

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 619 号	学位申請者	松山 崇弘
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	武田 泰生	副査 石塚 賢治
	副査	原 博満	副査 山下 勝

主査および副査の5名は、令和3年7月21日、学位申請者 松山 崇弘 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) パバインを3日間投与するマウスモデルは、確立されたモデルか。

(回答) パバインを3日間投与するモデルは、自然免疫型の好酸球性気道炎症モデルとして確立されている。

質問 2) ICS/LABA は一般の喘息患者に使うが、LAMA は重症の喘息患者に使うという理解でよいか。

(回答) LAMA は中～高用量 ICS/LABA で喘息のコントロールが不良な重症例に上乘せする薬剤として一般的に使用する。

質問 3) 重症の喘息患者では、気道リモデリングが生じていると考えられるが、3日間のパバイン投与で気道リモデリングが組織学的に生じるのか。

(回答) 3日間のパバイン投与によって組織学的に気道リモデリングの1つとして杯細胞増生がみられるが、短期間で気道平滑筋肥大や気道上皮基底膜直下の線維化は認められない。

質問 4) パバインを投与する1時間前にチオトロピウムを投与することは一般的なタイミングか。

(回答) LAMA の気管支拡張作用は比較的早く表れる。パバインや IL-33 などを投与する1時間前に薬剤を添加する方法が既報で散見されており、今回はそれらを基にパバイン投与の1時間前にチオトロピウムを投与した。

質問 5) 他の LAMA とチオトロピウムとの間で臨床効果に違いはあるのか。

(回答) グリコピロニウムはチオトロピウムと同様に喘息増悪抑制効果が示されているが、ウメクリジニウムの喘息抑制効果は検討されていない。薬剤によって効果発現までの時間に違いはあるが、3種類とも呼吸機能や症状の改善効果は認められる。

質問 6) OVA とパバインを投与するモデルもあるが、より病態をわかりやすくするためにパバインのみ投与したのか。

(回答) 自然免疫に焦点を当て、病態をわかりやすくするためにパバインのみ投与した。

質問 7) 骨髄から好塩基球を採取して実験に用いているが、肺由来の好塩基球は使用していないのか。

(回答) 肺由来の好塩基球は、十分量を単離するのが困難であり、骨髄由来の好塩基球を使用した。

質問 8) BALF と肺実質中の ILC2 数と総細胞数の結果が異なるが、その点に関してどのように考察しているか。

(回答) BALF の ILC2 数はチオトロピウム群で有意に減少している。肺実質の ILC2 数はチオトロピウム群で有意差はないものの低下傾向であり、チオトロピウムは BALF、肺実質の ILC2 数を減少させると考えられる。肺実質の総細胞数は細胞懸濁液を作成し、細胞をカウントしている。肺実質の細胞懸濁液には炎症細胞以外に構築細胞も混入しており、そのことが影響していると考えている。

質問 9) BAL を行った後も、マウスは生きているのか。

(回答) マウスを深麻酔下に下行大動脈を切断して放血させた後、BALF と肺を採取した。

質問 10) Introduction では、チオトロピウムは T 細胞に作用して好酸球性気道炎症を抑制していたと記載しているが、チオトロピウムは T 細胞にどのようなメカニズムで作用しているのか。

(回答) 引用した文献では、チオトロピウムは T 細胞上のムスカリン M3 受容体(M3R)に直接作用して、2型サイトカイン産生を抑制すると記載されているが、その詳細なメカニズムについては不明である。

質問 11) Discussion で M3R-KO マウスの OVA モデルで好酸球性気道炎症は抑制されなかったと記載している。今回の研究と M3R-KO マウスの OVA での報告の違いは何か。

(回答) OVA モデルは Th2 細胞を介して気道炎症を誘導する。一方でパバインモデルは、ILC2 を介する抗原非特異的な気道炎症を誘導しており、Th2 細胞にはほとんど影響を与えない。両者で結果が異なるのは、マウスモデルの違いによるものではないかと考えられる。

質問 12) フローサイトメトリーの % of ILC2 や % of Basophil の分母はどの細胞集団か。

(回答) % of ILC2 は CD45.2 陽性リンパ球を、% of Basophil は散乱光の FSC^{low} SSC^{low} の細胞集団を分母とした。

質問 13) Fig.5D・E において、ACh はどこで産生されているのか。

(回答) マクロファージやリンパ球などの炎症細胞も ACh を産生することが報告されており、今回は検証できていないが、好塩基球が ACh を産生していると考えている。

最終試験の結果の要旨

質問 14) Fig.5E について、IL-4 が ILC2 に影響を与えることを証明するにはどのような実験を行えばよいか。

(回答) ILC2 を IL-33 単独と IL-33+IL-4 でそれぞれ刺激した後の細胞培養液を回収し、細胞培養液中の IL-5・IL-13 の変化を調べるという方法がある。

質問 15) PMA/ionomycin で再刺激しても、チオトロピウム投与群で IL-5 と IL-13 のレベルが低下することについて、どのように考えているか。

