

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 278 号		学位申請者	宮原 恵 弥 子
審査委員	主 査	宮田 篤郎	学 位	博士 (医学)
	副 査	松山 隆美) 副 査	秋葉 澄泊
	副 査	吉満 誠	副 査	青山 公治

主査および副査の5名は、平成26年2月19日、学位申請者 宮原 恵弥子 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) ベンゼンにより誘発される白血病にはどのようなタイプが多いか。また染色体異常について、ベンゼン発がんの特異的な異常など何か報告はあるのか。

回答) 急性リンパ性白血病や慢性骨髄性白血病より急性骨髄性白血病が多く、中でも FAB 分類で M3、M4 が多いと報告されている。ベンゼン発がんの特異的な染色体異常等は分かっていない。

質問2) 今回の報告は、ベンゼンによる細胞の白血化というよりは、ベンゼンによる再生不良性貧血の報告という印象があるが、それについて何か考えはあるか。

回答) ご指摘のように、アポトーシスの誘導をみているので再生不良性貧血のモデルと考えられる。一方、私たちは、BT によるハロゲン化 DNA 損傷の誘導を過去において報告している。BT によって、アポトーシスが生じれば、再生不良性貧血となり、アポトーシスに繋がらなければ、発がんへと向かうと思われる。従って、本実験系は発がん (細胞の白血化) のモデルでもあると考えている。

質問3) ABAH による MPO 阻害の機序は。

回答) ABAH のベンゼン環の置換基の電子供与能が高く MPO の過酸化能を不可逆的に阻害する。

質問4) MPO の siRNA 処理によって、どの程度 MPO がノックダウンされたのか。

回答) 今回はウエスタンブロット等によるノックダウンの程度の確認は行っていない。今後確認したいと考えている。

質問5) Z score を用いた意義は何か。

回答) 例えば2から4への変化と2000から4000への変化では、変化割合は2倍だが、変化量は異なる。この点を考慮した Z score を用い、結果の評価を行った。

質問6) 発現変動があった遺伝子の中で、細胞周期遺伝子は論文中には書かれているが、Table 中には示されていない。Table にある他の遺伝子と比べ発現変動はどの程度だったのか。

回答) Table には有意な発現変動遺伝子の上位 10 位までしか載せていない。実際は上位 20 位まで調べており、細胞周期遺伝子はその中に含まれていた。

質問7) BT によりアポトーシスが誘導されると、白血病にはならないのではないか。

回答) アポトーシスが誘導されると再生不良性貧血類似の血球減少が表現系として表れてくると考えている。しかし抗アポトーシスへ誘導されるとハロゲン化損傷 DNA を持つ細胞が残る確率は上がり、それが白血病など発がんへ誘導されるのではないかと考えている。

質問8) ABAH により完全にアポトーシスが抑えられているわけではないので、ベンゼン発がんには MPO 以外の要因もあるのではないか。

回答) その可能性はあると考えているが、マイクロアレイでは MPO を阻害するだけで遺伝子発現が大きく変化していた。このことから、MPO が主な毒性発現関与分子であると考えている。

質問 9) 24 時間の ABAH 処理の間に細胞はコンフルエントになっていないか。また細胞周期をそろえているのか、そろえなくてもよいのか。

回答) HL-60 細胞は浮遊系の細胞であり、BT 曝露前に一度細胞数をそろえている。しかし今回の実験では細胞周期まではそろえていない。今後検討したいと考えている。

質問 10) mRNA は BT 曝露後 4 時間処理の細胞から抽出しているが、暴露時間は適切か。

回答) BT によるアポトーシスの誘導は曝露 4 時間後で生じていた。遺伝子発現変化はそれよりも前に起こるのであると考え、この時間で mRNA を抽出した。

質問 11) ベンゼンは肝臓で代謝されるとのことだったが、どの段階で BT になるのか。肝臓以外で代謝を受ける事はあるのか。また、どのように骨髄で毒性が発揮されるのか。

回答) ベンゼンは薬物代謝酵素である CYP2E1 で代謝後、自動酸化により様々な代謝物へと変化する。BT がどこで生じるかは、不明な点が多い。また BT は血液により全身に運ばれると思われるが、骨髄で MPO が特異的に発現しているため、骨髄において毒性が強くと考えられるのではと考えている。

質問 12) 動物実験ではベンゼンにより白血病が誘発されるという報告はないが、ヒトと動物ではベンゼンに対する応答が異なるのか。

回答) ベンゼン曝露により血球減少が起こることに関しては共通しているが、がんが生じる臓器については骨髄ではなく肺など他の器官であるとの報告がある。

質問 13) BT と ABAH を曝露する順序を逆にするとどうなるのか。

回答) BT を曝露することで活性酸素が生じ、DNA 損傷が起こると考えられる。従って、その後 ABAH を加えてもその効果は不十分になるのではないかと考える。

質問 14) 大気中のベンゼン濃度について、対策はとられているのか。ベンゼンに曝露する機会はあるのか。

回答) 日本ではベンゼンの排出規制があるため、工場から高濃度のベンゼンが排出される事はない。しかし、交通量が多い場所では、車の排気ガス由来のベンゼンによって、一時的にベンゼン濃度が高くなることもあるかもしれない。

質問 15) BT によるアポトーシスの誘導は DNA のハロゲン化によるものか。

回答) BT によるアポトーシスの誘導は DNA のハロゲン化によるものと考えている。

質問 16) siRNA で MPO を阻害した実験は何回行ったのか。そのいずれにおいても HL-60 の BT によるアポトーシスは抑制されているのか。

回答) 6 回実験を行い、いずれも BT によるアポトーシスの誘導は同程度抑制された。

質問 17) U937 に HOCl を加える実験は行っているか。

回答) 今回の実験ではまだ行っていないが、今後検討したいと考えている。

質問 18) 骨髄細胞の分化過程と BT 毒性の関係は、どのようなものと考えているか。

回答) 分化により MPO の発現が減少すると思われるので、BT の影響が少なくなると予想される。

質問 19) ベンゼンから BT への代謝は、動物種により異なるのか。In vivo で実験したらどうなるのか。

回答) 異なると報告されている。In vivo での実験は今後検討したい。

質問 20) BT 曝露 1 時間後と 4 時間後で発現変動遺伝子の種類に変化はなかったか、変動幅はどうだったか。

回答) 変動遺伝子の種類に大きな違いは見られなかった。また、4 時間後の方が遺伝子発現変動の幅が大きかった。

質問 21) ABAH は一般的にどのように使用されているのか。

回答) in vitro や in vivo での実験には用いられているが臨床応用はされていない。

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・識見を十分に具備しているものと結論し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。