

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 加藤 怜
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1112 号
学位授与の日付 令和5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 Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S) 変異ヒト Trex1 発現ショウジョウバエの樹立

論文審査委員 主査 教授 柿田 明美
副査 教授 池内 健
副査 准教授 他田 真理

博士論文の要旨

<目的>

Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S)はエキソヌクレアーゼ活性を持つ three-prime repair exonuclease 1 (TREX1) の遺伝子変異による常染色体優性遺伝疾患である。進行性の視覚障害を引き起こす血管網膜症と、神経学的単症状を呈す脳小血管病変を引き起こす極めて希な疾患である。成人期に脳小血管病変を来し、10年ほどで致命的な転機をたどる。RVCL-Sを引き起こす変異ではエキソヌクレアーゼ活性を維持しているが、野生型で細胞質中の小胞体膜に局在している TREX1 が核の内部にも存在することが知られている。今までに RVCL-S の動物モデルとして複数の試みがされているが、TREX1 の変異が RVCL-S の分子病態にどのように関与しているのかは不明である。そこで、RVCL-S の病態機序解明のためには、より扱いやすい動物モデルの構築が望ましい。

<方法>

hTREX1 の UAS 系統を作製する為、変異 TREX1 遺伝子を PCR で増幅したインサート断片を 20 × UAS-IVS-P10 ベクターに組み込んだ。この時、挿入した各 TREX1 遺伝子には N 末端に myc tag と 6His tag を付加した。作製した組み換えベクターをショウジョウバエ胚にインジェクションし、ZH86Fb ランディングサイトに挿入した。

hTREX1 の発現を確認するために、GMR-Gal4 を発現させた個体と各 hTREX1 を持つ個体を交配し、視神経に hTREX1 を発現したメス個体からタンパク質サンプルを取得し hTREX1 に付加した myc を標識としてウェスタンブロッティングを行った。

TREX1 の発現パターンの確認のために、c739-Gal4 を用いて kenyon cell に各 hTREX1 を発現させ、myc を標識に免疫染色を行ない共焦点顕微鏡で撮影し三次元構築画像を作製した。

hTREX1 の細胞毒性の検証のために、GMR-Gal4 ドライバーを用いて複眼に各 hTREX1 を発現し、複眼構造の乱れをスコア化した。

異なる細胞種における hTREX1 の毒性検証のために、全細胞で発現する tub-Gal4, グリア細胞特異的な repo-Gal4, 全神経特異的な nSyb-Gal4, 気管で発現する bt1-Gal4 を用いて、各細胞種特異的な Gal4 ドライバー

をヘテロで有する系統と UAS-hTREX1 をホモで有する系統を交配させることによって次世代において hTREX1 を発現する個体数と全羽化個体との比を計測した。

<結果>

作製した各ショウジョウバエにおける挿入遺伝子の発現を確認するために、これらの系統と、視神経特異的な Gal4 ドライバーである GMR-Gal4 発現系統を交配し、羽化後の成体ハエからタンパク質サンプルを抽出した。その後、抗 myc 抗体によるウエスタンブロット法を実施し、想定された分子サイズにバンドを得た。hTREX1 V235fs を発現したハエでは、hTREX1 タンパク質は核を含む細胞全体でびまん性の局在を示した。また、野生型と比較して複眼の形態異常が有意に生じた。さらに、ハエ全神経細胞やハエグリア細胞に hTREX1 V235fs を発現した場合と比べてハエ気管に発現した際に著しく羽化率が低下し、変異型 TREX1 の細胞毒性は組織特異性を有する可能性が示唆された。

<考察>

今回のショウジョウバエモデルにおいても、TREX1 タンパク質は核を含む細胞全体でびまん性の局在を示した。これは、既報のヒト細胞での局在変化と一致している。また、複眼に組織特異的に変異型 hTREX1 を発現したショウジョウバエ個体では、複眼の配列の乱れが出現している。これは、変異型 hTREX1 の発現が何らかの機序で組織障害的に機能していることを示している。変異型 hTREX1 では、小胞体に局在するための膜貫通ドメインの直前にフレームシフト変異が生じている。このことから固定されていない hTREX1 が、エキソヌクレアーゼ活性を保持したまま核内にも移動できると想定される。このことから、核内に移行してしまった変異型 hTREX1 によって核内の DNA が分解されてしまうことで組織障害が生じている可能性が示唆された。

また、今回の実験から変異型 hTREX1 はショウジョウバエ気管に対しての毒性が強いことが示唆された。昆虫気管は上皮細胞とクチクラからなるチューブ構造をとり、ヒト血管は内皮細胞と平滑筋細胞からなるチューブ構造をとる。このように構成する要素は異なるが基本的な構造は類似している。また、ハエ気管系は外胚葉から生じ、線維芽細胞成長因子 (FGF) 受容体のショウジョウバエホモログ *breathless* を含む気管の分枝を促す遺伝子の発現を誘導する。FGF は同様の分枝形成プロセスである血管新生の促進にも重要であり、ショウジョウバエの気管系と脊椎動物における血管系の発達では、細胞移動による分枝パターン制御において類似性が指摘されている。このように、ショウジョウバエ気管系と脊椎動物血管系には類似性があり、脳小血管病である RVCL-S の変異がショウジョウバエ気管への高い毒性を示したことに関与した可能性が考えられた。

<結論>

以上の実験によって、RVCL-S 変異ヒト TREX1 発現ショウジョウバエモデルを樹立した。本モデルは RVCL-S 病態解析のための遺伝子スクリーニングや薬剤スクリーニングに利用することが期待できる。

審査結果の要旨

Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S) はエキソヌクレアーゼ活性を持つ three-prime repair exonuclease 1 (TREX1) の遺伝子変異による常染色体顕性遺伝疾患であり、成人期に重篤な脳小血管病変を来す。野生型 TREX1 は小胞体膜に局在するが、変異型蛋白はエキソヌクレアーゼ活性を維持し核内にも局在する。本研究では、既存の動物モデルより扱いやすいモデルとして RVCL-S で頻度の高い hTREX1 V235fs 変異 TREX1 を発現するショウジョウバエモデルを作製した。同モデルでは、変異蛋白は核を含む細胞全体にびまん性の局在を示した。また、野生型と比較し複眼の形態異常が有意に生じた。更に、全神経細胞やグリア細胞に変異蛋白を発現した場合と比べ、気管に発現した際には著しく羽化率が低下したことから、変異蛋白の細胞毒性は組織特異性を有することが示された。

この様に本研究は、RVCL-S 変異ヒト TREX1 発現ショウジョウバエモデルの作製に成功し、本疾患の病態理解に向けた新規解析ツールを樹立した。ここに学位論文としての価値を認める。