

氏 名	みしま たかやす 三嶋 崇靖
学 位 の 種 類	博士（医学）
報 告 番 号	甲第 1682 号
学位授与の日付	平成 29 年 9 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学 位 論 文 題 目	Cytoplasmic aggregates of dynactin in iPSC-derived tyrosine hydroxylase-positive neurons from a patient with Perry syndrome (Perry 症候群 iPSC 細胞由来 tyrosine hydroxylase 陽性細胞モデルにおけるダイナクチン凝集体)
論 文 審 査 委 員	(主 査) 福岡大学 教授 坪井 義夫 (副 査) 福岡大学 教授 川寄 弘詔 福岡大学 教授 小玉 正太 福岡大学 准教授 上原 清子

内 容 の 要 旨

【目的】

Perry 症候群はパーキンソニズム、うつ、体重減少、中枢性低換気をきたす常染色体優性遺伝の神経変性疾患である (Perry TL, et al. Arch Neurol. 1975)。病理学的には中脳黒質を中心とした神経細胞脱落やグリオシス、神経細胞内の transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) 凝集体およびダイナクチン凝集体がみられる (Wider C, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2009, Farrer MJ, et al. Nat Genet. 2009)。現在までに 8 箇所 (F52L, G67D, G71A, G71R, G71E, T72P, Q74P, Y78C) の遺伝子変異が報告されている。*DCTN1* 遺伝子を過剰発現させた培養細胞研究は報告されているが (Ishikawa K, et al. PLoS One. 2014)、詳細な病態は不明である。今回、我々は Perry 症候群患者から iPSC 細胞を樹立し、病態モデル作成を行う。

【対象と方法】

我々が報告した (Araki E, et al. Mov Disord. 2014) 本邦の 1 家系 (F52L 変異) の男性患者 1 名を対象とした。患者の臨床症状の詳細について検討し、頭部 MRI や MIBG 心筋シンチグラフィーおよび脳ドパミントランスポーターシンチグラフィーについても解析を行った。

患者および健常人の血液から単核球を分離し、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、EBNA1、p53 を用い、リプログラミングを行った (Okita K, et al. Stem cells. 2013)。また、フィーダーフリー培養システムを用い、iPS 細胞を樹立した (Nakagawa

M, et al. Sci. Rep. 2014)。SFEBq 法 (Eiraku M, et al. Cell Stem Cell. 2008) および SMAD シグナル二重阻害 (Doi D, et al. Stem Cell Rep. 2014) により、疾患標的細胞である tyrosine hydroxylase (TH) 陽性細胞に分化誘導した。

HEK293T 細胞に GFP タグ付きの *DCTN1* プラスミドを過剰発現させ、24 時間後に解析を行った。

iPS 細胞や TH 陽性細胞、HEK293T 細胞は免疫染色を用いて解析を行った。NANOG、SSEA4、Sox17、 α SMA、Tuj1、TH、p150^{glued}、TDP-43、ubiquitin、 α -tubulin、p50、p62、TOM20、LAMP2、Calnexin で免疫染色を施行した。

本研究は京都大学および福岡大学の倫理委員会にて審査・承認を受けている。

【結果】

患者は 61 歳の男性である。53 歳でうつ症状が出現した。55 歳からはパーキンソンズムがみられるようになり、L-dopa の効果がみられた。明らかな認知機能障害はみられなかったが、便秘と体重減少を認めた。頭部 MRI では前頭側頭葉の軽度萎縮がみられた。MIBG 心筋シンチグラフィーおよび脳ドパミントランスポーターシンチグラフィーで取り込み低下を認め、孤発性パーキンソン病と類似の所見がみられた。

健常人および患者から iPS 細胞を樹立し、ES 細胞マーカーである NANOG、SSEA4 で染色されることを確認した。また、三胚葉に分化誘導可能であること明らかな染色体異常がみられず、患者由来 iPS 細胞で *DCTN1* 遺伝子変異 (F52L, c.156T>G) がみられることを確認した。

