

たか の まさ ひこ

|           |  |
|-----------|--|
| 氏 名       | 高 野 政 彦  |
| 学 位       | 博 士 (医学)                                       |
| 学 位 記 番 号 | 新大院博(医)第18号                                    |
| 学位授与の日付   | 平成17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 | トランスジェニックマウスを用いた伸長ポリグルタミン鎖による CREB 依存性の転写活性の検討 |

|        |    |    |         |
|--------|----|----|---------|
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 | 西 澤 正 豊 |
|        | 副査 | 教授 | 那 波 宏 之 |
|        | 副査 | 教授 | 崎 村 建 司 |

#### 博士論文の要旨

現在までに9つの遺伝性の神経変性疾患（球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症：DRPLA、脊髄小脳失調症1型、2型、マシャドジョセフ病/3型、6型、7型、17型）において病因遺伝子の翻訳領域内にポリグルタミン鎖をコードするCAGリピートの異常伸長が見出されることが、これまでの分子遺伝学的な研究で明らかにされている。特にDRPLAの病態機序としては、伸長ポリグルタミン鎖を含む変異蛋白が核内に集積し、それにより神経細胞毒性を獲得すると推測されており、これまでに *in vitro* の実験系により神経細胞の機能にとって重要なCREB依存性の転写活性に障害を引き起こすことが報告されている。本症の病態機序におけるCREB依存性転写障害の有無は、本症の病態機序を検討し治療法を開発するためにきわめて重要である。我々のグループは伸長したポリグルタミン鎖による神経変性機構を個体レベルで解析することを目的に、プロモーター領域を含むDRPLA患者のゲノムDNA全長を単一コピーで導入したDRPLAモデルマウスを作製した。このモデルマウスは神経症状を呈さないが、世代間でCAGリピート数の変化を認めること、世代間の不安定性にparental biasを認めること、体細胞モザイクを認めることなど、DRPLA症例と様々な点で類似していることを確認している。また病理学的には、加齢と共に核内に増大ポリグルタミン鎖の蓄積を認め、12週齢ではほぼ全ての神経細胞に核内蓄積を認め、ヒトDRPLA剖検脳とその病変分布、核内蓄積像も類似している。そこでCREB依存性の転写活性の変化をレポーター解析することができるCRE-*LacZ*トランスジェニックマウス(RSVプロモーターの下流に6個の連続したCRE配列をもち、更にその下流に $\beta$ -galactosidaseの発現領域をもつ導入遺伝子を持ったマウス)を用いて、DRPLAモデルマウスを自然交配させて得られるダブルトランスジェニックマウスを作製し、個体レベルにおけるCREB依存性の転写活性が伸長ポリグルタミン鎖の神経細胞での核内蓄積により変化を受けるのか、 $\beta$ -galactosidase発現によるレポーター解析を行い検証した。非刺激下では $\beta$ -galactosidaseの発現はごく僅かであるため、nicotineを投与するこ

とにより CREB 依存性の転写活性を増強して比較検討することとした。nicotine を腹腔内投与した CRE-*LacZ* トランスジェニックマウスでは、同量の生理食塩水を投与した場合を対照に X-Gal 染色を行って比較すると、nicotine により CREB 依存性の転写活性の著明な増強を確認できた。そこで nicotine を腹腔内に投与して 2 時間後のマウス脳から切片を作製し、hippocampus レベルの脳皮質における個々の神経細胞を 1C2 抗体と抗  $\beta$ -galactosidase 抗体により二重蛍光免疫染色を行い、その蛍光強度を測定した。伸長ポリグルタミン鎖の核内蓄積度と nicotine 刺激による CREB 依存性の転写活性化との関連性を検索したところ正の線型相関関係を見出し、個体レベルでは伸長ポリグルタミン鎖が蓄積するほど CREB 依存性の転写活性が増強されていることが示された。核内集積を強く認める細胞ほど転写活性が増強されていることを考えると、こうした神経細胞では何らかの代償機構が強く働いていると考えられた。このような代償作用が存在することは、本症の治療方法を考察する上で興味深いと考え、報告する。

#### 審査結果の要旨

齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) では、伸長ポリグルタミン鎖 (ポリ Q) を含む変異蛋白が CREB 転写に障害を引き起こすことにより、細胞毒性を発揮すると推定されている。患者由来のゲノム DNA 全長を導入した DRPLA トランスジェニックマウス (Tg) では、病理学的にヒト DRPLA 脳とポリ Q の分布や核内蓄積像がよく再現された。そこで本研究では CREB 依存性の転写障害が個体レベルに及ぼす影響を検討するために、CREB 依存性の転写活性をレポーター解析し得る CRE-*LacZ* Tg と、DRPLA Tg とを自然交配させた二重 Tg マウスを作成した。

CREB 転写を増強するためにニコチンを腹腔内投与した後、海馬レベルの脳皮質においてポリ Q を認識する 1C2 抗体と抗  $\beta$  ガラクトシダーゼ抗体による二重蛍光免疫染色を行い、個々の神経細胞の蛍光強度を測定した結果、両者の蛍光強度の間には正の相関関係を認めた。すなわち、個体レベルでは伸長ポリグルタミン鎖が蓄積するほど、CREB 依存性の転写活性が増強されており、何らかの代償機構が働いていることが示唆された。

以上、本研究は伸長ポリグルタミン鎖の蓄積と CREB 依存性転写活性の関連性をはじめて個体レベルで解析し、転写活性の亢進を示した点に学位論文としての価値を認めた。