



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハダカデバネズミのマクロファージの同定と細胞株樹立に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	柴田, 悠平
Description	配架番号 : 2533
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14068号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77909
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuhei_Shibata_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 柴田 悠平

	主査	北村 秀光	准教授
審査担当者	副査	小林 弘一	教 授
	副査	安斉 俊久	教 授
	副査	園下 将大	教 授

学 位 論 文 題 名

ハダカデバネズミのマクロファージの同定と細胞株樹立に関する研究

(Detection and establish of cell lines of macrophage in naked mole-rat)

申請者は、老化や各種疾患に対して耐性で長寿形質を示すハダカデバネズミ (naked mole rat: NMR) について免疫担当細胞の解析を行った。さらにウイルスベクターを使用して新規マクロファージ細胞株 (Naked mole rat peritoneal cavity macrophage-1: NPM1) を樹立し、遺伝子発現および機能について解析を行い、その特徴的な性質を示した。

審査にあたり、まず副査の安斉俊久教授から、NMR の免疫細胞において抗 NK1.1 抗体が認識する抗原の同定に関する手法について質問があった。それに対し申請者は、既報から推定されるエピトープのアミノ酸配列を NMR のデータベースで検索するとともに、さらに cDNA ライブラリーの作成も検討したが、最終的に同定には至らなかったことから、今後、免疫沈降法等の別の方策を検討する必要があると回答した。また、樹立した NPM1 細胞株は定常状態で M2 マクロファージ様であることと長寿形質との関連について質問があった。申請者は、今後、M1/M2 関連遺伝子と長寿関連遺伝子発現についての検証を行うことで、長寿形質との関係が明らかとなると考えていると回答した。続いて副査の小林弘一教授から、NMR のマクロファージの細胞傷害活性の機能評価について質問があった。申請者はターゲット細胞との共培養による検証を試みたが、明確な細胞傷害活性を示すには至らなかったと回答した。また ADCC 活性の解析についての質問があり、本研究では検証しておらず、今後の検討課題であると回答した。また細胞傷害活性に関連する遺伝子発現についての質問があり、申請者は定量 PCR 法によりパーフォリンおよびグランザイム遺伝子が発現していることを確認したと回答した。さらにマクロファージと好中球との区別化の方法について質問があり、申請者は、好中球特異的な遺伝子発現や M-CSF に対する応答性の解析と評価から好中球と区別が可能と考えていると回答した。また副査の園下将大教授から、本研究の仮説についての質問があり、申請者は、はじめに NMR の長寿形質に免疫細胞の種特異性が関与していると仮説を立て、NMR 細胞に交差性のあるモノクローナル抗体は未知であることから、リンパ球などの獲得免疫細胞に比べて、形態学的に識別可能なマクロファージに着目して、本研究を開始したと回答した。次に、ポジティブ・ネガティブコントロールとして確実性の高いマーカーを同定しての検証についての質問があった。本研究においては、はじめに各種モノクローナル抗体との交差性を検証し、当該細胞の機能、遺伝子発現を確認することで、マクロファージ様細胞であることを明らかにする方向で検討したと回答した。また本研究の新規性についての質問があり、NMR に交

差性のある抗体の発見と NMR 由来マクロファージの機能性を確認した点が新規であると回答した。さらに抗 CD11b 抗体のエピトープについて質問があり、当該抗体の認識する分子のアミノ酸配列についての既報は無いことから、NMR においてどの配列を認識したかについては、現在不明であると回答した。また、NMR のマクロファージが M2 マクロファージ様であることとその個体レベルでの表現系についての質問があった。申請者は、M2 マクロファージは一般に抗炎症性を示すとともに、生体における炎症反応は老化現象にも関連することから、NMR の老化耐性に寄与する可能性を考えていると回答した。NMR の個体に炎症刺激を与えた際の免疫機能を評価した先行研究の有無について質問があり、申請者が検索した範囲内では既報は無く、今後マウスを使用した比較検討も行うことで、NMR の種特異的な炎症・免疫応答性の解明に繋がると回答した。最後に主査の北村秀光准教授から NMR と自己免疫疾患との関連についての質問があり、申請者は、これまで既報が無く、現段階では不明であると回答した。また本研究で用いた定量 PCR に使用したプライマーの作成についての質問があり、NMR のゲノムは解析されており、そのデータベースを用いてプライマー設計を行ったと回答した。さらに NMR マクロファージの T 細胞活性化能についての質問があり、本研究では検証出来なかったが、NMR 特異的な獲得免疫にも関与する可能性も考えられると回答した。NPM1 が培養温度の条件により死滅した現象についての質問に対し、p53 を抑制した影響が考えられると回答した。最後に今後の展望として本研究の臨床応用に関する考えについての質問があり、申請者は、本研究で樹立した NPM1 が NMR の長寿形成能の獲得メカニズムを解明する一助となり、得られた研究結果をヒトの病態で検証することで新規治療法の開発や更なる病態解明に繋がる可能性があるとして回答した。

この論文は NMR の免疫担当細胞の解析を行い、新規マクロファージ細胞株を樹立するとともに、その細胞機能を評価し、温度耐性など特異的な性質を有することを示した点において高く評価され、今後、生物学や医学領域において、長寿形質獲得の機序解明に貢献する可能性が期待される。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。