

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 332 号	学位申請者	樋口 雄二郎
審査委員	主査	武田 泰生	学位
	副査	橋口 照人	副査
	副査	佐野 輝	副査
			博士 (医学)
			久保田 龍二
			中村 雅之

主査および副査の5名は、平成28年7月12日、学位申請者 樋口雄二郎 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) 次世代シーケンサー (NGS) を用いた *PMP22* 重複・欠失のスクリーニングは難しいのか。

(回答) NGS によるコピー数多型解析はすでに実用化されており、エクソーム解析のリード数情報 (depth) を元に構造異常を検出することができる。

質問2) 日本人のコントロールデータベースは活用したのか。

(回答) 京都大学のホームページで一般公開されている健常日本人 1,208 例検体のエクソーム解析に基づくデータベース (HGVD database) を活用した。

質問3) 通常の常染色体劣性遺伝形式であれば、4人に1人の割合で発症するはずであるが、Patient 4 や 5 の家系では同胞発症の頻度が高いのはどうしてか。

(回答) Patient 5 の家族歴情報を再度確認したところ、両親は血族結婚 (従兄弟婚) であることは間違いがないが、父方の祖父母も血族結婚していた可能性がある。したがって、父親が *MME* 遺伝子ホモ接合体異常を有していた可能性があり、その子供の世代に同胞発症頻度が高くなったと推測される。

質問4) ネプリライシン (NEP) は髄鞘では細胞内外のどちらの方向に発現しているか。またシュワン細胞における NEP の基質は何か。?

(回答) NEP のシュワン細胞での正確な局在や基質については未解明である。

質問5) Patient 8 は複合ヘテロ接合性変異が確認されているが、2つの変異がそれぞれ対立アリルに存在することは証明したか。

(回答) 間接的であるが証明した。Patient 8 の segregation study で、父親はすでに亡くなっていたため遺伝子検査を実施できていないが、母親が c.655-2A>G のヘテロ接合体のキャリアであることが証明でたので、おそらく父親は c.439+2T>A のヘテロ接合体キャリアであったことが推測される。そのため、発端者である Patient 8 はその両親の変異アレルをそれぞれ継承し、複合ヘテロ接合性変異であると思われ、2つの変異がそれぞれ対立アリルに存在していると考えられる。

質問6) C411del と C621R 変異部位について、この部位のシステイン残基の SH 基はジスルフィド結合を形成する残基なのか、それとも free のシステイン残基としてレドックス制御に関与しているのか。

(回答) 411番と621番のシステインはそれぞれ143番と747番のシステインとジスルフィド結合を形成しているため、NEPの三次構造に重要な部位と考えられ、この2カ所の変異はいずれもNEPの三次構造に大きな影響を与えていると推測される。また、750個のアミノ酸から構成されるNEPには、12個のシステイン残基が存在し、すべてジスルフィド結合(6カ所)を形成しているため、freeのシステイン残基はないと考えられる。

質問7) Polyphen-2 や SIFT などの蛋白機能障害予測スコアの陽性的中率はどの程度か。

(回答) 陽性的中率は不明である。Polyphen-2 や SIFT などの software の作成者が Cut-off 値を設定していないため、スコアの解釈は user によって異なる。

質問8) 末梢神経組織像にて大径有髄線維の脱落を認めるが、その機序はどのように考えているのか。

(回答) マウスなどの過去の研究により、NEP は末梢神経の発達、軸索再生に重要な働きがあり、神経細胞の代謝・処理にも関与しているのではないかと推測され、その機能不全により末梢神経の変性 (脱落) をきたすのではないかと考えられる。また *MME* 変異の患者は、病歴上、幼少期や成人期にはまったく運動障害がないため、正常に発達分化していた末梢神経が年齢依存性に変性が出現し大径有髄線維の脱落をきたすのではないかと考える。

最終試験の結果の要旨

質問9) NEP KO マウスは *endotoxin shock* に感受性が高いという参考文献があるが、その機序は何か。

(回答) NEP KO マウスでは、末梢血管から Lipopolysaccharide を投与すると、wild type と比較して致死率が高いと報告されている。これは、KO マウスでは、NEP の基質である endothelin や bradykinin, tachykinin, enkephalin などのショック関連分子の代謝に影響を与え致死率を増強させるのではないかと考察されている。

質問10) MME 変異の患者がアルツハイマー病 (AD) を発症していないということであれば、現在国内の他の研究室で計画されているヒト AD に対する MME 遺伝子導入治療は、本当に意味のある治療なのか。

(回答) 推測であるが、MME 変異の患者は先天的に NEP が欠損しているため、生下時から β アミロイド ($A\beta$) を分解する代償機構が発達している可能性があり、 $A\beta$ の優位な沈着が起らず AD を発症していないのかもしれない。しかし、後天的に NEP の発現や活性が低下していく AD 患者では、この代償機構が不十分なため、AD を発症してしまうことも考えられる。このような $A\beta$ 分解の代償機構が不十分な症例では、MME 遺伝子導入治療は十分効果が期待できると考えている。

