

氏名	たか はし りょう すけ 高 橋 良 輔
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1494 号
学位授与の日付	平 成 7 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	A null mutation in human CNTF gene is not causally related to neurological diseases (ヒトにおける毛様体神経栄養因子の生理的及び病理的役割に関する分子遺伝学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 西 重 忠    教 授 柴 崎 浩    教 授 木 村 淳

### 論 文 内 容 の 要 旨

毛様体神経栄養因子 (CNTF) は、副交感神経である毛様体神経節ニューロンの生存因子として見出されたタンパクであるが、その後の研究で、末梢及び中枢のさまざまなニューロンに生存維持作用を有することが明らかになった。特に脊髄運動ニューロンについては、軸索切断時、培養下、発生過程の細胞死を防ぐ効果が示され、注目されている。さらに最近、相同組み換えによって CNTF 遺伝子を欠失させたマウスで運動ニューロンの変性が生ずることが報告され、CNTF が生体内で運動ニューロンの生存維持に不可欠であると考えられるようになった。本研究は、上記のマウスでの報告とは対照的に、遺伝的に CNTF を欠損したヒトが神経系に明らかな異常をきたすことなく生存することをはじめて明らかにした。

ヒト坐骨神経 cDNA ライブラリーより、2 種類の CNTF の cDNA が単離された。一方は 200 個のアミノ酸からなる蛋白をコードし、正常の CNTF の cDNA と考えられた。ところが他方は翻訳領域内に 4 塩基の挿入があり、それ以降の読み枠のずれによって、コードする蛋白はアミノ酸 62 個に短縮されていた。これは変異の cDNA と考えられた。CNTF 遺伝子の塩基配列を直接シーケンス法で解析したところ、片方のアレルにおいて、G から A への点変異によってイントロン内に新たにスプライス受容部位 (AG) が形成され、挿入配列に一致するイントロンの配列がエクソンに組み込まれることが判明した。

変異遺伝子からの mRNA の転写を、変異遺伝子を導入して強制発現させた培養細胞とヒトの組織で検討した。RNase プロテクションでの解析では、変異遺伝子導入細胞では変異の mRNA しか産生されないことが判明した。またヘテロ接合の坐骨神経では正常、変異の mRNA が等量存在していた。以上の解析の後、変異のホモ接合のヒトの脳及び筋肉が入手できた。RT-PCR でこれらの組織中の mRNA を解析したところ、ともに変異の mRNA しか検出されなかった。すなわち培養細胞でも生体内でも変異遺伝子からは変異の mRNA しか転写されないことが明らかになった。

大腸菌で CNTF の融合蛋白を作製し、これをマウスに免疫して抗血清を得た。この抗血清は正常、変異

の両方の CNTF 融合蛋白を認識した。イムノブロットでの解析では、変異遺伝子を導入した細胞でも、ヘテロ接合のヒトの坐骨神経でも、変異蛋白は検出されなかった。また、変異のホモ接合のヒトの脊髄根の免疫組織化学でも免疫陽性物質は検出されなかった。これらの結果は変異蛋白が極めて不安定であることを示している。以上よりこの遺伝子の変異は CNTF を実質的に欠損させることが明らかになった。

CNTF の遺伝子型を RCR を用いて簡便に決定する方法を案出し、正常人 151 名、神経疾患の患者 240 名、計 391 名で、変異遺伝子の分布を決定した。その結果は、正常のホモ接合 242 名 (61.9%)、ヘテロ接合 140 名 (35.8%)、変異のホモ接合 9 名 (2.3%) であった。変異のホモ接合は CNTF を欠損していると考えられるが、その頻度に正常人 (4 名) と患者 (5 名) で有意差はなく、また変異のホモ接合の患者が罹患する疾患にも一定の傾向はなかった。従って、ヒトにおける CNTF の欠損は神経疾患の病因には関与しないと結論された。

本研究は、CNTF の生理的及び病理的役割に関して、従来の考えの訂正を促す新しい知見を提供するものである。また本研究で見出された CNTF を欠損したヒトの解析によって、CNTF の機能の解明が今後さらに進展するものと期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) は末梢および中枢神経系のニューロンやグリアにさまざまな作用を示すが、その生理的役割はいまだ不明であるが、これまでの多くの実験的証拠から、CNTF は運動ニューロンの生存維持に重要な役割を果たしていると考えられてきた。当申請者はヒトにおいてスプライシングの異常を引き起こすことにより、CNTF を実質的に欠失させる変異遺伝子を発見した。この変異遺伝子の分布は、正常人 151 名、神経疾患の患者 240 名、計 391 名での検討で、正常のホモ接合型は 61.9%、ヘテロ接合型は 35.8%、変異のホモ接合型は 2.3% であった。変異遺伝子の頻度は 20% の高率であった。CNTF を完全に欠失している変異のホモ接合型を含め、CNTF の各遺伝子型の頻度は正常人と患者で統計学的に有意の差はなかった。したがって、ヒトにおける CNTF の欠損は、神経疾患の病因には関与しないと結論された。申請者の結果は従来の常識に反するものでヒトの神経系における CNTF の生理的、病理的役割の解明に寄与するところが大きい。従って本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお本学位授与申請者は、平成 6 年 11 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。