

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 332 号		学位申請者	佐々木 文郷
審査委員	主査	乾 明夫	学位	博士 (医学)
	副査	堀内 正久	副査	原 博満
	副査	谷本 昭英	副査	石神 純也
<p>主査および副査の5名は、平成27年4月15日、学位申請者 佐々木文郷 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。</p> <p>質問1) GPNMB はどのようなメカニズムでサイトカイン産生に関与するのか？  (回答) 今回の検討では、p38 および ERK1/2 のリン酸化シグナルを抑制することによりサイトカイン産生に対して抑制的に作用していることが考えられた。しかし、詳細なメカニズムは不明である。また、GPNMB を活性化する因子は現在のところ不明である。</p> <p>質問2) CDAA 食飼育ラットでは、GPNMB は関与しているのか？  (回答) CDAA 食飼育ラットでは肝マクロファージに高発現し、組織修復に関与している可能性が報告されている。</p> <p>質問3) GPNMB (DC-HIL) が Syndecan-4 を介して T cell 系を抑制し、抗炎症に作用しているという報告はあるが、この実験系では検討していないのか？  (回答) 検討していない。</p> <p>質問4) D2 mice では、GPNMB の mRNA レベルの発現は低いのか？  (回答) 腹腔マクロファージの実験で示した通り、GPNMB のメッセージは低かった。</p> <p>質問5) GPNMB の抗炎症に IL-10 は関与しているのか？  (回答) 変異マウスから単離した腹腔マクロファージの実験系で IL-10 産生に差があったが、その他の実験では IL-10 産生には差がなく、IL-10 よりも炎症性サイトカインの抑制によって抗炎症に作用している可能性が考えられる。</p> <p>質問6) IL-10 の関与を調べるには、どのような実験を行えばよいか？  (回答) クローン病モデルである IL-10 ノックアウトマウスと GPNMB ノックアウトマウスのダブルノックアウトマウスを作製し、腸炎の重症度やマクロファージのサイトカイン産生を評価する実験を行うと、IL-10 の関与がより明瞭になると考えられる。</p> <p>質問7) GPNMB は、マクロファージの炎症の調節因子として発現するという報告があるが、LPS で刺激すると GPNMB 発現は低下することから、炎症の調節因子と言えるか？  (回答) GPNMB 発現は LPS 刺激で抑制されるが、その後、LPS を除去すると発現が増強することから、惹起された炎症が収束する時に作用する調整因子ではないかと推測している。</p> <p>質問8) 腸管マクロファージもしくは肝クッパー細胞など、レジデントマクロファージ (炎症のない状態のマクロファージ) で GPNMB の発現はあるのか？  (回答) レジデントマクロファージの状態では、GPNMB は発現していないことを免疫組織化学染色で確認している。</p> <p>質問9) DSS 腸炎モデルの実験系において、大腸組織全体をホモジナイズし、炎症性サイトカインの解析を行っているが、腸管マクロファージのみを単離した実験は行っていないのか？  (回答) 今回の検討では行っていないが、現在、取り組んでいる。</p> <p>質問10) 潰瘍性大腸炎患者数が増加している理由は？  (回答) 食生活の変化 (食生活の欧米化) により、摂取脂肪量の増加が関与していると考えられている。また、衛生環境の改善により、患者数が増加しているとの報告もある。</p> <p>質問11) DSS 腸炎モデルと潰瘍性大腸炎の近似性について、腸管に浸潤しているのは、マクロファージのみか？  (回答) マクロファージだけではなく、好中球、リンパ球など各種炎症細胞が浸潤している。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 12) ヒトの潰瘍性大腸炎標本での GPNMB の発現を認めたが、潰瘍のない部分での GPNMB 発現は認められるか？  
また潰瘍性大腸炎に特異的な現象か？

