

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	482	号	学位申請者	小牧 祐雅
審査委員	主査	堀内 正久		学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	谷本 昭英		副査	宮田 篤郎
	副査	大脇 哲洋		副査	浅川 明弘

主査および副査の5名は、平成30年10月16日、学位申請者 小牧 祐雅 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) 酢酸による化学的潰瘍とESDによる物理的潰瘍とは何か相違があるのか。

(回答) 潰瘍形成から修復前の時間に違いがあるが、粘膜層が潰瘍辺縁から修復される点は両者とも同じである。

質問2) 酢酸を漿膜下に注入することでの潰瘍が作成される機序は何か。潰瘍はどこにできるのか。

(回答) 酢酸を漿膜下に注入すると粘膜下層の微小血管が損傷され粘膜層が壊死に至り潰瘍を形成する。潰瘍は酢酸を注入した直下の粘膜に形成されていた。

質問3) 酢酸を漿膜下に注入することで、潰瘍はどのラットでも均一にできるのか。

(回答) 既報と全く同じ方法で食道潰瘍を作成したので潰瘍はどの個体でも均一に作成されていると考えている。

質問4) 食道潰瘍が癒痕化する以前の急性期の炎症反応に差があったか。

(回答) 急性期の炎症反応を調べるためには潰瘍が一番形成されているday3での組織での食道重量や食道長を比較することが必要だと思われるが、今回はday3では組織的な検討はしなかった。

質問5) TIMP、MMPの局在はどこなのか。粘膜層なのか。

(回答) 様々な臓器において、悪性腫瘍の上皮細胞に局在しているとの既報があるが、本研究では食道全層からRNAを抽出しTIMPやMMPの発現を確認したので、その局在までは分からなかった。

質問6) PCNA染色は、抗体が認識しているものは何か。

(回答) 細胞周期のDNA合成期の細胞の核で発現する抗原を認識している。

質問7) 食道ESD後に狭窄する理由は何か。

(回答) 食道ESD後に人工的な潰瘍が出現し、潰瘍が膠原繊維で置き換わり線維化が起こるからである。

質問8) 今回の食道潰瘍の面積は、粘膜側を測定しているのか。それとも漿膜側なのか。

(回答) 食道潰瘍面積は粘膜側を測定している。

質問9) c-METの測定部位はどこになるのか。

(回答) 今回は、食道全層を含めてRNAを抽出しc-MET遺伝子発現を計測している。

質問10) c-METはHGFの受容体とのことだが、HGFで受容体が増えるのか。

(回答) 今回は外因性にHGFを投与されたことで粘膜上皮細胞が増殖し、c-METも増加したと思われる。

質問11) c-METがDay7で増えているが、Day3の時点で増えてもいいのではないか。

(回答) 組織傷害後、リン酸化されたc-METがHGFと結合することで、c-METが一時的に減少する。今回はDay3で一時減少していたと考えられる。

質問12) 今回の実験では食道潰瘍作成とはほぼ同時にHGF投与を開始しているが、潰瘍形成をHGFが予防した可能性はあるか。また、今回のデータで修復を促進しているというデータはあるか。

(回答) 潰瘍形成自体をHGFが予防した可能性は否定し切れないが、day7のHGF群食道には肉眼的に潰瘍癒痕を認めるので、HGF群も潰瘍は作成されていたと考えられる。

質問13) HGFにおける「morphogen」の具体的な例は何か。

(回答) 一例として、イヌ腎臓細胞から分枝細管が分化していくことが知られていることに対し、既報ではin vitroの実験においてイヌ腎臓細胞にHGFを外因性に投与することで分枝細管が分化することが確認されている。

質問14) 腹腔内持続ポンプでHGFを0.2 mg/dayで投与していたとのことだが、血中濃度を確認したのか。既報ではHGFを持続投与している間は血中濃度が増加していたが、今回はどうだったのか。

(回答) Day7時点で0~0.8 ng/dlの血中濃度だった。

最終試験の結果の要旨

質問 1 5) HGF の半減期はどの位なのか。

(回答) HGF の半減期は 3.2 分である。

質問 1 6) 実臨床ではどのように投与するのか。実臨床で持続投与するのは難しいのではないかと。

(回答) 既報ではラット大腸炎モデルへの HGF の注腸による局所投与で大腸炎の粘膜損傷が有意に改善していた。持続投与でなくとも、HGF の効果は期待できると考えられる。

