

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 698 号	学位申請者	大久保 葵
審査委員	主査	谷本 昭英	学 位
	副査	原 博満	副査
	副査	井上 博雅	副査
			博士 (医学)
			西尾 善彦
			原口 みさ子

主査および副査の5名は、令和4年9月30日、学位申請者 大久保 葵 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) イミキモドによる乾癬誘発のメカニズムは？ (回答) Toll-like receptor 7 を介して樹状細胞を活性化させ IFN α 、IL-23、IL-6、TNF- α の産生が誘導されることにより乾癬が誘導される。

質問2) $\gamma\delta$ T細胞が乾癬の発症に関わっているが、イミキモドはこの系にどう関与しているか？ (回答) 樹状細胞を活性化させ IFN α 、IL-23、IL-6、TNF- α の産生が誘導されることにより、 $\gamma\delta$ T細胞含む表皮ケラチノサイトが刺激を受け、IL-17 が産生され乾癬が誘導される。

質問3) Th17 はヘルパーT細胞だが、皮膚で何か特異的な抗原を認識しているのか？ (回答) 明らかな認識抗原はなく、現在、研究が進展中である。

質問4) 患者血清で CD147 が発現するメカニズムは？ (回答) CD147 は細胞膜からシェディングして血中に放出される。

質問5) リンパ球が活性化されるとシェディングも亢進するのか？ (回答) 亢進する。

質問6) CD147 を発現している CD4 陰性細胞は、どのような細胞か？ 乾癬の病態形成に関与しているか？ (回答) CD8 陽性細胞と推測するが、今回は CD4 陽性細胞に着目したため、この細胞が病態に関与しているかは検討していない。

質問7) 骨髄キメラ実験でキメリズムが 60% と高くない結果だが、どう評価したか？ (回答) 放射線量を上げたらマウスが死亡し許容できなかったため、今回の 10Gy が妥当と考えた。実験結果も WT 群と比較し有意差が出たため、実験系として許容した。

質問8) ドナーとレシピエントごとに細胞を分けて FCM で解析したか？ (回答) 解析していない。

質問9) キメラ実験の脾臓細胞を用いた解析 (スライド 39) はドナーとレシピエントが mix された細胞での解析か？ (回答) はい、mix されたままの細胞で解析している。この FCM 時は細胞由来を分ける染色をしていない。

質問10) In vitro の実験で、Th17 だけではなく Th1/2 培養下では KO マウスの細胞はどうなるか？ CD14KO で Th17 に特異的なのか？ T細胞全体の活性が低下するのか？ (回答) CD147 はあらゆる細胞膜に発現しているため他のサブセット/T細胞全体に影響するであろうと推測されるが、今回の in vitro 実験では抗 IL-4 抗体、抗 IFN γ 抗体を用いて Th1/2 への分化を抑え、Th17 細胞に分化するよう誘導した。

質問11) CD147KO のナイーブT細胞を CD3/CD28 や IL2 で刺激すると細胞の増殖はみられるのか？ (回答) 増殖能は低下する。

質問12) CD147KO マウスの末梢血や胸腺で T細胞数をみたか？ (回答) CD147KO マウスでは皮膚組織と脾臓細胞のみ使用し、末梢血や胸腺を用いた検討はしていない。

質問13) CD147 の発現調節は解明されているのか？ CD147 が増加する因子や遺伝的に CD147 が増加することで乾癬を発症しやすいなどあるのか？ (回答) CD147 発現の増強因子などの解明までは行っていないが、アトピー性皮膚炎 (Th2 疾患) で CD147 発現が上昇しているという報告もあるので、やはり T細胞活性化により CD147 は発現しやすい。また、肥満が乾癬の悪化因子であるが、肥満が CD147 発現に影響するかなど検討の余地がある。

質問14) 乾癬は栄養過多な人に発症しやすいとのことだが、自然免疫の強さと関係があるのか？ (回答) 尋常性乾癬はトリガーとして自然免疫を担う細胞から産生される INF- α や IFN- γ などが関与しており、膿疱性乾癬ではこれらに加えて、好中球、T細胞、樹状細胞、単球などの自然免疫系の細胞を活性化させる IL-36 がより強く病態形成に関与していることが示唆されていることから、乾癬の発症に自然免疫の強さが影響する可能性がある。

質問15) イミキモドは尖圭コンジローマの治療薬とのことだが、ウイルスと乾癬へのかかりやすさは関係するか？ (回答) 乾癬の発症と感染性の相関を示した報告はない。

質問16) CD147 が MCT1 と相互作用するとのことだが、解糖系を介しているという根拠は？ (回答) CD147 ノックアウトマウスの血清や細胞培養液などを用いて乳酸を測定するなど、今後の課題としていきたい。

質問17) イミキモド外用マウスで CD147 発現量が上昇していたが、CD147 発現の調節因子があるのか？ (回答) イミキモドが乾癬を誘導するメカニズムは IFN α 、IL-23、IL-6、TNF- α の産生が誘導されることにより Th17 細胞分化が促進され乾癬が誘導されるが、イミキモド外用により CD147 が上昇して Th17 細胞分化が促進される可能性が考えられる。

最終試験の結果の要旨

質問 18) MCT1 と MCT4 のすみわけはあるか? (回答) MCT1 は細胞膜上で乳酸を取り込む段階、MCT4 は乳酸の細胞外への輸送に関与する。今回の研究では ROR γ t 細胞上における MCT1 と CD147 発現の相関は見られたが、MCT4 と CD147 の相関はなかった。

