

氏名（本籍）	赤松 恵（大阪府）			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 7029 号			
学位授与年月	平成 26 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	筋萎縮性側索硬化症疾患モデルの開発と異常タンパク質封入体の解析			
主	査	筑波大学教授	理学博士	岡村 直道
副	査	筑波大学教授	博士(医学)	島野 仁
副	査	筑波大学准教授	博士(医学)	新井 哲明
副	査	筑波大学准教授	博士(医学)	柳川 徹

## 論文の内容の要旨

### (目的)

近年、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 患者脳より Transactive respons DNA-binding protein 43; TDP-43 というタンパク質が発見され、孤発性 ALS の運動ニューロン内に封入体として蓄積していることが明らかとなった。しかしながらこの封入体の形成が細胞死や細胞機能に影響しているのかどうかについては明らかではない。孤発性 ALS の原因としては、他にグルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の RNA editing 異常, RNA 代謝異常, タンパク分解酵素系の異常やグリア細胞の異常なども考えられている。生体内ではこれらの要因が複合的に関わりあって ALS の発症に関わっているものと考えられる。このような脳内の複合的な要因を検討するには *in vitro* の実験系では不十分であり、また、遺伝子改変動物では作成に時間と費用がかかってしまう。そこで、本研究は *in utero* electroporation(EP) でのマウス胎仔側脳室内への遺伝子導入法を確立して神経変性疾患モデルマウスの作製を試みるとともに、ALS 疾患関連遺伝子である human TDP-43 (hTDP43) を導入して、TDP-43 封入体の形成過程や含有物質、神経細胞への影響を解析することで ALS 発症メカニズムを明らかにすることを目的として行われた。

### (対象と方法)

EP により E12.5 マウス胎仔側脳室内に DNA 溶液を注入し、大脳皮質第 V 層運動野付近に目的の

遺伝子を導入した。次に TDP-43（全長および C 末断片，各野生型と変異型）を EP し、胎仔脳（胎生 15.5 日齢，E15.5）および成体脳（生後 7 日目；P7，21 日目；P21）について、封入体形成と細胞死を検討した。形成された封入体の解析は免疫組織染色法および電子顕微鏡観察によって行った。

#### (結果)

EP を行う時期や電極の向きを調整することで皮質 V 層に目的のタンパク質を発現させることが可能となった。また、複数の遺伝子を同一細胞内に発現させることも可能であった。

hTDP-43 の導入を行ったところ、全長 TDP-43 は野生型・変異型とも主に核内に存在した。また、胎仔期にのみ一部の細胞で核周囲に halo 状に広がるリン酸化されていない封入体が観察されたが、このような凝集を持つ細胞の核は変形していると共に、核からの TDP-43 の消失が認められた。

一方、C 末断片 TDP-43 の野生型・変異型を導入したマウス脳では、胎仔期から成体期において細胞質内に点状・球状の封入体や、細胞質内に広がった凝集体が観察され、全長 TDP-43 を EP した場合とは明らかに異なった。これらの封入体のほとんどはリン酸化やユビキチン化されている TDP-43 を含み、ヒト ALS の病理を反映させることが出来た。また、電子顕微鏡による観察で、細胞質内封入体にミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官が含まれていることを明らかにした。さらに、細胞質内封入体のみならず核内封入体も多く観察され、核内封入体はクロマチンを巻き込む形で存在し、一部は核膜の内側に架橋を形成していた。

マウス胎仔脳内のアポトーシスを生じている細胞数について検討したところ、C 末断片 TDP-43 導入マウスで有意に増加しており、TDP-43 封入体により細胞死が引き起こされる可能性が示唆された。全長 TDP-43，C 末端 TDP-43 のいずれにおいても野生型と変異型の間には明確な違いは観察されなかった。

#### (考察)

EP を行う時期や電極の向きを調整することで大脳皮質の目的の位置に遺伝子を導入することが可能となった。これまでの報告と同様、C 末断片型 TDP-43 が封入体形成の一因であることが本研究でも再現された。一方、本研究において全長野生型 TDP-43 を導入した場合でも核周辺の封入体が確認されたことは、孤発性 ALS の発症メカニズムを解明する上で有意義な結果と考えられる。また、C 末断片 TDP-43 を導入したマウス脳の細胞質内封入体中にミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官が含まれていること、核内封入体がクロマチンと結合していたことから、TDP-43 の封入体形成が核内外の正常な神経細胞機能に影響を与えている可能性も考えられ、これらの知見は新たな ALS 発症メカニズムを示唆するものといえる。

### 審査の結果の要旨

(批評)

本研究で開発された *in utero electroporation* によるマウス胎仔側脳室内への遺伝子導入法は簡便に生体内の環境を再現することが可能であり、また、タンパク質・siRNA なども導入できることから ALS の発症メカニズムの解明のみならず他の神経変性疾患の研究にも応用が可能な新たなモデル実験系を提供でき、実際にその解析によって ALS 発症メカニズムについての新たな知見が得られたことは高く評価できる。

平成 25 年 12 月 27 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。