

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	493号	学位申請者	郡山 豊泰
審査委員	主査	西 順一郎	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	堀内 正久	副査	石塚 賢治
	副査	井上 博雅	副査	原 博満

主査および副査の5名は、平成31年2月18日、学位申請者 郡山 豊泰 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) 届出数が増えている理由の一つに検査試薬の進歩があるとの説明だったが、具体的にはどのような経緯か。

(回答) レジオネラ尿中抗原検査キット、LAMP法が、各々2003年4月、2011年10月より保険適用になった。

(質問2) 2006年と2013年に罹患患者数が著増しているが、この時期に診断技術が進歩したからと考えるのか。

(回答) 診断技術の進歩に加えて、医師のレジオネラ症の認知向上も影響していると考えられる。

(質問3) “マクロファージ様細胞と普通のマクロファージとは、どのように違うか。

(回答) 今回用いた“マクロファージ様細胞は、通常のマクロファージと同様にCD14、CD11bが発現し、プレートへの接着、spread形成も確認できた。しかし、ヒト組織球性リンパ腫由来であるため、マクロファージ様と記載した。

(質問4) Figure 1Bで培養液中のLDHを測定しているが、MOI = 0での20%ほどのどのような意味をもつのか。

(回答) 培養細胞液中には、定常状態でも細胞分裂等により、一定のLDHが検出される。MOI = 0で20%という結果は、24時間培養した上清中のLDHを測りこんだもので測定上のバックグラウンドと考えている。

(質問5) microRNAの後に続く数字はどのようにして決められているのか。

(回答) 2001年にmicroRNAという名称になって以降、基本的には発見された順番に番号が付加されている。

(質問6) Precursor miR-218 (Pre-miR-218)の長さはいくらか。

(回答) Pre-miR-218-1、Pre-miR-218-2共に全長は約110 bpである。

(質問7) リアルタイムPCRのリファレンスジーンは何を用いたか。

(回答) U6 snRNAを用いて、各miRNAを補正し半定量化した。

(質問8) *SLIT*遺伝子、miR-218は、どの種まで保存されているのか。

(回答) *SLIT2*と*SLIT3*遺伝子はマウス、ラットなどでは90%の相同性を有している。miR-218-5pは、哺乳類において完全に一致しているため、重要なmiRNAの一つと考えている。

(質問9) レジオネラ菌に感染したマクロファージがサイトカインを産生する意義は何か。

(回答) 一般的に、サイトカインにより細菌が排除され細菌にとって不利と考えられるが、レジオネラ菌が増殖するために必要な宿主のマクロファージをさらに呼び寄せられるという、細菌に有利なシナリオも考えられる。

(質問10) *in vivo*でのレジオネラ菌感染のモデルはあるのか。また、IL-6とTNF- $\alpha$ を選んだ理由は何か。

(回答) *in vivo*ではA/Jマウスにレジオネラ菌を感染させた実験がある。この論文でレジオネラ菌の増殖能をIL-6とTNF- $\alpha$ が制御するデータがあるため、本実験でもサイトカインの中でIL-6、TNF- $\alpha$ を選択し検討した。

(質問11) NF- $\kappa$ B経路を検討したか。

(回答) mTOR経路とNF- $\kappa$ B経路はクロストークすると考えるが、検討実験は行っておらず今後の検討課題としたい。

(質問12) miR-218を選んだ理由は何か。がん患者のレジオネラ菌感染などを考えているのか。

(回答) レジオネラ菌によるmiR-218とmiR-155の発現増強は同等であるが、マクロファージのmiR-218の発現量がmiR-155より多いこと、miR-218についての研究が少ないことなどの理由からmiR-218を選択した。がん増殖制御にmiR-218が関連するという報告があるが、マクロファージのmiR-218とがんについての研究は現在行っていない。

(質問13) mTORのシグナルが誘導されるのは、どんな要因が考えられるか。

(回答) 一般的には、栄養状態、エネルギー産生状況等を感じてmTOR経路は作動する。近年、TLRを介したmTOR経路制御も報告されており、レジオネラ菌のLPS、フラジリンがmTOR経路に関与する可能性もあると考える。

(質問14) miR-218はRICTORへ直接的な作用を及ぼすのか。

(回答) 既報でmiR-218と結合する*RICTOR* mRNAの3'UTR領域を組み込んだreporter plasmidを使用して、直接結合することが示されている。

(質問 15) IL-6 と TNF- $\alpha$  は炎症を惹起すると考えられるが、レジオネラ菌にとって有利と考えるのはどうしてか。

(回答) 炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- $\alpha$ ) が、「更なるレジオネラ菌増殖の場」としてマクロファージを炎症部位に誘導すれば、レジオネラ菌の増殖にとっては有利に働くと考えられる。

