

## 米子医学会賞

米子医学会では、鳥取大学医学部の大学院生に対し将来の発展を期待し、優秀な研究論文に米子医学会賞を授与することになっています。応募資格は、米子医学会会員で1) 医学専攻博士課程、2) 機能再生医科学専攻博士後期課程・生命科学専攻博士後期課程、3) 保健学専攻博士後期課程・臨床心理学専攻修士課程を当該年度に修了若しくは修了見込の大学院生です。被表彰者は賞状ならびに副賞を授与され、米子医学雑誌に論文要旨を公表することになっております。

第12回授賞者ならびに授賞論文は以下のとおりです。

### 第12回米子医学会賞受賞者（平成29年度）

医学専攻博士課程

- 1) 窪内康晃（鳥取大学医学部器官制御外科学講座 胸部外科学分野）

生命科学専攻博士後期課程

- 2) 宇野勝洋（鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻博士後期課程）

保健学専攻博士後期課程

- 3) 河月 稔（生体制御学）

### 抄 録

#### 1) Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts unfavourable prognosis in patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma

（癌関連線維芽細胞のポドプラニン発現は、病理病期IA期肺腺癌患者の予後不良を予測する）

Kubouchi Y, Yurugi Y, Wakahara M, Sakabe T, Haruki T, Nosaka K, Miwa K, Araki K, Taniguchi Y, Shiomi T, Nakamura H, Umekita Y  
平成29年 Histopathology 72巻 490頁-499頁

ポドプラニンは38kDaのI型膜貫通糖蛋白であり、腫瘍細胞において血小板凝集を誘導する因子として発見された。ポドプラニンはリンパ管内皮細胞に発現しており、現在ではD2-40（抗ポドプラニン抗体）を用いて、リンパ管侵襲の評価が行われている。一方、肺癌においては腫瘍細胞にも発現し、腫瘍の進展や転移に関与すると考えられている。また、癌関連線維芽細胞（CAFs）にも発現することが知られており、当教室ではこれまでにCAFsのポドプラニン発現は肺扁平上皮癌の予後不良因子になると報告してきた。肺腺癌におけるCAFsのポドプラニン発現についてはいくつ

か報告があるが、新TNM分類（第8版）病理病期IA期におけるポドプラニン発現と予後との関連及び腺癌組織亜型との関連はわかっていない。

### 方 法

2005年1月から2011年12月までの期間に鳥取大学医学部附属病院胸部外科で根治切除（区域切除以上かつ縦隔リンパ節郭清を伴う）が施行された病理病期IA期肺腺癌158例を対象とし免疫組織化学により腫瘍細胞及びCAFsにおけるポドプラニン発現を評価した。I型肺胞上皮細胞及びリンパ管内皮細胞をコントロールとし、腫瘍細胞、CAFsとも全体の10%以上が染色されるものを陽性と定義した。さらに全切片の腫瘍径、浸潤径、優位亜型、高悪性度病変（micropapillary, solid component）の有無を評価し、病理学的因子の評価対象とした。病期は第8版TNM分類に基づき再分類し、病理学的浸潤径を用いてT因子を決定した。ポドプラニン発現と臨床病理学的因子との関連は $\chi^2$ 乗検定で解析した。生存解析にはdisease-free survival (DFS) と disease-specific survival (DSS) を用い、生存曲線はKaplan-Meier法でプロットし、群間の比較はlog-rank法を用いた。予後因子の単変量及び多変量解析にはCox比例ハザ

ードモデルを用いた。

## 結果

対象症例の平均年齢は $68.8 \pm 9.5$ 歳、76例が男性、72例が喫煙者であった。高悪性度病変は55例にみられた。腫瘍細胞におけるポドブラニン陽性は8例(5%)、臨床病理学的因子及び予後との関連は認められなかった。一方、CAFsにおけるポドブラニン陽性は41例(28.9%)認められ、臨床病理学的因子との関連では、男性( $P < 0.001$ )、喫煙者( $P < 0.001$ )、病理学的T因子( $P = 0.001$ )、組織学的低分化( $P < 0.001$ )、リンパ管侵襲( $P < 0.001$ )、高悪性度病変( $P < 0.001$ )と相関関係が認められた。予後との関連ではポドブラニン陽性CAFsではDFS( $P < 0.001$ )、DSS( $P = 0.015$ )ともに有意に短かった。多変量解析では、DFSの予後不良因子としてはCAFsのポドブラニン陽性( $HR = 4.411$ ,  $P = 0.004$ )が最も有意な因子であり、次に高悪性度病変( $HR = 3.581$ ,  $P = 0.013$ )が続いた。DSSに関しては、高悪性度病変( $HR = 5.521$ ,  $P = 0.041$ )のみが独立した予後不良因子となり、CAFsのポドブラニン陽性( $P = 0.316$ )は有意な因子とはならなかった。

