

博士学位論文

論文題目

**脳特異的 MITOL 欠損マウスは成長ホルモンの分泌不全を原因とする
小人症の表現型を示す**

東京薬科大学大学院生命科学研究科生命科学専攻

氏名 松野 圭悟

主指導者 柳 茂

研究室名 分子生化学研究室

目次

第一章 序論	3
1-1. ミトコンドリアとミトコンドリア病	
1-2. 小人症と成長ホルモン分泌不全性低身長症	
1-3. GH の分泌メカニズム	
1-4. 下垂体の構造と下垂体ホルモンの種類	
1-5. 下垂体の分化	
1-6. MITOL (Mitochondrial ubiquitin ligase)について	
1-7. 要旨	
第二章 結果	10
2-1. MITOL ^{F/E, Cre} マウスでは低身長・低体重の表現型が認められる	
2-2. MITOL ^{F/E, Cre} マウスでは GH の分泌が低下する	
2-3. MITOL ^{F/E, Cre} マウス下垂体では分化異常が認められる	
2-4. GH 投与により MITOL ^{F/E, Cre} マウスで見られた低身長、低体重が回復する	
2-5. GH3 細胞における MITOL の発現抑制は GH の発現量を低下させる	
第三章 考察	26
3-1. 結論	
3-2. MITOL ^{F/E, Cre} マウスの有用性	
3-3. MITOL ^{F/E, Cre} マウスに認められた表現系は Nestin プロモーター依存的な Cre の影響ではない	
3-4. 下垂体の分化に対する MITOL の役割	
3-5. GH 分泌に対する MITOL の役割	
3-6. ミトコンドリア機能を介した GH 分泌に対する MITOL の役割	
第四章 実験操作・試薬	30
第四章 参考文献	36
謝辞	40

**脳特異的 MITOL 欠損マウスは成長ホルモンの分泌不全を原因とする
小人症の表現型を示す**

第一章 序論

1-1. ミトコンドリアとミトコンドリア病

ミトコンドリアは動的なオルガネラであり、分裂と融合を繰り返す事で ATP 産生や活性酸素種(ROS)の量的な制御を行うだけでなく、アポトーシスや ER(endoplasmic reticulum)との接触部位である MAM(mitochondrial-associated membrane)を介した Ca イオン流入など様々な制御を行っている (van et al.,2017: Sandoval H et al., 2018: Janikiewicz et al., 2018)。その為、ミトコンドリアの異常は癌や糖尿病など様々な疾患に繋がる事が報告されている。ミトコンドリア病はミトコンドリア DNA(mtDNA)の異常のみでなく、ミトコンドリア蛋白異常でも発症する事が分かっている。全身で様々な症状が見られるが、特にエネルギーを必要とすることが知られている脳や骨格筋、心筋で主症状が見られる。また、ミトコンドリア病では GH (Growth hormone)分泌不全性の低身長が共通の症状として見られるが発症メカニズム等の詳しいことは今だ、不明な点が多い(Rocha et al., 2015)。

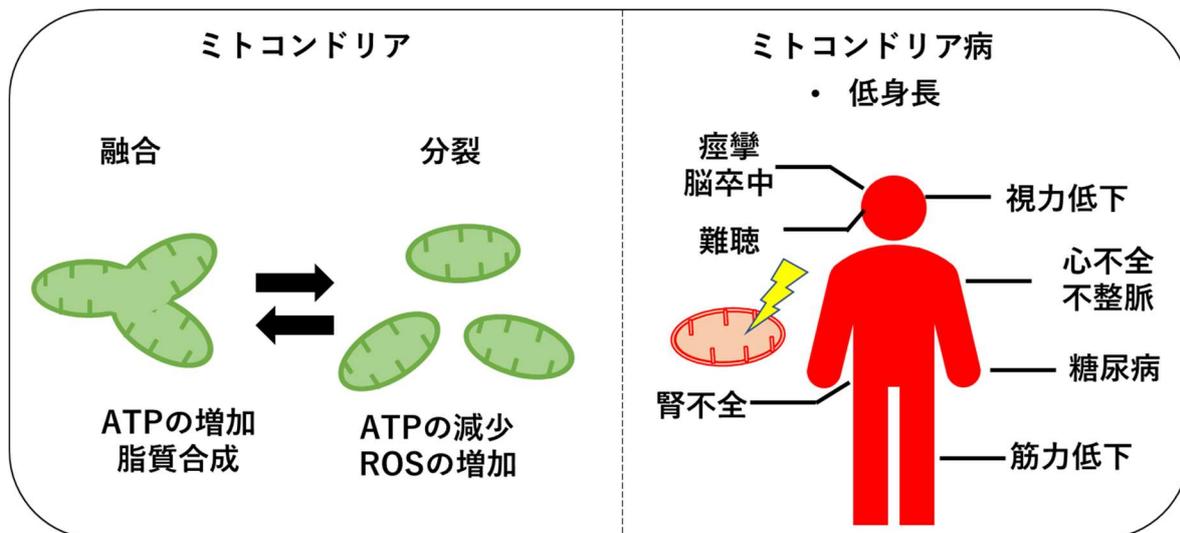


図 1-1. ミトコンドリアとミトコンドリア病

ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返す事で細胞内エネルギーの量的制御を行う。機能不全のミトコンドリアはマイトファジーにより分解される。ミトコンドリア病では共通症状として低身長が見られる。その他、全身で様々な症状が認められる。

1-2. 小人症と成長ホルモン分泌不全性低身長症

小人症は低身長を主症状とする疾患群の総称であり、標準身長-2SD 以下で診断され

る。小人症は原因により、体内発育不全低身長症やラロン型低身長症、軟骨無形成症、突発性低身長症など様々な分類がなされている。その中でも、成長ホルモン分泌不全性低身長症は下垂体前葉ホルモンである成長因子のGHの分泌不全により発症する事が分かっている(Oliveira MH et al., 2019)。症状の多くは低身長とそれに伴う低体重であるが、その他にもGHの分泌低下による動脈硬化などを発症する事例も報告されている(Gazzaruso et al., 2014)。治療はGH投与により行われる一方で、GHは肝臓でIGF-1(insulin growth factor 1)の刺激を介して血糖を上げる為、GH投与の副作用として代謝異常や糖尿病を発症する恐れがある(Shin-Hye et al., 2017)。その為、これらの疾患を併発しているとGH投与による治療を受けられない問題点がある。以上の背景から、根治治療が望まれるが、いまだそこまでは至っていない。

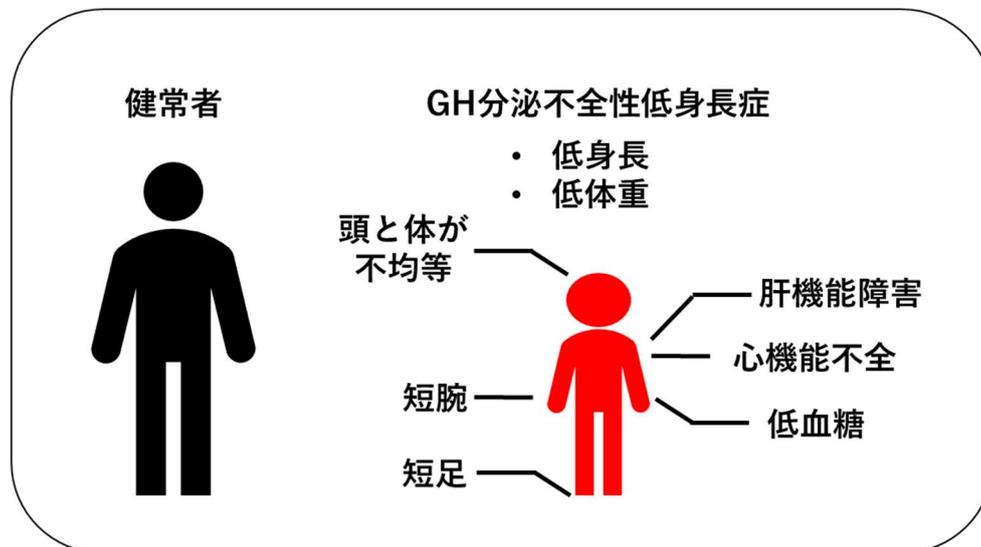


図 1-2. GH 分泌不全性低身長症の症状

GH 分泌不全性低身長症は低身長を主症状とし、それに伴う低体重が見られる。また、副症状として体の不均一や心機能不全等が見られる。

1-3. GH の分泌メカニズム

GH は脳の直下に位置する下垂体から分泌される下垂体ホルモンの 1 つである。GH は視床下部から分泌される GHRH (Growth hormone releasing hormone) の刺激により発現量が制御されており、GHRH が下垂体前葉に存在する GH 分泌細胞の GHRHR (Growth hormone releasing hormone receptor) に結合後、GH の分泌が促される(Godfrey et al., 1993)。また、GH は正のフィードバックにより分泌が促されることも知られてお

り、この場合は GH が GHR (Growth hormone receptor) に結合後、STAT3 を介して GH の分泌が促されることが報告されている(Zhou et al., 2015)。

