

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 <b>519</b> 号		学位申請者	浦田 結嘉
審査委員	主査	高嶋 博	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	久保田 龍二	副査	武田 泰生
	副査	橋口 照人	副査	橋口 昭大
<p>主査および副査の5名は、令和元年7月29日、学位申請者 浦田 結嘉 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) McLeod 症候群 (MLS) と chorea acanthocytosis (ChAc) では、臨床的には区別がつかないと思って良いのか。  (回答) MLS は男性患者で、ChAc と比較して発症年齢が高い、口腔周囲の不随意運動が少ないなどの臨床的特徴から大まかに鑑別できる。赤血球膜 Kell 抗原の低下が MLS に特徴的であり、臨床検査所見で鑑別が可能である。</p> <p>質問2) Chorein と XK が相互作用しているということだが、MLS で chorein が減るのはどのような理由があるか。  (回答) Chorein の発現量が低下する詳細な機序は不明だが、仮説としては、MLS で Kell 抗原が低下する現象と同様の機序が存在する可能性が考えられる。</p> <p>質問3) MLS 患者で <i>VPS13A</i> 遺伝子の mRNA の発現は評価しているか。  (回答) MLS 患者の白血球由来の RNA を用いて <i>VPS13A</i> 遺伝子の mRNA を RT-PCR 法で解析したが、MLS でも mRNA の発現を認め、健常と比較して一貫した結果は得られず、詳細は不明であった。</p> <p>質問4) 赤血球膜 chorein 発現量の比較 (Figure 2D) は、6例の解析を triplicate で行ったのか。  (回答) MLS 6例それぞれ異なる検体と繰り返し解析を施行しており、Figure のような6例全例で行なった解析を含めて、少なくとも triplicate して同様の結果が得られている。</p> <p>質問5) 健常と MLS のリンパ芽球様細胞を用いたウェスタンブロット解析 (Figure 2F) の実験の意義は何か。  (回答) MLS と健常のリンパ芽球様細胞を用いて、chorein の発現量や chorein と XK 蛋白相互作用を評価する目的であった。結果としては、リンパ芽球様細胞では XK 蛋白質の免疫反応が得られず、chorein の発現量も健常と同等であると解釈した。</p> <p>質問6) リンパ芽球様細胞の実験では、whole cell lysate を用いて行ったのか。膜分画の蛋白質を用いた場合など、局在で差があるのか。膜移行が障害されている可能性があるか。  (回答) 実験は whole cell を可溶化剤で処理した lysate を用いて行った。さらに不溶性画分を LDS (lithium dodecyl sulfate) sample buffer で処理したサンプルでも実験した。分画別の評価は出来ておらず、膜移行が障害されている可能性も否定はできない。</p> <p>質問7) XK 蛋白質の機能はどのようなものがあるか。  (回答) 10個の膜貫通領域を持つ膜蛋白質であり、膜輸送やアポトーシスに関わっていると言われている。赤血球膜、脳、骨格筋、腎臓、心臓などの臓器に多く発現しており、赤血球膜や骨格筋では Kell 抗原と共有結合した複合体として機能していると考えられている。</p> <p>質問8) XK 蛋白質と chorein は、直接的な相互作用が分かっているのか。  (回答) 今回、培養細胞を用いた免疫沈降で両蛋白質の相互作用を証明した。これまでは、両蛋白質に共通する分子機構としてチロシンリン酸化酵素 Lyn kinase 活性との関連が言われている。</p> <p>質問9) 心筋症の頻度は、ChAc と MLS で違いがあるが、どのような理由が考えられるのか。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