質問 19) Figure 4g の解釈は? (回答) CD4 陽性 T 細胞の数が CD147 ノックアウトマウスで減少し IL17 細胞の割合は変わらないという結果により CD147 ノックアウトマウスでは IL17 細胞数は減ったことを示している。

質問 20) IL-17 産生細胞をみる意義は? (回答) IL-17a の主となる産生細胞が $\gamma\delta$ Th17 細胞であるため、レビューアから IL17 産生細胞を解析するよう求められた。なお、我々は Th17 細胞への分化のマーカーとしては ROR γ t を用いた。

質問 21) CD147 ノックアウトマウスは全ての機能が抑制されているのか? 多彩な機能をもつ CD147 の機能を抑制するとどんな障害があるのか? (回答) 全体の機能が抑制されている。着床障害・精子形成不全・雌性不妊・嗅覚障害・空間・位置記憶の障害・視力障害が報告されている。視覚障害に関しては、網膜の形態に異常はないが、網膜にある細胞膜上で CD147 の発現がないと輸送蛋白である MCT が細胞膜上に発現できないため乳酸がグリウ細胞から光受容体細胞に輸送されず視覚機能に異常が生じる機序が報告されている。

質問 22) PASI スコアはあいまいな要素で評価されているが、スタンダードはどのように決めたか? (回答) PASI は 4 段階でスコアリングされる。確かに評価者の主観的要素が入る余地が否定できないが臨床試験等でも容認されている、今回は 3 人の皮膚科医で評価した。いずれも同様の傾向が見られ、平均したものをを用いて統計学的に評価した。

質問 23) AP-9 外用実験ではイミキモドと外用開始時期は同時か? 後塗りではなく、同時にしたのはなぜか? (回答) 我々は、CD147 が CD4 陽性 T 細胞から Th17 細胞へ分化するという初期の段階に関与していると考えたため、イミキモド外用し乾癬様皮膚炎が完成された後ではなく初日から外用することで、CD147 inhibitor の効果が発揮できると考えた。

質問 24) 免疫細胞を研究対象としたマウスモデルで脾臓を使ったリンパ球解析をしているが、皮膚で起きた病態と同じように脾臓細胞も反映しているのか? (回答) 脾臓を使った解析は Th17 への分化抑制が全身的な現象であることを評価するために提示した。皮膚炎の発症時には脾臓の腫大がみられ、CD147 ノックアウトマウスにイミキモド外用後も脾臓腫大は見られなかったため、皮膚の病態を反映していると考えた。

質問 25) イミキモド外用時、マウスの毛はどう扱うのか? (回答) 背部の毛を電気シェーバーで剃毛したあとに、脱毛クリームを用いて除毛を行う。

質問 26) 除毛クリームによる影響はあるのか? (回答) 影響は全くないわけではないかもしれないが、コントロール群の組織学的評価では炎症反応はみられないため、実験には影響していないと考えた。

質問 27) 乾癬患者の血清中 CD147 は乾癬患者の重症度や皮膚病変の範囲と関連はあったか? (回答) 今回の我々の研究では有意な相関はなかったが、PASI スコアが高いと CD147 値も高い傾向にはあった。我々の共同研究者が 2010 年に PASI スコアと血清 CD147 値に有意な相関がみられたことを報告している。

質問 28) 健常者や正常部と比較して皮膚の病変部の CD147 蛋白量が増加していることを Western blotting などで確認したか? (回答) 検討していない。

質問 29) MCT-1 と MCT-4 の生理的な作用の違いは何か? (回答) MCT は腫瘍細胞などの細胞膜上で CD147 と複合体を形成し乳酸の取り込みを行うが、MCT-1 は乳酸を取り込むときに関与、MCT-4 は細胞外への輸送に関与しているとされている。

質問 30) 今回の交配法とコンジェニック化との違い、利点・欠点は? (回答) コンジェニック化は C57BL/6J 系統などに戻し交配を行い、遺伝的背景が均一になる。我々が用いた CD147 ノックアウトマウスは着床障害がありノックアウトマウスが生まれる可能性がかなり低いいためコンジェニック化では十分な n 数を得るために数年以上時間を要する。

質問 31) 乾癬以外の皮膚疾患や Th17 依存性の他のマウスモデルにおいても CD147 が解糖系を制御して病態に関わるのか? (回答) 背景でお示したように CD147 は多彩な機能を有しており、Th17 依存性の疾患に限らず T 細胞が関与する疾患に関与していると考えている。

質問 32) CD147 アンタゴニストを臨床応用する場合に起こりえる有害事象は? MCT-1 阻害薬を併用した場合効果や有害事象はどう変化するか? (回答) CD147 は多彩な体細胞に発現しているためノックアウトマウスで示されている不妊・空間・位置記憶の障害・視力障害といった様々な有害事象が起こり得る。病巣部への選択的なドラッグデリバリーを検討する必要がある。MCT-1 と併用することで、全く複合体が形成されなくなるため、inhibitor の効果としてはより強固なものになると推測される。

質問 33) T 細胞 (CD4 陽性) だけ CD147 をノックアウトする方法は? (回答) ①コンディショナルノックアウトマウスの使用。CD4-Cre 発現マウスと、CD147 を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxp で挟んで作成した flox マウスをかけあわせることで作成。②CD4 をノックアウトし、CD4 陽性 T 細胞を欠損させたマウスに、CD147 ノックアウトマウスから単離した CD4 陽性 T 細胞を移植する。

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。