京都大学	博士（ 医 科 学 ）	氏 名	田 代 善 崇
論文題目	Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. （運動ニューロン特異的プロテアソーム欠損はALSの細胞病理を再現する―オートファジー欠損との比較―）		

(論文内容の要旨)

【背景】筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、筋萎縮・筋力低下が進行し、3年から5年程度で死に至る神経変性疾患の一種であり、近年、家族性ALSの原因遺伝子としてTDP-43, FUS, optineurin, ubiquilin2が同定されている。ALSをはじめとする多くの神経変性疾患では、変異タンパク質の蓄積が認められ、タンパク質品質管理機構であるユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー-リソソーム系の障害が病因仮説として挙げられている。ユビキチン・プロテアソーム系では、複数のサブユニットから構築される26Sプロテアソームが、ポリユビキチン化された基質を選択的に分解する。オートファジー・リソソーム系では、基質となる細胞内小器官などがオートファゴゾームと呼ばれる二重膜で取り囲まれ、リソソーム融合を経て、非特異的に分解される。

【目的】脊髄運動ニューロン特異的に26Sプロテアソームとオートファジーに必須な分子を欠損するマウスをそれぞれ作製し、各々のタンパク質分解機構の障害がALS類似の病態を引き起こすかどうか検討する。

【方法】26Sプロテアソームサブユニットの一つであるRpt3遺伝子、およびオートファゴソーム形成関連因子の一つであるAtg7をそれぞれlox配列で挟むよう遺伝子改変したfloxed-Rpt3マウス及びfloxed-Atg7マウスと脊髄運動ニューロン特異的にCreを発現するマウス（VAChT-Cre.Fastマウス）を掛け合わせ、脊髄運動ニューロン特異的にプロテアソームおよびオートファジー分解を欠損するRpt3-CKOおよびAtg7-CKOマウスを作製・解析し、各々のタンパク質分解機構とALSの病態との関連を検討した。VAChT-Cre.Fastマウスでは脊髄の運動ニューロンの50%がCreを発現し、生後5週間で最大発現となる。

【結果】Rpt3-CKOマウスは表現型として、8週齢以降に振戦様症状を呈し始め、尻尾吊り下げ時の下肢伸展反射の低下を示した。ロタロッド、握力測定装置を用いて運動機能解析を行ったところ、Rpt3-CKOマウスは運動機能の低下を示した。次に脊髄の病理学的解析を行ったところ、6週齢のRpt3が欠損した運動ニューロンにおいて、ユビキチンの蓄積を認め、運動ニューロン数は進行性に減少していた。12週齢脊髄でのH&E染色では、孤発性ALSに特徴的なchromatolytic neuronやbasophilic inclusionを認めた。また、局在変化と異常蓄積がTDP-43, FUS, optineurin, ubiquilin2それぞれに局在変化・蓄積・凝集が確認された。これらはヒトの孤発性ALSで見られる病理所見と類似であった。併せてグリオーシスも観察された。これに対して、Atg7-CKOマウスは2年齢まで表現型・運動機能の変化はなかった。Atg7が欠損した運動ニューロンでは巨大な封入体が形成されていたが、ニューロン数の変化は無かった。この封入体はユビキチン, p62, Nbr1, ubiquilin2 免疫陽性であったが、TDP-43, FUS, optineurinは陰性であった。

【考察】ユビキチン・プロテアソーム系はオートファジー・リソソーム系に比べてよりALS病態に影響を及ぼしていると考えられる。

【結論】脊髄運動ニューロン特異的なユビキチン・プロテアソーム系の欠損はALSの臨床・病理所見を再現する。

（論文審査の結果の要旨）

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロン死を来す原因不明の神経変性疾患である。ALSの原因として異常タンパク質蓄積の関与が報告されているが、病態における役割は不明であった。運動ニューロンでのタンパク質分解機構の障害とALSとの関連を調べるため、脊髄運動ニューロン特異的に主要な分解機構であるユビキチン・プロテアソーム系あるいはオートファジー・リソソーム系を欠損するマウスを作出し検討した。

プロテアソーム関連因子Rpt3、或いはオートファジー関連因子Atg7を脊髄運動ニューロン特異的に欠損するマウス（Rpt3-CKO、Atg7-CKO）を作製した。Rtg3-CKO は進行性の運動機能低下と運動ニューロン数減少を来し、孤発性ALSの特徴的所見であるTDP-43, FUS, optineurin, ubiquilin2の局在異常や凝集形成・グリオーシスを呈した。一方、Atg7-CKOは2年齢まで運動機能・運動ニューロン数は不変で、運動ニューロン内にオートファジー関連タンパク質の蓄積を認めたが、ALS関連因子蓄積は殆ど認めなかった。

これらの結果から、オートファジー・リソソーム系ではなく、ユビキチン・プロテアソーム系の障害がALS病態の基盤になっていることが示唆された。

以上の研究は、ALS病態機序の解明・治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（ 医科学 ）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 25 年 1 月 23 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