

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 262 号		学位申請者	寺崎 寛人
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)
	副査	金蔵 拓郎	副査	黒野 祐一
	副査	中川 昌之	副査	中尾 久美子
<p>主査および副査の5名は、平成25年10月29日、学位申請者 寺崎 寛人 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。</p> <p>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。</p> <p>質問1 実際の臨床で加齢黄斑変性の wet type に関与している RPE は非極性 RPE であり、dry type に関与している RPE は極性 RPE であることは分かっているのか。</p> <p>(回答) wet type では脱分化した RPE、つまり非極性 RPE が重要であることは過去の報告で分かっている。極性 RPE は、dry AMD における RPE というより、健康な RPE 細胞であり、正常な RPE に TNF-α などの炎症性サイトカインが暴露すると、dry AMD の病態に近づくと考えている。</p> <p>質問2 なぜ Transwell を使うと細胞が極性をもつのか。</p> <p>(回答) 細胞の接着面をフィブロネクチンでコートすることや接着面側 (基底膜側) に培地が接触していることが、生体の RPE の状態に近いために、極性を持つのではないかと考えている。</p> <p>質問3 極性細胞と非極性細胞を比較していることは、上皮間葉転換について研究していることと同じか。</p> <p>(回答) ほとんど同じことであると考えている。</p> <p>質問4 論文中の Figure 1 では極性 RPE の VEGF 分泌が 2000 pg を超えているが、Figure 3 では 1600 pg の計算になる。この違いは実験系による違いか。</p> <p>(回答) 研究で用いている細胞は初代培養のブタ細胞を用いているので、摘出眼によって、RPE の VEGF 分泌量に差が出る。そのために実験によって VEGF の量に差が生じている。</p> <p>質問5 Figure I-J の免疫染色では、細胞は単層になっているのか。MCP 1 で染色した理由はあるのか。</p> <p>(回答) 極性 RPE は単層になっていると考えている。非極性 RPE は、検眼鏡的には単層になっているようにみえるが、電顕で観察すると細胞が重層している部分もある。MCP 1 は上皮細胞の頂側に発現がみられるので極性をみる良いマーカーであるが、実際に使用した理由は、reviewer からの指示によるものである。</p> <p>質問6 論文中で NF-κB と JNK のクロストークに言及しているが、実際にどのような機構で NF-κB が JNK を抑制しているのか。</p> <p>(回答) RPE での報告はないが、過去の報告では NF-κB の活性化で産生された Gadd45β が JNK の上流の MKK を抑制するという報告はある。</p> <p>質問7 臨床では加齢黄斑変性において、dry type と wet type のどちらが多いのか。性差はないのか。</p> <p>(回答) 欧米では dry type の方が多いが、本邦では wet type の方が多い。加齢黄斑変性は男性の方が多くと考えられているが、最近では男性に喫煙者が多いために性差があるだけではないかという報告もある。</p> <p>質問8 加齢黄斑変性の原因は分かっているのか。</p>				

最終試験の結果の要旨

(回答) 疫学的には、喫煙・加齢が重要な因子であるといわれている。原因ははっきり分かっていないが、活性酸素による細胞障害が原因のひとつであると考えられている。

質問 9 wet AMD の病理組織でみられる非極性 RPE は VEGF の分泌が少なくなっているが、実際の臨床ではどうなっていると考えられるか。

(回答) *in vitro* の実験では非極性 RPE の VEGF 分泌量は少ないが、実際には TGF- β など他のサイトカインの影響や組織の虚血による VEGF の up-regulation が働いていると思われるので、実際の VEGF 分泌量は実験結果よりも多いと考えている。

質問 10 *in vitro* の実験ではブタ細胞を使っているのに *in vivo* の実験ではラットを使っているのは何故か。

(回答) ラットの RPE 細胞を用いても、技術的には極性 RPE の作成は可能と考えているが、実験に用いるには一度に大量の RPE を採取する必要があるので眼球の大きなブタを用いて行った。

質問 11 論文では TNF- α が極性 RPE の VEGF 産生を抑制するために網脈絡膜の萎縮が起きると結論しているが、*in vitro* では TNF- α による RPE の VEGF 抑制は 4 割程度であり、まだ 6 割の VEGF は分泌されている。本当にこの程度の減少で網脈絡膜の萎縮が起こるのか。

(回答) RPE からの VEGF 分泌減少が一時的なものであれば網脈絡膜への影響は少ないと思われるが、この状態が慢性的に続くことがあれば網脈絡膜の萎縮に繋がると考えている。

質問 12 今回は TNF- α の濃度を 10 ng/ml と固定して実験しているが、TNF- α は濃度によって影響が変わってくるサイトカインなので、実際にはもっと複雑な現象が起こっているのではないか。

(回答) 実際には、複雑な現象が起こっている可能性は考えられる。

質問 13 NF- κ B を阻害すると非極性 RPE の VEGF 分泌が増加しているが、臨床では NF- κ B を抑制するステロイドを使用することはあるのか。

(回答) 現在は wet AMD の治療には抗 VEGF 薬が用いられているが、それ以前にはステロイドの硝子体内注射やテノン嚢下注射が行われ、ある程度は効果があり、少なくとも病態の増悪はみられなかった。これは、ステロイドが直接 VEGF の分泌を減少させたというよりはその抗炎症作用によるものと思われる。

質問 14 dry AMD にはどのような治療法が行われているのか。

(回答) dry AMD については現在、抗酸化物質のサプリメントが有効と言われているがその効果は限定的である。

質問 15 生体の RPE は分裂能がないと説明していたが、それでは RPE は失われても増殖しないのか。

(回答) 基本的には分裂能はないが、眼球の周辺部に存在する RPE には増殖能が残っているという報告がある。おそらく、RPE が失われた場合にはその周辺の RPE が増殖して補完することはあると思われる。

