

## 学位取得者／学位記

●平成31年度 (令和元年/2019.4~2020.3) ●

### ●学位取得者

#### 橘真紀子

Pathological examination of the placenta in small for gestational age (SGA) children with or without postnatal catch-up growth J Matern Fetal Neonatal Med, 29 (6) : 982-6, 2016.

取得年月日 : 2019年4月30日

#### 村山史秀

Deposition dosages of three cromolyn forms by Cascade Impactor J Drug Deliv, 1892725, 2017.

取得年月日 : 2019年9月25日

#### 山本景子

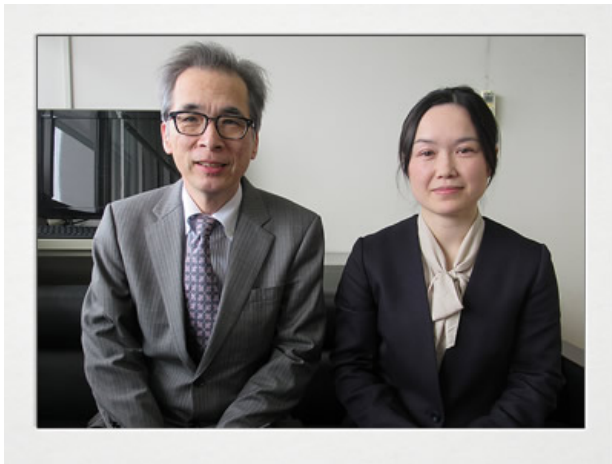
CREB activation in hypertrophic chondrocytes is involved in the skeletal overgrowth in epiphyseal chondrodysplasia Miura type caused by activating mutations of natriuretic peptide receptor B. Hum Mol Genet, 28 (7) : 1183-1198, 2019.

取得年月日 : 2019年9月25日

#### 長谷川 泰浩

CYP7A1 expression in hepatocytes is retained with upregulated .broblast growth factor 19 in pediatric biliary atresia Hepatology Research, 49 : 314-323, 2019.

取得年月日 : 2019年11月29日



## Pathological examination of the placenta in small for gestational age (SGA) children with or without postnatal catch-up growth

橘 真紀子  
医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻  
J Matern Fetal Neonatal Med. 2016  
Mar;29(6):982-6

### ● 目的

SGA (small for gestational age) 児は、出生時の体重または身長もしくはその両方が在胎週数相当の-2SD未満である児をさし、出生後の疾病罹患率が有意に増加するとされている。SGA児の約90%は生後2歳までにキャッチアップする一方で、残りの約10%では低身長が持続し、これをSGA性低身長症とよぶ。胎盤はSGAの病態を考える上で重要な材料であり、SGA児の胎盤では、重量の減少や、梗塞、血栓、フィブリン沈着、血管閉塞所見などが報告されているが、SGA児の生後のキャッチアップと胎盤組織所見との関係は明らかになっていない。そこで、本研究ではSGA児の生後のキャッチアップと胎盤組織との関連を明らかにすることを目的とした。

### ● 方法ならびに結果

1981年10月から2008年12月に、大阪府立母子保健総合医療センター(現大阪母子医療センター)で出生した、在胎37週以上の単胎児で、出生時身長・体重ともに-2SD未満の児を対象とした。染色体異常、先天異常、重症心疾患、発育異常をきたす既知の症候群は除外した。対象を電子カルテシステムにより抽出し、出生時身長・体重・頭囲、在胎週数、性別、周産期の母体疾患、生後の成長記録などの臨床情報を診療録より取得し、後方視的に検討した。2歳までに身長が標準身長の-2SDに達したものをキャッチアップ(CU)群、達しなかったものを非キャッチアップ(NC)群とした。

胎盤組織標本は、同センターで出産する母親全例に対し書面で同意を得て作製された。分娩後、胎盤を病理部へ搬送し、肉眼的観察、重量測定の上、臍帯、卵膜、胎盤実質をホルマリン固定後、パラフィン包埋し組織切片を作製、HE染色を行い、検鏡した。

各症例の胎盤組織を病理所見に基づいて以下の5群に分類した：(1)母体因子による異常(虚血、梗塞、フィブリン沈着など)、(2)胎児因子による異常(未熟・異形成絨毛)、(3)VUE (villitis of unknown etiology)、(4)その他の異常(腫瘍、臍帯異常、感染など)、(5)異常なし。

統計解析は、JMPソフトウェア version 10.0.0 および 統計ソフトR version 2.15.1を用い、Student t検定、Fischer正確検定、Tukey-Kramer検定を行い、 $P \leq 0.05$ を有意とした。

