

論文審査の結果の要旨

氏名 三好貞徳

本論文は5章からなる。第1章 (Introduction) においては本論文の研究対象である筋委縮性側索硬化症 (ALS) に関する学術的、臨床的な背景と本論文で用いられた遺伝子治療技術に関する背景が述べられている。ALS は上位運動神経と下位運動神経の両者における致死性の神経変性疾患であり、近年、原因遺伝子の同定や病因病態についての研究が進んできているものの効果的な治療法は未確立であり、新たな治療技術の開発が求められている。最近、ALS の病態進行モデルのひとつとして、病態進行が神経筋接合部 (NMJ) における運動神経軸索末端の変性、離脱に始まるとする dying-back 仮説が提唱され、NMJ が新たな治療標的として注目されている。NMJ は運動神経の軸索と筋管 (筋繊維) とを結ぶ唯一のシナプスであり、骨格筋収縮に必須の構造である。NMJ の形成と維持は骨格筋に発現する受容体型チロシンキナーゼ MuSK によって制御され、また、MuSK は運動神経軸索末端より放出される agrin と骨格筋に発現する Dok-7 により活性化される。先行研究では、ヒト Dok-7 を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-D7) を用いた Dok-7 の強制発現が NMJ の形成を高度に増強することや、Dok-7 の変異により NMJ の形成不全をきたす先天性筋無力症のモデルマウスに対する AAV-D7 の発症後の投与 (DOK7 遺伝子治療) が早期致死性を回避し、運動機能を回復させることが実証されていた。さらに、Dok-7 変異に非依存的な NMJ 形成不全を伴う筋ジストロフィーのモデルマウスにおいても DOK7 遺伝子治療の有効性が実証された。しかしながら、ALS などの神経変性疾患に認められる運動神経軸索末端の変性・離脱による NMJ 形成不全に対する有効性は未確立であった。本論文では *SOD1* 遺伝子の変異による ALS のモデルマウスに対する *DOK7* 遺伝子治療の効果を骨格筋と運動神経における病理組織学的な解析と生存期間や運動機能の解析により精査している。

第2章 (Results) では結果が述べられている。まず、論文提出者は ALS モデルマウスにおける *DOK7* 遺伝子治療の病理組織学的な解析を実施し、AAV-D7 の経尾静脈投与 30 日後の NMJ における運動神経軸索末端の変性や離脱の抑制を明らかにした。さらに、脊髓前角の運動神経細胞体やその軸索の変性には当該治療による悪化が認められないことも実証している。そこで、これらの知見を踏まえ、論文提出者は *DOK7* 遺伝子治療の延命効果の有無を検討した。その際、生存期間の前臨床試験に対して国際的に推奨されているガイドラインに基づく解析が実施された。このガイドラインは、ALS モデルマウスを用いた前臨床試験における有効性が対応する臨床試験に反映されなかった事実を踏まえ、高い再

現性と臨床での効果が期待できる前臨床試験実施のために欧州の専門家グループによって作出されたものである。さらに、論文提出者は、ガイドラインよりも厳しく、個体ごとの発症を厳格に定義・判定した上で、*DOK7* 遺伝子治療による延命効果を生後、発症後の両者で実証し、同時に、当該治療の自発運動活動に対する有効性も明らかにしている。

第3章 (Discussion) では本論文の結論と考察が述べられており、*DOK7* 遺伝子治療が先行研究で示されていた筋原性疾患のみならず、神経原性疾患である ALS のモデルマウスでも有効であることを実証し、また、ALS モデルマウスの病態進行における NMJ の重要性を明らかにしたと結論している。さらに、近年の ALS に対する治療薬の開発や NMJ に関する知見について概説した上で、*DOK7* 遺伝子治療の作用機序解明の重要性や、当該治療、もしくは、同等の効果を持つ低分子化合物等による NMJ 形成増強治療と NMJ 以外の、例えば運動神経保護薬などとの併用治療の可能性について議論している。

なお、第4章 (Materials and methods) では本実験で行われた実験材料と方法について簡潔に記述し、第5章 (References) では引用文献について記述している。

上述の通り、ALS の病態進行における NMJ の重要性が示唆されたことから、NMJ を標的とする新たな治療技術の開発が期待されていた。さらに、本博士論文の先行研究では、*DOK7* 遺伝子治療の筋原性疾患への有効性も実証されたが、ALS に代表される運動神経変性疾患を含む神経原性疾患に対する効果については不明であった。これに対して、本論文では、ALS 病態に対する *DOK7* 遺伝子治療の効果についてモデルマウスを用いた詳細な解析を実施している。論文提出者は *DOK7* 遺伝子治療による NMJ の増強が、運動神経細胞体や軸索の変性を悪化することなく、NMJ における運動神経軸索末端の変性や離脱を抑制することを明らかにした。そして、国際的なガイドラインと個体毎の厳密な発症の定義に基づく試験により、*DOK7* 遺伝子治療の延命効果と運動機能の改善効果を実証している。この成果は、重篤な、また、有効な治療法が確立されていない疾患である ALS の病態解明と新たな治療薬開発の基盤となるべき知見といえる。

本博士論文は手塚徹、有村純暢、伴野太郎、岡田尚巳、山梨裕司との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析及び検証を行ったもので、学位申請者の寄与は十分であると判断する。

以上より、博士 (理学) の授与に値すると判断した。