

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	小池 佑佳
学位	博士（医学）
学位記番号	新大院博（医）第 850 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	TARDBP DNA メチル化状態による TDP-43 の自己調節機構関連スプライシングの変化
論文審査委員	主査 教授 那波 宏之 副査 教授 柿田 明美 副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

**背景と目的:** 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経細胞が障害される進行性の神経変性疾患である。ALS の大部分を占める孤発例は中年以降に発症する。病理学的には、核蛋白である TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) の核からの消失と細胞質への蓄積を特徴とする。TDP-43 をコードする *TARDBP* 発現量の異常は、神経細胞毒性を惹起し、ALS における TDP-43 病理と関連する。しかし、*TARDBP* 発現量の異常を来す初期因子は明らかになっていない。生理的な条件下では、TDP-43 は、*TARDBP* pre-mRNA の 3'側非翻訳領域 (3'UTR) 内のイントロン 7 に結合し、選択的スプライシング機構を介して、*TARDBP* 発現量を厳密に自己調節している。ALS 病態には、この *TARDBP* pre-mRNA 3'UTR の選択的スプライシングに関与する因子が関わると思われるが、孤発性 ALS において、その因子は不明である。近年のゲノムワイドなエピジェネティクス解析は、DNA メチル化状態が遺伝子発現に加えて、選択的スプライシング機構に影響を及ぼし得ることを示している。これらのことから申請者は、*TARDBP* 3'UTR の DNA メチル化状態が選択的スプライシング機構を介し、*TARDBP* の発現量を規定しているのではないかと推測した。この仮説をヒト培養細胞およびヒト剖検脳組織を用いて検証することを本研究の目的とした。**方法:** dCas9 を利用したゲノム編集の手法により、HEK293T 細胞の *TARDBP* 3'UTR にあるメチル化シトシン(CpG) 部位を標的的特異的に脱メチル化させ、*TARDBP* の選択的スプライシング効率と mRNA 発現量を評価した。次に、中枢神経疾患を有さない患者 8 症例由来の凍結剖検脳組織（運動野皮質、後頭葉皮質および小脳半球）を用いて、*TARDBP* 3'UTR の CpG 部位のメチル化状態を解析した。さらに、運動野皮質において、*TARDBP* 3'UTR の DNA メチル化率と選択的スプライシング効率の関連を検討した。DNA メチル化状態の解析のために、次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトアンプリコンシーケンシングを行った。選択的スプライシングと mRNA 発現量の評価のために、HEK293T 細胞では逆転写定量 PCR を、ヒト剖検脳組織では droplet digital PCR を行った。**結果:** *TARDBP* 3'UTR には 15 か所の CpG 部位が存在し、生理的な状態ではこれらの CpG 部位は高度にメチル化されていた。同部位を標的的特異的に脱メチル化させた細胞では、コントロール細胞と比べて、*TARDBP* pre-mRNA の選択的スプライシング効率が減弱し、*TARDBP* mRNA の発現量は約 2 倍に増加した。ヒト剖検脳組織を用いた解析では、*TARDBP* 3'UTR のうち、特にイントロン 7 内の連続する 6 か所の CpG 部位の DNA メチル化状態は、脳領域に依

存して異なっていた。運動野皮質では、この6か所のCpG部位のDNAメチル化率は、年齢とともに減少していた。さらに、運動野皮質において、*TARDBP*イントロン7の一部のCpG部位のDNAメチル化率は選択的スプライシング効率と有意に正の相関を示した。考察: 本研究は、*TARDBP* 3'UTRのDNAメチル化状態が、TDP-43量の自己調節機構に重要な役割を果たす選択的スプライシングを介し、*TARDBP* mRNAの発現量を規定することを示した。さらに本研究の結果から、*TARDBP* 3'UTRの中でも、特にイントロン7のDNAメチル化状態は、脱メチル化因子の影響を受けやすく、細胞種による特性があることが示唆された。加えて、ALSの罹患領域である運動野皮質において、この*TARDBP*イントロン7のCpG部位は、年齢依存性の脱メチル化をみとめた。TDP-43の自己調節機構に関連するイントロン7でみられた、DNAメチル化状態の特性は、加齢の影響を受ける神経疾患の一つである、孤発性ALSの病態機序を考える上で興味深い。ALS病態におけるエピジェネティクスの寄与を明らかにするために、今後は、孤発性ALS患者脳を用いて、*TARDBP* 3'UTRのDNAメチル化状態が変容しているか、調べる必要がある。

#### 審査結果の要旨

背景と目的: 筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経細胞が障害される神経変性疾患でTDP-43の核からの消失と細胞質への蓄積を特徴とする。TDP-43は、当該遺伝子*TARDBP* pre-mRNAの3'側非翻訳領域(3' UTR)内のイントロン7に結合し、選択的スプライシング機構を介して、*TARDBP*発現量を自己調節しているとされる。本研究では*TARDBP* 3' UTRのDNAメチル化状態が選択的スプライシング機構を介し、*TARDBP*の発現量を規定している可能性をヒト培養細胞およびヒト剖検脳組織を用いて検討している。

方法:ゲノム編集の手法により、HEK293T細胞の*TARDBP* 3' UTRにあるメチル化シトシン(CpG)部位を標的特異的に脱メチル化させている。凍結剖検脳組織を用いて、*TARDBP* 3' UTRのCpG部位のメチル化状態を解析している。

結果:*TARDBP* 3' UTRには15か所のCpG部位が存在し高度にメチル化されている。同部位を標的特異的に脱メチル化させた細胞では*TARDBP* pre-mRNAの選択的スプライシング効率が減弱し、*TARDBP* mRNAの発現量は約2倍に増加する。剖検脳組織では、*TARDBP* 3'UTRのうち、特にイントロン7内6か所のDNAメチル化状態は、脳領域に依存して異なっている。運動野皮質では、これら部位のDNAメチル化率は、年齢とともに減少しているとともに、一部のDNAメチル化率は選択的スプライシング効率と有意に正の相関を示す。

考察: 本研究は、*TARDBP* 3'UTRのDNAメチル化低下が、選択的スプライシングを介し、*TARDBP* mRNAの発現量と影響すること、また、運動野皮質において*TARDBP* イントロン7のCpG部位脱メチル化は年齢に依存することを申請者は発見している。したがって 本研究は*TARDBP* 遺伝子のDNAメチル化状態が、スプライシングを介して加齢の影響を受ける神経疾患ALSの病態進行に関与しうることを示した点に博士論文としての価値を認める。