCT-PR群 vs OCT-PE群 vs OCT-CN群: 705 [IQR: 545 to 854], 300 [IQR: 126 to 357], 355 [IQR: 303 to 478], $p < 0.001$ と、3群間で有意差を示した。さらに、Gray-scale IVUSで識別の困難なOCT-PRとPEを識別するためのmax LCBI 4mm値のカットオフを426とすると感度92%、特異度97%であった。上記の結果をもとに内腔に突出した石灰化病変、プラーク空洞病変、そしてmax LCBI 4mm値を用いたNIRS-IVUSアルゴリズムを作成した。上記アルゴリズムでは急性心筋梗塞の患者にNIRS-IVUSを施行し、内腔に突出した石灰化病変を認めた場合、NIRS-IVUS-CNと分類した。続いて、プラーク空洞病変を認めた場合には、definite NIRS-IVUS-PRと分類した。そして、両者を認めず、max LCBI 4mm値が426より高値であった場合、probable NIRS-IVUS-PRに分類した。どれにも属さないものをNIRS-IVUS-PEとした。OCTによる分類をリファレンスとした場合のNIRS-IVUSアルゴリズムの診断精度を検証した。

NIRS-IVUS-PRの感度97%、特異度96%、NIRS-IVUS-PEの感度93%、特異度99%、NIRS-IVUS-CN

の感度 100 %、特異度 99 %と、3 群を高精度に識別することが可能であった

【結論】

NIRSにより得られる max LCBI 4 mm 値は OCT-PR 群で最も大きく、OCT-CN 群、OCT-PE 群と 3 群間で有意に異なった。NIRS-IVUS を用いてプラーク空洞形成、内腔に突出する石灰化病変、max LCBI 4 mm 値を用いた NIRS-IVUS アルゴリズムによって急性冠症候群の成因を高精度に識別することが可能であった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 3 年 2 月 18 日、22 日、24 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

【背景】

急性冠症候群の多くは、plaque rupture : PR、plaque erosion : PE、calcified nodule : CN から起こる。病理学的にプラーク形態、組織性状に違いがある。これまでに optical coherence tomography : OCT による急性冠症候群の成因把握に関する報告がなされている。しかし、OCT では血栓の存在下では近赤外線シグナルが減衰するため描出不良で、実臨床では急性冠症候群の成因把握は容易とは言えない。本論文は、OCT による分類をもとに、新たな血管内イメージングである近赤外線スペクトロスコーピー血管内超音波(near-infrared spectroscopy intravascular ultrasound : NIRS-IVUS)によって急性心筋梗塞の成因把握の精度を検証した。

【方法】

急性心筋梗塞症例(n= 244)の冠動脈責任病変を OCT と NIRS-IVUS で観察した。244 例のうち、初めの 156 例を OCT により急性冠症候群成因を OCT-PR、OCT-PE、OCT-CN の 3 群に分類した。3 群間での NIRS - IVUS 結果を比較した。結果をもとに 3 群を分類するアルゴリズムを作成した。続いて、88 例を用いて上記アルゴリズムの診断精度を検証した。

【結果】

上記の定義をもとに急性心筋梗塞 156 例は、OCT-PR 群 112 例(72%)、OCT -PE 群 29 例(19%)、OCT-CN 群 15 例(10%)に分類された。IVUS 結果では、プラーク潰瘍病変は OCT-PR のみに、内腔に突出する石灰化病変は OCT-CN 群 15 例中 14 例に認めた。脂質含有量の指標である maximum lipid-core burden index 4 mm (max LCBI 4mm)を比較した。OCT-PR 群 vs OCT-PE 群 vs OCT-CN 群: 705[IQR: 545 to 854], 300[IQR: 126 to 357], 355[IQR: 303 to 478], p<0.001 と 3 群間で有意差を示した。さらに、Gray-scale IVUS で識別の困難な OCT-PR と PE を識別するための max LCBI 4mm 値のカットオフを 426 とすると感度 92 %、特異度 97 %であった。上記の結果をもとに内腔に突出した石灰化病変、プラーク潰瘍病変、そして、max LCBI 4mm 値を用いた NIRS-IVUS アルゴリズムを作成した。OCT による分類をリファレンスとした場合の NIRS-IVUS アルゴリズムの診断精度を検証した。NIRS-IVUS-PR の感度 97%、特異度 96%、NIRS-IVUS-PE の感度 93%、特異度 99 %、NIRS-IVUS-CN の感度 100 %、特異度 99%と、3 群を高精度に識別することが可能であった。

【結論】

NIRSにより得られる max LCBI 4mm 値は OCT-PR 群で最も大きく、OCT-CN 群、OCT-PE 群と 3 群間で有意に異なった。

NIRS-IVUS を用いてプラーク潰瘍病変、内腔に突出する石灰化病変、max LCBI 4 mm 値を用いた NIRS-IVUS アルゴリズムによって急性冠症候群の成因を高精度に識別することが可能であることを示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第992号		
学位授与の日	令和2年6月16日		
氏名	井澤 大輔		
学位論文の題目	Efficacy of Middle Meningeal Artery Embolization for Organized Chronic Subdural Hematoma. (器質化慢性硬膜下血腫に対する中硬膜動脈塞栓術の有効性)		
論文審査委員	主査	教授 加藤 正哉	
	副査	教授 伊東 秀文	教授 中尾 直之

論文内容の要旨

【緒言】

器質化慢性硬膜下血腫(OCS DH)に対する経動脈的中硬膜動脈(MMA)塞栓術は、通常慢性硬膜下血腫と異なり、まだ有効性を示した報告は無い。我々は、OCS DH に対する MMA 塞栓術を施行し、その有用性について検討したため報告する。

【方法】

2013年から2017年の期間で、穿頭血腫洗浄術(BHS)を行った慢性硬膜下血腫は、282例、314病変あり、このうちOCS DHと診断し、MMA塞栓術を施行したものは11例、14病変(4.5%)であった。OCS DHは、再発時の術中所見および、術後の画像所見で診断し、血腫除去ができなかった病変や、術後経過で3mm以上の血腫の再増大を認めた病変に対し塞栓術を施行した。これら14病変において、血腫腔の縮小効果として、完全に血腫が消退したものを完全消失、50%未満の残存血腫を認めるものを部分的縮小、50%以上残存しているものや血腫の縮小が得られなかったものを効果不十分と判定した。また、3mm以上血腫が縮小し始めるまでの期間や、治療合併症、再発抑制効果についても検討した。

【結果】

MMA塞栓術を施行した14例中、2病変で血腫の増大を認め、全身麻酔下での開頭血腫除去術を行った。1例は強い正中偏位を伴う厚い血腫で、もう1例は感染性硬膜下血腫であった。他の12病変では、MMA塞栓術後平均2.9週(2-4週)で血腫の縮小傾向を示し、8例で完全消失が得られ、4例は部分的縮小であった。また、これら12例ともに再増大なく経過し、治療合併症も認められなかった。

【考察】

局所麻酔下での中硬膜動脈(MMA)塞栓術は、器質化を伴わない難治性慢性硬膜下血腫に対しては、再発率が1.4-10.4%と、比較的良好な治療成績が多数報告されているが、OCS DHに対しては、その有効性を示した報告はない。今回の我々の研究では、血腫の縮小効果および再発予防効果を示した症例が14病変中で12病変に認められており、OCS DHに対するMMA塞栓術の有効性が期待できる結果であった。その要因として、まだ症候が軽度で、器質化の途中段階にある症例に対しMMA塞栓術を施行することで、微小出血に関連した血腫の増大過程を遅延させることができたためと考えた。そのため、残存血腫により重度の神経障害が認められている場合は、開頭血腫除去術を優先することが望ましい。

【結語】

器質化慢性硬膜下血腫であっても、MMA塞栓術により血腫の縮小効果や再発の予防効果が期待出来る。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年5月11日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、通常の慢性硬膜下血腫に対して治療効果を認めている経動脈的中硬膜動脈塞栓術が、まだ治療報告のない器質化慢性硬膜下血腫(OCS DH)に対しても有用性を示すことを明らかにすることである。

2013年から2017年の期間で再発時の術中所見および、術後の画像所見でOCS DHと診断し、血腫除去ができなかったものや、術後経過で3mm以上の血腫の再増大を認めた12名(14病変)の患者を治療の対象とした。治療方法は経大腿または経上腕アプローチで経動脈的に中硬膜動脈へマイクロカテーテルを挿入し、polyvinyl alcohol particles または trisacryl gelatin microspheres で塞栓術を行った。治療の効果判定は血腫腔の縮小効果を3つに分類し、完全に血腫が消退したものを完全消失、50%未満の残存血腫を認めるものを部分的縮小、50%以上残存しているものや血腫の縮小が得られなかったものを効果不十分と判定した。また、3mm以上血腫が縮小し始めるまでの期間や、治療合併症、再発抑制効果についても検討した。本研究は和歌山県立医科大学臨床倫理委員会の承認を得ており、全ての対象者から治療説明の文書による同意を得ている。

結果は、中硬膜動脈塞栓術を施行した14病変のうち、2病変で塞栓術後も血腫の増大を認め、全身麻酔下での開頭血腫除去術を行った。うち一例は当初より強い正中偏位を伴う厚い血腫で、もう一例は感染性硬膜下血腫により強い正中偏位を伴う血腫であった。他の12病変では、中硬膜動脈塞栓術後より平均2.9週(2-4週)で血腫の縮小傾向を示し、8例で完全消失が、4例で部分的縮小が得られた。治療効果が得られた12例は、ともに経過中に再増大なく経過し、全被験者において周術期には手技関連合併症は認められなかった。今回の治療結果より、まだ症候が軽度で、器質化の途中段階にある症例に対し中硬膜動脈塞栓術を施行することで、微小出血に関連した血腫の増大過程を遅延させることができ治療効果が得られることが推測された。即ち、治療効果の発現に1-2週間を要するため、すでに高度の圧排を認める症例でなければ、器質化慢性硬膜下血腫においても中硬膜動脈塞栓術で血腫の縮小効果が期待出来ることが判明した。

本論文はOCS DHも、通常の慢性硬膜下血腫と同様に中硬膜動脈から栄養されていることを前提に、従来の開頭術よりも低侵襲な経動脈的中硬膜動脈塞栓術を行い、血腫の縮小効果が得られることが示された初めての報告であり、開頭術を行うことが困難な症例に対する新たな治療の可能性を示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第993号		
学位授与の日	令和2年7月21日		
氏名	徳留 なほみ		
学位論文の題目	Differential significance of molecular subtypes which were classified into EGFR exon 19 deletion on the first line afatinib monotherapy (EGFR exon 19 deletion の分子生物学的サブタイプのアファチニブ単剤療法に与える影響)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 村田 晋一	教授 山本 信之

論文内容の要旨

【緒言】

非小細胞性肺癌 (NSCLC) における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 遺伝子変異の9割を占めるエクソン19欠失変異 (del19) と L858R は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の効果予測因子であり、特に日本人症例の約半数がこれらの遺伝子変異を有している。そのうち、del19には欠失部位によりさまざまなバリエーションがあることが知られており、この欠失部位の違いは EGFR-TKI の作用部位である EGFR の構造変化をもたらすため、治療効果に影響を及ぼす可能性がある。2020年3月現在、日常臨床で用いられる EGFR-TKI には、第1世代のゲフィチニブとエルロチニブ、第2世代のアファチニブとダコミチニブ、第3世代のオシメルチニブの4剤がある。今回われわれは、NSCLC に対し、第2世代 EGFR-TKI であるアファチニブを投与し前向きにバイオマーカー研究を行う多施設共同試験の WJOG8114LTR の付随研究として、del19 の欠失サブタイプ別のアファチニブへの反応性の違いを検証した (UMIN ID: 000015847)。

【対象・方法】

未治療の病期 IIIB/IV の del19 と L858R を有する NSCLC に対し、アファチニブ 40mg を病勢進行または許容不能な有害事象が認められるまで投与した。並行して血漿中の腫瘍 DNA (cfDNA) を経時的に採取して EGFR 遺伝子変異の解析を行ない、さらに del19 症例の腫瘍組織から DNA を抽出して blocking-oligo dependent PCR 法を用いてバリエーションの解析を行ない、欠失サブタイプを分類した。

【結果】

WJOG8114LTR に登録した del19 は 29 例で、アファチニブの奏効率は 84.6% と良好であった。組織検体が利用可能であった 26 例の解析では del19 のバリエーションは 7 種類あり、p.E746_A750delELREA が最多で 65.4% を占めていた。これらのバリエーションをヌクレオチドの欠失数別や欠失の開始点となるコドン別などの欠失サブタイプに分類して検証した結果、15ヌクレオチドの欠失 (15n-del) / 18ヌクレオチドの欠失 (18n-del) / 欠失に挿入・塩基置換が加わった複雑型にそれぞれ 21 (80.8%) / 1 (3.8%) / 4 (15.4%) 例が分類された。このうち、15n-del は複雑型の症例と比較して有意に長い無増悪生存期間を示した ($p=0.0244$)。血漿中の EGFR 遺伝子変異の有無は今回の del19 のサブセットにおいては治療効果の予測には繋がらなかった。

【考察】 del19 の欠失部位の違いはアファチニブにおいても治療効果に影響を及ぼす可能性が示唆された。一方で治療効果が乏しい 15n-del 症例も存在するため、原因となる他の遺伝子変異の解析も必要と考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年6月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

非小細胞性肺癌（NSCLC）における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 遺伝子変異のエクソン 19 欠失変異 (del19) は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の効果予測因子である。del19 には欠失部位によりさまざまなバリエーションがあることが知られており、この欠失部位の違いは EGFR-TKI の作用部位である EGFR の構造変化をもたらすため、治療効果に影響を及ぼす可能性がある。本論文の目的は、第2世代 EGFR-TKI であるアファチニブを NSCLC 症例に投与し前向きにバイオマーカー研究を行う多施設共同試験の WJOG8114LTR の付随研究として、del19 の欠失サブタイプ別のアファチニブへの反応性の違いを検証することである。

方法として、未治療の病期 IIIB/IV の del19 と L858R を有する NSCLC 症例を対象とし、アファチニブ 40mg を病勢進行または許容不能な有害事象が認められるまで投与する WJOG8114LTR 研究 (図1) において、del19 症例の腫瘍組織から DNA を抽出して blocking-oligo dependent PCR 法を用いてバリエーションの解析を行ない、欠失サブタイプを分類した。並行して血漿中の腫瘍 DNA (cfDNA) を経時的に採取して EGFR 遺伝子変異の解析を行なった。

図1. West Japan Oncology Group [WJOG] 8114LTR

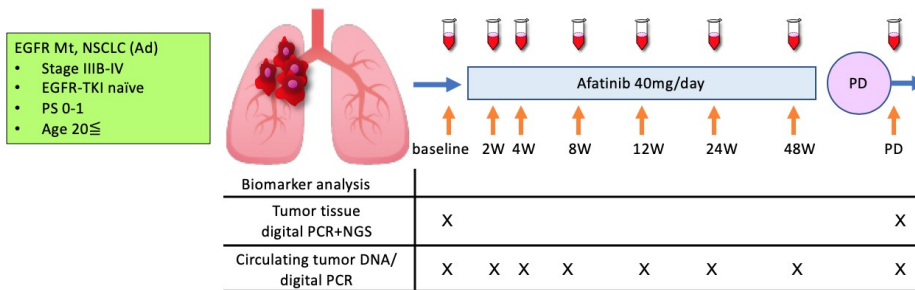


表1. Patient background (all patients)

