

審査の結果の要旨

氏名 濱田 健介

本研究は孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）において、塩基配列異常によらない遺伝子発現異常を検出するため、flow cytometry を応用し神経細胞核を分離することで得た一次運動野の神経細胞核特異的 DNA に対して、DNA メチル化異常の検出を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 肉眼的に中心前回を同定し採取したサンプルの一部を用いたリン酸化 TDP-43 免疫染色では ALS 群でいずれも異常な染色性が認められたのに対して、正常コントロール群ではいずれも同様の染色性が見られなかった。一方で SMI32 免疫染色ではいずれのサンプルでも陽性に染色される神経細胞が認められた。したがって、ALS のサンプル中には確かに ALS の病態が存在し、かつ全サンプルで運動ニューロンの存在が示された。
2. 神経細胞核 DNA を抽出して行ったゲノム網羅的 DNA メチル化解析の結果、有意なメチル化変化領域が 22 箇所検出された。うち 2 箇所は遺伝子間領域で、残る 20 箇所はいずれも過去に ALS との関連が報告されていない遺伝子上に存在していた。過去に ALS との関連が報告されている遺伝子では有意なメチル化変化は検出されず、これらの遺伝子はいずれもメチル化変化には関連がない可能性が示唆された。これらの有意なメチル化変化を示した領域においては、領域内の probe 同士で DNA メチル化の良い相関を示しており、領域単位での DNA メチル化変化を反映していた。また、ゲノム全体に渡る Manhattan plot ではいずれかの染色体に偏った DNA メチル化の分布は見られず、DNA メチル化変化が特定の遺伝子にのみ起こっているのではなく、ゲノム全体の様々な領域で同時多発的に起こっていることが示された。一方で、検出された DNA メチル化変化は ALS と DNA メチル化に関する先行研究の結果とは合致せず、本研究において新たに神経細胞核特異的 DNA の DNA メチル化変化を解析したことで、先行研究より ALS の病態を反映した DNA メチル化異常を検出できた可能性が考えられた。
3. 臨床病型と比較した解析において bulbar 群のみで有意となったメチル化変化領域が全 19 箇所中 9 箇所と半数近くにとのぼり、bulbar type が臨床的に limb type とは異なる表現型をもつ事実が、上位運動ニューロンにおける DNA メチル化に伴う遺伝子発現変化に関連している可能性が示された。
4. Gene Ontology 解析によりメバロン酸経路異常、ミトコンドリアにおける脂肪酸代

謝異常、タンパク質輸送障害が示唆された。また、Pathway 解析によりミトコンドリアにおけるアミノ酸・脂肪酸代謝異常が示唆された。これらの異常はいずれも過去に異なるアプローチにより ALS との関連が報告されており、DNA メチル化異常による発現異常によりこれらの異常が引き起こされる可能性が示唆された。

以上、本論文は一次運動野の神経細胞核特異的 DNA メチル化解析から、複数箇所の DNA メチル化変化領域を検出し、ALS の病態との関連が報告されているメバロン酸経路異常、タンパク質輸送異常、ミトコンドリアにおけるアミノ酸・脂肪酸代謝異常といった異常を引き起こす背景に DNA メチル化異常がある可能性を明らかにした。本研究はこれまで知られていなかった孤発性 ALS の病態生理における DNA メチル化異常の影響の解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。