

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 <b>723</b> 号	氏名 池内真代
審査委員会委員	主査氏名	宮崎英士 
	副査氏名	波多野豊 
	副査氏名	渡邊哲生 
<p>論文題目</p> <p>A pH imbalance is linked to autophagic dysregulation of inner ear hair cells in <i>Atp6v1ba</i>-deficient zebrafish                  (<i>Atp6v1ba</i> 欠損ゼブラフィッシュにおける内耳有毛細胞のオートファジー制御異常と pH 不均衡の関連性)</p> <p>論文掲載雑誌名                  Biochemical and Biophysical Research Communications</p> <p>論文要旨</p> <p><b>目的:</b> 遠位尿細管性アシドーシスは、腎集合管の酸調節を担う V-ATPase の異常により代謝性アシドーシスに加え、感音性難聴を合併することがある。主要な原因遺伝子である <i>ATP6V1B1</i> は、V-ATPase の B1 サブユニットをコードし、このサブユニットは ATP 加水分解と H<sup>+</sup> 輸送に不可欠である。本研究は <i>ATP6V1B1</i> 遺伝子 knockout モデルを確立し、アシドーシスに関連した感音難聴の発症機序を解明することである。</p> <p><b>対象と方法:</b> モルフォリノオリゴヌクレオチドによる <i>atp6v1ba</i> knockdown モデルと、CRISPR/Cas9 システムを用いた <i>Atp6v1ba</i> 欠損ゼブラフィッシュ (<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup>) を作製し、生体内機能を解析した。また、pH 感受性の緑色蛍光タンパクである pHluorin2 を全身に発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> と交配することにより pH 可視化型 <i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> を樹立し、pH の変化を蛍光強度により評価した。</p> <p><b>結果:</b> <i>atp6v1ba</i> knockdown モデルおよび <i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> は野生型と比べて有意に体長が短く、耳石が小さかった。また <i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> は全身性アシドーシスを示した。<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> の内耳有毛細胞では、受精後 24 時間時点では野生型と比べて有意な差を認めなかったが、受精後 5 日目にはアセチル化チューブリン抗体による染色性が低下し繊毛の脆弱化を認めた。電子顕微鏡による解析において、<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> の有毛細胞層は野生型に比べ薄く、さらにはオートファゴソムの形成が見られたため、オートファゴソム形成のマーカーである LC3B を免疫染色したところ、<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> で強く染色された。正常な酸性リソソムの標識に用いられる蛍光色素 pHlys Red および Lysoprime Green を用いたリソソム染色では、<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> においてリソソム内部の pH 調節の異常 (pH の上昇) が確認された</p> <p><b>考察と結論:</b> 本研究の結果より、<i>atp6v1ba</i> 欠損によるリソソム内の pH 異常がオートファジーの機能不全を招き、結果として有毛細胞の恒常性の維持が破綻したと考えられた。ゼブラフィッシュにおいて、有毛細胞は耳石形成に不可欠であることから、<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> では耳石形成異常が生じたと考えられる。また、耳石の大きさが有毛細胞の音感度を決めると言われており、<i>atp6v1ba</i><sup>-/-</sup> は聴力障害を生じていると推測される。</p> <p>本研究では遠位尿細管性アシドーシスの原因遺伝子として同定された <i>atp6v1ba</i> 遺伝子の knockout モデルを確立し、遺伝子の欠損が聴覚障害発症に及ぼす機序の一部を明らかにした。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 ①・論	第 <b>723</b> 号	氏名	池内真代
審査委員会委員	主査氏名	宮崎 英士 	
	副査氏名	波多野 豊 	
	副査氏名	渡邊 哲生 	
<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"> <li>1. dRTAにおける感音性難聴の機序についてはどこまで解っているのか？ 耳石形成不全や有毛細胞障害が生じているのか？</li> <li>2. Atp6v1baのゼブラフィッシュにおける発現にも、ヒトと同様に部位特異性があるのか？</li> <li>3. Atp6v1ba遺伝子欠損ゼブラフィッシュにおいて、acidosisを是正しても耳石形成異常は回復しなかったとのことだが、成長障害や内耳細胞の異常などは回復したのか？</li> <li>4. ゼブラフィッシュの聴力を規定する因子は明確なのか？</li> <li>5. ゼブラフィッシュの聴力を解析する方法はあるのか？本研究では実施していないのか？</li> <li>6. dRTA患者における感音性難聴に、有毛細胞のオートファジーとの関連性は解っているのか？</li> <li>7. ゲノム編集の実験だけでも十分とも思えるがMorpholino oligonucleotideの実験を加えた意義は？</li> <li>8. モルフォリノオリゴヌクレオチドによるknockdownが有効であることをどのように確認しているのか？</li> <li>9. Fig 3, Fig 4, Fig S1～S5は定量化して比較していないが、定量化しなかったのに理由があるのか？</li> <li>10. 電顕や内耳の形態などは、どれくらいの検体数で検討しているのか？</li> <li>11. モルフォリノ核酸はデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬として使用されているが、遠位尿管性アシドーシスの治療薬となりうると考えているか？</li> <li>12. ゼブラフィッシュは蝸牛と前庭は分離していない。将来的により人に近いマウス等のモデルを確立して聴力検査や治療への応用は可能と考えているか？</li> <li>13. Atp6v1baをknockoutしたマウスモデルの先行研究では内耳について検討はしているのか？</li> <li>14. モルフォリノによるknockdownでは翻訳の阻害ほどのくらい続くのか？</li> <li>15. Atp6v1ba knockoutで生じた形態的变化の中でオートファジーに着目した理由はなにか？</li> <li>16. 他臓器における変化、特に石灰化や骨の異常については検討しているか？</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</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 池内 真代

