

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 565 号	学 位 申 請 者	田 中 啓 仁
審 査 委 員	主 査	橋 口 照 人	学 位 博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	堀 内 正 久	副 査 原 博 満
	副 査	家 入 里 志	副 査 浅 川 明 弘

主査および副査の5名は、令和2年4月2日、学位申請者 田中 啓仁 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) 潰瘍性大腸炎(UC)患者数について、軽症者への助成制度が成されなくなったあとの現在の患者数の把握方法はどのように行なっているのか。  
 (回答) 難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班と難病疫学班との合同で、UCの有病者数推計に関する全国疫学調査を行った。調査診療科を内科、外科、小児科、小児外科の4科とし、層化無作為抽出された全国3,741病院を調査対象施設とした。2015年12月に郵送調査を開始、2016年3月に終了・集計し、回収率は6割であった。なお結果は、推定有病者数は22.0万人(18.4万人-25.5万人)であった。(Murakami Y, J Gastroenterol, 2019, 54, 1070-7)

質問2) プロバイオティクス有望株20株の選定方法はどのように行なっているのか。  
 (回答) プロバイオティクスの条件(公益財団法人 腸内細菌学会)でもあるが、“胃酸・胆汁酸への耐性”、“グルコースからのガス産生”、“Caco-2細胞への付着性”をもつものを選定している。(Takeda S., Animal Science Journal, 2011, 82, 571-9)

質問3) Methodで、mRNAのリファレンスは何か。論文に記載されているrRNAは誤りではないか。  
 (回答) リファレンスはGAPDHを用いた。論文のrRNA記載は誤りであった。

質問4) Fig. 6でB群(抗IL-10中和抗体投与)の体重減少が起きた理由は何か。摂食量を測定した上での実験系には出来なかったのか。  
 (回答) B群の体重減少は抗体を腹腔内投与したことによる直接的な侵襲による影響と考えられた。摂食量は測定していないが、侵襲が加わったことによる摂食量の減少があった可能性もある。なお、摂食量の測定が出来ていない理由は、自由摂食であることや、餌をゲージから落下させてしまうためである。

質問5) 抗体量100 mg/bodyは多すぎるのではないか。100 µg/bodyの間違いではないか。  
 (回答) 参考文献を参考にし、100 µg/bodyとした。論文の記載(100 mg/body)が誤りであった。(Seo N., Immunology, 2001, 103, 449)

質問6) LP06CC2は自分で分離したのか、それとも分与してもらったか。  
 (回答) LP06CC2は、共同研究施設である南日本酪農株式会社で熱滅菌処理され、粉末状態で分与してもらった。

質問7) プロバイオティクスとプレバイオティクスの違いは何か。  
 (回答) いずれも、宿主の健康に有益な全身的な効果をもたらすが、プロバイオティクスは「腸内フローラのバランスを改善することによって宿主の健康に好影響を与える生きた微生物」と定義されている。一方、プレバイオティクスは「大腸内の特定の細菌の増殖および活性を選択的に変化させることより、宿主に有利な影響を与え、宿主の健康を改善する難消化性食品成分」と定義されている。(腸内細菌学会による用語集)

質問8) 死菌体でもプロバイオティクスと呼んでいいか。  
 (回答) プロバイオティクスの条件が生菌であるため、死菌体はプロバイオティクスとは呼ばない。直接、あるいは腸内細菌叢を介して宿主に有益な効果をもたらすものとして、バイオジェニックスと表現した方がよいと思われる。(Gibson, G.R. and Beal, M.B., J. Nutr., 2000, 125, 1401-21, 光岡知足, 腸内菌叢研究の歩み, 腸内細菌学雑誌, 2011, 25, 113-24)

質問9) 臨床応用としては生菌ではなく本研究同様に死菌体の利用を考えているのか。  
 (回答) 菌体成分が有効と考えられるので、死菌体を用いた応用を考えている。今後の課題として、菌体中の有効成分を選択的に抽出していくことも考えている。