(質問 16) TLR をノックダウンした系で、Figure 4 のようにサイトカインの変化を検討したか。

(回答) TLR を介するシグナル経路については、本研究で検討していない。今後検討したいと考えている。

(質問 17) レジオネラ菌による AKT リン酸化以外の系は考えていないのか。

(回答) TLR 経路活性化などは考慮すべき大切なシグナルであるが、今回は RICTOR 分子のみに注目して研究を行った。

(質問 18) レジオネラ菌により分泌されたサイトカインによるシグナルについてはどう考えるか。

(回答) レジオネラ菌で刺激を受けたマクロファージからのサイトカインによる 2 次的なシグナルは、24 時間以上の中長期培養では考慮すべきと考える。今回、6~24 時間の実験系では影響が比較的少ないため、検討していない。

(質問 19) レジオネラ菌は、どのようにしてライソゾームとの融合を阻害して生存しているのか。

(回答) Icm/Dot (intracellular multiplication)/Defects in Organelle trafficking) トランスポーターを介してエフェクター分子群が菌側からマクロファージに分泌され誘導されると考えられている。この分子がライソゾームの融合を阻止していると考えられる。現在のところ関連したエフェクター分子は、30 種以上報告されている。

(質問 20) レジオネラ菌はどうやってマクロファージ内で排除されるのか。U937 で感染した菌は排除に至るのか。

(回答) ファゴソームとリソゾームの融合が起こるとレジオネラ菌は排除される。U937 細胞でレジオネラ菌の排除は起こりにくいと考ええる。

(質問 21) レジオネラ菌感染と Autophagy との関連した報告はないのか。

(回答) レジオネラ菌が Autophagy を抑制するという報告がある。

(質問 22) なぜ、mTORC2 経路が低下するとサイトカイン産生が上昇するのか。そのメカニズムをどの様に考えているのか。mTOR 経路を阻害すると IL-10 の産生が促進されるが、IL-10 による抑制効果が解除されたことで色々なサイトカインの産生が亢進することは考えられないか。

(回答) ご指摘のとおり IL-10 による抑制効果が解除されたことで、その他のサイトカインの産生が促進したことが考えられる。既報では、mTOR 複合体を抑制すると Autophagy を促進し細胞内寄生菌を排除すると考えられている。今後、mTORC1 を制御することでサイトカインの変化を検討したいと考える。

(質問 23) mTORC1 経路の活性化、例えば、S6 のリン酸化などはみなかったのか。

(回答) mTORC1 の下流に位置する 40S リボソーム構成因子 (S6) のリン酸化は、今回検討してないが、mTORC1 の構成タンパク質の Raptor については、発現の変化はみられなかった。

(質問 24) スライド中の通性細胞内寄生菌と要旨 (初稿) に記載している偏性細胞内寄生菌はどちらが正しいのか。

(回答) 今回の実験で使用した WY0- $\alpha$  培地などの人工培地で発育可能であるため通性細胞内寄生菌が正しい。

(質問 25) レジオネラ感染で発現が増加する miR-155 は TLR シグナル経路を抑制しているとスライドでお示しになっている。つまり、miR-155 は炎症性サイトカインの産生を抑制すると報告があるのか。miR-218 と miR-155 は全く逆の作用があると考えていいのか。

(回答) 今回は、miR-218 がサイトカイン産生を促進する結果だったが miR-155 がサイトカインを抑制するとの報告もある。本実験系では、相対的に miR-218 の方が勝っているため、サイトカインの産生を促進したと考える。

(質問 26) ROS の産生は検討したか。

(回答) 今回の実験では検討していない。今後検討したい。

(質問 27) Figure 4 で、レジオネラ感染で RICTOR の発現は低下するのに、さらにサイレンシングで発現を抑える実験を行ったのはなぜか？

(回答) レジオネラ感染によってサイトカイン (IL-6、TNF- $\alpha$ ) のさらなる増強がみられるかを確認するためである。

(質問 28) U937 細胞で用いた接着細胞は、すべて分化しているのか。

(回答) PMA の添加の前後において、目視による確認ではあるが多くが接着していることを確認している。

(質問 29) Slit2/3 の発現を増強するメカニズムは何か？レジオネラ菌特異的に発現しているのか。

(回答) 内皮細胞で LPS 刺激によって Slit2 が誘導されるという報告もある。レジオネラ菌特異的であるかは大変興味深く今後の検討課題としたい。

(質問 30) サイトカイン測定は、接着細胞でみたのか上清でみたのか。

(回答) サイトカインの産生能は、すべて mRNA (IL-6、TNF- $\alpha$ ) の発現レベルで検討しており、接着している U937 細胞の定量 PCR で検討した。

(質問 31) SLIT2/3 による migration はどの細胞での動態を考えているか。また、どのような意味があるか。

(回答) Slit3 による単球の migration は報告がある。ただ、今後の検討課題としてマクロファージの遊走を invasion assay kit を用いて検討したい。マクロファージの遊走において更なる感染の場をレジオネラ菌が得ていると考えた。

(質問 32) IFN $\gamma$  や IL-12 がレジオネラの感染の排除に必要なが今回は検討していないのか。

(回答) 本実験系でレジオネラ菌感染における U937 細胞での IFN $\gamma$  や IL-12 のサイトカイン産生を培養上清で検討したが、どちらも産生能は、極めて低かったため今回は検討しなかった。

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。