

京都大学	博士（薬科学）	氏名	福井 悠斗
論文題目	幹細胞技術とモデルマウスを用いたPerry病に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p><b>Perry病</b>は、<b>DCTN1</b>遺伝子のミスセンス変異を原因とする常染色体顕性遺伝性の神経変性疾患であり、パーキンソニズム、うつ症状、体重減少および中枢性低換気を呈する希少疾患である。<b>50</b>歳前後に発症し約<b>5</b>年で死亡する予後不良の疾患であるが、有効な治療薬は未だ開発されていない。</p> <p>本研究の第一章では、神経変性疾患病態と密接に関わる細胞内凝集体形成に<b>Perry</b>病原因遺伝子変異が与える影響を網羅的に解析した。また第二章では、セロトニン神経変性脱落が生じる<b>Perry</b>病の疾患モデルとして、<b>Perry</b>病原因遺伝子変異を導入したヒトiPS細胞を樹立するとともに、セロトニン神経へと分化誘導しその表現型を解析した。さらに、<b>Perry</b>病原因遺伝子変異を導入したマウスを作製し行動学的検討に供した。</p> <p><b>第一章 Perry病原因遺伝子変異がDCTN1凝集体形成に与える影響の解明</b></p> <p><b>Perry</b>病原因遺伝子変異として、<b>DCTN1</b>遺伝子におけるミスセンス変異が<b>9</b>種類同定されており、<b>Perry</b>病患者死後脳では<b>TDP-43</b>および<b>DCTN1</b>陽性の凝集体が存在することが示されている。<b>TDP-43</b>凝集体は多くの神経変性疾患で共通して見られる病理学的特徴であることから、<b>DCTN1</b>遺伝子変異による細胞内凝集体形成が神経変性の背景にあると考えられている。既に一部の<b>Perry</b>病変異<b>DCTN1</b>が細胞内凝集体を形成することが示されているが、<b>DCTN1</b>遺伝子の変異は筋萎縮性側索硬化症（<b>ALS</b>）患者や健常者においても見出されており、細胞内凝集体が<b>Perry</b>病原因変異に特異的なものであるかは不明であった。そこで本章では、変異<b>DCTN1</b>の凝集体形成能を網羅的に解析した。その結果、<b>ALS</b>および健常者で見出された変異<b>DCTN1</b>は野生型同様の微小管状の局在を示したのに対し、<b>Perry</b>病原因変異<b>DCTN1</b>の全てが凝集体を形成することを見出した。さらに、野生型<b>DCTN1</b>の存在下ではこの凝集体形成が顕著に抑制されることを見出した。これらの結果は、<b>Perry</b>病患者の非変異アレル由来の<b>DCTN1</b>による疾患抑制の可能性を示唆するものである。</p> <p><b>第二章 Perry病病態モデルの構築と病態発症機序の解明</b></p> <p><b>Perry</b>病患者死後脳におけるセロトニン神経の変性脱落から、本疾患の病態形成におけるセロトニン神経の重要性が示唆されているが、その詳細は未だ不明である。そこで本章では、まずヒトiPS細胞からセロトニン神経への分化誘導法を新たに構築した。セロトニン神経発生に重要な転写因子<b>7</b>種類を様々な組み合わせで発現させた結果、<b>ASCL1</b>および<b>LMX1B</b>の発現によりセロトニン神経への分化が誘導されることを見出した。分化誘導したセロトニン神経はセロトニン合成酵素である <b>TPH1</b>, <b>TPH2</b> および <b>AADC</b> を発現し、脱分極刺激によるセロトニン遊離能を有しており、生体におけるセロトニン神経と類似の性質を有することが示唆される。<b>Perry</b>病患者は片側</p>			

