	よこぜき　あきお
氏　　名	横関　明男
学　　位	博　士（医学）
学位記番号	新大院博(医)第245号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	筋萎縮性側索硬化症における TAR DNAbindingprotein-43 (TDP-43)変異の検討
論文審査委員	主査　教授　西澤正豊
	副査　教授　木南　凌
	副査　教授　高橋　均

博士論文の要旨

【はじめに】筋萎縮性側索硬化症(ALS)は，上位および下位運動ニューロンが選択的に変性し四肢麻痺，呼吸不全を来す致死性の神経変性疾患である．大多数は孤発性であるが，Copper / Zinc superoxide dismutase (*SOD*1)変異により家族性 ALS(FALS)を発症することから，free radical などの酸化ストレスに注目して病態機序の研究が進められてきた．しかし *SOD*1 変異をもつALSの病理組織では，孤発性ALS(SALS)に特徴的なBunina小体やユビキチン化skein like inclusions を伴わないことから，*SOD*1 変異による FALS と SALS 病態機序は異なる可能性が指摘されてきた．2006 年にユビキチン化 skein like inclusion の構成蛋白が，TAR DNA binding protein-43 (TDP-43)であることが報告された．TDP-43 陽性の封入体は，*SOD*1 変異による FALS では認められず，一方 *SOD*1 変異陰性の FALS においては SALS と同様に TDP-43 陽性の細胞質内封入体が存在することが報告された．このことから ALS の病態機序に TDP-43 が関与することが強く示唆されている．

【方法】ALS における TDP-43 の関与を検討するため，*SOD*1 変異陰性の FALS16 家系(優性遺伝 13，劣性遺伝 3)において同遺伝子変異の有無を検討した．

【結果】検索した *SOD*1 陰性 FALS16 家系の内，1 家系(2 世代，発症者 3 名)のみで 1028 番目の塩基が A から G への置換する変異をヘテロ接合体で存在することを見いだした．同変異は，コントロール 267 人(534 染色体)，孤発性 ALS 112 症例(剖検症例 20 症例を含む)，frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions 1症例，frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease 2 症例，primary lateral sclerosis 1 症例では認められなかった．同変異は 343 番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンへ置換する変異(Q343R)であり，同部位のアミノ酸は哺乳類では保存されていた．患者剖検脊髄を用いた RT-PCR では，変異アレルの発現を確認した．患者脊髄のウエスタンブロットでは，既報の孤発性 ALS の所見と同様に，sarkosyl や urea など不溶性分画に約 25 kDa の断片型 TDP-43 を認めた．この家系の病理組織では Bunina 小体，skein like inclusion を伴い広汎は TDP-43 陽性の細胞質内封入体を認めた．家系内非発症者の検索はできていないが，これらの事実より，筆者は本変異が本家系の ALS 症状の発症に関与していると結論した．次に

Q343R-TDP-43 の機能異常を検索した. 細胞内局在は, 野生型と Q343R いずれも核に局在し, 細胞質内に封入体形成は認めなかった. 病態と関連するとされる約 25 kDa や 35 kDa の C 末断片型 TDP-43 を細胞内に発現させると, 核への局在が消失し細胞質に局在したが, その局在に野生型と Q343R で違いはなかった. また 25 kDa の断片型 TDP-43 は野生型, Q343R ともに細胞質内に封入体を形成し, 違いはなかった. TDP-43 は各種核内小体と局在することが報告されている. そこで ALS において Cajal 小体の病態への関与を疑い, TDP-43 と Cajal 小体の関連を検討した. 野生型, Q343R-TDP-43 共に Cajal 小体に一部局在した.
Q343R-TDP-43 の強制発現細胞および内在性 TDP-43 のノックアウトした細胞では Cajal 小体の数の減少を認めた.
【考察】核内小体の一種である Cajal 小体の数は, 神経細胞の活動性と密接に関連するとされている. また ALS と同様に運動神経細胞死を来す spinal muscular atrophy の原因蛋白である SMN は Cajal 小体に局在し, Cajal 小体の維持に関与するとされる. 変異 TDP-43 の ALS 発症の原因として, Cajal 小体への関与が示唆される.
【結論】今回の FALS 症例における TDP-43 の変異の発見は ALS の病態機序の解明に寄与することが期待される.

（論文審査の要旨）

筋萎縮性側索硬化症 ALS の病理組織に認められる skein-like inclusion の構成蛋白質は、ユビキチン化された TDP-43 であることが 2006 年に明らかにされた。申請者は, ALS における TDP-43 の関与について検討するため、SOD1 変異陰性の家族性 ALS 16 家系において同遺伝子の変異の有無について検討した。

その結果, 優性遺伝性の 1 家系において Q343R ヘテロ接合変異を同定した. 変異部のアミノ酸は哺乳類で保存されていた. 剖検脊髄の RT-PCR により変異アレルの発現を確認し, ウエスタンブロットにより、既報と同様に 25 kDa の断片型 TDP-43 を不溶性分画に認めた。病態に関連するとされる TDP-43 の 25 kDa と 35 kDa の C 末断片を細胞内に発現させると、核への局在が消失し, 25kDa は封入体を形成したが, 野生型と Q343R 変異型では差違はなかった. さらに、TDP-43 は各種の核内小体に共存することから, TDP-43 と Cajal 小体 (CB)の関連について検討した結果、野生型, Q343R 変異 TDP-43 はいずれも CB に一部局在し, Q343R 変異 TDP-43 の強制発現細胞、および内在性 TDP-43 のノックアウト細胞では、CB の数が減少することを明らかにした。

以上、本研究は TDP-43 の変異を伴う遺伝性 ALS の家系例を世界で初めて見出し、ALS の分子病態におけるこの蛋白質の役割の一端を明らかにしたことに、学位論文としての価値を認めた。