最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 364 号		学位申請者	熊谷　公太郎
審査委員	主査	夏越　祥次	学位	博士（医学）
	副査	堀内　正久	副査	谷本　昭英
	副査	原　博満	副査	門野　潤

主査および副査の５名は、平成 28 年 2 月 17 日、学位申請者 熊谷 公太郎君に面接し、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）四塩化炭素（CCl_4）投与による肝障害のメカニズムは？
（回答）CCl_4 は肝細胞の Cyp2E1 で代謝されるが、その際にフリーラジカルが産生され、細胞膜にて脂質過酸化反応が誘導されて細胞膜が破壊され、肝細胞死（肝障害）が誘導される。

質問２）コリン欠乏アミノ酸置換食（CDAA）における肝障害の発症機序は？またマウスでも可能か？
（回答）メチオニンやコリン欠乏食では肝臓でリポ蛋白質が合成できずに、取り込んだ脂肪酸が肝細胞に蓄積して最終的に脂肪肝となる。マウスでも同様の方法で作成可能である。

質問３）CDAA 食飼育ラット肝より Gpnmb を見いだした際の役割は？
（回答）CDAA 食飼育ラット肝に早期に発現する遺伝子群から単離した遺伝子であるが、Gpnmb を肝癌細胞に導入するとその転移、浸潤が亢進した。

質問４）Gpnmb トランスジェニック（Tg）ラットを CDAA 食で飼育すると肝線維化が抑制されているが、そのメカニズムは？　また、Gpnmb 発現に用いたプロモーターは？
（回答）Gpnmb-Tg マウスでは PDGF 受容体 α、TIMP-1 が有意に抑制されていたが、それ以上のメカニズムは不明である。また Gpnmb 発現には肝細胞特異的な human serum amyloid P (SAP) promoter を用いた。

質問５）CCl4 投与２日目、４日目に浸潤するマクロファージにおける CD11b 発現は異なるのか？
（回答）過去の報告では、CD11b は CCl4 投与２日目に上昇し、４日目には減少する。また、浸潤マクロファージが経時的に形質を変化させることも報告されており、Precursor が異なるのではなく、CD11b 陽性のマクロファージが CD68 陽性マクロファージに形質を変化している可能性がある。

質問６）TNF-α と IL-6 の発現をみているか？創傷治癒マクロファージも TNF-α を発現するのか？
（回答）TNF-α、IL-6 ともに修復期にかけて上昇しており、創傷治癒マクロファージも TNF-α を発現する。

質問７）Gpnmb 欠損マウスでは経時的に FACS しているか？CD68 陽性マクロファージの数は？CD68 は創傷治癒マクロファージのマーカーなのか？
（回答）Gpnmb 欠損マウスでも同様に、修復期にかけて主として CD68 陽性マクロファージが浸潤していたが、Gpnmb 変異型マウスでは CD68 陽性マクロファージの比率および絶対数が増加していた。

質問８）Gpnmb 欠損マウスでマクロファージを単離して貪食能を評価したことがあるか？これらの細胞で MMP-13 産生に差はないか？
（回答）Gpnmb 変異型マウス由来のマクロファージでも同様に貪食能は低下していた。MMP-13 の差については評価していない。

質問９）Gpnmb は何を認識して、細胞内でどういった変化をおこすのか？LPS を添加するとどうなるのか？貪食すると上昇するなど。
（回答）Gpnmb が何を認識し、細胞内でどのような変化をおこすかについては、未だ明らかになっていない。LPS を添加すると、Gpnmb 発現は一旦低下し、時間の経過とともに増強する。貪食では発現は亢進しない。

質問１０）Gpnmb と星細胞の関係は、貪食によって初めて認めるものなのか？早いタイミングでクロドロネートを投与すると結果がかわるのか？
（回答）Gpnmb と星細胞との関係は貪食後の MMP-13 の産生によって初めて誘導される。また CCl4 投与前にクロドロネートを投与すると、肝障害はさらに増悪し、修復もみられない。