(回答) 骨格筋では、XK 蛋白質と Kell 抗原の複合体を形成しており、この複合体の機能の障害が、心筋症など筋障害の頻度の差異に影響していると考えられる。

質問 10) 培養細胞を用いた免疫沈降で、Output の XK 蛋白質バンドの位置が Input より高いが、その考察はあるか。

(回答) 糖鎖の修飾やリン酸化が、泳動の移動度に影響している可能性が考えられる。

質問 11) MLS の赤血球膜で、XK 蛋白質のバンドが全く検出されないことに関して、考察があるか。

(回答) 赤血球膜に XK 蛋白質が存在していないと考えられる。不完全な XK 蛋白質が膜移行できずに存在している可能性は否定できない。

質問 12) MLS Case 2 の臨床症状で、有棘赤血球症の鑑別を行なった経緯は何か。

(回答) MLS Case 2 においては、発熱、皮下硬結、筋膜炎に加えて全身の不随意運動がみられ、神経筋疾患が疑われ、鑑別診断の一環として有棘赤血球症の遺伝子検査が依頼された症例である。

質問 13) 膜に XK 蛋白質や chorein を移行させる分子は分かっているか。

(回答) XK 蛋白質や chorein の移行に関わる分子機構については不明である。

質問 14) XK 蛋白質と chorein は、その他の膜蛋白質との相互作用は調べているか。

(回答) 先行研究において、chorein と  $\beta$ -actin や  $\beta$ -adducin との相互作用は、免疫沈降と免疫染色での共在で相互作用を確認している。抗 XK 抗体を用いた免疫沈降において、chorein と相互作用する分子を解析したが、検索した限りでは共通の分子はなかった。

質問 15) XK 遺伝子にヘテロに変異を持つ MLS の解析はしているか。

(回答) MLS は非常に稀な疾患であり、MLS 変異ヘテロ保因者の検体は当研究室では有していない。MLS 家系の報告では、ヘテロ保因者で不随意運動など部分症状を呈している報告がある。

質問 16) ChAc と MLS の分子診断の手法について、どのようなアルゴリズムで行なっているか。

(回答) まず ChAc 分子診断を目的に、赤血球膜蛋白質の chorein ウェスタンブロット解析と、VPS13A 遺伝子配列解析を行う。本研究で得られた知見をもとに、chorein 発現量が低下している検体に関しては、VPS13A 遺伝子配列解析に加えて、XK ウェスタンブロット解析と XK 遺伝子配列解析を行い MLS 分子診断を行っている。

質問 17) ChAc と MLS の臨床症状で、鑑別診断に一番有用であるものは何か。

(回答) MLS では、赤血球膜 Kell 抗原の低下が特徴的であり、鑑別診断に有用である。筋症状に関して、ChAc では神経原性が多く、MLS では神経原性・筋原性いずれの所見もあると言われている。

質問 18) MLS は発症が遅いが、発症までは全く正常と考えて良いか。

(回答) 得られた病歴の情報からは、初発症状を呈した発症年齢以前には、筋や精神神経症状の目立った異常所見はなかった。なお、XK を有する血液の輸血では、2 回目で致死的となるため、日本赤十字社は輸血検体全例で血液型物質 XK の検査を行っている。

質問 19) 初発年齢から最終診断までの年数が長いことが、家系の検体が集めにくい要因と考えて良いか。

(回答) 本研究の MLS 6 例では、初発年齢は平均 47 歳に対し、最終診断の年齢は平均 64 歳であった。遅い発症で緩徐な進行であり、最終診断まで年数が長く、家系の検体が集めにくいと考えられる。

質問 20) 気分障害患者にも VPS13A 遺伝子変異保因者を認めた報告があったが、比較した健常者の解析は何人か。

(回答) 先行研究で対象とした健常者は、100 人程度の解析を行っている。

質問 21) 気分障害患者でみられた変異も機能喪失性の変異と考えて良いのか。

(回答) 2 つの非同義的変異に関しては、PolyPhen2 などの *in silico* 解析で possibly damaging とされており、exon 60-61 欠失変異に関しては、VPS13A 最初の疾患変異として同定されており、機能喪失性の変異と考えられる。

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。