## 考察

肺癌腫瘍細胞におけるポドブラニン発現が予後予測因子になるとの報告は複数あるが、いずれも組織型は扁平上皮癌であり、腺癌に関するものはない。本研究でも、腺癌腫瘍細胞におけるポ

## 抄録

### 2) Bioluminescence-based cytotoxicity assay for simultaneous evaluation of cell viability and membrane damage in human hepatoma HepG2 cells

(ヒト肝癌HepG2細胞における細胞生存率と細胞膜損傷の同時評価のための生物発光に基づく細胞毒性アッセイ)

Uno K, Murotomi K, kazuki Y, Oshimura M, Nakajima Y

Luminescence. 2018; 1-9

細胞毒性試験は、培養細胞を用いた実験においては再現性と信頼性を担保するのに必要な試験で

ドブラニンの発現と予後との関連は認められなかった。一方、肺癌においてCAFsのポドブラニン発現と予後との関連を検討した報告は非常に少なく2編しかない。伊藤まさみらの先行研究で、TNM分類第7版のI期肺癌において、CAFsのポドブラニン発現が独立した再発予測因子であると報告されている。本研究も同様の結果であったが、本研究ではTNM分類第8版のIA期を対象としている。第8版より、T因子は病理学的浸潤径を用いることと変更されており、IA期もIA1, IA2, IA3へと細分化された。TNM分類第8版を適用したIA期肺癌の予後因子に関しては本研究が初めてである。また、本研究ではmicropapillary及びsolid病変という高悪性度病変の有無についても同時に検討を行った。これまでの先行研究で、高悪性度病変が早期肺癌の予後不良因子であると報告されていたが、本研究によって新TNM分類IA期においても高悪性度病変が予後不良因子であることが示された。

## 結論

病理病期IA期肺癌において、CAFsのポドブラニン陽性は、腫瘍細胞でのポドブラニン発現に関わらず、独立した再発予測因子であった。日常臨床で行われているポドブラニンに対する免疫組織化学は、リンパ管侵襲の評価だけでなく、予後不良な患者を予測するためにも有用と考えられた。

ある。細胞の代謝活性、膜漏出、周期、老化などを解析し、細胞の生存率や増殖率、アポトーシス細胞の有無などによって判断される。従来の細胞毒性試験法には代謝活性を調べるWST-1アッセイやMTTアッセイ、膜漏出を調べるLDHアッセイ、周期を調べる細胞周期アッセイ、老化を調べる酸性 $\beta$ ガラクトシダーゼアッセイなどが知られている。これらの試験ではテトラゾリウム塩を用い、比色反応によって生成したホルマザンの測定、もしくは直接細胞を染色することで解析している。これらは細胞を破碎し、あるポイントで解析しているに過ぎない。医薬品、化学物質などの毒性データでは、毒性の強弱を含む有無だけでなく、用量依存反応、経時変化、回復性などのリ

スク評価に係る情報が重要視されており、これらのデータを取得しようとする多大な労力が必要になる。そこで本研究では同一細胞における経時の変化を解析可能な毒性試験法の開発を行った。

## 方法

長期間安定した発現を可能にする人工染色体ベクターを用い、細胞の有無を判断する細胞毒性をモニター用のELucと、細胞膜漏出を判断する膜障害をモニターできるGLuc-KDELの異なる2種類のルシフェラーゼ遺伝子を導入したHepG2細胞を作製した。ルシフェラーゼ導入HepG2細胞を用い、異なる細胞数を播種した培養皿を一日培養し、ELucとGLuc-KDELそれぞれの発光量を測定後、従来法であるWST-1アッセイとLDHアッセイの吸光度の測定を行い、感度の比較を行った。また、毒性が知られている医薬品、化学物質を添加することで故意に細胞毒性を誘導した。細胞毒性と膜障害の経時の変化をELucとGLuc-KDELの発光量で確認すると同時にWST-1アッセイとLDHアッセイを実施し、結果を比較した。

膜障害をモニターすることで、細胞死に至る主要なプロセスであるアポトーシスとネクローシスを区別できるかを確認するため、アミオダロンを添加し細胞死を誘導した上で、エチジウムホモダイマー III (EthD-III) とアネキシンV-FITCを用いたFACS解析を行った。

