

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 452 号	学位申請者	久留 光博
審査委員	主査	井戸 章雄	学位
	副査	井上 博雅	副査
	副査	谷本 昭英	副査
			博士 (医学)
			小澤 政之
			古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成30年1月24日、学位申請者 久留 光博 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) Pam212細胞、HaCaT細胞の不死化はどのような機序によるものか。

(回答) それぞれ BALB/c マウス、白人男性から採取され、一定の条件下での継代培養により不死化を自然獲得した細胞株で、SV40 T 抗原を用いる方法やテロメア逆転写タンパク質の発現を介する不死化の導入を行った細胞株ではない。

質問2) Pam212細胞、HaCaT細胞を通常のケラチノサイトのモデルとして使うことに問題は無いのか。

(回答) これらの不死化細胞株と初代培養ケラチノサイトの間で種々の反応に差異が無いことが確認されており使用に問題は無いと考える。

質問3) 初代培養ケラチノサイトの purity はどの程度か。

(回答) CK10 (cytokeratin 10) に対する抗体で免疫染色したところ全細胞で陽性を認めた。

質問4) 初代培養ケラチノサイトでカルシウム濃度を上げると角化するのか。

(回答) 初代培養ケラチノサイトではカルシウム濃度を上げると2時間でデスモソームの発現が起こり、DNA合成の低下をきたし、3日目にはdishからの剥離が観察されることが報告されている。即ち、角化はしないが角化の方向に分化する。

質問5) 培養時に HGF の刺激によって細胞の形態・増殖能・遊走能に変化はでたのか。

(回答) HGF での12時間の刺激では培養細胞の明らかな形態的变化は認められなかった。HGFによるケラチノサイトの増殖能及び遊走能への影響は確認していないが、それぞれ亢進することが報告されている。

質問6) HGF の濃度勾配はとったのか。Kinase inhibitor の濃度はどのようにして決めたのか。

(回答) HGF 5 ng/ml、15 ng/ml、50 ng/ml で濃度勾配をとり、15 ng/ml を至適条件とした。各 inhibitor を複数の濃度で試し最適な濃度を使用した。

質問7) HGF と TNF α (tumor necrosis factor α) の添加はどのように行ったのか。

(回答) HGF 15 ng/ml と TNF α 10 ng/ml を同時に添加して6時間刺激した。

質問8) CXCL8 (C-X-C motif chemokine ligand 8) については調べたのか。ケラチノサイトからの産生はあるのか。CXCL15についてはどうか。

(回答) マウスにおいてはヒト CXCL8 に相当する遺伝子はないので、スクリーニングに加えなかった。HaCaT細胞でのCXCL8 mRNAについては調べていない。ケラチノサイトからCXCL8が産生される報告はある。CXCL15についてはPam212細胞ではmRNAの発現を認めなかった。

質問9) CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5) に血管新生の働きはあるのか。

(回答) VEGF産生を促し間接的に血管新生に作用する報告がある。

質問10) MEK (MAPK/ERK kinase) のリン酸化は確認したのか。

最終試験の結果の要旨

(回答) 直接は MEK のリン酸化は確認していないが、MEK1/2 の下流の ERK (extracellular signal regulated kinase) のリン酸化が確認できたため、MEK1/2 もリン酸化していると考えられた。

質問 1 1) ルシフェラーゼアッセイは HaCaT 細胞では行わなかったのか。

(回答) HaCaT 細胞では遺伝子導入効率が不良であったので、ルシフェラーゼアッセイは行わなかった。

質問 1 2) ルシフェラーゼアッセイのコンストラクトの構造は何を用いたのか。

(回答) NFκB 結合領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子をもつプラスミドを用いた。CXCL10 遺伝子のプロモーター領域を用いたアッセイは行っていない。

質問 1 3) NFκB と MEK の下流の関係とはどのようになっているのか。NFκB による遺伝子発現に対して、HGF がどのように働くと考えられるか。IκB (inhibitor of κB) の degradation は確認したのか。

(回答) 腎臓近位尿細管上皮細胞においては HGF が核内移行後の NFκB と CCL5 遺伝子プロモーターとの結合を阻害したという報告があり、CXCL10 も同様の可能性があるが、MEK の下流がいかにして上記機序に至るかは今後の検討課題である。今回の実験では IκB の degradation は確認していない。

質問 1 4) ケラチノサイトにおける HGF による VEGF 産生はどのような機序によるか。

(回答) HGF により MEK/ERK シグナル経路を介して Egr-1 (early growth response-1) の発現を増強し VEGF を産生するという報告がある。

質問 1 5) どうして HGF は CXCL10 に特異的に働くのか。

(回答) HGF が NFκB と CXCL10 Promotor 部位との結合を阻害する可能性が示唆されたが、他にも NFκB を介して発現するケモカインがあるという報告はあるものの、それぞれの遺伝子発現の機序について不明な点が多く、現時点で特異的に作用するメカニズムの詳細については明らかになっていない。

質問 1 6) HGF と TGF (transforming growth factor) との関連はどのように考えているのか。

(回答) HGF が Smad7 を活性化して Smad2 のリン酸化を阻害し、TGFβ のシグナル経路を阻害するという報告がある。

質問 1 7) 臨床において実験で用いた HGF 濃度になるのはどのような病態の時か。

(回答) 第 x a 因子により 1500/μl の顆粒球から 90 分で 1.3 ng/ml の HGF が産生されたという報告があり、これを基に顆粒球から放出される創部局所での HGF 濃度を概算したところ 8-17 ng/ml となった。

質問 1 8) 創傷治癒において HGF、TNFα、IL-1β (interleukin1β)、CXCL10 をどのように協調するのか。

(回答) 創傷治癒の過程において受傷後 1 時間以内には血小板が活性化し、0-3 日目には好中球、続いて 0.5-6 日目にはマクロファージの遊走がある、3-10 日目にリンパ球の遊走があり、7 日目以降に癒痕治癒に至る。受傷後 1 時間後にはトロンピンや第 x a 因子により活性化・放出された HGF が血管新生に働く。TNFα、IL-1β は同じく初期から存在するが、CXCL10 の産生は受傷後 12 時間以降に始まるため、HGF によって産生が抑制される。血管新生により創傷部への血球の遊走、酸素、栄養の運搬につながり、上皮化に至る。4 日目以降は HGF の活性化が収まり、産生された CXCL10 による血管の安定化、リンパ球の遊走促進作用により癒痕形成につながると考えられる。

質問 1 9) 本実験の反応は皮膚の構造でどの層で起こっていると考えられるのか。

(回答) CXCL10 はケラチノサイト由来であるので、有棘層で起こっていると考えられる。

質問 2 0) HGF 濃度が高い劇症肝炎の患者ではどのような皮膚の変化が起こるのか。

(回答) 劇症肝炎時には黄疸、紅斑、浮腫が見られる場合があるが、HGF による表皮の変化は不明である。

質問 2 1) ケラチノサイトと血管が近接している Pyogenic Granuloma と Angiokeratoma は HGF と関連はあるのか。

(回答) Angiokeratoma における報告は無かったが、炎症を伴う Pyogenic Granuloma においては、血管内皮細胞での HGF 濃度上昇と受容体である Met の発現亢進を示す報告があった。

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。