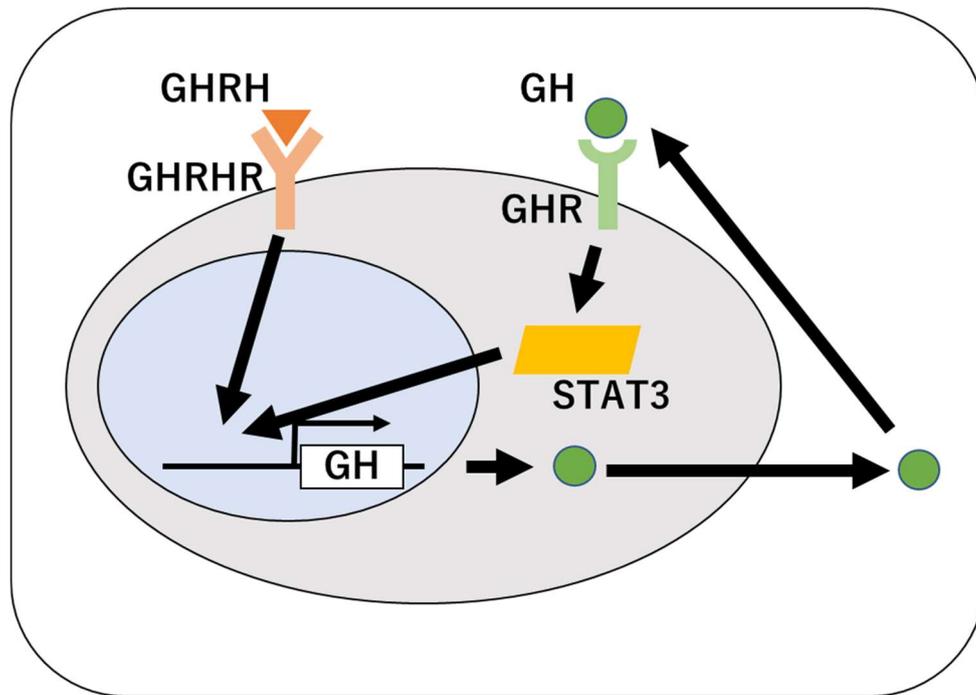


図 1-3. GH 分泌のメカニズム

GH の分泌経路は主には 2 経路存在しており、GHRH により促進する経路と GH による正のフィードバックにより促進される経路である。

1-4. 下垂体の構造と下垂体ホルモンの種類

下垂体はホルモン分泌器官であり、前葉、中葉、後葉から成る。前葉からは GH の他に PRL (Prolactin)、甲状腺刺激ホルモンである TSH (Thyroid stimulating hormone)、黄体形成ホルモンである LH (Luteinizing hormone)、卵胞刺激ホルモンである FSH (Follicle-stimulating hormone) と副腎皮質刺激ホルモンである ACTH (Adrenocorticotropic hormone) が、中葉からはメラニン細胞刺激ホルモンである MSH (Melanocyte-stimulating hormone) がそれぞれの分泌細胞内で合成後、分泌される。後葉は神経の軸索が束になることで形成されており、後葉ホルモンである OXT (Oxytocin)、VP (Vasopressin) は視床下部の神経細胞内で合成後、軸索を通り後葉まで移動し、分泌される。

1-5. 下垂体の分化

下垂体は胎生期 10.5 日目から始まっており、胎生期 14.5 日目には前葉の前駆器官であるラトケ嚢胞が形成される。この時、ラトケ嚢胞のくぼみに神経板が陥入し後葉の前駆器官となる。その後、胎生期 16.5 日で未成熟な下垂体が形成され、胎生期 18.5 日に成熟した下垂体が形成される。この時様々な転写因子が働くことが知られており、幹細胞に Prop1 (Homeobox protein prophet of Pit1)が発現すると後に TSH や GH、PRL 分泌細胞に分化する前駆細胞へと分化する。Prop1 が発現しない細胞は後に ACTH、MSH、LH、FSH や TSH 分泌細胞へと分化前駆細胞へと分化する。Prop1 陽性細胞に Pit1 (Pituitary transcription factor 1)が発現すると GH や PRL 分泌細胞へと分化する細胞の前駆細胞に分化する事が知られている(Ellsworth et al., 2018)。

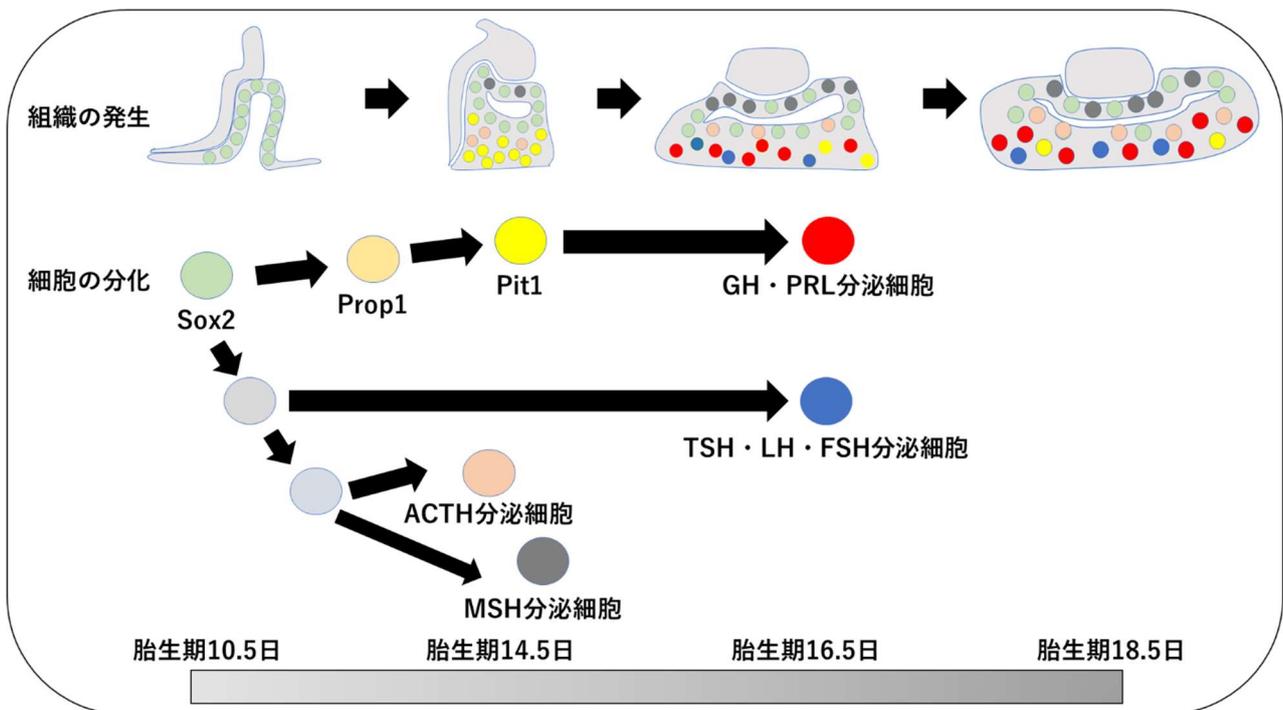


図 1-5. 下垂体の発生と細胞の分化

下垂体は胎生期の 10.5 日目から形成が始まり、18.5 日目には成熟している。下垂体ホルモン分泌細胞は細胞ごとに分化する時期が異なる。また、単一のホルモンを分泌する細胞が主であるが、GH と PRL など、複数のホルモンを分泌する細胞も少なからず存在する。

1-6. MITOL (Mitochondrial ubiquitin ligase)について

当研究室は以前、ミトコンドリア外膜4回膜貫通型ユビキチンリガーゼとして MITOL を同定した(Yonashiro et al., 2006)。これまでの研究により MITOL の機能として、ユビキチン-プロテアソーム経路による Drp1 (Dynamin related protein1)や Mid49 の分解を介したミトコンドリア動態の制御(Yonashiro et al., 2006; Karbowski et al., 2006; Xu et al., 2016)や Mfn2 の活性化を介した MAM の誘導を明らかとしてきた(Sugiura et al., 2013)。また、ES(embryonic stem)細胞の幹細胞性の維持や抗細胞老化など様々な機能を持つ事が報告されている(Gu et al., 2015; Park et al., 2010; Park et al., 2014)。また最近では IRE1 α を介した小胞体ストレスの制御を行う事を報告した(Takeda et al., 2019)。また、in vivo においては Emx-Cre マウスを用いた、大脳・海馬・嗅球特異的 MITOL 欠損マウスにおけるミトコンドリア機能異常を介した神経細胞の異常を報告した(Nagashima et al., 2019)。これらの MITOL の機能から、ミトコンドリアの品質管理の役割を担う MITOL がミトコンドリア病で見られる成長ホルモン分泌不全性低身長症に関連する可能性は十分想定できる。しかしながら、MITOL の脳における機能解明が十分でないことや、ミトコンドリア病における GH 分泌不全の原因解明がなされていないことから、MITOL の GH 分泌における関連は明らかとなっていない。

