

審査の結果の要旨

氏名 坂井 祐介

mTORC1 シグナルは、精神疾患や神経変性疾患において重要な役割を果たしているものと考えられている。小脳における機能を明らかにするため、本研究は、恒常的に活性化状態にあるラット mTOR 変異体（以下、「活性型 mTOR」と記す）を小脳プルキンエ細胞特異的に発現させることで mTORC1 シグナルを亢進したトランスジェニックマウス（L7-mTOR Tg マウス）を用いて、小脳における mTOR シグナルの機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. L7-mTOR Tg マウスの小脳からタンパク質懸濁液を調整し、小脳における活性型 mTOR の発現時期をウェスタンブロットにより調べた。その結果、2 週齢から 4 週齢において、活性型 mTOR が多く発現していることが確認された。次に、4 週齢の L7-mTOR Tg マウスの小脳において、mTORC1 シグナルの亢進を抗リン酸化 S6 抗体による蛍光免疫組織染色により検証した。Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞において強い陽性シグナルが検出された。このことから、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、mTORC1 シグナルの亢進が引き起こされていることが示唆された。
2. 活性型 mTOR 発現によるマウス個体への影響を調べるために、Control マウスおよび L7-mTOR Tg マウスを用いて、種々の行動解析を行った。ロータロッドテストおよび foot print 解析を行ったところ、L7-mTOR Tg マウスでは運動協調能に異常があることが確認された。オープンフィールドテストでは、Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスの行動時間および移動距離の減少が見られたが、不安様行動については有意な差は認められなかった。Three chamber test では、L7-mTOR Tg マウスにおいて社会行動の異常は認められなかった。
3. プルキンエ細胞における電気生理学的な特性を検証したところ、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では自発的な発火頻度が低く、脱分極刺激に対する活動電位の発生が少なかった。このことから L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞は、膜興奮性が低いことが示唆された。また、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞は複数の登上線維により多重支配を受けていることが示され、登上線維刺激により誘発されるスパイクレットの減少が確認された。このことから、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、登上線維から入力された情報がプルキンエ細胞軸索から深部小脳核へ適切に伝達されていない可能性が示唆された。

4. 3, 4, 6, 12 週齢における L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞数の経時的変化を定量したところ、Control マウスと比較して、3 週齢から有意にその数が減少していることが示された。また、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の形態を抗 Calbindin 抗体による蛍光免疫組織染色を用いて検証したところ、Control マウスと比較して、細胞体が肥大化していることが明らかとなった。
5. L7-mTOR Tg マウスにおけるプルキンエ細胞数の減少の原因を調べるため、アポトーシスマーカーである Cleaved caspase 3、酸化ストレスマーカーである Heme oxygenase 1、低酸素マーカーである Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 $\alpha$ ) による蛍光免疫組織染色を行った。その結果、これらのマーカーが陽性のプルキンエ細胞が Control マウスよりも L7-mTOR Tg マウスにより多く検出された。このことから、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞は、細胞ストレスによるアポトーシス細胞死を起こしていることが示唆された。
6. mTORC1 阻害剤の投与により、L7-mTOR Tg マウスで見られた表現型のレスキューを試みた。3 週齢から 6 週齢までラパマイシンの腹腔内投与を行ったところ、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞で見られた細胞体の肥大化や細胞数の減少といった表現型がレスキューされた。このことから、これらの表現型は mTORC1 シグナルの亢進に起因することが強く示唆された。
7. mTORC1 シグナルの亢進がプルキンエ細胞の細胞体の肥大化や細胞数の減少といった現象に関与していることが示唆され、mTORC1 シグナルの下流因子である HIF1 $\alpha$  の発現上昇が確認されたことから、HIF1 $\alpha$  阻害剤である PX-478 を用いてプルキンエ細胞における mTORC1-HIF1 $\alpha$  シグナルの影響を検証した。その結果、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の細胞体の肥大化やプルキンエ細胞数の減少が有意に抑制された。これらのことから、L7-mTOR Tg マウスで見られた表現型には mTORC1 シグナルの中でも HIF1 $\alpha$  に繋がるシグナルの関与が強く示唆された。

以上、本論文は、小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現させた Tg マウスを解析することで、mTORC1 シグナルの亢進がプルキンエ細胞の発生及び発達に異常をきたし、運動協調能に異常を生じさせることを明らかにした。また、小脳における mTORC1-HIF1 $\alpha$  シグナルがプルキンエ細胞の生存や形態形成に関わっていることが示唆された。本研究は、小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現させることで、小脳機能や精神神経疾患に対する mTORC1 シグナルの病態生理学的な寄与を直接的に明らかにすることができる点で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。