

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	409号	学位申請者	崎元 仁志
審査委員	主査	乾 明夫	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	久保田 龍二	副査	橋口 照人
	副査	武田 泰生	副査	浅川 明弘
<p>主査および副査の5名は、平成29年1月11日、学位申請者 崎元 仁志君に面接し、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。</p> <p>質問1) 体重差をマーカーとして用いているが、マウスの生育環境はどうだったか。生育環境が体重減少の原因となっているのではないか。</p> <p>(回答) マウスは1ケージに2~3匹で飼育した。行動実験の2週間前から個別飼育に変更した。</p> <p>質問2) 有棘赤血球の割合と臨床症状の発現には相関関係があるか。</p> <p>(回答) ヒト症例では有棘赤血球の割合と臨床症状の相関関係は明らかにされていない。</p> <p>質問3) 他の表現型解析として血液検査や water maze 等の別の行動実験は行わなかったのか。</p> <p>(回答) 血液検査は行っていない。高架式十字迷路や social interaction、passive avoidance も行ったが、全ストレインにおいて有意差は無かった。</p> <p>質問4) 有棘赤血球舞踏病の治療薬の開発に関してはどこまで進んでいるのか</p> <p>(回答) ChAc 患者由来の iPS 細胞を用いた研究が欧米で行われており (European Multidisciplinary Initiative on Neuroacanthocytosis; EMINA)、薬物治療のターゲットの検索を目標としたプロジェクトが進行中である。今後、私達も共同研究グループとして同研究に参加する予定である。</p> <p>質問5) 免疫染色で free floating 法を選んだ理由と切片の厚さを 40 <math>\mu</math>m にしたのは何故か。</p> <p>(回答) free floating 法は抗体の浸透がよいため選択した。free floating 法を用いた場合、切片にある程度の厚みがないと検体が破損してしまうため。先行文献を参考に 40 <math>\mu</math>m に設定した。</p> <p>質問6) 戻し交配によって継代中や行動実験に使用したマウスは、genotype はどのように判断していたのか。</p> <p>(回答) すべてのマウスでマウステールから genomicDNA を抽出し、変異領域を含んだ特異的 PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動して、genotyping をしている。</p> <p>質問7) 今回の研究ではマウス脳で astrocyte の変化を見ているが、gliosis 以外にヒトの有棘赤血球舞踏病で言われている病理所見はあるか。</p> <p>(回答) 尾状核、被核、淡蒼球での神経細胞数の減少と、免疫組織化学染色において線条体におけるドパミンや GABA、Enkephalin、substance P の免疫反応の減少が報告されている。</p> <p>質問8) ヒト症例での海馬での病理学的な変化は報告されているのか。</p> <p>(回答) 正常対象と比較してヒト ChAc 症例では海馬での神経細胞数の減少や gliosis は報告されていない。しかし、グリア細胞に関しては CA1 領域から CA4 領域にいくに従って増える傾向にあり、GFAP 陽性細胞は CA1 では増加していなかったが、歯状回では顕著に増加していたという報告がある。</p> <p>質問9) chorein と有棘赤血球症の関連性については何か知見はあるのか。</p> <p>(回答) 以前我々の研究グループは、赤血球膜分画において膜の裏打ち構造に関わる細胞骨格関連タンパク質の <math>\beta</math>-adducin と <math>\beta</math>-actin が chorein と相互作用する可能性を報告している。最近では赤芽球から分化するときのオートファジーに chorein が関与することが示唆されており、これら機構の破綻が有棘赤血球症の原因の可能性がある。</p> <p>質問10) ChAc モデルマウスは目が見えているのか。</p> <p>(回答) 新規物体認証試験で目が見えていることは確認されている。</p> <p>質問11) マウスの表現型を 40 週と 70 週で確認しているが、ヒト症例と比較して発症としては遅いのか。</p> <p>(回答) 単純に週齢とヒト年齢を比較することはできないが、マウスの寿命や繁殖期などから換算すると、マウスの 40 週齢はヒトでの 20~30 代であり、今回のマウスでは 40 週で表現型が確認されていたため、ヒトでの好発年齢と同程度と考えられる。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 12) 赤血球の脆弱性が報告されているが、脾腫は認めていないのか。

(回答) 以前の研究で ChAc モデルマウスの脾臓の重さを確認しているが、野生型マウスと比較して特に有意差は認めなかった。ヒト ChAc 症例では脾腫を認める割合は 20%程度といわれている。

質問 13) Gliosis が起きていると発表していたが、Blood Brain Barrier (BBB)の障害は起きていないのか。gliosis の増加はアストロサイトの機能不全であるのか、それとも神経細胞の減少なのか、もしくは両方であるのか。また、マウスの頭部 MRI などの画像所見は撮影したのか。