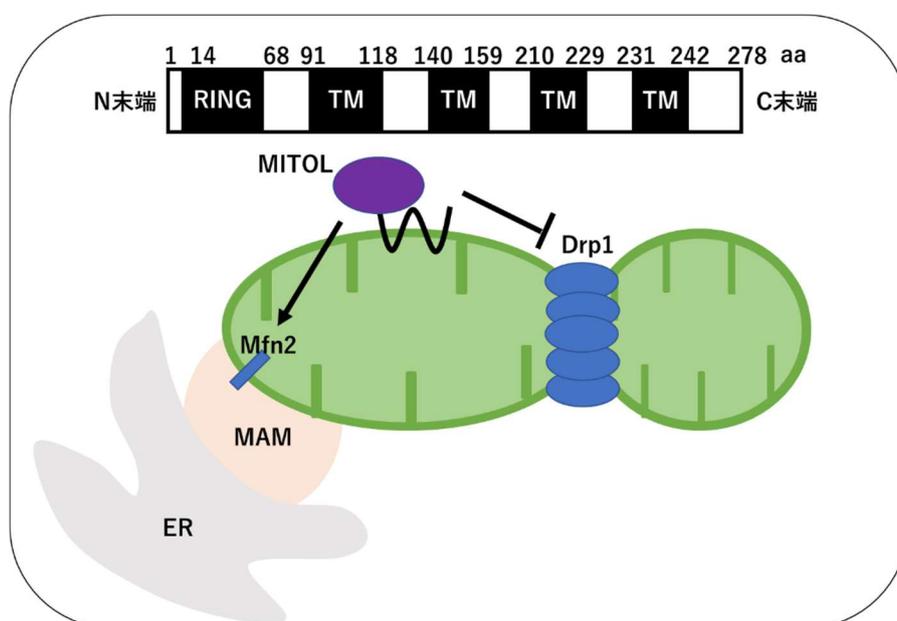


図.1-6 MITOL について

MITOL は4つの TM(transmembrane)ドメインと RING ドメインを持つミトコンドリア外膜局在タンパク質である。MITOL の主な機能について図に示した。

1-7. 要旨

ミトコンドリア病で見られる成長ホルモン分泌不全性低身長症の発症メカニズムは明らかとなっていない。そこで私は、ミトコンドリア品質管理を担う MITOL と成長ホルモン分泌不全性低身長症の関連を明らかにすることを目的とし、Nestin プロモーターに Cre をドライブした MITOL^{+/+, Cre} マウスを用いて作成された脳特異的 MITOL 欠損マウス(MITOL^{F/F, Cre} マウス)の解析を行った。その結果、MITOL^{F/F, Cre} マウスはコントロールのマウス群に比べて有意な身長低下が認められた。また、体重においても顕著な低下が認められた。体の成長に重要な役割を持つ事が知られる下垂体ホルモンである GH(Growth hormone)に着目したところ、下垂体の GH の発現量が mRNA レベルから低下していることを確認した。発現量低下の原因を探索したところ、GH と PRL 分泌細胞の分化に重要な転写因子である Pit1 の mRNA 発現量が低下していることを見出した。また、GH 産生株化細胞である GH3 細胞における MITOL の発現抑制は GH の発現量を低下させた。これらの結果は、MITOL が下垂体の分化に寄与していることを示唆するとともに GH の発現を直接制御していることを示唆する。また、MITOL^{F/F, Cre} マウスが世界で初めてのミトコンドリアタンパク質由来の成長ホルモン分泌不全性低身長症のモデルマウスとなりえる事を示唆する結果である。

**脳特異的 MITOL 欠損マウスは成長ホルモンの分泌不全を原因とする
小人症の表現型を示す**

第二章 結果

2-1. MITOL^{F/F, Cre} マウスでは低身長・低体重の表現型が認められる

脳におけるミトコンドリアの異常はミトコンドリア病を始めとし様々な疾患の原因となっている。そこで脳における MITOL の機能を明らかにするために MITOL^{F/F} マウスと主に神経幹細胞に Cre を発現する Nestin プロモーターに Cre をドライブした MITOL^{+/+, Cre} マウスを掛け合わせて作製された脳特異的 MITOL 欠損マウス(MITOL^{F/F, Cre} マウス)を解析した。8 週齢において MITOL^{+/+, Cre} マウスは下垂体から分泌される GH (Growth hormone)を含む様々なホルモンの分泌低下が報告されている(Galichet et al., 2010)。そこで頭から尻尾の付け根までを身長として 8 週齢の各マウス群を比較すると MITOL^{+/+, Cre} マウスは MITOL^{+/+}マウス、MITOL^{F/F} マウスと比較してわずかな身長の低下が認められたが、MITOL^{F/F, Cre} マウスは MITOL^{+/+, Cre} マウスを含む他の 3 群よりも顕著に低下している事が分かった。また、体重においても MITOL^{+/+, Cre} マウスは 3 週齢から MITOL^{+/+}マウスと MITOL^{F/F} マウスに比べて低下している様子が認められたが MITOL^{F/F, Cre} マウスは MITOL^{+/+, Cre} マウスを含む他の 3 群よりも顕著に低下していることも明らかになった(Fig. 1C,D)。また MITOL^{F/F, Cre} マウスの脳の萎縮も認められた(Fig. 1E)。これらの結果は MITOL 依存的な成長制御機能があることを示唆する。

Figure 1

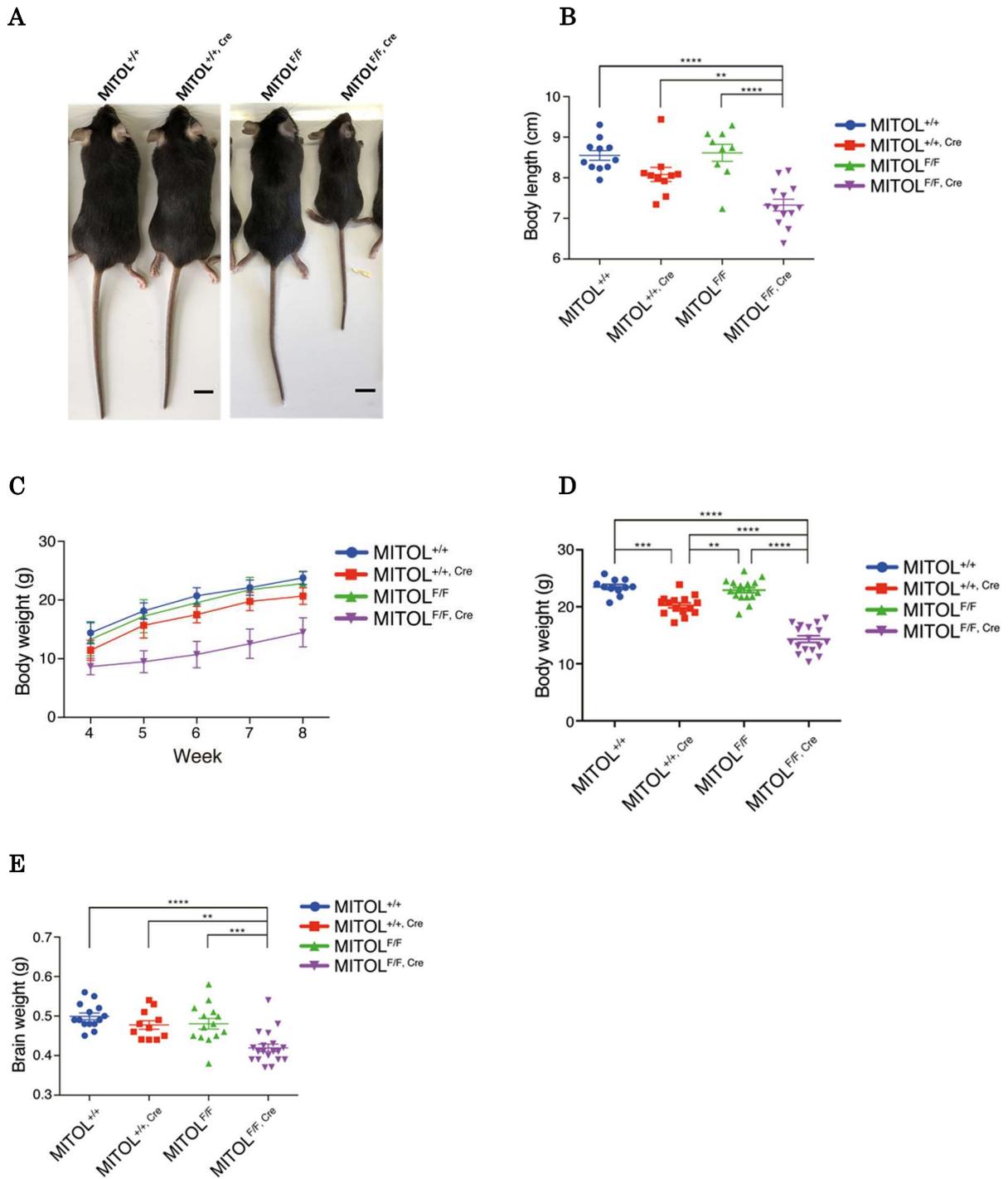


Fig.1. MITOL^{F/F, Cre} マウスでは低身長・低体重の表現型が認められる。

(A)8 週齢における各雄マウスの写真を示した。スケールバー;1cm

(B)A の画像から頭から尻尾の付け根までを身長として比較したグラフを示した。

MITOL^{F/F, Cre} マウスが他の 3 群に比べて有意に小さいことが分かる。エラーバー; 平均値±SEM (MITOL^{+/+}; n=11, MITOL^{+/+, Cre}; n=10, MITOL^{F/F}; n=9, MITOL^{F/F, Cre}; n=13)。

