

学力確認の結果の要旨

報告番号	総論第 48 号	学位申請者	中條 正英
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学)
	副査	下堂 蘭 恵	副査 高嶋 博
	副査	田川 義晃	副査 谷本 昭英
<p>主査および副査の5名は、令和5年10月31日、学位申請者 中條 正英 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) 脊髄損傷モデルマウスを 12 週にわたって長く生存させるためにどのような工夫をしたのか。 (回答) 脊髄損傷後よりしばらくは体温が低下しないように保温プレートを用いて体温管理を行い、直後から起こる膀胱直腸障害に関して数日間は徒手の排尿を行うことで対応した。</p>			
<p>質問 2) 今回の脊髄損傷モデルマウスでは排尿障害は長く続くものではないのか。 (回答) 急性期は必発であり、その後は排尿障害が続くマウスと自尿が得られるマウスに分かれ個体差が生じていた。</p>			
<p>質問 3) BMS スコアが安定しているが、70 キログラムの方で作成される脊髄損傷モデルは標準化された方法なのか。 (回答) 先行論文があり、この方法は標準化された方法である。</p>			
<p>質問 4) リハビリに関して、飼育環境で対応したことがあるか。 (回答) 今回リハビリに関して特別な介入は行っていない。</p>			
<p>質問 5) 今回の薬物療法に加え、リハビリとの併用でさらに機能が回復する可能性はあるか。 (回答) 過去の報告で、リハビリを併用することにより機能の回復が促進されたという報告がある。</p>			
<p>質問 6) その他の免疫抑制剤と比べて、HMGB1 が特に注目されている理由はあるか。 脊髄損傷の分野では、ステロイドが臨床で使用されているが、糖尿病や感染、消化性潰瘍などのリスクがある。HMGB1 に関しては、それらの副作用を考慮しない点が理由の一つと考える。</p>			
<p>質問 7) 作用というより、副作用が少ないという点で抗 HMGB1 抗体が勧められるということか。 (回答) 副作用が少ないという点と、血液脊髄関門の破綻を直接的に抑制している点が勧められる点である。</p>			
<p>質問 8) HMGB1 は、細胞の浸潤やサイトカインの誘導に関して中核となっているものであるか。 (回答) 組織障害の最初のトリガーとして作用するものと考えている。</p>			
<p>質問 9) 交通外傷等で脊髄損傷となった場合、現時点ではどのような治療になるのか。 (回答) 麻痺の程度や画像所見等により、可及的速やかに外科的治療を行うか待機的に行うか状況に応じて異なる。</p>			
<p>質問 10) 脊髄圧挫傷モデルで研究を行っているが、臨床ではどのような受傷形態が多いか。 (回答) 臨床においても圧挫傷のような受傷形態をとるケースが多いと考えている。</p>			
<p>質問 11) 脊髄損傷の治療では、錐体路と網様体脊髄路どちらが重要であると考えているか。 (回答) これまでの脊髄損傷の研究では錐体路の再編を中心とした研究が多く、錐体路が重要であると考えている。</p>			
<p>質問 12) Figure2-A, B で Sham ほどの改善はないが、Sham の BMS スコアはどのくらいであるか。 (回答) Sham に関しては、BMS スコア 9 点であり、通常のマウスの下肢機能に近い。</p>			
<p>質問 13) Sham ほどには血液脊髄関門の透過性の程度や浮腫は改善されていないということでしょうか。 (回答) Sham ほどの改善は得られなかった。</p>			

学力確認の結果の要旨

質問 14) Figure 2-C, D において細胞死を起こしている細胞は神経細胞ということでしょうか。

(回答) 神経細胞と考えているが、特異的に染色をしていないため断言はできない。

質問 15) 脊髄損傷の時系列において、血液脊髄関門の破壊から炎症や血管新生が起こる間のミクログリアに関して評価しているか。ミクログリアの浸潤を抑えているととらえてよいのか。

(回答) 今回ミクログリアの評価は行っていない。推測ではあるが、HMGB1 の中和により間接的にミクログリアの浸潤も抑制したと考えている。

質問 16) 形態の評価として HE 染色が大事であるが、今回 HE 染色による評価はしているか。

(回答) HE 染色も行うべきであったが今回は、HE 染色は行っていない。蛍光 2 重免疫染色で評価した。

質問 17) HMGB1 は病変のどこに局在し、どの細胞から発生したと考えるか。抗体染色で HMGB1 の確認はできたか。

(回答) HMGB1 は通常核内に存在し、組織の損傷を契機に細胞外へ放出される。発生した細胞は、一次損傷で死滅した細胞や付随して出現した免疫細胞から発生したと考えている。損傷の無い細胞の核内の染色は可能であったが、挫滅した組織においての染色は困難であった。また、核外に放出されたあと短時間で消失すると思われ、放出された HMGB1 を免疫染色で捉えることは困難であった。

質問 18) MMP の評価は PCR だけでなく活性測定はしたか。

(回答) 今回は PCR での評価のみ行った。

質問 19) 本邦での脊髄損傷の受傷原因が、21~25 歳と 56~60 歳の 2 峰性のピークとなっているがそれぞれの主な受傷原因はなにか。好発部位は頸部か。

(回答) 21~25 歳に関しては、スポーツ外傷や交通事故、高所からの転落が挙げられ、56~60 歳に関しては平地での転倒や低所からの転落、交通事故が挙げられる。好発部位は下位頸椎が多い。

質問 20) HMGB1 が血液脳関門に働く詳細な機序は分かっているか。

(回答) 詳細な機序は分かっていないが、HMGB1 が血管内皮細胞や周皮細胞に働き収縮性の反応を惹起することで透過性が亢進するとの報告がある。

質問 21) 使用した抗 HMGB1 抗体は中和抗体なのか。抗体の投与濃度はどのように決定したか。

(回答) 抗 HMGB1 モノクローナル抗体であり、細胞外に放出された HMGB1 分子と結合し中和するものと考えている。投与濃度は、先行論文に準じて決定した。

質問 22) Figure 1 においてマウスは n=5 で実験されているが、BMS のスコアが長期にわたってばらつきが少ないのは下肢機能変化があまりなかったということか。

(回答) 最初の 4 週で下肢機能の回復は落ち着き、その後は下肢機能の大きな変化が起きなかったためと考えている。

質問 23) 神経細胞に TLR2/TLR4 の受容体の発現はあるか。HMGB1 は神経細胞に対して直接作用した場合どのように作用すると考えるか。

(回答) 本研究では、マクロファージやミクログリアなどの免疫系細胞に受容体が発現し、障害された神経細胞が細胞死に陥って HMGB1 が放出され受容体に作用することで更なる炎症や神経障害を惹起すると考える。神経細胞の受容体が発現の有無や HMGB1 が直接作用した場合にどのように作用するか定かでない。マウス膝炎モデルにおいて感覚神経に RAGE や CXCR4 が発現し、マクロファージ由来の HMGB1 が作用し腹部痛覚過敏を引き起こすという報告がある。

質問 24) Figure 3-C で IL-1b だけが上昇しているのはなぜか。

(回答) IL-1b も抑制されると考えていたが、予想に反して上昇していた。この結果に関する解釈は困難であった。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。