

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病関連遺伝子 **TREM2** の発現を制御する

スプライシング因子の同定

Identification of Splicing Factors that Regulate the Expression of the Alzheimer's Disease-Associated Gene **TREM2**

論文提出者 柳津 茂慧 (Yanaizu, Motoaki)

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は進行性の神経変性疾患であり、認知症の原因疾患として頻度が最も高い。AD の病理学的変化としては、アミロイドベータ凝集物からなる老人斑、過剰リン酸化タウタンパク質から生じる神経原線維変化、海馬や大脳皮質の萎縮などが認められる。殆どの AD 患者は明確な家族歴を示さない孤発性 AD であり、近年、その発症リスク因子の理解が進みつつある。最も有名なものは APOE 遺伝子の多型であるが、近年、**TREM2** 遺伝子の一塩基多型が注目を集めている。**TREM2** はミクログリアやマクロファージに発現する細胞膜貫通型タンパク質で、脂質、APOE、アミロイドベータなどのリガンドと結合する。ミクログリアやマクロファージでは、その活性化状態によって **TREM2** の発現が上昇する場合があります、これらの細胞の機能制御に重要である。また、AD に加えて肥満やがんにおけるマクロファージの機能とも関連する。

申請者は、先行研究において **TREM2** の exon 3 が選択的スプライシングを受け、そしてこの選択的スプライシングが **TREM2** タンパク質の

発現レベルを調節することを報告していた。TREM2 の発現量変化は AD を含む各種の疾患や病態と関連しているため、申請者は TREM2 exon3 の選択的スプライシング制御因子の同定とその制御機構の解明を試みた。

まず、申請者は TREM2 minigene と各種の RBP 発現ベクターを HEK293 細胞に共発現させ、exon 3 のスプライシングパターンを変化させる因子を選別した。その結果、最も顕著に exon 3 のスキッピングを促進した CELF1 と CELF2 に注目した。TREM2 タンパク質の発現量は exon 3 の選択的スプライシングによって調節されるが、実際に、TREM2 タンパク質は CELF2 の過剰発現によって有意な減少を示した。一方、CELF1 との共発現では減少する傾向がみられたものの、統計的に有意な変化ではなかった。次に、siRNA による CELF1、CELF2 の発現抑制時における THP-1 細胞内在性 TREM2 exon 3 のスプライシングパターンを検討した結果、CELF1 と CELF2 を同時に発現抑制した際に exon 3 の挿入が増加した。これらの結果から、CELF1、CELF2 は exon 3 のスプライシングを制御しており、特に CELF2 が強い効果を示して TREM2 タンパク質の発現量を減少させることが明らかとなった。

次に、申請者は TREM2 の exon 3 の選択的スプライシングの動物種間の保存性を検討した。ヒト、マウス、アフリカミドリザルの TREM2 の exon 2 から exon 4 の領域を含む minigene を比較した結果、アフリカミドリザルの exon 3 はヒトと同様に選択的スプライシングを示し、CELF によってスキッピングが促進された。一方、マウス Trem2 では exon 3 の選択的スプライシングが生じず、CELF により促進されることもなかった。すなわち、exon 3 の選択的スプライシングには種特異性があることが示唆された。

最後に、申請者はヒトとマウスの TREM2 におけるスプライシングの違いを利用して、TREM2 のスプライシング制御機構を探究した。すなわち、

両種のキメラ minigene を作製することで CELF に対する応答領域を絞り込んだ。複数のキメラ minigene を作製し比較した結果、ヒト intron 3 の後半部に CELF に対する応答領域が存在することが示唆された。さらに、抗 CELF2 抗体を用いた RNA 免疫沈降実験から、THP-1 細胞内在性の CELF2 と TREM2 intron 3 領域を含む pre-mRNA の結合が確認された。

本研究を通じて、申請者は TREM2 の発現を制御するスプライシング因子として CELF2 を新規に同定した。興味深いことに、CELF2 は過去に AD 感受性遺伝子としての報告があり、本研究は AD 感受性遺伝子間の新たな制御関係を示したことになる。また、TREM2 のスプライシング制御に動物種間の差があることも見出した。この知見は、疾患モデルとしてマウスを使用する際に、TREM2 の挙動に関して注意が必要であることを示唆している。以上の成果は、博士（薬科学）の学位を授与するのに相応であると判断する。

令和 3 年 2 月 27 日

主査 明治薬科大学 准教授

紀 嘉浩 印

副査 明治薬科大学 教授

紺谷 圈二 印

副査 明治薬科大学 教授

長浜 正巳 印