

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 428 号	学位申請者	指宿 りえ
審査委員	主査	堀内 正久	学位
	副査	谷本 昭英	副査
	副査	西尾 善彦	副査
<p>主査および副査の5名は、平成29年5月31日、学位申請者 指宿りえ 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) CAG プロモーターで発現誘導している HNP-1 について、各種臓器、好中球、血小板の発現を相対比較したか。  (回答) HNP-1 蛋白濃度は、好中球と比較して、肝臓 0.8 倍、肺 3.7 倍、リンパ球 0.8 倍で、血小板は検討していない。</p> <p>質問2) 炎症性細胞のなかで、細胞種はマクロファージ以外に何を予想しているか。リンパ球は検討したか。  (回答) リンパ球の関与も考えられるが、検討していない。</p> <p>質問3) 細胞死に関連して、ネクローシスについては検討しているか。  (回答) HE 染色標本を見るとネクローシスも起こっていると思われるが、比較検討していない。</p> <p>質問4) 全身の好中球が重要だということだが、WT マウスにエタノールを飲ませると、血中の HNP-1 濃度は上がるか。  (回答) WT マウスには、HNP-1 遺伝子は存在しないので、血中の HNP-1 濃度は上昇しない。</p> <p>質問5) アポトーシスと好中球が共局在し、アポトーシスが炎症のトリガーとなると考察している根拠は何か。マクロファージが IL10 を産生し、抗炎症に作用するのではないか。  (回答) 好中球がアポトーシスを起こした細胞を食食し、好中球から HNP-1 が放出され、マクロファージや肝星細胞を活性化することで炎症が惹起されるのではないかと考察した。今回は IL10 については検討していない。</p> <p>質問6) 血清と血漿で HNP-1 に差があるか。  (回答) ヒトで、血清濃度と血漿濃度を比較したが、ほとんど差はなかった。マウスでは血清のみで評価した。</p> <p>質問7) HNP-1 は抗菌作用以外の作用はあるか。また、抗菌活性が発揮される濃度はどの程度か。  (回答) HNP-1 は肺上皮細胞などにアポトーシスを誘導する。10 μg/ml では抗菌活性が発揮されると報告されている。</p> <p>質問8) HNP-1 が濃度依存的にヒト肝星細胞株 LI90 の増殖を促進することにアポトーシスは関連するか。  (回答) HNP-1 は、LI90 でのアポトーシス関連分子である Bax, Bcl2, caspase3 の蛋白発現に影響せず、αSMA 蛋白発現を濃度依存的増加させたことから、アポトーシス以外の機序による LI90 増殖促進効果が推測される。</p> <p>質問9) HNP-1 が LI90 を増殖する経路は何か。他の細胞を増殖させるという報告があるか。  (回答) HNP-1 が LI90 を増殖させる細胞内のシグナル経路については検討していない。HNP-1 は、ヒト腎細胞癌細胞株や扁平上皮癌細胞株を増殖させ、MAPK 経路を介してヒト肺上皮細胞を増殖させるという報告がある。</p> <p>質問10) 8w モデルより 24w モデルの HNP-1 血中濃度が高く、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝炎、ALD でも高いのは何故か。  (回答) 病態の進展に伴い好中球が遊走促進・増加するために HNP-1 血中濃度が高くなったのではないかと考える。</p> <p>質問11) 好中球は、HNP-1 を細胞内に貯蓄しているのか、放出しているのか。  (回答) 好中球のアズール顆粒に存在する。アズール顆粒が細胞膜と融合して HNP-1 が放出される。</p> <p>質問12) 今回検討したマクロファージは、M1かM2か。  (回答) 十分な検討はしていないが、IL-6が増加していたことから、M1マクロファージが増加していたと推測する。</p> <p>質問13) NFκ-B p65の活性は、どのように評価したのか。また、IL6の発現は、炎症を促進させるか。  (回答) 肝組織からDNAを抽出して測定した。IL6/STAT3経路活性化により、炎症を促進すると考える。</p> <p>質問14) HNP-1がアポトーシスを誘導するという理解でよいか。  (回答) アポトーシスを誘導すると考えている。</p> <p>質問15) Fasにはリガンドが必要だが、今回のリガンドは、何が提供しているのか。  (回答) 肝組織中のFasL (CD95L) のmRNA発現は、差がなかった。今回の検討では不明である。</p> <p>質問16) 肝組織で、リンパ球の浸潤は観察されるか。  (回答) HE染色で確認している。他に、白血球共通抗原(LCA)、CD3 (Tリンパ球) 抗体による免疫染色もあるが、今回は行っていない。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

- 質問 1 7) マウスは、1つのストレインのみで実験したか。  
 (回答) 当初、2つのストレインで実験したが、HNP-1の血中濃度が一定しないため、1つのストレインのみで行った。
- 質問 1 8) HNP-1はシグナルペプチドを持っているか。  
