

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 510 号		学位申請者	永田 青海
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	浅川 明弘	副査	小林 裕明
	副査	田川 義晃	副査	桑木 共之
<p>主査および副査の5名は、平成31年3月12日、学位申請者 永田 青海 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) Chorea acanthocytosis (ChAc)では、chorein タンパクが免疫蛍光染色で染まっていなかったが、exon 60-61 の deletion ではタンパクが全く作られなくなるのか、それとも異常なタンパクが作られているのか。</p> <p>(回答) ChAc では nonsense mediated decay とと思われる機構により、chorein タンパク質の発現が全面的に障害されている。</p> <p>質問2) ChAc のモデルマウスに関して、愛媛欠失変異以外の変異による他の ChAc モデルマウスが作成されているか。他の ChAc モデルマウスが存在していれば、同じ雄性不妊の表現型が認められているのか。</p> <p>(回答) 愛媛欠失変異以外の変異による ChAc モデルマウスは、論文化されたものは、いまだ存在しないが、学会発表レベルにおいて確認されたものとしては、<i>1ps13a</i> knockout mouse が作成されており、本教室の ChAc モデルマウスと同様に、雄性不妊を呈していた。</p> <p>質問3) 免疫蛍光染色で chorein が精子中片部に限局しており、電子顕微鏡観察でミトコンドリアの形態異常が認められることから、chorein がミトコンドリアに限局していると考えているのか。</p> <p>(回答) chorein タンパクがミトコンドリアの存在している精子中片部に存在していた。免疫沈降法(IP)を用いた追加実験において、chorein タンパクとミトコンドリアにおける呼吸系の酵素との共沈は確認されている。</p> <p>質問4) 電子顕微鏡観察像において ChAc モデルマウス精子のミトコンドリアの異常が示されているが、全ての精子において異常を認めるのか、それとも一部の精子にのみ異常を認めるのか。</p> <p>(回答) 電子顕微鏡観察では多数の精子を観察しているが、ChAc モデルマウス精子においては全例でミトコンドリアの形態異常を認めた。Wild type にもごくわずかではあるが、ミトコンドリアのマトリクスの密度低下を認めているが、配列異常については ChAc モデルマウスに限った異常であった。</p> <p>質問5) Mitotracker Red を用いた蛍光染色は、ミトコンドリアの膜電位が変化することによって染色が変化するのか。</p> <p>(回答) Mitotracker Red は膜電位に応じて染色され、膜電位が保たれていない場合には染色されない。</p> <p>質問6) ChAc モデルマウスにおいて、雄性不妊のため妊娠率が0%であるが、継代をどのようにして行っているのか。</p> <p>(回答) ChAc モデルマウスでは雄性不妊となるため、継代はヘテロマウスを用いて行っている。</p> <p>質問7) ChAc のヒト患者においても臨床症状として雄性不妊が認められているのか。</p> <p>(回答) 9th International meeting on neuroacanthocytosis syndromes にて、ChAc 男性患者2症例で雄性不妊の報告があった。一方で、日本の大規模家系例において、ChAc 男性患者の子供が複数いる。以上のことから浸透率100%の雄性不妊ではないと考えられる。</p> <p>質問8) 精子の運動障害率について結果が示されているが、精子の前進運動についても低下を認めているのか。</p> <p>(回答) 精子の前進運動を反映するものとして、移動距離についての比較を行ない、ChAc モデルマウス精子における移動距離の有意な低下が認められている。</p> <p>質問9) ChAc 患者以外の男性において、不妊の原因として chorein タンパクが関わっている可能性はあるのか。</p> <p>(回答) 本研究において、精子に chorein が存在していることが世界で初めて確認された。ChAc 患者以外の男性において chorein タンパクが関わっている可能性について、不妊男性精子のプロテオーム解析において、chorein タンパク質も原因遺伝子~タンパク質の可能性が挙げられている。</p> <p>質問10) ミトコンドリアの異常は、精子以外の他臓器で確認されているのか。</p> <p>(回答) ChAc モデルマウスを用いて、線条体をはじめとした脳でのミトコンドリアの形態異常について、電子顕微鏡などで確認を進めている。</p> <p>質問11) もし今後、ChAc モデルマウスの全身臓器、例えば筋肉などでミトコンドリアの異常が確認された場合、ChAc における不随意運動の原因が、中枢性ではなく、末梢組織の異常となる可能性はあるのか。</p>				

(回答) 臨床症状などから、ChAcの不随意運動については中枢神経疾患と考えている。

質問1 2) ChAcモデルマウスにおいて、有棘赤血球症や不随意運動といったChAcの臨床症状は確認されているのか。

(回答) ChAcモデルマウスにおける有棘赤血球症は確認されている。ヒトのChAcでみられる舞踏運動のような不随意運動は確認されていないが、ChAcモデルマウスを用いた行動実験において、筋力低下、協調運動低下、および多動が認められている。