また、細胞への直接的な毒性の有無だけでなく、周囲、時間差で与える影響としてダメージ関連分子パターン (DAMPs) の測定を行った。DAMPsは損傷組織、壊死細胞から放出され、免疫、炎症反応などを誘導する危険信号であり、その中でも代表的タンパク質の一つであるHMGB1の測定を行った。

## 結果

ELucとGLuc-KDELの発光量は細胞数依存的に上昇した。これは従来法での吸光度の感度と比べても遜色ない結果であった。一方で、少数細胞では発光量はバラつきが小さいのに対し、吸光度のバラつきは大きくなっていった。細胞毒性試験では濃度依存的にELucの発光量が減少、逆にGLuc-

KDELの発光量は増大した。同時に行ったWST-1アッセイの吸光度は濃度依存的に減少、LDHアッセイの吸光度は濃度依存的に増大していることが確認できた。

FACS解析の結果、GLuc-KDELの発光量と膜の緩んだ状態の細胞割合は濃度依存的に上昇した。一方で、細胞生存率は濃度依存的、時間依存的に減少した。細胞死に至るプロセスごとに分類して解析を行うと、早期アポトーシス細胞の割合は75  $\mu$ Mで時間依存的に減少し、後期アポトーシス細胞の割合は時間依存的に増加、ネクローシス細胞の割合も時間依存的に増加した。発光量とそれぞれのプロセスでの細胞割合との相関関係を求めてみると、ネクローシス細胞との間に強い相関関係にあることが確認できた。アミオダロン処理後GLuc-KDELの発光量とHMGB1のタンパク量を測定すると、どちらも濃度依存的に増大し、強い相関関係があることが確認できた。

## 考察

ELucとGLuc-KDELの発光によるアッセイは従来法と同程度の感度で、より安定したアッセイが行えることが確認できたことから、従来法の代替が可能であると考えられる。ELucに関しては基質を培地中に入れておくことで常時発光することからリアルタイムでの測定が、GLuc-KDELは培地上清を少量用いることで測定可能であることから、同一細胞で繰り返し測定が可能であり、経時の変化を観察可能にした。また、GLuc-KDELの発光量はネクローシス細胞と強い相関関係が示せ、HMGB1とも強い相関関係が示せたことから、細胞への直接的な毒性だけでなく、その後の影響までもモニターできると考えられる。

## 結論

目的である同一細胞における経時の変化を観察可能な試験法の開発ができた。さらに、膜障害モニターが、DAMPsと関連があることを示せたことから、直接的な細胞へのダメージだけでなく、周辺細胞への影響をも観察できる試験法が開発できた。

## 抄 録

### 3) Comparison of olfactory and gustatory disorders in Alzheimer's disease

(アルツハイマー病における嗅覚障害と味覚障害の比較検討)

Kouzuki M, Suzuki T, Nagano M, Nakamura S, Katsumata Y, Takamura A, Urakami K. *Neurological Sciences*. 2018; 39(2): 321-328.

アルツハイマー病 (AD) はアミロイドβ蛋白 ( $A\beta$ ) が神経細胞外に沈着して形成される老人斑と、リン酸化タウ蛋白 (p-tau) が神経細胞内に蓄積した神経原線維変化の2つが主要な病理学的変化と考えられている。主な臨床症状は記憶障害であるが、 $A\beta$ やp-tauは記憶に関与する海馬に沈着する前に嗅覚関連領域へ蓄積することがわかってきている。また、ADで味覚障害を呈することがいくつかの研究から報告されている。ADは進行性の脳萎縮が特徴であり、脳萎縮や神経変性に伴い中枢性味覚障害を呈し、味の認識が障害されると考えられている。これまでにADにおける嗅覚機能及び味覚機能に関する報告はされているが、双方の機能を同時に検討している研究は非常に少ない。また、 $A\beta$ およびp-tauといったADの病理学的変化との関連性については言及されておらず、ADにおける嗅覚機能および味覚機能の障害の順序や病態との関連性は明確になっていない。したがって、本研究では、認知機能障害のない者 (HC) および軽度認知障害 (MCI) との比較や、ADの脳脊髄液 (CSF) バイオマーカーあるいは認知機能との比較により、ADの嗅覚機能および味覚機能の検討を行うことを目的とした。

