

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 631 号	学位申請者	笠毛 友揮
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査 高嶋 博
	副査	中村 雅之	副査 田川 義晃

主査および副査の5名は、令和3年12月20日、学位申請者 笠毛友揮 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) 1,5-anhydro-D-glucitol (1,5-AG)の血中濃度は知られているが、1,5-anhydro-D-fructose (1,5-AF)の血中濃度の測定結果はあるのか。

(回答) 1,5-AFのヒト血中濃度については未だ十分な研究がなされていない。現段階では当研究室のデータでヒトが1,5-AFを服用した場合、数時間後に血中の1,5-AG濃度が上昇することが測定されたという結果があり、比較的短時間で1,5-AFは1,5-AGに代謝されると思われる。

質問2) 1,5-AFは α -1,4-Glucan lyaseから肝臓で作られるとされるが、この酵素を阻害しないしノックアウトする研究結果はあるか。

(回答) 本研究においては α -1,4-Glucan lyaseの阻害実験は行っていない。今後の臨床応用においては大変興味深いテーマであり、今後検討していきたい。

質問3) 1,5-AFとパーキンソン病の関係についての実験をするにあたり、ヒントになることがあったのか。他の神経変性疾患での研究はされたのか。

(回答) 別の細胞実験で偶然ロテノンを細胞に用いたところ、1,5-AFに保護効果がみられたというのが本研究の出発点であった。1,5-AFの神経保護効果については今回が初めての知見であり、他の神経変性疾患についてはまだ研究されていないが、今後の検討課題としたい。

質問4) 今後の展望について、in vivoの実験のためにロテノン以外の6-Hydroxydopamineなどでパーキンソン動物モデルを作成することはどうか。

(回答) ご指摘の通り、ロテノンをを用いない動物モデルを検討していきたい。

質問5) 具体的な実験について、PC12細胞でロテノンの至適濃度を定める実験をしているが、初代神経培養細胞では50 nMの濃度にするにあたり、実験は行っているのか。

(回答) 初代神経培養細胞の細胞株が十分量得られなかったために、ロテノン濃度については既存の論文を参考に決め、予備実験は少数回のみ試行したためデータとしては提示していない。

質問6) 今回の研究ではin vivoでATPアッセイとミトトラッカー染色をされているが、ミトコンドリア膜電位の測定はしたか。

(回答) 今回の実験では測定はしていない。今後の課題と考えている。

質問7) 1,5-AF投与でミトコンドリア関連のシグナルが増えるが、電子伝達系の活性が起こっているのか。それともミトコンドリアの数が増えているのか。

(回答) 電子伝達系の活性が直接起こっている可能性は否定できないが、今回の研究結果からはミトコンドリアの数が増加していると考えている。

質問7) ミトコンドリアの生合成とあるが、どういうことか。

(回答) ミトコンドリアの生合成とは、biogenesisのことを日本語訳したもの。スライドにあるミトコンドリアDNAの転写翻訳から様々な蛋白合成のカスケード反応が起こり、結果としてミトコンドリアの分裂に至る経路を意味する。

質問8) 様々な種類のミトコンドリア病があるが、1,5-AFのミトコンドリアの保護作用に関してパーキンソン病に特化して研究された理由はなにか。

(回答) 最初に本研究を始めるきっかけは、ロテノンに対して1,5-AFが保護作用があったということが発端であった。ロテノンはパーキンソン病との関連が深く、パーキンソン病をターゲットにして研究をはじめた。

質問9) ミトコンドリア病で、L-アルギニンを投与すると改善を示すが、この1,5-AFについても、ミトコンドリア病をターゲットにして筋力の評価などをするにはどう考えるか。臨床応用するにあたり、パーキンソン病の進行抑制を評価するのは臨床的に困難と考えるがどうか。