; p<0.01, **; p<0.0001。 Ordinary one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test。

(C)各週齢の雄マウスの体重変化を示したグラフを示した。比較すると MITOL^{F/F, Cre} マウスが他の 3 群に比べて有意に小さいことが分かる。エラーバー; 平均値±SEM (MITOL^{+/+}; n=10, MITOL^{+/+, Cre}; n=13, MITOL^{F/F}; n=15, MITOL^{F/F, Cre}; n=14)。

(D)8 週齢のみの体重で比較したグラフを示した。他のマウス群よりも MITOL^{F/F, Cre} マウスが低下している事が分かる。エラーバー; 平均値±SEM (MITOL^{+/+}; n=10, MITOL^{+/+, Cre}; n=13, MITOL^{F/F}; n=15, MITOL^{F/F, Cre}; n=14)。 **; p<0.01, ****; p<0.001, ****; p<0.0001。 Ordinary one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test。

(E) 8 週齢における脳の重さを比較したグラフを示した。MITOL^{F/F, Cre} マウスが他の 3 群に比べて有意に小さいことが分かる。エラーバー; 平均値±SEM (MITOL^{+/+}; n=14, MITOL^{+/+, Cre}; n=11, MITOL^{F/F}; n=14, MITOL^{F/F, Cre}; n=19)。 **; p<0.01, ****; p<0.001, ****; p<0.0001。 Ordinary one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test。

2-2. MITOL^{F/F, Cre} マウスでは GH の分泌が低下する

MITOL^{F/F, Cre} マウスに見られる成長遅滞が GH の分泌低下によるものかどうか明らかにするために GH を分泌する下垂体に着目した(Fig. 2A,B)。下垂体前葉のホルモン産生細胞は HE 染色により酸性細胞(Acidophil)である GH と乳腺の分化、乳汁合成に重要な PRL(Prolactin)とその他のホルモンを分泌する塩基性細胞(Basophil)と非ホルモン分泌細胞(Chromophobe)に染め分けられるため、HE 染色により MITOL^{F/F, Cre} マウスの下垂体のホルモン分泌細胞の割合を検討した。結果、MITOL^{F/F, Cre} マウスの下垂体では acidophil の割合の有意な低下が認められた。(Fig. 2C, D)。次に GH 産生細胞の割合を検討する為に GH 抗体を用いた DAB 染色法により GH 分泌細胞特異的な染色を行った。その結果、MITOL^{F/F, Cre} マウスでは GH 産生細胞の割合が低下している様子が認められた(Fig. 2E)。実際に GH の発現量をウェスタンブロッティング法により検討した結果、MITOL^{F/F, Cre} マウスでは GH の発現量が有意に低下している様子が認められた(Fig. 2F)。これらのデータは KO マウスに見られる低身長・低体重が GH の分泌低下によるものだと示唆する。

Figure 2

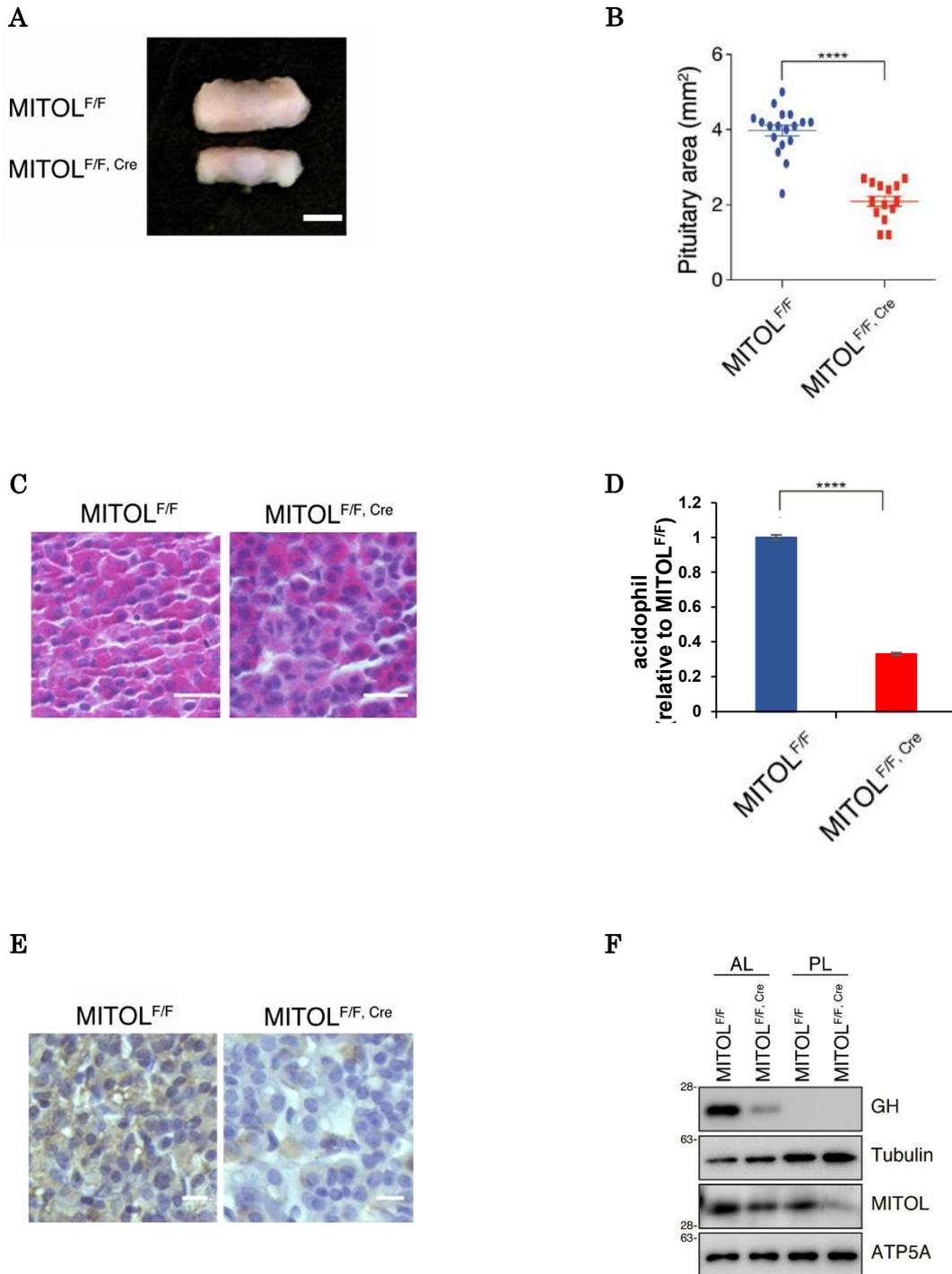


Fig.2. MITOL^{F/E, Cre} マウスの下垂体は萎縮し、GH の分泌が低下している。

(A)8 週齢における雄の下垂体の写真を示した。MITOL^{F/E, Cre} マウスの下垂体はコントロールである MITOL^{F/F} マウスの下垂体に比べて小さいことが分かる。スケールバー:0.1cm

(B)下垂体の面積を比較したグラフを示した。MITOL^{F/E, Cre} マウスの下垂体は優位に小さいことが分かる。エラーバー; 平均値±SEM (MITOL^{F/F} マウス; n=18, MITOL^{F/E, Cre} マウス; n=14)。****; p<0.0001。Unpaired t test。

(C)8 週齢における下垂体の H&E 染色の染色像を示した。下垂体ホルモン分泌細胞は H&E 染色により染め分けることが出来る。赤色が GH,PRL を含む酸性細胞(Acidophil)であり紫色が他のホルモンである塩基性細胞(Basophil)である。核が染まり細胞質が染まっていない細胞は非ホルモン分泌細胞(Chromophobe)である。

(D)C の画像から各細胞タイプの割合を定量したグラフを示した。MITOL^{F/E, Cre} マウスでは Acidophil の割合の有意な低下が認められる。エラーバー; 平均値±SD (MITOL^{F/F} マウス; n=3, MITOL^{F/E, Cre} マウス; n=3) ****; p<0.0001。Unpaired t test。

(E) 8 週齢の下垂体における GH を検出した DAB 染色法の結果を示した。MITOL^{F/E, Cre} マウスでは GH の染色が低下していることが分かる。

