

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 267 号	学位申請者	高木 恭仁子
審査委員	主査	桑木 共之	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	橋口 照人	副査 堀内 正久
	副査	八木 孝和	副査 米田 孝一

主査および副査の5名は、平成25年12月16日、学位申請者 高木 恭仁子 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) グレリンはどの部位でアシル化もしくはデアシル化されるのか。

(回答) グレリン産生細胞内の小胞体にある Ghrelin-O-acyltransferase によりアシル化され、分泌後速やかに血中エステラーゼによりデアシル化する。また、デアシル型グレリンでも血中に分泌される。

質問2) インスリン自己抗体はインスリンの分解を抑制するのか、それとも作用を抑制するのか。

(回答) インスリン分泌時に直ちに結合し、耐糖能異常を引き起こす中和抗体と、インスリンと結合し、分解を回避し、その遊離時に自発性低血糖を引き起こす抗体の両者が存在する。

質問3) 親和性の違いは、抗体構造のどここの違いによるものなのか。

(回答) 軽鎖重鎖の可変領域にある相補性決定領域 (complementaly determining region) の違いによる。

質問4) 他の自己抗体も抗原の分解を抑制し、作用を増強するのか。

(回答) 既知であるインスリン自己抗体症候群及び今回のグレリンに対する自己抗体の挙動から、 10^{-8} から 10^{-7} M 程度の親和性の自己抗体では分解阻害を呈するものが存在することが示唆される。

質問5) 血漿に 1N 塩酸を添加する意味は何か。

(回答) ELISA による (アシル) グレリン測定時のオクタノイル基の安定のためである。

質問6) グレリンに分解を保護するキャリアタンパクはあるのか。

(回答) 現在、そのような報告はない。

質問7) 今回の研究では、血清でなく血漿を用いた理由があるのか。

(回答) 既知の測定方法に従った。血清でも今回の抗体測定には問題はない。

質問8) 肥満者と神経性摂食不振症者 (AN) の抗グレリン抗体の親和性の違いはどこからくるのか。

(回答) 抗体の多様性に起因していると推測している。

最終試験の結果の要旨

質問 9) なぜ抗グレリン抗体が産生されるのか。論文中の *enterococcus* に関する考察は何か。

(回答) 腸内細菌の産出するペプチドホモログに対して抗体ができることにより、抗体の多様性が増していると考えている。

質問 10) In vivo では抗体複合体はどのような働きをしているのか。

(回答) 親和性が 10^{-8} から 10^{-7} M の抗体では、生体内で抗原と結合及び解離を繰り返している。

質問 11) IgA の自己抗体についてはどうか。

(回答) 今回の ELISA での検討では、抗グレリン IgA 及び抗デアシルグレリン IgA に関して、健常者及び肥満者間では差は認められなかった。親和性については未検討である。

質問 12) モデル動物になぜ *ob/ob* マウスを選んだのか。

(回答) レプチン欠損型 *ob/ob* マウスは他の肥満モデルよりも肥満になる確率が高いため採用した。

質問 13) IgG の抽出にはプロテイン A でなく G を用いたのはなぜか。

(回答) プロテイン A では IgG のサブタイプである IgG3 の結合能が低く、プロテイン G は全ての IgG サブタイプに強い結合があり、今回は総 IgG での検討を目的としたためである。

質問 14) ヒトの IgG をラットに投与して効果がみられるのか。

(回答) この実験はグレリンの作用に対する IgG の効果の検証が目的のため、ヒト IgG に対し、ヒトグレリンを用いた。また、事前にヒトグレリンがラットで作用することを確認している。

質問 15) ラットを用いた実験で、ヒトの IgG の個人差はどう考えるのか。

(回答) 今回はグレリンに対して特徴ある親和性を持つ IgG を用いることを優先した。

質問 16) Fig. 1a と Fig. 1c における肥満者のグレリン濃度の違いはどのように説明するのか。

(回答) プロテイン G による IgG 抽出の過程で、グレリン結合型 IgG がプロテイン G と結合する際の立体構造の阻害等により、グレリンが抗体から遊離し、溶出されてきたグレリンの差だと考える。

質問 17) Fig. 4 のアフィニティについて説明してください。

(回答) BIAcore で測定し算出された結合速度定数 (k_a) と解離速度定数 (k_d) から、解離速度定数 (KD) が次式で求められる。 $KD = k_d / k_a$ 。KD は親和性 (アフィニティ) を示す。

質問 18) 肥満者において、抗体を産生する細胞に変化はなかったのか。

(回答) 今回は検討していない。今後の検討課題にしたい。

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。