質問10) LP06CC2は、クロストリジウムなどの他の菌体と比較してIL-10の誘導能は高いのか。  
 (回答) IL-10発現能に関して、クロストリジウム属を含む他の菌体との比較は行っていない。

質問11) (Fig. 5) DSS腸炎モデルでのTh1やTh17系は測定しているか。またIFNγは確認しているか。  
 (回答) Th1系の発現は確認した。Th17系として、IL17の発現亢進は認めなかった。IL23は確認していない。またIFNγは本実験では確認していないが、共同研究者によるLP06CC2投与後の脾臓細胞中のIFNγが増加したことより、同じく増加することが予想される。(Takeda S., Biosci Biotechnol Biochem, 2013, 77, 1372-8)

質問12) CD4陽性細胞においてIL-10遺伝子の発現はなかったのか。  
 (回答) LP06CC2添加で、CD4陽性細胞においてIL10発現亢進は認めなかった。

質問13) (Fig. 4) LP06CC2の効果を確認するためにLPMCsの特定のポピュレーションは増加していたか。  
 (回答) FACS等により細胞種類の比率を確認すべきだったが、本実験では確認できていない。

質問14) (Fig. 5F) コントロールに比べるとTNF-αの発現増加が小さいように見られるが、DSS腸炎であれば、本来TNF-αはさらに増加するのではないか。  
 (回答) 予備実験を含め数回実験を行なったが、同様の結果であった。DSSが1%であるために腸炎の効果が乏しかった、あるいは本研究ではLPMCs全体を用いたmRNAの解析であったため、十分な差が出なかった可能性がある。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 5) DSS 腸炎であれば TNF- $\alpha$  が上昇するだろうが、実臨床の患者と本データの解離に関してどう思うか。

(回答) 潰瘍性大腸炎において、全例で TNF- $\alpha$  が優位な炎症というわけではなく、その他のサイトカインが優位な症例も存在することがある。

質問 1 6) (Fig. 6) DAI スコアの有意差はあったか。

(回答) 抗 IL-10 中和抗体を用いた実験では体重と大腸組織像のみを解析する目的であったので、DAI スコアの測定は行っていない。

質問 1 7) (Fig. 6) 体重減少の有意差はあったか。

(回答) 有意差があったことを確認している。

質問 1 8) (Fig. 7) 2 つの菌がなぜ増加したのか。

(回答) 本研究ではなぜ増加したかは詳細な検討はできていないが、既報でもプロバイオティクスの投与により *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* が増加すると同様の報告がある。既報でも機序に関しては明らかにはされていないが、2 つの菌は共生菌として存在しているとする報告が多く見られる。

質問 1 9) 使用したマウスはオスか。

(回答) オス、メス両方を使用している。予備実験でオス、メス両方を使用し、差を認めなかったためである。

質問 2 0) (Fig. 1) IL-10 など含め、100  $\mu$ g/ml で低下している理由は何か。

(回答) 当初は手技の影響と考えていたが、培養時間が超過したために低下した可能性も考えられる。48 時間よりも短いタイミングで行えば、0~100  $\mu$ g/ml で濃度依存的に増加した可能性はある。

質問 2 1) (Fig. 4) 論文ではコントロールの基点が 1 になっているが、スライドでは、1 になっていないのではないか。

(回答) スライドに示した Figure が間違いである。論文中に正しい Figure を記載している。

質問 2 2) IL-10 ノックアウトマウスは報告されているか、報告があるならばそのフェノタイプは何か。

(回答) IL-10 ノックアウトマウスは自然腸炎発症モデルとして報告されている。(Kühn R., Cell, 1993, 75, 263-74)