のアレルのみに変異を有しているため、ゲノム編集技術を用いてG67DあるいはY78Cの変異を片側のアレルのみに導入したiPS細胞および一塩基挿入によるヘテロノックアウトiPS細胞を樹立した。樹立したクローンはいずれも幹細胞様の形態を有し、未分化マーカーOCT4陽性であったことから未分化状態が保持されていることが示唆される。樹立したiPS細胞をセロトニン神経へと分化誘導したところ、セロトニン細胞数に有意な差は認められなかった。Perry病は中高年発症であることから加齢などのストレスが病態発症を誘発している可能性を考え、早老病の原因タンパク質であるプロジェリンを発現させた。その結果、プロジェリンを発現したG67DおよびY78C変異iPS細胞でのみセロトニン神経細胞数の減少が観察された。さらに変異の行動学的影響を調べるためG67Dノックインマウスを作製した。6ヶ月齢にて行動学的解析に供したところ、ヘテロノックインマウスはうつ様行動の指標である尾懸垂試験における無動時間が有意に延長していた一方、自発運動量に有意な差はなかった。これらの結果は、細胞老化と変異の相乗的効果によるセロトニン神経変性脱落がPerry病の病態形成に関わることを示唆している。

以上、著者はDCTN1変異体の網羅的解析により、Perry病原因変異DCTN1の全てが凝集体を形成し、野生型DCTN1による凝集抑制の可能性を見出した。また、新たなセロトニン神経への分化誘導方法を確立し、ヒトiPS細胞およびマウスにPerry病原因変異を導入することで、病態モデルセロトニン神経および病態モデルマウスを作製することに成功した。作製したモデルを解析することで、Perry病におけるセロトニン神経病理を再現した。上記の知見は、Perry病の病態解明および治療薬開発に資する基礎的な知見となるものである。

(論文審査の結果の要旨)

Perry病は、DCTN1遺伝子のミスセンス変異を原因とし、パーキンソニズム、うつ症状、体重減少および中枢性低換気を呈する常染色体顕性遺伝性の神経変性疾患である。50歳前後に発症し約5年で死亡する予後不良の疾患であり、有効な治療薬は未だ開発されていない。本研究の第一章では、神経変性疾患病態と密接に関わる細胞内凝集体形成にPerry病原因遺伝子変異が与える影響を網羅的に解析した。第二章では、Perry病原因遺伝子変異を導入したヒトiPS細胞を樹立するとともに、セロトニン神経へと分化誘導しその表現型を解析した。さらにPerry病原因遺伝子変異を導入したマウスを作製し行動学的検討に供した。

### 第一章 Perry病原因遺伝子変異がDCTN1凝集体形成に与える影響の解明

本章では、変異DCTN1の凝集体形成能を網羅的に解析した結果、ALSおよび健常者で見出された変異DCTN1は野生型同様の微小管状の局在を示したのに対し、Perry病原因変異DCTN1の全てが凝集体を形成すること、野生型DCTN1の存在下ではこの凝集体形成が顕著に抑制されること、を見出した。これらの結果は、Perry病患者の非変異アレル由来のDCTN1による疾患抑制の可能性を示唆するものである。

### 第二章 Perry病病態モデルの構築と病態発症機序の解明

本章では最初に、ASCL1およびLMX1Bの発現によりヒトiPS細胞からセロトニン神経への分化が誘導されることを見出した。次に、ゲノム編集技術を用いてG67DあるいはY78Cの変異を片側のアレルのみに導入したiPS細胞および一塩基挿入によるヘテロノックアウトiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞をセロトニン神経へと分化誘導し、早老病の原因タンパクであるプロジェリンを発現させた結果、両変異iPS細胞でのみセロトニン神経細胞数の減少が観察された。さらにG67Dヘテロノックインマウスを作製したところ、6ヶ月齢において、うつ様行動の指標である尾懸垂試験における無動時間が延長していた。これらの結果は、細胞老化と変異の相乗的効果によるセロトニン神経変性脱落がPerry病の病態形成に関わることを示唆している。

以上、著者は、Perry病原因変異DCTN1の全てが凝集体を形成し、野生型DCTN1が凝集抑制を担う可能性を見出した。さらに、新たなセロトニン神経への分化誘導方法を確立するとともに、ヒトiPS細胞およびマウスにPerry病原因変異を導入することで病態モデルセロトニン神経および病態モデルマウスを作製することに成功し、その解析によりPerry病におけるセロトニン神経病理を再現した。本研究成果は、Perry病の病態解明および治療薬開発に資する重要な基礎的知見となるものである。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年2月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、(令和9年3月25日までの間)当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。