(回答) 神経有棘赤血球症である pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PKAN) の *Drosophila* モデルでは BBB の障害を指摘されているが、ChAc での BBB の障害に関しては報告されていない。Gliosis に関しては一般的に神経変性や細胞死の緩徐進行性を反映するものと考えており、astrocyte 自体の障害は確認されていない。また今回のモデルマウスでは頭部 MRI は施行していない。

質問 14) 最近の論文で赤血球における eryptosis の報告があるが、chorein は eryptosis との関連性は言われているか。

(回答) 我々の研究グループは、chorein はオートファジーを介した細胞内小器官や異常タンパク質のクリアランスに関与しておりこれらの機構の破綻が ChAc の分子病態のひとつである可能性があるとして報告した。他のグループは赤芽球から分化する際のオートファジーと chorein の関連を報告している。このように赤血球における chorein については、赤血球分化のオートファジーとの関連性を検討している。これまでに chorein と eryptosis との関連性についての報告はないが大変興味深く、今後の課題として検討したい。

質問 15) Huntington 病と ChAc に関連性はあるのか。

(回答) 表現型は類似点が多いものの、現時点で分子病態の関連性については報告は無い。

質問 16) chorein 欠損がどのように影響して、精神障害が起こるのか。

(回答) chorein は細胞骨格、液胞輸送、神経伝達物質の放出機構、オートファジーなどに関わっており、これらの機構の破綻が神経細胞死のメカニズムの可能性があり、尾状核などの障害部位に応じて精神症状が出現するものと思われる。

質問 17) 以前の研究で *VPS13A* 遺伝子上の exon 60、61 の欠失変異を同定しているが、exon 60 と 61 が欠失するとどうなるのか。

(回答) exon 60 と 61 が欠失することにより、frame shift を生じ下流に stop codon を生じる。stop codon より上流の抗原を認識する抗 chorein 抗体を用いたウエスタンブロットで truncated chorein に相当するバンドは認めない。RT-PCR で変異 allele が増幅できていることから、Nonsense-mediated mRNA decay 以外の未知の機構で truncated chorein が産生されなくなるものと思われる。

質問 18) open field の結果で多動を指摘しているが、運動機能の低下も指摘している。この違いの解釈はどうか。

(回答) 同様の病態を示す Huntington 病モデルマウスでも運動機能低下と多動が指摘されており、不随意運動の影響ではないかと報告している。今回の ChAc-モデルマウスも同様と考えられる。

質問 19) 70 週齢の FVB では、野生型と ChAc モデルマウス共に rotarod の施行は困難であったのか。

(回答) FVB は多動傾向が強く、rotarod から飛び降りてしまうため野生型も含めて rotarod の施行は困難であった。

質問 20) chorein 欠失に伴い、ストレインごとの部位別 astrocyte の活性化と GABA の減少の関係について言及しているが、どう解釈しているのか。

(回答) gliosis は緩徐な神経変性による細胞脱落に応じて出現すると考えられている。そのため、Huntington 病モデルマウスのように急速に神経変性を来すモデルでは gliosis は見られない。今回 FVB-ChAc モデルマウスは線条体での gliosis の増加が見られていることから、線条体において緩徐に神経変性が進行していると考えられた。線条体を構成するニューロンの大部分は GABA 作動性ニューロンであるため、FVB-ChAc モデルマウスの線条体では GABA 作動性ニューロンの減少が起こると推察した。

質問 21) マウス各ストレインの背景遺伝子中に有棘赤血球舞踏病の修飾遺伝子が存在すると結論づけられているが、有棘赤血球症や精神症状の発症に関わる修飾遺伝子はどのような候補が考えられるのか。ヒトの疾患で推測されている遺伝子はあるか。

(回答) FVB-ChAc モデルマウスで観察された多動に関しては、ドパミンなどのモノアミンに関連する遺伝子の関与などが考えられる。今回の研究では連鎖解析などの遺伝統計学的に修飾遺伝子を見出せるほどの強い差は得られなかった。今後の課題と考えている。また、ヒトの疾患で推測されている遺伝子は、てんかんの表現型において原因遺伝子 *VPS13A* に隣接する遺伝子の関与が推測されている。

質問 22) モデルマウスと野生型マウスは同じケージで飼育されたか。

(回答) 実験使用したモデルマウスと同腹の野生型マウスは、行動実験の 2 週間前まで同じケージで飼育されている。

質問 23) 有棘赤血球舞踏病のヒト症例やマウスは肥満型と痩せ型で表現型の違いはあったか。

(回答) ヒト症例とマウス共に肥満度での表現型の違いは確認されていない。

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。