[課程―２]

審査の結果の要旨

氏名　　鈴木　一詩

本研究はポリグルタミン病の一種である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の病態機序を転写障害の観点から明らかにするため、ヒト変異 DRPLA 遺伝子全長が単一コピーで同一箇所に導入され、CAG リピート長のみ異なる 4 系統の DRPLA トランスジェニックマウス Q76、 Q96、 Q113、 Q129 を用いて、行動表現型の解析、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを用いた転写産物の変化の解析、薬剤投与による最初期遺伝子 Fos の活性化を用いた転写活性化障害の定量的検証を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 各系統の生存期間及び体重は明確に導入遺伝子のリピート長に依存して短縮、減少した。また加速ロタロッド試験, Beamwalking 試験で運動協調性を評価したところ、Q129、Q113、Q96 の各系統がリピート長依存性、週齢依存性の成績低下を示した一方、最短リピートの Q76 は nTg (non-transgenic)との間に成績差を認めなかった。オープンフィールド試験では、Q129、Q113、Q96 の 3 系統はリピート長依存性に新奇環境における活動性が低下した一方、Q76 は nTg よりもむしろ有意に活動性が亢進していた。
2. Home cage 内での活動を測定したところ、Q76 は nTg と総運動量の差を認めず活動の概日リズムも保たれていたが、Q96、Q113、Q129 マウスでは、暗時間における活動量が減少し、かつその程度はリピート長依存性に悪化した。更に、同一系統(Q113)で経時的に観察を行ったところ、週齢依存性に正常な睡眠覚醒リズムが失われた。
3. Tg マウス大脳、小脳の網羅的な発現解析を 2 種の異なるマイクロアレイプラットフォームを用いて解析した結果、双方の結果は互いに高い相関を示し、正の相関を示した遺伝子数は不の遺伝子数を大きく上回った。この結果から、cross-platform analysis はマイクロアレイ解析結果の網羅的かつハイスループットな確認の方法として信頼性が高いことが証明された。この手法を用いて、同週齢の nTg を対照とした DRPLA マウス大脳及び小脳の発現変動遺伝子数を算出した結果、その数はリピート長依存性に顕著に増加しており、マウスの表現型の重症度とよく相関することが示された。
4. 週齢、リピート長に依存して発現が変動する遺伝子群を同定するため、Tg/nTg の発現比データを基に週齢および系統を変動因子とした 2way-ANOVA を行い、両方の platform で Interaction p-value<0.005 であった遺伝子（大脳: 204 遺伝子、小脳: 431 遺伝子）を発現変動パターンによりクラスタリングし、各々のクラスターに付与された

5. 転写活性化障害を検討するため、マウス腹腔内に 15mg/kg、25mg/kg のカイニン酸を投与し、1,2h 後に海馬を摘出してリアルタイム定量的 RT-PCR で Fos mRNA の上昇度を定量した。結果、8 週齢の Q129 Tg と nTg 各群では、15mg/kg 、25mg/kg, 1h, 2h 後いずれの条件でも Tg は nTg に比し Fos の上昇度が有意に低く、DRPLA マウスでは Fos の発現活性化障害が存在することが示された。更に 12 週齢と 22 週齢の Q113 マウスで経時的変化を検討した。12 週齢群では 25mg/kg 投与群には有意な Fos 低下はなかったが、22 週齢群では 15mg/kg、25mg/kg の両方で有意に Fos mRNA 誘導が低下しており、障害が進行性に悪化した可能性が考えられた。
6. 更に、カイニン酸に先行してヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)阻害薬である酪酸ナトリウム (SB)を前投与し、この Fos mRNA 転写活性化障害がどのように変動するかを検討した。予備実験で SB の単独投与は濃度依存性にマウス海馬のアセチル化ヒストン H3 を上昇させること、また SB の単独投与では Fos が上昇しないことを確認した。12 週齢 Q113Tg マウスに SB 1800mg/kg を投与し、20 分後にカイニン酸 15mg/kg を投与して 1,2h 後 Fos を定量したところ、SB 前投与群では非前投与群に比し Fos 上昇度が有意に改善した。

以上、本研究は詳細な行動解析により、DRPLA トランスジェニックマウス 4 系統がリピート長、週齢に依存した多様な表現型を示すことを明らかにし、更にその背景に存在する転写産物の変化を Cross-platform の手法を用いた遺伝子発現プロファイリングで詳細に検討し、カルシウムシグナリング関連遺伝子や神経ペプチド類の発現低下が病態に関与する可能性を示した。またカイニン酸によるマウス海馬の Fos mRNA 発現誘導をモデルとして、DRPLA トランスジェニックマウスに転写活性化障害が存在すること、更にその障害が HDAC 阻害薬の投与により回復する可能性を定量的に示した。これらの成果は、現在治療法のないポリグルタミン病に対して、転写活性化障害を標的とした治療法が効果をもたらす可能性を提示するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。