

京都大学	博士(医学)	氏名	皆川 栄子
論文題目	Chicken DT40 cell line lacking DJ-1, the gene responsible for familial Parkinson's disease, displays mitochondrial dysfunction (家族性パーキンソン病の責任遺伝子 DJ-1 を欠損させたニワトリ由来 DT40 細胞はミトコンドリア機能不全を呈する)		
(論文内容の要旨) パーキンソン病 (PD) は主に黒質線条体のドパミン神経細胞死により進行性の運動機能障害を来す神経変性疾患である。わが国の患者数は 15~18 万人にのぼるが、病態の進行を抑制する治療法はなく、病態の解明と新たな治療法の開発が急がれる。 常染色体劣性 PD の原因遺伝子として <i>PINK1</i> ・ <i>Parkin</i> ・ <i>DJ-1</i> が同定された。その結果、 <i>DJ-1</i> が転写調節や自己酸化作用を通じて抗酸化ストレス作用を持つことや、 <i>PINK1</i> と <i>Parkin</i> が協働してミトコンドリアの品質管理を行うことが明らかにされた。これらの研究は、ミトコンドリア機能不全や酸化ストレスが古くから孤発性 PD の発症原因の一つと考えられている点からも、大変興味深い。一方、これらの遺伝子の遺伝子改変マウスは PD 様の表現型を示さないため、モデルマウスを用いたさらなる病態解明や、早期診断および創薬のためのツール開発には限界がある。 ニワトリ B リンパ球由来細胞株 DT40 は、脊椎動物由来の細胞株としては例外的に効率よく標的遺伝子を破壊でき、遺伝子の多重破壊も可能である。また浮遊細胞のため扱いが容易で、増殖が速く、ハイスループットスクリーニングへの応用実績もある。PD の原因遺伝子はニワトリでもよく保存されており、リンパ球でも発現している。さらに PD 患者では、神経細胞だけでなくリンパ球でもミトコンドリアの機能不全が見られる。従って、DT40 で PD の原因遺伝子を破壊することにより、病態解明のみならず新規創薬や診断方法の開発にもつながる新たな PD モデルを樹立できる可能性がある。 そこで本研究では、 <i>DJ-1</i> 遺伝子を破壊した DT40 細胞を作製し、既知の <i>DJ-1</i> の生理的機能に関する知見をもとに、 <i>DJ-1</i> 欠損に伴う表現型として期待される酸化ストレスへの脆弱性の有無の検討に加え、PD モデルの表現型解析に必須であるミトコンドリアの形態と機能の解析が DT40 において可能であるかどうかの検討を行った。 まずニワトリ <i>DJ-1</i> 遺伝子の第 4 エクソンにピューロマイシンまたはヒスチジノール耐性遺伝子を挿入した <i>DJ-1</i> 破壊ベクターを作製した。次に野生型 DT40 細胞にピューロマイシン耐性遺伝子を持つ <i>DJ-1</i> 遺伝子破壊ベクターを導入し、 <i>DJ-1</i> +/- 細胞を作製した。さらに、この <i>DJ-1</i> +/- 細胞にヒスチジノール耐性遺伝子を持つベクターを導入し、 <i>DJ-1</i> 欠損 DT40 細胞を作製した。 この <i>DJ-1</i> 欠損 DT40 細胞において、酸化ストレス負荷時の活性酸素種の量を、活性酸素種により蛍光を発する色素を用いて測定したところ、 <i>DJ-1</i> 欠損 DT40 細胞内に蓄積する活性酸素種の量は、野生型 DT40 細胞と比較して有意に増加していた。また酸化ストレス負荷により誘導される細胞死も有意に増加していた。これは <i>DJ-1</i> の既知の生理的機能である抗酸化ストレス作用が DT40 細胞でも保持されていることを示唆する。さらに、 <i>DJ-1</i> 欠損 DT40 細胞のミトコンドリアの膜電位を膜電位依存的染色剤を用いて測定し、ミトコンドリアの形態をミトコンドリア特異的タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色で評価した。その結果、 <i>DJ-1</i> 欠損 DT40 細胞では野生型 DT40 細胞と比較しミトコンドリア膜電位が有意に低下し、ミトコンドリアの形態が断片化していた。これらは <i>DJ-1</i> 欠損 DT40 細胞がミトコンドリア機能不全を呈することを示唆する。 以上より、DT40 細胞は新たな PD モデルの樹立に有用なツールであることが示唆された。将来的には、創薬のためのアッセイ系の樹立や、患者由来リンパ球を用いた診断方法の開発にも役立つ系であると考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、ニワトリ B リンパ球由来細胞株 DT40 を用いた効率のよい標的遺伝子破壊法を応用し、常染色体劣性パーキンソン病(PD)の原因遺伝子 *DJ-1* を欠損した DT40 がミトコンドリア機能不全を示すことを明らかにした。これは PD 患者由来リンパ球と同様の表現型である。

まず、*DJ-1* 遺伝子に異なる薬剤耐性遺伝子を挿入した 2 種類の遺伝子破壊ベクターを構築して DT40 細胞に順次導入し、*DJ-1* 欠損 DT40 細胞を作製した。

この *DJ-1* 欠損 DT40 細胞では、酸化ストレス負荷時に細胞内に蓄積する活性酸素種の量が、野生型 DT40 細胞と比較して有意に増加していた。また酸化ストレス負荷により誘導される細胞死も有意に増加していた。これらは *DJ-1* の生理的機能である抗酸化ストレス作用が DT40 細胞でも保持されていることを示唆する。

また、*DJ-1* 欠損 DT40 細胞では野生型 DT40 細胞と比較しミトコンドリアが断片化し、その膜電位も有意に低下していた。これらは *DJ-1* 欠損 DT40 細胞がミトコンドリア機能不全を呈することを示唆する。

以上より、DT40 細胞は新たな PD モデルの樹立に有用なツールであり、将来的には創薬のためのアッセイ系の樹立や、患者由来リンパ球を用いた診断方法の開発にも役立つ系であると考えられる。

以上の研究は、PD の病態の解明に貢献し、治療法および侵襲性の低い診断方法の確立に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 2 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降