

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 451 号	学位申請者	山田 きよ子	
審査委員	主査	谷本 昭英	学位	博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査	松口 徹也
	副査	山口 宗一	副査	東 裕子
<p>主査および副査の5名は、平成29年12月25日、学位申請者 山田 きよ子 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) NC/Nga マウスを実験に選んだ理由は何か。 (回答) NC/Nga マウスは、SPF 環境下で、自然にアトピー性皮膚炎に酷似した皮膚症状を呈することから実験に供試した。</p> <p>質問2) 角化細胞の培養に用いた HuMedia-KB2 の特徴は何か。 (回答) ヒト表皮角化細胞を試験管内での増殖・維持するのに最適化された無血清培地である。D-グルコースは 6mM 含まれる。また、カルシウム濃度は 0.15mM であるため細胞分化は誘導しない。なお、実験に必要な細胞数を準備するため、継代培養時に増殖促進剤 (インスリン、ヒドロコチゾン等) を添加したが、本実験ではそれらの添加剤を加えずに実験に供試した。グルコース、カルシウム、フェノールレッドをフリーにした培地で、必要に応じて添加量の調節が可能である。</p> <p>質問3) Claudin-1 が核で染まることの意義をどのように考えるか。 (回答) 癌細胞などで Claudin-1 が核に局在することが報告されているが、その移行機序や役割は不明である。</p> <p>質問4) グルコース塗布部位において観察された肥満細胞は脱顆粒しているのか。 (回答) 脱顆粒の有無については検討していない。今後検討したい。</p> <p>質問5) 培養細胞系において Filaggrin と Claudin-1 を発現誘導するグルコース濃度が異なるのは何故か。 (回答) それぞれの分子が最も強く誘導されるグルコースの濃度のデータをそれぞれ示した。</p> <p>質問6) グルコース濃度を 20%とした理由は何か。 (回答) マウスモデルで 10%~50%のグルコース濃度を供試した結果、20%グルコース接種が最も効果を認めたためである。</p> <p>質問7) プレドニゾン塗布とグルコース塗布時の Claudin-1 発現の違いは何か。 (回答) プレドニゾン塗布では Claudin-1 は異所性 (核内) に発現する傾向を示したが、グルコース塗布では、細胞間隙を満たすように上皮に発現していた。</p> <p>質問8) グルコースは皮膚組織のどこまで経皮吸収されるのか。 (回答) 500 ダルトンルールからすると、グルコースは経皮吸収される可能性が高いが、どこまで浸透するかは不明である。今後の検討課題とする。</p> <p>質問9) thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 等で前処理後にグルコースを添加することで Filaggrin 発現が増強される理由は何か。 (回答) TSLP の前処理によって、グルコースに対する細胞の感受性が高まった結果、Filaggrin 発現が増強された可能性がある。その機序については今後の検討課題とする。</p>				

質問 1 0) マウスは一匹/ケージにて飼育したのか。

(回答) 塗布したグルコースをお互いに舐めたり、噛んだりすることもあるため、実験中は 1 匹/ケージで飼育した。

質問 1 1) IL4/IL13 は、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) と signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) のリン酸化が報告されているが、サイトカイン等の前処理の実験で STAT3 以外の転写因子の制御について検討したか。

(回答) IL4/IL13 の共刺激により STAT6 のリン酸化が亢進し、その結果 Filaggrin の発現が抑制される事が報告されている、そこで、本実験においても IL4/IL13 の前処理により STAT6 リン酸化を認めたが、その後のグルコース添加により、STAT6 リン酸化が亢進する結果を得た。

質問 1 2) グルコースは、皮膚炎の予防に効くのか。この実験系は治療効果・予防効果のどちらを観察しているのか。

(回答) グルコースによるバリア修復・増強効果は、アレルゲン感作の予防とともに発症後の炎症寛解にも効果があると考えている。今後、予防効果を主眼においた実験系で確認したい。

質問 1 3) グルコースは代謝を変化させる可能性があるが、mTOR 経路、GLUT1 の関与についてどのように考えるか。

(回答) その可能性もあると思われるが、確認していない。今後検討したい。

質問 1 4) MafB についてどのように考えるか。考察で MafB に触れているが、MafB について検討したか。

(回答) グルコースが転写因子 MafB の活性化を制御することで Filaggrin の発現を誘導している可能性がある。今後、検討したい。

質問 1 5) イソジンシュガーに含まれる白糖とグルコースの違いは何か。

(回答) 白糖の抗炎症効果やバリア修復効果は検討していない。しかし予備実験で、高濃度の白糖は皮膚角化細胞の増殖や遊走を促進しなかったが、高濃度グルコースはそれらを促進したので、グルコースに絞ってその効果を詳細に検討することにした。

質問 1 6) マウスに使用したステロイドのランクは何か。

(回答) 0.3%のリドメックス軟膏で、ランクは、Medium Class である。

質問 1 7) 3 次元培養による実験は検討したか。

(回答) 3 次元培養では、Filaggrin と Claudin-1 の局在まで観察できるので、次回の課題にしたい。

質問 1 8) 肥満細胞と好酸球の染色原理は何か。

(回答) Astra Blue は、ポリサッカライドと結合し肥満細胞を染色し、メタクロマジーを呈する。Vital New Red は好酸球顆粒を同定でき、同じ pH で両者を同時に染色する特徴を持っている。

質問 1 9) 抗体の特異性の確認はしたのか。

(回答) Isotype が同一の一次抗体を用いた特異性の検討は行っていない。早急に、確認したい。

質問 2 0) 凍結切片を用いた蛍光免疫染色法がより局在が明確になるのではないか。

(回答) 続報の研究で耳介を採取した際に同方法を用いて確認したい。

質問 2 1) 皮膚サンプルの Western Blot や RT-PCR は行なったのか。

(回答) 行っていないので、次回の課題にしたい。

質問 2 2) 培養細胞での Claudin-1 の局在はどうか。

(回答) 今回の実験では確認していないので、今後検討したい。

質問 2 3) 分子発現誘導に対する浸透圧の影響はどうか。

(回答) 浸透圧が影響する可能性も十分考えられる。現在、等張のマニトールを用いた実験を行っているので、今後その影響も明らかにできると考えている。

質問 2 4) 他の糖では検討したのか、なぜグルコースを用いたのか。

(回答) 角化細胞培養系で各種の単糖と二糖類を添加して細胞増殖や遊走を調べた結果、もっともグルコースが効果を示したので、グルコースを使用することにした。

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。