

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 <b>513</b>	号	学位申請者	上菌 直弘
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位	博士 (医学)
	副査	吉本 幸司	副査	高嶋 博
	副査	田川 義晃	副査	久保田 龍二

主査および副査の5名は、令和元年5月13日、学位申請者 上菌 直弘 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) mouse iPS 細胞由来神経幹細胞と human iPS 細胞由来神経細胞を移植した場合にその効果に差はないのか。免疫的な拒絶反応はないのか。

(回答) それぞれ先行論文がありどちらも有効であることがわかっている。両者間で比べた論文はない。今回拒絶反応を予防するために NOD-scid マウスを使用した。

質問2) ステロイド治療と移植治療を組み合わせた先行研究はないのか。

(回答) ステロイド治療との組み合わせ治療の報告は私の知る限りにおいては無いが、抗 TNF $\alpha$  抗体治療との組み合わせ治療の報告はある (Wang L et al. *Brain Reseach* 2014)。

質問3) 損傷時、HMGB1 はどの受容体に最も関与するのか。

(回答) 本研究では行っていないが、脳挫傷モデルにおいては RAGE が重要であることが報告されている (Okuma Y, et al. *Ann Neurol* 2012)。

質問4) Fig 4F で intact の免疫染色の解析結果を記載しなかったのはなぜか？

(回答) intact を記載した方がより適切であったと考える。

質問5) 内在性ニューロンの数が損傷部より頭側で減少しているのに対して、セロトニン作動性ニューロンの線維は減少していないのはなぜか。

(回答) 損傷部より頭側のセロトニン作動性ニューロンの線維が損傷を免れたのかもしくは損傷を受けた線維が伸長したのかは、損傷直後に免疫染色で確認していないので評価できない。

質問6) 行動解析について、正常マウスを BMS にて評価するとどうなるのか。また組み合わせ治療後のマウスはどれほど回復しているのか。

(回答) 正常マウスを BMS で評価すると必ずしも満点の9点をつけられないマウスも存在した。協調運動を評価するために本研究では Grid walking test を行ったが、BMS では劇的な回復を認めた組み合わせ治療群のマウスも、正常マウスに比べると高々40%の回復にすぎないことがわかった。

質問7) 細胞外に放出された HMGB1 が損傷の増悪に影響し、これに対する抗体治療が有用であると考えているのか。

(回答) はい、そのように考えている。

質問8) 移植細胞はどのようなニューロンに分化したのか。

(回答) 本研究では、移植細胞由来ニューロンの subtype の評価は行っていない。

質問9) human 由来の細胞は成熟するのに時間を要することが報告されているが、本研究ではどのように考えているのか。

## 最終試験の結果の要旨

(回答) 本研究において組み合わせ治療群が受傷6週後も機能回復が継続しているのは、human由来の移植細胞がまだ成熟過程にある可能性を示唆しているが、本研究ではこれを評価していない。とても興味深いことであり今後検討する必要があると考える。

質問10) 炎症を誘発するサイトカインは多数ある中で、HMGB1に着目したのはなぜか。

(回答) 他のサイトカインの中でも、HMGB1はCNS傷害の超急性期に神経細胞を中心として直ちに動員される性質があり、これを中和することにより効率的に効果を獲得する可能性があったため、本研究ではHMGB1に着目した。

質問11) マウスの脊髄標本作製の際に苦労したことはあるか。

(回答) 標本作製するのは容易ではなかった。スライド切片を作製する際には、損傷部をまたいで頭側および尾側に中心管が存在するように切片を作製することにより、切片間の誤差を減らすように努力した。

質問12) 損傷脊髄においてHMGB1の発現について確認したか。

(回答) 免疫染色にて損傷周辺部にとどまらず広範囲にHMGB1が発現していることを確認した。

質問13) 抗HMGB1抗体投与のタイミングについて比較検討は行ったのか。

(回答) 受傷直後、3、6、9、12時間後に投与を行い、比較検討した(Nakajo M., et al. *Neurol Res* 2019)。6時間以内に投与するとコントロール群と比べ有意に機能回復を認め、損傷直後および3時間後に投与する方が6時間後に投与するよりも有意に回復することが判明した。

質問14) MEPで評価するのは困難でなかったか。

(回答) ご指摘の通り intact のマウスでも振幅に関してエラーバーが大きくなり、一定の波形をだすのに非常に苦労した。

質問15) 移植治療にリハビリテーションを併用した実験は行ったことがあるか。また、移植治療にリハビリテーションもしくは抗体治療を併用した際にそれらに差が生じるのか

(回答) 本研究では行っていないが、移植治療にリハビリテーションを併用すると機能回復を増大させたとの報告がある(Tashiro S. et al. *Sci Rep* 2016)。後者に関しては非常に興味深く今後検討したい。

質問16) 抗HMGB1抗体治療とオートファジーとの関係について検討を行ったか。

(回答) 本研究ではオートファジーについての検討は行っていない。

質問17) 組み合わせ治療では受傷6週以降も回復を継続しているが、このまま観察を続けると正常マウスの歩容まで回復する可能性はあるのか。

(回答) 質問6)でも回答したように、組み合わせ治療は正常マウスに比較すると機能回復はまだまだ不十分であると考え。協調運動をより詳細に評価するために、Random ladder testでの評価も今後検討したい。

質問18) 抗HMGB1抗体を急性期以降に投与することは検討しなかったのか。

(回答) 本研究では、傷害直後に細胞外に放出されたHMGB1を標的に抗体投与を行ったため、急性期以降の投与は検討しなかった。

質問19) 抗体の投与方法について、局所投与の検討は行ったか。

(回答) 本研究では先行研究にならって腹腔内投与を行い、局所投与は検討しなかった。

質問20) 抗体の局所での動態解析は行ったか。

(回答) 本研究では行っていないが、共同研究の岡山大学薬理学教室では標識抗体を作製し、生体内動態解析を検討している。

質問21) トロンボモジュリンはHMGB1を抑制するが、トロンボモジュリンの効果についての検討は行ったか。

(回答) 本研究ではトロンボモジュリンについての検討は行っていない。

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。