

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 号		学位申請者	笠毛 溪
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

主査および副査の5名は、令和元年12月3日、学位申請者 笠毛 溪 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) 確実に共分離しているのは難聴か。III-10の糖尿病は合併症か。形態画像は他の被験者で調べているのか。

(回答) 確実に共分離しているのは難聴と認知機能障害である。III-10は筋症状や中枢神経症状を認めなかったため、ミトコンドリア異常による糖尿病と判断しなかった。共分離している姉は頭部CTで全般性の脳萎縮を認めた。

質問2) PRIMPOLのY89D変異について、酵素活性が半分低下するだけではgain of functionとは言えないが、toxicとなった機序はどうか。Y89D変異体を導入して継代をした場合に多重欠失は認められるのか。

(回答) タンパク質の二次構造が変化すると考えられているが、機序は明らかにはされていない。PrimPol ノックアウト細胞にY89D変異体を補完したトランスフェクション細胞において、細胞生存率やDNA複製フォーク速度が低下することが証明されているため、gain of toxic functionと考えられる。継代した研究は行われていない。

質問3) CARD8やMEFVはこの疾患と関連しているか。MEFVの変異は共分離しておらず関係ないのではないか。

(回答) 直接関連があるとは言えないが、高熱によるCPT2活性低下がミトコンドリア障害に影響を与えた可能性を考えた。MEFV変異は共分離していないが、筋力低下の表現型の違いに影響を及ぼしたと考えている。

質問4) ミトコンドリアDNA(mtDNA)の欠失や多重欠失は母系遺伝では起こらないのか。核遺伝子に異常を来すというのは後天的に、多重欠失の変化が起こったということか。

(回答) 点変異では母系遺伝形式をとるが、多重欠失は一般的には常染色体顕性(優性)または潜性(劣性)遺伝形式である。mtDNA複製に関わる酵素、ヌクレオチド代謝に関わる蛋白、ミトコンドリアの融合と分裂に関わる蛋白、ミトコンドリア形態維持に関わる蛋白をコードする常染色体上の遺伝子の異常により多重欠失を引き起こす。

質問5) 絞り込みのkeywordである“replication”はミトコンドリアに関連したもので絞り込んだのか。coverage 10以上と設定した意味はどうか。

(回答) replicationはミトコンドリアに限らずに用いた。replicationとミトコンドリアに関連した遺伝子で絞り込みを行なった。ゲノムシーケンサーの解読において一般的にはcoverage 25以上の場所は信頼性が高いと言われているが、重要な遺伝子変異を見落とすことがないように10に引き下げて設定した。

質問6) このような複数の遺伝子に関連していることを確かめるためには今後どのように調べたらいいのか。

(回答) ミトコンドリア病が疑われる症例で原因遺伝子が不明な場合には網羅的に解析するため、エクソーム解析や全ゲノム解析を行い遺伝子変異を検索することが必要である。また、PRIMPOLは新規ポリメラーゼとして注目されているため、ミトコンドリア病の組織でのポリメラーゼ活性を調べることなどが重要と考えている。

質問7) ミトコンドリア遺伝子変異が血球で異常がなく筋肉のみで異常であることはどう考えるか。

(回答) 異常mtDNAの割合が臓器によって異なるヘテロプラスミーを示すためと考えられる。

質問8) 発端者の筋生検はこの筋肉で行なったか。他の筋肉で行っていないか。筋病理で何かしらのミトコンドリア異常が出てきそうだが、COX染色は行なったか。電顕での観察で筋病理変化が観察できるのではないか。

最終試験の結果の要旨

(回答) 筋生検は上腕二頭筋でのみ行なった。COX 欠損線維は認めなかった。電顕で筋病理変化が観察されるかもしれないが本研究では行っていない。筋という同一組織内においてもヘテロプラスミーの問題があると考えている。

質問 9) II-2 は発端者と似た表現型だが、遺伝子解析はしていないのか。眼瞼下垂などの筋力低下はなかったか。

(回答) II-2 ではエクソーム解析は行わなかった。発端者で認めた遺伝子変異について、II-2 においてサンガー法で遺伝子解析を行なった。眼瞼下垂などの筋力低下の所見は乏しかった。