(回答) 好塩基球由来の IL-4 刺激は STAT6 を介して ILC2 を活性化させる。一方、PMA/ionomycin の刺激は TCR と同じく PKC の活性化と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介する経路を誘導する。PMA/ionomycin と IL-4 からのシグナル伝達はそれぞれ異なる経路をたどるため、PMA/ionomycin の刺激は、チオトロピウム添加によって ILC2 の活性化が制御されても、ILC2 からのサイトカイン産生抑制に影響を与えないと考えられる。

質問 16) 好塩基球は IL-4 の他、IL-13 やヒスタミンも産生するが、チオトロピウムはなぜ IL-4 の産生だけ抑制するのか。

(回答) 今回、IL-3 と IL-33 で好塩基球を刺激している。IL-3 の刺激は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介して IL-4 の産生を、IL-33 の刺激は NF- κ B の活性化や p38 MAPK のリン酸化を介して IL-4・IL-13 の産生を誘導する。チオトロピウムは M3R を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度を低下させることで、IL-4 の産生のみ抑制すると考えられる。また IL-3 や IL-33 の刺激ではヒスタミンをほとんど産生しないと報告されている。

質問 17) 細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、どのような転写因子が関係してサイトカインを産生させるか。

(回答) 細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、カルシニューリンが活性化される。活性化したカルシニューリンによって NFAT(Nuclear factor of activated T cell) は脱リン酸化されて核内へ移行し、IL-4 のプロモーターと結合した結果、IL-4 の産生を誘導する。

質問 18) Neuromedin U (NMU) が ILC2 の活性化に関わっていると報告されているが、NMU はチオトロピウムによる影響を受けるのか。

(回答) NMU は、ムスカリン受容体には作用しないため、チオトロピウムによる影響は受けないと考えられる。

質問 19) マウスの好塩基球はたくさん採取できるのか。

(回答) マウス 5 匹分の骨髓細胞を IL-3 で 10~14 日間培養して、好塩基球を分化・増殖させた。

質問 20) 喘息の病態において、チオトロピウムは気道平滑筋、気道上皮、炎症細胞に作用しているが、これら 3 つの位置づけについてどのように考えているか。

(回答) チオトロピウムは気管支平滑筋の M3R に作用して気管支収縮を抑制する。また、気道上皮や粘膜下腺の M3R に作用して気道分泌物の産生を抑制する。喘息の病態においてそれぞれの細胞への作用はいずれも重要であると考えられる。炎症細胞への作用の位置づけは、今後の知見の蓄積により明らかになると考えられる。

質問 21) 肺細胞懸濁液はどのような方法で採取したのか。1 匹のマウスからどのくらい細胞が採取できるのか。

(回答) 肺をコラゲナーゼと DNase で酵素消化して、細胞懸濁液を採取した。1 匹のマウスの肺から、約 500 万個の細胞が採取される。

質問 22) ヒト好塩基球はどれくらいの量の血液から、どの程度とれるのか。採取した好塩基球はギムザ染色などで確認したのか。

(回答) 被験者から 50cc の血液を採取して、40~60 万個の好塩基球が採取される。採取した好塩基球は Diff-Quik 染色(迅速ギムザ染色)によって、単一細胞であることを確認している。

質問 23) 炎症が誘導される時、ILC2 や好酸球、好塩基球はどのような挙動を呈しているのか。

(回答) ILC2 は血中から組織へ移行する過程を認めず、初めから組織内に留まっていると考えられる。IL-33 などの上皮由来サイトカインによって ILC2 が活性化されると、血中の好塩基球、好酸球の顆粒球が組織内へ遊走・集積して、炎症を誘導する。

質問 24) 「ILC2 が増える」というのは、ILC2 が増殖しているということか。

(回答) 組織内の ILC2 は、IL-33 単独、IL-2 に IL-25 または IL-33 を加えた刺激によって増殖する。

質問 25) IL-4 はどのようなメカニズムで ILC2 を増殖させているのか。

(回答) ILC2 に IL-4 の刺激が入ると、STAT6 を活性化させて、IL-33+IL-2 による ILC2 の増殖をさらに誘導する。

質問 26) Fig.3C において、IL-5 と IL-13 の % of ILC2 とはどのような意味か。

(回答) 細胞内サイトカイン解析での % of ILC2 は、ILC2 内の各サイトカインレベルを相対的に評価したものである。

質問 27) チオトロピウムのようなアンタゴニストは基質で受容体が活性化されたものを抑制している。今回チオトロピウムが ACh による M3R の活性化を抑制しているかを示していないが、M3R 以外の要素は関係していないのか。

(回答) Fig.S2 で、チオトロピウムと同じ LAMA であるグリコピロニウムも好酸球性気道炎症を抑制しており、LAMA が M3R を阻害して、好酸球性気道炎症を抑制していると考えられる。

質問 28) 今回のババインモデルにステロイドを投与すると、サイトカイン産生や ILC2 の数はどうなるのか。

(回答) ババインモデルにステロイドを投与した報告はないが、IL-33 モデルにステロイドを投与すると、ILC2 数や 2 型サイトカイン産生を抑制すると報告されている。

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。