質問１１）TNF-α、IL-6 が肝再生に関与するとのことだが、IL-1β のデータのみを提示したのはなぜか？

最終試験の結果の要旨

（回答）IL-1βと IL-6 は経時的な変化が類似していたので、IL-1βを選択した。TNF-αに関しては、Gpnmb 変異マウスの実験系では評価しておらず、解析が不十分であったため、提示しなかった。
質問１２）TGF-β、MMP-13 の mRNA では差がなく、培養上清で差があることはどう説明するか？
（回答）TGF-βや MMP-13 の分泌そのものに影響している可能性と、活性化に関与している可能性の２つを考える。
質問１３）四塩化炭素以外で急激に肝壊死をおこす肝障害モデルはあるか？四塩化炭素ではなぜ中心静脈周囲に壊死が起こるのか？
（回答）チオアセトアミドや門脈の結紮による虚血性肝障害モデルがある。CCl_4 は Cyp2E1 で代謝されるが、Cyp2E1 の分布が中心静脈周囲の肝細胞に存在するためである。
質問１４）臨床における急性肝不全とこのモデルとで何か共通点は？
（回答）広範囲壊死からの修復過程に関しては、臨床における急性肝不全の病態とほぼ同様と考える。
質問１５）正常肝では肝臓にマクロファージはいるか？それは在住か？それはどこにいるのか？
（回答）肝臓の在住マクロファージは類洞内に存在する。
質問１６）クロドロネートはマクロファージの細胞死を誘導するのか、浸潤を阻害するのか？
（回答）クロドロネートはマクロファージに貪食され、ATP を枯渇させ、細胞死させる。
質問１７）アポトーシス小体をマクロファージが取り込むのは貪食というのか？アポトーシス小体を特異的に認識するレセプターがあるのか？
（回答）貪食と言う。Gpnmb と貪食に関与する分子は複数解析したが、明確なデータは得られなかった。
質問１８）CCl_4 のモデルにおける肝細胞死は、ネクローシスなのか、アポトーシスなのか？
（回答）基本的にはネクローシスだが、TUNEL 染色するとアポトーシス細胞も散見され、両方存在すると考える。
質問１９）データ解析を MMP-9、MMP-13 に限った理由はあるか？
（回答）過去の報告から MMP-9 を選択した。また MMP-13 は急性肝障害モデルで発現がみられ、その局在がマクロファージであることが報告されていたたま、今回解析した。
質問２０）Gpnmb の Western blotting で２つバンドがあるのはなぜ？
（回答）スプライシングバリアントが存在するため、MW の異なった Gpnmb 蛋白が検出される。
質問２１）Gpnmb はどういう糖鎖をもった蛋白なのか？どのような意味があるのか？
（回答）具体的にどのような糖鎖構造を持つかは明らかにされていない。
質問２２）Gpnmb は細胞膜に存在するのか？
（回答）発現すると細胞膜に存在する。
質問２３）DBA マウスはどのような方法で見つけたのか？もともと phenotype に差があるのか？
（回答）自然発症緑内障マウスとして報告され、その原因遺伝子として Gpnmb の変異が見出された。。
質問２４）DBA マウスにクロドロネートは投与したか？
（回答）Gpnmb 欠損の影響を検討するため、全てのマクロファージ欠損させる実験は行っていない。
質問２５）Hepatocyte debris とは？
（回答）マウス肝臓より肝細胞を単離し、培養後、抗 Fas 抗体を投与してアポトーシスを誘導したものを Hepatocyte debris とした。
質問２６）このモデルは臨床でみられる急性肝障害と同様の機序になりうるか？
（回答）虚血性肝障害に最も近いと考えているが、修復過程に関しては、ウイルス性の急性肝不全にも同様の機序が考えられる。
質問２７）TGF-βから下流に対する何か pathway はあるか？
（回答）今回の検討で Gpnmb と TGF-βとの関連性は明らかにできなかったが、慢性肝障害モデルなど他のモデルでも検討し、関連性があればそのシグナル伝達についても検討したい。
質問２８）発癌と Gpnmb 陽性マクロファージとの関わりは？
（回答）過去の報告で腫瘍関連マクロファージに Gpnmb が発現していることも報告されており、腫瘍周囲の微小環境において癌の発育、浸潤、転移に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。
質問２９）臨床でこれらの知見をどう生かすか？
（回答）Gpnmb は傷害組織の再生・修復のマーカーになりうると考えており、急性肝障害における予後予測因子としても応用できるのではないかと考えている。また、Gpnmb 発現したマクロファージを移植できれば、新たな肝再生・抗線維化療法にもなりうると考えている。
質問３０）星細胞が筋線維芽細胞になるのか？MMP-13 は筋線維芽細胞の分化に関与しているのか？
（回答）星細胞が活性化し、筋線維芽細胞になる。MMP-13 は筋線維芽細胞の成熟、遊走にも関与している。

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。