

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 412号	学位申請者	前田 拓郎
審査委員	主査	橋口 照人	学位
	副査	堀内 正久	副査
	副査	原 博満	副査
			博士 (医学)
			谷本 昭英
			門野 潤

主査および副査の5名は、平成29年1月26日、学位申請者 前田 拓郎 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) HNP-1はどのようなプロセスを経てアズール顆粒に濃縮するのか。

(回答) HNPの生合成は前骨髄細胞の段階で認められ、最初に94個のアミノ酸からなるPreproHNPが合成され、蛋白分解後、ProHNPの過程を経て、成熟HNPとしてアズール顆粒内に蓄えられる。

質問2) HNP-1は実際に組織から分泌されるのか。アズール顆粒からはどのような機序で細胞外に放出されるのか。

(回答) ヒト好中球が活性化するとアズール顆粒が細胞膜と融合して細胞外に放出される。トランスジェニックマウス(Tgマウス)では好中球以外の組織にも発現しているが、それらの組織からHNPが分泌されているかは確認していない。

質問3) HNP-1は細胞内に蓄積しているか。ELISA、Western blotで確認しているか。どの臓器で高濃度に存在するか。

(回答) ヒトでは好中球のアズール顆粒に存在する。通常のマウスには存在しない。Tgマウスでは全身に発現している。血漿、組織中のHNPはELISAで確認しており、口側大腸で高値であった。

質問4) Figure 5で合成HNP-1とnative HNPの違いは何か。

(回答) 合成HNP-1がnative HNPと同じ構造、機能を有しているかは不明であり、またHNPはHNP-1~HNP-4が存在するのでHNP-2~HNP-4の作用の可能性を除外するためにnative HNPにおいても検討した。

質問5) TgマウスのHNP-1のジスルフィド結合が保たれているか確認しているか。確認する方法はあるか。

(回答) 確認していない。試料を還元型と非還元型にてWestern blotの結果を比較することで確認できる。

質問6) C57BL/6NマウスとBalb/cマウスにおいてDSSに対する感受性は異なるのか。DSS腸炎の程度がストレインの差で感受性が異なることを決めている分子は何か。

(回答) C57BL/6NマウスのほうがDSSに対する感受性がやや高い。DSS感受性遺伝子については明らかになっていない。

質問7) Figure 2のmRNAレベルで一般的には野生型マウスを1にするがTgマウスを1にしている意味は何か。

(回答) mRNAレベルが低いTgマウスを基準とした。

質問8) TgマウスではHNP-1は全身に発現していたか。プロモーターは何か。

(回答) 全身に発現していた。CAGプロモーターを使用した。

質問9) ヒトでHNPが発現しているのは好中球だけか。

(回答) 基本的に好中球に発現しているが、潰瘍性大腸炎(UC)患者では好中球が浸潤した腸管上皮で発現していた。

質問10) TgマウスのDSS腸炎においてHNPの発現を免疫染色で確認したか。

(回答) 今回の実験では確認していない。

質問11) 腸管に浸潤している炎症細胞に好中球は存在するか。陰窩炎を認めるのか。

(回答) 好中球が存在すると考える。今回の実験の観察期間では陰窩炎は認めなかった。

質問12) マウスにはHNPのホモログとなる分子があるのか。

(回答) 好中球由来 α -ディフェンシン(HNP)のホモログ分子はマウスに存在しないが、パネート細胞由来の α -ディフェンシンはヒト・マウスともに認められる。

質問13) lamina propria mononuclear cells (LPMCs)はマクロファージを指すのか。付着していない細胞をみている可能性はないのか。

(回答) 付着細胞の約70%がFACSによる解析よりF4/80陽性マクロファージと判断している。

質問14) ヒトの生体内のHNP濃度はどのくらいか。In vitroの実験系の濃度が1000倍異なるのはなぜか。

(回答) 40~100ng/ml程度である。Tgマウスの腸組織濃度を参考にHNP-1添加濃度を0.1~1 μ g/mlと設定した。

最終試験の結果の要旨

(様 式 1 5)

質問 1 5) ヒトとマウスでディフェンシンの機能に違いはあるか。

(回答) 基本的に同等の抗菌作用があると考えられ、またディフェンシン欠損マウスでは DSS 腸炎の感受性が強い。

質問 1 6) マウスのディフェンシンは血漿中にあるのか。もともと存在するディフェンシンをさらに投与したのか。

(回答) パネート細胞由来 α -ディフェンシン (クリプチジン) はマウスにも存在するが、HNP のホモログ分子はマウスに存在しない。このため、HNP の作用を調べるためにマウスを使用した。マウス血漿中のクリプチジンレベルについての報告はない。