質問 2 3) LP06CC2 は大腸に到達するというデータはあるか。

(回答) 共同研究者により、ヒトに同菌株を含んだヨーグルトを摂取させ、糞便中の菌体の検出を確認している。

質問 2 4) 現在の難病指定患者数の推移について、分類はどうしているのか。

(回答) 以前は軽症者も含んでいたが、「難病の患者に対する医療等に関する法律」に基づき、現在は中等症、重症患者に限る。

質問 2 5) 潰瘍性大腸炎患者の軽症、中等症、重症者の比率はどうか。

(回答) 軽・中等症が約 8 割、重症が 1 割弱と言われている。

質問 2 6) 菌体の入手はどのようにしているのか。モンゴルから輸入しているのか。

(回答) 共同研究施設である南日本酪農株式会社を通じてモンゴルから入手している。

質問 2 7) モンゴル伝統的乳酸菌とは何か。何に由来するのか。

(回答) LP06CC2 はアイラグ(馬乳酒)に由来する。

質問 2 8) 強制経口投与の方法は何か。

(回答) 金属製ゾンデにより投与している。

質問 2 9) (Fig. 5E) 組織標本のスケールが異なるように見えるが、同じなのか。

(回答) 3 群共にすべてスケールは同じである。

質問 3 0) 腸管長の測定方法は何か。

(回答) 腸管膜を除去し、テンションをかけずに直線化した状態で測定している。

質問 3 1) DSS 腸炎はヒトではどのような病態か。

(回答) 本実験で用いた DSS (分子量約 5000) は直腸から口側に連続性に炎症を引き起こす。これは潰瘍性大腸炎に類似した病態とほぼ一致しており、これまでも潰瘍性大腸炎モデルとして確立されたモデルである。

質問 3 2) LP06CC2 の応用として、臨床での使用方法とは何か。

(回答) 本研究で示したように LP06CC2 が非腸炎において IL-10 を誘導することと、DSS1% と弱い炎症に対して腸炎抑制効果を持つことが確認されたことより、腸炎の予防と、軽症者に対する治療薬として期待できるものと考えている。

質問 3 3) プロバイオティクスの臨床使用のエビデンスは何か。

(回答) 潰瘍性大腸炎患者に対するプロバイオティクスの臨床応用として、*Lactobacillus rhamnosus* GG、*Bifidobacterium longum* 536、VSL#3 が有効であったと報告されている。

質問 3 4) Introduction にある、NOD2 や CARD9 といったような遺伝子多型について、今回の実験におけるインフラゾームとの関係については考察したか。

(回答) 今回の実験では検討していないため、今後の課題とする。

質問 3 5) DSS の分子量に単位として Da (ダルトン) をつけるのは誤りではないか。

(回答) DSS の分子量は質量ではなく相対分子質量と相対値で示されるため、単位をつけての表記は誤りであった。

質問 3 6) (Fig. 3) TLR4 ではなく TLR2 が増加したことの考察は何か。

(回答) 本実験では TLR4 の増加はなかった。この理由としては TLR4 のリガンドは LPS と言われており、今回使用した LP06CC2 はグラム陽性菌であり、LPS を持たないからと考えられる。一方、本実験では既報と同様に TLR2 の増加を確認した。この理由としては TLR2 のリガンドはペプチドグリカンなどの菌体成分と言われていたためである。しかし、TLR2 の増加する機序に関しては本実験においても検討できていない。

質問 3 7) P1189 右の段 11-12 行目 We decided that a 10-days DSS treatment の 10-days は正しいか。

(回答) 既報における急性腸炎モデルとしての DSS 投与期間 10 日に対し、予備実験では、DSS を 1% としていることもあり、10 日間では差が付かなかった。よって、本実験では 10 日以上と DSS 投与期間を延長させた。指摘の通り、論文の記載を 10 日以上としなければならなかった。

質問 3 8) P1182 右の段 Method の LPMCs の分離に DNAase を入れた理由は何か。

(回答) 死細胞から放出される DNA を切断し粘性を低下させ細胞を分散させるためである。(Hayashi A, cell Host Microbe, 2013, 13: 711-22)

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。