

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 248 号		学位申請者	屋 万栄
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	松山 隆美	副査	小賤 健一郎
	副査	松藤 凡	副査	東 美智代

主査および副査の 5 名は、平成 25 年 3 月 25 日、学位申請者 屋 万栄 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) クラウン系ミニプタの MHC は MGH ミニプタと同様に a、c、d などの組み合わせがあるのか。

(回答) クラウン系ミニプタで、組合せたミニプタの作成は可能であるが、実際には作られていない。

質問 2) FK506 単独投与群 6 例のうち急性拒絶により腎死しなかった 2 例と、腎死した 4 例と異なる点は何か。

(回答) 急性拒絶時に腎死しなかった 2 例は血清中の抗ドナー IgG 抗体が低値であったが、その意義は不明である。

質問 3) 何歳のミニプタを使用していたのか。免疫的に成熟しているミニプタか。

(回答) 3 ヶ月以上 12 ヶ月未満の、免疫学的にも成熟しているミニプタを使用した。

質問 4) HGF はドナーの腎に直接作用しているのか、あるいは宿主に作用しているのか。

(回答) 宿主の末梢血中制御性 T 細胞 (Treg) が維持されていたことから、HGF は宿主の抗原提示細胞を介する間接経路に作用していると考えられる。

質問 5) 肝臓移植時に HGF を使用している報告があるか。

回答) 小動物での肝臓移植に HGF の肝再生促進作用を期待して使用した報告があるが、免疫反応抑制作用に関してはほとんど報告がない。

質問 6) クラウン系ミニプタの C1、C2 の違いは、遺伝子レベルなのか、蛋白質レベルなのか。

(回答) 遺伝子レベルの違いは確認されており、蛋白レベルでも異なっていると考えられる。

質問 7) MGH ミニプタでは FK506 単独投与により免疫寛容が誘導され、クラウン系では誘導されないことを MLR、CML の反応から予測できないか。

(回答) MGH とクラウン系では MLR、CML 測定に用いた試薬が異なっているため、比較できなかった。

質問 8) HGF が直接的に Treg を維持したのか、急性拒絶を抑えた結果として Treg が維持されたのか。

(回答) *In vitro* で HGF によりナイーブ T 細胞が抗原依存性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 細胞に誘導された報告があるので、HGF が Treg の維持に関与していると考えているが、急性拒絶が抑制された結果 Treg が維持された可能性もある。

質問 9) cMet はリンパ球や単球にも発現しているのか。

(回答) 樹状細胞や単球、マクロファージに発現しているが、リンパ球には発現していない。

質問 10) 拒絶時の cMet 発現細胞の局在はどうか。

(回答) FK506 単独群拒絶時には、蛍光抗体法により糸球体、間質内浸潤細胞 (単球)、毛細血管に認められた。

質問 11) Treg は感染免疫を抑制するが、感染で死亡した例で病理組織学的に Treg の増加はなかったか。

(回答) Treg である CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺陽性細胞数は変化しなかった

質問 12) HGF の拒絶反応抑制作用は HGF の免疫系への作用か、HGF の抗アポトーシスや線維化抑制と関連したものか。

(回答) HGF は種々の生理作用を有するが、今回の実験では急性拒絶反応時に Treg を維持したことから、免疫系に対する免疫寛容誘導によるものと考えている。

質問 13) 小動物で免疫抑制剤と HGF を用いて拒絶への影響を検討した報告はないか。

(回答) マウスの心臓移植で FK506 と HGF を使用し、生存を延長した報告がある。

質問 14) 今回の実験では副作用はなかったか。

(回答) HGF 0.03mg/kg/日持続投与実験では、これまで知られているように蛋白尿が出現した。

質問 15) cMet のチロシンリン酸化はどうであったか。

(回答) Western blotting 法で確認を試みたが、用いた抗体の特異性の問題のためか確認できなかった。

質問 16) HGF の投与量はどのような根拠で決定したのか。

(回答) これまでの我々のミニプタを用いた実験から、HGF の血中濃度が 1ng/mL 程度になる投与量として 0.015mg/kg/day に設定した。

質問 17) 拒絶反応は腎組織の部位により違いが見られたか。

(回答) 腎臓が全体的に浮腫状であり、皮質に点状の出血がみられたが、それ以外に違いはなかった。

質問 18) HGF が急性期拒絶反応を抑制したミニプタの、最終的に犠牲死させた時の腎組織はどうだったか。

(回答) 術後 30 日目では軽度の急性糸球体炎がみられたが、犠牲死させた時には尿細管炎、間質の線維化がみられ、細胞性免疫の変化が確認された。

質問 19) HGF は急性拒絶を抑制したのか、それとも単に時期をずらしただけなのか。

(回答) HGF 投与群では細胞性免疫反応が確認できたが、液性免疫反応は確認できなかった。通常の急性拒絶反応では液性免疫反応が確認できるため、単に時期を遅らせたのではないと考えられる。

質問 20) 拒絶反応による腎障害とタクロリムスなどの免疫抑制薬による腎障害は組織学的に鑑別できるか。

(回答) タクロリムスによる腎障害は尿細管の空胞変性や細小動脈の硝子化を認め、拒絶では糸球体炎や尿細管炎が起こるので、鑑別可能である。

質問 21) HGF が投与終了後も長期にわたって拒絶反応を抑制している機序はなにか、Treg の抑制が関与するのか。

(回答) そのように考えているが、詳細は、現時点では不明である。

質問 22) 急性拒絶反応時期をすぎた、HGF を投与していない時期の HGF の血中濃度はどうか。

(回答) HGF 血中濃度は 0.3ng/ml 以下 (測定感度以下) であった。

質問 23) HGF の効果を、長く持続させる方法はあるか。臨床応用としてはどのような方法が最適か

(回答) ポリエチレングリコール化すると半減期は長くなる可能性がある。静脈投与ではほとんどが肝臓に集積するため、腎臓を標的とした投与方法としては、今回用いた腎動脈カテーテル留置が最適と考えられる。

質問 24) HGF の副作用として、糸球体にどのような影響を及ぼしたか。

(回答) 糸球体係蹄に蛋白が蓄積していた。これが糸球体を障害し、蛋白尿をきたしたと考えられる。

質問 25) HGF を FK506 の前に投与したらどうなるのか。

(回答) 今回は検討していないが、検討してみたい。

質問 26) ヒトの血液型不適合移植時には細胞性・液性免疫を共に強く抑制する治療が行われるが、今回の実験では、液性免疫はどうであったか。

(回答) 抗ドナー抗体産生を FACS で測定したところ、FK506 単独投与群では血清中および病理組織いずれも抗ドナー IgM・IgG の発現が見られたが、HGF 併用群では抗ドナー抗体はみられなかった。

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。