上記期間に出生した、在胎37週以上の単胎児33084例のうち、出生時身長・体重ともに-2SD未満であった235例(0.71%)より、除外基準に該当する93例を除外した。2歳までの成長が追跡できなかった90例と、必要なデータが取得できなかった3例を除いた49例(男21、女28)について検討した。

49例の内訳は、CU群41例、NC群8例であり、キャッチアップ率は84%であった。性差は見られなかった。CUおよびNC群間で在胎週数、出生時の体格、胎盤重量に有意な差は見られなかった。胎盤組織所見の分類は、(1)母体因子による異常21例、(2)胎児因子による異常7例、(3)VUE3例、(4)その他5例、(5)異常なし13例であった。キャッチアップ率は、(1)86%、(2)57%、(3)67%、(4)80%、(5)100%であり、(5)異常なしと比較し(2)胎児因子による異常で有意に低値であった。在胎週数、出生時身長・体重は、(5)異常なしと比較し(1)母体因子による異常で有意に低値であり、胎盤重量/出生時体重比は、(4)その他と比較し(2)胎児因子による異常で有意に低値であった。

## ●総括

SGA児での胎盤組織所見と生後の成長との関連について検討した。未熟もしくは異形成な絨毛を示す胎盤組織の群では、胎盤に組織学的異常を認めない群と比較して生後の成長障害のリスクが高いことが明らかとなった。SGA児の発育予後を考える上で、胎盤組織の評価は有用であると考えられた。

## ●本人コメント

栄養研での研修をきっかけに大阪母子医療センターの病理部で勉強する機会をいただき、SGA児の胎盤について27年間もの症例を解析させていただきました。この成果を学位論文としてまとめることができたことは大変幸運なことであり非常に光栄に思います。今回の研究を通じて、改めて症例蓄積の大切さと胎盤の奥深さに気づかされました。このような貴重な機会を与えていただき、心折れそうな時は叱咤激励してくださった、大藺先生、三善先生、母子センターの中山先生をはじめ、ご指導いただいた多くの先生方へこの場を借りて心より御礼申し上げます。本当にありがとうございました。



## Deposition dosages of three cromolyn forms by cascade impactor

村山 史秀

村山小児科

J Drug Deliv. 2017; 2017,1892725,6.

### ● 目的

1) 気道の閉塞部位についての評価 2) 閉塞部位に沈着する薬剤粒子径についての解析 3) クロモリンにおける異なる剤型、異なる吸入方法（ドライパウダー(DP)、加圧式定量噴霧式吸入器(pMDI)、ジェット式ネブライザー(solution, NE-C28)、メッシュ式ネブライザー(solution, NE-U22)）の有効沈着量の違いについて

### ● 方法ならびに結果

Weibelの気管支分岐モデルによって、気道の閉塞部位を想定した。第1から4分岐が気道の閉塞部位であると考えた。CEN（ヨーロッパ標準化委員会）において、粒子径と沈着部位に関する記述の中で、2-6 $\mu$ mの粒子がtracheobronchialに沈着するという記述があり、tracheobronchialは、気管支第0分岐から第4分岐に相当すると考えた。カスケードインパクトで、粒子径のMMAD(Massive Medium Aerodynamic Diameter)とその分布を調べた。MMADは、50.0 (DP)、5.2 (pMDI)、3.2 (NE-C28)、5.2 $\mu$ m (NE-U22)であった。2-6 $\mu$ mの粒子の占める割合17.0(DP)、51.8(pMDI)、49.0(NE-C28)、40.4(NE-U22)%、DP以外は、良好な結果であった。カスケードインパクトでの実験結果と1回通常量は、pMDIで、2mg (2puff) で、他は20mgであることから、通常量では、電動式ネブライザー吸入が、最も有効性が高いことが想定された。

### ● 総括

Weibel のデータから、喘息の気管支の閉塞部位は、1-4分岐であり、ヨーロッパ標準化委員会のデータから、2-6 $\mu$ mの粒子は、tracheobronchial（閉塞部位）に沈着すると考えた。MMADが2-6 $\mu$ mの占める割合は、pMDI、solutionで多かった。2-6 $\mu$ mの粒子の通常治療での沈着量は、solution、DP、pMDIの順に多く認められた。電動式ネブライザーでの吸入が最も多くの治療効果が期待できる。

### ● 本人コメント

3年前から、英語論文を書き始めました。英文論文が、3年間で9編になりました。今回の発表は、その記念すべきアクセプトされた一つの論文です。羽曳野病院、村山小児科での研究実績の蓄積があり、論文を書くことができました。昨年、American Journal of Case Reports, Medical Science Monitor, Italian Journal of Pediatricsのreviewerを務め、15論文の判定を行いました。

学位論文作成にあたり、大藺恵一教授、岡田伸太郎名誉教授、豊島協一郎元羽曳野病院小児科部長に、たいへんお世話になりました。主査の大藺恵一教授のご厚意によって、61才で、論文博士を授与されました。熊ノ郷敦教授、酒井規夫教授に副査を務めていただきました。研究の蓄積や論文作成に協力してもらっ

た妻村山菊野をはじめ、羽曳野病院の医師やスタッフの皆様、阪大医局秘書の金森美穂さん、医局員の皆様にもお世話になりました。感謝申し上げます。ありがとうございました。



## CREB activation in hypertrophic chondrocytes is involved in the skeletal overgrowth in epiphyseal chondrodysplasia Miura type caused by activating mutations of natriuretic peptide receptor B.

