

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第	号	学位申請者	川畑 活人
審 査 委 員	主 査	浅川 明弘	学 位	博士 (医学)
	副 査	堀内 正久	副 査	谷本 昭英
	副 査	家入 里志	副 査	前村 公成

主査および副査の5名は、令和1年11月18日、学位申請者 川畑 活人 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) コントロール食・フルクトース食の組成で異なる点、コントロール食は糖質としては何が入っているか？

(回答) コントロール食の組成は重量に対する割合で水分8.7%、粗タンパク質25.1%、粗脂肪4.5%、粗繊維5.1%、原灰7.0%、可溶無窒素物49.7%であった。フルクトース食の組成は同様にフルクトース60%、カゼイン20.7%、メチオニン0.3%、ラード5.0%、セルロース9.2%、ビタミンとミネラル4.5%、酒石酸コリン0.3%、および第三ブチルヒドロキノン0.001%であった。特殊配合のフルクトース食と一般的なコントロール食では公表されている組成の表記がこのようなやや異なっており、組成の異なる点を詳細に分析するのは困難であった。コントロール食の炭水化物源としてトウモロコシや小麦粉が使われており、これらは最終的に分解されてショ糖となるため、コントロール食の糖質は主にショ糖であると考えられる。

質問2) フルクトース食で体重が増えない理由は？ 摂食量は測定しているか？

(回答) 実際のフルクトース食の摂食量は計測できていないが、フルクトース食は粉末のため、最初の数日間は摂取が上手にできず体重が増えなかったと考えられる。

質問3) 統計について。4群は異なる独立した群としているが、2元配置ではなく1元配置にした理由は？

(回答) DSS+フルクトース食群とその他の3群をそれぞれ比較したかったので1元配置分散分析を用いた。

質問4) 傍細胞透過性について。細胞透過性でなくなぜ傍か？細胞透過性は測定できるか？評価したか？

(回答) 本研究ではタイトジャンクションをターゲットとしたため傍細胞透過性を評価した。フルクトースはGLUT5により細胞内に取り込まれるため、細胞透過性を変化させる可能性はあるが、本研究では評価できていない。

質問5) 便中フルクトースは2群だが、4群では評価していないのか？

(回答) まず予備実験として大腸にフルクトースが到達するかどうかを調べ、到達することを確認してから4群に分けた実験を行ったため、この項目に関しては最初に調べたフルクトース食の有無のみの2群の比較を報告した。

質問6) 粘膜の丈の高さとか陰窩の長さの評価は？差がありそうか？

(回答) 粘膜の丈の高さや陰窩の長さの測定は行っていない。FD群では粘膜上皮が破壊されるため、他群と比較して粘膜の丈の高さや陰窩の長さは減少することが予想される。

質問7) F群でも丈が短くなっているように見えるが？病理スコアでは多少は点数があがっているが？

(回答) F群では粘膜の丈に変化はなく、粘膜層や下層に炎症の浸潤が見られたため病理スコアが上昇した。

質問8) サイトカインはF群では上がっていないが病理スコアは上がっている。どのようなメカニズムか？

(回答) 病理スコアはF群で炎症細胞の軽度浸潤があり上昇しているが、サイトカインが分泌されるほどの炎症ではなかったと推察される。もしくは、本研究では腸管全層を用いたmRNAの解析であったため、十分な差が出なかった可能性もある。

質問9) HT29のmonolayer cellで接着蛋白や透過性を評価しているが適切か？

(回答) HT29以外にもmonolayer cellのCaco-2などで接着蛋白や透過性を評価した報告があり、適切と考えられる。

参考文献：Fang L et al. Inflamm Bowel Dis. 24(8):1733-1744, 2018.

質問10) Monolayer cellにDSSを加えていないのはなぜか？

(回答) 今回は腸管上皮細胞に対するフルクトースの影響を調べるためDSSは加えなかった。今後の課題としたい。

質問11) LDH assayで細胞障害を評価しているが、どのようなモードの細胞障害か？

(回答) 細胞膜に傷害をうけた細胞数の増加は、培養上清中のLDH酵素活性の増加として現われるため、死細胞数を解析していると考えられる。フルクトースは肝臓内で代謝され、Glycer AGEsが作られる。Glycer AGEsは細胞表面の受容体であるRAGEを介して認識され、細胞に酸化ストレスを惹起させてアポトーシスを誘導するため、アポトーシスによる障害をうけた細胞数を解析していると考えている。

質問12) フルクトースが好中球・マクロファージからMMPを分泌させてoccludinの発現を抑制しているが、どのようにMMPがoccludinの発現を抑制するのか？分解するのか、発現自体を抑制するのか？転写レベルなのか？

(回答) MMP-9は分泌型MMPであり、プロテアーゼ活性を有しており、occludinの細胞基質を溶解することでoccludinを直接蛋白レベルで分解する。

質問13) 潰瘍性大腸炎が増えているのは単純に診断率が上がったからなのか、実際に増えているのか？一番の原因は？人種差は？途上国や先進国での差は？

## 最終試験の結果の要旨

(回答) 患者総数は全世界的に増加している。環境因子や食生活の変化が影響しているものと推察されている。欧米諸国で有病率が高いが、近年アジア諸国でも有病率が増加している。