		All patients (N=57)	tissue del19* (n=29)
Gender	Male	26 (45.6%)	16 (55.2%)
	Female	31 (54.4%)	13 (44.8%)
Age	Median (Range)	69 (37-78)	68 (37-77)
Stage	Postoperative recurrence	16 (28.1%)	13 (44.8%)
	III	2 (3.5%)	1 (3.4%)
	IV	39 (68.4%)	15 (51.7%)
Smoking history	Yes	21 (36.8%)	17 (58.6%)
	No	36 (63.2%)	12 (41.4%)
Performance status	0	24 (42.1%)	8 (27.6%)
	1	33 (57.9%)	21 (72.4%)

*exon 19 deletion

表2. Molecular subtype distribution of EGFR exon 19 deletion mutation (n=26)

Type of mutation (Amino Acid)	Type of mutation (Nucleotide)	Number of nucleotide deletion	Frequency (n=26)	COSMIC* ID	Number of COSMIC registered samples [#]
p.E746_A750delELREA	c.2235_2249del15 (Deletion)	15	13 (50.0%)	COSM6223	1106
p.E746_A750delELREA	c.2236_2250del15 (Deletion)	15	4 (15.4%)	COSM6225	528
p.E746_S752>V	c.2237-2255>T (complex)	Mixed ins/sub [§]	2 (7.7%)	COSM12384	70
p.E746_T751>I	c.2235-2252>AAT (complex)	Mixed ins/sub	1 (3.8%)	COSM13551	4
p.L747_T751delLREAT	c.2240_2254del15 (Deletion)	15	4 (15.4%)	COSM12369	134
p.L747_P753>S	c.2240-2257del18 (Deletion)	18	1 (3.8%)	COSM12370	174
p.S752_I759delSPKANKEI	c.2253-2276del24 (Deletion)	24	1 (3.8%)	COSM13556	9

*the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

[#]At 07/11/2018

[§]Mixed insertion/substitution

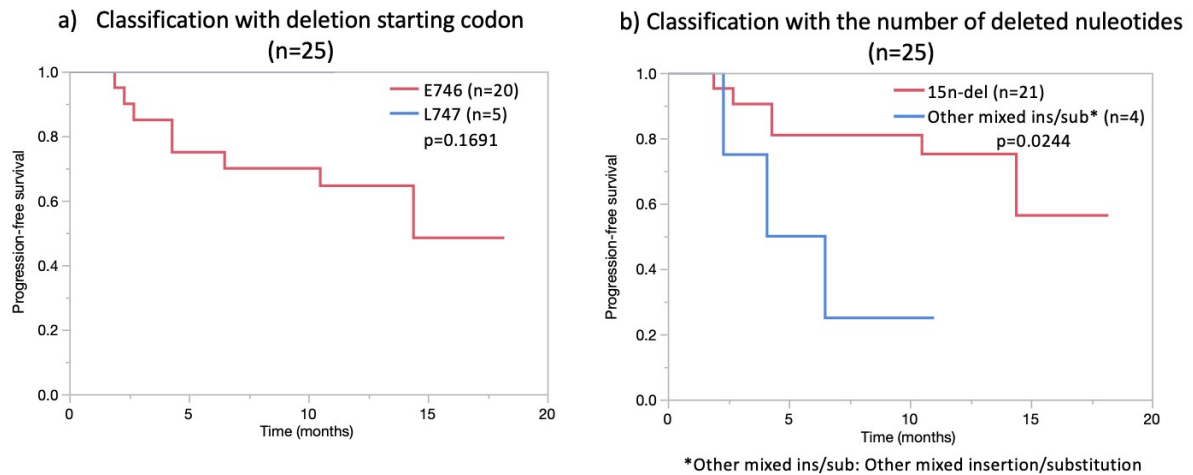
結果として、WJOG8114LTR 研究に登録された del19 症例 29 例のアファチニブの奏効率は 84.6%と良好であった。組織検体が利用可能であった 26 例の解析では del19 のバリエントは 7 種類あり、p.E746_A750delELREA が最多で 65.4%を占めていた (表 1,2)。これらのバリエントをヌクレオチドの欠失数別や欠失の開始点となるコドン別などの欠失サブタイプに分類して検証した結果、15ヌクレオチドの欠失(15n-del) /18ヌクレオチドの欠失(18n-del) /欠失に挿入・塩基置換が加わった複雑型にそれぞれ 21(80.8%)/1(3.8%)/4(15.4%)例が分類された (表 3)。

表3. Patient distributions according to exon 19 deletion molecular subtype classifications

		All del19 patients (n=26)
Number of nucleotide deletion	15-nucleotide deletion (15n-del)	21 (80.8%)
	18-nucleotide deletion (18n-del)	1 (3.8%)
	Other insertion/substitution (mixed ins/sub)	4 (15.4%)
Deletion starting codon	E746 group	20 (76.9%)
	L747 group	5 (19.2%)
	Non-LRE group	1 (3.8%)
LRE or non-LRE	LRE group	25 (96.2%)
	non-LRE group	1 (3.8%)
ELREA or not	ELREA group	17 (65.4%)
	non-ELREA group	9 (34.6%)

このうち、15n-del は複雑型の症例と比較して有意に長い無増悪生存期間を示した(p=0.0244) (図 2)。血漿中の EGFR 遺伝子変異の有無は今回の del19 のサブセットにおいては治療効果の予測には繋がらなかった。

図2. Progression-free survival for patients with exon 19 deletion according to different subtype classifications (n=25)



このことから、del19 の欠失部位の違いはアファチニブにおいても治療効果に影響を及ぼす可能性が示唆された。一方で治療効果が乏しい 15n-del 症例も存在するため、原因となる他の遺伝子変異の解析も必要と考えられる。

本論文は del19 の欠失部位の違いが EGFR-TKI の治療効果に影響を及ぼす可能性を第 2 世代 EGFR-TKI のアファチニブで治療を行った症例で検証した初の報告であり、del19 の欠失サブタイプが今後の治療選択の際に参考になる可能性があることを示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第994号		
学位授与の日	令和2年7月21日		
氏名	小向 賢一		
学位論文の題目	Effect of Atorvastatin Therapy on Fibrous Cap Thickness in Coronary Atherosclerotic Plaque as Assessed by Optical Coherence Tomography: The EASY-FIT Study (光干渉断層法を用いた冠動脈硬化性プラークの線維性被膜に対するアトルバスタチン治療効果の検討)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 加藤 正哉	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

スタチンはリポタンパク質と炎症マーカーを減少させ、心血管疾患の死亡率を低下させることが知られている。また急性冠症候群の二次予防において、高用量スタチン療法は低容量療法に比べ有益であることが証明されている。血管内超音波を用いた研究では、スタチンは動脈硬化の進展を抑制することが報告されている。血管内視鏡を用いた研究においても、スタチンによる冠動脈の黄色プラークの減少を認めており、プラーク形態や脂質成分に及ぼすスタチンの効果が注目されている。しかしながら、スタチン療法によるプラーク安定化の詳細な機序は十分に解明されていない。冠動脈プラークを覆う薄い線維性被膜は、プラークの脆弱性における主要因子である。近赤外線を用いた光干渉断層法 (optical coherence tomography: OCT) はその高解像度 (10-20 μ m) により、線維性被膜厚の測定が可能である。近年、我々は後ろ向き研究において、スタチン治療が線維性被膜厚を増加させたことを報告している。本研究では、急性冠症候群における冠動脈プラークの線維性被膜に対するアトルバスタチン 20mg/日と 5mg/日の効果を、OCT を用いて前向きに比較検討した。

【方法】

経皮的冠動脈インターベンション (PCI) に成功した不安定狭心症 102 例のうち、未治療の脂質異常症 (LDL-C>100mg/dL)、および中等度 (造影上 30-70%狭窄) の非責任病変を有する 70 例を対象とした。PCI 施行後、アトルバスタチン 20mg/日投与群もしくは 5mg/日投与群に無作為割付を行った。PCI 直後と 12 ヶ月後に OCT を用いた対象病変プラークの観察、および脂質・炎症マーカーの測定を行った。OCT カテーテル (Model M2 Cardiology Imaging System, St. Jude Medical, St. Paul, Minnesota) を対象病変の遠位部まで進め、オートプルバックにて対象病変の遠位部から近位部にかけて観察を行った。オフライン解析システム (St. Jude Medical) を用いて盲検化評価を行った。ベースラインと 12 ヶ月後の OCT 画像を隣接した 2 台のスクリーンに描出し解析した。対象病変のマッチングには側枝や石灰化、ステントなどランドマークとなる部位からの距離を指標とした。線維性被膜は標的プラークを覆う高信号帯と定義した。対象病変の全ての連続断面の中から、線維性被膜が肉眼的に最も薄いと考えられる 3 断面を選択し、その中から計測上最も薄い線維性被膜厚を最小線維性被膜厚と定義し、ベースラインと 12 ヶ月後の最小線維性被膜厚を比較した。脂質プラークの広がりには肉眼的に最大の脂質コアを有する断面のプラーク角度とした。脂質プラークの長さは脂質コアを有する断面数の合計から計測した。マクロファージは鋭い減衰信号を伴う高輝度・高信号の線状領域と定義した。各断面のマクロファージは、グレード 0, マクロファージなし; グレード 1, 局在性集積のみ; グレード 2, 1 四分円以内に散在性に集積; グレード 3, 1-2 四分円の範囲に散在性に集積; グレード 4, 3 四分円以上の範囲に散在性に集積 にグレード分類し、0.66mm 毎のグレードの合計をマクロファージグレードとした。脂質マーカーとして血清総コレステロール、高比重リポタンパク質 (HDL-C)、トリグリセライド、低比重リポタンパク質 (LDL-C)、酸化 LDL としてマロンジアルデヒド修飾 LDL (MDA-LDL) を測定した。また炎症マーカーとして高感度 CRP (hs-CRP)、インターロイキン-6 (IL-6)、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) を測定した。サンプルサイズは、両群間の線維性被膜厚の平均差が 100 μ m、両群の線維性被膜厚の標準偏差が 120 μ m と仮定

し、両側検定の α 水準が 0.05、検出力 80%で算出するに各群 23 例必要であり、さらに外れ値の除外で最大 15%、試験離脱などで最大 30%の症例喪失を考慮し、各群 35 例を要すると判断した。カテゴリーは頻度で表示し、2 群間の比較には χ^2 検定または Fisher 検定を用いた。連続変数は中央値と四分位範囲で表記し、2 群間の比較には Mann-Whitney *U* test、ベースラインと 12 ヶ月後の比較には Wilcoxon signed rank test を用いた。各バイオマーカーの変化率と線維性被膜厚の変化率の関連性には線形回帰を用いた。いずれも $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

【結果】

対象となった 70 例のうち、10 例（同意撤回：2 例、不適切プラーク：4 例、服薬コンプライアンス不良：1 例、スタチン副作用：1 例、フォローアップ不明：2 例）を除く 60 例（20mg 群：30 例、5mg 群：30 例）のデータ解析を行った。患者背景では両群で併存症、併用薬の使用は同等であった。5mg 群に比較し、20mg 群では 12 カ月間で LDL-C が有意に低下し、12 ヶ月後の LDL-C 値は有意に低値であった。線維性被膜厚は 20mg 群で有意に減少した。脂質プラークの広がりや 20mg 群で有意に減少したが、脂質プラークの長さは両群で同等に減少した。マクロファージグレードは 20mg 群で有意に減少した。線維性被膜の増加率は LDL-C、MDA-LDL、hs-CRP、MMP-9 の低下率とそれぞれ有意な相関を示し、さらにマクロファージグレードの低下率とも有意な相関を認めた。マクロファージグレードの低下率は HDL-C 上昇率、hs-CRP 低下率、MMP-9 低下率と有意な相関を認めた。

【考察】

スタチンは動脈硬化の進展を抑制し、心血管疾患の死亡率を低下させ、またそのイベント抑制効果は高用量スタチンでより顕著であることが報告されている。今回の検討では、高用量スタチン療法は低用量療法よりも線維性被膜厚を増加させ、脂質および炎症性マーカーの低下が線維性被膜厚の増加と関連することが明らかとなった。スタチンによるプラーク安定化のメカニズムは十分に解明されていないが、本研究により高用量スタチン療法が炎症を抑制し線維性被膜を肥厚させることでプラークを安定化させる可能性が示唆された。しかしながら本研究では症例数が少ないため線維性被膜の増加と心血管イベントの抑制の関連性については不明である。今後本研究を発展させるためには、より大規模な臨床試験による線維性被膜と心血管イベントとの関係性についての検討が必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年7月6日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め審査を行った。

急性冠症候群（ACS）は発症早期の心イベント再発率が高く予後不良である。HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンは ACS の遠隔期死亡率を低下させ、そのイベント抑制効果は低用量に比べ高用量スタチンでより顕著であることが報告されている。しかしながら、スタチン療法によるプラーク安定化の機序は十分に解明されていない。光干渉断層法（OCT）は冠動脈プラークの脆弱性および安定性の指標である線維性被膜厚の測定が可能である。本論文は、ACS 患者における非責任病変プラークの線維性被膜に対するアトルバスタチンの効果を、OCT を用いて前向きに比較検討したものである。

経皮的冠動脈インターベンション（PCI）に成功した不安定狭心症 70 例を対象とし、PCI 施行後にアトルバスタチン 20mg/日投与群もしくは 5mg/日投与群に無作為割り付けを行った。PCI 直後と 12 ヶ月後に OCT を用いて対象プラークの線維性被膜厚の測定およびマクロファージの半定量評価を行い、脂質および炎症マーカーとの関連性を検討した。

その結果、5mg 投与群に比較し、20mg 投与群では 12 ヶ月間で LDL コレステロールが有意に低下し、線維性被膜厚は有意に増加した。マクロファージは 20mg 投与群で有意に減少した。線維性被膜の増加率は LDL コレステロール、MDA-LDL、高感度 CRP、MMP-9 の低下率とそれぞれ有意な相関を示し、さらにマクロファージの減少率とも有意な相関を認めた。マクロファージの低下率は HDL コレステロール上昇率、高感度 CRP および MMP-9 低下率と有意な相関を認めた。

以上の結果より、高用量スタチン療法は低用量療法よりも線維性被膜厚を増加させること、さらに線維性被膜厚の増加には脂質および炎症性マーカーの改善が関連することが明らかとなった。本論文

は、高用量スタチン療法が脂質と炎症を抑制し線維性被膜を肥厚させることでプラーク安定化に寄与する可能性を示唆したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第995号		
学位授与の日	令和2年9月15日		
氏名	里神 慶亮		
学位論文の題目	Impact of Plaque Rupture Detected by Optical Coherence Tomography on Transmural Extent of Infarction After Successful Stenting in ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction (ST 上昇型心筋梗塞において光干渉断層法にて評価されたプラーク破裂と心臓 MRI で評価された梗塞壁深達度との関連)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 西村 好晴	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【背景】