質問 1 7) HGF は抗アポトーシスの作用もあるが、実臨床で CRT の際に効果がなくなる可能性はあるか。

(回答) 本研究では TUNEL 染色で HGF 群も PBS 群も有意差がなかったことを踏まえると、実臨床で HGF を投与しながら CRT を行っても、アポトーシスが起こりにくいわけではない可能性があると考えられる。

質問 1 8) 組織における線維化を α SMA 染色と AZAN 染色で診ているが、2 種類行った意味は何か。

(回答) 今回 AZAN 染色での組織学的評価は n 数が少なく統計学的評価が難しかったので、n 数を増やして、 α SMA 染色も行った。

質問 1 9) 酢酸を投与してから HGF 投与開始までの時間はどの位なのか。もし同時に投与しているのであれば潰瘍に対する HGF での予防をみていることにもなるので、酢酸と HGF 投与の時間は必ずすべきと思われるが。

(回答) 今回は酢酸で食道潰瘍誘導し、すぐに腹腔内に HGF 或いは PBS 入りの持続ポンプを挿入した。

質問 2 0) HGF 群と PBS 群とメチルプレドニゾン群の 3 群で比較した実験では、HGF 群には PBS を連日腹腔内投与をしたのか。注射のストレスでの影響を考えると、HGF 群も PBS の腹腔内投与するべきだが。

(回答) 今回、3 群比較の際に HGF 群には PBS は投与していなかった。

質問 2 1) メチルプレドニゾンの投与量が 40 mg/kg/day だったが、ヒトに換算すると多いのではないかと。また、投与量を減らすことで HGF 群と狭窄率で有意差がでた可能性はあるか。

(回答) 本研究でのメチルプレドニゾンの投与量は、既報で述べられている投与量に準じた。投与量を減らし HGF 群と有意差が出る可能性については、本実験では検討していなかった。

質問 2 2) 腹腔内持続ポンプは、何日間用の物を使用したのか。

(回答) 14 日間用の腹腔内持続ポンプを使用した。

質問 2 3) 食道重量が HGF 群で有意に低下した理由は何か。何も処置をしていない食道の重量はどのくらいか。

(回答) HGF の抗炎症作用はすでに示されているので、HGF 群では炎症細胞浸潤や炎症性浮腫が抑制されていたと思われる。何も導入していないラット食道重量は、本研究での測定ではいずれも約 200 mg であった。

質問 2 4) ラットに食道潰瘍を作成し体重減少をきたした理由は何か。体温は関係しているのか。

(回答) 食道造影検査で、特に PBS 投与群では食物残渣が食道狭窄で通過しにくいことが分かっており、食道狭窄に伴う食物の通過障害により体重減少をきたしたと考えられる。なお、本研究で体温は測定していなかった。

質問 2 5) HGF を VEGF や KGF と比較した際に、どれが一番有用性があると思われるか。

(回答) HGF では抗炎症作用と抗線維化作用を有するので、他の growth factor より有用性があると思われる。

質問 2 6) c-MET の脳における局在性はあるのか。

(回答) 海馬・皮質・橋の CA-1 領域に局在している。

質問 2 7) 今回の実験で、ラットの摂食量は測定したのか。

(回答) 本実験ではラットの摂食量は測定しなかった。

質問 2 8) 食道造影検査で、幽門部を結紮した理由は何か。噴門の結紮ではだめなのか。

(回答) 本研究では下部食道の噴門に近い部位に潰瘍を作成したため噴門での結紮が難しく幽門部を結紮した。

質問 2 9) 食道狭窄の検討では 3 群間で n 数が違ったが、統計学的にどのような問題が起こるか。

(回答) 検出力が下がる。

質問 3 0) 今回、PCR は $\Delta \Delta Ct$ 法か。プライマーの設定で工夫した点はないか。

(回答) 今回、PCR は $\Delta \Delta Ct$ 法であり、プライマーの設定は既報と同様にした。

質問 3 1) c-MET 欠損動物で炎症や損傷治癒をみた論文はあるのか。

(回答) 炎症や損傷治癒に関する報告はない。c-MET 欠損動物の表現形として、c-MET 欠損マウスが用いられているが、c-MET 欠損マウスでは骨格筋が作られないことが報告されている。

質問 3 2) ラットとヒトの食道での、一番の違いは何か。

(回答) ラット食道では上皮が角化している。

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。