質問11) Patient 1 の末梢神経組織では Western blot (WB) を実施しているが、Patient 4 は WB を実施しているか。

(回答) Patient 4 の末梢神経組織では WB は実施していない。

質問12) NEP KO マウスでは末梢神経障害をきたさないのか。

(回答) NEP KO マウスは、複合性局所疼痛症候群 (CRPS) 様の病態を呈するが、ニューロパチーを呈したという報告はない。

質問13) MME の同定で AR-CMT の診断率は向上したが、それでもまだ 65% が原因未同定である。残りの原因未同定症例に対しては今後どのように解析を進めていく予定なのか。

(回答) 今回の研究で用いた同じ手法 (overlap strategy) で MME 遺伝子以外にあと 2 つの有力な候補遺伝子を既に同定しており、現在機能解析中である。

質問14) 今回用いた overlap strategy という手法は、CMT 以外でも応用できるのか。

(回答) 本手法は CMT に限らず全てのメンデル遺伝性疾患に応用することができ、新規遺伝子同定のモデルケースになりうる手法であると考えられる。当科では CMT 以外にも、脊髄小脳変性症やミトコンドリア病、チャネロパチーなどを対象に、本手法を用いて新規候補遺伝子の同定を試みていきたいと考えている。

質問15) エクソーム解析はエクソン領域だけでなくイントロン領域の一部も解析できるのか。

(回答) エクソン領域だけでなく非翻訳領域 (UTR) や intron/exon junction であるスプライス部位も解析できる。

質問16) 10 例中 6 例がスプライス部位変異であるが、一般的に他の遺伝子でもスプライス部位変異は多いのか。

(回答) それぞれの遺伝子の機能にもよるが、一般的には、病気に関わる遺伝子変異はエクソン領域の一塩基置換 (ミスセンス変異) が頻度として最も多いと思われる。MME ではスプライス部位変異 (6 例) とナンセンス変異 (2 例) が多いことから、MME の完全な機能喪失性変異が CMT 発症に関与していると考えられ、ミスセンス変異では酵素活性が残存して CMT の発症に至らないのかもしれない。

質問17) Patient 5 の運動伝導速度では borderline であり、axon と myelin の混合型障害を呈しているが、どちらが primary に障害されていると考えているのか。

(回答) Patient 5 の正中神経の運動伝導速度は 37.4m/sec と borderline を示しているが、尺骨神経の運動伝導速度は 45.5 m/sec と比較的保たれており、また下肢の脛骨神経と腓腹神経の活動電位は消失していることから、primary には軸索が障害され、secondary に髄鞘の障害をきたしていると考えられる。

質問18) NEP は別名 CD10 とも呼ばれており、免疫系細胞にも発現しているが、MME 変異患者には末梢血などに異常は観察されなかったのか？

(回答) Patient 7 では急性骨髄性白血病 (M2) の既往があるが現在寛解状態にある。その他 9 例では末梢血での白血球数に異常が観察された症例はない。

質問19) MME 変異患者の末梢神経系は一旦正常に構築されていた末梢神経組織が後天的に障害されていくのか。

(回答) MME 変異患者は全例が高齢発症であり、病歴上も幼少期や成人期にはまったく運動障害がなく、中にはスポーツ万能であった方もいる。したがって、MME 変異患者の末梢神経は一旦正常に発達分化しており、年齢依存性に変性が進んでいくのではないかと推測できる。

質問20) ミエリン自体も変性しているのか。

(回答) NEP はミエリンにも豊富に出現しており、患者の末梢神経の組織像でミエリンの菲薄化も認めていることから、ミエリン自体も変性をきたしている可能性はあると考えている。

質問21) 末梢神経の組織検査が実施できたのは Patient 1 と Patient 4 だけか。

(回答) 末梢神経の組織が入手できたのは Patient 1 と Patient 4 の 2 症例だけである。

質問22) NEP には splicing variant があると思われるが、variant 毎に変異による影響への差違はあるのか。

(回答) The Consensus Coding Sequence (CCDS) Project には 5 つの NEP の splicing variant が登録されているが、すべての variant が 750 個のアミノ酸で構成され、coding 領域は共通しているため、variant 毎に変異による影響への差違はないと思われる。

質問23) 末梢神経組織像の免疫染色や WB で使用した抗 NEP 抗体の epitope はどこか。

(回答) 使用した抗 NEP 抗体は、細胞外ドメインをエピトープとした抗体である。

質問24) PMP22 や MPZ などのミエリン構成蛋白の発現レベルや NEP に類似する他の peptidase の発現レベルについては調べているか。

(回答) 今回の study ではミエリン構成蛋白や NEP を代償する他の peptidase の発現については調べていない。

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。