





学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・ 	第 373号	氏名	関口和人
審査委員会委員	主査氏名	濱田文彦 	
	副査氏名	松原悦朗 	
	副査氏名	秦聡彦 	
<p>論文題目 Metabolome Characteristics of Liver Autophagy Deficiency under Starvation Conditions in Infancy (新生児期の飢餓状態における肝臓オートファジー欠損のメタボローム特性)</p> <p>論文掲載雑誌名 Nutrients 13, 3206 (2021)</p> <p>論文要旨 【緒言】 成体の肝臓におけるオートファジーは、肝臓の恒常性維持に重要な役割を担うことが知られているが、新生児期の肝臓におけるオートファジーの役割は明らかになっていない。これを解明するため、肝臓特異的オートファジー欠損マウスを用い、特に出生直後の飢餓条件下におけるメタボローム解析(生体内に含まれる代謝物質の総体を解析すること)と肝臓の組織学的解析を行った。</p> <p>【研究方法および結果】 肝臓特異的オートファジー欠損マウス (<i>Atg5^{flax/flax}; Albumin-Cre</i>) と対照マウス (<i>Atg5^{flax/+}; Albumin-Cre</i>) との間には出生直後の飢餓条件下における生存率に有意差を認めなかったことから、肝臓におけるオートファジーは出生後の飢餓下における生存に必須ではないことが明らかになった。飢餓条件下の血清代謝物の分布をガスクロマトグラフィー-タンデム質量分析を用いて経時的に評価したところ、グルコース、ケトン体については両群で同様の経時的推移と検出量を示したが、一部のアミノ酸、遊離脂肪酸群については両群で異なる経時的推移、検出量を呈した。血清代謝物分布の多変量解析 (SIMCA を使用) からは、12 時間飢餓条件下において顕著な群間差を示すことが明らかになった。さらに、12 時間飢餓条件下の有意差代謝物種のパスウェイ解析 (MetaboAnalyst を使用) では、両群の違いにリンゴ酸-アスパラギン酸シヤトル、アスパラギン酸代謝、尿素回路、グリシンおよびセリン代謝など、ミトコンドリアに関連する代謝経路が関与していることが示唆された。電子顕微鏡を用いた飢餓条件下における肝細胞ミトコンドリアの解析から、肝臓特異的オートファジー欠損マウスの肝細胞ではミトコンドリアが大きくなり、クリステの形態異常を示すことが明らかになった。</p> <p>【考察および結語】 出生後飢餓条件下における肝臓オートファジー欠損マウスの生存は、主に糖新生のためのアミノ酸代謝の適応的变化によって保たれることが示唆された。また、肝臓オートファジーの欠損により、ミトコンドリア機能の変化に関連する代謝変化が引き起こされることが示唆された。血清中のコハク酸、フマル酸濃度の変化が、肝臓のオートファジー障害を予測するための指標となりえることが考えられた。</p> <p>本研究は、オートファジー欠損マウスのメタボローム解析を行うことにより、新生児期の肝臓におけるオートファジーの役割を明らかにした意義のある成果である。 このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・論	第373号	氏名	関口和人
審査委員会委員	主査氏名	濱田文彦	(濱田)
	副査氏名	松原悦朗	(松原)
	副査氏名	秦聡厚	(秦)
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> ① なぜ Atg5 KO (ノックアウト) を選択したのか? Atg5 KO と Atg7 KO との相違は? ② この Atg5 KO マウスの吸啜行動開始はどのくらいで開始されるのか? 新生児飢餓状態を本当に反映した実験計画の構築がなされているか? 飢餓期間の設定根拠は? ③ それぞれのマウスをさらに長期の飢餓状態とした場合、どのような結果が予想されるか? ④ トランスクリプトーム、プロテオーム、リピドームの中からメタボロームを選択した理由は? ⑤ なぜ GC-MS を選択したのか? CE-MS などの選択は考慮したか? ⑥ 本研究で用いたマウスとヒトの間では、特に肝のオートファジー機構について、どのような共通点や差異があるか? ⑦ パスウェイ解析に用いた MetPA 法と MSEA 法のそれぞれの特徴や違いは? ⑧ 肝臓特異的オートファジーを欠損する新生児マウスと、同様の成体マウスとの間で、メタボローム解析の結果が異なるのはなぜか? ⑨ 成体マウスでは長期間にわたり肝臓特異的にオートファジーを欠損させると、肝細胞の変性や腫瘍化が認められるが、新生児マウスでは同様のことが起こるか? ⑩ ミトコンドリアの機能解析のデータを示すことが望ましいと思われるが、示さなかった理由は? ⑪ 肝臓特異的なオートファジーの欠損を、どんな臓器がどのようにして補うと考えられるか? ⑫ Fig. 2D: p62 のリン酸化の有無は? 本結果は p62 がオートファジーに単に動員されていないことを示しているのか? ⑬ Fig. 3A, Fig. 4A: エネルギー産生時に脂肪が分解され、パルミチン酸→ステアリン酸→オレイン酸と脂肪酸が合成され、6h/12h では明らかに KO マウスでこれらが増加しているように見える、一方、グリセロールは有意に減少している。この乖離をどう考えるか? ⑭ Fig. 3B: 有意差はないものの、ケトン体産生が Atg5 KO マウスではむしろ増加しているように見られるが、これはケトン産生にはオートファジーが重要でないと考えられるのか?あるいは、何か代償的にケトン産生がなされていると考えるのか? ⑮ ケトン産生について、腎近位尿細管でのアポトーシスの代償性を考慮すると、肝臓だけでなく、腎尿細管とのダブル KO 解析が必要だったのではないか? ⑯ 肝細胞におけるミトコンドリア形態異常をどう考えるか? 善 (保護的)? 悪 (病的)? のいずれが考えられるか? ⑰ Fig. 6: ミトコンドリアの形態変化は、重度の細菌感染で見られる形態変化と類似しているか? <p>申請者は、これらの質疑に対して概ね適切に回答した。 審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 関口 和人