質問 1 7) LPMCs を用いた実験でサイトカイン発現の上昇、低下がみられるが、高濃度 HNP-1 に対してどのように応答するのか。

(回答) 経路は明らかでないが、高濃度 HNP-1 でサイトカイン発現が低下しているのは細胞死によるものではない。

質問 1 8) intermediate の濃度でサイトカイン発現が上昇している理由は何か。

(回答) 上昇している理由は明らかでないが、IL-6、IL-10 の抗炎症性の作用による可能性がある。

質問 1 9) ディフェンシンは高い濃度で抗菌活性があるのか。抗菌活性のメカニズムは何か。

(回答) 濃度が高すぎると細胞毒性の作用を認める。抗菌活性としては正に荷電したディフェンシンは、負に荷電した細胞膜表面に結合して重合体を形成し細胞膜に入り込んで孔を形成し膜透過性が亢進すると考えられている。

質問 2 0) 低濃度の HNP では細胞毒性を認めないことより受容体があるのか。P2 受容体は直接の受容体なのか。

(回答) 我々は HNP が腸管上皮細胞において P2 受容体を介して IL-8 産生を誘導することを報告している。

質問 2 1) 腸内細菌や T 細胞の変化について今回の研究で調べたか。

(回答) 今回は検討していない。

質問 2 2) ディフェンシン欠損マウスでは腸管マクロファージについて調べているか。今回の実験で IL-1 β の分泌がブロックされる可能性はあるか。

(回答) 腸管マクロファージについては調べていないが、マウスディフェンシンが LPS で活性化されたマウス腹腔マクロファージからの IL-1 β の放出を阻害、また HNP-1 が LPS で活性化されたヒト単球からの ATP 誘導性の IL-1 β の放出を阻害した報告がある。今回の実験でも IL-1 β がブロックされる可能性を検討したが、LPMCs 実験では認めなかった。

質問 2 3) DSS 腸炎の重症度、またマウスの生存率はどの程度か。実際の UC における重症度はどの程度か。

(回答) DSS 腸炎として中等症程度で生存率は 100%であった。実際の UC での重症度は軽症～中等症程度と思われる。

質問 2 4) マウスが弱ってきた場合、どの程度でサクリファイスするのか。

(回答) 今回の実験での DSS 濃度ではサクリファイスを検討するまでの重症度は認めなかった。

質問 2 5) C57BL/6N マウスと Balb/c マウスで DSS の投与量と投与期間が異なるのはなぜか。

(回答) C57BL/6N マウスと Balb/c マウスで同程度の DSS 腸炎が生じるように予備実験を行い投与量と期間を決定した。

質問 2 6) 今回の実験で組織学的にアポトーシスの評価をおこなっているか。

(回答) 今回の実験ではおこなっていない。

質問 2 7) HNP-1 と UC との関連で発症の機序に関連はあるのか。HNP-1 の上昇は二次的なものか。

(回答) 発症の機序は明らかでないが、炎症を改善するために HNP が分泌され、過剰の HNP が粘膜傷害の増悪因子となっていると考える。

質問 2 8) 白血球除去療法では HNP の産生細胞が減ることで HNP が低下して改善するのか。

(回答) 白血球除去療法後では HNP が低下する例もあれば上昇する例もある。理論的には低下すれば良いと考える。

質問 2 9) 中等度濃度で炎症抑制の可能性があるとされているが、ヒトでは中等度濃度で炎症が起きていないのか。

(回答) 中等度濃度の評価は難しいが高濃度から低濃度に移行する時期を反映しているのではないかと考える。

質問 3 0) HNP は低分子量だが、血中ではキャリア蛋白と結合しているか。

(回答) 検索した範囲では不明である。

質問 3 1) Tg マウスで HNP-1 の発現が盲腸と回腸において著しく少ないのはなぜか。

(回答) Tg マウスは全身発現のため発現があると思われるがその理由は不明である。

質問 3 2) 今回の実験での HNP の抗炎症作用のメカニズムはどう考えるか。

(回答) 今回の実験では、DSS 誘発大腸炎に対する低用量 HNP-1 の抗炎症作用は、腸管マクロファージへの直接作用ではなく、白血球の集簇作用を介しての間接的な抗菌活性の作用と考える。

質問 3 3) HNP は生細胞である好中球から分泌されるのか。あるいは死細胞である好中球から分泌されるのか。

(回答) 死細胞から放出される報告もあるが、基本的には生細胞から放出される。

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。