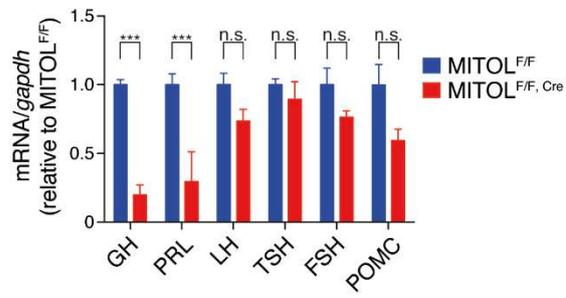
(F) 8 週齢における下垂体を用いたウェスタンブロッティング法の結果を示した。AL が前葉を示し PL が後葉を示す。また、MITOL^{F/E, Cre} マウスの下垂体では GH の発現量が低下している。また、MITOL の発現量も低下している。

2-3. MITOL^{F/F, Cre} マウスの下垂体では分化異常が認められる

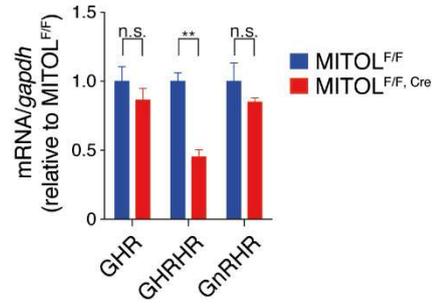
次に、MITOL^{F/F, Cre} マウスの下垂体に他の異常が認められるかどうか確かめる為に qRT-PCR 法を用いて検討を行った。下垂体の前葉からは GH の他に PRL、TSH、FSH、FSH と ACTH が分泌され、中葉からは MSH が分泌される。これらのホルモンのうち ACTH と MSH は前駆タンパク質である POMC(Proopiomelanocortin)の切断産物であることが分かっている(da Silva et al., 2014)。この為、qRT-PCR を用いた下垂体ホルモンの検討は GH、PRL、LH、TSH、FSH、POMC で行った。結果、Fig.2C,D と同様、酸性細胞である GH と PRL の mRNA レベルは顕著に低下していることが分かった(Fig. 3A)。その一方で他のホルモンについては差が見られなかった(Fig. 3A)。GH の分泌は GH による正のフィードバック機構と、視床下部から分泌される GH 刺激ホルモンである GHRH (Growth hormone releasing hormone)の刺激により促進されることが報告されている(Godfrey et al., 1993)。その為、次に GH の分泌低下のメカニズムを検討する為に GH の受容体である GHR (Growth hormone receptor)と GHRH の受容体である GHRHR(Growth hormone releasing hormone receptor)について検討した。結果、GHR の mRNA 発現量は変化しなかった(Fig.3.A)。しかしながら、GHRH と同様に視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモンである GnRHR (Gonadotropin releasing hormone)の受容体である GnRHR (Gonadotropin releasing hormone receptor)の mRNA 発現量は変化しなかった一方で GHRHR の mRNA 発現量は低下した(Fig. 3C)。GHRHR の転写因子として Pit1 が知られており、また、pit1 は GH や PRL に分化する前駆細胞の転写因子としても知られている(Lin C et al., 1992; Asa et al., 1993)。その為、MITOL^{F/F, Cre} マウスにおいて下垂体分化に異常が認められるのかどうか検討した。その結果、pit1 と同様、下垂体分化に重要であり、かつ、pit1 の転写因子として知られている prop1 の mRNA 発現量に差は認められなかった一方で pit1 の mRNA 発現量は低下した(Fig. 3C)。また、生後初期である P0 マウスでも同様の結果が得られた(Fig. 4C)。これらの結果は、MITOL^{F/F, Cre} マウスにおける下垂体の酸性細胞特異的な分化異常が認められることを示唆する。

Figure 3

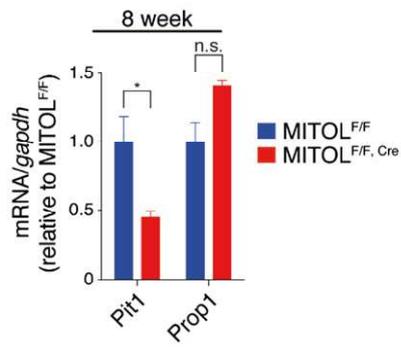
A



B



C



D

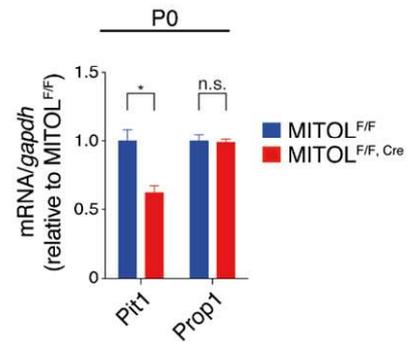


Fig. 3 MITOL^{F/E, Cre} マウスの下垂体では分化異常が認められる

(A-C) 8 週齢の MITOL^{F/F} マウスと MITOL^{F/E, Cre} マウスの下垂体の qRT-PCR 法の結果を示した。データは GAPDH の mRNA 発現量で補正した。

(A) 下垂体ホルモンの mRNA 発現量を検討すると、MITOL^{F/E, Cre} マウスでは好酸性細胞である GH と PRL の発現量が顕著に減少した。

(B) ホルモン受容体について検討すると GH の分泌に関与しない GnRHR の発現量は変化しなかった。また、GH 分泌に関与する受容体のうち、GHR は変化しなかったものの GHRHR は MITOL^{F/E, Cre} マウスにおいて顕著に減少した。

(C) 下垂体分化に重要な転写因子について検討すると MITOL^{F/E, Cre} マウスでは pit1 の mRNA 発現量は低下したものの、pit1 の転写因子である prop1 は変化しなかった。

(D) P0 における転写因子の mRNA 発現量を検討した結果、MITOL^{F/E, Cre} マウスにおいて(C)と同様、pit1 の顕著な発現低下が見られた一方、prop1 は変化しなかった。

(A-C) 平均値±SEM (MITOL^{F/F} マウス; n=3, MITOL^{F/E, Cre} マウス; n=3)。*; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001。2way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test。

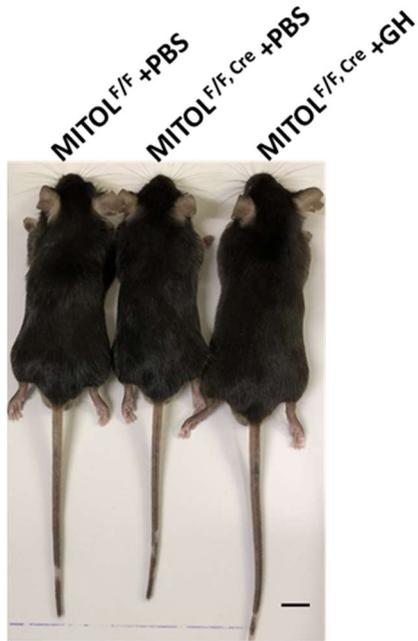
(D) 平均値±SEM (MITOL^{F/F} マウス; n=4, MITOL^{F/E, Cre} マウス; n=4)。**; p<0.01。2way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test。

2-4. GH 投与により MITOL^{F/F, Cre} マウスで見られた低身長・低体重が回復する

MITOL^{F/F, Cre} マウスは GH の分泌不全による低身長症を引き起こしていることが示唆された。その為、成長ホルモン分泌不全性低身長症の治療薬を投与したところ、低身長の回復と、低体重の回復が見られた(Fig. 4A,B)。これらの結果は MITOL^{F/F, Cre} マウスで見られる低身長・低体重は GH 分泌不全によるものであることを示すとともに、GH の感受性に異常がないことを示す。これらのデータは下垂体における GH 発現量の結果と下垂体における受容体の発現量の結果と相関が取れているものと考えられる(Fig. 2,3)。また、実際に治療薬により表現型が回復したことから、MITOL^{F/F, Cre} マウスが成長ホルモン分泌不全性低身長症のモデルとして有用であることを示唆する。