山本 景子  
医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻  
Hum Mol Genet. 2019 Apr  
1;28(7):1183-1198.

### ● 目的

ナトリウム利尿ペプチド受容体(NPRB)は、リガンドであるCNPが結合するとcGMPを産生する受容体型のグアニル酸シクラーゼである。CNP/NPRBシグナルは、ヒトとマウスにおいて軟骨の伸長に関与することが示唆されてきたが、その機序については不明な点が多い。我々は2012年にNPRBの機能獲得型変異が著しい骨格の過成長をきたす骨系統疾患を引き起こすことを報告し、その後の症例の蓄積によりこの疾患はEpiphyseal Chondrodysplasia, Miura type (ECDM, OMIM #615923)という疾患単位として確立された。本研究では、ECDMにおける軟骨過成長の細胞分子機序の解析を試みた。

### ● 方法ならびに結果

ECDMの初報例で同定されたNPRBの機能獲得型変異(p.V883M)を軟骨特異的に発現させたECDMモデルマウス(NPRB[p.V883M]-Tg)と、軟骨細胞モデルであるATDC5細胞、野生型マウス由来初代軟骨細胞を用いた。野生型マウスと変異マウスの脛骨成長板に対し、ヒトとマウスのNPRBを認識する抗体を用いた免疫染色を行ったところ、マウスの内因性NPRBとtransgene由来ヒト変異型NPRBは共に肥大軟骨細胞の形質膜に局在することが示唆された。変異マウスにおいて肥大軟骨層の肥厚化を認めたことから、その原因について検討した。BrdUラベリングの結果から、変異マウスの成長板においては、本来増殖を停止する肥大化後も細胞増殖を継続している軟骨細胞が存在することが示唆された。アポトーシスについては、野生型マウスと変異マウスの間で差を認めなかった。以上から、NPRBの細胞標的は肥大軟骨細胞であること、また骨格の過成長は肥大軟骨層の肥厚化によることが明らかとなった。

NPRB活性化の細胞標的が肥大軟骨細胞であると考えられたことから、次に、ATDC5と野生型マウス由来初代軟骨細胞を用いて、軟骨細胞の肥大化が開始される分化の後期にNPRBにより制御されるシグナルや遺伝子を検討した。成熟したATDC5へのCNPの添加によるNPRBの活性化は、CREBのリン酸化とその標的遺伝子であるCyclin D1の発現を誘導した。野生型マウス由来初代軟骨細胞においても同様の結果が得られ、細胞透過性のcGMPの添加によってもCREBのリン酸化が誘導された。CREBはPKAによってもリン酸化されるが、PKA阻害剤の同時添加がNPRBの活性化によるCREBのリン酸化誘導に影響を及ぼさなかったことから、NPRB活性化によるcGMP産生がPKA非依存的にCREBのリン酸化を誘導することが示唆された。

In vitroで得られた結果をin vivoにおいても確認するため、変異マウスの軟骨成長版の連続切片を用いて、リン酸化CREB(p-CREB)とCyclin D1、増殖マーカーであるKi67に対する抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、変異マウスと野生型マウスのいずれにおいても、p-CREB、Cyclin D1、Ki67のシグナルの大半は増殖軟骨層に分布していたが、変異マウスにおいては肥大軟骨層においてもこれらのシグナルを認め、これらのシグナルが共局在する細胞も確認された。

## ● 総括

以上の結果から、ECDMにおいては、肥大軟骨細胞でのNPRBの活性化により、CREBのリン酸化およびその下流の遺伝子であるCyclin D1の発現が誘導され、軟骨細胞が肥大化後も増殖を継続することにより、肥大軟骨層の肥厚化をもたらし、軟骨の過成長をきたすと考えられた。

## ● 本人コメント

大学病院で様々な骨系統疾患の患者様を出会い、現在の医療ではまだ解明されていないことがたくさんあると感じたことがきっかけで研究をしたいと考えました。研究は初めてで、初めはわからないことばかりでしたが、大阪母子医療センター研究所の環境影響部門の道上敏美先生に研究の基礎からご指導していただき、充実した大学院生生活を送ることができました。研究室の方たちや小児科の先生方のご協力で学位論文にまとめることができ、光栄に思います。熱心にご指導いただき、産休に入ったためいろいろお世話をおかけした道上敏美先生、大阪母子医療センター研究所環境影響部門に派遣してくださりたくさんのご助言をくださった大藺恵一先生をはじめ、お世話になった先生方や研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。



