

論文審査結果の要旨

【背景】

C型慢性肝炎の genotype1 高ウイルス量例に対する標準的な治療はペグインターフェロン+リバビリン併用療法である。近年アメリカ・日本から宿主側因子として IL28B の SNPs がペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果予測として有用であると報告されている。

【目的】

IL28B とペグインターフェロン+リバビリン併用療法をうけた HCV ジェノタイプ 1 型高ウイルス量患者の効果との関連について検討した。

【対象および方法】

2005 年 1 月から 2008 年 12 月まで、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法をうけた HCV ジェノタイプ 1 型高ウイルス量患者 122 人の臨床経過及び検査経過につき検討した。またその結果につき単変量及び多変量解析でも検討した。

【結果】

122 人中 63 人 (51.3%) がウイルス学的著効 (SVR: sustained virological response) を得た。rs8099917 の genotype TT では有意に高い SVR 率であった (p<0.001)。単変量解析では、BMI、線維化、アルブミン、総コレステロール、総ペグインターフェロン投与量、リバビリン投与量、rs8099917 が、有意な SVR に寄与する因子であった。多変量解析では、rs8099917 (オッズ比 7.434, 95%CI 2.278-24.257, p=0.001) 及び総ペグインターフェロン投与量 (オッズ比 7.162, 95%CI 1.565-28.15, p=0.007) が独立した SVR に寄与する因子であった。

【考察および結語】

genotype TT の SVR 率は genotype non-TT に比べて有意に高かった。またその genotype TT であっても総ペグインターフェロン投与量で 80% 以上が必要であることが示唆された。rs8099917 の genotype と総ペグインターフェロン投与量はペグインターフェロン+リバビリン併用療法をうけた HCV ジェノタイプ 1 型高ウイルス量患者の効果との関連があった。

【論文全体の評価】

この研究によって、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法をうけた HCV ジェノタイプ 1 型高ウイルス量患者のウイルス学的著効に IL28B と総ペグインターフェロン投与量が寄与する因子であることを明らかにした。本論文は Digestion の 2011 年 suppl 1 に掲載され、学位授与に値する論文と考えられる。

|             |  |
|-------------|--|
| 氏名          | 児玉 彰   |
| 学位の種類       | 博士 (医学)  |
| 学位記番号       | 医第 1080 号  |
| 学位授与の日付     | 平成 24 年 3 月 22 日   |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 5 条第 1 項該当   |
| 学位論文題目      | urokinase-type plasminogen activator および urokinase-type plasminogen activator receptor (遺伝子欠損マウスにおける角膜上皮創傷治癒課程の検討) |
| 論文審査委員 (主査) | 教授 下村 嘉一   |
| (副主査)       | 教授 磯貝 典孝   |
| (副主査)       | 教授 宗像 浩  |

【研究の目的】

角膜上皮欠損の速やかな修復は病原体の角膜内への侵入を防ぎ、角膜障害を予防する上で重要であり、線溶系因子は角膜上皮創傷治癒過程の中心的な働きを果たしていると考えられる。本研究の目的は角膜上皮創傷治癒過程における uPA, uPAR の役割を明らかにすることである。

【対象と方法】

uPA<sup>-/-</sup>, uPA<sup>+/+</sup>; tPA<sup>-/-</sup>, tPA<sup>+/+</sup>, uPAR<sup>-/-</sup>, uPAR<sup>+/+</sup> マウスに角膜上皮欠損モデルを作成した。経時的に角膜を観察し、さらに組織学的に評価した。NIMP-R14, F4/80, uPAR の免疫染色を行いその発現を検討した。さらに fibrin enzymography, gelatin zymography により、PA および MMP の発現変化を検討した。