Figure 4

A



B

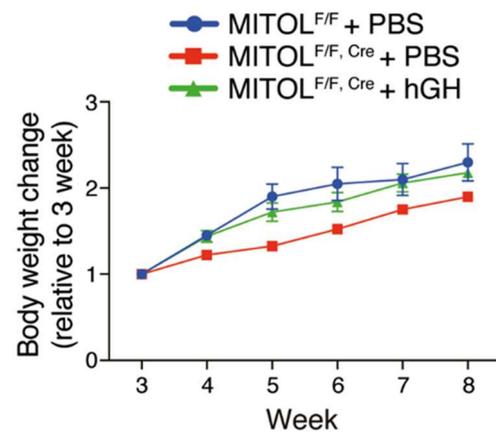


Fig.4. GH 投与は MITOL^{F/F, Cre} マウスで認められた低身長・低体重の表現型を回復する。

(A)3 週齢から GH を投与し 8 週齢になった各マウスの写真を示す。コントロールには PBS を投与している。スケールバー:1cm

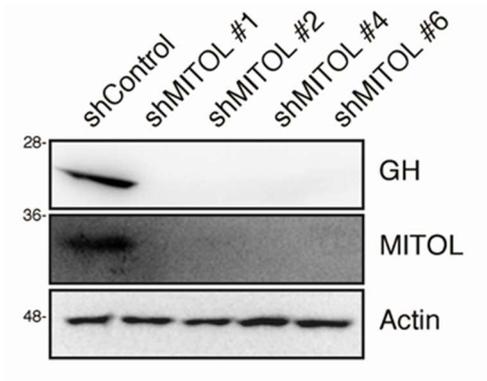
(B)投与し、各週齢になった時の体重の変化を表したグラフを示した。MITOL^{F/F, Cre} マウスに GH を投与すると MITOL^{F/F, Cre} マウスに PBS を投与した群よりも有意に体重が回復する事が分かる。エラーバー; 平均値±SEM (MITOL^{F/F} +PBS; n=3, MITOL^{F/F, Cre} +PBS; n=4, MITOL^{F/F, Cre} +GH; n=5)。

2-5. GH3 細胞における MITOL の発現抑制は GH の発現量を低下させる

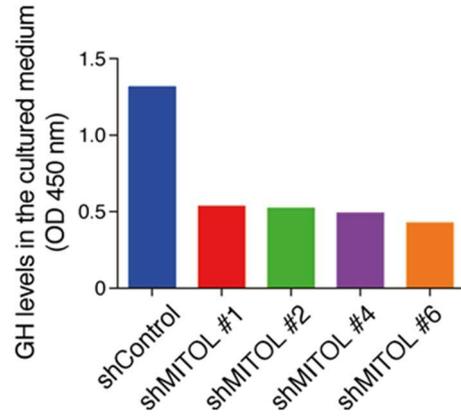
MITOL が GH 分泌の直接的な制御をしている可能性についても検討する為に GH 分泌株化細胞である GH3 細胞にて MITOL 安定的発現抑制株(shMITOL #1,2,4,6)を作製し、GH の分泌について検討した。その結果、MITOL 安定的発現抑制株では GH の発現量が低下した(Fig. 4A)。また、上清の GH 量が低下していることを ELISA 法により確認した(Fig. 4B)。MITOL 安定的発現抑制株は細胞増殖が停滞していたが、GH 投与により回復した(Fig. 4C)。これらの結果は MITOL が GH 発現量の調節を介して細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

Figure 5

A



B



C

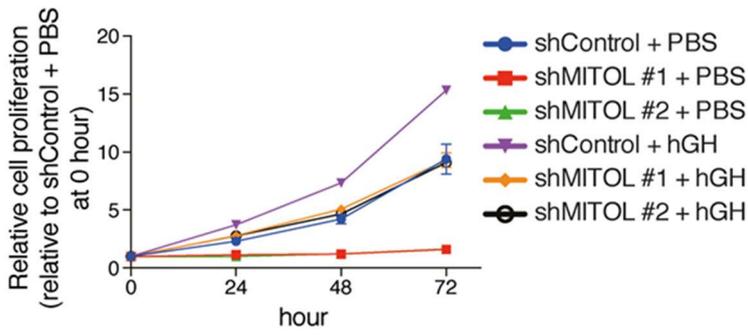


Fig.5. GH3 細胞における MITOL の発現抑制は GH の発現量を低下させる

(A)コントロール細胞と安定的 MITOL 発現抑制株を用いたウェスタンブロッティング法の結果を示した。コントロール細胞に比べて各 MITOL 発現抑制株は GH の発現量を劇的に低下させた。

(B)コントロール細胞と安定的 MITOL 発現抑制株の培養上清を用いた GH の ELISA 法の結果を示した。GH は細胞内で合成され細胞上清に分泌されるが、MITOL 発現抑制株では GH の分泌量が劇的に低下する。

(C)各細胞に GH を添加してからの細胞増殖率を表したグラフを示した。コントロールには PBS を投与している。MITOL 発現抑制株では細胞増殖がほとんど行われたいのに対し、GH を投与するとコントロール程度まで回復する事が分かる。この結果から MITOL 発現抑制株では GH の発現が低下しているものの GH の感受性には異常がないことが示唆される。

**脳特異的 MITOL 欠損マウスは成長ホルモンの分泌不全を原因とする
小人症の表現型を示す**

第三章 考察

3-1. 結論

本研究では成長ホルモン分泌不全性低身長症における MITOL の役割を明らかとする為、MITOL^{+/-, Cre} マウスを用いて作成した MITOL^{F/F, Cre} マウスの解析を行った。その結果、MITOL^{F/F, Cre} マウスは低身長・低体重の表現型を示した(Fig. 1)。また、この表現型が下垂体から分泌される GH の分泌低下によるものであることが明らかとなった(Fig. 2)。GH の発現量が mRNA レベルから低下していたことから、転写因子の検討を行ったところ、pit1 の mRNA 発現量が低下していた一方で pit1 の転写因子である propl の発現量は低下していないことが明らかとなった(Fig. 3)。また、GH 産生株化細胞である GH3 細胞における MITOL の発現抑制は GH の発現量を低下させた。これらの結果は MITOL による GH 分泌の制御は下垂体の分化を介した経路と直接的な経路の 2 経路で存在する事を示唆する。さらには、MITOL^{F/F, Cre} マウスに成長ホルモン分泌不全性低身長症の治療薬である GH を投与したところ体重の回復が見られた。この結果は MITOL^{F/F, Cre} マウスが世界初のミトコンドリア蛋白質由来の成長ホルモン分泌不全性低身長症モデルマウスとして有用であることを示唆する。

3-2. MITOL^{F/F, Cre} マウスの有用性

成長ホルモン分泌不全性低身長症の原因は GH 分泌細胞の分化に重要な役割を持つ PIT1 遺伝子や GH 遺伝子等の異常による遺伝的要因、下垂体断裂や腫瘍による障害等の外的要因、原因不明の 3 種が存在するが、多くは原因不明で発症する 경우가多く、遺伝的要因による成長ホルモン分泌不全性低身長症は非常に稀である。また、最近では NDUFB3 の変異が小人症を引き起こす事が報告されており、ミトコンドリアとの関係も示唆されている(Alston et al., 2016)。その一方でミトコンドリア病はミトコンドリア機能の低下により発症する事が分かっている疾患であり、多くの場合は成長ホルモン分泌不全性低身長症を発症するが、原因は分かっていない(Rocha et al., 2015)。その為、ミトコンドリア機能不全により引き起こされる成長ホルモン分泌不全性低身長症の発症メカニズムの解明は重要である。今回の研究により、ミトコンドリア品質管理を担う MITOL の欠損により成長ホルモン分泌不全性低身長症の表現型を示したことから、MITOL^{F/F, Cre} マウスの解析によりミトコンドリア不全による成長ホルモン分泌不全性低身長症の発症メカニズムの解明が期待される。また、MITOL^{F/F, Cre} マウスが世界に先駆けたミトコンドリアタンパク質由来の成長ホルモン分泌不全性低身長症モデルマウスであると考えられる。

3-3. MITOL^{F/F, Cre} マウスに認められた表現系は Nestin プロモーター依存的な Cre の影響ではない

2-1.でも述べたように 8 週齢の MITOL^{+/+, Cre} マウスは nestin プロモーター依存的な Cre の影響により GH を含む下垂体ホルモンの血中含量の低下が報告されている。その一方で MITOL^{+/+, Cre} マウスに低身長や低体重が認められるとの報告はない。そこで、身長や体重を計測すると身長においては MITOL^{+/+} マウス、MITOL^{F/F} マウスとの差は見られず、体重において MITOL^{+/+} マウス、MITOL^{F/F} マウスよりも低下している結果が得られた(Fig. 1)。しかしながら、MITOL^{F/F, Cre} は身長、体重共に MITOL^{+/+, Cre} マウスよりも顕著な低下を認めた。また、GH の mRNA、タンパク発現量のどちらもとも MITOL^{+/+, Cre} マウスよりも MITOL^{F/F, Cre} マウスの方が低下している結果を得ている(データ未公開)。これらの結果は、nKO マウスで認められた低身長・低体重の表現型は既報の nestin プロモーター依存的な Cre の影響ではなく、MITOL の欠損による特異的な表現型であることが考えられる。

3-4. MITOL は下垂体の分化に重要な役割を持つ

MITOL^{F/F, Cre} マウスにおいて、下垂体ホルモンのうち GH と PRL の mRNA 発現量の低下が認められた(Fig. 3A)。GH と PRL は好酸性細胞であり、pit1 陽性細胞から分化する事が知られている。その為、下垂体の発生・分化に重要な転写因子を検討したところ pit1 の mRNA 発現量の低下を見出した。しかしながら、pit1 の転写因子である prop1 の mRNA 量に変化はなかった。これらの結果から MITOL の未知の機能により pit1 の発現が低下していると考えられる。この未知の機能を解明する為に、prop1 に対する MITOL の役割や pit1 陽性細胞における MITOL の発現抑制系の実験系を構築中である。