ST 上昇型急性心筋梗塞(ST-segment elevation acute myocardial infarction; STEMI)は、病理学的検討において、60-70%がプラーク破裂、30-40%がプラークびらん、残りは石灰化結節などが原因で発症すると報告されている。これまでの研究では、STEMI において、血管内視鏡や血管内超音波法を用いて判定されたプラーク破裂を原因とする症例では、プラーク破裂以外を原因とする症例に比して、心筋逸脱酵素を用いて評価した梗塞サイズが大きいことが報告されている。ただし、血管内視鏡や血管内超音波は解像度の限界によりプラーク破裂の検出精度に限界があり、また心筋逸脱酵素による梗塞サイズの評価と慢性期の心機能の改善や予後との関連にも限界があるとされている。

一方、光干渉断層法(optical coherence tomography; OCT)は高解像度の冠動脈内画像診断法であり、STEMI の責任病変において、高い精度でプラーク破裂、プラークびらん、石灰化結節のいずれであるかを鑑別することができることが報告されている。また遅延造影心臓 MRI で評価された梗塞壁深達度(Transmural Extension of Infarction grade; TEI grade)は、急性心筋梗塞患者における慢性期の心機能の改善や予後の予測因子になることが報告されている。これまで STEMI 患者の責任病変において観察されたプラーク破裂と TEI grade との関連性は不明である。

【目的】

STEMI 患者に対する primary percutaneous coronary intervention (PCI)時に OCT で評価されたプラーク破裂の有無と遅延造影心臓 MRI での TEI grade との関連性を検討する。

【方法】

当院で初回 STEMI 症例において、発症 12 時間以内に primary PCI を施行し、バルーン拡張前に OCT を施行でき、1 週間後に遅延造影心臓 MRI を撮影できた 103 症例(平均年齢 64.0±10.6 歳、男性 79 例)を対象とした(プラーク破裂あり;71 例、なし;32 例)。OCT イメージ解析はプラーク破裂の有無、脂質に富んだプラークの有無、血栓の有無などを評価した。心臓 MRI はシネ MRI にて左室拡張末期容積、左室収縮末期容積、左室駆出率を算出した。また、遅延造影 MRI により TEI grade、微小循環障害の有無、を評価した。

【結果】

非プラーク破裂群に比して、プラーク破裂群において、No-reflow 現象(37% vs. 16%, p=0.032)と遠位部塞栓(24 % vs. 6 %, p=0.032)は統計学的により高頻度に認められた。またプラーク破裂群において、左室駆出率は有意に低く(46±10% vs. 51±8%, p=0.009)、TEI grade が有意に高く(grade 3: 28% vs. 15%, grade 4: 45% vs. 13%, p<0.001)、微小循環障害もより高頻度に認められた(39% vs. 19%, p=0.039)。

多変量解析において、プラーク破裂 (odds ratio: 6.60, 95% confidence interval: 2.19 to 21.69; p<0.001)および発症前のスタチン内服歴のないこと (odds ratio: 3.37, 95% confidence interval: 1.06 to 11.19; p = 0.039)が、慢性期の心機能の改善が不良とされる TEI grade3 または 4 の予測因子であっ

た。

【考察】

本研究では初回 STEMI 症例において、発症 12 時間以内に primary PCI を施行し、バルーン拡張前に OCT を施行でき、1 週間後に遅延造影心臓 MRI を撮影できた 103 症例を対象に後ろ向きに検討を行なった。急性心筋梗塞の発症様式にはプラーク破裂、プラークびらん、石灰化結節などが関与すると病理学的に報告されている。本研究においてプラーク破裂は 69%に認められた。遅延造影 MRI により評価された grade 3 以上の壁深達度をプラーク破裂群において統計学的に有意に高頻度で認められた。grade 3 以上の壁深達度や PCI 施行中の no-reflow 現象、遠位部塞栓は急性心筋梗塞患者における慢性期の心機能の改善や予後の予測因子とされている。本研究の結果により心筋梗塞の発症機序により壁深達度で評価された重症度に関連がある可能性が示唆された。

【結論】

primary PCI を施行された初回 STEMI 患者において、OCT で評価されたプラーク破裂の存在は、遅延造影心臓 MRI で評価された TEI grade の重症度や、微小循環障害の出現頻度との関連が認められた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 2 年 8 月 18 日、20 日、21 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

ST 上昇型急性心筋梗塞(ST-segment elevation acute myocardial infarction; STEMI)は、病理学的検討において、60-70%がプラーク破裂、30-40%がプラークびらん、残りは石灰化結節などが原因で発症すると報告されている。これまでの研究では、STEMI において、血管内視鏡や血管内超音波法を用いて判定されたプラーク破裂を原因とする症例では、プラーク破裂以外を原因とする症例に比して、心筋逸脱酵素を用いて評価した梗塞サイズが大きいことが報告されている。血管内視鏡や血管内超音波は解像度の限界によりプラーク破裂の検出精度に限界があり、また心筋逸脱酵素による梗塞サイズの評価と慢性期の心機能の改善や予後との関連にも限界があるとされている。一方、光干渉断層法(optical coherence tomography; OCT)は高解像度の冠動脈内画像診断法であり、STEMI の責任病変において、高い精度でプラーク破裂、プラークびらん、石灰化結節のいずれであるかを鑑別することができる」と報告されている。また遅延造影心臓 MRI で評価された梗塞壁深達度 (Transmural Extension of Infarction grade; TEI grade)において grade3 以上は予後不良とされる貫壁性梗塞を示唆し、STEMI 患者における慢性期の心機能の改善や予後の予測因子になることが報告されている。これまで STEMI 患者の責任病変において観察されたプラーク破裂と TEI grade との関連性は不明である。本論文は STEMI 症例において、primary percutaneous coronary intervention (PCI)を施行時に OCT をバルーンによる拡張前に施行し、遅延造影心臓 MRI を撮影できた 103 症例(プラーク破裂あり;71 例、なし;32 例)を後ろ向きに解析を行った。

非プラーク破裂群に比して、プラーク破裂群では、No-reflow 現象(37% vs. 16%, p=0.032)と遠位部塞栓(24 % vs. 6 %, p=0.032)はより高頻度に認められた。またプラーク破裂群において、左室駆出率は有意に低く(46±10% vs. 51±8%, p=0.009)、TEI grade が有意に高く (grade 3: 28% vs. 15%, grade 4: 45% vs. 13%, p<0.001) 微小循環障害もより高頻度に認められた(39% vs. 19%, p=0.039)。多変量解析では、プラーク破裂 (odds ratio: 6.60, 95% confidence interval: 2.19 to 21.69; p<0.001) および発症前のスタチン内服歴のないこと (odds ratio: 3.37, 95% confidence interval: 1.06 to 11.19; p = 0.039)が、慢性期の心機能の改善が不良とされる TEI grade3 または 4 の予測因子であった。

以上、本論文は primary PCI を施行された初回 STEMI 患者において、OCT で評価されたプラーク破裂の存在は、遅延造影心臓 MRI で評価された TEI grade の重症度や、微小循環障害の出現頻度との関連が認められた。

本研究は OCT によって診断されたプラーク破裂と梗塞壁深達度との関連性を示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第996号		
学位授与の日	令和2年9月15日		
氏名	森本 順子		
学位論文の題目	Preoperative left atrial minimum volume as a surrogate marker of postoperative symptoms in senile patients with aortic stenosis who underwent surgical aortic valve replacement (高齢大動脈弁狭窄症患者に対する外科的大動脈弁置換術後の有症状のサロゲートマーカーとしての術前最小左房容量)		
論文審査委員	主査	教授 鈴木 啓之	
	副査	教授 加藤 正哉	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【背景】

近年の超高齢社会では、高度大動脈弁狭窄(aortic stenosis; AS)の病因として加齢変性が最も多く、80%以上を占める。30年前より高度ASに対する外科的大動脈弁置換術(aortic valve replacement; AVR)の至適時期決定は、症状評価と心エコー図での左室駆出率(left ventricular ejection fraction; LVEF)に基づき判断されてきた。しかし、術後23~56%の患者が心不全症状を有すると報告され、術後の問題点の1つとされてきた。

ASでは心筋収縮機能障害、すなわちLVEF低下に先立ち、拡張機能障害が出現し、心筋線維化と変性により、左室拡張末期圧(left ventricular end-diastolic pressure; LVEDP)が上昇する。術前LVEFが正常でも高度な左室心筋線維化を有するAS患者ではAVR後に心不全症状が残存すると報告されている。よって、AVRの至適時期決定には、左室心筋線維化やLVEDP上昇を評価する方が、LVEFを評価するより鋭敏な指標になると考えられる。しかし術前フォロー目的でこれらの指標を繰り返し評価するには、高齢AS患者において侵襲かつ高価であることが問題である。

心エコー図における左室拡張末期に測定される最小左房容量(left atrial minimum volume; LAV_{min})はLVEDPの直接の影響を受けるため、LVEDPや左室拡張機能障害の指標になるとの報告があり、術前LAV_{min}はAS患者において術後症状出現の予測因子として期待される。そこで本研究では、ASに対するAVR後の有症状のサロゲートマーカーとして、LAV_{min}を体表面積で除した最小左房容量係数(left atrial minimum volume index; LAVI_{min})が有用であるか検討した。

【対象と方法】

1. 対象と症状評価

2008年4月から2015年3月まで和歌山県立医科大学附属病院でAVRが施行された連続219例のうち、冠動脈疾患、AS以外の有意な弁膜症、不整脈、心臓手術既往、画像描出不良例を除外し、60日間経過観察可能であった75例を対象とした。有症状評価は、術前とAVR後600日間に、New York heart Association(NYHA)機能分類を後向きに診療記録情報を元に評価した。本研究では、AVR後60日~600日の間に認めたNYHA class IIからIVまでを有症状と定義した。

2. 標準的な心エコー図評価

Vivid E9/E7 ultrasound machine (GE Vingmed Ultrasound AS)とEPIQ/iE33 ultrasound machine (Philips Ultrasound)でアメリカ心エコー図学会が推奨する方法に則り評価した。

3. 心エコー図による左房機能評価

左房機能は、左室収縮末期に計測される最大左房容量係数(Left atrial maximum volume index; LAVI_{max})、左室拡張末期に計測されるLAVI_{min}、および左房駆出率(Left atrial emptying fraction; LAEF)により評価した。左房容量計測は心尖部四腔断面、二腔断面を描出し、Biplane disk summation法で計測した値を用いた。LAEFは $[(LAV_{max} - LAV_{min}) / LAV_{max}] \times 100\%$ と定義した。

4. 検者間・検者内計測誤差の解析

無作為に抽出した10例での検者間ならびに検者内級内相関係数の解析を行った。

5. 統計学的解析

解析は JMP pro version 13.0(SAS Institute, Cary, NC, USA)、EZR version 1.37 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)、R software version 3.5.0 (R Foundation for Statistical Computing)を用いて行った。各種心エコー図指標における AVR 後の有症状検出の診断精度を、ROC 曲線を用いて算出した。それぞれの指標の AUC の比較は、Benjamini-Hochberg 法で多変量検定を行った。p <0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

【結果】

AVR 後経過観察期間において、対象例中 19 例 (25.3%) が NYHA functional class II～IV の症状を認め、うち 4 例 (5.3%) はうっ血性心不全による入院を要した。AVR 後有症状群、無症状群の 2 群間比較を行った結果、年齢、NYHA functional class、血清 BNP 値について 2 群間有意差を認めしたが、性別、COPD、喫煙、高血圧、脂質異常症、糖尿病、貧血、BMI、クレアチニン値については 2 群間有意差を認めなかった。術前心エコー図指標は、E/A、E/e'、LAVI_{max}、LAVI_{min}、推定肺動脈収縮期圧(pulmonary atrial systolic pressure; PASP)において有症状群で有意に高値、LAEF で有意に低値であった。術前大動脈弁口面積や大動脈弁圧較差、左室心筋重量係数(left ventricular mass index; LVMI)、LVEF や右室面積変化率(right ventricular fractional area change; RVFAC)には 2 群間で有意差は認めなかった。2 群間で有意差を認めた心エコー図指標および LVEF について、AVR 後の有症状に関する ROC 解析では、術前 LAVI_{min} ≥ 30 ml/m² で、感度 94%、特異度 68%、AUC 0.84 で、その他指標では付図に示す通りであった。各指標の ROC 曲線間の比較では、LAVI_{min} が mean E/e'、LVEF に比し、有意に診断精度が高かった。AVR 後有症状の術前予測因子として、年齢、性別、BMI、COPD、貧血、LAVI_{min} について多変量解析を行った結果、LAVI_{min} が独立した予測因子であった。

【考察】

本研究では、AS に対する AVR 後の有症状予測因子として LAVI_{min} は高い検出能を有し、独立した予測因子であることが示された。左房拡大が LVEDP 上昇と相関することが心臓カテーテル検査により示されてきた。特に、LAVI_{min} は左室拡張末期に計測されるため、LVEDP 上昇を反映する有用な指標と報告されている。本研究では、LAVI_{min} ≥ 30 ml/m² の拡大があれば、AVR 後の有症状を、感度 94%、特異度 68% で診断可能であった。これは、心臓カテーテル検査での報告から考えると、LAVI_{min} が LVEDP 上昇をよく反映した結果と考えられる。

【結語】

AS に対する AVR 後の有症状のサロゲートマーカーとして、術前心エコー図により計測される LAVI_{min} が有用である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年8月6日、論文審査委員は学位申請者に出席を求め、上記論文の審査を行った。

高度大動脈弁狭窄(aortic stenosis; AS)に対する外科的大動脈弁置換術(aortic valve replacement; AVR)は、有症状時、または無症状でも左室駆出率(left ventricular ejection fraction; LVEF) < 50% への低下時に class I で推奨されてきたが、術後 2～5 割の患者が心不全症状を有し、問題点の 1 つとされてきた。

AS では LVEF 低下に先立ち、左室心筋線維化と変性により、左室拡張末期圧(left ventricular end-diastolic pressure; LVEDP)が上昇する。LVEF 正常例でも左室心筋線維化が高度な場合、術後心不全症状残存の報告があり、LVEF に比して左室心筋線維化や LVEDP の方がより鋭敏な AVR 至適時期決定指標になると考えられる。しかし、これらの指標は侵襲的で高価であることが問題である。一方、心エコー図における最小左房容量は左室心筋線維化や LVEDP を反映するとの報告があり、術前最小左房容量は AS 患者において術後症状出現の予測因子として期待されるが体格・体型の影響を受ける可能性が考えられる。

本研究では AS に対する AVR 後の有症状のサロゲートマーカーとして、最小左房容量を体表面積で除した最小左房容量係数(left atrial minimum volume index; LAVI_{min})の有用性を検討した。2008 年

4月から2015年3月まで当院でAVR施行の連続219例のうち、冠動脈疾患、AS以外の有意な弁膜症、不整脈、心臓手術既往、画像描出不良例を除外し、600日間観察可能であった75例を対象とした。

結果は、対象例中19例(25.3%)が術後にNYHA functional class II～IVの症状を認めた。AVR後有症状群、無症状群の2群間比較の結果、術前心エコー図指標では左室拡張能指標であるE/A、E/e'、最大左房容量係数、LAVI_{min}、推定肺動脈収縮期圧が有症状群で有意に高値、左房駆出率が有意に低値であった。AVR後有症状に関するROC解析では、術前LAVI_{min} \geq 30 ml/m²で、感度94%、特異度68%、AUC 0.84で、各指標のROC曲線間の比較では、LAVI_{min}がmean E/e'、LVEFに比し、有意に診断精度が高かった。AVR後有症状の術前予測因子として、年齢、性別、BMI、COPD、貧血、LAVI_{min}について多変量解析を行った結果、LAVI_{min}が独立した予測因子であった。LAVI_{min}の検者内級内相関係数(intraclass correlation coefficient; ICC)は0.89、検者間ICCは0.93と高い再現性を有していた。

