
 *
 *
 *
 *
 *
 *

高 知 大 学 学 位 授 与 記 録

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第104号	福井 直樹	Targeting CD146 using folic acid-conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model (マウスグリオーマモデルにおける葉酸を結合したナノ粒子を用いたCD146の標的化と腫瘍増殖抑制)	1
甲総医博第105号	矢野 晶子	Near-infrared spectroscopy for monitoring free jejunal flap (近赤外線分光法を用いた遊離空腸のモニタリング)	6

氏 名 (本籍) 福井 直樹 (高知県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 甲総医博第104号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 令和2年11月17日

学位論文題目

Targeting CD146 using folic acid-conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model

(マウスグリオーマモデルにおける葉酸を結合したナノ粒子を用いたCD146の標的化と腫瘍増殖抑制)

発 表 誌 名

Journal of Neurosurgery DOI: <https://doi.org/10.3171/2020.4.JNS193078> Online Publication Date: 24 Jul 2020 2020年7月

審査委員 主査 教授 花崎 和弘
副査 教授 大畑 雅典
副査 教授 井上 啓史

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

	氏 名 福井 直樹
論 文 題 目	Targeting CD146 using folic acid-conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model (マウスグリオーマモデルにおける葉酸を結合したナノ粒子を用いた CD146 の標的化と腫瘍増殖抑制)
目的 神経膠腫（グリオーマ）の 1/3 を占める膠芽腫（GBM）は、集学的治療をもってしても顕著な治療効果を得られない予後不良の原発性脳腫瘍である。GBM は、細胞の不均一性を示す腫瘍であり、高い腫瘍原性と治療抵抗性を示し腫瘍の再発に寄与する腫瘍幹細胞を含んでいる。新規治療開発において、グリオーマ幹細胞(GSC)は魅力的な標的細胞であることが示唆されている。 様々な腫瘍の転移や予後に関与する CD146 遺伝子は、神経膠腫のグレード 3 以上で高頻度に発現し、GSC において高発現している。GSC における siRNA を用いた CD146 のノックダウンは、細胞周期の制御を介して細胞増殖を抑制することを報告しているが、in vivo における CD146 を標的とした遺伝子治療戦略はまだ確立されていない。 siRNA を用いた RNA 干渉は、標的分子を発現抑制するための強力なツールであるが、生体内における siRNA の適用には安定性の問題がある。この問題に対処するために、ナノ粒子(NPs)を核酸の担体および安定化剤の両方として利用する方法が開発されている。葉酸を結合したキトサンを含む NP を用いる事で卵巣および膵臓癌を標的とする siRNA の効率的なデリバリーが可能であることが報告された。 本研究では、マウスグリオーマモデルにおいて CD146 に対する siRNA(siCD146)を腫瘍細胞にデリバリーするために、葉酸を結合したキトサンオリゴ糖乳酸(FA-PEG-COL) NP を用いて、CD146 を標的とした遺伝子治療の有効性を検証した。 方法 腫瘍細胞は、脳内移植によって C3H/HeN マウスで誘発された脳腫瘍から樹立された細胞株（RSV-M マウスグリオーマ細胞）、ヒトグリオーマ U87MG、T98G、および U251MG 細胞、GBM 患者から単離した初代培養細胞（GBM-PCC1/2/3 細胞）を使用した。腫瘍細胞による NP の取り込みは、免疫細胞化学及び免疫組織化学染色、フローサイトメトリー、および生体内イメージングで行い、siCD146 のノックダウン効果は、ウェスタンブロットと水溶性テトラゾリウム塩 WST を用い	

た試験によって測定した。生体内での siRNA を用いた遺伝子治療の有効性は、C3H/HeN および BALB/c nu-nu マウスを用い、生体内イメージングおよび組織学的分析を通じて腫瘍の成長をモニタリングすることによって評価した。

