

論文内容の要旨

論文題目 Identification of the new gene causing cerebellar ataxia and investigation of pathogenic mechanism

(小脳失調症の新規原因遺伝子の同定と発症機序の解明)

氏名 大久保 真理子

脊髄小脳失調症 (SCA) は常染色体優性、劣性それぞれの遺伝形式をとるものが報告されている。このうち、常染色体優性遺伝形式をとる疾患の多くはポリグルタミン病であり、一方、常染色体劣性遺伝形式をとる疾患では様々な原因遺伝子が報告されている。SCA 全体では 38 個の原因遺伝子が同定され、49 のサブタイプに分類されている。また、それ以外にも小脳失調をきたす劣性遺伝性疾患は 32 種類報告されているが、その中で Marinesco-Sjögren 症候群は小児期発症で骨格筋に重篤な症状を示す代表疾患である。前述のように、ゲノムシーケンス技術の進歩により多くの原因遺伝子がみつかってきているものの、NCNP 筋疾患レポジトリーで Marinesco-Sjögren 症候群と臨床診断された患者の 38% (22/59 例)でしか *SIL1* 遺伝子に変異が同定されていない。このことは、新たな原因遺伝子

の存在を強く示唆していた。今回、小児期発症の小脳失調症の2家系3患者において新規遺伝子Xに変異を同定し、モデルマウスを作製することによってその病因性を証明したので、以下に報告する。

患者は小児期より小脳萎縮、運動失調、筋力低下、軽度知的障害を呈した。家族歴より常染色体劣性遺伝形式と考えられたが、既知の小脳失調症の原因遺伝子には変異を認めなかった。家族の検体とともに行った全エクソーム解析の結果、3患者に遺伝子Xにミスセンス変異とフレームシフト変異を複合ヘテロ接合性に認めた。非罹患家族は、これらの変異の片方のみ持っていた。フレームシフト変異は3人の患者で共通していた。これまで遺伝子Xは疾患原因としての報告はない。

この遺伝子変異の病原性を証明し、発症機序を推定するために培養細胞およびマウスを用いた実験を行った。HeLa細胞に遺伝子X変異体を過剰発現させたところ、フレームシフト変異体は野生型タンパク質と同様に、核内、細胞質の両方に局在を示したが、2種類のミスセンス変異体はともに核内に滞留し、細胞死が引き起こされた。この結果より、ミスセンス変異は局在変化を示すとともに、過剰発現により強い神経細胞に対する障害性を有することが示唆された。

次に CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒト患者で見出された変異を有するノックインマ

ウスを作製した。ミスセンス変異ノックインマウスは、ホモ接合性では生まれてこず、胎生致死であった。この結果は、細胞実験の結果と一致していた。これにより、ヒトの表現型を再現するためには、ヒト変異（ミスセンス変異とフレームシフト変異を複合ヘテロ接合性）を正確に模倣する必要があると推察された。これらをうけて、フレームシフト変異ノックインマウスを作製し、ミスセンス変異ノックインマウスと掛け合わせることで、複合ヘテロ接合性マウスを作製し解析を行うこととした。

遺伝子 X に複合ヘテロ接合性変異を有するマウスは、ミスセンス変異とフレームシフト変異を有する各々のヘテロマウスの掛け合わせにより、ほぼメンデルの法則に従って誕生した。生下時から体格が小さく 20%程度が離乳前に死亡した。致死に至らなかったマウスは野生型マウスと同様の寿命であった。これらの変異マウスは低体重を示すとともに、歩容の変化と著明な運動失調を示した。さらに、筋力低下も認められたが、これは筋量の低下が主な原因であると考えられた。

脳組織の形態学的観察では小脳萎縮を呈した。さらに発生・分化の過程における経時的な観察から、小脳発達における容量の増加が不十分であることがわかった。組織染色の結果、発生の初期段階から顆粒細胞の移動不良を認めるとともに、Purkinje 細胞の樹状突起が疎であるという形態異常を認めた。また、遺伝子 X 産物は小脳 Purkinje 細胞に強く発現して

いることを確認した。

以上の結果から、遺伝子 X の変異が小脳萎縮と運動失調を引き起こすことを示した。遺伝子 X 産物はスプライシング機構に関与する分子を核内へ輸送する分子であることが知られていることから、遺伝子 X の変異により多種類の遺伝子にスプライシング異常が引き起こされ、疾患に至るといった病態メカニズム仮説のもとに、さらに詳細な解析を進めたい。