【結果】

マウス角膜の観察では、uPA<sup>-/-</sup>群では上皮欠損の修復が、uPA<sup>+/+</sup>群に比べ有意に遅延していた。一方、tPA<sup>-/-</sup>群、uPAR<sup>-/-</sup>群では有意な遅延を認めなかった。組織学的評価でも、uPA<sup>-/-</sup>群は上皮の再被覆が遅延していた。また uPA<sup>+/+</sup>群、uPA<sup>-/-</sup>群ともに、NIMP-R14 陽性の細胞を認め、浸潤している炎症細胞は主に好中球であることが確認された。一方、F4/80 陽性の細胞はほとんど認めなかった。uPAR は正常角膜上皮では発現を認めず、移動する角膜上皮細胞にのみ局所的に発現を認めた。Fibrin enzymography では、uPA<sup>+/+</sup>群で経時的に uPA の増加を認めた。Gelatin zymography では uPA<sup>+/+</sup>, uPAR<sup>-/-</sup>, uPAR<sup>+/+</sup>群で経時的に MMP-9 の増加を認めたが、uPA<sup>-/-</sup>群では認めなかった。

【考察】

創傷治癒の過程で線溶系因子は重要な役割を果たすことが解明されてきた。近年、uPA と高い親和性で結合する uPAR は uPA の基質分解作用の促進他に細胞内シグナル伝達に関与していることが報告されている。本研究で、uPA は角膜上皮細胞の移動、MMP-9 の発現、好中球の角膜実質への浸潤に関与していることが明らかとなった。さらに、上皮の移動、MMP-9 の発現に対する uPA の作用は uPAR を介さないことが初めて明らかとなった。一方、uPAR は正常の角膜上皮では発現を認めず、移動する角膜上皮細胞に発現が増強されるが、上皮細胞の欠損修復速度には影響を与えず、MMP-9 の活性化には直接関与していないと考えられた。

【結論】

角膜上皮の移動、角膜実質への好中球の浸潤、MMP-9 の発現には uPA が関与しており、さらに上皮の移動、MMP-9 の発現に対する uPA の作用は uPAR を介していないことが明らかとなった。

|           |                  |                          |
|-----------|------------------|--------------------------|
| 博士論文の印刷公表 | 公 表 年 月 日        | 出版物の種類及び名称               |
|           | 平成 24 年 月 日 公表予定 | 出版物名                     |
|           | 公 表 内 容          | 近畿大学医学雑誌<br>第 37 巻 第 1 号 |
|           | 全 文              | 平成 24 年 月 日 発行予定         |

角膜は角膜上皮細胞、角膜実質細胞、角膜内皮細胞の 3 層構造からなる無血管で透明な組織であり、角膜が傷害を受けた際には、その透明性と形状を損なうことなく治癒させるということが重要であると考えられる。そのためには角膜上皮細胞による速やかな再被覆、病原菌や異物の速やかな排除、炎症細胞のコントロールが重要である。単純な角膜上皮欠損では約 1 週間以内に治癒するが、何らかの原因により欠損した角膜上皮が 1 週間以上にわたり再被覆しない遷延性角膜上皮欠損といわれる病態がある。角膜上皮の正常な修復には、角膜上皮細胞の伸展、細胞外マトリックスを介した基底膜との接着、および細胞の増殖分化が必要であり、遷延性角膜上皮欠損ではこれらのメカニズムのいずれかが障害されていると考えられる。その原因のひとつとして、角膜内での蛋白分解活性を制御する酵素やその阻害因子などが関与している可能性が考えられ、角膜上皮創傷治癒過程における線溶系因子の役割について検討した。線溶系には血栓を溶かして分解する生理反応の他に、細胞周囲での細胞外マトリックスの分解やサイトカインの誘導、増殖因子の活性化などに関与していることが明らかとなりつつあり、このような線溶系因子の機能は創傷治癒、組織再生、炎症反応、血管新生などに重要な役割を果たしていると考えられている。

本研究では、線溶系遺伝子欠損マウスに角膜上皮欠損モデルを作成し、線溶系因子が角膜上皮の創傷治癒過程に与える影響について検討した。

上皮欠損の治癒速度を検討すると、u-PA<sup>-/-</sup>群で有意な上皮欠損の修復遅延を認めたが、t-PA<sup>-/-</sup>群および u-PAR<sup>-/-</sup>群では対照群と有意な差を認めなかった。また u-PA stop<sup>®</sup> (u-PA 阻害剤) を用いた阻害実験でも、u-PA stop<sup>®</sup> 投与群では対照群と比較して有意に上皮の治癒は遅延した。本実験では u-PA の活性を完全に阻害するために、静脈注射と点眼で u-PA stop<sup>®</sup> を投与した。点眼のみの実験は施行しなかった。

