

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 644 号	学位申請者	矢野 圭輔
審査委員	主査	垣花 泰之	学位
	副査	大塚 隆生	副査
	副査	新山 修平	副査
			博士 (医学)
			岡本 康裕
			佐々木 文郷

主査および副査の5名は、令和4年1月14日、学位申請者 矢野 圭輔 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) IFALD 発症の危険因子となる胆汁うっ滞が、起こるときと起こらないときの違いはあるのか？例えば残存腸管が短い方が胆汁うっ滞を起こし易いといったことがあるのか？

(回答) 小児における胆汁うっ滞の原因としては、胆汁酸の腸肝循環の未熟性があり、新生児期や乳幼児期などで IFALD に陥るとより胆汁うっ滞を来し易いと考えられ、成人型 IFALD との組織所見の差異に表れている。実際に残存腸管長と回盲弁の有無が胆汁うっ滞の程度に影響を及ぼすという報告がある。

質問2) 本研究のモデルでは、GLP-2 の産生部位である回盲部や上行結腸は温存されているが、内因性の GLP-2 の動態はどのようになるのか？

(回答) 同様な大量腸管切除を行った動物モデルの研究によると、大量腸管切除3日目で内因性の GLP-2 が上昇したのち下降しており、本研究でもポジティブフィードバックのような、同様の血中動態を示すと考えられる。

質問3) GLP-2 の受容体の殆どは消化管に存在し、その腸管が失われている SBS においては高用量の GLP-2 が腸管に対し作用する、というのが加治らの先行研究であった。本研究モデルにおいては腸管に対する先行研究に反し、肝臓に対しては低用量でも効果があつて、高用量では良くなかったのはなぜか。考え得る機序や考察は？

(回答) GLP-2 の腸管順応促進を介した間接的な機序とは別に、肝に対する直接的な作用として炎症の関与が考えられ、TNF α の測定を行った。しかし有意な結果は得られず、炎症に依らない機序が関与している可能性がある。その他の作用としては、本研究モデルにおける高用量と同程度の GLP-2 を投与した他施設の研究を参考に、肝で直接的に脂肪化(de novo lipogenesis)を促進させた可能性が考えられる。これ以上の機序の解明には本研究では至らず、今後の追加実験が必要だと考えている。

質問4) ラットによって残存腸管率に個体差があつた可能性と、それが結果に影響を及ぼした可能性はないか？

(回答) 8週齢の SD ラットの小腸長が 100 cm という文献をもとに 90% 小腸切除モデルを作成したが、実際の腸管長には個体差があつたので、残存腸管率にも個体差が生じた可能性がある。IFALD の程度にも個体差を生じさせた可能性がある。

質問5) 肝臓に対しては HGF のような、肝臓を標的とした生理活性物質の方が効果があるように思われる。また HGF と GLP-2 を合わせて使用する方がより良いようにも思われるが、そういった研究はされているか？

(回答) HGF の投与で GLP-2 の受容体活性が上昇したという報告がありこれらは相互作用を有していると考えられ、併せて使用するとより効果があると予想されるが、未検証である。今後の検討課題のひとつと考えている。

質問6) 腸管に対しては2週間日のみ投与した方が効果的だったという先行研究に反し、本研究で2週間日のみ投与としなかったのはなぜか？また、腸管と共に肝臓も評価された研究はないのか？

(回答) GLP-2 の肝臓に対する投与期間の違いが他文献も含めて未検証であった。まずは全観察期間にあたる2週間の投与とすることで、GLP-2 の腸管に依らない肝臓への効果を検証したいと考えた。ただし、腸管に対する効果を介した間接的な作用を期待するならば2週間日のみ投与した方が良かった可能性がある。なお、腸管とともに肝臓も評価されている研究はこれまでもなかった。

質問7) GLP-2 アナログの治験におけるアウトカムは何だったのか？

(回答) 患児の体重の増加や小腸機能の指標であるシトルリンの数値、便の性状や量がアウトカムとされていた。

質問8) GLP-2 アナログの治験データと照会し、本研究における投与期間や用量は十分なものであったと言えるか？さらに長期間での観察期間を設定した場合、異なった結果が得られた可能性はあるのか？

(回答) 治験では1日1回の皮下投与、本研究では24時間持続の静脈内投与であった。この投与方法や投与期間による違いは未検証であり、今後の検討課題であると考えている。本研究モデルで3~4週間の投与期間とした場合でも異なる結果が得られた可能性はある。しかし3週間以上の絶食 TPN はラットの生存率が著しく低下し、合併症率は増加するなど、管理が難しく検討が困難である。本研究モデルは疾患の慢性経過を反映したモデルとするには改良が必要である。

質問9) 炎症を評価する目的で TNF α を測定しておりターゲットを肝細胞とされているが、TNF α の産生細胞は元々肝細胞ではないのでは、それを踏まえ肝細胞をターゲットとした理由は、TNF α 以外のどのような方法を取れば better か？

