

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 465 号	学位申請者	梅橋 功征
審査委員	主査	大石 充	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	西尾 善彦	副査 橋口 照人
	副査	谷本 昭英	副査 吉満 誠
<p>主査および副査の5名は、平成30年3月19日、学位申請者 梅橋 功征 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) JNK と c-Jun の活性はほとんど抑制されているが、JNK 阻害剤による IL-8 分泌は5割程度しか抑制できていないのはなぜか。 (回答) JNK 以外の他の経路 (JAK など) が関与している可能性があると考えている。</p> <p>質問 2) 血清 Soluble ST2 は心血管イベントと関連があるとされているが、Soluble ST2 が多いほど IL-33 のシグナルが抑制されて良いのではないか。 (回答) 血清 Soluble ST2 は、IL-33 へのデコイレセプターとして産生された結果であると考えている。</p> <p>質問 3) IL-33 が動脈硬化に重要とすれば、IL-33 を増やす原因・病態は何か。 (回答) IL-33 は恒常的に細胞内の核内に存在し、ネクロシスや力学的ストレッチによる血管内皮細胞傷害時に分泌されると考えられる。</p> <p>質問 4) IL-33 が IL-8 を介して血管新生を行うとすれば、どのような生体内での状況を想定しているか。 (回答) プラーク内での血管新生を惹起しているのではないかと考えている。</p> <p>質問 5) IL-33 は高内皮細静脈 (以下 HEV) で発見されているが、HEV との機能的関係はないか。 (回答) 核内での転写制御因子に関与するとされている。</p> <p>質問 6) IL-33 受容体の down regulation についてどこまで解析しているか。 (回答) 免疫染色にて ST2 の蛋白発現が、confluent で減少していることは確認した。メカニズム等についても今後、検討していく予定である。</p> <p>質問 7) IL-8 mRNA の発現ピークは IL-33 と IL-1β で違いはなかったか。 (回答) IL-33 刺激による IL-8 mRNA の発現は4~8時間でピークになると考えられるが、IL-1β のタイムコースについても、今後確認が必要であると考えます。</p> <p>質問 8) 分泌された IL-8 は血清と結合しているのか、それとも free で存在しているのか。 (回答) 今回、分泌された IL-8 蛋白の詳細については評価できていない。</p> <p>質問 9) 免疫染色における「免疫活性」とはどのような意味か。 (回答) 免疫染色の表現法として「免疫活性」ではなく「蛋白発現」と訂正する。</p> <p>質問 10) IL-8 の AP-1 プローブを作成しゲルシフトアッセイをすべきである。さらに、スーパーシフト、プロモータアッセイをしてない理由は何か。 (回答) ゲルシフトアッセイにおいて目的蛋白の転写因子 (今回、IL-8 の AP-1) のコンセンサス配列が入ったプローブを用いることが重要であり、また、スーパーシフトアッセイやプロモータアッセイを今後検討したい。</p> <p>質問 11) Confluent 時の細胞が本当に静止状態であるかフローサイトにて確認したか。 (回答) 今回は、細胞周期をフローサイトにより確認できていない。ご指摘のとおり、血管内皮細胞は confluent 時でも核分裂を起こしている可能性があるため、今後は静止細胞の確認をしたい。</p>			

最終試験の結果の要旨

465

質問 12) HUVECs を使うメリットとデメリットは何か。

(回答) メリットは、発育させやすいことである。動脈系の血管内皮細胞との反応性は若干異なるため、動脈硬化の研究に用いるには動脈系の血管内皮細胞を用いるべきであると考ええる。

質問 13) 血漿 IL-8 の高値が冠動脈疾患のリスクを増やすということだがどの程度増やすか。

(回答) 血漿 IL-8 が 2.1 pg/ml 以上では 1.5~1.8 倍ほど冠動脈疾患のリスクが増加するという報告がある。

質問 14) IL-8 と糖尿病、喫煙などの関連で知られていることがあるか。

(回答) 糖尿病患者では非糖尿病患者と比べ血清 IL-8 が上昇しており、糖尿病性腎症や糖尿病性血管合併症とも関連があるとされている。非喫煙者と比較し喫煙者での気道上皮の IL-8 mRNA の発現は増加し、血清 IL-8 も増加している。

質問 15) 急性冠症候群 (以下 ACS) における IL-1 β の役割は何か知られているか。

(回答) マウスの実験において IL-1 β 欠如により動脈壁の VCAM-1、MCP-1 が減少し、動脈硬化が抑制されたという報告がある。また、臨床試験 (CANTOS 試験) において、抗 IL-1 β 抗体 (カナキヌマブ) が ACS を抑制できている。これらより、IL-1 β は ACS の発症などに重要な役割を担っていることが考えられる。

質問 16) Endothelial cell growth supplement は何が入っているか。

(回答) Endothelial cell growth supplement の成分はウシの下垂体エキスである。培養液には epidermal growth factor が入っている。

質問 17) IL-33 の濃度 10^{-8} mol/L では IL-8 の発現、分泌は飽和していないのではないか。

(回答) 実験で使用した IL-33 の濃度であるが 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L となれば薬理的濃度となり生体内で存在しない濃度となってしまうことより今回は、 10^{-8} mol/L までとした。

質問 18) Medium 中の Soluble ST2 について条件を揃えるために行ったことはあるか。

(回答) 今回は Medium 中の Soluble ST2 の評価はできていない。ご指摘のとおり 24 時間の培養では影響が出ている可能性があり、その点を踏まえ今後検討していきたい。

質問 19) IL-33 は生体にどれほど必要か。IL-33 ノックアウト (以下 KO) マウスなどで起きるフェノタイプは知られているか。

(回答) IL-33 KO マウスでは卵巣や毛に軽度の異常が認められるのみである。この IL-33 KO マウスを用いて、大腸炎やアレルギーによる気道炎症を誘発した際、野生型と比較し免疫応答の低下及び炎症細胞数の低下がみられている。また、動脈硬化を惹起する ApoE KO マウスにおいて IL-33 や ST2 を KO しても動脈硬化は抑制されなかったという報告がある。

質問 20) 異なる細胞密度による実験があったが生体内での血管内皮細胞はどちらの状態か。

(回答) 生体内での血管内皮細胞は confluent の状態であると考え。生体内の傷害部位は増殖状態であると考え。

質問 21) JNK 阻害剤が IL-8 を抑えるという動脈硬化に対する薬の開発はされているか。

(回答) JNK 阻害剤としては関節リウマチ治療薬として臨床応用されている。現在のところ JNK を抑制し IL-8 を抑えることで動脈硬化が抑制されることを目的とした薬剤の開発はない。

質問 22) IL-33/IL-8 経路が生体内でどのような役割を担っているか。

(回答) 傷害局所において IL-33 はアラミンとしてオートクライン、パラクライン様式により内皮を刺激しているのではないかと考える。増殖細胞において IL-33 受容体が増加していることにより、傷害部位に選択的に IL-8 産生を増加させ白血球遊走などに関与しているのではないかと考えている。

質問 23) Confluent 時における、IL-33 受容体を down regulation させているものは何か。

(回答) 現在、メカニズムについてはわかっていない。IL-33 が核内で ST2 の転写を制御している可能性があることは指摘されているが、今後の課題である。

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。