

主論文の要旨

**Silencing of FUS in the common marmoset
(*Callithrix jacchus*) brain via stereotaxic injection of
an adeno-associated virus encoding shRNA**

（ shRNA を発現するアデノ随伴ウイルスの定位注入法による
コモンマーモセット脳での FUS タンパク質の発現抑制 ）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

（指導：勝野 雅央 教授）

遠藤 邦幸

【緒言】

前頭側頭葉変性症 (FTLD) は、後頭葉に比して前頭葉および側頭葉が選択的に侵される病理学的な症候群である。臨床的には前頭側頭型認知症 (FTD) に相当し、行動異常、言語障害、認知機能障害に特徴づけられる。FTLD は広いスペクトラムを持つ症候群であることが知られており、リン酸化タウの蓄積がみられる進行性核上性麻痺 (PSP) や大脳基底核変性症 (CBS) といったタウオパチー、FTD を伴う運動ニューロン疾患 (FTD-MND/FTD-ALS) などが含まれる。Fused in sarcoma (FUS) は、転写を含む RNA 代謝、RNA スプライシング、mRNA 輸送などに関わる RNA 結合タンパク質であり、遺伝学的・病理学的に FTD-MND/FTD-ALS と深く関わることが知られている。我々は、マウスの海馬で FUS タンパク質の発現を抑制したところ、FTD 様の情動異常がみられたことを報告している。このマウスは、FTLD モデル動物として有用であるものの、FTD の主な臨床徴候である社会行動異常などの高次の認知行動異常を観察する上では限界がある。そのため我々は、社会行動に関する研究が可能であり、科学的な関心が高まっているコモンマーモセットにおいてアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて FUS タンパク質の発現を制御する方法を開発したため、報告する。

【方法】

マーモセットの脳組織から抽出した全 RNA サンプルに対して逆転写酵素を用いて相補的 DNA ライブラリー (cDNA) を作成した。Ensembl 遺伝子データベースに登録されていたマーモセット *FUS* の mRNA 配列の部分的情報を用いて 5'-UTR とコーディング配列 (CDS) の末端に対するプライマーを設計し、PCR 法を用いて遺伝子配列を増幅させ、マーモセット *FUS* 遺伝子の CDS を解読した。

EGFP とマーモセット *FUS* の融合タンパク質を発現するレンチウイルスを構築し、これを安定発現する HEK293T 細胞を樹立した。樹立した細胞株に対してマーモセット *FUS* 配列をターゲットとする複数の候補 siRNA を導入した。蛍光顕微鏡を用いた EGFP の蛍光強度とウェスタンブロッティングによる *FUS* タンパク質の発現レベルを測定した。複数の候補 siRNA 配列のうち、最も効率よく *FUS* タンパク質の発現を抑制する siRNA を選定し、マーモセット *FUS* 配列を標的とする shRNA を発現する AAV (sh*FUS*-AAV) を作成した。この sh*FUS*-AAV は、9 型 AAV を背景とし、shRNA 領域に H1 プロモータを持ち、EGFP 配列に CAG プロモータを持つ。

マーモセットのメス 2 頭を麻酔し、定位固定装置を用いて左頭頂葉に sh*FUS*-AAV を、右頭頂葉には対照 shRNA を発現する AAV (shCont-AAV) を、1 μ l ずつ注入した。2 頭のマーモセットはそれぞれ 6 週と 8 週後に還流固定を行った。摘出した脳は 4 % PFA を用いて固定し、パラフィン包埋標本にした。その後、抗 *FUS* 抗体、抗 GFP 抗体、抗 NeuN 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 Iba1 抗体を用いて組織免疫染色を行った。EGFP 陽性細胞の *FUS*、GFAP、Iba1 の信号強度を測定し、対照と比較した。JMP 13 を用いて独立 2 群の t 検定を行い、統計学的有意差は 0.05 未満の p 値とした。

【結果】

1.6 kbp のマーモセット *FUS* 遺伝子の CDS をクローニングし、Gen Bank/EBI No. LC193721 として登録した。ヒトと比較してマーモセットの *FUS* 遺伝子配列は 94 % が一致し、*FUS* タンパク質のアミノ酸配列は 90 % が一致した。*FUS* タンパク質の RNA 結合部位である C 末端配列はヒトとマーモセットで完全に一致した。

パラフィン包埋標本に対する組織免疫染色では、*FUS* タンパク質は大腦皮質、尾状核、海馬を含む脳の各部位で広く発現していた。また神経細胞、アストロサイト、ミクログリアなどの神経細胞種で発現しており、核に強い局在を示した。shCont-AAV を注入した部位と比して、sh*FUS*-AAV を注入した部位の EGFP 陽性細胞で *FUS* タンパク質の発現が有意に抑制されていた (Fig. 1A, 1B)。共焦点レーザー顕微鏡を用いて EGFP 陽性細胞での *FUS* タンパク質の信号強度を測定したところ、*FUS* タンパク質の発現が 80 % 抑制されていた。AAV によって、*FUS* タンパク質の信号強度は NeuN 陽性細胞、GFAP 陽性細胞、Iba1 陽性細胞のいずれにおいても低下していた (Fig. 1C)。*FUS* タンパク質の発現抑制による神経細胞脱落は明らかではなかった。抗 GFAP 抗体および抗 Iba1 抗体を用いた組織免疫染色では、*FUS* タンパク質の発現が抑制された部位で GFAP 陽性細胞と Iba1 陽性細胞が有意に増加していた (Fig. 2)。

【考察】

この研究では、マーモセット *FUS* 遺伝子をクローニングし、マーモセット *FUS* の配列を標的にした sh*FUS*-AAV を作成した。この AAV をマーモセット脳に注入することで、有効性が確認できた。

FUS タンパク質の発現を抑制した大腦皮質では、対照と比較して神経細胞の脱落は認めなかったが、グリア細胞の増殖がみられた。グリア細胞の活性化は、FTLD を含む様々な神経変性疾患の病理でみられる特徴の 1 つである。当研究室では、初代培養で *FUS* タンパク質を抑制したところ、多くの免疫関連遺伝子が発現したことを報告している。*FUS* タンパク質の喪失によりグリア細胞が直接活性化される可能性がある。

マーモセットは、げっ歯類よりも高次の認知行動を研究する上での優位性がある。今回開発した手法を用いて、海馬や尾状核など様々な脳組織で *FUS* タンパク質の発現を抑制するマーモセットモデルを作成することは、FTLD の病態発症のメカニズムの解明に役立つことが期待される。

【結語】

我々は、マーモセットにおける *FUS* 遺伝子配列を同定し、*FUS* タンパク質が脳で広範に発現していることを確認した。さらに、shRNA を発現する AAV を用いてマーモセット脳での *FUS* タンパク質の発現を抑制することに成功した。また、*FUS* タンパク質の喪失によりグリア細胞が活性化されることを示した。