

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 西山 潤

本研究は、哺乳類神経細胞において重要な役割を果たしていると考えられるオートファジーの機能を明らかにするため、Cre-loxP システムを用いて生後小脳プルキンエ細胞特異的にオートファジーに必須とされる遺伝子 *Atg5* を欠損するマウスを作成し、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *Atg5<sup>fllox/fllox</sup>; Pcp2-Cre* マウスの各組織より抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行った結果、Cre-loxP システムによる遺伝子の再編成は小脳特異的に起こり、またこの遺伝子の再編成は出生 6 日頃よりはじまり、出生 21 日ではほぼ完成されることが示された。

2. 行動レベルの解析の結果、*Atg5<sup>fllox/fllox</sup>; Pcp2-Cre* マウスは出生 115 日では明らかな異常を示さなかったが、出生 294 日では歩行障害や異常反射がみられ、またロータロッドテストにて対象群 (*Atg5<sup>fllox/fllox</sup>* マウス) と比較して滞在時間が有意に短いなど、遅発性の運動失調を起こすことが示された。

3. *Atg5<sup>fllox/fllox</sup>; Pcp2-Cre* マウス及び対照群より作成した小脳切片において免疫組織学的検討を行うことにより、*Atg5<sup>fllox/fllox</sup>; Pcp2-Cre* マウスではプルキンエ細胞に神経変性がみられることが示された。また同時に、このプルキンエ細胞の変性は軸索の腫大を伴うことが示された。

4. プルキンエ細胞の変性と軸索の腫大の経時的な変化を免疫組織学的に調べた結果、軸索の腫大は出生 28 日頃より始まるのに対し、プルキンエ細胞の変性は出生 56 日頃より起こり、神経変性に軸索腫大が先行することが示された。

5. 軸索の腫大部を免疫組織学的に調べた結果、軸索遠位部が走行する深部小脳核の領域では腫大は顕著であったが、顆粒細胞層内の軸索近位部においては明らかな腫大は認めなかった。また、深部小脳核領域におけるプルキンエ細胞軸索遠位部の電子顕微鏡による解析の結果、軸索終末部は大部分が腫大していたが、非終末部においては腫大した軸索は一部であった。軸索の腫大部は GABA 作動性神経終末のマーカである VGAT と共局在することなどから、*Atg5<sup>fllox/fllox</sup>; Pcp2-Cre* マウスにおけるプルキンエ細胞の軸索腫大は、神経終末部に優位に起こることが示された。

6. 腫大した軸索の内部には、シート状あるいは渦巻状の粗面小胞体や二重膜構造体など異常な膜構造体が蓄積しており、オートファジーがこれらの膜構造体の維持に関与することが示された。

以上、本研究は生後プルキンエ細胞特異的に *atg5* を欠損するマウスの解析から、オートファジーが神経細胞の生存と軸索内部の膜構造及び形態の維持に必須であることを明らかにした。近年、様々な神経変性疾患でオートファジーの関与が報告されているが、その意義は全く不明である。本研究はオートファジーの活性化を伴う神経変性疾患や軸索障害の病態解明、治療法の開発において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。