(回答) ご指摘の通り、臨床評価においてはパーキンソン病の治療効果判定は困難と予想される。ミ

最終試験の結果の要旨

トコンドリア病をターゲットにしての筋力評価など、客観的に評価ができる項目を用いることを考慮し、今後の研究課題としたい。

質問 1 0) 神経細胞の樹状突起の伸長の評価は、1,5-AF 投与後 24 時間の観察結果か。また、神経細胞の実験にあたりカルチャーは 1-2 週間ほどおいたものを実験に用いているか。

(回答) ご指摘の通り、24 時間後に観察した。また、神経細胞の実験では、培養し 1-2 週間ほどおいて安定した細胞を実験に用いている。

質問 1 1) 1,5-AF には 24 時間で細胞の樹状突起が伸長する作用があり、またロテノンによる突起短縮を抑制する効果もみられているが、この作用は同時に平行してみられていると考えるか。

(回答) ご指摘の通り、1,5-AF は樹状突起伸長とロテノンによる細胞死抑制の 2 つの作用を有するものとする。

質問 1 2) 神経細胞の軸索の観察はされたか。

(回答) 今回の研究では観察していない。今後の課題としたい。

質問 1 3) 1,5-AF を起点に研究されているが、PGC1 α のノックアウトや過剰発現での研究は考えているか。

(回答) 興味深いテーマであり、今後の研究課題としたい。

質問 1 4) AMPK の活性化をきたすものはパーキンソン病に効果があると考えるか。

(回答) 機序としては効果は期待できるが既知の AMPK 活性化作用をきたすメトホルミンでも in vivo 以上のレベルで効果を示す論文は皆無である。1,5-AF が AMPK や PGC-1 α に特異的な作用がある可能性も考え、今後の実験の課題とする。

質問 1 5) ロテノンの細胞毒性のタイムカーブについて 24 時間以降のデータはあるか。ロテノンと 1,5-AF をほぼ同時に投与しているが、時間を開けて投与した研究はされたか。

(回答) ロテノン投与後 3 日の観察では、細胞はほぼ死滅し評価に至らなかった。また、ロテノンを先行して投与して数時間後に 1,5-AF 投与を行った実験でも細胞保護効果はみられた。本研究ではより明確な保護効果がみられた条件を採用した。

質問 1 6) カスパーゼやフォスファチジルセリンによる細胞死の評価はしたか。

(回答) 本研究では評価には MTT とカルセイン染色の 2 つを用い、ご指摘の評価は行っていない。今後の課題としたい。

質問 1 7) 初代神経培養細胞と PC12 以外の細胞では実験したか。

(回答) 予備実験として NB2A 細胞でも実験を行い、1,5-AF の効果はみられた。

質問 1 8) PC12 で NGF を投与して類神経突起の評価はしたか。

(回答) NGF 投与での類神経突起のばらつきのために、初代神経細胞での評価を採用した。

質問 1 9) 1,5-AF 投与後のヒト血中濃度はどの程度か。

(回答) ヒトで計測した実験の報告はまだ皆無であり、今後の研究課題としたい。

質問 2 0) 1,5-AF の受容体はあると考えるか。

(回答) 1,5-AF の受容体はグルコースの受容体 GLUT のサブタイプのどれかに作用すると考えるが、1,5-AF の受容体の研究はまだ皆無であり、今後の課題としたい。

質問 2 1) なぜ 1,5-AF はヒトの体内で比較的速やかに 1,5-AG に変換されると考えるか。

(回答) 1,5-AG はヒト血中に一定濃度で存在する単糖で、その機能はまだよくわかっていない。1,5-AF は本研究でミトコンドリア活性に関わることが判明し、また生体内ですぐに代謝されることからシグナル分子の役割を担っている可能性を考えている。今後のテーマとして研究したい。

質問 2 2) 1,5-AF と 1,5-AG には構造式の違いがあるが、どういう機序で AMPK 活性化や、PGC-1 α 活性の有無をもたらすか。

(回答) 未だ未解明の部分も多いテーマであり、今後検討していきたい。1,5-AF には強い還元力があり、このことが 1,5-AF の作用に関与している可能性がある。

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。