3-5. GH 分泌に対する MITOL の役割

GH3 細胞の安定的 MITOL 発現抑制株は GH 発現量の低下を引き起こした(Fig. 4)。この結果は MITOL が下垂体の発生や分化だけでなく GH 分泌細胞内において GH の量的制御を行っている事を示唆する。また、GH の投与により細胞増殖が促進されたことから、GH の感受性に対して役割を持つものではないことが考えられる。私は GH の転写因子である STAT3 の発現が MITOL の発現抑制により低下していることを見出している(未発表データ)。その為、MITOL が STAT3 の制御を介して GH の量的制御をしている可能性が示唆される。しかしながら、この仮説を立証する為には STAT3 に対する MITOL の役割を立証するためのさらなる研究が必要である。

3-6. ミトコンドリア機能を介した GH 分泌に対する MITOL の役割

これまでに GH3 細胞において、NO によって誘導されるミトコンドリアダメージによりサイトカインの放出やアポトーシスが誘導された結果 GH の分泌が低下する事や、ミトコンドリアによるカルシウムバッファリングが GH の分泌を制御していることが報告されており、GH の分泌におけるミトコンドリア機能の重要性が示唆されている (Liu et al., 2017; Johnson et al., 2005)。当研究室で同定された MITOL は MAVS を介した炎症反応の制御や MAM を介したカルシウムイオンの流入の制御に役割を持つ事が報告されている(Yoo et al., 2015; Sugiura et al, 2013)。これらの知見から、MITOL がミトコンドリア機能を介して GH 分泌を制御していることが示唆される。

**脳特異的 MITOL 欠損マウスは成長ホルモンの分泌不全を原因とする
小人症の表現型を示す**

第四章 実験操作・試薬

実験動物

今回の動物を用いたすべての実験は東京薬科大学動物使用委員会の承認を得た後に実施されている。また、これらの動物は東京薬科大学のガイドラインに則り世話と維持をした。

今回使用した動物は MITOL^{+/+}マウス(C57BL/6J)、MITOL^{+/+, Cre} マウス (Tronche et al., 1999)、MITOL^{F/F} マウス、MITOL^{F/F, Cre} マウスの 4 系統である。MITOL^{+/+}マウスと MITOL^{+/+, Cre} マウスは MITOL^{+/+}マウスと MITOL^{+/+, Cre} マウスを掛け合わせることで維持した。MITOL^{F/F} マウスと MITOL^{F/F, Cre} マウスは MITOL^{F/F} マウスと MITOL^{F/F, Cre} マウスを掛け合わせることで維持した。マウスの genotype は生後 2 週間後にしっぽを切断後アルカリ法(50mM NaOH に浸し、95°C で 30min 反応させた後 Tris-HCL で中和)にて DNA を抽出し PCR 法を用いて決定した。PCR プライマーは table1 に示した。身長は解剖の直前に頭からしっぽの付け根までを測定した。体重は各週齢になった日に測定した。

Table1. genotype primer

primer	配列(5'--3')
MITOL-F	CACAGGTACGGTAGGTGTGTAAGC
MITOL-R	ATGGGAATGTGGTTCAGTTGTACC
Cre-F	GTTTCACTGGTTATGCGGCGG
Cre-R	TTCCAGGGCGCGAGTTGATAG

抗体

Mouse anti- α -tubulin antibody、mouse anti- β -actin antibody は sigma から購入した。rabbit anti-TOM20 antibody は Santa Cruz Biotechnology から購入した。Rabbit Anti-hGH antibody は Dako から購入した。Rabbit anti-rat GH antibody は R&D から購入した。Rabbit anti-MITOL antibody は当研究室にて作成した(Yonashiro et al., 2006)。

GH 投与実験

1 回 3.5 μ g/体重(g) の GH(wako)を 50 μ l の PBS に溶かし、皮下注射にて 3 週齢から 8 週齢にかけて平日連日投与した。コントロール群には同様の方法で PBS を投与した。体重は毎朝決まった時間と解剖直前に測定した。身長については解剖直前に測定した。

免疫組織染色法

① 切片の作製

ヘマトキシリン-エオシン染色法(H&E 染色法)とジアノベンジン染色法(DAB 染色法)を行うためにまず初めに PBS で還流したマウスを解剖し下垂体を摘出した。その後、

組織を固定する為に 10%中性緩衝ホルマリン液(Wako)に浸し、4°Cで一日浸透させた。固定後、組織を 70%エタノールに置換した。パラフィン切片を作製する為に、置換した組織をパラフィン自動包埋装置を用いてパラフィンに包埋した。その後マイクロトーム(YAMATO)にて 6 μ m の薄さで組織を切り、MAS コートされたスライドガラス(Matsunami)にマウントする事で切片を作製した。作製した切片を染色前にキシレン(関東化学)に浸し脱パラフィンを行った。その後 100%エタノールから段階的に 80%エタノールに置換し、最終的には純水に置換し、以下の各染色法を行った。

② H&E 染色法

核を染める為に切片をマイヤーヘマトキシリン溶液(Wako)に 2min 浸し、色だしの為に流水にさらした。次に細胞質を染める為に純水で希釈した 0.1%エオシン Y 溶液(Wako)に 20sec 浸し、純水で洗浄後 60%エタノールから 100%エタノールに段階的に置換後、キシレンに浸した。その後マリノール(武藤化学)を用いて封入を行い、カバーガラスをマウントし、これをサンプルとして解析を行った。

③ DAB 染色法

内在性のペルオキシダーゼ活性を失活させるために 3%過酸化水素に 7min 浸し、PBST で洗浄した。その後、hGH 抗体をブロッキング試薬(Dako)で希釈し 4°Cで一晩反応させた。PBST で洗浄後、二次抗体試薬(Dako)を 30min 反応させた。その後、PBST で洗浄を行い、ジアノベンジン反応を起こすために CSA II Biotin-free Tyramide signal Amplification System (Dako)を用いた。次に前述の H&E 染色法と同様の方法で核を染色し、マウントまでを行いサンプル化、解析を行った。

画像解析

これらのサンプルは All-in-one Fluorescence microscope BZ-9000(キーエンス)にて画像を習得し、image Jにて解析と編集を行った。H&E 染色における定量は 50 μ m \times 50 μ m の範囲で定量を行った。

qRT-PCR 法

RNA の精製は PBS で還流後のマウスから下垂体を摘出し、RNeasy kit (Qiagen)を用いて行った。逆転写は Rever tra Ace qPCR RT kit (TOYOBO)を用いて行った。qRT-PCR は KAPA SYBR&FAST Universal (KK4602) (Sigma-Aldrich) を用いて行った。内部標準化には GAPDH を使用した。プライマーは table2 に示した。

Table2. qRT-PCR に用いたプライマー

primer	配列(5'--3')
GAPDH-F	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC
GAPDH-R	CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC
GH-F	ACCTGCACCCGCTGGCTGCTGACAC
GH-R	GCTGCGCATGTTGGCGTCAAACCTTG
Prolactin-F	CTCACTACATCCATACCCTGTATAC
Prolactin-R	CATTTCCCTTTGGCTTCAGGATAGGC
LH-F	GCCGGCCTGTCAACGCAACT
LH-R	GAGGGCTACAGGAAAGGAGA
FSH-F	TGAACTGACCAACATCACC
FSH-R	ACTATCACACTTGCCACAGT
TSH-F	ATGAGTGCTGCCGTCCTCCTCTCC
TSH-R	GGTGCAGTAGTTGGTTCTGACAGC
PMOC-F	GAGGACCTCACCACGGAGAGCAAC
PMOC-R	GCGGAAGTGCTCCATGGAGTAGGA
GhrhR-F	ACCCGTATCCTCTGCTTGCT
GhrhR-R	AGGTGTTGTTGGTCCCCTCT
GhR-F	CCAGGATCTATTCAGCTGTACTATGC
GhR-R	TGGGTCCATTCATGAGCAATT
GnRHR-F	TCTTCTCTATGTATGCCCCAGCTT
GnRHR-R	TGTAGTTTGCGTGGGTCTTGATGA
Prop1-F	CCAGAACCGCAGGGCTAAG
Prop1-R	GGCTATCGGCTGGAGAAGTG
Pit1-F	AGCTGAGCAGGTCGGAGCTTTGT
Pit1-R	GGAAGGCTTGCTGTGCTCCCC