(回答) 潰瘍のない部分での検討や、クローン病や細菌性腸炎などのその他の炎症性腸疾患での検討は行っておらず、不明である。

質問 13) 潰瘍性大腸炎において GPNMB は好中球や上皮での発現はないのか？

(回答) 好中球や上皮で GPNMB が発現するという報告はなく、我々の検討でも発現はみられなかった。

質問 14) 腹腔マクロファージを単離する方法としてチオグリコレートを使用しているが、腸管マクロファージと同様と考えるとよいのか？

(回答) 異なる性質もあると考えられるが、今回は十分検討していない。

質問 15) ヒト由来のマクロファージ細胞株で同様の実験をおこなったことがあるか？

(回答) HL-60 細胞で同様の実験を行った。HL-60 細胞は GPNMB の発現を認めたが、浮遊系細胞であり、siRNA の導入が困難で、しっかりとした結果が得られなかった。

質問 16) DSS 腸炎モデルについて、遠位大腸に炎症が発生するのは？

(回答) 分子量の差で炎症部位が異なることが知られている。今回は、分子量 50000 の DSS を使用しており、遠位大腸に腸炎が惹起された。

質問 17) これまで腫瘍内のマクロファージで GPNMB に関連した報告はないか？

(回答) 乳癌や皮膚癌での報告はあるが、消化癌での報告はない。

質問 18) GPNMB は M2 マクロファージに発現しているとのことだが、M2 マーカーである CD168 の発現は検討しているか？

(回答) 検討していない。

質問 19) GPNMB は実際の IBD 診療でどのように役に立つのか？

(回答) GPNMB を高発現させる因子が不明なため、現時点では難しいが、GPNMB 蛋白や GPNMB を高発現させる因子を用いて、抗炎症作用によって粘膜治癒を誘導する治療薬の開発に寄与できる可能性がある。

質問 20) IBD (UC, CD) において免疫調整剤が使用されるが、同疾患のマクロファージにおける役割は？

(回答) 腸管局所では常に多数の腸内細菌が存在し、健常者ではマクロファージは腸内細菌に対して過剰な免疫反応を起こさないように制御されている。一方、炎症性腸疾患では、腸管マクロファージの腸内細菌に対する免疫制御機構が破綻し、腸内細菌に対して過剰な免疫反応が誘導されることによって病態が形成されると考えられている。

質問 21) GPNMB の細胞外ドメインの役割は？ (他の分子と結合するのか？)

(回答) 乳癌細胞を用いた検討で、GPNMB が protease である ADMA10 で切断され、細胞外ドメインが血管内皮細胞の遊走に関与するという報告があるが、細胞外ドメインと他の分子との結合に関する詳細な報告はない。

質問 22) D2/D2+マウス (特に D2+mice) の作出方法は？

(回答) D2 マウスは gpnmb 遺伝子内に stop codon が存在し、GPNMB 蛋白が発現しない自然発生のマウスである。D2+マウスは、変異 gpnmb 遺伝子のある染色体を野生型 gpnmb 遺伝子の染色体に置換したマウスである。

質問 23) 体重減少率の Fig に使用した統計は？

(回答) 実験開始日ごとに、各群のマウスの体重を測定し、Turkey's test で多重比較を行った。

質問 24) Fig3A の D2/D2+マウス腹腔マクロファージに LPS 刺激を加えた IL-10 のデータは有意差がありそうであるが？

(回答) LPS+ の D2/D2+ のみの 2 群比較ではなく、LPS- の D2/D2+ も含めた 4 群比較を Turkey's 検定にておこなったため有意差はなかった。

質問 25) GPNMB のウエスタン・プロットでバンドが 2 本出ている理由は？

(回答) GPNMB 蛋白はスプライシング・バリエーションによる 560 と 572 アミノ酸の 2 つの GPNMB が存在することが知られており、その 2 つを検出したためと考えている。

質問 26) D2/D2+マウスにおいて DSS を投与しないコントロールマウスで腸炎の差などはあるのか？

(回答) DSS を投与しない場合は、GPNMB の発現の有無に関わらず腸炎は発症せず、差はなかった。

質問 27) 現在、UC で使用される薬剤 (ステロイドや 5ASA 製剤) で GPNMB 発現に影響を与える薬剤はあるのか？

(回答) 報告はなく、我々も検討していない。

質問 28) D2 では、IBS の症状のような便通異常をきたすことがあるのか？

(回答) そのような報告はない。

質問 29) Microglia の cell line や脳内での GPNMB の発現・機能はあるのか？

(回答) 今回は検討していないが、脳虚血の状態が発現が亢進するという報告がある。

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、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。