

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 470 号		学位申請者	馬場 淳徳
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位	博士 (医学)
	副査	家入 里志	副査	黒野 祐一 印
	副査	中川 昌之	副査	橋口 照人

主査および副査の5名は、平成30年6月20日、学位申請者 馬場 淳徳 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) シルクフィブロイン (SF) の分子量はどれくらいか。分子と分子を架橋するものは何か。

(回答) SF の分子量は 35-37 万である。主にアラニンとグリシンからなる一本の分子が平行に並び、水素結合してβシート構造をとっている。

質問2) SF フィルムは創部に吸収されないのか。

(回答) 創部に吸収されることはない。

質問3) セリシンは医学的に応用されていないのか。

(回答) セリシンは化粧品などに利用されている。しかし、フィブロインよりも抗原性が高くアレルギーを惹起しやすい素材である。

質問4) 動物実験で BALB/c マウスを選んだ理由は何か。

(回答) 創傷に関する実験では、BALB/c メスが最も多く用いられるためである。

質問5) マウスに作成した潰瘍は人体では何パーセントに相当するか。

(回答) およそ 7~8% に相当する。

質問6) 動物実験の経過中に創部の細菌感染はなかったか。

(回答) 細菌感染はなかった。

質問7) 創傷を何も被覆しない場合はどうなるのか。対照のウレタンフィルムにも免疫学的治癒機構が働いているのか。

(回答) 創傷を保護しなければ治癒が遅延することが予想される。ウレタンフィルムは免疫学的治癒機能を持ちあわせていない。

質問8) 創傷治癒期における浸出液はどのような因子を含んでおり、そこに SF はどのような影響を及ぼすのか。

(回答) 線維芽細胞増殖因子、血小板由来成長因子が浸出液に含まれており、SF はそれらの因子に作用する。好中球、マクロファージを動員する microRNA が高発現しているという実験結果も得られている。

質問9) 肉芽組織はどのような細胞で構成されるのか。

(回答) 主に線維芽細胞、組織球、リンパ球、マクロファージ、好中球、血管内皮細胞で構成されている。

質問10) 過剰肉芽は形成されていなかったか。

(回答) 肉芽が形成されてからは上皮再生に転じており、過剰肉芽形成はなかった。

質問11) 血管新生の評価について、遺伝子組換え SF (TG-SF) では行っていないのか。

(回答) 重要なことであるが今回は行っていない。

最終試験の結果の要旨

質問 1 2) CD31 染色の評価は創傷治癒におけるどの stage に相当するのか。

(回答) 4、8、12 日目の評価はそれぞれ細胞増殖期の初期、中期、後期に相当する。

質問 1 3) CD31 の定量は hot spot を評価したのか、ランダムに評価したのか。

(回答) ランダムな部位を選び評価をした。

質問 1 4) サイトケラチンの免疫染色は行っているか。

(回答) 行っていない。

質問 1 5) 遺伝子組み換え蚕は正常に成育するのか。

(回答) 正常に成育する。

質問 1 6) TG 蚕が RGD 配列をもつシルクを産生する発現効率はどれくらいか。

(回答) TG 蚕の産生する絹糸に RGD は 100%発現している。

質問 1 7) RGD を遺伝子導入することによって絹糸の産生量が野生型 (WT) 蚕と比較して増えなかったのか。

(回答) 肉眼的に TG 蚕の繭と WT 蚕の繭の大きさは変わらないので、絹糸の産生は増えていないものと考える。

質問 1 8) RGD 以外のアミノ酸配列を遺伝子導入、あるいは複数のアミノ酸配列を遺伝子導入したものはあるのか。

(回答) RGD 以外のアミノ酸配列を遺伝子導入、あるいは複数のアミノ酸配列を遺伝子導入したシルクも存在する。

質問 1 9) RGD 配列が接着性を向上したという根拠はあるのか。

(回答) WT-SF と TG-SF を比較した Adhesion assay を行っており、TG-SF が WT-SF より線維芽細胞の接着性を向上していたという結果を得ている。

質問 2 0) シグナル伝達経路で JNK、ERK をみたのはなぜか。STAT3 や PI3K はどうか。

(回答) 過去の論文で MAPK 経路が一般的な創傷治癒過程、シルク的作用に関与することが知られている。STAT3、PI3K はその上流にあると考えられるが、今後検討すべき事項である。

質問 2 1) JNK、ERK のリン酸化のピークがそれぞれ 30 分、3 時間となっているが、その時間が意味することは何か。

(回答) 両者が創傷治癒機転にどのように関与しているかを含めて検討したい。

質問 2 2) 創傷被覆材への臨床応用について、治験まで至っている段階か。

(回答) まだ動物実験の段階である。

質問 2 3) 対象疾患として熱傷は想定されるか。

(回答) 今回の実験は外傷性皮膚潰瘍を対象としている。熱傷を対象とするのであれば熱損傷によって創傷を作成したモデルマウスを用いた実験を行う必要があるため、熱傷に対する効果は確認していない。

質問 2 4) 臨床応用する場合には、どのような疾患が対象になるか。

(回答) 褥瘡など慢性皮膚潰瘍、熱傷、擦過傷等が対象になる。

質問 2 5) 臨床応用する場合、感染に対する効果はあるか。

(回答) シルク自体が抗菌作用を有するので、細菌のコロニー形成あるいは感染に対して有効であると考えている。

質問 2 6) 粘膜の創傷に対しても SF は適用可能か。

(回答) 粘膜にも皮膚と同様に適用可能である。口内炎に対する効果も知られている。

質問 2 7) 創傷治癒に有望な物質は他にないか。

(回答) 従来、糖質 (イソジンシュガー)、キチン質等が用いられている。我々は卵殻膜タンパク質が創傷治癒を促進することを見出した。

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。