本論文は、ASに対するAVR後の有症状予測因子としてLAVI_{min}は高い検出能を有し、サロゲートマーカーとして有用であることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第997号		
学位授与の日	令和2年10月20日		
氏名	西山 大介		
学位論文の題目	Prediction of pelvic inclination in the sitting position after corrective surgery for adult spinal deformity (成人脊柱変形矯正固定術における術後座位骨盤傾斜予測)		
論文審査委員	主査	教授 中川 幸洋	
	副査	教授 金井 克光	教授 山田 宏

論文内容の要旨

【背景】

1983年に Hip-spine syndrome の概念が提唱されて以降、股関節病変と脊椎病変が関連することは共通認識となっており、様々な報告がなされている。脊椎病変に対しては脊柱変形矯正固定術、変形性股関節症に対して人工股関節置換術 (THA) がそれぞれ行われるが、THA と脊柱変形矯正固定術の併存患者の股関節脱臼率は THA 単独と比べ有意に高い。

脊柱固定により屈曲時の骨盤 rollback 運動が抑制され、大腿骨頸部と寛骨臼前縁が前方で衝突 (前方インピンジメント) を来すためと考えられる。前方インピンジメントの大部分が座位からの体位変換時に起こることより、予防には座位姿勢での骨盤傾斜の把握が重要であるが、矯正固定術後の座位骨盤傾斜の詳細はこれまで明らかにされていない。

【目的】

矯正固定術後の座位骨盤傾斜に影響する因子を明らかにし、様々なパラメータを組み合わせた総合予測式を考案し検討すること。

【対象と方法】

2015年12月-2019年1月に当院で施行した初回腰椎多椎間固定術183例のうち術前後に座位側面 X-p を撮影していた28例を対象とした。男性4例、女性24例で、平均年齢71.7歳、平均固定長は7.5椎体であった。

術後座位骨盤傾斜に影響を与える因子の検討として、年齢、性別、固定椎間数、仙骨固定の有無、仙腸関節固定の有無、各種脊椎矢状アライメントパラメータ (術前立位 PI;骨盤形態角、術前後の立位座位 LL;腰椎前弯角、術前の立位座位 SS;仙骨傾斜角) を、単回帰分析を用いて検討した。更に、有意であった因子を組み合わせた多変量解析を追加した。得られた重回帰式を基に術後座位時の骨盤傾斜の予測式を考案した。

【結果】

固定椎間数 ($\beta = 0.30, p = 0.003$)、仙骨固定の有無 ($\beta = 0.22, p = 0.01$)、仙腸関節固定の有無 ($\beta = 0.24, p = 0.008$)、術前の立位座位 SS ($\beta = 0.21, p = 0.01$ and $\beta = 0.34, p = 0.001$) が弱い相関を示した。術後立位の LL ($\beta = 0.67, p < 0.0001$) が強い相関を示した。

脊椎外科医が唯一介入可能な術後立位 LL を含み、また利便性を考慮し少数項目で最も当てはまりがよくなるよう重回帰分析を用いて組み合わせの検討を行ったところ、術後立位 LL と術前座位 SS の組み合わせが最も当てはまりがよく、式の当てはまりのよさを示す自由度調整 R 二乗は 0.82 であった。得られた回帰式をもとに予測式: 術後の座位 SS = $11.7 + 0.4 \times$ 術後立位 LL (目標値) + $0.16 \times$ 術前座位 SS を得た。式の当てはまりのよさを示す自由度調整 R 二乗は 0.82 であった。予測値と実測値の誤差の範囲内達成率は 3 度 46.4%、5 度 71.4%、7 度 96.4% であった。

【考察】

近年、脊椎固定術と THA の両方を受ける患者の増加が報告されている。両手術の併存患者の有意に高い THA 脱臼率が示されている。脱臼の多くが座位からの体位変換時に起こることより、予防のための患者指導では座位での制限事項が多く設けられている。

脊柱変形矯正術後の THA に関して、Phan らは脊椎の柔軟性とバランスにより対象患者を分類し、それぞれのカテゴリでの THA インプラント設置の戦略を提唱している。

最新の発表では脊椎固定を先行したほうが脱臼、再置換のリスクが高いと示されたため、今後、THA 後の脊椎矯正固定手術例が増加する可能性がある。しかし、THA 後の成人脊柱変形矯正術に関する手術戦略を示したものは見当たらない。

脊柱変形に対する矯正手術においては理想的アライメントの獲得が目標とされる。代償の働いていない理想的アライメントは脊椎のみならず関節や軟部組織に対する最小負荷で立位姿勢を保持できると考えられる。脊椎骨盤アライメントと health related quality of life (HRQOL) の関連に基づいて、sagittal vertical axis (SVA) >40mm, 骨盤傾斜 (pelvic tilt : PT) >20° , PI-LL>10° が sagittal deformity と定義され、これが現在の成人脊柱変形評価のスタンダードとなっている。

本研究により、PI-LL<10 度のような目標値に基づく脊柱矯正固定を行った場合の術後座位 SS 予測が可能となった。これをもとに屈曲シミュレーションを行い、前方インプラントインピンジメントを来す股関節屈曲角度を計測し人工股関節脱臼リスクの予測が期待される。本研究は、THA 後の成人脊柱変形矯正術に関する手術戦略の根拠となりうると考えられた。

単施設、症例数の少なさが本研究の limitation と考えられた。選択バイアスの影響が懸念されるため今後多施設研究での追試を要す。また、レントゲン撮影時の座位が体幹を垂直に保つよう標準化し撮影したため、日常生活における座位姿勢と乖離している可能性が考えられる。

【結論】

本研究により、理想の LL を獲得する脊柱矯正固定を行った場合の術後座位 SS 予測が可能となった。本研究にて考案した総合予測式は高い予測能を示し有用であると考えられた。本研究は、THA 後の成人脊柱変形矯正術に関する手術戦略の根拠となりうると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 2 年 10 月 1 日、5 日、6 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

本研究は、成人脊柱変形に対する矯正固定術における術後の座位での骨盤傾斜を術前に予測する手法について検討を行ったものである。

成人の加齢変化において股関節病変と脊椎病変はしばしば並存する。脊椎病変に対しては脊柱変形矯正固定術、変形性股関節症に対しては人工股関節置換術 (THA) がそれぞれ行われるが、THA と脊柱変形矯正固定術の併存患者の股関節脱臼率は THA 単独と比べ有意に高い。この原因として考えられるのは、股関節屈曲時に脊柱が固定されていることにより脊柱後弯運動や骨盤 rollback 運動が抑制された結果、発生する大腿骨頸部と寛骨臼前縁の前方での衝突 (前方インピンジメント) である。前方インピンジメントの大部分が座位からの体位変換時に起こるため、予防には座位姿勢での骨盤傾斜の把握が重要であるが、矯正固定術後の座位骨盤傾斜の詳細はこれまで明らかにされていなかった。本論文では、初回腰椎多椎間固定術の術前後に座位側面レントゲンを撮影しえた 28 例 (平均年齢 71.7 歳、平均固定長 7.5 椎体) を対象に後ろ向きの解析を行った。術後座位骨盤傾斜に影響を与える因子として固定椎間数 [β (標準偏回帰係数)=0.30, $p = 0.003$]、仙骨固定の有無 ($\beta = 0.22$, $p = 0.01$)、仙腸関節固定の有無 ($\beta = 0.24$, $p = 0.008$)、術前の立位座位仙骨傾斜角 ($\beta = 0.21$, $p = 0.01$, $\beta = 0.34$, $p = 0.001$) が弱い相関を示し、術後立位の腰椎後弯角 ($\beta = 0.67$, $p < 0.0001$) が強い相関を示した。脊椎外科医が唯一介入可能な術後立位腰椎後弯角を含み、また利便性を考慮し少数項目で最も当てはまりがよくなるよう重回帰分析を用いて組み合わせの検討を行ったところ、術後立位腰椎後弯角と術前座位仙骨傾斜角の組み合わせが最も当てはまりがよき、式の当てはまりのよさを示す自由度調整 R² は 0.82 であった。得られた回帰式をもとに予測式：術後の座位仙骨傾斜角 = $11.7 + 0.4 \times$ 術後立位腰椎後弯角 (目標値) $+ 0.16 \times$ 術前座位仙骨傾斜角を得た。予測値と実測値の誤差は 46.4% が 3 度以内に収まった。71.4% が 5 度以内、96.4% が 7 度以内であった。【まとめ】本研究により、理想の腰椎後弯を獲得する脊柱矯正固定を行った場合の術後座位骨盤傾斜の予測が可能となった。矯正固定術後の座位骨盤傾斜の状態が術前に把握できる本研究の成果は、三次元モデルを用いた脱臼シミュレーションなど発展的研究の

礎となる。本研究は THA 後の成人脊柱変形矯正術に関して、理想的な腰椎後弯獲得のみならず脱臼予防も意図した手術計画を立てる際の根拠となりうると考えられ、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第998号		
学位授与の日	令和2年10月20日		
氏名	中島 強		
学位論文の題目	The effect of positive-end-expiratory pressure on stroke volume variation: An experimental study in dogs (一回拍出量変化における呼気終末陽圧の影響：実験犬を用いた研究)		
論文審査委員	主査	教授 川俣 知之	
	副査	教授 赤阪 隆史	教授 加藤 正哉

論文内容の要旨

【緒言】

一回拍出量変化 (Stroke volume variation : SVV) は、動脈圧波形分析法により算出される一回拍出量 (Stroke volume : SV) の呼吸性変動の変化率を表したパラメーターである。主に麻酔、集中治療の領域で、人工呼吸患者における輸液反応性の指標として頻用され、急性期の循環管理に有用である。

一方で、呼吸器設定に影響を受けることが報告されており、高度な人工呼吸管理を行う集中治療室において適切にSVVとSVを解釈するためには呼吸器設定とこれらのパラメーターの関連を明確にする必要がある。特に呼気終末陽圧 (positive end-expiratory pressure : PEEP) と above PEEP の様々な前負荷における変化は、これまでの研究では明確にはされていない。

今回の目的は、実験犬を用いて、様々な前負荷下でSVVにおけるPEEPとabove PEEPの影響を明確にすることである。

【方法】

本実験は、大阪府立大学獣医学部内教室における実験犬を用いた共同研究である。大阪府立大学倫理審査委員会により承認を得ており、日本学術会議の動物実験ガイドラインを遵守し行った。

全身麻酔下で人工呼吸管理とした9頭の実験犬 (10-12 kg) を用いて、軽度出血モデル (10 ml/kg 脱血)、中等度出血モデル (20 ml/kg 脱血)、正常モデルを作成した。

呼吸器は初期設定を調整換気、従圧式モード、酸素濃度 40%、呼吸回数 20 回、PEEP 4 cmH₂O、above PEEP 5 cmH₂O とし、PEEP を固定し above PEEP を 4 cmH₂O ずつ最大気道内圧 (PIP) 21 cmH₂O まで上昇させた。その後、PEEP 4 cmH₂O ずつ 8 cmH₂O、12 cmH₂O と上昇させ、それぞれの PEEP で above PEEP を 4 cmH₂O ずつ PIP 21 cmH₂O まで上昇させた。各設定で、SVV、SV、中心静脈圧 (central venous pressure : CVP)、平均動脈圧 (mean arterial pressure : MAP)、脈拍 (heart rate : HR)、肺動脈楔入圧 (pulmonary capillary wedge pressure : PCWP) を測定した。測定終了後、脱血した血液は返血した。

【結果】

前負荷における PEEP による各パラメーターの変化

それぞれの前負荷下で PEEP の増加によって CO は有意に低下した。しかし、SV や SVV は正常モデルと軽度出血モデルでは有意な変化はなかった。

前負荷における PEEP と SVV の関係

PEEP の増加により SVV は減少した。回帰係数は正常モデル-0.16 (Standard error [SE] :0.12 p=0.18)、軽度出血モデル-0.39 (SE :0.20, p=0.05)、中等度出血モデル-0.68 (0.25 ;p<0.01)であった。

前負荷における above PEEP と SVV の関係

above PEEP の増加により SVV は有意に増加した。回帰係数は正常モデル 0.59(SE:0.07 p<0.01)、軽度出血モデル 0.91 (SE ;0.12, p<0.01)、中等度出血モデル 1.37 (SE ;0.14 ;p<0.01)であった。

SVV、SV における前負荷、above PEEP、PEEP の関係

多変量解析では前負荷低下と above PEEP 増加は有意に SVV 増加に関連があったが、PEEP は関連がなかった。一方で、SV 低下と関連があったのは PEEP 増加と前負荷の減少であった。

【考察】

今回の実験では、SVV は出血と above PEEP に有意な相関関係があったが、PEEP とは相関がないことがわかった。

これまでの報告では PEEP と SVV には相関があるとされており、PEEP 増加により SV は減少し SVV は増加するとの報告が散見される。しかし、それらの実験では、呼吸器設定が従量式でなされており、一回換気量を一定にして PEEP を上げると、above PEEP は一定ではなく増加するため、PEEP だけでなく above PEEP が SV や SVV に影響を与えていた可能性がある。本実験は従圧式で行ったため PEEP と above PEEP の影響を明確にすることができた。

高度な呼吸器管理を要する集中治療室において、本実験が循環動態把握の一助となると考えられた。

【結論】

陽圧換気を行っている実験犬において、PEEP 増加により SV は減少するが SVV は増加しなかった。above PEEP は PEEP より SVV に影響を与える。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年9月24日及び29日に論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

麻酔、集中治療領域において用いられる循環の指標として一回拍出量変化（Stroke volume variation : SVV）がある。動脈圧波形分析法により算出される一回拍出量（Stroke volume : SV）の呼吸性変動の変化率を表した指標であるが、人工呼吸患者における輸液反応性の指標として頻用され、急性期の循環管理に有用である。

一方で、呼吸器設定に影響を受けることが報告されており、高度な人工呼吸管理を行う集中治療室において適切に SVV と SV を解釈することは極めて重要であり、呼吸器設定とこれらの指標の関連を明確にする必要がある。特に呼気終末陽圧（positive end-expiratory pressure : PEEP）と above PEEP の様々な前負荷における変化は、これまでの研究は吸気圧が一定ではない実験が多く、明確にされていない。本実験では、実験犬を用いて、様々な前負荷下で SVV における PEEP と above PEEP の影響を明確にすることを目的とした。

本実験は、大阪府立大学獣医学部内教室における実験犬を用いた共同研究である。

全身麻酔下で人工呼吸管理とした9頭の実験犬（10-12 kg）を用いて、軽度出血モデル（10 ml/kg 脱血）、中等度出血モデル（20 ml/kg 脱血）、正常モデルを作成した。

呼吸器は初期設定を調整換気、従圧式モード、酸素濃度 40%、呼吸回数 20 回、PEEP 4 cmH₂O、above PEEP 5 cmH₂O とし、PEEP を固定し above PEEP を 4 cmH₂O ずつ最大気道内圧（PIP）21 cmH₂O まで上昇させた。その後、PEEP 4 cmH₂O ずつ 8 cmH₂O、12 cmH₂O と上昇させ、それぞれの PEEP で above PEEP を 4 cmH₂O ずつ PIP 21 cmH₂O まで上昇させた。各設定を2分ごとに変更し、SVV、SVなどを測定した。

