

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 333 号	学位申請者	吉嶺 陽造
審査委員	主査	西尾 善彦	学位
	副査	堀内 正久	副査
	副査	宮田 篤郎	副査
			博士 (医学)
			谷本 昭英
			上野 真一

主査および副査の5名は、平成27年3月9日、学位申請者 吉嶺 陽造 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) STAM-F マウスの名前の由来と作成方法について。

(回答) STelic Animal Model (STAM) の略で、商標名である。STAM マウスはステリック社で生後2日齢オスの C57BL/6N マウスに 200 μ g のストレプトゾトシン (STZ) を皮下注射し、離乳後より高脂肪食を投与して作成する。6週齢の搬入時も高脂肪食が投与継続され、健康状態は問題なかった。

質問2) 実験で用いた CDAA マウスの特徴は。

(回答) 耐糖能異常や肥満を来さず、脂肪肝と肝線維化を呈し、一部は肝細胞癌 (HCC) を発症する。

質問3) B6N-F の肝脂肪化は継時的に進行したが、STAM-F では逆に脂肪化が減少したのは何故か。

(回答) ヒト NASH では肝線維化が進展すると脂肪滴は減少することがあるが、STAM-F では肝線維化は軽度であり、線維化進行に伴う変化ではないと考えられる。HCC の多発に伴い、脂質代謝異常が何らかの影響を受けた可能性を推測するが、理由は明らかではない。

質問4) Fig.7 で STAM-F の経時的な統計による評価を行っているか。

(回答) Fig.7 の Real time PCR で STAM-F は肝での *Sptlc3* 遺伝子発現量が経時的に上昇しており、10週齢と18週齢で統計学的有意差を認めた ($p=0.008$, Tukey HSD 検定)。

質問5) 通常発癌モデル実験は $n=30$ 以上であるが、 $n=5$ は少なくないか。また、STAM-C でも一部で肝発癌が見られており、STZ による肝発癌の可能性はないか。

(回答) 追加実験で、STAM-F24 匹に SPT 阻害剤を投与した実験でも HCC を多数例で認め、STAM-F での肝発癌は多いと考えられる。また、STZ は肝細胞のミトコンドリアや核の傷害作用を有し、肝腫瘍を発症する可能性があり (*Exp Toxicol Pathol.*, 55:467-80,2004.)、STZ は STAM 群での肝腫瘍発生に寄与した可能性が考えられるが、その腫瘍発生に今回明らかにした因子が促進的に作用したと考える。

質問6) STZ の代わりにアロキサン投与や膵臓摘出術しても同様に発癌はみられるか。

(回答) 今回の実験で検討しておらず、今までにそのような報告はない。

質問7) STAM-F の肝腫瘍は転移するのか。

(回答) STAM-F18 週齢では5匹中1匹で明らかな肺転移巣を認めた。

質問8) 肝に線維化を来す際のコラーゲン産生細胞は。マーカーは。

(回答) 肝星細胞がコラーゲンを産生し、 α -SMA は活性化肝星細胞のマーカーである。

質問9) STZ 投与してもラ氏島が再生し、血糖値が改善するものもあるが膵臓の組織は確認したか。

(回答) 膵のインスリン免疫染色を行い、STAM-C では STAM-F より陽性細胞が増加していた。

質問10) 血清や肝組織中の TG は測定しているか。

最終試験の結果の要旨

(回答) 血清と肝組織中の TG 濃度を測定した。STAM-F は STAM-C と比較し、血清 TG は高値であったが、肝内 TG に差はなかった。

質問 1 1) 肝癌の転移能について、ヌードマウスに移植して転移するか報告があるか。

(回答) ヌードマウスの皮下にヒトの肝癌細胞株 (MHCC97 など) を異種移植したモデルでは肺転移が起こるが (*Br J Cancer.*, 81 : 814-21, 1999.)、今回認めた肝腫瘍についての検討や報告はない。

質問 1 2) 肝癌の原因で NBNC の肝癌の増加を%で示しているが、実数は増えているか。

(回答) 当科で肝生検を行った 1990-1994 年の NBNC による HCC は 4 人 (総 HCC104 人) で、2010-2014 年は 37 人 (総 HCC138 人) であったことから、実数も増えていると考えられる。

質問 1 3) Tukey HSD で解析を行うときに一元配置分散分析を行った後に行っているか。

(回答) 一元配置分散分析を行い、有意であることを確認後、Tukey HSD を行った。

質問 1 4) STZ で代謝的に肝細胞へのダメージはあるか。

(回答) 肝細胞のミトコンドリアや核の傷害作用があり、代謝異常が起こると考えられる。

質問 1 5) *Sptlc3* に genetic な変化があり、肝癌の発生に影響したりするのか。

(回答) *Sptlc3* の genetic な変化と肝癌発生との関連の報告はない。*Sptlc3* の過剰発現が短鎖脂肪酸 C16 の活性化、Src family kinase LYN の活性化、p53/p21/waf1/cip1 の発現低下、lipoapoptosis の亢進などを介して肝発癌に寄与するのではないかと考えた。*Sptlc3* の過剰発現の機序は今後の検討課題である。

質問 1 6) *Sptlc3* の酵素活性は測定しているか。lipid 解析はしたか。SPT 阻害剤投与時もスフィンゴミエリン等の脂質は測定しているか。インスリン治療は行ったか。

(回答) *Sptlc3* の酵素活性測定法は確立していないため、測定していない。Lipid 解析は行っていない。また、スフィンゴ脂質の解析やインスリン治療は行っていない。

質問 1 7) STAM-F の NAS スコアは CDAA や db/db-F と比較すると低めであるが、肝腫瘍は多発していた。STZ による毒性以外にモデルにおける発癌率の違いについてどう考えるか。

(回答) 高血糖および高脂肪食による糖代謝異常が CDAA と比較し顕著であり、db/db-F と比較すると体重減少がみられた。加えて *Sptlc3* などの遺伝子発現異常が肝発癌率の差に影響したと考えている。

質問 1 8) 外科症例では NBNC の肝癌は増加しているが、NASH 起因は意外と少ない。STAM-F は肝線維化も軽度であり、実臨床の NBNC 肝癌のモデルとして適当なのではないか。今後、臨床検体を用いて NBNC 肝癌の研究をすすめてはどうか。

(回答) STAM-F は進行した肝線維化を呈さずに HCC を高率に発症することから NBNC の肝癌モデルの一つと考えられる。今後、臨床検体を用いた *Sptlc3* 発現などの検討をすすめていきたい。

質問 1 9) 非癌部と癌部で *Sptlc3* の遺伝子発現量に差はあるか。

(回答) STAM-F 14、18 週齢ともに癌部と非癌部で *Sptlc3* の発現量の差はなかった。

質問 2 0) STAM-F で *Sptlc3* 遺伝子発現が亢進する上流の因子は。

(回答) TLR4 による飽和脂肪酸の認識が *Spt* 遺伝子上流にあると報告されている (*J Clin Invest.*, 121:1858-70, 2011.)。 *Sptlc3* 遺伝子発現を調節する転写因子等は明らかにされていない。

質問 2 1) 血中セラミドは測定したか。

(回答) スフィンゴミエリン等の血清セラミドは測定していない。

質問 2 2) 今回投与した高脂肪食の脂肪成分は。

(回答) 飽和脂肪酸が多くを占め、重量比 35.0%、カロリー比 62.2%である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。