## 論 文 題 目

A pH imbalance is linked to autophagic dysregulation of inner ear hair cells in *Atp6v1ba*-deficient zebrafish  
(*Atp6v1ba* 欠損ゼブラフィッシュにおける内耳有毛細胞のオートファジー制御異常と pH 不均衡の関連性)

## 要 旨

(緒言) 身体の内部や外部の環境変化に応じて体温や pH など身体の状態を一定に保つホメオスタシスの調節機構は、細胞の酵素活性や機能の維持に重要である。V-ATPase は、ATP 加水分解駆動型プロトンポンプであり、腎集合管における H<sup>+</sup>分泌を介して細胞小器官の酸性化と全身の酸塩基恒常性維持に関与している。遠位尿管性アシドーシス (distal renal tubular acidosis: dRTA) は、腎集合管の酸調節を担う V-ATPase の異常により代謝性アシドーシスを来す病態である。dRTA の主要な原因遺伝子として同定された *ATP6V1B1* は、V-ATPase の B1 サブユニットをコードし、このサブユニットは ATP 加水分解とそれに続く H<sup>+</sup>輸送に不可欠である。B1 サブユニットを含む V-ATPase は、精巢上体、眼毛様体、内耳に局在しており、*ATP6V1B1* 遺伝子変異を有する患者は感音難聴の早期発症を合併することが多いが、この合併症の根底にある発症機序は未だ不明である。

(研究対象及び方法) ゼブラフィッシュはヒト *ATP6V1B1* オルソログである *Atp6v1ba* を持つ。我々はモルフォリノオリゴヌクレオチドによる *atp6v1ba* knockdown モデルと、CRISPR/Cas9 システムを用いた *ATP6v1ba* 欠損ゼブラフィッシュ (*atp6v1ba*<sup>-/-</sup>) を作製し、生体内機能を解析した。また、pH 感受性の緑色蛍光タンパクである pHluorin2 を全身に発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、*atp6v1ba*<sup>-/-</sup> と交配することにより pH

の変化を直接モニタリングできる pH 可視化型 *atp6v1ba*<sup>-/-</sup> を樹立し、pH の変化を蛍光強度により評価した。.....  
(結果) *atp6v1ba* knockdown モデルおよび *atp6v1ba*<sup>-/-</sup> は野生型と比べて有意に体長が短く、耳石が小さかった。また *atp6v1ba*<sup>-/-</sup> は全身性アシドーシスを示した。*atp6v1ba*<sup>-/-</sup> の内耳有毛細胞では、受精後 24 時間時点では野生型と比べて有意な差を認めなかったが、受精後 5 日目にはアセチル化チューブリン抗体による染色性が低下し、繊毛の脆弱化を認めた。電子顕微鏡による解析において、*atp6v1ba*<sup>-/-</sup> の有毛細胞層は野生型に比べ薄く、さらにはオートファゴソームの形成が見られたため、オートファゴソーム形成のマーカーである LC3B を免疫染色したところ、*atp6v1ba*<sup>-/-</sup> で強く染色された。正常な酸性リソソームの標識に用いられる蛍光色素 pHlys Red および LysoPrime Green を用いたリソソーム染色では、*atp6v1ba*<sup>-/-</sup> においてリソソーム内部の pH 調節の異常 (pH の上昇) が確認された。.....

(考察) V-ATPase はリソソーム膜に存在しリソソーム内の酸性状態を調節している。リソソーム内を酸性に保つことは、オートファジーのプロセスにおけるリソソーム内の酵素の活性化に不可欠である。特に、有毛細胞の健全な状態の維持にはオートファジーによる細胞内の細胞質成分や細胞小器官の新陳代謝が重要である。本研究の結果より、*atp6v1ba* 欠損によるリソソーム内の pH 異常がオートファジーの機能不全を招き、結果として有毛細胞の恒常性の維持が破綻したと考えられた。ゼブラフィッシュにおいて、有毛細胞は耳石形成に不可欠であることから、*atp6v1ba*<sup>-/-</sup> では耳石形成異常が生じたと考えられる。また、耳石の大きさが有毛細胞の音感度を決定と言われており、*atp6v1ba*<sup>-/-</sup> は聴力障害を生じていると推測される。.....

(結語) *ATP6V1B1* バリエーションによる dRTA に伴う感音難聴の病態形成において、リソソーム内の pH 不均衡によるオートファジー不全と有毛細胞変性との関連を示し、この病態の理解と治療に新たな示唆を与えた。また、ゼブラフィッシュモデルは、その透明性により内耳が直接可視化可能であり、創薬の *in vivo* スクリーニングにも十分な実績を持つことから、本疾患モデルは将来の新たな治療法開発にも貢献する可能性がある。今回作製した *atp6v1ba*<sup>-/-</sup> ゼブラフィッシュモデルや pHluorin2 トランスジェニックモデルは、アシドーシスに関連した聴覚障害の疾患メカニズムや潜在的治療法をさらに研究するための貴重なツールとなりうる。.....