

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 倉 地 由 季 子

本研究は、常染色体劣性の遺伝形式を示す神経セロイドリポフスチン症 (neuronal ceroid lipofuscinosis:NCL) の幼児型 (late infantile NCL:LINCL) の病因と病態を明らかにするために、原因遺伝子である *CLN2* (ceroid lipofuscinosis, neuronal 2) に関し、*CLN2* 蛋白の発現の分布や発現時期の解明 (実験 1)、そして簡便な診断法の可能性の検討を行ない (実験 2)、さらに遺伝子解析の同意を得られた症例において *CLN2* の解析 (実験 3) を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 実験 1: *CLN2* 蛋白の脳を含めた臓器における発現と、発達に伴う発現の変化を調べるため、*CLN2* 蛋白の N 末端と C 末端を認識するウサギ抗血清 (anti-*CLN2*-N と anti-*CLN2*-C) を作製した。吸着試験後の血清では認められなかった *CLN2* 蛋白に相当する band は、ヒト脳の immunoblotting で両抗体共に認められ、抗体の特異性を確認した。作製した抗体を用いて immunoblotting と immunohistochemistry を行なった結果、*CLN2* 蛋白は脳と内臓臓器に広範な分布を認めた。immunohistochemistry においては、特に Kupffer 細胞やペリサイトなどの食食機能を有する細胞に強く発現していた。また、*CLN2* 蛋白の発現は満期産の頃からわずかに出現し、幼児期に増強していた。電顕所見において通常認められる curvilinear bodies (CLB) 以外に finger print profiles (FPP) を認めた LINCL、さらに若年型 (juvenile NCL:JNCL) の脳では、*CLN2* 蛋白発現が示され、電顕所見が CLB の LINCL は *CLN2* 蛋白の欠損が示された。

2. 実験 2: 造血関連組織の剖検組織、さらに末梢血リンパ球、線維芽細胞、リンパ芽球において、作製した抗体をもちいて immunoblotting と immunohistochemistry を行なった。正常コントロールにおいては、細胞においても、*CLN2* 蛋白の発現が示されたのに対し、LINCL においては、*CLN2* 蛋白の発現は、欠損あるいは

[別紙2]

減弱 (リンパ芽球) が示された。

3. 実験 3: CLN2 蛋白の欠損あるいは減弱が認められた症例において *CLN2* の変異解析を行なったところ、正常コントロール 50 人では認めなかった C3383T (Q161X)、A4020G (N286S)、G4357C (K346N) の新たな変異が 3 例の日本人の LINCL において示された。ただし、そのうち CLN2 蛋白が欠損していた 2 例においては、片側のアレルの変異は認められず、御両親の RNA 解析まで行なった。片側アレルの発現の低下の可能性は考えられたが、遺伝子変異と蛋白発現欠損との関連は依然として不明である。

以上、本論文は *CLN2* 遺伝子をもとに特異的な抗体を作製し得たことから、CLN2 蛋白は全身臓器に広範に分布し、脳での発現は発症年齢の幼児期に増強することを明らかにし、臨床症状の初発年齢と一致していた。また、患者における CLN2 蛋白の明らかな欠損を線維芽細胞、リンパ球において証明し、LINCL の新たな簡易診断法を開発した。さらに、症例の一部で、日本人における *CLN2* の新たな変異を明らかにした。こうした簡便な LINCL の診断法の開発は、早期診断の可能性もあり、さらに発達段階における CLN2 蛋白の発現調節機序の分子遺伝学的解明により、発症予防や治療へと発展させることができると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。