論 文 題 目

Metabolome Characteristics of Liver Autophagy Deficiency under Starvation Conditions in Infancy

(新生児期の飢餓状態における肝臓オートファジー欠損のメタボローム特性)

要 旨

【緒言】

・肝機能は、新生児期においても代謝、解毒、胆汁合成に不可欠である。オートファジーは成人の肝臓において重要な役割を果たすことが知られているが、出生直後の新生児期における肝臓のオートファジーの役割は未だ解明されていない。

・我々は新生児の飢餓期における肝臓のオートファジーの重要性を明らかにするため、肝臓特異的オートファジー欠損マウス (*Atg5^{fllox/fllox}; Albumin-Cre : KO* マウス) を導入し、出生直後の飢餓条件下において対照マウス (*Atg5^{fllox/+}; Albumin-Cre*) と比較した。研究は血清代謝物と肝臓の組織所見に特に焦点を当てて行った。

【研究方法および結果】

・出生直後の飢餓下における生存率を評価した。KO マウスと対照マウス新生仔の間で生存率に有意差を認めなかった。肝臓オートファジーは出生後の飢餓下での生存に不可欠ではないことが判明した。

・ウェスタンブロッティングおよび免疫染色でオートファジー活性の評価を行った。成獣と同様に

新生仔においても KO マウス肝臓のオートファジー活性は対照群に比べ低下していた。

・ 飢餓下の血清代謝物の分布をガスクロマトグラフィー-タンデム質量分析を用いて経時的に評価した。グルコース、ケトン体は両群で同様の経時的推移と検出量を示したが、一部のアミノ酸、遊離脂肪酸群の両群で異なる経時的推移、検出量を呈した。

・ 血清代謝物分布を多変量解析ソフト SIMCA で主成分解析すると、特に飢餓 12 時間で顕著な群間差を示した。抽出された飢餓 12 時間の有意差代謝物種をパスウェイ解析プログラム MetaboAnalyst で解析した。解析結果から「リンゴ酸-アスパラギン酸シャトル」、「アスパラギン酸代謝」、「尿素回路」、「グリシンおよびセリン代謝」といったミトコンドリア代謝に関連した代謝経路の関与が示唆された。

・ 肝細胞のミトコンドリア形態を電子顕微鏡で評価した。飢餓 12 時間の KO マウス肝臓のミトコンドリアでクリステ異常などの形態的变化が観察された。

・ 画像分析プログラム ImageJ によるミトコンドリア計測では、飢餓 1 時間のミトコンドリア計測値は KO マウスと対照群で差が無かったが、飢餓 12 時間の KO マウスの肝臓ミトコンドリア面積は対照群に比して有意に大きかった。

【考察および結語】

・ 出生後の飢餓状態において肝臓オートファジー機能は主に糖新生のためのアミノ酸代謝の適応的变化によって、生存率については補償されることが示された。

・ 代謝経路データベース SMPDB によると、見出された代謝経路群は飢餓状態での代謝において別々の重要な役割を果たす。ミトコンドリア機能はこれら代謝経路の何れにおいてもアンモニア無害化や TCA 回路によるエネルギー生成を通じて貢献する。従って、肝臓特有のオートファジー欠損はミトコンドリア機能の変化に関連する特徴的な代謝変化を引き起こすことが示唆された。

・ 新生児は、肝臓のオートファジーが不足している飢餓状態でもケトン体を生成し得る。これは致命的な栄養危機を回避するための適応メカニズムである可能性がある。

・ 肝臓のオートファジーが不足している新生児では、TCA 回路でコハク酸やフマル酸などのミトコンドリアに関連した代謝物のレベルが上昇していた。これは、重度の細菌感染の条件下でヒト血清データの既報と類似していた。さらなる検討が必要だが、コハク酸やフマル酸の濃度は感染状態を模倣する肝臓のオートファジー機能障害を予測するためのバイオマーカーとなり得ると考えられた。