結果

ほとんどのマウスおよびヒトグリオーマ細胞株及び組織で葉酸受容体 (FOLR1) の発現が検出された。マウス尾静脈から NP を投与した一日後には、皮下および脳内の腫瘍組織において FA-PEG-COL NP の蓄積が観察された。また、FA と結合した NP の方が多く取り込まれており、葉酸受容体を取り込み効率を高めていた。In vitro においてし CD146 を結合した NP を RSV-M のスフェロイド細胞 (TS) へ添加すると、CD146 レベルの低下に伴い細胞増殖が抑制された。マウスグリオーマモデルにおける siCD146 を結合した NP の投与による遺伝子治療では、腫瘍の増殖が有意に抑制され、組織学的解析により腫瘍が完全に消失している個体も観察された。さらに、治療群の個体の残存腫瘍における Ki-67 指数は、対照群の個体と比較して有意に低下していた。

結語

本研究において、葉酸を結合した NP を用いた siRNA のデリバリーによる CD146 を発現抑制することで、マウスグリオーマを根絶できることを示した。CD146 は有望な GBM 治療の標的であり、siRNA をデリバリーする葉酸を結合した NP は悪性神経膠腫における遺伝子治療に有用である。さらに、この siRNA デリバリーシステムは、悪性神経膠腫に対する治療法を開発する中で、様々な治療標的分子の評価する系にも応用可能である。本研究により、がん幹細胞を標的とした治療法の有効性を示したことは CD146 が関与する他の悪性腫瘍に対する治療戦略の開発を促進するであろう。

論文審査の結果の要旨

		氏 名	福井 直樹
審 査 委 員	主 査 氏 名	花崎 和弘	
	副 査 氏 名	大畑 雅典	
	副 査 氏 名	井上 啓史	

題 目 Targeting CD146 using folic acid-conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model

(マウスグリオーマモデルにおける葉酸を結合したナノ粒子を用いた CD146 の標的化と腫瘍増殖抑制)

著 者 Naoki Fukui, Toshio Yawata, Takahito Nakajo, Yu Kawanishi, Yuichiro Higashi, Tatsuyuki Yamashita, Takaaki Aratake, Koichi Honke, Tetsuya Ueba

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月

Journal of Neurosurgery DOI: <https://doi.org/10.3171/2020.4.JNS193078> Online Publication Date: 24 Jul 2020, 2020 年 7 月

要 旨

【背景・目的】 神経膠腫（グリオーマ）の1/3を占める膠芽腫（GBM）は、高い造腫瘍性を示す腫瘍幹細胞が存在し、化学療法や放射線治療に対する感受性が低く、腫瘍再発や治療抵抗性を示す。膠芽腫（GBM）の治療成績向上のためには、この腫瘍幹細胞を標的として効率的に排除する新規治療法の開発が望まれる。申請者らは先行研究において様々な腫瘍の予後や薬剤感受性に関与するCD146遺伝子は、ヒト膠芽腫幹細胞でも高発現し、細胞周期を制御していることを明らかにした。またCD146遺伝子は、WHO分類グレード3以上の神経膠腫（グリオーマ）で高頻度に発現し、膠芽腫（GBM）や悪性神経膠腫（グリオーマ）の治療標的分子であると考えられており、グリオーマ幹細胞（GSC）におけるsiRNAを用いたCD146のノックダウンは、細胞周期の制御を介して細胞増殖を抑制することが報告されている。しかし、残念ながら、in vivoにおけるCD146を標的とした遺伝子治療戦略は未だ確立されていない。

本研究では、マウスグリオーマモデルにおいてCD146に対するsiRNA(siCD146)を腫瘍細胞にデリバリーするために、RNAの血清中の安定性を向上させるために葉酸を結合したキトサンオリゴ糖乳酸(FA-PEG-COL)ナノ粒子(NP)を用いて、CD146を標的とした遺伝子治療法の有効性を検証した。

