

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 588 号	学位申請者	河村 菜実子
審査委員	主査	宮田篤郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	西尾善彦	副査 田川義晃
	副査	桑本共之	副査 奥野若行

主査および副査の5名は、令和3年2月15日、学位申請者 河村 菜実子 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) 脳部位はどのようにサンプリングしたか？

回答) 脳のアトラスに従い目視で脳部位を分画した。

質問 2) 血中と海馬の IGF-1 および BDNF はどこで作られているか？

回答) 血中 IGF-1 は肝臓から分泌され、脳内 IGF-1 はマイクログリアから産生される。血中 BDNF は血小板から分泌される。脳内の BDNF は海馬や扁桃体に多く発現しており、ニューロン、マイクログリアおよびアストロサイトで発現が認められる。

質問 3) Y maze test で認知機能の評価は短期記憶の評価で、海馬と前頭前皮質が関係していると思うが、DIO マウスの前頭前皮質では fractalkine および CX3CR1 の mRNA 発現は変化していないがその解釈はどう考えているか？

回答) 海馬だけの障害でも短期記憶は障害されるので、DIO マウスでは海馬の fractalkine-CX3CR1 シグナルの減少が認知機能の低下を引き起こしたと考えられる。

質問 4) 18a の側脳室内投与 1 時間後に mRNA とタンパク質発現が減少しているものがある。mRNA の減少がタンパク質発現の減少の原因と考えるには時間が早すぎると思うが、どういうメカニズムか？

回答) 18a 投与後の mRNA 発現の減少とタンパク質発現の減少の関連については検討していないので、今後検討していく予定である。

質問 5) 最後の結論で CX3CR1 アゴニストによって学習記憶が改善できる可能性があるとおったが、fractalkine は手に入るものか？

回答) Fractalkine は、生体内では膜結合型と分泌型の2つの形態をとり、分泌型 fractalkine は販売されている。DIO マウスに分泌型 fractalkine を 3 μ g/mouse 側脳室内に投与して 1 時間後に Y maze test を行ったが、長期間の高脂肪食摂取による学習記憶低下は改善しなかった。おそらく、その受容体である CX3CR1 も減少しているためと考えられる。

質問 6) 短期記憶だけではなく長期記憶や記憶の想起に関して何か考えがあれば教えてほしい。

(回答) 本研究では、長期記憶および記憶の想起については検討していないので分からない。

質問 7) 初代培養細胞を用いて、細胞の違いによる fractalkine および CX3CR1 の発現変化を確認しているが、Immunohistochemistry を用いて細胞特異的な発現変化を検討することは可能か？

(回答) Immunohistochemistry を用いることは可能だと思うが、本研究では行っていない。

質問 8) 論文に性差について記載しているところがあったが、マウスではオスとメスで探索行動などに変化がないと思うが、その点について何か報告があるか？

(回答) 探索行動についての報告ではないが、長期間高脂肪食を与えたオスマウスでは、視床下部の fractalkine および CX3CR1 発現が減少するが、メスマウスでは fractalkine は増加し、CX3CR1 は変化しないという報告があり、

最終試験の結果の要旨

fractalkine および CX3CR1 の発現調節は性別によって異なっていると考えられる。

質問 9) ヒトの糖尿病の学習障害は男性と女性で発症率の違いについての報告はあるか？

(回答) 明確に検討した報告はない。

質問 10) 糖尿病モデルマウスの実験(STZ 投与や高脂肪食摂取)は長期的な実験であるが、CX3CR1 アンタゴニスト投与は投与してから 1 時間後に認知機能や学習関連因子の発現を検討しており、短期で検討している CX3CR1 アンタゴニスト投与の実験と糖尿病モデルマウスの実験は同じように考えていいのか？

(回答) 糖尿病モデルマウスの fractalkine および CX3CR1 の減少と CX3CR1 アンタゴニスト投与の実験が同様の条件であるとは考えていない。18a を 1 週間正常マウスの皮下に投与した実験でも認知機能の低下が認められた。

質問 11) シナプス関連因子のタンパク質減少は、細胞自体が死んで減少している可能性はないか？

(回答) コントロール群と比較して DIO マウスおよび 18a 投与マウスの海馬での GAPDH のタンパク質発現に変化は認められなかったため、細胞数の減少によってシナプス関連因子のタンパク質が減少している可能性はないと考えられる。

質問 12) IGF-1 受容体インヒビター(PPP)と BDNF 受容体 TrkB アンタゴニスト(ANA-12)投与で認知機能は変化するか？

(回答) 本研究では検討していないが、ANA-12 投与が認知機能低下を引き起こすという報告はある。PPP 投与と認知機能についての報告はない。

質問 13) 成熟したマウスの認知機能を検討しているが、発生発達段階での fractalkine シグナルの役割はあるか？

(回答) 発生発達段階の fractalkine シグナルが認知機能に影響を及ぼすかは分からない。

質問 14) 両モデルマウスの 1 番の共通点は血糖が高いということだと思うが、細胞実験などでグルコースの作用は検討していないのか？

(回答) 本研究では、グルコースの作用は検討していない。

質問 15) ヒトの糖尿病では IGF-1 が低いというイメージがなく、網膜症などでは一般的に IGF-1 の活性化が網膜症を悪くするというところもあるが、今回の実験では、どちらの糖尿病モデルでも IGF-1 が減少しているが、これは糖尿病モデルマウス特異的なものと考えていいのか？

(回答) 本研究で使用した糖尿病モデルマウスの IGF-1 の低下についてはすでに報告がある。一方、ヒトの糖尿病の病態と完全に一致しているものではないという認識はある。

質問 16) IGF-1 減少の点からみると growth hormone (GH)欠損症の方あるいは脳下垂体の術後の方で GH が低下していて IGF-1 も低下しているような方のモデルではないかと思ったが、GH を投与したときの学習記憶はどうなるか？

(回答) 本研究では、GH については検討していない。

質問 17) Fractalkine は、ニューロンとアストロサイトで発現しているということだが、絶対量としてはどちらの方の発現量が多く、海馬などの脳部位でみられる fractalkine の発現減少はどちらの細胞の変化が強く反映されているか？

(回答) Fractalkine は、アストロサイトにも発現しているが、主にニューロンに多く発現しているため、脳部位での発現減少は、ニューロンでの変化がより強く反映されていると考えられる。

質問 18) 静止型と活性型どちらのマクログリアに作用しているか？

本研究では、マクログリアの形態について検討していないので、STZ 投与マウスおよび DIO マウスで静止型と活性型どちらのマクログリアが多いかは分からない。マクローファージでは、CX3CR1 の発現量は静止型と活性型で変わらないという報告がある。

なお、以上の質疑応答を踏まえ、主査・副査の指導のもと、受理時の学位論文から一部修正を行った。

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)の学位をとるに足る資格を有するものと認定した。