PEEP の増加により SVV は減少傾向にあった。回帰係数は正常モデル-0.16 (Standard error [SE] ;0.12 p=0.18)、軽度出血モデル-0.39 (SE ;0.20, p=0.05)、中等度出血モデル-0.68 (SE; 0.25 ;p<0.01)であった。

above PEEP の増加により SVV は有意に増加した。回帰係数は正常モデル 0.59(SE ;0.07 p<0.01)、軽度出血モデル 0.91 (SE ;0.12, p<0.01)、中等度出血モデル 1.37 (SE ;0.14 ;p<0.01)であった。多変量解析では前負荷低下と above PEEP 増加は有意に SVV 増加と関連があったが、PEEP は関連がなかった。一方で、SV 低下と関連があったのは PEEP 増加と前負荷の減少であった。

以上のことから、SVV に影響を与えるのは above PEEP であり、PEEP は影響を与えないことを明らかにした。

本論文はこれまで明確にされていなかった SVV と PEEP、above PEEP の関係を明確にしており、本知見が集中治療室における適正な急性期循環管理の一助になる可能性があるものであり、学位論文として価値があると認めた。

学位記番号	博(医)乙第999号		
学位授与の日	令和2年11月17日		
氏名	東裏 将己		
学位論文の題目	Correlation between haemoglobin level and type of erythropoiesis-stimulating agent at initiation of haemodialysis (血液透析導入時におけるヘモグロビン値と赤血球造血刺激因子製剤の特製差との関連性)		
論文審査委員	主査	教授 園木 孝志	
	副査	教授 原 勲	教授 重松 隆

論文内容の要旨

【諸言】

慢性腎臓病 (CKD) に伴う腎性貧血は尿毒症環境下において進行が促進され、透析導入直前では血清ヘモグロビン (Hb) 値が著明に低下する事 (Hb dip) が知られている。また腎性貧血は心負荷を増大させ心肥大を惹起し、心血管病 (CVD) の発症を促進する事がこれまでの研究で明らかにされている。そのため、透析導入前後においては CVD 発症リスクが増大する事が報告されている。腎性貧血に対する治療として赤血球造血刺激因子製剤 (ESA) が使用されており、腎予後や心肥大の改善を介して QOL 改善や CVD 発症抑制が報告されている。現在、本邦で使用されている ESA は short-acting ESA と long-acting ESA とに分類されている。しかしながら、透析導入時 Hb 値や Hb dip に影響を及ぼす臨床的関連因子の検討、特に ESA 特性差が及ぼす影響に関する検討はほとんど行われていない。本研究では ESA 特性差が透析導入時 Hb 値および Hb dip に及ぼす影響を検討した。

【対象と方法】

対象患者：

2009年から2015年にかけて和歌山県立医科大学附属病院腎臓内科においてHD導入となった364名の患者のうち除外項目を除く168名を対象とした。

1. 平均 Hb 値と臨床的関連因子の関連性の検討

血液透析 (HD) 導入時の平均 Hb 値で対象患者を高 Hb 値群と低 Hb 値群に分け、臨床的関連因子を比較した。

2. 導入3ヶ月前から導入時の Hb 値の変化

対象患者を long-acting ESA 使用群と short-acting ESA 使用群に分け、HD 導入3ヶ月前から HD 導入時にかけての Hb 値の変化を比較した。

3. HD 導入時 Hb 値に影響を及ぼす臨床的関連因子の検討

HD 導入時 Hb 値に影響を及ぼす臨床因子に関して、有意な関連性を認めた因子に対して重回帰分析を引き続いて行った。

血液サンプルおよび心臓超音波検査測定

血清 Hb 値、血清鉄、血清フェリチン、血清尿素窒素、血清クレアチニン、血清アルブミン、血清補正カルシウム、血清リン、血清 intact thyroid hormone、血清 HCO₃⁻、血清 CRP に関して、HD 導入時に測定した。

心臓超音波検査は溢水所見のない状態において、HD 導入時周辺で測定した。

統計学的解析

2群間の比較には t 検定、Mann-Whitney U test および X² 検定を用いた。HD 導入時 Hb 値に影響を及ぼす独立因子の検討には重回帰分析を用いた。いずれも p<0.05 を統計学的に有意差ありと判定

した。

【結果】

導入時における患者背景：

平均年齢は 66.9 歳、65.5%が男性で 48.2%に糖尿病罹患を認めた。平均 Hb 値は 8.8g/dL、平均血清鉄および血清フェリチン値はそれぞれ 59.8 μ g/dL、206.9ng/mL であった。69.6%で long-acting ESA が、30.4%で short-acting ESA がそれぞれ使用されていた。また、鉄剤は 17.3%で使用されていた。平均左室重量係数 (LVMI) は 142.2g/m² であった。

1. 平均 Hb 値と臨床的関連因子の関連性の検討

long-acting ESA 使用群は short-acting ESA 使用群に比して、Hb 値を高く維持していた。また、高 Hb 値群は低 Hb 値群と比して LVMI が低値であった。

2. 導入 3 ヶ月前から導入時間の Hb 値の変化

long-acting ESA 使用群は short-acting ESA 群に比して、導入 1 ヶ月前から導入時間で有意に Hb 値を維持できていた。

3. 導入時 Hb 値に影響を及ぼす臨床的関連因子の検討

単変量解析において、血清鉄、フェリチン、アルブミン、マグネシウム、CRP、long-acting ESA 使用、鉄剤使用は導入時の Hb 値と有意な関連性が認められた。重回帰分析では、血清鉄、アルブミン、long-acting ESA が独立した関連因子として認められた。

【考察】

本研究において、long-acting ESA 使用群で HD 導入時 Hb 値は有意に維持されていた。ESA における造血活性は ESA が保有するシアル残基数によって規定されており、シアル残基増加に伴いエリスロポエチン受容体への結合親和性が低下する。その結果、骨髄細胞内に取り込まれにくくなり、血中消失半減期が延長され長時間作用する事で高い造血活性を発揮する事が報告されている。本邦で使用されている long-acting ESA はダルベポエチン α (DA) とエポエチン β ペゴル (CERA) とが挙げられる。DA は short-acting ESA に比して、その構造に N 結合型糖鎖を多く付加する事でより多くのシアル残基を保有する事で、また CERA は short-acting ESA にメトキシポリエチレングリコールポリマーを修飾させる事でいずれも強力かつ持続的な造血活性を有しており、Hb 値維持に寄与したと考えられた。

また Hb 値は、心肥大の発症に寄与する事が報告されている。Hb 値低下に伴い心筋酸素供給量が低下するため、レニン-アンジオテンシン系や交感神経系が亢進され代償性に心拍出量を増加させる。結果的に左室拡張末期用量が増大し、心肥大を惹起すると考えられている。心肥大は心不全の代償性前段階であるだけでなく、虚血性心疾患や致死性不整脈といった CVD 発症に寄与している。CKD 進展に伴う尿毒症や内因性エリスロポエチン減少が Hb dip を引き起こすと考えられており、HD 導入前後では CVD 発症リスクが増大する。本研究において long-acting ESA は、short-acting ESA と比して、HD 導入時 Hb 値を維持できる事がわかった。さらに HD 導入時 Hb 値と LVMI に有意な関連性を認めた。したがって、long-acting ESA 使用し HD 導入時 Hb 値を維持し心肥大を抑制できる可能性が示唆された。

【結語】

long-acting ESA は Hb dip を有意に抑制し、HD 導入時 Hb 値を維持する事が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年11月5日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文に関する審査を行った。

CKDに伴う腎性貧血は尿毒症環境下において進行が促進され、HD導入直前では血清Hb値が著明に低下する事（Hb dip）が知られている。また腎性貧血は心負荷を増大させ心肥大を惹起し、CVDの発症を促進する事がこれまでの研究で明らかになっている。そのため、HD導入前後においてはCVD発症リスクが増大する事が報告されている。腎性貧血に対する治療として現在本邦ではESAが使用されており、腎予後や心肥大の改善を介してQOL改善やCVD発症抑制が報告されている。そのため、HD導入時Hb値やHb dipに影響を及ぼす臨床的関連因子の検討、特にESA特性差が及ぼす影響の検討は生命予後改善の観点から必要であると考えられる。

本研究ではESA特性差がHD導入時Hb値およびHb dipにどのような影響を及ぼしているかについて検討した。

long-acting ESA使用群はshort-acting ESA使用群と比して、HD導入3ヶ月前からHD導入時まで有意にHb値は高く維持されていた。ESAにおける造血活性は保有するシアル残基数によって規定されており、シアル残基増加に伴いエリスロポエチン受容体への結合親和性が低下する。その結果、骨髄内に取り込まれにくくなり、血中消失半減期が延長され長時間作用する事で高い造血活性を発揮する事が報告されている。本邦で使用されているlong-acting ESAはDAとCERAとが挙げられる。DAはshort-acting ESAに比して、その構造にN結合型糖鎖を多く付加する事でより多くのシアル残基を保有する事で、またCERAはshort-acting ESAにメトキシポリエチレングリコールポリマーを修飾させる事でいずれも強力かつ持続的な造血活性を有しており、Hb値維持に寄与したと考えられた。また対象患者をHD導入時の平均Hb値で2群に分け比較したところ、Hb値を高値に維持していた群の方がLVMIをより低値に維持していた。

上記結果よりlong-acting ESAは、short-acting ESAと比して、HD導入時Hb値を維持できる事がわかった。さらにHD導入時Hb値とLVMIに有意な関連性を認めた。したがって、long-acting ESAを使用する事でHb dipを抑制しHD導入時LVMIを低値に維持する事で心肥大を抑制しうる可能性が示唆された。本論文は、保存期CKDからHD導入時まで継続して検討しESA特性差とHb dipとの関連性について検討した初めての論文であり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第1000号		
学位授与の日	令和2年11月17日		
氏名	池崎 みどり		
学位論文の題目	Calreticulin protects insulin against reductive stress in vitro and in MIN6 cells (カルレティキュリンは試験管内及び膵β細胞においてインスリンを還元ストレスから保護する)		
論文審査委員	主査	教授 井上 徳光	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 井原 義人

論文内容の要旨

【緒言】

膵β細胞の機能障害は2型糖尿病病態に密接に関与すると考えられる。膵β細胞は常に大量のインスリン分子を合成しているため生理的状态において既に小胞体ストレス下にあり、酸化ストレス、還元ストレス等の様々なストレスに対して脆弱であることが知られている。インスリンは、前駆体のプレプロインスリンとして翻訳され、小胞体内でシグナル配列を切断されプロインスリンとなる。その後小胞体内でプロインスリン分子内/分子間で3ヶ所のジスルフィド結合が形成され、酸化的に折り畳まれる(酸化的フォールディング)。プロインスリン分子の酸化的フォールディングは小胞体から分泌顆粒への輸送に必須である。酸化的フォールディングは還元ストレスにより阻害されると考えられるが、膵β細胞において還元ストレスがインスリン合成、分泌にどのように影響するかは明らかではない。また、2型糖尿病の発症、進行には酸化ストレスが深く関与することが知られているが、酸化ストレスによる活性酸素種産生亢進はミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの機能異常とそれによるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)の蓄積を引き起こす。NADHの蓄積は還元ストレスを誘導するが、このような還元ストレスの誘導によりインスリンの分泌が低下し得ることが示唆されている。

本研究では、膵β細胞モデルとしてマウスインスリンノーマ由来MIN6細胞株、還元ストレスの誘導剤としてジチオトレイトール(DTT)を用い、還元ストレスがインスリン分子の細胞内動態にどのように影響するかを調べた。さらに、還元ストレス下においてインスリンと細胞内で相互作用する分子として小胞体シャペロンであるカルレティキュリン(CRT)を同定し、CRTが還元ストレス誘導剤によるインスリン分子のフォールディング異常にどのように対処するかについて、*in vitro*アッセイおよびMIN6細胞株を用いて解明を試みた。

【実験方法】

細胞内(プロ)インスリン量、インスリンmRNA発現量及び小胞体ストレスの解析

膵β細胞モデルとして、マウスMIN6細胞株を用いた。MIN6細胞においてDTT処理による還元ストレスを誘導後、細胞内(プロ)インスリン、小胞体ストレスマーカーについてウェスタンブロット法で解析した。また、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法を用いたX-Box結合タンパク質1(XBP-1)のスプライシングの解析により、小胞体ストレスを評価した。マウスインスリン2mRNA発現量はRT-PCR法で解析した。

インスリン翻訳の評価

還元ストレスのインスリン翻訳に対する影響は³⁵S標識L-メチオニン/L-システインによるパルスチェイス法により解析した。

インスリン相互作用分子の同定

還元ストレス誘導下でインスリンと相互作用する小胞体シャペロンの同定は免疫沈降法により行った。

インスリン細胞内動態の解析

還元ストレス誘導下におけるインスリン細胞内動態は抗インスリン抗体、抗CRT抗体及びリソソームマーカーに対する抗体を用いた免疫細胞化学的解析により評価した。

インスリンの凝集に対する CRT シャペロン機能の評価

インスリンの凝集能とそれに対する CRT シャペロン機能は光散乱法及びポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価した。また、マウス組み換え CRT の立体構造は、CRT 分子内のトリプトファン (Trp) 残基の蛍光スペクトル測定及び疎水性プローブ 8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸 (ANS) を用いた分子表面の疎水性度の解析により評価した。

還元ストレス誘導下における細胞内小器官の形態観察

還元ストレス誘導下において、ゴルジ体、小胞体及びインスリン分泌顆粒の形態等がどのように影響を受けるかについては透過型電子顕微鏡による解析で評価した。

【結果】

1. 還元剤によるインスリン凝集化

還元剤存在下でインスリンの凝集が *in vitro* で誘導されることを光散乱法により観察した。

2. 還元ストレス誘導下におけるインスリン細胞内動態の解析

MIN6 細胞において DTT 処理による還元ストレスがインスリン動態に与える影響をウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法で解析した。プロインスリンは DTT 処理の時間及び濃度に依存して減少したが、インスリンの転写は還元ストレスの影響を受けないことが分かった。還元ストレス誘導下の MIN6 細胞では eIF2 α リン酸化および XBP-1 mRNA のスプライシングが共に亢進していたため、小胞体ストレスの誘導が確認された。また、ゴルジ体では還元ストレスによる形態の変化は見られなかったが、粗面小胞体では膨張が認められた。パルスチェイス法による解析ではインスリン翻訳の抑制が観察されたため、還元ストレス誘導下におけるプロインスリン減少は小胞体ストレスによる翻訳抑制が一因であることが示唆された。インスリン分泌量は還元ストレスの誘導の影響を受けないことを ELISA 法及び透過型電子顕微鏡法によるインスリン顆粒の観察により確認した。

3. 還元ストレス誘導下におけるプロインスリン分解機構の解析

還元ストレス下の細胞内 (プロ) インスリン量の減少はプロテアソーム阻害剤 (MG-132) ではなくリソソーム阻害剤 (塩化アンモニウム) により抑制され、リソソーム阻害剤存在下ではプロインスリンがリソソームに局在することも分かった。従って、還元ストレス誘導下でプロインスリンは主にリソソーム経路で分解されると考えられた。