## 方 法

対象者は、AD 40名、MCI 34名、HC 40名である。嗅覚検査はOdor Stick Identification Test for Japanese (OSIT-J) を用いて12種類のおい同定について評価を行い、味覚検査は味質溶液を用いた口腔内滴下法により甘味、塩味、酸味、苦味の認知閾値について評価を行った。また、嗅覚や味覚に関するアンケートを実施し、自覚的な嗅覚機能や味覚機能についても評価を行った。認知機能の評価としてはMini-Mental State Examination (MMSE), Alzheimer's disease Assessment Scale-cognitive subscale Japanese

version (ADAS-J cog), Touch Panel-type Dementia Assessment Scale (TDAS) を用いて行い、CSF中の $A\beta$ 42およびp-tau181の測定を市販のELISAキットを用いて行った。尚、脳脊髄液検査は一部の対象者にしか実施できていない。得られたデータを用いてAD, MCI, HCにおける嗅覚機能や味覚機能の比較、および嗅覚機能や味覚機能と認知機能やCSFバイオマーカーとの関連性を統計学的に検討した。

## 結 果

OSIT-Jの合計スコアはHC群と比較してAD群およびMCI群で有意に低下していた (それぞれ $p < 0.0001$ ,  $p = 0.026$ )。ROC解析を行ったところ、AD群とHC群を識別するには、カットオフ値を6.5点としたときに感度82.5%、特異度67.5% (AUC=0.809)、MCI群とHC群を識別するには、カットオフ値を7.5点としたときに感度76.5%、特異度62.5% (AUC=0.711) だった。一方、味覚検査の合計スコアは、AD群、MCI群、HC群の間に有意差はみられなかった。また、アンケートにより評価した自覚的な嗅覚機能や味覚機能も3群間で有意差は認めなかった。嗅覚検査および味覚検査と各種検査結果の比較では、OSIT-Jの合計スコアとMMSE ( $r = 0.386$ )、ADAS-J cog ( $r = -0.375$ )、TDAS ( $r = -0.503$ )、 $A\beta$ 42 ( $r = 0.355$ ) との間に有意な相関を認め、味覚検査の合計スコアとMMSE ( $r = -0.213$ )、ADAS-J cog ( $r = 0.268$ )、TDAS ( $r = 0.366$ ) との間に有意な相関を認めた。

## 考 察

嗅覚機能はAD病態の早期から変化が生じるCSFバイオマーカーやその後症状として現れる認知機能障害を評価する神経心理学的検査と関連があったことより、病態の早期から障害されることが示唆された。しかし、本研究ではAD群とMCI群の嗅覚検査の結果に有意差を認めておらず、簡易な嗅覚検査法ではなくより鋭敏な検査法が開発されることでHC, MCI, ADをより正確に識別できる可能性が考えられた。一方、味覚検査の合計スコアは、認知機能とは相関を認めたものの、CSFバイオマーカーとは関連がみられず、AD群、MCI群、HC群の間に有意差は認めなかった。先行研究ではADやMCIで味覚障害を生じると報告されているが、本研究で一致しなかった理由とし

ては、味覚検査の手法や味質溶液の濃度の違いが考えられた。認知機能とは相関があったことを考えると、AD病態による認知機能障害が進行していくにつれて味覚機能が低下していくという点においては、先行研究と一致した見解となったが、CSFバイオマーカーとの関連がなかったことより早期の変化ではないことが示唆された。

## 結 論

本研究では嗅覚機能や味覚機能と脳脊髄液バイオマーカーや認知機能との比較検討により、ADにおける認知機能障害の進行とともに両者の機能低下が生じると考えられたが、特に嗅覚障害はAD病態の早期から生じることが示唆された。

## 米子医学雑誌優秀論文賞

米子医学会では、当該年度に米子医学雑誌に掲載されたものの中から優秀論文（原著論文1編，症例報告1編）を選考し米子医学雑誌優秀論文賞を授与することになっています。被表彰者には賞状ならびに副賞が授与されます。

平成29年度の受賞者ならびに受賞論文は以下のとおりです。

### 米子医学雑誌優秀論文賞受賞者（平成29年度）

#### ☆原著論文

北脇 都（公益社団法人 鳥取県中部医師会立三朝温泉病院）  
高齢入院患者の運動自己効力感を高める要因（Vol. 68, No.1・2 2017）

#### ☆症例報告

高屋 誠吾（鳥取大学医学部病態制御外科学分野）  
ダブルバルーン内視鏡にて診断・点墨を行い、単孔式腹腔鏡補助下に切除したメッケル憩室の1例（Vol. 68, No.3・4・5 2017）