質問 16 VEGF には VEGF-A 以外にもサブタイプが存在するが、なぜ今回は VEGF-A だけを測定したのか。

(回答) 眼科領域で疾患に関与している VEGF は、ほとんどが VEGF-A であるために今回は VEGF-A のみを測定した。

質問 17 臨床で用いられている抗 VEGF 薬は実際に効果的なのか。

(回答) 新生血管に対しては非常に有効な治療薬である。その一方で、加齢黄斑変性の患者では、抗 VEGF 薬による治療を繰り返さないといけない症例も多く今後の課題である。

質問 18 今回 TNF- α が加齢黄斑変性の原因のひとつであると結論しているが、加齢黄斑変性の患者には必ず炎症があるといっているのか。

(回答) 加齢による RPE 細胞の老化や細胞内への脂質の蓄積などの所見もあり、加齢黄斑変性の患者には、炎症は存在すると考えている。

質問 19 TNF- α 以外の炎症性サイトカインにおいて、RPE の VEGF 分泌に与える影響は調べられているのか。

(回答) TGF- β や IL-1 などのほとんどのサイトカインは RPE の VEGF 分泌を増加させるという報告があるが、ほとんどの研究が非極性細胞を用いた研究であり今後の検討が必要である。

質問 20 多くのサイトカインのなかで何故 TNF- α の影響を調べようと考えたのか。

(回答) いくつかのサイトカインを用いて RPE の VEGF 分泌に与える影響を調べたところ、TNF- α を用いた結果が従来と異なる興味深い結果を得たので TNF- α の影響を調べる実験を行った。

質問 21 今回、RPE の極性が研究のキーワードとなっているが、RPE の極性を失わせる要因は知られているのか。

(回答) 細胞極性の研究は、上皮間葉転換として研究が進んでおり、炎症性サイトカインの TGF- β や TNF- α が RPE の上皮間葉転換を進行させる、すなわち極性を失わせるという報告がある。

質問 22 TNF- α が極性 RPE に与える影響は VEGF 分泌を抑える以外にあるのか。

(回答) VEGF 分泌を抑える他にも極性 RPE のバリア機能を低下させることが分かっている。

質問 23 糖尿病網膜症やぶどう膜炎の患者においても硝子体中の TNF- α 濃度が上昇しているが、これらの疾患においても RPE からの VEGF 分泌は減少しているのか。

(回答) 硝子体中に TNF- α が単独で存在していれば、RPE からの VEGF 分泌は低下しているはずだが、糖尿病網膜症による網膜の虚血があれば VEGF はむしろ増加する可能性もある。ぶどう膜炎においても TNF- α 以外のサイトカインの影響も考えられるので、RPE からの VEGF 分泌がどのように変化しているかは不明である。

質問 24 RPE からの VEGF 分泌の低下が脈絡膜の萎縮に繋がると結論しているが、なぜ今日臨床で用いられている抗 VEGF 薬にはそのような合併症がみられないのか。

(回答) 硝子体注射された抗 VEGF 薬の多くは、RPE の上層にある感覚網膜で捕獲されて、実際に RPE が暴露する抗 VEGF 薬は少量であるために、RPE の VEGF 分泌に与える影響は限定的であるためと思われる。

質問 25 dry AMD では RPE の萎縮が先に生じて、脈絡膜の萎縮がその後起こるといわれているが、今回の結果から考えると脈絡膜の障害が先に起こるのではないのか。

(回答) RPE 細胞が脈絡膜を栄養している一方で、RPE 自身も脈絡膜からの栄養で機能を維持している。TNF- α の暴露などの慢性炎症で RPE からの VEGF 分泌の低下だけでなく、RPE の老化・機能の低下も起こりうるもので、実際には RPE と脈絡膜の障害は同時に起こっていると考えている。

質問 26 今回の結果から、dry AMD にはどのような治療が適切だと考えているか。

(回答) RPE からの VEGF 減少には、NF- κ B の経路が関与していることが分かったので、ステロイドなどの NF- κ B の経路を抑制する薬剤が望ましいと考えられる。しかし、ステロイドの長期投与は、白内障・緑内障などの合併症のリスクもあり、新たな薬剤の開発が望ましいと考える。現在臨床で用いられている、抗 TNF- α 抗体も効果的かもしれないが、ステロイド同様に合併症の懸念はある。

質問 27 低酸素になると、VEGF 分泌が亢進することが知られているが、コントロールの状態では極性 RPE と非極性 RPE の酸素に対する反応に違いはあるのか。

(回答) 直接的な検討はしていないが、予備実験で、極性 RPE と非極性 RPE のコントロールの状態での低酸素誘導因子の発現を調べた際には、差を認めなかったことから、VEGF の分泌の違いに低酸素の影響はなかったものと考えている。

質問 28 一度極性をもった細胞を、もう一度非極性用のプレートに蒔き直したら極性は失われるのか。

(回答) そのような実験を行ったことはないが、非極性用のプレートではほとんどの RPE 細胞が極性を失うことを考えると、おそらく細胞極性は失われると思われる。

質問 29 極性を持つことで TNF- α の受容体の発現は変化するのか。

(回答) 予備実験でウエスタンブロットを行ったが TNF- α の受容体の発現には差はみられなかった。

質問 30 Figure 3 の VEGF の PCR 定量でみているものは、VEGF165 だと思うが、他のアイソフォームについては違いがあったのか。

(回答) 他のアイソフォームについては違いを認めなかった。

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。