4. 還元ストレス誘導下におけるプロインスリン相互作用分子の探索

還元ストレス下の MIN6 細胞においてプロインスリンのフォールディングを担う分子の同定を免疫沈降法により試みた。BiP とプロインスリンの相互作用に還元ストレス誘導の影響はなく、カルネキシン (CNX)、プロテインジスルフィドイソメラーゼ、ERp57 についてはプロインスリンとの相互作用は見られなかったが、CRT との相互作用が還元ストレス誘導下で亢進した。従って、還元ストレス下でミスフォールドしたプロインスリンが CRT のシャペロン機能の新たな基質である可能性が示唆された。

5. インスリン凝集体に対する CRT シャペロン機能の解析

CRT は小胞体に存在する糖鎖結合活性 (レクチン部位) を持つカルシウム結合性のレクチンシャペロンであり、糖タンパク質と非糖タンパク質の両方にシャペロン機能を発揮することが報告されている。ブタ膵臓インスリンの還元剤存在下における凝集体形成は CRT 共存下で CRT 濃度依存的に抑制された。ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析でも CRT 共存下でインスリンの還元剤によるミスフォールディングが抑制された。

CRT のレクチン部位に親和性を持つ合成糖鎖基質である Glc₁Man₄-biotin によりインスリンに対する CRT のシャペロン機能が低下し、Ca²⁺キレート剤の存在下ではインスリン凝集体に対する CRT のシャペロン機能が上昇した。また、内因性 Trp 蛍光スペクトルや疎水性プローブ ANS を用いた解析から、CRT の構造は還元剤や Ca²⁺の存在の影響を受けることが分かった。以上より、還元ストレスが CRT 構造変化を引き起しインスリン凝集体に対するシャペロン機能が発揮できるようになること、そのシャペロン機能には CRT のレクチン部位とカルシウム結合性の両方が寄与することが示唆された。

6. 還元ストレス誘導下におけるプロインスリン分解は CRT 依存的である

siRNA を用いた CRT 発現抑制により還元ストレス誘導下のプロインスリン分解量が低下したことから、プロインスリンの分解は CRT 依存的であることが示唆された。

【考察】

CRT は小胞体に存在する糖鎖結合活性を持つカルシウム結合性の分子シャペロンであり糖タンパク質品質管理に重要である。一方、CRT はポリペプチド結合部位の存在により糖鎖を持たないミスフォールディングタンパク質を基質とすることも可能となる。本研究では、CRT に対する糖鎖を持たないシャペロン基質として還元ストレス下で凝集したインスリンを新たに同定した。

本研究ではさらに、還元ストレスによりミスフォールドしたプロインスリン分子がリソソーム経路で主に分解されることを発見した。リソソームを介した分泌顆粒中のインスリン分子の分解は主にマイクロオートファジーとクリノファジーによるが、プロインスリンの分解はマクロオートファジーにより行われる。従って、恒常的にインスリンを産生する細胞である膵β細胞では、分泌顆粒中の不要なインスリンを分解する経路と、何らかのストレスで正常なフォールディングに失敗した（プロ）インスリン分子を分解する経路が異なることが示唆された。還元ストレスによりミスフォールドしたプロインスリン分子がどのようにリソソームに運搬、分解されるのかについての解明は今後の課題である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年11月5日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

1. 目的 膵β細胞の機能障害は2型糖尿病病態に密接に関与すると考えられる。膵β細胞は恒常的なインスリン産生により小胞体ストレスへの感受性が高いことが知られる。しかし、小胞体ストレス下のインスリン合成制御機構は十分解明されていない。本研究は、還元ストレスを用いた過剰な小胞体ストレスによるインスリン分子の折りたたみや細胞内動態に対する影響とその制御機構の解明を目的とした。

2. 方法 インスリン分子の折りたたみや細胞内動態に対する還元剤（ジチオトレイトール[DTT]）の影響について、試験管内実験とマウスインスリンノーマ由来MIN6細胞モデルを用いて調べた。

3. 結果 試験管内では還元剤DTTの存在によりブタ膵臓由来インスリンの凝集が誘導された。一方、MIN6細胞においてDTT処理により細胞内プロインスリン量が減少すること、これにはプロインスリン分子のリソソーム経路による分解が関与することが明らかとなった。従って、還元ストレスによるインスリン分子の細胞内でのミスフォールディングと凝集体の積極的な分解機構の誘導が示唆された。

次に、還元ストレス下のMIN6細胞においてプロインスリン分子との相互作用が亢進する分子として小胞体シャペロン・カルレチキュリン（CRT）を同定した。試験管内で、CRTはシャペロン機能を発揮し、還元ストレス下のインスリンの凝集を抑制すること、その機能にはCRTのレクチン部位とカルシウム結合部位の両方が寄与することが分かった。MIN6細胞では還元ストレス下でミスフォールドしたプロインスリンの分解がCRT依存的事であったことから、小胞体ストレスのもとでミスフォールドしたプロインスリン分子に対するCRTの新たなストレス応答機構の存在が示唆された。

4. 結語 本研究により、小胞体ストレス下の膵β細胞におけるインスリン分子のミスフォールディングと凝集の制御に小胞体シャペロンCRTが関与する新たな分子機構の存在が明らかとなった。本成果は糖尿病における膵β細胞のインスリン分泌障害の分子機構の理解に寄与するものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第1001号		
学位授与の日	令和2年12月15日		
氏名	高 真守		
学位論文の題目	Increased large-scale inter-network connectivity in relation to impulsivity in Parkinson's disease (パーキンソン病の衝動性に関連した大規模ネットワーク間の機能的結合性変化に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 中尾 直之	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

本論文の目的は、パーキンソン病の衝動性がどのような脳内ネットワーク異常に関連しているかについて、安静時機能的MRIを用いて明らかにすることである。対象は認知機能正常の特発性PD患者45名および健常対照者21名とした。衝動性の評価はBarratt Impulsiveness Scale (BIS-11)を用いた。BIS-11の下位項目として注意衝動性 (Iat)、運動衝動性 (Im)、無計画衝動性 (Inp) もそれぞれ評価した。安静時機能的MRIはCONN toolboxを用いて、既知の大規模ネットワーク間の機能的結合性を評価した。

衝動性の高いパーキンソン病群は衝動性の低いパーキンソン病群に比べて、右前頭頭頂ネットワーク (right FrontoParietal Network: rFPN) と内側視覚ネットワーク (Medial Visual Network: MVN) 間の機能的結合性が有意に高かった (FDR $p = 0.0315$, $T = 3.55$)。同様にrFPN-MVN間の機能的結合性はBIS-11およびIat、Inpと有意な正の相関を示した。Imのみが異なる傾向を示し、Default Mode Network (DMN)とSalience Network (SN) 間の機能的結合性の減少に関連していた。このDMN-SN間の運動衝動性に関連した機能的結合性低下は、健常対照者でも同様の傾向を示した。一方で、大脳基底核と大規模ネットワークの間の機能的結合性には、衝動性の高いパーキンソン病群と衝動性の低いパーキンソン病群の間に有意差は認めなかった。また3つのグループ間で側坐核と他の密接に関連する領域間の機能的結合性に有意差はなかった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年12月1日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文はパーキンソン病の衝動性亢進に特定の脳内ネットワーク異常が関連していることを初めて示した報告である。rFPNは認知の柔軟なコントロールを行う過程で重要な役割を果たすネットワークであり、MVNとの機能的結合性が亢進していることから、視覚情報を統合処理する過程でのネットワーク異常が、パーキンソン病に特異的な認知衝動性亢進のメカニズムの一つであることが示唆された。また運動衝動性に関しては、パーキンソン病と健常対照者の両者においてDMN-SN間の機能的結合性低下を示しており、こちらに関してはパーキンソン病の病態ではなく、一般的な運動衝動性に関連したネットワーク変化である可能性がある。以上より、この報告は、パーキンソン病の衝動性亢進の病態解明、治療法開発につながる可能性を示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第1002号		
学位授与の日	令和3年2月16日		
氏名	田中 佑典		
学位論文の題目	Association between serum lipids, polyunsaturated fatty acids, and prognosis in maintenance hemodialysis patients (血液透析患者における脂質、多価不飽和脂肪酸と予後との検討)		
論文審査委員	主査	教授	松岡孝昭
	副査	教授	赤阪隆史
			教授 重松隆

論文内容の要旨

【緒言】

維持透析(HD)患者の予後は不良であり、心血管病(CVD)が死因の第一位である。一般人において、CVDの原因は粥状動脈硬化が主な原因であるが、HD患者においては、血管中膜石灰化という病態が関与していることが知られている。一般人において脂質異常症は、CVDの独立したリスク因子であり、スタチン製剤の使用を含めた積極的な脂質低下療法がCVDリスク減少のために推奨されている。しかしながら、HD患者においては脂質異常症とCVDの関係性については一般人と異なる可能性もある。実際、いくつかの試験ではHD患者においては、スタチン製剤により脂質レベルは正常化するものの、有意なCVDリスクの低下は得られなかったと報告されている。また、多価不飽和脂肪酸(PUFA)は一般人においてはCVDリスクとの関連性が報告されているが、HD患者に関しては不明な点も多い。HD患者における脂質、不飽和脂肪酸プロフィールと予後との関連性はいまだ明らかにされておらず、本研究では脂質及び不飽和脂肪酸プロフィールと生命予後、CVDリスクとの関連性を検討したので報告する。

【対象と方法】

2011年6月時点で(医)博文会の維持透析施設3施設において血液透析中の患者460名のうち除外項目を除く420名を対象とした。全死亡、心血管病死、新規の心血管病発症をアウトカムに設定し、2011年6月から2016年6月まで5年間の後ろ向きコホート研究を行った。

血液検査は週初めの透析前に行われる定期検査で行った。血圧及び脈拍数は透析前に測定した。

LDL-C, HDL-C, non-HDL-C レベル及びEPA/AA比を中央値で高値群と低値群の2群に分け、2群間の累積生存率、イベント回避率をKaplan-Meier分析を用いて評価した。また、各アウトカムへのLDL-C, HDL-C, non-HDL-C レベル及びEPA/AA比のハザード比についてCox比例ハザードモデルを用いて解析を行った。

【結果】

患者背景：

平均年齢は65.5歳、平均透析期間は86.9ヶ月であった。39.5%が糖尿病を合併していた。脂質の平均値はそれぞれLDL-C 82.7mg/dL, HDL-C 49.1mg/dL, non-HDL-C 110.5mg/dL, TG 119.4mg/dLであった。またEPA/AA比は中央値0.25と一般人の中央値と比べて低値であった。

結果：

観察期間中に腎移植3名、転院16名、死亡151名となり、観察終了時点では生存250名であった。感染症による死亡(n=45, 29.8%)が最も多く、ついで心血管病死(n=37, 24.5%)が多かった。

Kaplan-Meier分析：

HDL-C高値群は低値群に比べて有意に生存率が高く新規のCVD発症も少なかったものの、LDL-C、non-HDL-Cにおいて、2群間で有意な予後の差は認めなかった。また、EPA/AA比の高値群は低値群に比べて有意に生存率が低かった。

単変量及び多変量Cox比例ハザードモデル分析：

単変量解析ではHDL-Cレベルは、全死亡と新規のCVD発症の有意な関連因子(全死亡:HR 0.64、新規CVD発症:HR 0.59、ともにP<0.01)であった。LDL-C、non-HDL-Cにおいては有意な差は認め

られなかった。また、EPA/AA 比は全死亡、心血管病死の有意な関連因子（全死亡:HR 1.67 P<0.01、心血管病死:HR 1.93、P<0.05）となった。

多変量解析では最終的にHDL-C レベルは、新規のCVD発症の独立した関連因子（新規CVD発症:HR 0.66、P<0.05）であった。EPA/AA 比は多変量解析において有意な差は認められなかった。

【考察】

本研究では HDL-C レベルは独立した新規 CVD イベント発症の関連因子であったが、LDL-C レベルや non-HDL-C レベルは生命予後や CVD リスクの有意な関連因子にはならなかった。この結果は、血管中膜石灰化（メンケベルグ型動脈硬化症）といった HD 患者特有の血管病変を反映している可能性がある。HD 患者における心血管病は血管石灰化に代表される骨ミネラル代謝異常によるところが大きく、血管石灰化の程度は生命予後と関連していることが知られており、HD 患者において LDL-C、non-HDL-C と生命予後、CVD 予後と直接関連性がなかった結果になった可能性があると考えられる。

また、本研究における脂質プロフィールをみると一般的な脂質異常症を呈した患者は少なく、患者の栄養状態を反映していた可能性もあると考える。一般人に限らず、HD 患者においても低栄養は強い予後不良因子であり、低栄養は血管石灰化の高リスクであり、生命予後との関連性が報告されている。本研究の結果に低栄養という病態が影響している可能性は否定できない。

また、多価不飽和脂肪酸の代表的な指標である EPA/AA 比は多変量解析後では有意差が認められなかったものの、単変量解析では既存の報告とは異なり、低値群で予後が良好であった。本研究の患者では EPA/AA 比が一般人の報告されている中央値と比べても低値（中央値 0.25）であり、高値と考える患者が少数であった事が影響している可能性があると考えられた。さらに食生活の影響のためか若年ほど EPA/AA 比が低く、年齢の影響を強く受けていた事も本研究の結果に大きく関与していた可能性があると考えられた。

【結語】

HD 患者においては LDL-C レベルや non-HDL-C レベルは生命予後や CVD リスクの有意な因子にはならないものの HDL-C レベルは新規の CVD 発症の関連因子になりうる。HD 患者における脂質、多価不飽和脂肪酸プロフィールと生命予後、CVD リスクとの関連は一般人と異なる可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年1月26日、28日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

維持透析(HD)患者の予後は不良であり、心血管病(CVD)が死因の第一位である。非 HD 患者において脂質異常症は、CVD の独立したリスク因子であり、スタチン製剤の使用を含めた積極的な脂質低下療法が CVD リスク減少のために推奨されている。しかしながら、HD 患者においては、スタチン製剤による脂質低下療法を新たに開始しても有意な CVD リスクの低下は得られないことが知られている。また、多価不飽和脂肪酸(PUFA)は非 HD 患者においては CVD リスクとの関連性が報告されているが、HD 患者に関しては不明な点も多い。HD 患者における脂質、多価不飽和脂肪酸プロフィールと予後との関連性はいまだ明らかにされておらず、その関連性の検討は HD 患者の予後改善の観点から必要であると考えられる。

本研究では HD 患者における脂質及び多価不飽和脂肪酸プロフィールと生命予後、CVD リスクとの関連性を検討するため、(医)博文会の HD 患者 420 名を対象に、全死亡、心血管病死、新規の心血管病発症をアウトカムに設定し、2011 年 6 月から 2016 年 6 月まで 5 年間の後ろ向きコホート研究を行った。

Kaplan-Meier 分析の結果、HDL-C 高値群は低値群に比べて有意に生存率が高く新規の CVD 発症も少なかったものの、LDL-C、non-HDL-C においては、2 群間で有意な予後の差は認めなかった。また、EPA/AA 比の高値群は低値群に比べて有意に生存率が低かったが、年齢の影響が大きく年齢で調整を行うと有意差はなくなった。