 (回答) ディフェンシンはシグナルペプチド、プロペプチド、成熟ディフェンシンの各ドメインから構成された前駆体ペプチドとしてm-RNAから翻訳されると言われており、ディフェンシンの一つであるHNP-1はシグナルペプチドを持っていると考える。
- 質問 1 9) 受容体はあるのか。その受容体を持っている細胞は何で、その受容体がある細胞だけに作用するのか。  
 (回答) 報告されているのはP2Y6であり、ほとんどの細胞に発現している。
- 質問 2 0) HNP-1は、アルコール性脂肪肝炎と非アルコール性脂肪肝炎では同じように作用するのか。違いはあるのか。  
 (回答) NASHモデルでもHNP-1は肝細胞アポトーシスと肝線維化を促進したこと、NASHとALD患者の血中HNP-1濃度は高値であること、などから同じように作用すると考えている。動物モデルでは顕著な違いはなかった。
- 質問 2 1) TGマウスでは、24w水を与えたら、どうなるか。何かトリガーとなるものが存在するか。  
 (回答) 24w水を投与したTGマウスでは、HE染色、 $\alpha$ SMA染色、F4/80染色、D68染色による病理組織学的評価では病的変化はなかった。エタノールやCDA食などがトリガーになると考える。
- 質問 2 2) HNP-1は、治療上の標的として有効か。  
 (回答) ASH患者のTNF- $\alpha$ 、IL1、IL6、IL8などの炎症性サイトカインの血漿中濃度は高値であり、炎症反応に関連して好中球の増加がみられることや今回の検討から、HNP-1は治療標的と考えている。
- 質問 2 3) 10%エタノール水の投与量は、コントロールしたか。飲水量は、把握しているか。  
 (回答) 今回は自由摂取のため量は把握していない。TGとWTマウスの体重には差はなかった。
- 質問 2 4) 細胞実験で、エタノール100mMは高濃度のようなのだが、他の報告ではどうか。100mMは何%か。  
 (回答) SKHep-1のアポトーシスを検討した報告など、200mMでの検討が多い。100mMは約6%である。
- 質問 2 5) 動物、細胞実験の両方でアポトーシスの裏付けをもう1つ行うとすれば何があるか。  
 (回答) 電子顕微鏡を用いて確認することが簡便で確実な方法である。今回は行っていない。
- 質問 2 6) ALDH KOマウスで、アルコール投与モデルの実験を行った報告はあるか。また、今後行う予定はあるか。  
 (回答) Oyamaらの報告(J Toxicol Sci 2007; 32: 421-8)がある。現時点では行う予定はないが、検討する。
- 質問 2 7) HNP-1の分泌に関するメカニズムは何か。好中球が死んだときに放出されるのではないか。  
 (回答) アズール顆粒に存在するHNP-1は、アズール顆粒が細胞膜と融合してHNP-1が放出される。また、HNP-1は好中球の自発的アポトーシスを抑制するという報告もあり、放出とアポトーシスのとの関連は不明である。
- 質問 2 8) 肝障害の程度と、HNP-1濃度は相関するか。  
 (回答) 8wと24w投与モデルのTGマウスでは、ALT、LDHの上昇と共にHNP-1の血中濃度も増加した。
- 質問 2 9) microRNAの解析で、リファレンスにこのプライマーを用いた理由は何か。  
 (回答) RNU6-2の発現が、相対定量 $\Delta$ CT法を用いたデータの標準化に最適であったため用いた。
- 質問 3 0) 24wエタノール水投与モデルのmicroRNAの解析で、24w水投与モデルのWTとの比較は行っているか。  
 (回答) 比較している。WTでは24w水投与の有無に関わらずmicroRNAの発現に有意差はなかった。水の投与ではmicroRNA発現に影響はないと考えている。
- 質問 3 1) 細胞でのBcl2のmRNA発現は、アルコールは影響しなかった結果はin vivoの結果と違うのではないか。  
 (回答) 有意差はなかったが、in vivoでもBcl2のmRNA発現はTGマウスにおいて低下しており、蛋白発現はin vivo、in vitroとも有意に低下していたことから、Bcl2の発現に関してはin vivo、in vitroいずれも同じ結果と考えている。
- 質問 3 2) 好中球をカウントした際の単位 (high-power fields) の記載について説明せよ。  
 (回答) 文献を参考にした。蛍光顕微鏡(40倍の対物レンズ)を用いて画像を取り込み、その画像のX軸とY軸の長さから面積を算出した。
- 質問 3 3) ALDの肝障害作用機序で、アセトアルデヒドが酸化ストレスを起こしていると考えているのか。  
 (回答) アセトアルデヒドだけでなく、エタノールよりROSが産生されることで、酸化ストレスが発生すると考える。
- 質問 3 4) アルコール摂取によって、摂食量はどうなったのか。  
 (回答) 飼料の摂取量については評価していない。TGマウスとWTマウスの平均体重は8wと24wのいずれも差はなかった。
- 質問 3 5) 摂食量が減った可能性が高いと思われるが、その影響をどのように考えるか。  
 (回答) アルブミン値などを用いた栄養評価はできていないが、栄養障害はALDと深い関連があり、病態進展に影響した可能性はある。しかし、HNP-1の作用に影響したかは不明である。
- 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。