(回答) 既報では NAFLD 進行の重要なマーカーとして TNF α が挙げられていたので TNF α に着目した。未発表データではあるが、本研究でも血漿中の TNF α を測定したがいずれの群においても測定感度以下であった。炎症の局在を評価するために、肝細胞を TNF α 測定のターゲットとしたものの、IL-6 や IL-11 など TNF α 以外にも炎症性サイトカインの測定を行う

最終試験の結果の要旨

ことで better な評価ができたのではないかと考えている。

質問10)本研究のような成人型 IFALD のモデルではなく、小児型 IFALD を反映したモデルは存在するのか。

(回答)様々な施設で SBS 関連の動物モデルでの実験は行われており、絶食 TPN 管理で胆汁うっ滞を認めたという報告もあるが、当実験モデルとは動物種や TPN の組成、観察期間など異なっている。当施設においては胆汁うっ滞を来したモデルの作成には至っておらず今後の検討課題であると考えている。

質問11)GLP-2 アナログは DPP4 で不活化されにくい native の GLP-2 は DPP4 で不活化され易いといった違いもあるようである。例えば GLP-2 のアナログと native のものを比べてみる、あるいは DPP4 阻害薬を使用してみるといった研究はされているか。

(回答)SBS モデル動物における DPP4 の腸管に対する効果を検証した報告はみられるが、本研究では GLP-2 アナログと native の違いや DPP4 との関連は検討しておらず今後の検討課題と考えている。

質問12)本研究では動物の表現型に差を認めていないがその理由は何か？

(回答)観察期間が十分でなかった可能性があり、本研究よりも長期間の観察を行うと表現型に違いが出た可能性がある。

質問13)本モデルでの肝臓や腸管における GLP-2 受容体の発現は確認しているのか。

(回答)本研究では GLP-2 受容体の発現は確認していない。消化管に多く肝臓に少ないという他施設での報告をもとに IFALD に対する GLP-2 の作用機序を考察した。

質問14)肝機能を測定するうえで重要な所見である、肝予備能を反映する血液マーカー(ChE や ALB、凝固系、線維化マーカー)を測定していないのはなぜか？また成人型 IFALD を反映している本モデルでは血糖や耐糖能の評価はされていないのか？

(回答)肝予備能を反映する血液マーカー測定、血糖や耐糖能の評価の重要性を認識していなかった。本研究モデルにおいては検討すべき項目であったと考える。観察期間中は眼周囲や鼻腔からの出血、下血など、出血傾向を呈したラットが一定数存在したことからも、凝固系も評価すべきであったと考える。線維化マーカーは、当施設での先行研究で肝線維化の病理所見を呈さなかったため、測定不要と判断した。免疫染色やその他の定量的な評価も行わなかった。

質問15)NAFLD activity score の検討において脂肪化や炎症細胞浸潤は GLP-2 低用量群で改善がみられた一方、ballooning に関しては GLP-2 の用量依存的に悪化がみられているが、これに関する考察や想定される機序はあるのか？

(回答)Ballooning は NAFLD/NASH における慢性的な変化を反映しているものと理解しており、他の所見と乖離が生じているが、残存腸管率などで個体差が出た可能性を考えている。明らかな機序は未検証であった。今後の検討課題とさせていただきたい。

質問16)小腸切除を行わない SD ラットに対する GLP-2 の投与については検討されているか？その投与期間は？NASH 発症には腸管由来のエンドキシンの関与も報告されているが、GLP-2 の用量別のエンドキシンや腸管透過性の差異の評価は行っているか？

(回答)先行研究において小腸切除を伴わない SD ラットに対する 5 日間の GLP-2 投与がなされており腸管順応促進作用があったことを報告しているが、肝障害の評価はしていなかった。腸管由来のエンドキシンについては本研究においては評価していない。今後の検討課題であると考えている。

質問17)統計学的な検討の結果、サンプル数を計算し、研究を開始したか？

(回答)本研究では統計学的な検討のうえサンプル数を算出しなかった。今後は必要であると考えている。

質問18)培養細胞レベルでの GLP-2 の幹細胞への影響の報告はどのようなものがあるか？

(回答)細胞レベルでの GLP-2 への影響については未検討であり、実験モデルの改善や IFALD 機序解明のためにも検討が必要であると考えている。

質問19)GLP-2 アナログの脂肪肝や肝線維化に関連する実臨床のデータはあるのか？

(回答)実臨床でのデータはない。小児においては肝生検など局所的な処置であっても全身麻酔を要し容易ではないといった背景がある。

質問20)SBS モデルにおける残存腸管に対する GLP-2 の効果はどういった方法で評価されているのか？

(回答)残存腸管の粘膜所見や小腸機能を反映する糖輸送蛋白の発現および残存腸管長などで評価されている。

質問21)小腸に対する効果か肝臓に対する効果か、どちらを重視すれば予後が良くなると考えられるか。

(回答)実臨床においては、腸管順応促進も胆汁うっ滞の改善も、いずれも生命予後に寄与するという報告があり、それぞれが同時並行で病態に関与していると考えられる。本研究モデルにおいてはどちらがラットの生命予後に寄与しているかまでの検討には至っていない。

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。