続いて、COX 比例ハザードモデルを用いて各アウトカムの関連因子の検討を行った。多変量解析の結果、HDL-C レベルは独立した新規 CVD イベント発症の関連因子であったが、LDL-C レベルや non-HDL-C レベル、EPA/AA 比レベルは生命予後や CVD リスクの有意な関連因子にはならなかった。

以上の結果から、HD 患者においては LDL-C や non-HDL-C は CVD リスクの有意な関連因子にはならないものの、HDL-C レベルは CVD イベント発症の予測因子になりうることが示された。CVD リスクの層別化に HDL-C が有用かという点については、海外の HD 患者のコホート研究からは否定的である。しかし、HDL は炎症や酸化ストレスにより機能性 HDL から機能不全 HDL へと変化することが知られており、海外の HD 患者の炎症マーカーは一般的に高値であるため、HDL-C レベルが CVD イベントの予測因子にならなかったのだらうと推測される。本研究では、海外の既存研究の結果とは異なり、HDL-C レベルが CVD イベント発症の予測因子になりうることが示された。

本研究は、HD 患者においても HDL-C レベルが、新規の CVD イベント発症の予測因子になりうることを示した臨床的に意義深いものであり学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第1003号		
学位授与の日	令和3年3月9日		
氏名	利光 充彦		
学位論文の題目	Clinical Presentation of Preterm Infants with Ventricular Septal Defect (心室中隔欠損症合併早産児の臨床的特徴)		
論文審査委員	主査	教授 赤坂隆史	
	副査	教授 井篁一彦	教授 鈴木啓之

論文内容の要旨

【緒言】

心室中隔欠損症（VSD）は正期産児で最も多い先天性心疾患であり、1000 出生のうち 0.4～3.3 人の割合で出生すると報告されている。正期産児では、新生児期には無症状～軽症で治療介入を要することは少なく、中等度 VSD 以上では多呼吸や体重増加不良、心不全などの治療を要する症状が新生児期を過ぎてから出現することが多い。

最近の医療の発展により低出生体重児、特に 1500g 未満の極低出生体重児の生存率が向上している。先天性心疾患を合併した極低出生体重児の割合や予後を報告した文献も散見されており、極低出生体重児に最も合併する先天性心疾患も VSD である。

しかし、VSD を合併した早産児のケースレポートはほとんど存在しない。VSD の大きさによる症状の出現時期や手術の必要性などのデータは存在しない。今回我々は 18 年間を後方視的に検討し、NICU に入院した VSD 合併早産児の症状や治療経過をまとめ、報告する。

【対象】

- 1) 期間は 2000 年 1 月から 2017 年 12 月。
- 2) (国内留学先である) 神奈川県立こども医療センターの NICU に入院した在胎 32 週未満の早産児を対象とした。これらのうち isolated VSD を合併した児を本研究の対象とした。胎児期には卵円孔と動脈管は全ての児で開存しているため、これらの開存については心疾患と判断していない。
- 3) 13 トリソミーや 18 トリソミー、多発奇形症候群などの予後不良疾患は検討から除外した。平均寿命が 60 歳を超える 21 トリソミーは今回の研究に含めた。

【方法】

1) 評価の時期・頻度

すべての早産児は生後 2-3 時間以内にエコーを用いて評価した。急性期の生後 1 週間程度は 1 日 3 回以上のエコーを行い、患児の状態を評価した。

2) VSD のサイズ (径)

VSD の直径はエコーの四腔断面像、短軸像、長軸像で測定し、最大径を採用した。早産児において、VSD 径 ≥ 2 mm が合併症を引き起こしやすいと臨床的経験から判断した。そのため、我々は VSD ≥ 2 mm と VSD < 2 mm の 2 群に分けて検討した。

3) VSD の位置

VSD を Kirklin 分類に従って 4 つに分類した。Kirklin I 型を円錐部欠損型、Kirklin II 型を膜様部欠損型、Kirklin III 型を心内膜症欠損型、Kirklin IV 型を筋性部欠損型と分類した。

4) 治療介入基準

我々は症状や検査異常があるときに内科的治療介入を行った。心雑音や尿量減少、浮腫、体重増加不良などの症状を認める場合や、レントゲンによる肺うっ血やそれに伴う高炭酸血症、心エコーによる左房や左室の拡大などの検査異常を認めたときに内科的治療を行った。内科的治療は水分制限や人工呼吸管理、薬物療法などを行った。

内科的治療で効果が不十分なときに外科的治療介入を行った。肺動脈絞扼術 (PAB) や動脈管結紮術 (PDA ligation)、PAB+PDA ligation のいずれかを小児循環器科と相談し決定した。

【結果】

1) 対象症例

18年間にNICUに入院した32週未満の早産児は1124例。これらのうち、isolated VSDを合併した児が32例。除外基準例に当たる9例を除いた計23例を対象とした。

2) VSD合併早産児23例

23人の在胎週数は中央値29.4週(25.0~31.3週)、出生体重の中央値924g(524g~1526g)であった。サイズによる内訳はVSD<2mmが9例、VSD≥2mmが14例であった。欠損部位による内訳は13例が膜様部、8例が筋性部、2例が膜様部と筋性部を合併していた。円錐部欠損型と心内膜症欠損型の症例は認めなかった。

3) VSD<2mm未満の9例

筋性部の症例が8例で膜様部は1例であった。症候性PDAを呈した症例はなく、VSDに対する治療(内科的にも外科的にも)を要した症例はなかった。VSDの自然閉鎖は7例(77.8%)に認め、残りの筋性部の2例は退院時に縮小傾向且つ非症候性のためフォローされていなかった。

4) VSD≥2mmの14例

14例のうち、1例(7.1%)はVSDに対する治療は行われず、5例(35.7%)で内科的治療のみが行われ、8例(57.1%)で内科的・外科的治療が行われた。外科的介入はVSD≥2mm群の方がVSD<2mm群と比較して有意に多かった(p=0.007)。

4-1) VSD≥2mm且つ非手術群の6例

VSDに対する治療に関しては、1例は施行せず、1例は水分制限のみ、1例は人工呼吸管理、2例は利尿剤+人工呼吸管理、1例は利尿剤+ACE阻害薬を投与した。PDAは5例で自然閉鎖し、1例は薬物療法により閉鎖した。5例(83.3%)は重症合併症を来さなかったが、21トリソミーの1例は肺出血、壊死性腸炎の合併症を発症し死亡した。

4-2) VSD≥2mm且つ手術群の8例

PABのみが2例、PDA ligationのみが3例、PAB+PDA ligationが3例であった。6例でPDA ligationが施行された。重症合併症を3例で認め、2例は肺出血と脳室内出血の両方を来し、1例は肺出血を合併した。

5) 本研究の結果のまとめ

VSD≥2mm群14例では8例で手術を施行し、VSD<2mm群では手術例はなかった。VSD≥2mm群ではVSD<2mm群に比べて有意に手術介入を必要とする症例が多かった(p=0.007)。

VSD≥2mm群14例では動脈管結紮術を要した症例は6例であり、VSD<2mm群では手術例はなかった。VSD≥2mm群ではVSD<2mm群に比べて、有意に症候性動脈管開存症を来しやすかった(p=0.048)。

【考察】

本研究ではVSDを合併した早産児について報告した。

正期産児においてVSD≥5mmであれば手術介入が必要と報告する文献があり、今回我々は正期産児の平均体重、平均身長から体表面積を算出し、本研究の23例の平均体表面積を算出。これで計算すると正期産児のVSD5mmは本研究の早産児のVSD2.48mmに該当し、本研究が2mm以上と未満で分けたことは妥当性があると考えた。

早産児の症候性PDAは肺出血や壊死性腸炎、脳室内出血などの重症合併症を引き起こすことが知られている。本研究では動脈管結紮術を要した6例のうち3例で重症早産合併症(肺出血、脳室内出血)を引き起こした。VSD合併早産児では症候性PDAも呈しやすく、重症早産合併症を引き起こすリスクがあるので、動脈管結紮術やPABなどの迅速な外科的介入を検討すべきである。ラットの新生仔においてANP濃度依存性に出生後の動脈管が再開通する文献がある。ヒトでも早産児のVSD合併により心不全マーカーであるANPやBNP濃度が上昇することにより、動脈管を開存させる可能性があることが示唆された。

【結語】

(在胎32週未満の)早産児にVSDを合併した場合、特にVSD≥2mm以上のときは手術療法を含めた速やかな治療介入が必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年2月19日、22日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

心室中隔欠損症（VSD）は正期産児で最も多い先天性心疾患である。最近の医療の発展により、低出生体重児、特に1500g未満の極低出生体重児の生存率が向上している。極低出生体重児に最も合併する先天性心疾患もVSDであるが、VSDを合併した早産児についての論文はほとんどない。本研究ではNICUに入院した在胎32週未満の早産児にVSDを合併した23例について、症状や治療経過について検討した。

VSD合併早産児23例の在胎週数は中央値29.4週（25.0～31.3週）、出生体重は中央値924g（524～1526g）であった。欠損孔のサイズによる内訳はVSD<2mmが9例、VSD \geq 2mmが14例であった。欠損部位による内訳は13例が膜様部、8例が筋性部、2例が膜様部と筋性部を合併していた。円錐部欠損型と心内膜症欠損型の症例は認めなかった。

VSD<2mm未満の9例では症候性動脈管開存症（PDA）を呈した症例はなく、VSDに対する治療（内科的にも外科的にも）を要した症例はなかった。VSD \geq 2mmの14例では1例がVSDに対する治療は行われず、5例で内科的治療のみが行われ、8例で内科的・外科的治療が行われた。外科的介入はVSD \geq 2mm群の方がVSD<2mm群と比較して有意に多かった（ $p=0.007$ ）。

VSD \geq 2mm群で非手術群の6例ではPDAは5例で自然閉鎖し、1例は薬物療法により閉鎖した。手術群の8例の手術内容の詳細は肺動脈絞扼術（PAB）のみが2例、動脈管結紮術（PDA ligation）のみが3例、PAB+PDA ligationが3例であった。6例でPDA ligationが施行された。VSD \geq 2mm群ではVSD<2mm群に比べて、有意に症候性動脈管開存症を来しやすかった（ $p=0.048$ ）。

本研究ではVSDを合併した早産児について報告した。正期産児においてVSD \geq 5mmであれば手術介入が必要と報告する文献があり、今回我々は正期産児の平均体重、平均身長から体表面積を算出し、本研究の23例の平均体表面積を算出。これで計算すると正期産児のVSD5mmは本研究の早産児のVSD2.48mmに該当し、本研究が2mm以上と未満で分けたことは妥当性があると考えた。

以上より、在胎32週未満の早産児にVSDを合併した場合、特にVSD \geq 2mmのときは手術療法を含めた速やかな治療介入が必要であることが示された。本研究により、臨床的な治療介入基準を示したことは学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第1004号		
学位授与の日	令和3年3月23日		
氏名	垣田 真里		
学位論文の題目	The prevalence of ulnar neuropathy at the elbow and ulnar nerve dislocation in recreational wheelchair marathon athletes		
論文審査委員	主査	教授 山田 宏	
	副査	教授 朝村 真一	教授 田島 文博

論文内容の要旨

【諸言】

近年、車いすスポーツの身体・精神機能の向上に対する効果が報告されており、低活動となりやすい車いす障がい者において、その重要性が認知されつつある。しかし一方で、車いすスポーツによる、上肢への過度な負担も懸念される。肘部尺骨神経障害(ulnar neuropathy at the elbow=以下 UNE)は手根管症候群について 2 番目に頻度の高い上肢末梢絞扼性神経 障害と言われている。健常者における UNE の有病率は 1.8 - 5.9 と報告がある。上肢を酷使する車いす障がい者では、UNE リスクは健常者に比して高まると予想される。これまで、車いすアスリートにおける、UNE 有病率は 25 - 39 % との報告があるが、非常にまれでその実態は不明である。これまで、尺骨神経脱臼は UNE のリスクとして報告されている。肘屈曲時に脱臼による摩擦で神経障害を引き起こしうるといわれており、車いす走行では、そのリスクは高まる可能性がある。しかし、車いす障がい者において UNE や尺骨神経脱臼の有病率に関する研究もほとんどない。そこで、今回、車いすマラソンアスリートにおける UNE と尺骨神経脱臼の有病率を調査した。

【対象と方法】

対象は、第 37、38、39 回大分国際車いすマラソン大会の参加選手で、大会前日にエントリー会場にてリクルートし、本検診・研究の参加の同意を得られた者とした。日本語が話せない選手、頸髄損傷などの頸髄疾患を有する選手、すでに診断の付いている UNE 以外の上肢神経筋疾患を有する選手、6 カ月以内の肘の外傷・手術歴を有する選手が除外とした。検診はアンケート調査、身体診察、超音波検査を実施した。アンケート内容は、年齢、性別、身長、体重、BMI、原疾患診断名・罹患期間、既往歴、利き手、車いすマラソン競技歴、他車いすスポーツ競技歴、車いすスポーツ外傷歴の有無、練習頻度・時間、筋トレの頻度、上肢のしびれや疼痛の有無・部位・期間・治療歴の有無とした。身体診察では、UNE 所見と尺骨神経脱臼の有無について診た。UNE は、以下の所見のいずれかを認めた場合とした。 a)尺骨神経領域のしびれ or リングスプリットサイン陽性 b)肘部管でのチネルサイン陽性 c)フローメントサイン陽性 or 第一背側骨間筋もしくは小指外転筋の麻痺。尺骨神経脱臼の診断は超音波検査でおこなった。尺骨神経が肘屈曲時に内側上顆を完全に乗り上げる場合に完全脱臼、内側上顆の頂点でとどまっていた場合に亜脱臼と診断した。データの解析は、人口統計学的項目、アンケート項目、尺骨神経亜脱臼・脱臼について、UNE を認める群、UNE を認めない群の 2 群間で比較検討した。いずれの解析も P 値 0.05 以下で有意差有りとした。解析ソフトは JMP® pro version 14.1 (SAS Institute Inc.)を使用した。

【結果】

38 人が対象となった。平均年齢は 50 歳で、男性 37 人、女性 1 人とほとんどが男性であった。原疾患の罹患歴は平均 29 年であった。UNE ありの群となしの群とで比較すると、年齢、性差、身長、体重、BMI、原疾患罹患歴に有意差はなかった。UNE は 11 人、全選手の 28.9 %に認めた。UNE 診断に至った所見をみると、①しびれを 4 人、①ring split sign を 3 人、②肘部管 Tinel sign を 10 人に認め、③フローメントサイン陽性 or 第一背側骨間筋もしくは小指外転筋の麻痺または筋委縮などの運動障害所見を認めたのは 0 人であった。アンケート結果より、他競技歴について、UNE なしの群では、有りと答えた選手が 44 %いたのに対し、UNE ありの群では 9 %であり、UNE 群において、他競技歴のある選手は有意に少なかった。車いすマラソン歴、スポーツ外傷歴、練習頻度、筋力トレ

ニングに両群間で差はなかった。練習頻度は全体平均で3回/週で、練習時間は1.6時間/回であった。筋力トレーニングをすると答えた選手は全体の12人、31%と少なく、練習内容は車いす走行がメインであった。尺骨神経脱臼は全選手のうち8人、21%に認め、亜脱臼は全選手のうち9人、23.6%に認めた。尺骨神経脱臼・亜脱臼は、UNEを認める肘の64%に認め、UNEを認めない肘と比較して有意に多く認めた。(x²乗検定、p=0.0003)

