

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 379 号	学位申請者	柳澤 嵩大
審査委員	主査	松口 徹也	学位
	副査	山崎 要一	副査
	副査	後藤 哲哉	副査
			博士 (歯学)
			中村 典史
			中田 匡宣

主査及び副査の5名は、令和2年10月15日、学位申請者 柳澤 嵩大 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事が出来た。

質問1) 抗菌性ペプチドは、ディフェンシン等いくつかの種類が知られているが、LL-37 に着目した理由は何か。

(回答) ディフェンシンがリンパ管新生を促進するという報告は既にあるため、もう一つの代表的な抗菌性ペプチドであるカテリシジンの一種のLL-37に着目した。

質問2) どの細胞がプロテアーゼを出し、hCAP18を切断するのか。

(回答) 好中球等の顆粒球を始めとする免疫担当細胞から産生される事が知られている。

質問3) LL-37は、TLRと結合して創傷治癒を促進するのか。

(回答) LL-37はLPSと結合するので、少なくとも間接的にはTLRと結合する事が出来るが、その結果創傷治癒が促進したという報告はない。

質問4) CRAMP ノックアウトマウスでリンパ管新生が抑制されるという報告はあるか。

(回答) LL-37とリンパ管の関与については、ほとんど知られていないため、CRAMPについても明らかではない。

質問5) 今回実験を行っているLL-37の濃度は、口腔内の濃度と比較してどの程度か。

(回答) 今回実験を行った100nMは、一般的な健常者の唾液中よりも高濃度だが、歯周炎等によりLL-37が発現亢進すれば容易に到達する濃度である。

質問6) LL-37は、重層扁平上皮のうち、どのあたりから産生されるのか。

(回答) 受傷時、炎症時に高発現するという性質上、比較的表層の細胞から分泌されるのではないかと考えられるが、具体的な報告はない。

質問7) LL-37はHDLECの増殖能に影響を与えなかったが、リンパ管新生において細胞増殖は必須だと考えられる。例えば、他の増殖促進作用を持つ物質と協調して働くような作用があるのか。

(回答) 増殖が促進されるためには細胞内シグナル伝達経路の活性化が起こる必要があるが、この活性化が一過性であるのか、持続的であるのかが重要であると言われている。本研究の実験系では、LL-37添加による刺激のタイミングが、増殖を促進するのに十分でなかった可能性がある。そのため、LL-37に細胞増殖促進作用が真にないのかは、今後の研究で明らかにする必要がある。

質問8) トランスウェルチャンバー法で用いたチャンバーのポアと細胞直径の関係はどのようになっているか。

(回答) 内皮細胞の遊走を評価する際には3µm以上のポアサイズを使用する事が多い。今回は8µmのものを使用している。内皮細胞の直径はおよそ8~15µmなので、細胞直径の50~80%のポアサイズである。

質問9) 今回の実験ではLL-37の濃度に関わらず管腔形成能が促進しているが、HDLECの管腔形成能における至適濃度はどれくらいか。

(回答) HDLECは末梢系の細胞であり、管腔形成能が高いため、遊走能に差が生じる濃度でも、促進効果を示したと考えられる。少なくとも*in vitro*においては、細胞毒性を示さず遊走能促進効果を示す100nMが適正である。

最終試験の結果の要旨

質問 10) 管腔形成の促進作用とは、管腔が伸長するのか、太くなるのか。

(回答) 末梢のリンパ管において、活性化の状態によって細胞同士の結合が緩み、太さは変動するため、太さと管腔形成の程度は関連しない。管腔形成が促進するとより伸長すると考えられる。

質問 11) 管腔形成が促進するのであれば、遊走能は抑制されるのではないか。

(回答) 見ているタイミングが違う事が影響していると考えられる。管腔形成能と同様に、LL-37 添加後 24 時間時点で遊走能を評価すると、抑制されている可能性はあると考えられる。

質問 12) VEGF や Ang 等のリガンドを単独で使用した場合、リンパ管新生促進作用は効率的に発揮されるのか。

(回答) VEGF、特に VEGF-C は強力なリンパ管新生促進因子なので、リンパ管新生は促進すると考えられる。

質問 13) VEGF の mRNA レベルでの発現上昇を以て、リンパ管新生が促進したと結論して良いのか。

(回答) VEGF のノックダウンを行う事で HDLEC の遊走能と管腔形成能が抑制されるので、VEGF によりリンパ管新生が促進していると考えられる。

質問 14) ERK 阻害時に Akt のリン酸化上昇が認められる一方で、遊走能と管腔形成能は効果的に抑制されているが、このメカニズムは説明可能か。

(回答) ERK 阻害により代償性に生じた Akt のリン酸化上昇による作用よりも、阻害剤による ERK 阻害の影響の方が大きい事により、リンパ管新生が抑制されていると考えられる。

質問 15) LL-37 が FPRL1 と結合し、VEGF の発現が促進するという報告はあるか。

(回答) LL-37 により VEGF 発現が促進されるという報告はあるが、FPRL1 受容体の関与についての報告はない。

質問 16) FPRL1 の発現量を、血管内皮細胞と比較した報告はあるか。

(回答) リンパ管内細胞について、FPRL1 の発現量について調べた報告はない。

質問 17) 統計は何を使ったか。

(回答) 二群間の比較は t 検定、多重比較には ANOVA の後に post-hoc test として Tukey 検定を使用した。

質問 18) 血管内細胞ではどのような実験結果だったか。

(回答) 血管内皮細胞では、LL-37 によって増殖能を含む血管新生能の促進効果が示された。また、細胞内シグナル伝達経路については同様に ERK、Akt の活性化が認められたが、VEGF の産生は認められなかった。

質問 19) LL-37 を創部に投与すると、どうなるか。

(回答) 脈管系組織の新生が起こる事により、創傷治癒を促進する事が出来るのではないかと考えられる。

質問 20) 血管新生する時は、LL-37 の存在に関わらず、静脈等からリンパ管も新生するのではないか。

(回答) 胎生期のリンパ管発生とは異なり、リンパ管新生では、静脈ではなく既存のリンパ管内皮細胞によりリンパ管新生が起こる事が知られている。LL-37 が無くてもリンパ管新生は起こると考えられるが、遊走能と管腔形成能の促進効果によるリンパ管新生促進効果はあると考えられる。

質問 21) VEGF、FPRL1、LL-37 について全体的な流れはどうなっているか。

(回答) LL-37 が FPRL1 と結合し、ERK、Akt が活性化してリンパ管新生促進が起こる事と、LL-37 により VEGF が発現亢進し、リンパ管新生促進が起こる事が今回明らかとなった。

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 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。