

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	三島 健史
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 無血清培養系での lymphokine-activated killer 細胞の細胞障害活性誘導に及ぼすインスリン及びコレステロール合成阻害剤の影響			
論文審査担当者			
主査	教授 栗原 英見	印	
審査委員	教授 杉山 勝		
審査委員	准教授 虎谷 茂昭		
<p>【目的】</p> <p>コレステロールなどの脂質は生体膜の主要構成成分であると同時に、脂質や脂質代謝産物がさまざまな生理活性を有する生理活性脂質として機能し、脂質の異常が、生活習慣病、免疫性疾患、癌などの原因となることが知られている。さらに近年、免疫応答においても生理活性脂質が重要な役割を果たすことが報告され、リンパ球やマクロファージなどの免疫細胞の機能が脂質の細胞内代謝によって制御されていることが明らかにされつつあるがその詳細は不明な点が多い。</p> <p>申請者の所属する研究室では、インスリンが、lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の細胞障害活性の誘導を抑制することを報告し、インスリンを含まない無血清培地で誘導した LAK 細胞を用いて、口腔癌の細胞治療に応用してきた。</p> <p>本研究では、インスリンが LAK 細胞の細胞障害活性を抑制する機序について明らかにすることを旨とした。まず、インスリンが LAK 細胞のコレステロール代謝系に影響を及ぼすことにより細胞障害活性を制御しているという仮説に基づき、無血清培養系を用いて、コレステロール合成の阻害剤の LAK 細胞の細胞障害活性の誘導に及ぼす影響を検討し、さらにインスリンの LAK 細胞におけるコレステロールエステル化に及ぼす影響について解析を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>LAK 細胞は、健常人ボランティアから末梢血を採取し、Ficoll-Conray 比重遠心法を用いて末梢血リンパ球 (Peripheral blood lymphocytes : PBL) を分離し、無血清培地 (RD4F : RPMI1640 と Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を 1 : 1 に配合した培地 (RD) にヒトトランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-アミノエタノール、亜セレン酸ナトリウムを添加) に interleukin-2 (IL-2) を加えた無血清培地に、インスリン、Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) あるいは Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) を種々の濃度で添加し 7 日間培養することで LAK 細胞の誘導を行った。誘導した LAK 細胞の細胞障害活性試験は、扁平上皮癌細胞株 A431 細胞を標的細胞とした 4 時間の⁵¹Cr 遊離試験法で行い、%細胞障害活性を算出し、評価した。LAK 細胞における免疫チェックポイント分子 Programmed cell death 1 (PD-1) 発現に及ぼすインスリンの影響は、定量 PCR 法及びウェスタンブロット法で解析した。</p> <p>コレステロール合成阻害剤として、ファルネシル 2 リン酸合成酵素阻害剤である Zoledronic Acid、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA-reductase 阻害剤 Lovastatin、7-デヒドロコレステロール還元酵素阻害剤 AY9944、デスモステロール還元酵素阻害剤 Triparanol の細胞障害活性の誘導に及ぼす影響を検討した。</p> <p>インスリンの LAK 細胞の脂質合成への影響を明らかにするために、[2-¹⁴C] acetate の脂質画分への取り込みを指標に検討した。脂質の抽出は、Bligh & Dyer 法で行い、各脂質は、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:2) の溶媒系で分離し、各画分の放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。</p> <p>さらに、コレステロールエステルへの変換酵素である cholesterol acyltransferase (ACAT) に及ぼすインスリンの影響を明らかにするために、インスリン存在下及び非存在下での ACAT 遺伝子及び蛋白発現を定量 PCR 法及びウェスタンブロット法で解析すると</p>			

ともに、[1-¹⁴C] oleic acid の各脂質画分への取り込みを指標として ACAT 活性を算出した。また、ACAT 阻害剤である Avasimibe の LAK 細胞の細胞障害活性及び PD-1 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

【結果】

1. 無血清培養下、インスリン、IGF-1 及び IGF-2 は非添加条件と比較し、LAK 細胞の細胞障害活性を有意に抑制したが、PD-1 遺伝子及び蛋白発現を亢進した。
2. Lovastatin, AY9944 及び Triparanol などのコレステロール合成阻害剤は、LAK 細胞の細胞障害活性を抑制した。AY9944 ならびに Triparanol の細胞障害活性の抑制効果は、Lovastatin のそれと比較し高いことが明らかとなった。
3. Zoledronic Acid は、1~5 μ M の低濃度では細胞障害活性を増強したが、高濃度では抑制した。
4. AY9944 ならびに Triparanol は、PD-1 遺伝子発現を亢進した。
5. インスリンは、LAK 細胞における遊離コレステロールの比率を低下させた。
6. インスリンは、ACAT 遺伝子・蛋白発現及び ACAT 活性を有意に増強した。また、ACAT 阻害剤である Avasimibe は、インスリンによる LAK 細胞の細胞障害活性の誘導を抑制した。

【考察】

Zoledronic Acid, Lovastatin, AY9944 及び Triparanol などのコレステロール合成阻害剤は LAK 細胞の細胞障害活性の誘導を抑制することが明らかとなった。さらに、インスリン、IGF-1 及び IGF-2 による LAK 細胞の細胞障害活性の抑制機序は、インスリンが LAK 細胞の ACAT 活性を誘導することで、遊離コレステロールのエステル化が促進され、遊離コレステロールが減少することによると考えられた。したがって、細胞膜の遊離コレステロール量は LAK 細胞の細胞障害能に重要な機能を果たしていることが考えられ、免疫細胞のコレステロール代謝をターゲットとした癌免疫療法の有用性が考えられた。

本論文は、口腔外科学をはじめ歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	三島 健史
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 無血清培養系での lymphokine-activated killer 細胞の細胞障害活性誘導に及ぼすインスリン及びコレステロール合成阻害剤の影響			
最終審査担当者			
主査	教授 栗原 英見	印	
審査委員	教授 杉山 勝		
審査委員	准教授 虎谷 茂昭		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年12月26日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月7日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. コレステロール合成阻害剤による細胞障害活性の誘導抑制機構について 2. PD-1 と CTLA-4 の機能について 3. PD-1 発現の制御機構について 4. コレステロール合成阻害剤による LAK 細胞における PD-1 発現の抑制機構について 5. ACAT 活性の測定法について 6. ゴレンドロン酸（ゾメタ）による顎骨骨髓炎と今回の研究成果との関連性について 7. LAK 細胞を用いた口腔癌治療への応用方法について 8. 本研究成果の臨床応用について <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			