【方法】 腫瘍細胞は、脳内移植によってC3H/HeNマウスで誘発された脳腫瘍から樹立された細胞株（RSV-Mマウスグリオーマ細胞）、ヒトグリオーマU87MG、T98G、U251MG細胞および膠芽腫（GBM）患者から単離した初代培養細胞（GBM-PCC1/23細胞）を使用した。腫瘍細胞によるナノ粒子（NP）の取り込みは、免疫細胞・免疫組織化学染色、フローサイトメトリー、生体内イメージングを用いて評価した。siCD146のノックダウン効果は、ウェスタンブロットと水溶性テトラゾリウム塩WSTを用いて評価した。生体内でのsiRNAを用いた遺伝子治療の有効性は、C3H/HeNおよびBalb C nu-nuマウスを用い、生体内イメージング、組織学的分析を通じて腫瘍の成長をモニタリングして評価した。

【結果・考察】 ほとんどのマウスおよびヒトグリオーマ細胞株組織で葉酸受容体（FOLR1）の発現が検出された。マウス尾静脈からナノ粒子（NP）を投与した一日後には、皮下および脳内の腫瘍組織においてキトサンオリゴ糖乳酸（FA-PEG-COL）ナノ粒子（NP）の蓄積が観察された。また、葉酸と結合したナノ粒子（NP）の方が多く取り込まれており、葉酸受容体を取り込み効率を高めていた。In vitroにおいてCD146を結合したナノ粒子（NP）をRSV-Mのスフェロイド細胞（TS）へ添加すると、CD146レベルの低下に伴い、細胞増殖が抑制された。マウスグリオーマモデルにおけるsiCD146を結合したナノ粒子（NP）の投与による遺伝子治療では、腫瘍の増殖が有意に抑制され、腫瘍が完全に消失している個体も観察された。さらに、治療群の個体の残存腫瘍におけるKi-67指数は、対照群と比較して有意に低下していた。

本研究において、葉酸を結合したナノ粒子（NP）を用いたsiRNAのデリバリーシステムはCD146の発現を抑制することにより、マウスグリオーマを根絶できることが明らかとなった。膠芽腫（GBM）において腫瘍幹細胞を標的とした遺伝子治療の報告は極めて少なく、腫瘍幹細胞を排除する治療法の有効性に関わる本研究は、腫瘍の根治性を高め、治療抵抗性を克服するために大変重要である。CD146は悪性腫瘍の根源である腫瘍幹細胞を駆逐するために有望な標的分子であり、膠芽腫（GBM）に対する新たな分子標的薬治療や遺伝子治療法の開発も含めた臨床応用展開が期待される。また、葉酸を結合したナノ粒子（NP）を用いたsiRNAのデリバリーシステムは、悪性神経膠腫の遺伝子治療に有用であり、様々な治療標的分子を評価する系にも応用可能である。本研究により、膠芽腫（GBM）の腫瘍幹細胞を標的とした有効な遺伝子治療法を開発したことは、CD146が関与する他の癌腫に対する遺伝子治療法の開発にも波及効果を及ぼすことが期待できる。

【結論】 siRNA結合ナノ粒子（NP）を用いた膠芽腫（GBM）に対する標的遺伝子治療法の開発研究を施行した。本研究で得られた新知見は、これまで集学的治療を行っても予後不良であった膠芽腫（GBM）に対する有効な治療法開発におけるブレークスルーが期待できるだけでなく、他の癌腫に対する様々なナノ粒子（NP）を用いたsiRNAのデリバリーによる遺伝子治療法開発の波及効果も期待される。

以上のように、本論文はこれまで根治治療が困難で予後不良とされた膠芽腫（GBM）の新規治療法開発に一石を投じた論文であり、医学的に高い価値を有する。

よって、審査委員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。

氏 名（本籍）	矢野 晶子	（高知県）
学 位 の 種 類	博士（医学）	
学 位 記 番 号	甲総医博第105号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与年月日	令和2年11月17日	
学位論文題目	Near-infrared spectroscopy for monitoring free jejunal flap (近赤外線分光法を用いた遊離空腸のモニタリング)	
発 表 誌 名	Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery DOI : 10.1016/j.bjps.2020.05.0402020年6月22日 オンライン公開	
	審査委員	主査 教授 佐藤 隆幸 副査 教授 北岡 裕章 副査 教授 兵頭 政光

