

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 伊藤 岳
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 665 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 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 TDP-43 機能喪失による OPA1 mRNA の splicing 変化を介したミトコンドリアの断片化

論文審査委員 主査 教授 柿田 明美
副査 教授 西澤 正豊
副査 教授 池内 健

博士論文の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、成人期に発症し、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし、呼吸不全により致死性の経過をたどる神経変性疾患である。ALS の病理学的な特徴として、運動神経細胞の細胞質内にユビキチン陽性封入体を認める。2006 年にその構成タンパク質として、核タンパク質である TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) が同定され、孤発性及び家族性の ALS にて TDP-43 の遺伝子変異が見出された。これらから TDP-43 は ALS の発症に一次的に関わると考えられている。TDP-43 は RNA 認識モチーフを持ち、RNA の発現調整やスプライシングに関与する核タンパク質である。ALS では核から消失する事から、TDP-43 の核内での機能喪失が、病態機序として想定されている。一方、ALS の病理学的検討では、以前よりミトコンドリアの形態異常が唱えられてきた。ALS 患者の運動神経細胞では、ミトコンドリアの膨張、ミトコンドリア内膜の折りたたみ構造であるクリステの増加が報告されている。しかし、これらの形態異常と TDP-43 との関連については、検討されていない。ミトコンドリアは、ATP の産生に携わり、分裂と融合を頻回に繰り返す動的な細胞内小器官である。ATP 産出に伴う代償として、ミトコンドリア DNA は活性酸素に曝されており障害を受けやすい。ミトコンドリアは融合により障害を受けたミトコンドリア DNA の比率を低下させ、障害が過剰に蓄積したミトコンドリアは分裂し、オートファジーにより分解される。ミトコンドリアのホメオスタシスを保つこれらの動的な活動は、ミトコンドリア・ダイナミクスと総称されている。申請者は、ALS では、TDP-43 の機能喪失により、ミトコンドリア・ダイナミクスに異常を来しミトコンドリアの形態異常が引き起こされていると仮説をたて、TDP-43 発現抑制とミトコンドリア・ダイナミクスの関係を検討した。HEK293T 細胞を用い、siRNA 法を用いて TDP-43 の発現を抑制したところ、ミトコンドリアは断片化した。またミトコンドリア内膜の融合に関わる Optic atrophy 1 (OPA1) の 84 kDa タンパク質の増加を認め、その原因として OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 の増加を認めた。OPA1 の各々のエクソンでは、エクソン 4b が増加することを見出した。そこで、HEK293T 細胞に OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 を強制発現したところ、OPA1 84 kDa タンパク質が増加し、ミトコンドリアは断片化した。更に、ALS 患者のホルマリン固定パラフィン包埋脊髄標本から、運動神経細胞をレーザーマイクロダイセクションにより収集し OPA1 mRNA スプライシングに変化を認めるか

解析を行った。しかし、コントロール患者群と比して差を認めなかった。これらから HEK293T 細胞では、TDP-43 の発現抑制によりミトコンドリアは断片化し、その機序として OPA1 エクソン 4b のスプライシングの抑制による OPA1 スプライシング 多様体 8 の増加と、それによる OPA1 84 kDa タンパク質の増加を認めた。OPA1 は 5 つの異なるサイズのタンパク質からなり、それぞれに適切な発現量が求められるが、この発現量のバランス異常によりミトコンドリアは断片化したと考えられる。OPA1 はミトコンドリア内膜の融合やクリステの構造維持に関わるとされ、申請者が見出した現象は、ALS で報告されているミトコンドリアのクリステの増加という形態異常を引き起こしている可能性がある。しかし、今回の解析では、脊髄の運動神経細胞では ALS 患者と対象との間で OPA1 スプライシングに差を指摘できなかった。この理由として、今回の解析では、TDP-43 の状態に関わらず、すべての運動神経細胞を対象としたことが挙げられる。ALS 患者の脊髄前角細胞において、TDP-43 の核からの消失は全ての細胞に認められる訳ではない。TDP-43 の核からの消失により OPA1 のスプライシング異常が惹起されるという仮説に従えば、今後、免疫染色法を加え、TDP-43 の核からの消失を認める細胞のみを選択して、解析する必要がある。これらの解析により、今回の知見の ALS 病態への寄与が明確になると期待される。

審査結果の要旨

本論文は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)における病態関連核蛋白：TDP-43 とミトコンドリアの形態異常との関連性を *in vitro* で検証したものである。申請者は、siRNA 法を用いて HEK293T 細胞における TDP-43 の発現を抑制したところ、ミトコンドリアが断片化する現象を見出した。また、ミトコンドリア内膜の融合に関わる蛋白：OPA1 の 84 kDa 蛋白の増加を見出し、その原因として OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 が増加すること、並びに OPA1 mRNA エクソン 4b が増加することを見出した。そこで、HEK293T 細胞に OPA1 mRNA スプライシング多様体 8 を強制発現させたところ、OPA1 84 kDa 蛋白は増加し、ミトコンドリアは断片化した。スプライシングと翻訳後蛋白質切断により、OPA1 には 5 つの C 末断片が存在する。これらの発現量がバランスよく調整されることにより、OPA1 の機能が働くものと考えられている。

本論文は、TDP-43 の発現が抑制されることにより OPA1 のスプライシングに異常を来し、OPA1 の発現バランスが乱れ、その結果、ミトコンドリアが断片化することを初めて示したものであり、ALS における病態形成機序の一端を明らかにしたものである。この点に学位論文としての価値を認める。