## **CYP7A1 expression in hepatocytes is retained with upregulated fibroblast growth factor 19 in pediatric biliary atresia**

長谷川 泰浩

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Hepatology Research 2019; 49: 314–323

### ● 目的

胆汁酸の生合成は生理的条件下で厳しく制御されている。小腸上皮細胞に発現するファルネソイドX受容体に胆汁酸が結合するとFibroblast growth factor (FGF) 19の発現が誘導される。FGF19は門脈血流に乗り、肝細胞膜にあるFGF receptor (FGFR) 4と $\beta$  klotho (KLB) 共受容体に結合し、extracellular signal-regulated kinase (ERK)を介し、胆汁酸の生合成の律速酵素であるcytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 (CYP7A1)の転写阻害を引き起こすことで胆汁酸の生合成を負に制御している。しかし胆道閉鎖症 (BA) をはじめとする小児胆汁鬱滞性疾患などの慢性胆汁鬱滞下の状況にある患者におけるこれらのシグナル伝達経路の調節機構は不明である。また肝臓は肝硬変に進展すると線維組織の割合が増加し、相対的に胆汁鬱滞を制御する場所である肝細胞の割合が減少する。BAでは急速に肝硬変へと進行する。しかし現在までに行われた小児胆汁鬱滞性疾患における肝臓を用いた研究では対象者から採取した肝臓を線維細胞、肝細胞合わせた形で「肝臓」として解析、考察されているため、肝細胞で行われている事象は過小評価されていると考えられる。我々はレーザーマイクロダイセクションの手法を用いて肝臓から肝細胞を抽出し、肝細胞内の事象にクローズアップすることでBA小児患者におけるこれらのシグナル伝達経路の制御を研究した。

### ● 方法ならびに結果

我々は8名のBA小児患者、対照として4名の胆汁鬱滞のない小児疾患コントロールから得られた肝臓及び血清のサンプルを用いて、これらのシグナル伝達経路の分子制御について解析した。レーザーマイクロダイセクションで作成した肝細胞が豊富な組織(HET)において、CYP7A1 mRNAの発現はBA小児患者では血清胆汁酸濃度が高値であるにもかかわらず抑制されていなかった。BA小児患者では血清のFGF19タンパク濃度は上昇していた。さらに定量PCRおよび in situ hybridizationの方法でFGF19mRNAの発現を認めることで、BA小児患者のHETにおいてはFGF19タンパクが合成されていることを認めた。同様の事象は、胆汁鬱滞のない患者では認めなかった。一方でFGFR4はBAの肝臓においてリン酸化されており、FGF19のシグナルは肝細胞膜までは到達していることが確認できた。しかしその下流のERKのリン酸化が有意に減少し、ERK経路が不活性化されていることを認めた。我々はERK経路がFGFRの下流でどのようにして不活性化されたかを確かめるために、FGFRの下流で阻害的に働くことが知られるSPRY2の発現を調べ、SPRY2mRNAがBA小児患者において定量PCRの方法で発現が増加していること、免疫染色法で胆汁鬱滞のない患者で認めない肝細胞での染色を認めることで、SPRY2発現が慢性胆汁鬱滞の状況下にあるBA小児患者において有意に増加していることを認めた。

### ● 総括

レーザーマイクロダイセクションの方法を用いて肝細胞にクローズアップして解析すると、慢性胆汁鬱滞の状況下にあるBA小児患者の肝細胞においては、SPRY2の発現増加によりERK経路が不活性化することで



FGF19経路のCYP7A1 mRNAの適切な発現抑制が起こらず、胆汁酸合成は抑制されていなかった。このことはBAにおける急速な肝硬変、肝不全への進行のメカニズムの一因である可能性がある。

#### ●本人コメント

胆道閉鎖症は胆汁うっ滞性肝障害のために急速に肝硬変、肝不全へと進行し、肝移植手術なくては極めて予後の悪い疾患です。急速に増悪する機序の解明およびその診療レベルの向上は患者さんおよび家族にとって喫緊の問題となっています。わたしが栄養消化器肝臓研究グループでもっと多く出会ったのも胆道閉鎖症の患者さんたちで、今回このような研究に従事できる機会に恵まれました。研究を行うにあたり、大藺先生、近藤先生、三善先生、道上先生、別所先生、川井先生をはじめ、本当にたくさんの皆さんにご指導のみならず公私にわたり支えていただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。