【考察】

今回の車いすマラソン選手のUNE有病率は、これまでの報告されている他の車いすアスリートと同等であり、健常成人より多く、非アスリートの下肢機能障がい者より少なかった。肘屈曲時に、肘部管内の圧は7倍となり、尺側手根屈筋の収縮を伴えば20倍にも及ぶと言われており、尺骨神経絞扼によるUNE発症のリスクは高まる。車いす駆動では、肘屈曲と伸展を繰り返すため、健常者よりもそのリスクにさらされる機会が多いといえる。近年、肥満、糖尿病、喫煙はUNEのリスク因子であると言われていたが、今回の検診で、多くの選手らは1時間半の有酸素運動を週3回継続実施していることが判明した。日ごろのトレーニングが、UNEリスクである糖尿病、肥満の予防につながっている可能性が考えられた。一方で、アスリートではスポーツ傷害が懸念されるが、今回のアンケート調査結果より、他競技歴のある選手のほうがUNEは少なかったことが判明した。スポーツによるUNE発症予防への何らかの貢献が示唆された。今回の検診では、UNEを疑われた選手らにしびれなどの自覚症状のあった選手は4人と少なく、その他の7人は今検診で初めて指摘された。また、運動障害を示したUNE選手はいなかった。肘検診の重要性が示唆された。亜脱臼・脱臼の頻度について、車いす障がい者における頻度を報告した文献はない。健常人において超音波画像検査による亜脱臼は21~27%、脱臼は8.5~20%の頻度で認めると報告がある。今回の結果は、健常成人と同等であった。今回の結果では、UNE肘において脱臼は64%と、UNEを認める肘に尺骨神経脱臼を高頻度に認めた。尺骨神経脱臼とUNEの関係については一定の見解を得ていない。今回の結果で尺骨神経脱臼・亜脱臼は、UNEを認める肘においてより多く認め、我々も、尺骨神経亜脱臼・脱臼のUNEの影響はありうると考える。検診においてはUNEとともに尺骨神経脱臼、亜脱臼を診る必要がある。

【結語】

車いすマラソン選手におけるUNE有病率は、健常者よりは高かったが、非アスリート下肢機能障がい者より低かったことから、スポーツのUNEに対する何らかの予防的な効果が示唆された。尺骨神経脱臼をUNEで高頻度に認めたことから、尺骨神経脱臼はUNEの何らかのリスク因子である可能性が示唆された。車いす障がい者における肘検診では、UNEとともに尺骨神経脱臼についても診る必要がある。

本研究は、14th ISPRM World Congress and 53rd AAP Annual Meeting (2020.3.6)、第4回日本リハビリテーション学会秋季学術集会(2020.11.20)で発表した。
また、PLOS ONEに掲載予定である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和3年3月4日、8日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

肘部尺骨神経障害(Ulnar Neuropathy at the Elbow=UNE)は、一般的に2番目に頻度の高い上肢神経障害であり、スポーツ傷害としても報告されている。車いす障がい者にとって、手の内在筋を広く支配する尺骨神経の障害予防は非常に重要である。従来、肘へのメカニカルストレスはUNEのリスク因子と言われている。また、尺骨神経脱臼もUNEのリスクと言われている。しかし、車いす障がい者においてUNEや尺骨神経脱臼の有病率に関する研究もほとんどない。そこで申請者らは、車いすマラソンアスリートにおけるUNEと尺骨神経脱臼の有病率を調査した。検診はアンケート調査、身体診察、超音波検査を実施した。UNEは、以下の所見のいずれかを認めた場合とした。a)尺骨神経領域のしびれ、またはリングスプリットサイン陽性、b)肘部管でのチネルサイン陽性、c)フローメントサイン陽性、または第一背側骨間筋もしくは小指外転筋の麻痺。尺骨神経脱臼の診断は超音波検

査でおこなった。

車いすアスリート 38 人が対象となった。UNE は全選手の 28.9 %に認め、この頻度は健常者よりは高く、非アスリートの下肢機能障がい者(下腿切断、ポリオ患者ら)より低かった。また、アンケート結果より、他のスポーツに従事している選手ほど UNE が少なかった。選手たちの練習内容は、筋力トレーニングよりも走行練習がメインであり、平均で 1 時間半/回を週 3 回実施していた。これらの事からスポーツの UNE に対する何らかの予防的な効果が示唆された。尺骨神経脱臼は全選手の 21 %に、亜脱臼は全選手の 23.6 %に認めた。尺骨神経脱臼・亜脱臼は、UNE を認める肘の 64 %に認め、UNE を認めない肘と比較して有意に多く認めた。車いす障がい者における肘検診では、UNE とともに尺骨神経脱臼についても診る必要がある。今回、UNE を指摘された選手だちのほとんどは、本検診で初めて指摘されており、また麻痺などの運動所見で指摘された選手はいなかったことから検診が早期発見に寄与する可能性が示唆された。

以上より、スポーツ参加をしている車いすマラソン選手は、運動は継続しており、運動の効果は得られている可能性があった。しかし、練習の方法や実施は単独で行っているため、検診などの適切なメデイカルチェックが必要と考えられた。

本論文は、車いすマラソンアスリートにおける UNE と尺骨神経脱臼の有病率について調べた世界で初めての論文であり、車いす障がい者の安全なスポーツ参加や健康増進につながる事を期待できることから学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第1005号		
学位授与の日	令和3年3月23日		
氏名	高畑 昌弘		
学位論文の題目	Prevalence, features, and prognosis of artery-to-artery embolic ST-segment-elevation myocardial infarction: an optical coherence tomography study (冠動脈間塞栓からの ST 上昇型心筋梗塞の頻度、特徴および予後 : OCT による検討)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 加藤 正哉	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【諸言】

ST 上昇型心筋梗塞(STEMI)を含む急性冠症候群(ACS)は冠動脈内の血栓形成が主な原因となる。ACS を引き起こす主な原因は、以前の病理学や光干渉断層法(optical coherence tomography : OCT)の研究ではプラーク破綻 (plaque rupture : PR) が 60-70%、プラークびらん (plaque erosion : PE) が 30-40%、石灰化結節 (calcified nodule : CN) が 3-8%、その他の原因が 1-17%と報告されている。その他の原因の一つとして冠動脈塞栓があるが、直接型、奇異性、および医原性に分類される。直接型の塞栓源として左心耳内血栓が最も多く (58%)、左室内(25%)、大動脈弁もしくは僧帽弁 (15%)が続くが、冠動脈近位部に生じた血栓による塞栓から生じる STEMI(artery-to-artery embolic ST-segment-elevation myocardial infarction ; AAEMI)も稀ながら存在する。しかしながら、AAEMI の頻度や予後も含めた特徴は明らかでない。本研究の目的は、OCT を用いてそれらを明らかにすることである。

【方法】

1. 対象

2014 年 5 月から 2018 年 4 月の間に和歌山県立医大附属病院で STEMI の診断で入院し、緊急冠動脈造影検査を施行し、経皮的冠動脈形成術(Percutaneous Coronary Intervention:PCI)前に OCT を施行した 297 例(AAEMI 10 例、PR 193 例、PE 67 例、CN 27 例)を対象とした。

2. OCT イメージングと PCI

冠動脈造影検査にて STEMI の責任病変を同定し、引き続きカテーテルインターベンション前に OCT イメージングを施行した。OCT カテーテル (Dragonfly OPTIS, Abbott Vascular or Fastview, Terumo) を病変の遠位部まですすめ、造影剤注入により冠動脈内の赤血球を除去した上でイメージング収集を施行した。赤血球除去不十分の場合は血栓吸引カテーテルによる血栓除去もしくは直径 2.0mm 以下のバルーンにて病変の拡張をおこなった。OCT を施行した後、必要な場合薬剤溶出性ステントの留置を行った。

3. AAEMI の定義

冠動脈近位部の PR で形成された血栓が遠位部へ遊走し塞栓を生じる病態を AAEMI と名付けた (Fig.1)。AAEMI の定義は①冠動脈造影上に TIMI 血流分類 2(造影遅延を認めるが末梢まで造影される)以下の STEMI、②OCT 上閉塞部位に PR、PE、CN を認めない、③近位部の責任部位に新鮮血栓を伴う PR を認める、④閉塞部位から責任部位まで 30mm 以上離れている、⑤心房細動やその他心内血栓を認めない、とした (Fig.2)。

4. OCT イメージ解析

責任病変を PR、PE、CN、AAEMI に分類した。脂質角度、薄い線維性皮膜を持つアテローム(thin-cap fibroatheroma; TCFA)などを評価した。またプラーク破裂部の血管内腔の断面積および閉塞部位での血管内腔の断面積を計測した。

5. 統計学的解析

カテゴリーは頻度で表示し、4 群間の比較には χ^2 検定または Fisher 検定を用いた。連続変数は中央値(四分位)で表示し、4 群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。多群比較は Steel-Dwass 検定

を用いた。いずれも $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

【結果】

AAEMI の頻度は 3.4% (Fig 3)、AAEMI の 60% は右冠動脈が責任血管病変であった。AAEMI 群では PR、PE、CN 群と比較し責任病変の最小内腔面積が大きかった (4.0mm^2 [IQR: 2.2 to 4.9] vs. 1.0mm^2 [IQR: 0.8 to 1.3] vs. 1.0mm^2 [IQR: 0.8 to 1.1] vs. 1.1mm^2 [IQR: 0.7 to 1.6], $p < 0.001$)。プラーク破裂部位の内腔面積は AAEMI 群で PR 群と比較し大きかった (4.4mm^2 [IQR: 2.5 to 6.7] vs. 1.5mm^2 [IQR: 1.0 to 2.4], $p < 0.001$)。AAEMI 群では閉塞部位の最小内腔面積は 1.2mm^2 であった [IQR: 1.0 to 2.1] (Table 1)。AAEMI の 40% はステントを使用しない再灌流治療が施行された。また AAEMI において 3 年間の主要心血管イベントを認めなかった。

【考察】

1. AAEMI の頻度

動脈間塞栓症は脳神経系の概念である。動脈間脳梗塞は 7 から 18% の頻度であるが、AAEMI は 3.4% と低かった。理由の一つとしては血管径の違い (内頸動脈、椎骨動脈は 4-6mm、冠動脈は 2-4mm) である、血管径の細い冠動脈はより近位部で閉塞しやすい可能性が考えられる。もう一つの理由としては血栓は動的で減ったり増えたりしている、そのため冠動脈造影を行なった際は自然経過の一時点を見ているだけであり、実際の頻度が多い可能性が考えられる。

2. AAEMI の特徴

AAEMI の特徴として 10 症例中 6 例で責任冠動脈が右冠動脈であった。その理由としては右冠動脈の流速が左冠動脈と比較し遅い、そのため遠位部での血栓形成を促進したことが考えられる。本研究では PR と比較して AAEMI ではプラーク破裂部の内腔はより大きかった。我々は以前に STEMI 症例では、NSTEMI や無症候性冠動脈疾患と比較して、プラーク破裂部位の内腔が小さいことを報告した。この結果はプラーク破裂部の内腔が小さいことが ACS を引き起こす重要な因子の一つであると考えられる。

3. 本研究の問題点

TIMI 血流分類が 2 以下の患者に、OCT 前に血栓吸引手技と直径 2.0mm 未満のバルーンを使用したバルーン血管形成術を実施した。これらは、責任病変の形態を変更した可能性がある。

残存血栓はその背後にあるプラークの解析に影響を与える可能性がある。特に、PR と非 PR の区別が難しくなる可能性がある。しかし、大量の血栓を含む OCT 画像の質が悪いと除外された患者の数は少なかった。

AAEMI の患者 (わずか 10 症例) を対象にした、サンプルサイズが小さい単一施設で OCT レジストリデータベースを使用した後ろ向き研究であった。したがって、AAEMI の有病率 (3.4%) とその特徴に関して選択バイアスの存在を完全に排除できなかった。より大規模な臨床試験を行う必要がある。

【結論】

STEMI 患者において AAEMI は 3.4% の原因であり、内腔面積がプラーク破裂部位では大きく、閉塞部位では小さいといったユニークな形態学的特徴をもっていた。また長期予後は良好であった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 3 年 3 月 10 日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め論文審査を行なった。

ST 上昇型心筋梗塞 (ST-segment-elevation myocardial infarction ; STEMI) を含む急性冠症候群 (acute coronary syndrome; ACS) は冠動脈内の血栓形成が主な原因となる。ACS を引き起こす主な原因は、以前の病理学や光干渉断層法 (optical coherence tomography : OCT) の研究ではプラーク破綻 (plaque rupture : PR) が 60-70%、プラークびらん (plaque erosion : PE) が 30-40%、石灰化結節 (calcified nodule : CN) が 3-8%、その他の原因が 1-17% と報告されている。その他の原因の一つとして冠動脈塞栓があるが、直接型、奇異性、および医原性に分類される。直接型の塞栓源として左心耳内血栓が最も多く (58%)、左室内 (25%)、大動脈弁もしくは僧帽弁 (15%) が続くが、冠動脈近位部

に生じた血栓による塞栓から生じる STEMI(artery-to-artery embolic ST-segment-elevation myocardial infarction ; AAEMI)も稀ながら存在する。しかしながら、AAEMI の頻度や予後も含めた臨床的、形態的特徴は明らかでない。

本論文の目的は、OCT を用いて AAEMI の病態ならびに臨床的特徴を明らかにすることである。

2014 年 5 月から 2018 年 4 月の間に和歌山県立医大附属病院で STEMI の診断で入院し、緊急冠動脈造影検査を施行し、経皮的冠動脈形成術(Percutaneous Coronary Intervention;PCI)前に OCT を施行した 297 例(AAEMI 10 例、PR 193 例、PE 67 例、CN 27 例)を対象とした。AAEMI は冠動脈近位部の PR で形成された血栓が遠位部へ遊走し塞栓を生じる病態を AAEMI と名付けた。AAEMI の定義は①冠動脈造影上に TIMI 血流分類 2(造影遅延を認めるが末梢まで造影される)以下の STEMI、② OCT 上閉塞部位に PR、PE、CN を認めない、③近位部の責任部位に新鮮血栓を伴う PR を認める、④閉塞部位から責任部位まで 30mm 以上離れている、⑤心房細動やその他心内血栓を認めない、とした。

結果は AAEMI の頻度は 3.4%、AAEMI の 60%は右冠動脈が責任血管病変であった。AAEMI 群では PR、PE、CN 群と比較し責任病変の最小内腔面積が大きかった(4.0mm²[IQR: 2.2 to 4.9]vs. 1.0mm²[IQR: 0.8 to 1.3] vs.1.0mm²[IQR: 0.8 to 1.1] vs. 1.1mm²[IQR:0.7 to 1.6], p<0.001)。プラーク破裂部位の内腔面積は AAEMI 群で PR 群と比較し大きかった (4.4mm²[IQR: 2.5 to 6.7] vs. 1.5mm²[IQR: 1.0 to 2.4], p<0.001)。AAEMI 群では閉塞部位の最小内腔面積は 1.2mm²であった [IQR:1.0 to 2.1]。AAEMI の 40%はステントを使用しない再灌流治療が施行された。また AAEMI において 3 年間の主要心血管イベントを認めなかった。

本論文は、AAEMI の臨床的特徴、OCT による形態的特徴を明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。