

平成 19年 9月

## 深田育代 学位論文審査要旨

主 査 難 波 栄 二  
副主査 井 上 貴 央  
同 中 島 健 二

### 主論文

Gene expression analysis of the murine model of amyotrophic lateral sclerosis:

Studies of the Leu126delTT mutation in SOD1

(筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける遺伝子発現解析 :

SOD1Leu126delTT変異における検討)

(著者 : 深田育代、安井建一、北山通朗、土井浩二、中野俊也、渡辺保裕、中島健二)

平成19年7月 Brain Research 1160巻 1頁~10頁

# 学 位 論 文 要 旨

## Gene expression analysis of the murine model of amyotrophic lateral sclerosis: Studies of the Leu126delTT mutation in SOD1

### (筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける遺伝子発現解析： SOD1Leu126delTT変異における検討)

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) の病因は未だ不明である。SOD1遺伝子上の第126コドン(ロイシン)における2bp (TT) 欠損をもつ家族性筋萎縮性側索硬化症 (Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: FALS) のモデル動物として、同遺伝子異常をもちALSと同様の症状および病理学的変化を呈するSOD1トランスジェニックマウス (SOD1L126delTT TgM) が作成されている。ALSの病因因子を探ることを目的として、発症前後におけるSOD1L126delTT TgM脊髄における遺伝子発現および発現量の変化を、cDNAマイクロアレイを用いて解析した。

## 方 法

実験にはSOD1L126delTT TgM、年齢を合わせたB/CL56マウスをコントロールマウス (nTgM) として使用した。cDNAマイクロアレイはtwo-color dye-swap法にて行われた。発症前TgM (n=2)、発症後TgM (n=2) と年齢を合わせたnTgMの脊髄 (頸髄～腰髄) より抽出したRNAサンプルを用いた。それぞれのペアについて、Cy3/Cy5 (nTgM/TgM)、Cy5/Cy3 (TgM/nTgM) の2パターンでラベリングした。解析にはAceGene<sup>®</sup> Mouse Oligo Chip 1 Chip Version (HITACHI, Japan) を使用し、DNASIS Array (HITACHI) で測定した。Cy3、Cy5の吸光度から算出されたそれぞれの遺伝子発現量 (intensity) の比率をratioとした。2.0以上を過剰発現、0.5以下を発現抑制と定義した。1遺伝子につき計4つのratio; Cy5/Cy3 (TgM/nTgM) およびCy3/Cy5 (nTgM/TgM) の逆値をrepeated measure test (avadis<sup>®</sup>V4. X (Stratagene, CA, USA)) を用いて統計学的解析し、 $P < 0.01$ 以下のものを有意とした。発症後TgMの脊髄で過剰発現していた54個の遺伝子のうち10個について、real-time PCRによる半定量的評価を行った。10個の遺伝子は、発症前より過剰に発現しているもの、また過去に炎症、アポトーシス、また神経変性疾患との関連性について報告があるものを理由に選択した。サンプルはマイクロアレイで用いたものに新たに追加し、n=6とした。プライマーはTaqMan<sup>®</sup>プローブ (ABI Japan) を使用し7900HT (ABI Japan) にて測定した。測定された各遺伝子発現量 (Quantity) をGAPDHで内部補正し、TgMとnTgMの補正後Quantityの比率 (TgM/nTgM)、つま

りRatioの平均値を算出した。10個の遺伝子のうちマイクロアレイと同様の結果を呈した6遺伝子から抗体入手が可能な4分子;Crym、Hspb1、Ctsh、Paip1について免疫染色（ABC法）による病理組織学的評価を行った。nTgM、TgM（発症前、発症直後、発症後）計4匹を灌流固定し取り出した脊髄（頸髄～腰髄）をサッカロース液にて置換した。その後-80度にて凍結させ厚さ8 $\mu$ mの凍結切片を作成しこれを用いた。発色にはDAB基質を用いた。また、GFAPとIballを用いた二重染色（蛍光染色）によりこれらの蛋白の局在評価を行った。

## 結 果

マイクロアレイでは、発症前TgMにて11個について過剰発現を認め、2個の遺伝子発現が抑制されていた。発症後TgMでは54個の遺伝子が過剰発現しており、4個の遺伝子発現が抑制されていた。発症後TgMで過剰発現していた54個の遺伝子のうち10個についてreal-time PCRを用いて遺伝子発現量を調べたところ、6個の遺伝子;  $\mu$ -crystallin (Crym)、heat shock protein 27(Hspb1/HSP27)、serine-proteinase inhibitor clade A member 3N (Serpina3n)、Complement component 1 subcomponent beta polypeptide (Clqb)、Cathepsin H (Ctsh)、polyadenylate binding protein-interacting protein 1 (Paip1) がマイクロアレイと同様の変化を呈した。Paip1は唯一発症前よりnTgMに比較し過剰発現しており、そのほかの遺伝子は発症後TgMにて発現量が増加していた。これら6遺伝子のうち、Crym、Hspb1/HSP27、Ctsh、Paip1の4分子について病理学的評価を行った。Hematoxylin & Eosin染色では、発症後のTgMの脊髄前角において運動神経細胞の脱落とグリア細胞の増生を認め病期の進行とともに増強した。免疫染色では、発症前TgMにおいて、Paip1のみグリア細胞に発現を認めた。発症直後TgM、発症後TgMでは、4分子すべて、グリア細胞に発現を認め、病期の進行に伴い著明となった。二重染色では、Hspb1/HSP27、Ctshが反応性アストロサイト内に発現しており、Crym、一部のCtsh、Paip1がミクログリア細胞内に発現していた。同時期の正常マウスではこれらいずれの蛋白も発現を認めなかった。

## 考 察

今回の研究はALS発症に関わる遺伝子の検索を目的とした。病理学的評価にて発現を確認しえた4個の蛋白はすべて反応性アストロサイトまたは、ミクログリアに発現していた。 $\mu$ -crystallinはヒトの神経組織での発現が報告されており、またNADPH結合蛋白であるTHBP結合蛋白と相同性を持つことから、酸素毒性に対し神経保護的な役割を担っている可能性が考えられた。また、Hspb1/HSP27はsmall HSPの一つで分子シャペロンとしての働きをもつ蛋白である。またdistal hereditary motor neuroathy type IIの家族では、HSP27

欠損が認められることが報告されている。これらのことから、HSPb1は酸化ストレスに対する保護的な役割を担っており、運動ニューロンの生存に必要な分子と考えられた。Ctshはカテプシン類の一つでオートファジーに関与する蛋白である。オートファジーは、ALSを含む神経変性疾患の病態との関連が唱えられているユビキチンプロテアソームシステムとは独立した非特異的蛋白分解システムであり、この蛋白の過剰発現はオートファジーがユビキチンプロテアソーム系障害による蛋白凝集に対し反応性に作用している可能性が考えられた。Paip1は蛋白翻訳開始に関わる分子である。神経変性疾患との関連性については未明であるが、Paip1は発症前より過剰発現しており、またミクログリアに発現を認めたことからALSにおけるグリア細胞活性化に関わっている可能性が考えられた。

## 結 論

Crym、Hspb1/HSP27、Ctsh、Paip1はFALSにおいて神経保護的な役割を担っている一方、反応性アストロサイトやミクログリアの増生に関与した病態に関わっている可能性が考えられた。特にPaip1については発症前よりミクログリアにて発現量が増加しており、グリア活性化との関連を示唆するものであった。