質問1 3) ヒトChAc患者においてautophagyの障害が確認されているか。

(回答) 培養細胞を用いたautophagy/mitophagyの研究が当研究室で行われている。ヒトChAc患者の神経細胞でのautophagy/mitophagyの異常については研究を進めているが、未解明である。

質問1 4) ChAcモデルマウスの精子における奇形を判定する際に、WHO分類を用いているが、ヒト精子を対象としたWHO分類を用いて良いのか。

(回答) ヒト精子とマウス精子には、頭部や全長などに違いがあり、マウス精子における奇形や運動障害率を判定する独自の基準は存在しない。一方で、マウス精子の奇形率や運動障害率を対象とした先行研究において、WHO分類が用いられており、本研究においても先行研究にならう形でWHO分類を適用した。

質問1 5) 本研究において、酵母VPS13がmitophagy経路を抑制しているという知見、および*Vps13a* exon 60-61欠損によるchoreinタンパク欠損から、ChAcモデルマウスではmitophagy経路抑制の崩壊が生じ、精子のミトコンドリア異常が生じたと解釈しているのか。mitophagyは不良ミトコンドリアの選択的分解システムである。家族性パーキンソン病において不良ミトコンドリアがautophagyにより分解されないことが病態形成に関わっていると考えられている。今回の実験系においては、ChAcモデルマウスにおけるautophagyの抑制が、精子における異常ミトコンドリアの発現に繋がっているのではないか。

(回答) 酵母による研究では、VPS13 knockoutがmitophagyを促進するという考察がなされ、一方でHEK293細胞による研究では、chorein過剰発現がautophagyを促進したとの結果が得られている。この一見矛盾した結果と、本研究におけるChAcモデルマウス精子におけるミトコンドリア異常を説明しうる考察としては、choreinはmitophagy/autophagyの調整因子のような役割を果たしているのではないかと考えている。Choreinの欠損に伴い、mitophagy/autophagy調整系の破綻によって不良ミトコンドリアが残存してしまうのではないかと考えている。

質問1 6) ChAcモデルマウスの精子を用いて、卵子に受精させる実験で、受精能力低下の検証実験は検討されたのか。あるいはそのような解析をした報告はあるか。

(回答) ChAcモデルマウス精子を用いた人工授精の試みについては検討されているが、まだ実施されていない。他の研究において同様の解析をした報告はない。

質問1 7) ChAc男性患者の生殖能力が、非罹患者と同等の生殖能力か否かに関する比較のエビデンスはあるか。

(回答) 比較のエビデンスは現時点では存在しない。

質問1 8) ChAc男性患者の精子について、精子数、奇形率、運動率に関する報告があるか。

(回答) 9th International meeting on neuroacanthocytosis syndromesでのポスター発表で、ChAc男性患者兄弟2症例において、精子運動性の低下が報告され、精子数については2例中1例において低下が報告されている。

質問1 9) ChAc患者におけるchoreinタンパクの欠損は、その主症状を呈する病態形成にどうかかわっているのか。特に脳神経系領域で検出できる変化として表現されているのか。

(回答) 病態のうち、有棘赤血球症においては、赤血球の脂質二重膜構造の内膜と外膜のリン脂質の比率が異なり、choreinが内膜の裏打ち構造として存在していることがわかっているが、病態を生じる機構は不明である。また、ChAcにおいてchoreinタンパクの欠損が全身性に認められているが、線条体ニューロンの選択的変性脱落につながるメカニズムも、未解明である。

質問2 0) 本研究におけるChAcモデルマウスにおける雌性不妊の原因となる変化は、ChAcヒト患者の病態解明・治療開発にどのように関わっていく可能性があるか。

(回答) 精子の構造が比較的単純であることから、精子におけるchoreinタンパクと共存するタンパク質の同定から、神経細胞における変化の原因解明へつながるのではないかと考えている。

質問2 1) 有棘赤血球症とChAcの遺伝子異常との関連性はなにか。

(回答) ChAc患者の赤血球においては、脂質二重膜構造の脂質分布に異常がある。Choreinタンパクは細胞膜内膜の構造維持に資する裏打ちタンパクとして結合していることがわかっている。

質問2 2) *VPS13A*以外の遺伝子変異は、ChAcにおいて同定されているか。

(回答) 同定されていない。

質問2 3) *Vps13a*遺伝子を過剰発現させた場合、生殖能、ミトコンドリアの構造はどうなるのか。

(回答) *Vps13a*遺伝子を過剰発現させたマウスを作成しておらず、chorein過剰発現精子における生殖能、ミトコンドリア構造異常の研究はまだ行っていない。

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。