

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 632 号	学位申請者	古別府 裕明	
審査委員	主査	堀内 正久	学位	博士 (医学)
	副査	原 博満	副査	家入 里志
	副査	山口 宗一	副査	中原 真由美

主査および副査の5名は、令和3年12月15日、学位申請者 古別府 裕明君に面接し、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) 虚血時間についてはどのように設定したのか？

(回答) マルマラ地震において圧迫時間の平均が12時間程度であったことから、最長虚血時間を12時間とした。虚血再灌流障害における虚血時間と重症度の相関関係を把握するために、虚血時間を2、4、8時間と設定した。

質問2) 再灌流後比較的短時間で死亡する割合が高いが、マウスにとっての虚血部位の割合が高いからなのか？

(回答) クラッシュシンドロームの重症度は虚血時間や虚血部位の体積に比例すると言われており、今回の実験モデルにおいても、虚血部位(両下肢)の体積の割合が大きかったためと思われる。

質問3) 2回目の特異的抗体を投与するタイミングはどのように設定したのか？

(回答) 生存率を検討した実験から予想される、状態が悪化するであろう時間の1時間前に設定した。

質問4) HMGB1 がアセチル化すると核内に戻れないとあるが、同様のことが Histone にもあるのか？

(回答) Histone は HMGB1 のように核内外を行き来する性質はなく、核内で働くタンパク質である。

質問5) オスのマウスのみ使用したのは意図があるのか？また、このモデルマウスを作成する際に苦労したことは？

(回答) オスにした意図はない。先行研究を参考に、できるだけ安価で簡便にできる方法を検討した。グロメットを使用することとしたが、再現性をもってマウスの両股関節部に装着させる方法を考えるのに難渋した。

質問6) HMGB1 がアセチル化されて細胞外に出てくる際のシグナルについて教えてください。

(回答) 免疫細胞のパターン認識受容体に DAMPs が結合すると、NF- $\kappa$ B が活性化され、INF $\beta$  が産生・分泌される。INF $\beta$  が近隣の免疫細胞のインターフェロン受容体に結合すると JAK キナーゼの活性化および STAT1 のリン酸化を引き起こされ、リン酸化 STAT1 二量体は核に移動し、ヒストンアセチラーゼを動員し、HMGB1 がアセチル化され分泌可能となる。

質問7) 今回の研究結果では Histone が血中で検出されなかった違いは何か？

(回答) 筋肉が他の臓器に比べて虚血に強いこと、また今回の実験モデルが細胞自体に強力な外力が加わるような実験系でなかったことが挙げられる。

質問8) HMGB1 と Histone 以外に、もう一つ重要な DAMPs を挙げるとしたら何があるか？ (回答) ATP。

質問9) 再灌流直後に突然死するような個体はなかったか？虚血中は完全に血流は遮断されているのか？

(回答) 突然死した個体はなかった。再灌流せずとも、血中 CK 値は上昇していることから、完全な遮断には至っていないと思われる。

質問10) 組織所見として、血管内皮障害や血栓の状態を観察したか？ (回答) 観察していない。

質問11) 2時間虚血再灌流群で、アセチル化 HMGB1 値を測定している理由は？

(回答) 長時間の虚血後再灌流すると虚血肢で水分漏出が起こり、サンプリングに難渋するため。

質問12) 再灌流障害を軽減するため、臓器移植の際は灌流している血液を洗い流してから移植するが、骨格筋の

## 最終試験の結果の要旨

場合はどうか？

(回答) 再灌流直後の血液を体循環に戻さないことは、再灌流障害を軽減するのに効果的であると思われる。

質問 1 3) 虚血再灌流障害の治療で抗体療法は実用化しているのか？今後実用化するものなのか？

(回答) 現時点では実用化していない。DAMPs 単体のみを標的とした抗体療法よりはパターン認識受容体をブロックする抗体療法やパターン認識受容体以降のシグナリングを担う物質をブロックする抗体療法が期待される。

質問 1 4) マウス以外の動物で骨格筋再灌流障害のモデルはあるのか？あるとすると、そのモデルでは DAMPs が関与しており、DAMPs を抗体でブロックすると予後が改善するという報告はあるのか？

(回答) ラットでの報告は多数ある。ラットにおける虚血再灌流障害モデルにおいても、HMGB1 が関与しており、HMGB1 やそのパターン認識受容体をブロックすることで、予後が改善するという報告はある。Histone に関しては、検索した限り報告はない。

質問 1 5) HMGB1 はその他の臓器の虚血再灌流障害においても重要な働きがあるのか？

(回答) その他の臓器においても、HMGB1 をブロックすることで予後改善するという報告はある。

質問 1 6) 今回の骨格筋細胞は死んでいるのか？HMGB1 は虚血の時点では骨格筋の細胞外に出ていないのか？

(回答) 骨格筋細胞の多くは死んでいないと思われる。HMGB1 は虚血の時点では出ていないと考えている。

質問 1 7) HMGB1 を細胞外へ放出するメカニズムは？

(回答) 受動的放出の場合は、ネクローシスに加えて、ネクロトーシス、パイロトーシス、フェロトーシス、アポトーシスが関与し、能動的放出の場合はライソソームやエクソソームのエクソサイトーシスが関与する。

質問 1 8) Figure で示している白血球の核には HMGB1 が豊富に存在しているように見えるが、時間が経つとこの細胞についても細胞質に移動し、放出されるのか？

(回答) 核内でアセチル化された HMGB1 の細胞質への輸出は約 6~8 時間かかり、HMGB1 の細胞外への分泌がピークに達するには最大 18 時間かかるとされている。

質問 1 9) 実臨床で抗 HMGB1 抗体を使うとすれば、どのタイミングで使うのが効果的か？

(回答) 再灌流前に使用するのが効果的である。

質問 2 0) クラッシュシンドロームによる死亡に影響を与える因子は何か？

(回答) 虚血時間と虚血された部位の体積、その後の感染が影響する。

質問 2 1) 免疫染色に関して、HMGB1 や Histone H3 の染色性のデータを出しているが、定量的な評価を行ったか？

(回答) 論文中の Additional figure 2 において検討している。

質問 2 2) 抗 HMGB1 抗体が認識しているのは、HMGB1 のどのエピトープか？

(回答) HMGB1 の receptor for advanced glycation end products (RAGE) 結合部位をブロックする抗体であり、その関連領域を認識する抗体と考える。

質問 2 3) 抗体の投与方法として、腹腔内投与した場合の吸収経路は？

(回答) 腹膜下の毛細血管系を介する経路とリンパ管を介した経路が考えられる。

質問 2 4) HMGB1 は組織の修復においては善玉との報告があるが、今回の実験では？

(回答) 適度な量の HMGB1 であれば予後を悪化させることなく、組織修復に有用であるという報告もあるが、今回の実験では、抗体によって生存率が上昇していることから、HMGB1 は悪玉として作用していると考えられる。

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。