

審査の結果の要旨

氏名 羽尾 暁人

本研究では、今までに原因遺伝子である ATP Binding Cassette Subfamily D Member 1(*Abcd1*)遺伝子の単独 **knockout** では達成できなかった大脳型副腎白質ジストロフィー (ALD)のモデルマウス作出を目的として、*peroxin-5(Pex5)*遺伝子 (① 全身性ヘテロ欠損、② オリゴデンドロサイト特異的ホモ欠損) との **double knockout mice** をそれぞれ作成し、各種解析を行って、下記の結果を得ている。

1. 既存の *Abcd1* **knockout mice** は雑種であり、バックグラウンドが均一なものを作成する必要があると考えた。今回、CRISPR-Cas9 システムを用いて新たに作出し、各種解析を施行して、*Wt* 群との比較を行った。

生化学的な評価として、血漿の極長鎖脂肪酸値を測定したところ、*Wt* 群と比較して高値を取ることが確認できた。

行動解析として、生後 3-24 か月で 3 か月おきに Rotarod test を施行したが、*Wt* 群との顕著な所見差は認めず、Pujol らの報告(Pujol et al. Hum Mol Genet 2002; 11: 499-505) と異なる結果であった。一方で、Kaplan-Meier 曲線を作成したところ、Logrank test で *Wt* 群よりも生存期間が短いことが示された。尚、これらの解析は N=30 で評価した。

また、生後 24 か月時点で脳の組織学的解析を施行したところ、*Abcd1*^{-Y} 群において Iba1 染色でミクログリアの増殖や形態変化が疑われたが、既報と同様に炎症性脱髄の所見は認めなかった。

2. 次に、*Pex5* 全身性ヘテロ接合性欠損マウスと *Abcd1* **knockout mice** を掛け合わせて *Abcd1*^{-Y}x*Pex5*^{+/-} mice を得て、*Abcd1*^{-Y} mice との表現型の比較を N=30 で行った。

結果として、Rotarod test の成績や生存率において両群間の有意差は認めず、生後 24 か月時点で脳の組織学的解析を施行したが、炎症性脱髄の所見は認めなかった。

結論として、目標としていた大脳型 ALD モデルを作成するには至らなかった。

3. 更に、Kassmann らの既報(Kassmann et al. Nat Genet. 2007; 39: 969-76)で脳の炎症性脱髄を来たしたとされる *Pex5* オリゴデンドロサイト特異的ホモ接合性欠損マウスを作出して、*Abcd1* **knockout** を加えた **double knockout mice** との比較を行うこととした。

既報では、*Cnp-Cre* マウスを用いて conditional **knockout mice** を作成しており、本研究でも新たに作出した *Cnp-Cre* マウスを用いる計画であったが、X-gal 染色において

Cre 遺伝子の正常な機能を確認することができなかった。

そこで、初の試みとして *Mbp-Cre* mice マウスを用いることとした。結果として、X-gal 染色において *Cre* 遺伝子の正常な機能を確認でき、進行期の *Pex5^{flox/flox}xMbp-Cre/Wt* mouse 脳の組織学的解析で炎症性脱髄の所見を再現できた。

4. *Pex5^{flox/flox}xMbp-Cre/WtxAbcd1^{-Y}* mice(N=13)を得て、*Pex5^{flox/flox}xMbp-Cre/Wt* mice(N=9)と表現型を比較すべく、行動解析を開始した。

生後 2 か月時点から Kassmann らの既報に従った staging、生後 6 か月時点から Rotarod test を 1 か月おきに施行して、生後 10 か月時点の解析まで終了している。

両群において、生後 3 か月時点から一部のマウスが発症して、その後も病勢は進行した。行動解析の結果を比較すると、全経過の中で *Pex5^{flox/flox}xMbp-Cre/WtxAbcd1^{-Y}* 群の Clinical Stage がやや進んでおり、生後 9 か月時点以降 Rotarod test における両群の所見差が目立つようになった。*Pex5^{flox/flox}xMbp-Cre/WtxAbcd1^{-Y}* 群でのみ、24,27,33 週齢で 1 匹ずつ死亡が確認されたことも併せ、*Pex5^{flox/flox}xMbp-Cre/Wt* 群よりも進行が早いものと考えられた。

以上、本論文では oligodendrocyte-specific *Pex5* knockout mice に *Abcd1* knockout を加えることで病勢の増悪を再現することができ、今日まで実現できなかった脳の炎症性脱髄に対する *Abcd1* 遺伝子変異の関与を検討しうるモデルが作出できる可能性を示した。

大脳型 ALD の病態機序を解明するに当たって、モデル動物の作成が達成できていないことが最大の課題となっており、今後の探求に重要な貢献を成し得るものとする。

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。