

氏名（本籍）	渡辺 亮平
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 9961 号
学位授与年月	令和 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	TDP-43 proteinopathy における Ataxin-2 の病理 生化学的検討

主査	筑波大学教授	博士（医学）	松丸 祐司
副査	筑波大学准教授	医学博士	内田 和彦
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	高橋 晶
副査	筑波大学講師	博士（医学）	辻 浩史

論文の内容の要旨

渡辺亮平氏の博士学位論文は、TDP-43 proteinopathy における Ataxin-2 の病理を生化学的に検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）前頭側頭葉変性症（Frontotemporal lobar degeneration: FTLD）と筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は、それぞれ前頭側頭葉と運動神経系を障害の主領域とする神経変性疾患である。両者では臨床的・遺伝的な重畳があり、共通する蛋白質が患者脳内に凝集・蓄積することから、同一の疾患スペクトラム（FTLD-ALS）として捉えられている。TAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）は FTLD-ALS における主要な蓄積蛋白質であり、TDP-43 の蓄積がみられる症例は TDP-43 蓄積症（TDP-43 proteinopathy）と総称される。一方、Ataxin-2（ATXN2）は RNA 結合能を持ち、*ATXN2* exon 1 内の CAG/CAA リピートの高度伸長変異が家族性脊髄小脳変性症 2 型の原因として知られてきた。しかし、この CAG/CAA リピートの中等度伸長変異は TDP-43 蓄積のある FTLD や ALS の臨床的表現型の修飾因子にもなることが報告され、さらに ATXN2 が TDP-43 の異常な修飾を促進することから、ATXN2 は TDP-43 蓄積症の病態機序にも関与すると考えられるようになった。多くの FTLD-ALS 関連蛋白質は患者脳内で局在変化を起こすが、ATXN2 の患者脳を用いた病理学的な検討の報告は未だ乏しい。このような背景から、著者は TDP-43 の蓄積がみられる FTLD 症例（FTLD-TDP）の病態における ATXN2 の役割を実際の患者脳を用いて解明することを目的とし、感度の高い免疫組織化学的手法および生化学的手法を用いて正常対照例と FTLD-TDP 症例の脳における ATXN2 の細胞内動態の検討を行ったものである。

（対象と方法）まず著者は、ヒト脳組織内の ATXN2 を免疫組織化学染色により最も高感度に検出しうる組織固定法および抗原賦活法の条件の決定を行っている。次に著者は、正常対照例の脳標本を用いた免疫組織化学染色により ATXN2 の脳内分布および細胞内局在を検討した他、ATXN2 抗体および細胞質オルガネラマーカーもしくは ATXN2 の関連蛋白質に対する抗体による蛍光二重染色画像を用いた定量的共局在解析により、ATXN2 のより詳細な細胞内局在の検討を行っている。併せて著者は、ヒト脳内で得られ

た ATXN2 の細胞内局在の知見を再認するため、培養細胞とマウス脳を用いたポリソームプロファイル解析を行っている。さらに著者は、FTLD-TDP 症例の脳標本を用いても前述した共局在解析を実施した他、正常対照例と FTLD-TDP 症例、各数例の脳検体を用いて、各々の脳組織における ATXN2 の発現レベルを免疫組織化学的・生化学的手法により定量的に解析し、各群の結果を統計的に比較している。

(結果) 免疫組織化学染色による ATXN2 の陽性像は、4%パラホルムアルデヒド固定された脳浮遊切片を Tris-EDTA 緩衝液 (pH9.0) 中で抗原賦活した場合にもっとも強かったため、著者らは以下の実験で本条件を採用している。その結果、ATXN2 はヒト脳内で広範かつほぼ均等に分布しており、神経細胞内では細胞質内と近位樹状突起内の双方に局在していた。また、神経細胞内の ATXN2 はリボソームマーカー ribosomal protein S6 (RPS6) および RNA 安定化に関わる分子である poly-A binding protein 1 (PABP1) と強く共局在し、小胞体マーカー Calnexin とも部分的に共局在していたが、リソソームマーカー、ゴルジ装置マーカー、TDP-43 とは共局在しなかった。マウス脳および培養細胞を用いたポリソームプロファイル解析では、ATXN2 は RPS6 とともにポリリボソーム画分に存在した。FTLD-TDP 患者脳では、ATXN2 は正常対照例においてと同様の局在パターンを示した他、FTLD-TDP に特徴的であるリン酸化 TDP-43 陽性構造にも共局在した。さらに、ATXN2 による免疫反応性は患者脳において顕著に減弱していた。浮遊脳切片の蛍光染色画像および凍結脳のウェスタンブロットをそれぞれ定量解析して統計的に比較したところ、患者脳内では ATXN2 の発現レベルが正常対照例と比較して有意に減少していた。一方、ATXN2 の関連分子である RPS6 および PABP1 の発現レベルは両群間で有意差を示さなかった。

(考察) 著者は、ATXN2 の細胞内局在が過去研究で示されてきた核周部細胞質に加えてより末梢側の領域においても確認し、このことから ATXN2 は過去の研究が示す以上に細胞内の幅広い領域で機能していることを明らかにしている。また著者は、*in vitro* および動物モデルによる過去研究で示されてきた ATXN2 の翻訳機構との関連や RNA 安定化への寄与といった生理的機能を、ヒト脳においても免疫組織化学的・生化学的手法により解明している。また著者は、FTLD-TDP 患者脳の免疫組織化学的・生化学的解析により示された ATXN2 レベルの減少は、TDP-43 による神経毒性を減衰させるための二次的反応であるか、もしくは神経変性の増悪に関与する要因としての意義があると考察している。さらに著者は、患者脳のリン酸化 TDP-43 陽性構造に ATXN2 が共局在した結果から、FTLD-TDP における TDP-43 の凝集・蓄積過程に ATXN2 が少なくとも部分的に関与することにより、神経変性を促進している可能性を明らかにしている。

(結論) 著者は、ATXN2 の翻訳機構および RNA 代謝への関与をヒト脳において解明し、さらにその FTLD-TDP 病態への関与についても明らかにした。著者は本研究より ATXN2 が FTLD-TDP の病理過程においても重要な役割を果たしており、今後の同疾患の治療標的の重要な候補の一つとなり得ることを示した。

審査の結果の要旨

著者は、ヒト脳における ATXN2 の詳細な分布と細胞内局在を初めて明らかにした。また著者は、FTLD-TDP 患者脳における ATXN2 の低下および FTLD-TDP の特徴的な TDP-43 陽性構造における ATXN2 の共局在を初めて明らかにした。著者の研究はきわめて緻密に計画実行されており、その結果は FTLD-TDP という難病の新規治療につながると考えられる。

令和2年12月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。