

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 249 号	学位申請者	田邊 史
審査委員	主査	谷本 昭英	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	高嶋 博	副査 宮田 篤郎
	副査	小賤 健一郎	副査 有田 和徳
<p>主査および副査の5名は、平成25年5月28日、学位申請者 田邊 史 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) オートファジーの制御という治療はどのような患者さんに役立つと考えるか？ (回答) 不可逆的神経変性に至っていない病態、すなわち脊髄症状が軽症～中等度例に有用と考える。</p> <p>質問2) p62の発現細胞について特徴はないか？ (回答) p62がどの細胞に有意に発現していたのかという検討は行っていないが、p62免疫染色では、neuronの細胞体よりもその間隙に多数蓄積しており、軸索やグリアの細胞により発現している可能性が推察された。</p> <p>質問3) 頸髄圧迫部で発現しているオートファジーとアポトーシスは関連があるか？ (回答) 別の生体内機構と考える。アポトーシスは細胞レベルで生命体がつ細胞死に作用する機構であり、オートファジーは細胞生存的に作用する機構であると考え。</p> <p>質問4) オートファジー促進剤によって神経死を免れるという研究結果は今回が初めてか？ (回答) 初めてではない。神経変性疾患モデルでラパマイシンなどの投与により神経障害が改善されたとの報告がある。</p> <p>質問5) リチウムのオートファジー亢進メカニズムと躁病への治療作用機序との関連はあるか？ (回答) リチウムはオートファジー開始時に形成される隔離膜形成を促進するといわれている。躁病については、ノルアドレナリンの遊離抑制とセロトニンの合成及び再取り込みを促進することで躁状態を改善するといわれている。</p> <p>質問6) オートファジーが亢進しすぎて、生体にとって危惧されることはないか？ (回答) オートファジーは本来全ての真核生物に存在する機構であり、その亢進により害はないものと考え。亢進しすぎた状態が生体にどう影響するかについては、渉猟しえた範囲ではそのような文献はなかった。</p> <p>質問7) 各実験で使用した cell line (使い分け) が記載されていないが、どの cell line をどの実験に用いたか？ (回答) MEB5 という precursor cell line を低酸素ストレス解析 (Fig. 4A)、LC3 turnover assay (Fig. 4B)、オートファジー薬剤投与による低酸素ストレス解析 (Fig. 6) に用いた。U251MG という glioma cell line を GFP-LC3 cleavage assay (Fig. 4C)、p62 overexpression 解析 (Fig. 5) に用いた。</p> <p>質問8) ニューロン系とグリア系で実験結果の意味、解釈が異なってしまうのでは？ (回答) MEB5 は precursor cell として、今回は用いた。その点についての検討は行っていないが検証が必要である。</p> <p>質問9) U251MG は腫瘍細胞であり、正常細胞と違いアポトーシスなど細胞死において全く逆の動態を示す場合もあるのでは？初代 (正常) 細胞を用いるべきでは？ (回答) p62 を overexpression する細胞に適したヒト正常神経細胞の実験系ができなかったため、やむを得ず用いた。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 10) WST assay は単に細胞の数を評価する方法であり、細胞死と細胞増殖の両方の因子が含まれる。Ki-67 や Brdu などで増殖細胞の評価は行ってないか？

(回答) 指摘通り WST assay は一定期間培養後の細胞数を評価するものである。WST assay の結果では細胞増殖抑制と細胞死を合わせた結果しか評価できていないため、今後は詳細な実験を行いたい。

質問 11) p62 を overexpression した際、p62 の内因性レベルはどれくらいあったか？

(回答) 今回、内因性レベルの検討は行ってない。今後検討が必要である。

質問 12) siRNA による評価は必要なかったか？

(回答) 指摘のように p62 のノックダウン実験を行い特異性をみることが望ましいが今回は行ってない。

質問 13) twy マウスでの靭帯骨化の機序は？原因遺伝子はわかっているか？

(回答) ICR系マウスから近交系を作出する目的で交配中に発見されたマウスで、常染色体性劣性遺伝子によって支配され、原因遺伝子は nucleotide pyrophosphatase (Npps) が同定されている。

質問 14) 実験で用いた塩化リチウムと精神科で実際に服用される量はどのくらい違うか？

(回答) 今回の研究で用いた塩化リチウム投与量は約 400mg/L で、躁病治療で投与される炭酸リチウムの有効血中濃度は約 30~90mg/L である。

質問 15) 実際、オートファジー亢進剤をヒトに投与した報告はあるか？

(回答) 渉猟しえた範囲では報告はない。

質問 16) 脳神経疾患でもオートファジー亢進薬は有効か？

(回答) パーキンソン病やハンチントン舞踏病などの神経変性疾患動物モデルでオートファジー亢進薬を投与し有用であったとする報告がある。

質問 17) 発生機序に脊髄圧迫、虚血、低酸素、梗塞とあるが、twy マウスで梗塞は認めたか？

(回答) twy マウスの梗塞の検討は行ってない。機械的圧迫で脊髄の血管が閉塞している可能性が推察されるが、twy マウスで梗塞を認めたという文献はこれまでにない。

質問 18) 神経細胞が減少しているのはどのようなメカニズムか？

(回答) アポトーシスによる神経細胞死以外に、異常蛋白の蓄積によるオートファジーがおこる。今回の実験では分解されず蓄積した凝集蛋白が神経細胞死に関与していると考えられる。

質問 19) 論文にある神経変性とは具体的にどういう病態を意味するか？

(回答) 神経細胞の減少、脱髄性変化を意味している。

質問 20) 塩化コバルトによる低酸素誘導のメカニズムは？

(回答) 模擬的な低酸素研究で頻用されている薬剤で、細胞内に ROS を産生するとの報告や細胞内のアスコルビン酸を消耗させ二価鉄が不足するとの報告がある。

質問 21) Fig. 6 の塩化コバルトによる低酸素ストレス下 72 時間で細胞数が増加しているのはどう解釈するか？

(回答) 塩化コバルトモデルは細胞死が生じない軽度の低酸素モデルであると解釈している。

質問 22) twy マウスで虚血の評価は Hif1a で検討しているが、Hif1a は虚血特異的か？

(回答) Hif1a は正常状態では検出されず、低酸素状態になって初めてリン酸化され核内へ移行し安定化するといわれているので、虚血や低酸素状態で発現するマーカーと考えてよい。

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。