質問 10) *PRIMPOL* 変異は遺伝性か、後天的なものか。筋肉の障害は後天的に変化することはあるのか。

(回答) 核遺伝子変異は遺伝性である。mtDNA が活性酸素や紫外線、薬物、老化などの障害で後天的に変化することはある。

質問 11) 発端者の Polg は正常だが、どこまで疾患に *Primpol* が関与しているのか。他の代償機能は認めないのか。

(回答) ミトコンドリア一本鎖 DNA 結合タンパクや複製プロテイン A, *POLDIP2*, *Twinkle* と相互作用するとの報告があるが、代償機能は不明である。*Y89D* 変異の gain of toxic function により mtDNA 障害に影響を及ぼしたと考えた。

質問 12) 全ての遺伝子が関与しているのか。一番の原因遺伝子は *PRIMPOL* で多重欠失を引き起こすという考察か。

(回答) 本症例の mtDNA 多重欠失に最も影響を与えた遺伝子は *PRIMPOL* と考え、*BRCA1* の関与も考えられた。*CPT2* 熱不安定性型 SNP はミトコンドリア障害に影響を与え、その作用を強めたのは *MEFV* と *CARD8* 変異であると考えた。*GJB2* 変異は難聴を重症化させたと考えた。

質問 13) 低血糖発作はどう考えているか

(回答) インスリンを使用していたが、知的障害のためインスリン使用が適切に行われなかったと考えている。

質問 14) 髄液タンパク質が高くなるのは一般的か。髄液の中の炎症の結果が反映されているのか。

(回答) *CPEO* では髄液タンパク質上昇は一般的にみられる。中枢神経系の炎症ではなく、壊死性病変である。

質問 15) 止血の際の血小板のネクロシスにはミトコンドリアが非常に重要な役割を果たすが、核を持たない血小板のミトコンドリアはどうなるのか。血小板などの異常や止血異常などはなかったか。

(回答) 血小板異常や止血異常はなかった。骨髄において血小板に分化する前の核を持つ造血幹細胞～巨核球において核遺伝子異常から mtDNA 損傷をきたす可能性があるため、血小板でもミトコンドリア異常の可能性はある。

質問 16) mtDNA の long PCR は一回でかかったのか。

(回答) 以前に同様の研究手法を行っており、プロトコールに従って LA taq を使い、1回で long PCR を行った。

質問 17) *PRIMPOL* の *Y89D* 変異のアミノ酸の変化で、gain of function がどのような機序で起こるのか。

(回答) チロシンは芳香族アミノ酸で中性を示すが、アスパラギン酸は酸性であり、ポリメラーゼの融点が著しく低下することが報告されているため、タンパク質の二次構造が変化することが示唆される。

質問 18) コネキシンはどの組織に存在し K イオンが関係するか。*GJB2* はミトコンドリア異常にどう影響するのか。

(回答) *GJB2* がコードするコネキシン 26 は K イオンの維持に関わる。内耳、肝臓、乳腺、汗腺、唾液腺、星状膠細胞に多く発現する。*GJB2* の直接の影響はないが、ミトコンドリア障害による難聴を重症化させた相乗効果を考えて。

質問 19) *PRIMPOL* 変異を認めた発端者は近視だったのか。発熱を繰り返し障害が蓄積すると近視が増悪しそうだが、そうではなかったのはどういう機序を想定しているか。

(回答) 発端者は遠視であった。*PRIMPOL* 変異は近視の原因となるという論文が報告されているが、その後の研究では近視ではない眼疾患の患者にも認められることが報告されており、近視との直接の関係は不明となっている。

質問 20) *PRIMPOL* や *BRCA1* の異常がなく、熱不安定性多型や家族性地中海熱でミトコンドリア障害が生じる報告はあるのか。*CPT2* 活性は高温の状態でも落ちているのか。

(回答) *CPT2* の熱不安定性多型はミトコンドリア障害を引き起こす。30 度でも野生型より活性が落ちていると報告されている。*MEFV* 変異のみによるミトコンドリア異常の報告はない。

質問 21) *PRIMPOL* の *Y89D* 変異体における UV ダメージでの細胞生存率は mtDNA 機能に直接反映しているのか。

(回答) *Y89D* 変異体において、DNA ポリメラーゼの低下や複製フォーク速度の低下が証明されているため、UV ダメージによる mtDNA 障害を複製する機能は低下すると考えられる。よって mtDNA 機能は直接障害されると考察する。

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。