

最終試験の結果の要旨

| | | | | |
|------|-----------|-------|-------|---------------|
| 報告番号 | 総研第 459 号 | | 学位申請者 | 倉内 宏一郎 |
| 審査委員 | 主査 | 堀内 正久 | 学位 | 博士 (医学・歯学・学術) |
| | 副査 | 上野 真一 | 副査 | 石塚 賢治 |
| | 副査 | 吉満 誠 | 副査 | 上野 健太郎 |

主査および副査の5名は、平成 30年 3月 2日、学位申請者 倉内 宏一郎君に面接し、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) アドリアマイシンなどの心毒性と CY 心毒性との違いは。

(回答) 両者で異なるのはアドリアマイシンでは累積毒性を認めるが、CY には累積毒性を認めない。

質問 2) PM に代謝される割合と acrolein に代謝される割合は。

(回答) 具体的に何%どちらに代謝されるという報告はない。

質問 3) ALDH は小児と成人、アルコールをよく摂取する人で CY の代謝に差があるのか。

(回答) 小児と成人では差はないと考えられる。アルコールと CY 代謝について関連した報告はない。

質問 4) ALDH について塩基多型で副作用の出方が異なるのか。

(回答) ALDH は遺伝子多型によって副作用の出現頻度が異なると考えられるが、報告の多くはアルコールに関連した ALDH2 であり、AldoCY を CEPM に代謝する ALDH1 の報告は確認できない。

質問 5) HCY までの代謝は肝臓内の CYP で行われるが、それ以降は心筋でも行われるのか。

(回答) 心筋細胞を HCY に曝露すると acrolein に代謝されることから、心筋でも代謝されると考えられる。

質問 6) HCY 自体に心筋毒性はあるのか。

(回答) HCY 自身にも心筋細胞傷害性があると考えられるが、主体は acrolein によるものと考えている。

質問 7) Fig.2 で HCY 10 μ M の細胞毒性が 20%程度、Fig.2e では acrolein の産生が 1.5 μ M である。acrolein が 1.5 μ M 程度の産生ならば、HCY 自体にも毒性があると考えられるがどうか。

(回答) 質問 6 の回答同様、HCY 自身にも毒性があると考えられるが、主体は acrolein と考える。

質問 8) acrolein の濃度に細胞傷害を起こす一定の閾値があり、あるレベルを越えると心筋毒性が出るのか。

(回答) acrolein は低用量では細胞傷害を起こさず、一定のレベルを越えると細胞傷害を起こすと考えられる。

質問 9) acrolein の血中濃度は測定できるか。先行研究では acrolein 投与何時間後の PK スタディか。

(回答) 現在は acrolein の濃度を測定できるが、先行研究の時点ではまだ測定不可能だったため未測定である。

質問 10) NAC により CY の主作用も落とさないか。

(回答) HL-60 を用いた研究では NAC による抗腫瘍効果の抑制は認めなかった。

質問 11) 今回使用した NAC の濃度は実臨床で使用される濃度か。

(回答) 引用文献では NAC の投与量は記載されていたが、NAC の血中濃度は測定しておらず、比較困難である。

質問 12) CY 心毒性は小児と成人で頻度に違いはあるのか。

(回答) 小児と成人で CY 心毒性の頻度に違いはないと考えられる。

質問 13) CY を 100mg/kg 以上使用する移植の前処置とは。

(回答) 再生不良性貧血の造血細胞移植の移植前処置では 50mg/kg \times 4 日間使用する。

質問 14) 前処置での CY 投与量を減らせると心毒性がなくなると思うが。

(回答) CY 投与量を減量すれば心毒性の頻度は減少するが、拒絶、生着不全が増加する可能性がある。

質問 15) 心筋細胞毒性なのか細胞毒性なのか、今回は白血病の細胞株を用いているが、他の細胞株では問題なく心筋細胞に特異的なものであるとすれば、その理由は何か。正常のリンパ球に対してはどうか。

(回答) 本研究では他の臓器由来の細胞株や正常リンパ球では検討を行っていないが、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞など、よりよいモデルも存在する可能性はある。

