

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 598 号	学位申請者	松田 恵理子
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	橋口 照人	副査 西尾 善彦
	副査	永野 聡	副査 三井 薫

主査および副査の5名は、令和3年2月5日、学位申請者 松田 恵理子 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) 2型糖尿病 (T2D) に対しても HGF の治療効果は見込めるのか。

(回答) 過去の研究で、T2D モデルマウス (ob/ob マウス) を用いて、HGF/c-Met シグナルを介したグルコース恒常性の改善が報告されていることから、HGF 遺伝子治療は T2D に対しても治療効果が期待できる。

質問2) T1D に対する Ad.CA-HGF 遺伝子治療の長期的効果はあるのか。

(回答) アデノウイルスベクターで *in vivo* 遺伝子導入後の遺伝子発現は 2-4 週間であるが、今回の研究で観察終了の 11 週間まで治療効果がみられたように、HGF 遺伝子発現期間よりも長期の高血糖抑制作用が得られることがわかった。更なる長期の治療効果誘導の技術も、今後開発したい。

質問3) 保護した  $\beta$  細胞の観察は行なったか。

(回答) 今回は、安全で効果的な遺伝子治療法の開発、その特許出願ならびに論文発表を優先したため、組織は採取しているが、組織学的解析までは行っていない。今後行う予定である。

質問4) STZ によりどの程度の  $\beta$  細胞が破壊されたのか。

(回答) 今回は組織学的に検討を行っていないが、過去の論文から、本研究で用いた実験条件では約 5 割の  $\beta$  細胞が破壊されるということが報告されている。

質問5) マウスにおいて糖尿病の症状は観察されたか。

(回答) コントロール (Ad.CA-LacZ) 群で、T1D の症状の多飲多尿及び体重減少が見られた。

質問6) STZ 投与後のコントロール群の血漿インスリン量は低下していくと思われるが、本論文の Fig. 2 において、定常時のインスリン分泌量は治療 (Ad.CA-HGF) 群と差がない。このことを、臨床的にはどのように評価したのか。食後血糖などで評価したのか。

(回答) これまでの複数の研究で、今回の低用量 STZ 誘導の T1D モデルはヒトの緩徐進行 T1D に酷似しており、 $\beta$  細胞数は徐々に減少していくが、非絶食時の血清 (血漿) インスリン値は長期間正常値が維持され、血糖値のみが経過的に上昇することが示されている。さらに非絶食時血清 (血漿) インスリン値は、初期に急激に上昇することが特徴で、その後の長期正常値の期間を経て、最終的には低下する。このメカニズムとして、正常血糖を維持するための生体内反応から、残存  $\beta$  細胞がオーバーワークをしていることが示唆されている。本実験と同一条件の STZ 量とマウス種の論文では、STZ 投与 6 週後の 1 ポイントしか検証していないが、その時点では血清インスリン値は低下しているので、我々の研究においても実際に後期のタイムポイントを調べれば血漿インスリン値が低下していると推察する。また今回は、糖負荷試験などは、実施していない。今後、これらの点を慎重に検討していきたい。

質問7) アデノウイルスベクターで投与するメリットは何か。

(回答) 生体内半減期が短い HGF タンパクは、治療には一日数回の静脈注射が必要である。一方、アデノウイルスを用いた *in vivo* 遺伝子治療では、1 回の投与で 2-4 週間の HGF タンパクが体内で得られる。患者の負担が軽減でき、更に治療効果も上昇する可能性がある。

## 最終試験の結果の要旨

質問 8) 本論文の Fig. 2 において、治療群は Day7 で血漿インスリン量が少ないにも関わらず高血糖を抑制しており、HGF が直接血糖値を下げているように見える。これまでに、HGF が直接血糖値を下げるという報告はないのか？

(回答) 調べた限り、HGF が直接的に血糖値を下げる報告をした論文はなかった。STZ の  $\beta$  細胞破壊作用に対し、HGF の抗アポトーシス作用が働き  $\beta$  細胞を保護したことで、代償性のインスリン過剰分泌を起こさずに高血糖を抑制したと考察している。