これらの結果は u-PA が上皮細胞の伸展移動に重要な働きをしていることを示唆している。角膜上皮の創傷治癒過程で、u-PAR は発現してくるが、その果たす役割は少ないと思われる。u-PA の角膜上皮細胞の伸展移動に対する作用は u-PA 単独の細胞外基質分解作用を介するものと考えられた。また、御指摘いただいた、角膜上皮欠損時の u-PA は、どこから分泌されているのかという点についてであるが、免疫染色やザイモグラフィなどの結果から、欠損部周囲の上皮細胞や涙液から分泌されているのではないかと考えている。

また、培養細胞を用いた過去の実験から、角膜では上皮が主に MMP-9 を、角膜実質が主に MMP-2 を産生しているとの報告があり、今回の実験ではそれらの MMP に注目して実験を行った。角膜上皮の創傷治癒過程において、MMP-9 は u-PA<sup>+/+</sup> 群、および u-PAR<sup>-/-</sup> 群、u-PAR<sup>+/+</sup> 群では経時的に明らか

な上昇を認めたが、u-PA<sup>-</sup>群では抑制されていた。よって、MMP-9の活性はu-PAに依存していると思われる。ザイモグラフィの結果では、u-PA活性のピークは24時間、MMP-9のピークが12-24時間となっており、MMP-9の活性が先に上がっているように見えるが、u-PA<sup>-</sup>群では活性の上昇が明らかに抑制されており、ほぼ同時に起こってくる変化であるという可能性が考えられた。

また、角膜上皮欠損の修復過程で、u-PA<sup>+/+</sup>群ではu-PA<sup>-</sup>群と比較して角膜輪部から浸潤してきたと思われるNIMP-R14陽性細胞を有意に多く認め、u-PAは角膜実質への好中球の遊走に関与していることが明らかとなった。多少の好中球の浸潤は異物や病原菌の排除のため必要であると考えられ、今回の上皮欠損モデルでは、角膜実質内に直接影響は少なくu-PA<sup>+/+</sup>群でも炎症細胞の浸潤は比較的軽度であったため、u-PAの炎症細胞を介した角膜創傷治癒の遷延化の影響ではなく、角膜上皮細胞の伸展移動に対する作用が強く働いたと考えられる。

本研究の結果から、u-PAは角膜上皮欠損の修復過程で、上皮細胞の伸展移動、MMP-9の発現、好中球の角膜実質への浸潤に関与していることが明らかとなった。さらに、上皮細胞の移動、MMP-9の発現に対するu-PAの作用はu-PARを介さないことが初めて明らかとなった。u-PARは正常の角膜上皮では発現を認めず、移動する角膜上皮細胞に発現が増強されるが、u-PARは、上皮細胞の欠損修復速度には影響を与えず、MMP-9の活性化には直接関与していないと考えられた。最後に御指摘いただいた今後のアプローチについてであるが、本研究からu-PAには角膜上皮細胞の移動を促すと同時に炎症細胞の角膜実質内への浸潤を促進する働きもあることが明らかとなり、角膜実質内の過剰な炎症細胞の存在は、角膜創傷治癒に悪影響を与える可能性があるため、今後炎症細胞をいかにコントロールするかが課題であると考えられる。

|             |  |     |     |  |
|-------------|--|-----|-----|--|
| 氏名          | 草 岩 崇 若  |     |     |  |
| 学位の種類       | 博 士 (医学)   |     |     |  |
| 学位記番号       | 医 第 1 0 8 1 号  |     |     |  |
| 学位授与の日付     | 平 成 2 4 年 3 月 2 2 日  |     |     |  |
| 学位授与の要件     | 学位規則第5条第1項該当   |     |     |  |
| 学位論文題目      | Oral branched-chain amino acid granules reduce the incidence of hepatocellular carcinoma and improve event-free survival in patients with liver cirrhosis.<br>(分枝鎖アミノ酸顆粒製剤が肝硬変患者の予後に与える影響に関する検討) |     |     |  |
| 論文審査委員 (主査) | 教授   | 工 藤 | 正 俊 |  |
| (副主査)       | 教授   | 竹 山 | 宜 典 |  |
| (副主査)       | 教授   | 宗 像 | 浩 浩 |  |