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

	氏 名	矢野 晶子
論文題目	Near-infrared spectroscopy for monitoring free jejunal flap (近赤外線分光法を用いた遊離空腸のモニタリング)	
(論文要旨) 咽頭・頸部食道の癌に対する根治的切除による生命予後改善に伴い、術後長期のQOLを高めるため咽頭や食道の再建術が行われている。空腸は、瘻孔の発生率が低く早期の摂食開始が可能などの利点から多くの施設で再建臓器の第一選択として用いられている。遊離空腸グラフトは腸間膜動静脈を頸部血管に吻合して血行再建をするが、グラフトの虚血やうっ血により空腸の壊死をきたすことがある。しかし、術中は肉眼的に確認できるものの、閉創後は発見が遅れ重篤な状態になり得る。空腸の一部を皮膚外に出す方法や内視鏡、ドプラによる観察などの報告もあるが、いずれも間歇的で迅速な診断ができずモニターすることの負担も大きい。 そこで、我々は心臓血管外科領域で脳灌流の非侵襲的な連続モニターとして用いられる近赤外線分光法(near-infrared spectroscopy : NIRS)に着目した。NIRSは組織内の局所酸素飽和度(regional oxygen saturation : rSO_2)をリアルタイムに測定でき、ヘモグロビン密度(Hb index : HbI)やその内訳である酸化ヘモグロビン(oxi-Hb)、還元ヘモグロビン(deoxy-Hb)も評価可能である。遊離空腸グラフトにrSO_2モニターを行った報告は皆無で、正確さや意義、基準につき検討を行った。 対象は、2011年9月～2016年1月に当院で咽頭・喉頭の悪性腫瘍に対する切除術に引き続き遊離空腸グラフトで再建を行った連続25例(男性23例、女性2例、39～85歳、平均63.5歳)である。rSO_2モニターは、Brain Oximeter TOS-96(症例1～8)またはTOS-OR(症例9以降)を使用した。症例1で術後にrSO_2がモニターできることを確認した後、症例2で術中にrSO_2を測定可能なことを確認し、症例3以降は動静脈遮断時、灌流再開時のrSO_2変化を測定し、閉創後はICUに移動後、術後モニターに移行した。 手術死亡、在院死亡は一例も認めなかった。症例4で術後に皮下血腫を形成し血腫除去術を要したが、他の症例では手術に関連した手術直後の合併症は認めなかった。空腸グラフトの壊死は一例もなかったが、症例4では空腸と咽頭との吻合部が離開した。術後rSO_2モニターは、21例で50時間以上、19例で72時間の連続モニターができた。モニター期間中、23例中19例でrSO_2は55%以上を維持し、他の4例も50%以下には低下しなかった。症例4ではrSO_2は60～70%で推移したが、2時間後からHbIが上昇し始め、4時間後には40以上と高値になった。皮下血腫と診断し、緊急で血腫除去を行った。動脈遮断前のrSO_2は全例60%以上であったが、遮断1分後には有意に低下し($69.5 \pm 5.6\% \rightarrow 57.0 \pm 8.2\%$, $p=0.0025$)、7例では遮断後1～3分以内に55%以下に低下した。静脈遮断後、rSO_2(10例の平均値)は68.8%から1、2、3分後にそれぞれ67.7%、63.1%、61.3%と若干低下したものの、有意差は認めなかった。HbI		

は 10 例中 8 例で増加し、遮断直前に比べ遮断 100 秒後には 1.56 から 7.18 に増加した ($p=0.0459$)。再灌流までの遊離空腸グラフトの阻血時間は 70~222 分 (129.7 ± 38.3 分)で、再灌流直前の rSO_2 は 10.9~52.5% ($34.6 \pm 12.0\%$)と全例 55%以下に低下していた。阻血時間と再灌流直前の rSO_2 値には有意な相関は見られなかった($r=0.0925$)。再灌流とともに、 rSO_2 は 18 例全例で回復した。

