

学位授与番号：甲 9 9 9 号

氏 名：長谷川 実奈美

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 1 月 13 日

学位論文名：

筋萎縮側索硬化症モデルマウス白血球における RNA 代謝解析

主論文名：

Analysis of RNA metabolism in peripheral WBCs of TDP-43 KI mice identifies novel biomarkers of ALS.

（筋萎縮側索硬化症モデルマウス白血球における RNA 代謝解析）

学位審査委員長：教授 加藤総夫

学位審査委員：教授 岡部正隆 教授 井口保之

論文要旨

(2部提出)

論文提出者名	長谷川 実奈美 指導教授名 岡野ジェイムス洋尚
<p data-bbox="196 443 438 477">主論文題名</p> <p data-bbox="180 517 1430 595">Analysis of RNA metabolism in peripheral WBCs of TDP-43 KI mice identifies novel biomarkers of ALS</p> <p data-bbox="180 633 1166 667">(筋萎縮側索硬化症モデルマウス白血球における RNA 代謝解析)</p> <p data-bbox="180 705 1430 784">著者名 : Minami Hasegawa, Chikako Hara-Miyauchi, Hiroki Ohta, Kenji Sakimura, Hideyuki Okano, Hirotaka James Okano</p> <p data-bbox="180 822 700 855">誌名 : Neuroscience Research, 2016</p> <p data-bbox="180 896 1430 2024">神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位・下位運動神経細胞の脱落が徐々に進行する疾患であり、発症から 3-5 年以内に呼吸器を含む運動機能を全廃に至らしめる悲惨な疾患である。未だ病因の解明には至っておらず、失った運動機能を取り戻す特効薬は存在しない。早期に神経変性徴候を捉えることが重要であるにも関わらず、有用な ALS のバイオマーカーは存在しない。この為、ALS 診断の遅延が生じ、治療の妨げとなっている可能性が指摘されている。そこで本研究では、ALS の早期治療介入を目指した診断バイオマーカーの探索を行うこととした。近年、神経変性疾患の病態には RNA プロセッシングや翻訳異常などの RNA 代謝が密接に関与する可能性が指摘されている。そこで、神経変性過程で起こる RNA 代謝異常を末梢血中においても捉えることができれば、非侵襲的で有用なバイオマーカーとなるのではないかと考えた。RNA 代謝調節を行うことが知られている TAR RNA binding protein 43kDa (TDP-43) は、ALS 患者において 50 カ所以上の遺伝子変異が発見されている。本研究では、ヒト末梢血での解析を行う前段階として、ALS モデルマウスである変異型ヒト TDP-43 ノックインマウスの末梢白血球内 RNA 代謝解析を行った。ALS 患者と同様の変異を持つマウス 2 群と野生型マウスの 3 群で比較を行ったところ、白血球核内の TDP-43 の mRNA 代謝が変異型マウスでは有意に変化していることがわかった。さらに、TDP-43 の RNA 代謝は 2 群の変異間でも有意に異なることがわかった。このことから、変異型 TDP-43 は変異によって異なる代謝を示す可能性があると考えられた。そこで、TDP-43 の代謝に関与する因子を抽出し、同様に白血球内 mRNA 解析を行った。その結果、TDP-43 の代謝と相関した変化を引き起こしていることがわかった。このことから、神経変性に関わる複数因子の RNA 代謝を組み合わせることで、遺伝的バックグラウンドの異なる個体の RNA 代謝異常を検出できる可能性が考えられる。本研究結果は、末梢血内の RNA 代謝をターゲットとした神経変性バイオマーカー探索研究の大きな一歩となることが期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨

学位請求論文は、主論文1編からなる。本論文は、現在、有効な治療法の見出されていない神経難病である筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）の早期診断を目指して、発症もしくは進行過程の重要因子として近年注目されているRNAのスプライシングや翻訳の異常、すなわち、RNA代謝異常を末梢血中の血球を用いて検出する可能性を検討したものである。そのために長谷川氏は、家族性・孤発性両方のALSでその関与の報告のあるTAR DNA binding protein 43 (TDP-43)に着目し、すでに確立しているそのヒト変異型をマウスの同遺伝子プロモーター下にノックインした遺伝子組み換えマウスを用いて、末梢白血球におけるmRNA代謝の異常を解析し、その結果を論文公表した。

12月24日16時、岡部正隆教授、井口保之教授、そして私を委員とする審査委員会による公開審査会を開催した。審査会では学位請求論文の内容の紹介に続き、質疑応答による公開口頭試験を行った。席上、口頭発表および論文の内容に関し、以下の質問があった。

- 2種類のヒト変異型TDP-43をノックインしたマウスを用いたが、同じ変異は、ヒトでどの程度のpopulationで保有されているのか？
- 末梢血中白血球のmRNA代謝の異常を解析対象としたが、このノックインマウスでは、全身にこの変異タンパクが発現している。神経系細胞や心筋でのmRNA代謝異常、あるいは、封入体の異常を呈していたのか。
- 2種類の変異型TDP-43を持つマウスの中で、表現型の違いは認められたか？
- このノックインでは、どこまでのexonによるタンパクが合成されているのか？ 蛍光タンパクvenusの挿入部位の顆粒に3'-UTRシグナルは入っていないのか？ あるいは、3'-UTRによるタンパク合成の制御は認められないのか？
- ヒトwild typeをノックインしたマウスを対照として比較すべきではなかったか？
- 生後7カ月ごろから体重増加不良と運動障害を呈するとのことだが、それ以前にもこのノックイン遺伝子の変異は存在しているので、なぜ7カ月ごろまで異常が認められないのか？ また、その年齢依存的発症、あるいは、運動ニューロン特異的発症のメカニズムは何か？
- TDP-43は運動ニューロン以外にもあらゆる細胞に発現しているが、この変異ノックインマウスのALSモデルとしての妥当性は評価したか？
- 正常マウス型TDP-43はどの程度発現するのか？ その量を診断のバイオマーカーとすることはできないか？
- このmRNA代謝異常の検出によって診断されるのはALS症例の約10%くらいか？ TDP-43変異を持つ症例だけではないのか？ 他の原因を持つ症例にどの程度応用できると考えるのか？
- RNA代謝の解析をより簡便に実臨床で行えるように改善できる可能性はないか？

など、多くの重要な質問が審査委員から出され長谷川氏は、適切に回答した。

本論文は、ALSにおける運動障害の発症以前に末梢白血球を用いて診断に用いるバイオ

マーカーの確立につながりうる研究と認め、審査委員会で協議した結果、長谷川実奈美氏の学位請求は、論文の内容ならびに公開口頭試験の結果から、医学博士の学位にふさわしいものと判断した。