最終試験の結果の要旨

459

質問 1 6) NAC が CY の効果までは抑制しないのか。

(回答) NAC は in vitro で CY の抗腫瘍効果を抑制しないが、今回の NAC 濃度が実臨床で抗腫瘍効果を減弱するかは不明である。

質問 1 7) 心毒性を起こした 2 例では例えばブスルファン、TBI の使用や肝障害の有無はどうだったか。

(回答) 今回の 2 例では BU の使用はなく、肝障害も認めていなかった。TBI は 1 例で 2Gy を 1 回施行していた。

質問 1 8) HCY に対する NAC の作用点は? acrolein は作られるのか? acrolein の産生を抑えるのか。

(回答) HCY を直接抑制するのではなく acrolein に変換後、NAC が acrolein に作用すると考えられる。

質問 1 9) acrolein が ALDH を抑制する機序は。

(回答) acrolein が ALDH と接触すると ALDH の結合サイトに adduct して ALDH の活性を抑制する。

質問 2 0) AldoCY から acrolein、PM が産生されるが、研究の中で PM を測定しているのか。

(回答) PM は測定が困難であり、本研究では測定は行っていない。

質問 2 1) 人体内では acrolein と PM の分布はどうなっているのか。

(回答) PM は測定困難であるため、体内での PM の血中濃度や分布も不明である。

質問 2 2) 血管内皮細胞でも acrolein は用量依存性に細胞障害を起こすというようなデータはあるのか。

(回答) 血管内皮細胞を用いて acrolein の用量依存性毒性を研究した報告は確認できなかった。

質問 2 3) NAC の前処理について、NAC の活性は保たれているのか。

(回答) 活性が保たれなければ心筋細胞傷害を抑制できないと考えられ、心筋細胞傷害を抑制していることから活性は保たれていると考えられる。

質問 2 4) Fig.3 の MTT アッセイと Fig.4 の染色における乖離の理由は。

(回答) 両者で観察時間が異なり、Fig.4 で画像上はアポトーシス細胞が多く生細胞が目立たないが、残存した生細胞が増殖することで MTT アッセイでの回復につながり、Fig.3 と 4 の結果が乖離していると考えられる。

質問 2 5) Fig.5c でコントロールの ALDH 活性に差があるが測定が不安定なのか。

(回答) 細胞の状態や実験時の室温などの環境要因も考えられる。

質問 2 6) CY 代謝物の毒性について、心筋炎ということだが、応答している細胞の浸潤は病理学的には認めるのか。

(回答) 炎症細胞浸潤など病理学的所見については引用文献では詳細不明だった。

質問 2 7) β -elimination は酵素によるものか、自然によるものか。

(回答) β -elimination は非酵素反応であり、自然反応と考えられる。

質問 2 8) アクロレインはこの後代謝されないのか。

(回答) アクロレインは GSH と結合して S-2-carboxy-ethyl mercapturic acid になり尿中へ排泄される。

質問 2 9) ALDH について、ALDH1 が特異的に代謝に関与するのか、ALDH 2 は関係ないのか。

(回答) ALDH1 が関係していると報告されている。本研究で ALDH2 の関与は不明である。

質問 3 0) 濃度を変えている実験、量変化を行っている場合、通常は分散分析のほうが望ましいと思われるが。

(回答) ご指摘の通り、分散分析が望ましいと考えられるが、本研究では分散分析は行っていない。

質問 3 1) HCY の方が時間変化とともに毒性が強まり、acrolein の方はむしろ弱まるような印象があるが、この点についてはどう考えるか。

(回答) 単純に同じ濃度で比較することは困難である。HCY は時間経過とともに acrolein が産生され、acrolein は時間経過とともに代謝されていくので、MTT アッセイの生細胞に差があると考えられる。

質問 3 2) ALDH は阻害剤もあるが、ALDH の阻害剤を投与した時に HCY の効果や毒性の強弱について評価はしていないか。

(回答) 本研究では ALDH 阻害薬を使用した実験は行っていない。

質問 3 3) 先行研究と今回の研究でコントロールの GSH レベルに違いがあるが、細胞レベルによって異なるのか。

(回答) 細胞の状態により GSH 濃度に違いが出たものと考えている。

質問 3 4) GSH を予め下げる条件では、代謝物の毒性が強まるのか。

(回答) GSH を予め下げた条件で代謝物の毒性は強まると考えられるが、本研究では行っていない。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。