

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 徐 聖 旭

伝達性海綿状脳症はヒトや、ヒツジ、ウシなど多くの哺乳動物に見られる神経変性疾患であり、プリオン蛋白 (PrP) の異常によって起こるプリオン病である。牛海面状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) など、動物のプリオン病流行の原因は、スクレイピー感染ヒツジ由来の飼料ではないかと考えられているが、ヒツジ由来飼料と発症の因果関係はまだ不明である。興味深いことに、クーズーやオリックスなどの野生反芻獣は、ヒツジやウシなどの家畜反芻獣に較べて、プリオン病発症までの潜伏期間は短く、発症後の経過も急激であることが知られている。一般に海綿状脳症の伝達性および発症までの期間の種差は、各種の PrP のアミノ酸違いによるという可能性が示唆されている。本研究において、 β -アクチンプロモーターの用いることにより、神経細胞、免疫細胞、筋肉などを含むすべての臓器で OrPrP を過剰発現する Tg マウスが期待された。一方、ヒツジプリオン蛋白遺伝子 (ShePrP) を発現したマウスにおいて、ShePrP 過発現の原因で壊死性筋炎が見られたことが報告された。我々はプリオン病原体に対する診断方法としてオリックス型 Tg マウスの開発を行っている。

そこで、本研究においてはこの開発中、心臓に異常が発見されたことに着目し、1) OrPrP の過発現が及ぼした Tg(OrPrP) マウスの組織の異常、及び2) 心筋細胞における OrPrP の過剰蓄積、あるいは過剰発現が及ぼす細胞の空胞化形成に関する以下の研究を行った。

第 1 章において、OrPrP の過発現が及ぼした Tg(OrPrP) マウスの組織の異常について検討した。OrPrP を神経及び筋細胞を含む全身で過剰発現する Tg マウス作製より、4 系統の #34Tg(OrPrP), #36Tg(OrPrP), #42Tg(OrPrP), #50Tg(OrPrP) マウスで OrPrP の遺伝子導入が確認された。この 4 系統中、107 日目に突然死を起こした 2 系統マウス

の病理組織学的に調べた結果、#42Tg(OrPrP)マウスにおいては海馬錐体細胞の変性萎縮、#34Tg(OrPrP)マウスでは骨格横紋筋の一部硝子様変化が観察された。しかし、肝臓、肺、胸腺、腎臓、脾臓、心臓では異常が見られなかった。一方、#50Tg(OrPrP)と#36Tg(OrPrP)マウスの仔孫においては、脳、骨格筋では異常が見られず、心臓で空胞様変化が観察された。以前、ヒツジプリオン蛋白遺伝子 (ShePrP) を発現したマウスにおいて、ShePrP 過発現の原因で、脳を含む骨格筋において壊死性筋炎が見られたことが報告された。今回作製した Tg(OrPrP)マウスにおいても、脳、骨格筋において病変が観察された。従って、作成された4系統の Tg(OrPrP)マウスにおいて導入遺伝子 (OrPrP) が神経細胞を含む筋組織で過剰に産生し、突然死を伴う組織の異常を誘導したことが判明した。

第2章において、Tg(OrPrP)マウスの心筋細胞における OrPrP の過剰蓄積、あるいは過剰発現が及ぼす影響について検討した。まず、突然死を示さなかった#36Tg(OrPrP)、#50Tg(OrPrP) マウスの系統維持と OrPrP が及ぼす組織への影響を調べるために、プリオン遺伝子欠損マウス (KO) マウスとの交配を行った。この KO マウスは、Dpl 蛋白の過発現より Purkinje 細胞変性死、ataxia 様症状が見られることで知られている。一方、この KO マウスの神経学異常は OrPrP を再導入することで回復した本研究より、神経細胞及び筋細胞の OrPrP 発現が神経消失、行動異常を妨げる機能を持っていることが明らかにされた。脳、肝臓、肺、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉における RNA レベルでは、脳、心臓、筋肉においてのみ発現が認められた。蛋白レベルでは、Tg マウスの脳以外に、心臓、骨格筋に過剰に産生していることが明らかにされた。脳でも免疫沈降法及び免疫染色により OrPrP の産生が確認された。OrPrP 遺伝子が心臓において強く発現していることから、OrPrP が心臓で多量に産生する事が考えられた。心臓での OrPrP の過発現が及ぼす影響について、Tg(OrPrP)マウスを週齢別に心電図の測定を行った。その結果、30 週齢では 60%、50 週齢以後では 80%のオリックス Tg マウスにおいて心電図 QRS の R 波形の異常波形が確認された。対照である C57BL/6 マウスにおいては同週齢でこの様な波形は観察されなかった。また KO マウスにおいてもこの様

な波形は観察されなかった。一方、心電図の測定により異常が見られた Tg(OrPrP) マウスの心臓における病理組織学的検討によると、30 週齢以上から心室部心筋全体に散在する心筋細胞の空胞変性、心室の拡張が観察された。さらに#50Tg(OrPrP)と#36Tg(OrPrP)の子孫マウスにおいて同様に心臓異常を示していた。さらに、30 週齢 Tg(OrPrP)マウスと C57BL/6 マウスにアトロピン (4mg/Kg) 投与後、心電図の測定を行った。その結果、Tg(OrPrP)マウスでは 66%の R 波形の異常を含む全体に不規則な波形が観察された。しかし C57BL/6 マウスにおいては、異常波形は見られなかった。以上の成果から、OrPrP の心臓での過剰発現は、空胞変性及び心筋異常を伴うものであることが判明した。また、心臓障害を事前に妨げる薬投与による実験モデルとして利用可能であることも明らかとなった。

従って、病理組織学的検討より、海馬錐体細胞の変性、横紋筋の硝子様変化により突然死が起った Tg(OrPrP)マウスにおいては、それぞれ脳と骨格筋に過剰に OrPrP が発現していた可能性が考えられる。また、Tg(OrPrP)マウスは、心臓において導入遺伝子の過発現により空胞変性を引き起こしていることから、正常型 PrP の過剰蓄積、あるいは過剰発現が細胞の空胞化形成に関与していると考えられた。このような心筋病変は、以前に報告された Tg(ShePrP)マウスでは観察されていない。したがって、Tg(OrPrP)マウスを用いて我々の研究において初めて観察された事実である。一方、30 週齢以上の Tg(OrPrP)マウスにおいて心電図の異常の波形を示していること、また薬投与後においても不規則な波形が測定されたことから、今後の拡張性心筋症研究の疾患モデルを提供したと考えられる。

したがって、審査員一同は、当論文内容が農学博士の資格を有するとの結論に達した。