質問 9) 血漿インスリン測定に必要な血液はどのくらいの量か。

(回答) 超高感度マウスインスリン測定キット (森永生科学研究所) のプロトコールに従い、 $5\mu\text{l}$  の血漿を使用した。

質問 10) 血漿中の HGF はどの程度発現するのか。

(回答) 今回、血漿中の HGF 発現量は確認していない。我々はこれまで、Ad.CA-LacZ ( $1 \times 10^{11}$  particles) の尾静脈投与で、肝細胞の 60~90% で LacZ 遺伝子が発現していることを示した。今回の Ad.CA-HGF 投与量 ( $3 \times 10^8$  pfu;  $3 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$  particles に相当) から遺伝子発現量を換算すると肝細胞の 2~30% で HGF が発現していることが考えられる。HGF 発現量の測定は行なっていないが、血液循環で膵臓に到達した HGF が  $\beta$  細胞を保護したと推察している。

質問 11) HGF による  $\beta$  細胞の保護効果として考察した根拠は何か。

(回答) 過去に、 $\beta$  細胞における HGF/c-Met シグナルは、定常状態では  $\beta$  細胞の増殖と機能に影響しないが、糖尿病誘発状態では  $\beta$  細胞の生存率が劇的に減少し、糖尿病の発症を早めるとの報告がある。このことから、HGF/c-Met シグナルが糖尿病状態における  $\beta$  細胞の生存に重要な役割を担うと推察し、Ad.CA-HGF 治療効果を残存  $\beta$  細胞の保護作用と考察した。

質問 12)  $\beta$  細胞の保護作用とはどのような作用効果か。

(回答) 我々はこれまで、HGF の抗アポトーシスと抗ネクローシスの両細胞保護作用を肝細胞で見出し、他臓器障害モデルでも HGF の臓器保護作用を明らかにした。上記の c-Met ノックアウトマウスの報告も併せ、 $\beta$  細胞へ抗アポトーシス作用が働いたと考察している。

質問 13) T1D モデルマウスであれば多飲多尿や体重減少などの症状が見られると思うが、今回の実験で用いたマウスは T2D モデルに近いのではないのか。

(回答) 過去に多くの研究で、STZ 50 mg/kg の 5 日間連続投与は、経過的に血糖上昇が続くことで T1D を誘発することが示されている。本研究で用いたマウスにも、コントロール群で多飲多尿と体重減少という症状を示したことから、T1D モデルマウスとなる。

質問 14) Ad.CA-HGF 投与量  $3 \times 10^8$  pfu を設定した根拠は何か。

(回答) 近年、様々な疾患に対する遺伝子治療の医薬承認が進んでいるが、最近、海外の臨床試験においてベクターの高用量投与で 3 例の致死性肝障害が報告されたことから、肝障害を引き起こさない、安全かつ効果的な低用量投与を検討した。我々はこれまで、難治性肝疾患への Ad.RSV-HGF  $1 \times 10^{11}$  particles の静脈投与で著明な治療効果と軽度肝障害を確認したので、今回はプロモーター活性が強力な Ad.CA-HGF を使用したことから、まずは半分量で T1D 治療効果を検証した。臨床応用への最適な投与量は、今後、検証・確定していく。

質問 15) STZ 投与で  $\beta$  細胞の組織破壊が進行してから HGF を投与した場合と、今回のように組織破壊の進行前に投与した場合での違いはどのように考えるか。

(回答) 本研究では、STZ 投与で  $\beta$  細胞の破壊が進行する初期の段階において HGF 投与を行い、残存する  $\beta$  細胞の保護作用が示唆された。発症初期の残存  $\beta$  細胞の保護・再生を誘導する有効な治療法である。また STZ による  $\beta$  細胞の破壊が進行してから HGF を投与した場合は、残存  $\beta$  細胞の量で治療効果のレベルに差が出ると推察する。

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。