

(様式4)

学位論文の内容の要旨

() 印

(学位論文のタイトル)

Generation of a neurodegenerative disease mouse model using lentiviral vectors carrying an enhanced synapsin I promoter

(レンチウイルスベクターを用いた改良型SynapsinIプロモーターによる神経変性疾患モデルマウスの作出)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判、ワープロ等使用

脊髄小脳変性症 (Spinocerebellar degeneration; SCD) は運動失調を主症状とする神経変性疾患であり根治治療法が存在していない難病である。国内には約2万5千人の認定患者がおり、約1/3は遺伝性のSpinocerebellar ataxia (SCA)である。現在までにSCAは37の型に分類することが可能である。そのうちの7つの型はポリグルタミン病であり、これらが国内ではSCA患者の半数以上を占めている。ポリグルタミン病は遺伝子内に存在するCAGリピートの異常伸長が起因となり、タンパク質内のポリグルタミン鎖が異常伸長することで神経細胞障害及び細胞死が生じるとされている。ポリグルタミン病のSCAは、詳細は異なるものの、小脳の神経細胞を中心とし、大脳から脳幹にかけての幅広い領域の神経細胞が障害されるという共通の特徴を有している。これらの病態解明や治療法の開発に向けて様々な種類の遺伝子組換え (Tg) SCAモデルマウスが開発されているが、脳全体、特に後脳の幅広い神経細胞に発現誘導可能なプロモーターが存在しておらず、Tgマウスでは特定領域に限定的な発現及び解析になってしまうという問題があった。さらにSCAモデルとなる非ヒト霊長類は作出されていないことからマウスで開発された治療法を霊長類で追試することが出来ない。非ヒト霊長類を用いた治療効果の検討は臨床応用する際に重要となるため、今回の研究では、脳全体の神経細胞特異的かつ強力に遺伝子発現を誘導するプロモーターを開発し、そのプロモーターを用いてCNS全体の神経細胞に導入遺伝子を発現するSCAモデルマウス及び非ヒト霊長類を作出することを目的とした。

神経細胞特異的プロモーターはいくつか存在するが、比較的神経細胞特異性が高く発現量も強いとされていることからヒト及びラット由来のSynapsin I (SynI) プロモーターを3種類用いた。約400bpのヒト由来 (hSynI(0.4)) のSynIに対してはCMVプロモーターのエンハンサーを含めた領域 (CMV enhancer; CMVe) を付加することで発現増強を行った (CMVe-hSynI(0.4))。また、ラット由来で長さが異なる約500bp (rSynI(0.5)) と1,000bp (rSynI(1.0)) に対してはCMVプロモーターのTATA BOXを含めた領域 (minimal CMV; minCMV) を付加した (rSynI(0.5)-minCMV, rSynI(1.0)-minCMV)。SynIプロモーターによってGFPを発現するレンチウイルスベクターをそれぞれ作製、マウス小脳にインジェクションし、GFP発現細胞数や発現細胞種を解析した。3種類とも発現は強い傾向にあったが、発現細胞数ではSynI(0.5)-minCMVやCMVe-hSynI(0.4)と比べてrSynI(1.0)-minCMVで多いことが分かった。

また発現細胞種を解析すると、CMVe-hSynI(0.4)はグリア細胞への漏れが大きかったが、rSynI(1.0)-minCMVでは漏れが有意に抑えられていることが分かり、rSynI(1.0)-minCMVプロモーターを使用することで、高い神経細胞特異性を維持しつつ高発現が得られることが分かった。次にrSynI(1.0)-minCMVによってCNS全体の神経細胞に遺伝子発現が誘導可能か調べるためレンチウイルスベクターを用いてrSynI(1.0)-minCMVプロモーターによってGFPを発現するTgマウスを作出し、GFP発現細胞を解析した。その結果、CNS全体でGFP発現が観察できた。さらに免疫染色後、大脳から脳幹にかけての5箇所を観察したところ、GFP発現細胞のうち99.5%以上が神経細胞であったことから神経細胞特異的に発現していることが分かった。発現は1ヶ月齢マウスでも1歳齢マウスでも変わらず維持されていた。CNS全体の神経細胞に遺伝子導入可能なプロモーターが開発できたことにより、続いて大脳から脊髄まで幅広い領域の神経細胞が障害されるSCA1型（SCA1）をターゲットとしたTgマウスを作出した。コンストラクトはGFPを残し、P2A配列を挟んでSCA1の原因遺伝子となる*ATXN-1*を配置した。ヒト*ATXN1*のCAGリピートは40回を超えて伸張するに従いSCA1を発症する確率が上昇し、早期発症や重症化傾向がある。今回早期に発症させることを目的に98回まで伸張させた（*ATXN-1[Q98]*）。6匹のファウンダーマウスを得られ、すべての胎児脳でGFP蛍光が観察できた。その後飼育し、運動失調を呈し体重減少が観察された3個体を解析した結果、GFP及びAtaxin-1タンパク質がCNS全体の神経細胞において観察できた。また、Ataxin-1タンパク質が核内に凝集している様子や、小脳の分子層が有意に萎縮しているなど、SCA1様の症状が組織的、細胞的にも観察することができた。これらの結果、rSynI(1.0)-minCMVプロモーターはマウスのCNS全体の神経細胞へSCA1の原因遺伝子を発現させ、SCA1様症状を誘起することが可能であることが分かった。

SynIプロモーターは動物種間において相同性が高いことから、他の動物でも同じような活性が得られる可能性が高いと考えられる。そのため、CAGリピートを123回まで伸張させた*ATXN1*を用いてSCA1の非ヒト霊長類モデルとなるTgマーマーモセットの作出を試みた。作出は、マーマーモセットの未受精卵と精子を用いて体外受精を行い、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入した胚を仮親の子宮に戻すという方法で行った。現在までに仮親へ16回59個の胚を移植し、内7回は母体での着床を確認、最終的に仮親2個体から3頭のTgマーマーモセットを出産させることに成功した。移植胚から出産に至るまでの成功率は5.1%である。今後、Tgマーマーモセットを分子的、細胞的、表現形的に解析を進めていく予定である。