

審査結果の要旨

論文題目 「Dexamethasone restores TNF α -induced epithelial barrier dysfunction in primary rat alveolar epithelial cells」
(デキサメタゾンとはラットのプライマリー肺胞上皮細胞における TNF α 誘導バリア機能障害を回復させる)
学位申請者 香澤 直賢

本論文は、急性肺障害の治療に使われるグルコルチコイドが、なぜ急性肺障害に有効となるのか、そのメカニズムの解明を目指した研究である。

急性肺障害 (ALI) や急性呼吸切迫症候群 (ARDS) においては治療にグルコルチコイドが使われるが、その奏功機序に関しては必ずしも明らかではない。申請者らは「グルコルチコイドがタイトジャンクション関連タンパクの発現を変化させることにより、急性肺障害の肺胞上皮バリア機能障害を回復させる」と仮説して、ラット初代培養肺胞上皮細胞の TNF α 誘導バリア機能障害モデルに対するデキサメタゾンの効果を in vitro で検証した。

具体的には、ラット肺から分離・培養した 2 型肺胞上皮細胞を 1 型肺胞上皮様に分化させた単層培養系に TNF α 及びグルコルチコイドを添加し、電気抵抗を測定することで肺胞上皮バリア機能の評価した。その結果、まず、TNF α が in vitro の初代培養肺胞上皮細胞において肺胞上皮のバリア機能を損なうことがわかった。さらに、デキサメタゾン投与がグルコルチコイド受容体を介したシグナル伝達系により TNF α 誘導肺胞上皮バリア機能障害から回復させることが判明した。またデキサメタゾンは MLCK (myosin light chain kinase)/pMLC2 (phosphorylation of myosin light chain) 系の抑制を引き起こすこと、さらにデキサメタゾンは細胞内での ZO-1 タンパクの分布を変化させ intercellular junction での ZO-1 を増加させることが判明した。一方、デキサメタゾンによる TNF α 誘導肺胞上皮バリア機能障害からの回復は細胞障害の抑制や Na 再吸収をきたす ENaC の機能には依存していなかった。

これらのデータは、グルコルチコイドがグルコルチコイド受容体-MLCK-pMLC2 経路を介して急性肺障害における肺胞上皮バリア障害を回復することを示唆している。この研究は今後の肺胞上皮バリア研究の基礎となる重要な知見と展望を示し、急性肺障害の治療に新しい展開をもたらさう臨床的意義のある研究であり、博士論文に十分値するものと考えられる。

本論文に対して、各審査委員から次のような多数の質疑がなされた。

1. 培養実験系におけるグルコルチコイドの設定濃度と生体内濃度の相関はどうか？
2. グルコルチコイドは TNF- α による細胞死を抑制しないのにバリア機能を回復させるというのはどのように解釈するのか？
3. 生体内におけるグルコルチコイドによるタイトジャンクション制御について文献的には何が知られているのか？
4. 肺の中の酸素分圧と実験条件での酸素分圧の違いが肺胞上皮細胞培養実験結果に及ぼす影響を考慮しなくていいのか？
5. 動物実験倫理を鑑みて、この研究に動物を使うことの必然性はあるのか？
6. 実験動物として特に rat を使ったのはなぜか？
7. Rat の肺からどのようにして Type II の肺胞上皮細胞を単離するのか？
8. Type I の肺胞上皮細胞と Type II の肺胞上皮細胞は、この実験系ではどうやって区別するのか？

9. Amiloride が ENaC を inhibit できていることをどうやって確認したのか？
10. デキサメタゾンのかわりに MLCK を直接阻害したら、TNF α 誘導バリア機能障害から回復するの
か？
11. この研究の臨床的意義はなにか？
12. 急性肺障害における肺胞バリアの重要性に関する質問
13. 実験プロトコルの妥当性（経上皮電気抵抗の時間的推移、計測した肺胞上皮バリア関連蛋白の
妥当性）に関する質問
14. グルココルチコイドによるバリア機能維持効果が短時間で消失するメカニズムに関する質問
15. バリア機能の方向性（流入と流出）に関する質問
16. 1 型上皮が脱落し細胞レイヤーに欠落が生じるような、より強力な肺上皮障害の場合にもステロ
イドは奏功するのか？
17. 肺障害およびその候補治療薬の評価において、肺胞上皮バリアだけでなく血管内皮バリアも同時
に検討できないか？
18. オルガンチップで肺胞上皮と血管内皮を組み合わせたシステムで検討する場合に、バリア機能を
どのような方法で検討できるのか？

これらの質問に対して申請者は、自らの研究成果と文献的考察をあわせて的確にわかりやすく回答し、研究の問題点と将来性・今後の展望を踏まえ詳細な説明を行った。本学位論文が、急性肺障害（ALI）や急性呼吸切迫症候群（ARDS）に対するグルココルチコイドの有効性を示し、その機序の一端を解明した価値ある内容であることが確認できた。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 沓澤 直賢氏は東海大学博士（医学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	博士（医学）	谷口 俊恭	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	八幡 崇	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	竹下 啓	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	浅野浩一郎	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	小熊 剛	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）