以上の結果より、1) 空腸グラフトの rSO_2 は阻血により速やかに低下し、再灌流により速やかに回復する、2) うっ血により HbI が増加する、3) 組織虚血の指標は 55%が妥当である、ということが明らかになった。本研究ではグラフトの壊死を来した症例がなく、それが起こった場合どのような変化が起こるのかを提示することはできないが、動脈と静脈それぞれの遮断による rSO_2 の変化から、虚血では $rSO_2 < 55\%$ 、うっ血では HbI の上昇がそれぞれ指標として使える可能性が示唆された。非侵襲的に術後モニターでき、想定外のグラフトトラブルを早期診断し、迅速な治療が可能になると期待される。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	矢野 晶子
審 査 委 員	主 査 氏 名	佐藤 隆幸 
	副 査 氏 名	北岡 裕章 
	副 査 氏 名	兵頭 政光 

題 目 Near-infrared spectroscopy for monitoring free jejunal flap
(近赤外線分光法を用いた遊離空腸のモニタリング))

著 者 Akiko Yano, Kazumasa Orihashi, Yukitaka Yoshida, Motone Kuriyama

発表誌名、巻(号)、ページ(～)、 年 月
Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery DOI : 10.1016/j.bjps.2020.05.040
2020年6月22日 オンライン公開

要 旨

咽頭・喉頭・食道の悪性腫瘍の根治的切除術後の遊離空腸による再建術では、グラフトの生着率の向上を図るためグラフトの組織灌流状態を連続的に評価できる非侵襲的手法の開発が求められている。そこで、申請者は、心臓血管外科領域で脳灌流の非侵襲的連続モニターとして用いられている近赤外線分光法に着目し、頸部皮下に移植された遊離空腸の組織灌流評価法の開発およびその妥当性について評価した。

2011年9月から2016年1月の期間に本学医学部附属病院で咽頭・喉頭の悪性腫瘍切除後に引き続き遊離空腸による再建術を受けた連続25症例を対象とした。近赤外線分光法による組織内酸素飽和度・ヘモグロビン濃度測定用センサーとして、標的深度が14-16mmになるよう、発光部と受光部の距離を20mmにした。

遊離空腸グラフトの採取時に、グラフトに直接センサーを当て動脈遮断による阻血および静脈遮断による鬱血が組織内酸素飽和度・ヘモグロビン濃度に与える影響を評価した。その結果、阻血、鬱血共に組織内酸素飽和度を低下させるが、組織内ヘモグロビン濃度は、阻血では低下し、鬱血では増加することを見出した。採取し

たグラフトを頸部皮下に移植・再建術を行い閉創した後に、グラフト直上の皮膚表面に組織内酸素飽和度・ヘモグロビン濃度測定用センサーを貼り付け、連続 50 時間以上のモニタリングを行った。1 例で、術後 4 時間後にヘモグロビン濃度の急激な上昇を認めたことから皮下血腫の診断に至り、緊急の血腫除去術を行い、グラフトの血流回復を図ることができた。空腸・咽頭吻合部が離開して再手術になった例が 1 例あったが、全例でグラフトは生着した。

申請者は、全 25 例のデータを解析し、組織内酸素飽和度が 55%未満に低下した場合や、組織内ヘモグロビン濃度の急激な上昇を認めた場合には、グラフトの組織灌流障害を疑うべきであるとの結論を示した。

審査員一同は、本論文は、咽頭・喉頭・食道の悪性腫瘍の根治的切除術後の遊離空腸による再建術におけるグラフト組織灌流評価法の新しい手法の提案に繋がる画期的なものであることから、本論文を、高知大学博士（医学）の学位を授与するに値するものと判断した。