

氏名	下園 啓介
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第62号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	Ubap1 knock-in mice reproduced the phenotype of SPG80 (SPG80の表現型を再現した Ubap1 ノックインマウスの報告)
論文審査委員	委員長 教授 宮澤 恵二 委員 准教授 佐々木 知幸 委員 講師 大場 哲郎

学位論文内容の要旨

【目的】

遺伝性痙性対麻痺（hereditary spastic paraplegia; HSP）は緩徐進行性の下肢の痙縮と筋力低下を主徴とする遺伝性疾患であり、臨床的にも遺伝学的にも多様性がある。臨床的には純粋型と複合型に分類され、純粋型では通常下肢の痙縮のみを呈するが、ときに振動覚低下・膀胱直腸障害・上肢の腱反射亢進を伴うことがある。複合型では精神発達遅滞・小脳失調・末梢神経障害・網膜色素変性症・難聴・てんかん発作などの他の神経学的異常を伴う。また、遺伝学的には原因遺伝子あるいは原因遺伝子座が同定された順に、現在までに SPG1 から SPG87 が知られている。

2019年に *Ubap1* (*Ubiquitin associated protein 1*) 遺伝子変異を原因とする SPG80 は、我々を含む3つのグループにより同定され、その後世界中から症例が報告されつつある。臨床的には、*Ubap1* 遺伝子のヘテロ接合型変異により発症し、若年発症で純粋型を呈することが知られている。*Ubap1* 自体は ESCRT-1 のサブユニットの一つであり、ESCRT は、ユビキチン化タンパク質のエンドリソソームへの仕分けや、多胞体（MVB）の形成など、細胞内輸送の中心的役割を担っている。この過程で、ユビキチン化されたタンパク質はエンドソームに運ばれ、そこで MVB 形成を介してリソソームと融合し、分解される。これは、ミスフォールドや損傷を受けたタンパク質を分解するために不可欠なプロセスであり、ESCRT の機能障害が、神経変性疾患と関連していることはすでにいくつかの疾患でも報告されている。しかし、これまでに SPG80 の表現型を再現できた動物モデルの報告はなく、HSP における *Ubap1* 変異の病態解明には、動物モデルを用いたさらなる研究が求められている。

【方法】

哺乳類の *UBAP1* は、N-末端の UMA ドメイン、HD-PTP 結合領域、C-末端の SOUBA ドメインの 3 つの主要ドメインからなる。これまでに報告された SPG80 家系の *Ubp1* 変異は、いずれも N 末端の UMA ドメインはそのまま保たれ、一方で C 末端の SOUBA ドメインは完全に失われた早期切断型タンパク質となっている。そこで、それらと同様の遺伝形式をもち、我々がすでに報告している SPG80 の家系の変異 (c. 535G>T, p. E179*) と遺伝的に類似した変異マウスを CRISPR-Cas9 にて作成し、新規 *Ubp1^{+/E176Efx23}* ノックインマウスを得た。

CRISPR-Cas9 で問題とされるオフターゲット変異については 5 世代以上の戻し交配を行い、オフターゲット変異が限りなく存在しないことも確認している。我々はこのモデルマウスを用い、歩行試験や病理学的変化の観察を行った。

【結果】

Ubp1^{+/E176Efx23} ノックインマウスは、出生時は正常であったが、数ヵ月後に進行性の後肢の機能障害を呈することが確認された。歩行障害以外の身体的変化はなく、障害は上位運動ニューロンに局限していた。これらの所見はヒトの SPG80 と一致しており、我々のモデルマウスは SPG80 の病態生理を研究する上で有効であると考えられた。

分子病理学的には、脊髄の神経細胞数の減少とユビキチン化タンパク質やオートファゴソームの蓄積、HSP の最も一般的な発症メカニズムの 1 つである軸索の変性が観察された。神経細胞数の減少は既に *in vitro* の研究でも報告されており、本モデルマウスにおいても同様の結果が得られ、そのメカニズムとしてアポトーシスの関与が示唆されている。また、Rab5 および Rab7 陽性エンドソームの分布の変化に加え、その数の増加やサイズの縮小が観察され、*Ubp1* の変異はエンドソームを介した小胞輸送を阻害している可能性が示唆された。

【考察・結論】

本研究は SPG80 の表現型をマウスで再現した初めての報告であり、*Ubp1* 変異はエンドソームの機能に影響を与えていることが明らかとなった。エンドソーム・リソソーム経路で不要なタンパク質を分解するためには、初期エンドソームが成熟し、リソソームと融合する必要がある。しかし、エンドソームの融合と成熟が阻害され、それに伴い小胞輸送が阻害されることは、これらのタンパク質の分解が部分的に妨げられている可能性がある。ユビキチン化タンパク質やオートファゴソームの蓄積、軸索の変性及び神経細胞数の減少は、このエンドソームの機能障害に起因していると考えられた。

本ノックインマウスは SPG80 のモデルマウスであり、*Ubp1* の変異に起因した HSP の分子病態の解明、さらには薬剤のスクリーニングによる治療法の開発に繋がることが今後期待されると考えられる。

論文審査結果の要旨

1. 学位論文研究テーマの学術的意義

遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia; HSP) は臨床的にも遺伝学的にも多様性がある遺伝性疾患である。臨床的には主として下肢の痙縮のみ呈する純粋型、他の神経学的異常を伴う複合型に分類される。一方、原因遺伝子 (遺伝子座) は現在までに SPG1 から SPG87 まで同定されている。本研究は若年発症で純粋型を呈する SPG80 の原因遺伝子 *Ubap1* の変異をノックインしたマウスを作成し、病理学的観察をおこなったものである。SPG80 の表現型を再現した動物モデルの樹立により、病態解明や治療薬スクリーニングを可能にした点で、十分な学術的意義が認められる。

2. 学位論文及び研究の争点、問題点、疑問点、新しい視点等

本研究では運動機能の低下の指標としてビームウォーキングテストやローターロッドテストが用いられている。これらの方法について、痙性歩行の評価法としての妥当性が議論になった。また、ヘテロ変異マウスで表現型が現れることについても質問があった。この点について、変異 *Ubap1* タンパク質は一部の機能ドメインを欠く **truncated form** であり、**dominant negative** 効果と考えているとのことであった。本研究ではヘテロ変異マウスの脳で変異 mRNA が **nonsense decay** を免れて十分量発現していることを確認しており、妥当な考察と考えられる。

原因遺伝子の *UBAPI* は ESCRT-I の構成成分であるが、その機能を前提にするとモデルマウスに見られる表現型を説明できない部分もある。病態メカニズムの解析はこれからの課題である。細胞機能に対する変異体の影響についても、現時点では培養細胞での実験系が確立していないので、解析が進んでいない。一方、公開発表会では、すでに出版公表された内容に加え、治療薬候補 (**drug repositioning** 薬) による投与実験のデータが提示された。発症前からの投与ではあるが、症状の改善状況が示され、本モデルマウスの有用性が明確に示された。発症後投与の実験結果が待たれる。さらに、治療薬候補を投与したマウスでの細胞レベルでの解析結果が病態メカニズムの解明につながることも期待される。

3. 実験及びデータの信頼性

ノックインマウスの作成、細胞生物学的な観察は堅実な方法が使われており、適切な統計処理により有意差の検定が行われている。したがって、信頼性は高いものと考えられる。

4. 学位論文の改善点、等々

公開発表会では学位論文に含まれていないスライドも提示された。これについて、審査の資料として博士論文に添付した形で再提出を求め、最終的に委員長が確認した。