

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 314 号	学位申請者	米満 亨
審査委員	主査	乾 明夫	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	亀山 正樹	副査 橋口 照人
	副査	垣花 泰之	副査 松永 明
<p>主査および副査の5名は、平成26年11月19日申請者 米満 亨君に面接し、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。</p> <p>質問1) 香水のにおいにも気道系の TRPA1 は反応するのか。 (回答) 香水なども化学物質を含んでいるので、濃度にもよるが、刺激の強いものであれば反応すると考える。</p> <p>質問2) TRP は反応が一過性ということだが、長期暴露ではどのような反応をするのか。 (回答) 高濃度酸素やホルムアルデヒドなどに長期暴露されると、暴露量に比例して身体へ障害が出現することを考えると、長期暴露されると反応も継続して起こっていると考ええる。</p> <p>質問3) 今回の実験ではオスのみを使用しているが、メスだと違いがあるか。 (回答) メスには性周期があるので、今回の実験ではオスのみを使用した。性差については検証していない。</p> <p>質問4) なぜ AP18 が鼻腔内で効果があったといえるのか。鼻づまりなどの影響はないのか。 (回答) 鼻腔内投与では鼻づまりによる影響もあったと考える。Vehicle の鼻腔内投与でも忌避行動が抑制されたマウスが観察されたが、AP18 を投与した群は Vehicle 群より有意差をもって忌避行動を抑制することができた。</p> <p>質問5) 痛みとの関連はあるか。 (回答) 本研究は鼻腔内の三叉神経をターゲットにしたが、三叉神経の TRPA1 の入力をブロックすることができれば、三叉神経痛や片頭痛などのトリガーをブロックできるのではないかと考える。</p> <p>質問6) Fig. 1 で KO 群はホルマリン蒸気の部屋への滞在時間がコントロールより短いのはなぜか。 (回答) ホルマリンは刺激性の強い化学物質であり TRPA1 以外にも危険を知らせる受容体があるのではないかと考える。</p> <p>質問7) 気管には TRPV1 も発現しているが、何か関係しているのか。 (回答) 感覚神経 (C 線維) において TRPA1 と TRPV1 は共発現していることが分かっているが、使用したアゴニスト、アンタゴニストは TRPA1 特異性が高いので、本研究では TRPV1 は関わっていないと考える。</p> <p>質問8) 気道・呼吸への影響はあるか。 (回答) 本研究では呼吸数を測定していない。吸入侵害刺激が気道系 TRPA1 を活性化すると、呼吸数を減少して取り込みを抑えようとすると考えられるが、本研究は忌避行動実験であり、積極的な回避行動により呼吸数減少や気道系の炎症はなかったのではないかと考える。</p> <p>質問9) 痛みに対して TRPA1 をブロックすることで、体に影響はないのか。 (回答) 外界からの刺激センサーがなくなることは危険である。鎮痛薬として使うのであれば、全身投与よりも局所投与が安全と考える。</p> <p>質問10) TRPA1 欠損マウスにおいて TRPA1 が特異的に KO されていることを確認したか。 (回答) 生化学 (レセプター結合実験) や組織学 (分布) による確認はしていないが、尻尾から DNA を抽出して</p>			

PCR で遺伝子型の確認を実験に使った全ての個体で行った。

質問 1 1) TRPA1 を活性化する内在性リガンドは何か。

(回答) TRPA1 活性を制御する内在性物質として知られているのは酸素であるが、その作用メカニズムはシステイン残基またはプロリン残基の化学修飾によるものであり、リガンドの定義には当てはまらない。現時点で内在性リガンドは知られていない。

質問 1 2) AP18 の濃度について、足底に投与した濃度より鼻腔内に投与した濃度のほうが高濃度であったが、低濃度では抑制しなかったのか。

(回答) 皮下注射と鼻腔内投与なので比較が難しいが、今回のマウスへの鼻腔内投与は難しく、高濃度の AP18 を投与したが、全てが鼻腔内に作用しているかは不明である。より確実に鼻腔内に投与できれば、低濃度でも効果があったと考える。

質問 1 3) Active behavior とした根拠はなにか。

(回答) 吸入侵害刺激に対する反応において、呼吸数減少を passive として、対比的に忌避行動を active とした。

質問 1 4) TRPA1 の培養系における刺激はどのような細胞応答を起こすのか。

(回答) TRPA1 を刺激すると Ca イオンなどの陽イオンが流入し、細胞が興奮することが分かっているが、その後のシグナル伝達による細胞増殖・分化・死といった細胞応答の制御についてはまだ分かっていないと思われる。

質問 1 5) TRPA1 を活性化すると血管拡張が起こるが、17°C 以下の寒冷刺激においても TRPA1 を介した血管拡張が起こるのか。

(回答) 17°C 以下の冷刺激が TRPA1 を活性化するかについて結論が出ていない。ただ、17°C 以下の寒冷刺激で血管拡張が起こるとは考えにくい。

質問 1 6) 気体の濃度コントロールはどうしたのか。

(回答) 厳密な気体の濃度コントロールはできていない。しかし、ホルマリンを 3 分間蒸発させた後、20 分間の濃度測定を行い、実験中少なくとも 100ppm 以上の濃度であった。表現を 100ppm 以上とすべきであった。

質問 1 7) 忌避行動実験で入口付近からマウスはどうやって戻ったのか。

(回答) 部屋の間の通路は狭く、Uターンできないので、後ずさりして戻った。

質問 1 8) TRPA1 を発現している細胞に特徴はあるのか。

(回答) C 線維に発現していることは分かっているが、細胞の特徴については不明である。

質問 1 9) TRPA1 と TRPV1 は共発現しているが、43°C 以上の熱刺激と 17°C 以下の冷刺激の両方とも感知するのか。

(回答) TRPA1 の冷刺激に関してはまだ結論が出ていないので、今後さらに検討が必要である。

質問 2 0) 吸気刺激によって三叉神経から覚醒を起こす経路はなにか。

(回答) ホルマリン蒸気暴露後の c-Fos の発現を三叉神経主感覚核と脊髄路核でカウントしたが、脊髄路核における痛覚・温度核の伝導路である尾側亜核でのみ c-Fos の発現量増加を認めた。三叉神経から覚醒を起こす経路としては、尾側亜核から視床後内側腹側核へ投射する経路が重要と考える。

質問 2 1) TRPA1 欠損マウスは学習に問題はなかったか。

(回答) マウスの成長や繁殖においても野生型マウスと差はなく、学習も問題ないと考える。

質問 2 2) AP18 の皮下注射の量を増やしたら TRPA1 をブロックできるのか。

(回答) 今回は行動実験を行ったが大量投与だと行動量に影響が出るため断念した。理論的には大量投与するとブロックできると思うが、副作用の心配がある。

質問 2 3) 漢方薬大建中湯は腸管 TRPA1 に作用して血管拡張を起こすことが分かっているが、鼻腔内でも同じことが起こるのか。

(回答) 吸入刺激によって髄膜の血管拡張が起こることは報告されているが、吸入刺激で鼻腔内の血管拡張がおこっているかは不明である。鼻腔内に TRPA1 アゴニストを直接塗布すると血管拡張が起こると考える。

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。