

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名 樋口 陽
学 位 博士 (医学)
学 位 記 番 号 新大院博 (医) 第 983 号
学位授与の日付 令和3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 進行性核上性麻痺における BSN バリエントの同定と分子病態機序の解明

論文審査委員 主査 教授 五十嵐 博中
副査 教授 笹岡 俊邦
副査 准教授 金澤 雅人

博士論文の要旨

背景と目的

進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP) は、神経細胞およびグリア細胞に不溶化したリン酸化タウが蓄積する神経変性疾患である。PSP の大部分は孤発性に発症する多因子性疾患であるが、一部の症例は家族発症が報告されている。PSP に類似した本邦の家族性タウオパチーに対して全エクソーム解析が行われ、BSN 変異 (p. P3866A) が原因となることが報告された。本研究では、PSP と BSN の関連に着目し、PSP と臨床診断された症例を対象に BSN の遺伝子解析を行った。さらに BSN を介した分子病態機序を明らかにするために、培養細胞に BSN バリエントを導入しタウ不溶性に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

臨床的に PSP と診断された症例を対象に BSN 遺伝子解析を行った。エクソーム解析により BSN の翻訳領域およびスプライスサイト領域の配列を抽出し、非同義置換、公共データベースによるアレル頻度、in silico 解析などを用い候補バリエントを抽出した。

野生型 BSN をコードするプラスミドを鋳型に遺伝子変異を導入した。ヒト型タウを安定発現する HEK293 細胞を樹立し、野生型と3つのバリエント BSN を一過性に導入した。培養細胞は Sarkosyl バッファーで溶解し、超遠心により可溶性分画を回収した。不溶性ペレットは 8M Urea/1%SDS により溶解し、上清を不溶性画分として回収した。

溶解したサンプルを電気泳動で分離し、特異抗体を用いた免疫ブロットによりタウ、bassoon の量を半定量化した。PSP 剖検脳 (n=54) と対照脳 (n=24) から全 RNA を抽出し、RIN により品質を確認した。RIN>6.5 のサンプルを用い、ライブラリーを作成し RNA-seq 解析を実施した。

結果

PSP と臨床診断された症例において、BSN の遺伝子解析を行い、3種類の BSN バリエントを同定した。BSN p. P3866A は既報と同じであり、p. A1710T と p. T2043M は新規バリエントであった。これらの BSN バリエントは、公共のデータベースにおける頻度が 0.001%以下と極めて稀な低頻度バリエントであった。また、p. T2043M バリエントの CADD スコアは 15.3 と高く、PSP との関連性を支持する所見であった。

次に、4R1N 型ヒト・タウを安定発現した HEK293 細胞に野生型および変異型 BSN の遺伝子導入を行い、

BSN バリエントがタウ不溶性に及ぼす影響を検討した。p. T2043M 変異型 bassoon を導入すると野生型と比し、不溶性タウが約2倍に増加した。一方、p. A1710T, p. P3866A 変異型 bassoon は、タウ不溶性に及ぼす効果は明かでなかった。タウと同様に、不溶性画分における bassoon 量を解析したが、野生型と変異型 BSN の間に有意な差は認めなかった。

PSP 脳における BSN 遺伝子発現量を解析する目的で、PSP 剖検脳 (n=54) と対照脳 (n=24) から全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。PSP 脳の BSN 発現量は 21.0 ± 13.5 、対照脳は 25.3 ± 10.2 であり、PSP 脳で低値を示したが有意な差は認めなかった ($P=0.12$)。

考察

PSP 患者脳では神経細胞に加え、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞にリン酸化タウが蓄積する。PSP の病変進展機序として、異常タウの細胞間伝播仮説が提唱されているが、不溶化したタウが PSP 脳に蓄積する病態は十分に解明されていない。本研究では、PSP と BSN の関連に着目し、臨床的に PSP と診断された症例に対して BSN の遺伝子解析を行い、3 種類の BSN バリエントを同定した。BSN p. P3866A は既報と同じであり、p. A1710T と p. T2043M は新規バリエントであった。これらの BSN バリエントは、公共のデータベースにおける頻度が 0.001%以下と極めて稀な低頻度バリエントであった。また、p. T2043M バリエントの CADD スコアは 15.3 と高値を示した。以上の所見から、BSN の低頻度バリエントが PSP の遺伝的リスクとなる可能性があると思われる。

Bassoon は分子量 400kDa を越える巨大タンパクであり、前シナプスのアクティブ区域に存在する。BSN ノックアウトマウスは、シナプス小胞の融合不全が生じ、シナプス間伝達が減弱する。Bassoon の機能障害を原因とする神経疾患は、bassoon proteinopathy と呼ばれている。多発性硬化症患者のプラーク巢由来組織を用いた網羅的 RNA-seq 解析により、BSN 発現亢進が病態の核となり神経傷害性を惹起することが報告されている。剖検脳を用いた BSN 発現解析を本研究において行ったところ、PSP 脳 (n=54) において BSN 発現は、対照脳 (n=24) と比し低下していたが、有意な差は示さなかった。

本研究において、ヒト型タウを安定発現した HEK293 細胞に野生型および変異型 BSN の遺伝子導入を行い、BSN バリエントがタウ不溶性に及ぼす影響を検討した。p. T2043M 変異型 bassoon を導入すると野生型と比し、不溶性タウが約2倍に増加した。BSN 変異の一部は、タウ不溶性を亢進させ、PSP 発症を促進させているのかもしれない。一方で、p. A1710T, p. P3866A 変異型 bassoon は、タウ不溶性に及ぼす効果は明かでなかった。

結論

臨床的に PSP と診断した症例を対象に BSN 遺伝子解析を行い、3つの低頻度バリエントを同定した。p. T2043M 変異型 bassoon を導入すると野生型と比し、不溶性タウが約2倍に増加した。BSN 変異の一部は、タウ不溶性を亢進させ、PSP 発症を促進させているのかもしれない。一方、タウ不溶化には影響を及ぼさない BSN 低頻度バリエントも存在し、PSP の病態が多様であることが示唆された。

審査結果の要旨

進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP) は、一部の症例は家族発症が報告されている。近年、臨床的に PSP と診断された症例の原因として BSN 変異が注目されている。本研究では、PSP と BSN の関連に着目し、PSP と臨床診断された症例を対象に BSN の遺伝子解析を行った。さらに BSN を介した分子病態機序を明らかにするために、培養細胞に BSN バリエントを導入しタウ不溶性に及ぼす影響を検討した。

PSP と臨床診断された症例において、BSN の遺伝子解析を行い、3種類の BSN バリエントを同定した。その中で p. T2043M バリエントの CADD スコアは 15.3 と高く、PSP との関連性を支持する所見であった。

次に、4R1N 型ヒト・タウを安定発現した HEK293 細胞に野生型および変異型 BSN の遺伝子導入を行った。p. T2043M 変異型 BSN を導入すると野生型と比し、不溶性タウが約 2 倍に増加した。BSN 変異の一部は、タウ不溶性を亢進させ、PSP 発症を促進させている可能性が示唆された。

一方、PSP 脳における BSN 遺伝子発現量を解析する目的で、PSP 剖検脳と対照脳から全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。PSP 脳の BSN 発現量は 21.0 ± 13.5 、対照脳は 25.3 ± 10.2 であり、有意な差は認めなかった。

BSN 変異が臨床的に PSP と診断された症例における病因の一つであることを示唆した研究であり、今後の PSP の診断・治療戦略に多大な貢献をすると考えられ、今後の神経臨床に寄与すること大である。よって博士論文として妥当であると判断した。