

## 学位論文審査の結果の要旨

令和 5 年 8 月 17 日

審査委員	主査	上野 正樹		
	副主査	中村 祐		
	副主査	山本 融		
願出者	専攻	医学	部門	(平成27年度以前入学者のみ 記入)
	学籍 番号	19D713	氏名	川北 梨愛
論文題目	Age-related brainstem degeneration through microRNA modulation in mice			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	・	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)

**〔要旨〕**

【背景・目的】ヒトの神経変性疾患で、脳における初期の病理学的変化が脳幹で生じ、その後上行性に病変が進行する可能性が知られている。今回、我々は加齢性変化が初期からみられる解剖学的部位として、脳幹に着目し、加速老化のモデルマウスであるSenescence accelerated mouse prone-8 (SAMP8) を用いて、脳組織の変性に先行するmiRNAの変化を検討した。

【対象・方法】脳の加齢性変化の初期の段階である、生後5月齢のSAMP8と、対照群として同齢のSenescence accelerated mouse resistant-1 (SAMR1) を用いた。各群で6匹、計12匹のマウスを用いて、最初にY-mazeで空間作業記憶を評価し、その後sacrificeし、脳を採取した。各群1匹の脳で組織学的評価を行い、各群の残り5匹の脳は、海馬、脳幹、大脳皮質に分け、miRNAプロファイリングを行った。両群の脳部位別におけるmiRNAの発現量を、venn図を用いて比較し、SAMP8の脳幹において、最も大きな発現量の変化を呈するmiRNAを選別した。

【結果】空間作業記憶は、両群で差はなかった。SAMP8において、脳幹と他の部位のmiRNA発現量を比較し、脳幹において2つのupregulated miRNA (mmu-miR-491-5p、mmu-miR-764-5p)、2つのdownregulated miRNA (mmu-miR-30e-3p、mmu-miR-323-3p) を同定した。これらのmiRNAはSAMR1で脳部位別の発現量に有意差がなく、SAMP8でのみ変化が起こることが分かった。

【考察・結論】SAMP8の脳幹で組織変性が始まった初期に、それぞれのmiRNAがupregulateあるいはdownregulateし、標的となる蛋白の誘導を開始している可能性がある。今回特定されたmiRNAは、神経細胞死や神経細胞の形成に関わるプロセスに関わることが報告されていた。これらのmiRNAの変化は、加齢に関連した脳の病理学的変化の初期段階における、分子学的な機序を解明することに繋がる可能性がある。

令和5年8月16日に行われた学位論文審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

- ① miRNAプロファイリングの対象となった脳組織の部位は、各組織のうちの一部なのか。  
→海馬であれば、CA1領域というような分割は行っておらず、海馬全体である。同様に大脳皮質、脳幹についても特定の部位ではなく、全体である。
- ② SAMP8の5月齢のY迷路試験の結果が多動であったことを、作業記憶が低下する前段階としているが、その他の解釈はどのようなものか。ヒトではどうか。  
→ヒトでも、病初期には長谷川式やMMSEといった認知機能スケールでは低下がないものの、前頭葉の障害によって落ち着きがない認知症患者をみることがある。マウスでも認知症の経過で、同様の行動学的変化がある可能性を考えた。
- ③ 今回特定されたmiRNAの標的遺伝子の候補に挙げられたものに、神経変性に関連しそうな遺伝子はあったか。  
→直接的に関連するものはなかった。今回特定したmiRNAと、神経変性疾患と関連しそうな分子とが関連しているという報告はいくつかあったが、我々が活用した標的遺伝子予測のデータベースには掲載されていなかった。
- ④ 今回の実験計画において、SAMP10ではなくSAMP8を用いた理由は。  
→SAMP8の方が、より広く老化関連の疾患研究に用いられるマウスであったため。
- ⑤ 5月齢のSAMP8を用いた理由は何か。4月齢でも、6月齢でもない理由は何かあるのか。  
→SAMP8で、病理学的変化が脳幹で生じて間もない時期、かつ認知機能障害はまだ目立っていない時期を選択すると、5月齢が最適と考えた。
- ⑥ 加齢促進マウスのmiRNAの解析結果について、加齢と、神経炎症との区別ができるかどうか。  
→現時点ではmiRNAのどの変化が加齢で、神経炎症によるものか、区別が難しい。今回変化のあったmiRNAのmimicsやantagonistをSAMP8に投与することで、どのようにモデル動物の病理に変化が生じるのか、今後の実験で検討していきたい。
- ⑦ マウスのsacrificeから、サンプルを解析するまで、miRNAは安定しているのか。  
→サンプルを採取した後は、RNAlaterに浸透させて保管するため、miRNAは安定している。
- ⑧ 海馬を取り出すときに、組織が障害されてしまう可能性もあるのでは。  
→4%のパラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った後に、脳を取り出している。固定が充分であれば、海馬の分離は比較的容易であった。ただし採取の過程で組織が障害され、miRNA解析に影響した可能性も否定できない。
- ⑨ 脳を部位別に取り出すときには、海馬に脳梁や脈絡叢がついていたかどうか。  
→顕微鏡下の採取ではなかったため、脳梁や脈絡叢が付着していた可能性は否定できない。
- ⑩ 加齢に興味をもって、SAMP8で実験を行っているが、着想したきっかけは。  
→加齢が関連するヒトの神経変性疾患では、Braak仮説があるが、SAMではどのような変化が起こっているのか興味があった。また、高齢化社会でパーキンソン病の高齢発症例が増えており、バイオマーカーになりうるmiRNAの候補の発見にも繋がった。
- ⑪ 今回の実験は脳組織であったが、髄液や血漿などのエクソソームで評価をやるという構想はあるか。  
→実験で灌流固定を行う際に、マウスの血液を採取している。しかし一部のサンプルには溶血などの問題があり、今回の実験では血液をmiRNA解析の対象にしなかった。

など、多くの質疑・応答が行われた。申請者はそのいずれにも明確に応答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有するものと認められた。

掲 載 誌 名	Molecular Medicine Reports		
	第 28 卷, 第 146 号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2023 年 8 月	出版社(等)名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。