

学位論文審査結果の要旨

氏名	尾崎優樹
審査委員	主査 東山 繁樹 副査 國枝 武治 副査 永井 将弘 副査 矢野 元 副査 東 太地

論文名 アルツハイマー型認知症患者における *TREM2* 遺伝子イントロン1領域の DNA メチル化率と mRNA 発現量の変化

アルツハイマー型認知症(Alzheimer's Disease : AD)は、認知症の中で最も頻度の高い疾患であり、脳内でのアミロイド β やタウの凝集がみられる。Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (*TREM2*)は、希少な常染色体潜性遺伝性疾患である那須-ハコラ病の原因遺伝子の一つであるが、ミクログリア細胞の表面に発現し、アポトーシスニューロンやミスフォールド蛋白の貪食能の促進作用やサイトカイン産生を抑制することによる炎症遅延作用を有する。2013年に*TREM2*の機能欠損を引き起こす点変異がAD発症のリスク上昇に有意に関連していることが報告され、AD群における*TREM2* mRNA発現量が健常群と比較して有意に高いことが報告されている。尾崎氏は、エピジェネティクスな変化により*TREM2*の遺伝子発現量が変化し、AD発症や重篤度に関与すると予想し、*TREM2*の遺伝子発現調節部位 CpG sitesのDNAメチル化率とAD群-健常対照群の末梢血白血球 mRNA発現量や、AD群の臨床症状との関連を調べることで、末梢血白血球*TREM2* mRNA発現量がADの診断や治療のバイオマーカーとなり得るかを検証した。

本研究では、愛媛大学医学部附属病院精神科および同連携病院にて治療中のAD群50例と性年齢を一致させた健常対照群50例を対象とした。AD群では、発症年齢、服薬内容などの臨床的特徴の聴取に加え、Mini-Mental State Examination (MMSE)、Neuropsychiatric Inventory (NPI)、Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale (ADAS-cog)などの神経心理検査を施行した。対象者の末梢血白血球から常法により、mRNAおよび遺

伝子 DNA 分画を抽出し精製した。RNA 分画からは逆転写反応により cDNA を作成し Taqman probe 法を用いた real time PCR 法にて解析した。DNA メチル化率は遺伝子 DNA をバイサルファイト処理後にパイロシークエンス法を用いて測定した。*TREM2* の DNA メチル化率は、主要な転写因子が結合すると予測されたイントロン1の4つの CpG sites を選択した。その後、AD 群の臨床的特徴と *TREM2* mRNA 発現量、イントロン1の DNA メチル化率を統計学的に比較した。

まず、AD 群では、健常群と比較し末梢血白血球 *TREM2* mRNA 発現量は有意に増加していることを確認した。そして AD 群の *TREM2* イントロン1の3つの CpG sites の DNA メチル化率は健常群と比較して有意に低下していること、*TREM2* mRNA 発現量と DNA メチル化率には有意な負の相関があることを明らかにした。一方、*TREM2* mRNA 発現量や DNA メチル化率と各種臨床データ、神経心理検査の間に有意な相関は認められなかった。

本研究では、AD 群の末梢血白血球 *TREM2* mRNA 発現量とイントロン1の DNA メチル化率との間に有意な相関を初めて見出した。一方、今回の解析では、*TREM2* mRNA 発現量や DNA メチル化率と臨床的データとの間に有意な相関は認めなかったことから、今後、さらに例数を増やして解析するべきだと思われる。末梢血白血球 *TREM2* DNA メチル化率による判別分析を行うと AD 群と健常群を感度 78.0%、特異度 84.0% と高い精度で判別できたことから、*TREM2* mRNA 発現量や DNA メチル化率が AD の診断バイオマーカーとなりうることが示唆された。

本論文に対する公開審査会は平成 30 年 1 月 30 日に開催された。申請者から研究内容が英語で口頭発表された後に、審査委員から本研究に関連する以下の質問がなされた。

- ① コントロール群をどのような基準で選定したのか？
- ② *TREM2* mRNA 発現量や DNA メチル化率と臨床的データとの間に有意な相関を認めなかったことについてどのように考えるのか？
- ③ *TREM2* mRNA 発現量や DNA メチル化率の変化は、他の神経疾患でも認められるのではないのか？ また、AD 患者での特異性はあるのか？
- ④ 末梢血中で *TREM2* mRNA 発現が認められるのは Monocyte のみであるのか？ 脳内の炎症部位に浸潤している Monocyte や他の免疫系細胞において、*TREM2* mRNA 発現は見られるのか？
- ⑤ *TREM2* が AD 発症抑制にどの程度機能しているのか？
- ⑥ *TREM2* ゲノム DNA のメチル化解析をイントロン1に限定して解析した理由は何か？ また、プロモーター領域を解析していない理由は何か？
- ⑦ *TREM2* ゲノム DNA のメチル化と *TREM2* タンパク質発現との相関性はあるのか？
- ⑧ *TREM2* mRNA 発現を定量 PCR で解析した結果に大きな差がないように見えるか？
- ⑨ 脳変性部位での *TREM2* ゲノム DNA のメチル化状態は変化しているのか？
- ⑩ *TREM2* タンパク質の機能はどのようなものか？ またシグナルはどのようにして伝達されるのか？

などの活発な質疑がなされた。申請者はこれらの質問に対して、明確に返答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。