

審査の結果の要旨

氏名 中 村 真 理

本研究は家族性認知症の一種である FTDP-17 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17)の病態メカニズムを解明するため、その原因遺伝子の一つである *MAPT* (タウ) 遺伝子上に R406W 変異を持つ FTDP-17 患者から iPS 細胞を作製し、神経細胞へと分化誘導することで、病態の検出及び再現を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. タウ遺伝子上に R406W 変異をヘテロに持つ2名の FTDP-17 患者の血液細胞に、リプログラミング因子を載せたエピソーマルベクターを導入することで、正常な iPS 細胞(*MAPT*^{R406W/+})を複数クローン樹立した。さらに、一部の細胞株に対して、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、変異修復型株(*MAPT*^{+/+})及びホモ変異型株(*MAPT*^{R406W/R406W})を作製した。
2. 樹立した iPS 細胞から前脳由来神経細胞への分化誘導を行った。三次元的構造を持つ脳オルガノイドを作製した後、培養30日目のオルガノイドをシングルセルに分散させ、神経細胞のみを接着培養させた。分散培養30日後、免疫染色による解析を行ったところ、約85%以上の細胞が MAP2 や β III-tubulin などの神経細胞マーカーに対して陽性であり、FOXG1、TBR1 など前脳由来神経細胞に特異的なマーカーも高い割合で発現していることが確認できた。どの iPS 細胞株からも、純度高く前脳由来神経細胞を得られていることが示された。
3. R406W 変異を持つ患者由来神経細胞(*MAPT*^{R406W/+})及びホモ変異型神経細胞(*MAPT*^{R406W/R406W})において、タウのリン酸化レベルが低下していることが western blot により示された。S409、T181、S404 を含めた特定のエピトープにおけるリン酸化レベルの低下が認められた他、pan-tau 抗体を用いた解析より、低リン酸化状態の 48kD タウが増えていることも明らかになった。また、*in vitro* における解析結果から、R406W 変異型タウは GSK3 β 、CDK5、PKA、RhoK などのキナーゼによるリン酸化が受けにくくなっていることが示された。中でも、GSK3 β の阻害によって 48kD タウのシグナルが増幅したことから、GSK3 β が R406W 変異型タウの全体的なリン酸化レベルの低下に関与している可能性が示された。
4. Pan-tau 抗体を用いた western blot の解析により、R406W 変異によってタウの N 末端の断片化が増えていることが明らかになった。また、プロテアーゼの阻害剤を培養系に加えることで、カルパインがこの断片化に寄与していることが示された。さら

に、カルパインを阻害することで、48kDの低リン酸化タウが増加することから、カルパインは低リン酸化状態にあるタウを基質として切断していることが示された。従って、リン酸化レベルが低下しているR406W変異型タウは、カルパインによる切断を受けやすくなっている可能性が示された。

5. 神経細胞の免疫染色を行ったところ、R406W変異を持つ神経細胞において、細胞体及び樹状突起を特異的に認識するMAP2とタウが共局在している割合が増えていることが明らかになった。タウは通常神経細胞の軸索に局在しているため、R406W変異によってタウの局在異常が起こることが考えられた。
6. R406W変異を持つ患者由来神経細胞(MAPT^{R406W/+})及びホモ変異型神経細胞(MAPT^{R406W/R406W})において、軸索変性が起こり、軸索上に粒状のpunctaが増えていることが免疫染色により示された。この現象は、微小管安定化剤であるEpothilone D (EpoD)の投与によってレスキューされることから、R406W変異型タウによる微小管の不安定化を介して起こっていることが考えられた。
7. ライブイメージングにより、R406W変異を持つ神経細胞でミトコンドリアの輸送能の障害が起こっており、retrogradeの方向(軸索から細胞体に向かう方向)に動くミトコンドリアの割合の増加が認められた。この結果に伴い、MAPT^{R406W/+}及びMAPT^{R406W/R406W}において、軸索上のミトコンドリアの数が減っていることも明らかになった。これらもEpoDの投与によってレスキューされることから、R406W変異型タウによる微小管の不安定化が引き金となって起こることが示された。
8. 本研究で検出した表現型の時系列を検証したところ、3~7.に記された表現型がすべて分散培養30日目で検出されたのに対し、分散培養10日目においてはR406W変異型タウのリン酸化レベルの低下のみ認められ(3)、細胞レベルにおける異常(5~6)は検出されなかった。従って、R406W変異型タウのリン酸化の異常は比較的早期に起こることが考えられ、タウの局在異常・軸索変性などの細胞レベルにおける表現型はその下流にある可能性が示された。

以上、本論文はFTDP-17患者由来iPS細胞を用いることで、R406W変異によるタウの生化学的変化及び神経細胞における異常を検出した。本研究はこれまでの認知症モデルでは困難であった、疾患の初期で見られる病態の検出及び再現を可能にし、FTDP-17の根本的な発症メカニズム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(保健学)の学位請求論文として合格を認める。