

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 安戸 方邦
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 639 号
学位授与の日付 平成 27 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 「発生期の神経筋活動遮断時のポリグルタミン毒性について」

論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 佐藤 昇
副査 教授 柴田 実

博士論文の要旨

【目的】 脊髄運動ニューロンは神経筋接合部の形成後、「プログラムされた細胞死」と呼ばれる現象によって、その約半数が失われる。しかしアセチルコリン受容体の阻害剤である curare (d-tubocurarine) の投与によって神経筋活動を遮断すると、この現象が回避される。このメカニズムは不明であるものの、運動ニューロンに対する何らかの保護作用があるものと推察される。ところでポリグルタミン (polyQ) 病は、遺伝子中にあるグルタミンをコードする CAG 配列の異常重複によって引き起こされる遺伝性の神経変性疾患で、「プログラムされた細胞死」と同様な分子メカニズムの関与が示唆されている。そこで発育鶏胚を用いた polyQ 病モデル系で神経筋活動を遮断し、その効果を観察することで、polyQ 病の分子メカニズムの一端を明らかにすることを試みた。

【方法】 polyQ タンパク断片として、Machado-Joseph 病患者の ataxin-3 遺伝子から得られた 77 回繰り返し CAG 配列 (Q77) を用いた。またコントロールとして 10 回繰り返し CAG 配列 (Q10)、および運動ニューロンの可視化のため GFP (Green Fluorescent Protein) を用意した。これらの遺伝子を In ovo electroporation 法で、孵卵 3 日目の発育鶏胚の神経管に導入した。なお上記の遺伝子は islet-1 エンハンサー/プロモーターに連結して用い、運動神経特異的に発現させるようにした。脊髄前角中での運動ニューロンの特定は、縫工筋に DiI (Carbocyanine fluorescent dyes) の結晶または溶液を塗布接種し、逆行性に拡散させて行った。神経筋活動の遮断は羊膜をスクラッチ後、5%curare/生理食塩水溶液を孵卵 6 日目から 10 日目の間、毎日 1 日 1 回 300 μ l (1.5 μ g) ずつ胚上に滴下して行った。運動ニューロン細胞体の観察、撮影は、孵卵 6 日、8 日、10 日目の第一腰椎のレベルで凍結横断切片 (厚さ 10 μ m) を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で行った。細胞体の面積は、画像処理ソフトウェア Image J で計測した。多群間の比較は一元配置分散分析法で行い、 $P < 0.05$ をもって有意とした。

【結果】 発育鶏胚における腰髄レベルの運動ニューロンの細胞体は、孵卵 8 日から 10 日目にかけて面積が大きくなり、樹状突起が発達した。Q10 導入後の運動ニューロンは、細胞体の面積、細胞の大きさ、形態ともに、GFP 単独導入後のものと有意な差がなかったが、Q77 導入によって細胞体面積が約 1/3 に縮小 (有意) し、細胞は丸い形態となって、樹状突起も見られなかった。curare によって神経筋活動を遮断すると、縫工筋を支配する前角が拡大していたが、個々の細胞体の大きさと形態はともに対照群と違いが見

られなかった。Q77 導入後に神経筋活動遮断を行った結果、「プログラムされた細胞死」の回避によると思われる細胞数の増加が観察されたものの、これらの細胞は小さく丸く、樹状突起もなく、Q10 あるいは GFP 単独導入に比較して面積も約 1/3 に縮小しており、神経筋活動遮断を行わないものと有意な差が見られなかった。

【考察】これまで運動ニューロンの細胞体の発達については報告が少なかったが、GFP の In ovo electroporation 法によってまばらに運動ニューロンを可視化することで、細胞体の面積を測定することが可能となった。その結果、運動ニューロン死がピークを迎える孵卵 7 日から 8 日目を過ぎて、孵卵 8 日から 10 日目にかけて細胞体の面積が大きくなることが分かった。これは細胞死によってできた脊髄前角内のスペースを利用して生き残った細胞の肥大が起こっていることを示しているのかもしれない。Q10 の導入では運動ニューロンへの影響が見られなかった一方で、Q77 は細胞の形態、大きさともに明らかな発達阻害をもたらした。よってグルタミンの重複そのものが神経毒性として作用していることは明らかである。またこの結果から、発育鶏胚を用いた本実験系が polyQ 病のモデルとして有用である可能性が示唆された。これまで curare による神経筋活動の遮断下で運動ニューロン細胞体の形態を見た報告はなかったが、上記 In ovo electroporation 法による運動ニューロン可視化技術を用いることで、細胞体の大きさ、形態は、curare を添加していない、通常の運動ニューロンと同じ形態を持っていることが分かった。また神経筋活動遮断の有無にかかわらず Q77 の毒性が変わらなかったことは、polyQ の毒性メカニズムが、「プログラムされた細胞死」の分子メカニズムとは異なることを示していると考えられた。

【結論】発育鶏胚の脊髄運動ニューロンにおいて、神経筋活動遮断は「プログラムされた細胞死」の回避には作用するが、ポリグルタミンによる細胞毒性の回避には作用しないことが明らかになった。従って両者の細胞障害に至る機序は異なることが示唆された。

審査結果の要旨

発生期の脊髄運動神経は、筋原基に向かって軸索を伸長し、シナプスを形成する。その後、プログラム細胞死を起こし、約半数が失われる。この際クラレ投与により神経筋間の活動を遮断すると、神経細胞死が抑制される。ポリグルタミン(polyQ)病は、優性遺伝を示す神経変性疾患である。原因遺伝子の中にある CAG 反復配列の伸長によってコードするタンパクのグルタミン配列が伸長し、細胞障害性を獲得することにより、神経細胞が変性すると考えられている。これら 2 つの細胞障害のメカニズムの共通性を調べるために、ニワトリ胚の in ovo エレクトロポレーション法を用いて実験を行った。孵卵開始 3 日目胚の脊髄に運動神経特異的に GFP を発現するプラスミドを遺伝子導入し、腰髄の GFP 陽性運動神経を観察したところ、細胞体は孵卵 8 日目から 10 日目に大きくなることが観察された。同様の方法を用いて Machado-Joseph 病の原因遺伝子 ataxin-3 の部分欠失型遺伝子を導入し、77 個のグルタミン配列をもつ polyQ タンパクを発現させた。その結果、孵卵 10 日目あるいは 11 日目の胚では、対照と比べて運動神経の細胞体成長が認められず、細胞体は小さいままであり、クラレ投与した胚でも同様に細胞体成長が認められなかった。つまり、polyQ による神経障害性はクラレ投与によって回避されないことが明らかになった。このことから、運動神経においてプログラム細胞死と polyQ による神経障害性のメカニズムは異なっていると考えられた。

以上、申請者はニワトリ胚の運動神経特異的に遺伝子を発現する手法を確立し運動神経の発達過程を観察する事に成功した。さらに、クラレによる細胞死抑制を指標にプログラム細胞死と polyQ による神経障害性のメカニズムを調べる実験系を立ち上げ、それらの差異について調べる事に成功した。これらの

点に学位論文としての価値を認める.