タンパク質抽出

下垂体からのタンパク質抽出は PBS で還流後のマウスから下垂体を摘出し前葉と後葉に分けた後、Lysis buffer (1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 20mM Tris-HCL pH8.0, 150mM NaCl) を加えホモジナイズ処理を行った。その後 BCA protein assay kit (Pierce Thermo scientific)を用いてタンパク濃度を測定後 1 μ g/ μ l になるように Lysis buffer で調整した。その後に sample buffer を加え、5 分間 95 $^{\circ}$ Cにて加熱処理を行い、これをサンプルとした。細胞からのタンパク質抽出は細胞の上清、を回収後スクレーパーで細胞を回収し 1000 \times g で 3 分間遠心し、沈殿物を回収した。その後は上記と同様、Lysis

buffer を加え濃度を測定後、サンプル化した。

ウェスタンブロッティング法

タンパク抽出したサンプルを SDS-PAGE により分離後 PVDF 膜(Millipore)に転写した。ブロット後、PBST で希釈した 5% スキムミルク溶液で 30 分間ブロッキングを行った。抗体反応には Can get signal immunoreaction enhancer solution (TOYOBO) を使用し、1 次抗体は Solution1 で希釈した溶液を 4°C で一晩反応させた。2 次抗体は Solution2 で希釈し、室温で 30 分反応させた。検出には Immobilon western HRP substarate peroxide solution (Millipore) を使用し、LuminoGraph (ATTO) にて検出を行った。

細胞培養

GH3 細胞は JCRB 細胞バンクから購入した。培養は 82.5% Ham's F-10 培地(Sigma)に 15% HS と 2.5% FBS を加えたものを使用し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

shMITOL プラスミドの作製

GH3 細胞の MITOL をノックダウンする為の shMITOL ベクターは pLKO-TRC クローニングベクターを鋳型に作製した。MITOL のターゲット配列はすでに報告されている配列を使用した(Sugiura et al., 2013)。

shMITOL を持つアデノ随伴ウィルスの作製

MITOL の発現抑制を行うためのアデノ随伴ウィルスを作製する為に HEK293T 細胞に shMITOL ベクター、pMDLg/pRRE pRSV-Rev ベクターと pCMV VSVG ベクターを Lipofectamin 3000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。これらを導入した細胞の上清を精製しウィルス溶液とした。コントロールには shMITOL の入っていない pLKO-TRC ベクターを用いた。

MITOL 安定発現抑制 GH3 細胞の樹立

精製したアデノ随伴ウィルスを GH3 細胞に感染させた。感染した細胞をピューロマイシン(500ng/ml)で選択した後に限界希釈法にて単離しクローン化を行い樹立した。

Cell Counting Kit (CCK)-8 proliferation アッセイ

MITOL 安定発現抑制 GH3 細胞、またはコントロール GH3 細胞の培養情勢に 100nM になるように GH(Wako) を添加し 0、24、48、72 時間 37°C、CO₂ インキュベーターで培養した。CCK-8 アッセイは Cell counting kit (同人科学研究所) のプロトコール通りに行った。

ERISA

コントロール GH 3 細胞と MITOL 安定発現抑制株の培養上清を 1 μ g/ml になるように PBS で希釈し、microplate 96well half-area (greiner)に 4°Cで一晩吸着させた。その後、5%スキムミルク/0.05%PBST でブロッキングを行い anti-rat GH antibody を加えた。その後、anti-rat HRP antibody を加え、TMB microwell peroxidase substrate(KPL 50-76-11)で反応させた。その後、Wallac 1420 ARVOsx (amersham phrmacia biotech) で 450nm-570nm の波長を測定した。

統計解析

全ての数値的な実験データは複数回の独立したサンプル、実験からデータを習得し、Prism.6 (GraphPad.)により解析した。

**脳特異的 MITOL 欠損マウスは成長ホルモンの分泌不全を原因とする
小人症の表現型を示す**

第五章 参考文献

Aguiar-Oliveira MH, Bartke A. (201).

Growth hormone deficiency: Health and Longevity. *Endocr Rev*, 40, 575-601.

Alston CL, Howard C, Olahova M, Hardy SA, He L, Murray PG, O'sullivan S, Doherty G, Hield JP, Hargreaves IP, Monavari AA, Knerr I, McCarty G, Morris AA, Thorburn DR, Prokisch H, Clayton PE, McFarland R, Hughes J, Crushell E, Taylor RW. (2016).

A recurrent mitochondrial p.Trp22Arg NDUF3 variant causes a distinctive facial appearance, short stature and a mild biochemical and clinical phenotype. *J Med Genet* 53, 634-41.

Asa SL, Puy LA, Lew AM, Sundmark VC, Elsholtz HP. (1993).

Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1275-80.

Gazzaruso C, Gola M, Karamouzis L, Giubbini R, Giustina A. (2014).

Cardiovascular Risk in Adult Patients with Growth Hormone (GH) Deficiency and Following Substitution With GH- An Update. *J Clin Endocrinol Metab* 99, 18-29.

da Silva AA, do Carmo JM, Wang Z, Hall JE. (2014).

The brain melanocortin system, sympathetic control, and obesity hypertension, *Physiology* 29, 196-202.

Buffo S, Ellsworth, Caitlin E. Stallings. (2018).

Molecular mechanisms governing embryonic differentiation of pituitary somatotropes. *Trends Endocrinol Metab* 29, 510-523.

Galichet C, Lovell-Badge R, Rizzoti K. (2010).

Nesytin-Cre mice are affected by hypopituitarism, which is not due to significant activity of the transgene in the pituitary gland. *PLoS One* 5, e11443.

Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE. (1993).

GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat Genet* 4, 227-32.

Gu H, Li Q, Huang S, Lu W, Cheng F, Gao P, Wang C, Miao L, Mei Y, Wu M. (2015).

Mitochondrial E3 ligase March5 maintains stemness of mouse ES cells via suppression of ERK signaling. *Nat Commun* 6, 7112.

Jsnikiewicz J, Szymanski J, Malinska D, Paralas-Krawczyk P, Michalska B, Duszynski J,

Giorgi C, Bonora M, Dobrzyn A, Wieckowski MR. *Cell Death Dis* 9, 332.

Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. (2007).

The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178, 71-84.

Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG. (1992).

Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360,765-8.

Nagashima S, Takeda K, Ohno N, Ishido S, Aoki M, Saitoh Y, Takeda T, Tokuyama T, Sugiura A, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. (2019).

MITO deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress. *Life Sci Alliance* 2, e201900308.

Moller N, Jorgensen JO. (2009).

Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, And Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocr Rev* 30, 152-77.

Park YY, Lee S, Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ, Cho H. (2010).

Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci* 123, 619–626.

Park YY, Nguyen OT, Kang H, Cho H. (2014)

MARCH5-mediated quality control on acetylated Mfn1 facilitates mitochondrial homeostasis and cell survival. *Cell Death Dis* 5, e1172.

Rocha V, Rocha D, Santos H, Sales Marques J. (2015).

Growth hormone deficiency in a patient with mitochondrial disease. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 28, 1003-4.

Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsiki Y, Ishido S, Kudo Y, McBride HM, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. (2013).

MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol Cell* 51, 20-34.

Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Uda A, Tokuyama T, Ito N, Fukuda T, Matsushita N, Ishido

- S, Iwawaki T, Uehara T, Inatome R, Yangagi S. (2019).
MITOL prevents ER stress-induced apoptosis by IRE1 α ubiquitylation at ER-mitochondria contact sites. *EMBO J* 38, e100999.
- Xu S, Cherok E, Das S, Li S, Roelofs BA, Ge SX, Polster BM, Boyman L, Lederse WJ, Wang C, Karbowski M. (2016).
Mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 controls mitochondrial fission and cell sensitivity to stress-induced apoptosis through regulation of MiD49 protein. *Mol Biol Cell* 27, 349-59.
- Van der Blik AM, Sedensky MM, Morgan PG. (2017).
Cell biology of the mitochondrion. *Genetics* 207,843-871.
- Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, Fukuda T, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Sado K, Hotta H, Yamamura H, Inatome R, Yanagi S. (2006).
A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25, 3618-26.
- Yoo YS, Park YY, Kim JH, Cho H, Kim SH, Lee HS, Kim TH, Sun Kim Y, Lee Y, Kim CJ, Jung JU, Lee JS, Sho H. (2015).
The mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 resolves MAVS aggregates during antiviral signaling. *Nat Commun* 6, 7910.
- Zhou C, Jiao Y, Wang R, Rwn SG, Wawrowsky K, Melmed S. (2015).
STAT3 upregulation in pituitary somatotroph adenomas induces growth hormone hypersecretion. *J Clin Invest* 125, 1692-702.

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導頂いた分子生化学研究室の柳 茂教授に深く感謝いたします。博士課程後期からである私を受け入れて頂き、研究のいろはをご指導して頂いたことに本当に感謝いたします。

研究指導を始め論文指導など、多くの場面でご指導頂きました長島 駿助教授に深く感謝いたします。

研究を進めるうえで様々なアドバイスやお力添えを頂きました松下 暢子准教授、福田 敏史講師、稲留 涼子先生、徳山 剛士研究員、武田 啓佑研究員に深く感謝いたします。

また、分子生化学研究室の皆様、特に博士課程の椎葉 一心君に深く感謝いたします。

ゲノム病態医科学研究室の深見 希代子教授には副指導教官としてご指導頂きました。深く感謝いたします。

免疫制御学研究室の田中 正人教授には副指導教官としてご指導頂きました。深く感謝いたします。

最後になりましたが、博士課程後期まで進学する事に理解、応援してくれた家族に感謝します。