

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 681 号	学位申請者	山城 康太
審査委員	主査	中村 典史	学位 博士(歯学)
	副査	佐藤 友昭	副査 田中 達朗
	副査	西 恭宏	副査 石畑 清秀

主査および副査の5名は、令和4年12月26日、学位申請者 山城 康太 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) 症例の選択にあたり、従来のシェーグレン症候群診断基準を満たしている人であったか。

(回答) 海外の分類基準も使用し、合計4つの基準のうち、2つ以上を満たしている方を選んでいる。

質問2) シェーグレン症候群の対症療法でM3Rアゴニスト薬とはどういったものか。

(回答) M3ムスカリン作動性アセチルコリン受容体作動薬であり、塩酸セビメリンや塩酸ピロカルピンがある。細胞の小胞体に働き、カルシウムイオンを放出させ、細胞膜に働き水を産生させる作用がある。

質問3) 対象の中で、今回の結果に影響しそうな基礎疾患を持った患者はいたか、またどの程度除外したか。

(回答) コントロール群は口腔乾燥症状や粘膜疾患がない、自己免疫疾患、糖尿病、甲状腺疾患、炎症性疾患、代謝性疾患を有していないことを基準にしているが、服用薬剤については除外できていない。

質問4) サンプルの採取方法で、サンプルの回収量に差はないか。再現性は安定しているのか。

(回答) うがい液を採取する際の液体は10mlであり、その中のエクソソームからマイクロRNAを抽出し解析している。採取時に多少こぼれる事はあるが、定量PCR解析にかけるRNA量は全例揃えて解析している。

質問5) うがい液を検体としているが、なぜ今まで「うがい液」に着目されていなかったのか？また、1分間の含嗽時間はどのように決定したか？

(回答) 過去の研究をみると、唾液を採取しようとしても唾液がとれないということがあり、うがい液ならば唾液を含めた検体採取ができるのではないかとこの考えに至った。採取時はリラックスした姿勢で行っており、1分間の含嗽が苦であるという意見はなかった。1分間という時間には、まだエビデンスはない。

質問6) うがい液からエクソソームを抽出して検査しているが、これにこだわる理由はあるか。頬粘膜などを擦過する方法は検証しているか。乾燥が強いひとは頬粘膜をぬぐったりすると痛いものなのか。

(回答) うがいと擦過でのRNA量や解析の違いは検証していないが、採取の簡便さや安全性ではうがい液が優れていると考えている。口腔乾燥があると、粘膜の擦過は疼痛誘発や出血のリスクがある。

質問7) うがい液では、唾液腺の壊れた細胞からできたエクソソーム内のマイクロRNAを拾うことを目的としているか？口腔粘膜細胞や口腔細菌由来のマイクロRNAが影響することはないか。

(回答) 口腔粘膜由来エクソソームはうがい液に含まれる可能性はあるが、細菌由来エクソソームは遺伝子配列が根本的に違うので検出されない。超遠心でエクソソームを分離することにより細胞や細菌自体も除去されている。

質問8) 解析をマイクロRNAにした理由はあるか。また、こだわった点はあるか。

(回答) 先行研究でやってきたメソッドがあるので、シェーグレン症候群でも使用した。こだわった点は、エクソソーム内のマイクロRNAが安定している報告があるため、このような手法にした。

最終試験の結果の要旨

質問 9) マイクロ RNA を選択していく過程で、プールサンプルを作成し比較されていたが、この手法はどのように行ったのか、また一般的に行われているのか。

(回答) 候補マイクロ RNA を絞り込む目的で、両群 10 例ずつの検体をプールし、マイクロアレイで比較をしている。絞り込む方法としては一般的に使われており、金銭的な問題もあり、今回この手法を使用した。

質問 10) リアルタイム PCR で候補マイクロ RNA を定量しているが、実験プロトコルでは $\Delta\Delta CT$ 法を使っている。これは PCR 増幅効率が同等であるということが前提であるが、その検証はどうしているか。

(回答) 指数関数的領域の増幅曲線の傾きから、PCR 増幅効率を算出してほぼ同等であることを確認している。全例で、希釈サンプルを作製しての検証は行っていない。

質問 11) AUC や陰性的中率、陽性的中率はどのように算出したのか。AUC を出した後にクロス解析をするのか？

(回答) ROC 曲線からカットオフ値を求めて診断指標にした。その診断指標にあてはまる、あてはまらないものを表に集計し、感度や特異度、的中率を算出しフィッシャー検定を行っている。

質問 12) マイクロアレイで差があっても PCR で差がないマイクロ RNA があつたが、これについてはどう考えるか。

(回答) プールサンプルのマイクロアレイ時点でのコンタミ等が原因ではないかと考えている。

質問 13) マイクロ RNA は抑制的に働くものであるが、今回の結果では疾患群で増えており、直接に関与するのであれば、促進になってしまうのではないか？

(回答) 細胞のアポトーシスなどを抑制しているものを抑制している可能性を考えている。

質問 14) 既存報告と比較し、今回のマイクロ RNA はスクリーニング目的なのか、確定診断目的なのか？

(回答) 感度特異度の結果から、抗 SS-A、SS-B 抗体には及ばないが、スクリーニングに適していると考えている。

質問 15) 今回のマイクロ RNA とサイトカインの関係性は何か報告があるか。

(回答) 今のところないが、let7b-5p についてはシェーグレン症候群関連遺伝子や抗 SS-A 抗体・抗 SS-B 抗体などと関連があると報告されている。miR-1290 も、シェーグレン症候群関連遺伝子と関連していると報告がある。

質問 16) 単一マイクロ RNA で有意差があつた 3 つは、Index で 2 つになっているが、どのように絞つたか。

(回答) 様々な組み合わせでの解析や多変量解析を経て、特に影響の強い 2 つのマイクロ RNA が選ばれた。

質問 17) Index はどのように計算するのか？陽性、陰性にかかわらず発現量を代入するのか。

(回答) 疾患に関わらず、マイクロ RNA の相対発現量を代入し計算する。カットオフ値は 0.43 に設定している。

質問 18) 今回の結果とリウマチはどのように関与していると予想されるのか。また、今回の疾患群の中にリウマチ患者は含まれているのか。

(回答) シェーグレン症候群は 1 次性の患者のみを対象としており、リウマチ等は含んでいない。リウマチとの関連については既存の報告があり、miR34a-5p はリウマチ患者の関節滑液中で上昇していたとのことであった。

質問 19) 今回は 24 例に限っての結果であつたが、感度、特異度からも診断の有用性はあると思われる。今後の展望として、別の患者群にどういった形で応用しようと考えているか。

(回答) 罹患率を考えると、コントロール群を増やしての検討、シェーグレン症候群の診断を得ていない口腔乾燥症の人を対象とした比較検討、を今後していくべきであると考えている。

質問 20) Limitation に「うがい液、唾液、唾液腺組織の相関関係は不明」とあるが、どういうことか。

(回答) 今回の研究では、破壊された唾液腺細胞から出たマイクロ RNA が唾液を経て口腔内に分泌されており、その唾液をうがい液で採取している想定である。それぞれの相関を、今後検証する必要がある。

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 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。