質問 1 4) DSS 腸炎は化学的腸炎でいいか？実験中の生存率は？

(回答) DSS 腸炎は化学的腸炎であり、濃度が高いと致死率も高い。今回は予備実験で炎症は起こるが生存率も保てる濃度を設定し実験を行った。

質問 1 5) 実験腸炎モデルと IBD 腸炎との類似点や相違点は？基本的には同じでいいのか？

(回答) IBD 腸炎には免疫や上皮機能に影響する遺伝子が関係していると言われているが、今回用いた DSS 誘導腸炎にはこれらの遺伝的要素はほとんど関係していない。ただ、病理組織学的には類似性のある腸炎像を示すことが知られており、慢性実験腸炎モデルとして頻用されている。

質問 1 6) 実験でのフルクトースは実際の人間が食事で摂る量にするとどのくらいか？

(回答) 体重 60kg の人間に換算すると、ダイエットココアを 1.5L 毎日摂取する計算結果になった。

質問 1 7) DSS・フルクトースを加えた状態だが、摂取をやめると可逆性はあるのか？

(回答) DSS、フルクトースを中止し、しばらくすると体重の増加を認めたため可逆性はあるものと考えられる。

質問 1 8) 炎症性サイトカインは血中での測定は行わなかったか？

(回答) マウスの門脈採血の手技が困難で断念した。

質問 1 9) フルクトースが肝臓にも影響を及ぼすというイントロがあったが、肝臓の評価は行わなかったか？

(回答) 今回は肝臓の評価は行わなかった。

質問 2 0) DSS モデルはフルクトースの吸収のスピードに変化はおきているのか？

(回答) DSS モデルと吸収スピードについての既報は検索した限り見られなかった。ただし、フルクトースの大部分が十二指腸～空腸で GLUT5 を介して吸収されるため、今回の実験のモデルでは小腸には炎症を有しておらず、吸収には影響ないと推察している。

質問 2 1) DSS は小腸のモデルなどにも使われるのか？

(回答) DSS は小腸にはあまり影響を与えないとされているが、高濃度で小腸の炎症を評価している既報も見られた。

参考文献：Shukla PK et al. Sci rep. 8(1): 16241, 2018.

質問 2 2) DSS はフルクトースのトランスポーターの発現に影響は与えるか？組織学的な変化に影響を与えるか？

(回答) DSS とトランスポーターについての既報は検索した限り見られなかった。DSS は高濃度のフルクトースと併せると上皮を破壊するため、トランスポーターの発現を低下させると推察される。

質問 2 3) 吸収されなかったフルクトースが結腸内に流入して細胞に障害を与えるといった仮説だが、バクテリアルトランスロケーションに影響を与えるか？

(回答) 門脈血中の細菌の存在を証明できていないが、腸管のタイトジャンクションに影響を与えるため可能性が高いと考えられる。参考文献：Gäbele E et al. J Hepatol 55: 1391-1399, 2011.

質問 2 4) なぜバクテロイデスが特異的に増えるのか？UC を増悪させるメカニズムは？

(回答) いずれも現在明確な理由を示す既報は検索した限り見られず、解明されていないと考えられる。

質問 2 5) マクロファージや好中球のどこに作用して MMP の分泌が始まるのか？ほかの炎症も同時に起こるのか？

(回答) MMP-9 はマクロファージや好中球、特に好中球から放出される。MMP-9 の遊走に関与するのは分泌性オルガネラの一つである三次顆粒である。血管内皮細胞に付着した好中球では、様々な受容体を細胞表面に露出させ、血管内皮細胞に強固に結合する。その後、三次顆粒が細胞膜に融合することで、顆粒中の MMP-9 を開口放出する。これらは好中球の食食関連のメカニズムで、その他にも炎症性サイトカインの分泌など炎症の過程は同時に進行する。

質問 2 6) DSS モデルで、期間が短くなると炎症が起こらないのか？このモデルでは 2 週間だが一般的なのか？

(回答) 濃度を高くすれば短期間でも炎症は起こる。高濃度で 1 週間摂取した既報も見られたが、低濃度で 1 カ月以上飼育した実験も見られる。実験によって濃度や期間は様々で、どれが一般的かは決まっていない。

質問 2 7) 飲水量は DSS 群と通常食群で変化はあったか？

(回答) 実測はしていないが印象としては大きな差はなかった。

質問 2 8) バクテロイデス数が上がっているが、細菌数全体が上がっていることによって炎症が増悪した可能性は？

(回答) F 群においても細菌数は上昇し、バクテロイデス属の割合も上昇しているが、炎症は軽度となっている。粘膜のバリア機能低下とバクテロイデス属の増加が同時にある状態だと炎症が増悪すると考えられるが、今回の実験では菌数の増加によるものの評価は困難であった。既報ではバクテロイデス属が IBD の症状を増悪させるとされている。

質問 2 9) 無菌マウスにバクテロイデスを糞便移植などで移植した先行研究はあるか？

(回答) 検索した限りでは見られなかった。

質問 3 0) Figure7 で透過性については 0.5 時間、1 時間、細胞障害については 1 時間、2 時間を見ているが透過性については 2 時間、細胞障害について 3 時間を見た場合、時間効果は得られるのか？

(回答) 今回の実験ではいずれも提示した時間までしか実験を行っていないが、明らかに時間依存性に透過性、障害度ともに上昇しており、時間を延長した場合に時間効果が得られると考えられる。

質問 3 1) 今回はフルクトースと UC の関係を調べているが、クローン病に対しての先行研究はあるか？

(回答) IBD として、UC と併せて調べられている先行研究はあったがクローン病単独では検索した限り見られなかった。

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。