健常人および患者由来 iPS 細胞から TH 染色陽性に分化誘導し、ダイナクチンの細胞分布について検討した。我々は HEK293T 細胞に GFP タグ付きの *DCTN1* プラスミドを過剰発現させ、野生型と変異型で比較を行い、変異型でのみ細胞質にダイナクチン凝集体がみられることを示した。次に TH 陽性細胞でもダイナクチンの細胞分布について検討し、患者 iPS 細胞由来 TH 陽性細胞でのみダイナクチン凝集体がみられることを明らかにした。HEK293T 細胞および TH 陽性細胞では、TDP-43 凝集はみられなかった。次にダイナクチン凝集体の特徴について解析した。ダイナクチン凝集体の一部とユビキチン、小胞体、ミトコンドリア、リソソームの一部が共局在していることが明らかになった。

【結論】

TDP-43 凝集体とダイナクチン凝集体は Perry 症候群の病理学的特徴である。我々は患者 iPS 細胞由来 TH 陽性細胞でダイナクチン凝集体を見出した。Perry 症候群患者 iPS 細胞由来 TH 陽性細胞で TDP-43 凝集はみられなかったが、TDP-43 凝集体が病理学的特徴である筋萎縮性側索硬化症においても iPS 細胞由来神経細胞で TDP-43 凝集体を検出した報告は少ない (Egawa N, et al. Sci. Transl. Med. 2012, Burkhardt MF, et al. Mol. Cell Neurosci. 2013)。Perry 症候群において TDP-43 凝集はダイナクチン凝集の二次的な反応で、TDP-43 凝集体の検出にはダイナクチン凝集体出現後、長期間を要するののかも

しれない。iPS 細胞由来神経細胞は未成熟であり、成人発症の神経変性疾患ではモデリングが難しいとの報告もあるが (Studer L, et al. Cell Stem Cell. 2015)、我々は Perry 症候群において iPS 細胞由来 TH 陽性細胞で病態の一部再現に成功した。Perry 症候群キャリアにおいてもドパミン神経変性は報告されており (Felicio AC, et al. Mov. Disord. 2014)、症状出現前から神経変性が始まっていると考えられる。

今回、我々は iPS 細胞を用い、F52L 変異において一部病態再現に成功した。今後は他の遺伝子変異例や *DCTN1* 変異 (G59S) を有する運動ニューロン疾患との比較検討が必要である。

審査の結果の要旨

本論文は、家族性パーキンソン病である Perry 症候群患者から iPS 細胞を樹立し、病態モデル作成を行うことを目的とした。本邦の 1 家系 (F52L 変異) の男性患者 1 名を対象とした。患者の臨床症状の詳細について検討し、頭部 MRI や MIBG 心筋シンチグラフィーおよび脳ドパミントランスポーターシンチグラフィーについても解析を行った。患者は、典型的なパーキンソニズムを呈し、MIBG 心筋シンチグラフィーおよび脳ドパミントランスポーターシンチグラフィーの取り込み低下を認めた。患者由来の iPS 細胞を樹立した後、SFEBq 法を用いて疾患標的細胞である tyrosine hydroxylase (TH) 陽性神経細胞を分化誘導し、免疫染色でコントロール細胞との比較検討を行った。患者由来 iPS 細胞から分化誘導した TH 陽性神経細胞でのみダイナクチンの凝集体を検出し、病態の一部再現に成功した。以下に本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、主な質疑応答の内容についてそれぞれ記載する。

1. 斬新さ

Perry 症候群は非常に稀な神経変性疾患であり、患者の詳細な症状や検査所見について検討した報告は少ない。本研究では、詳細な臨床症状と検査所見について解析し、TH 陽性神経細胞が疾患標的細胞であることを示した。また、その患者由来 iPS 細胞から TH 陽性神経細胞を用いて表現型の解析を行っている。本研究は、臨床および基礎研究の両方の側面を持つ点が非常に斬新な内容である。

2. 重要性

Perry 症候群は *DCTN1* 遺伝子変異を有する。過去の報告では培養細胞に *DCTN1* 遺伝子変異を過剰発現させ、ダイナクチン凝集体を検出しているが、患者由来の細胞で検討した報告はない。それゆえに患者由来の iPS 細胞を樹立し、疾患標的細胞である TH 陽性神経細胞を用いてダイナクチンの凝集体を検出した点は重要である。

3. 実験方法の正確性

本研究は、京都大学 iPS 細胞研究所との共同研究であり、iPS 細胞の樹立、TH 陽性神経細胞の分化誘導法については、正確性を担保している。iPS 細胞樹立、TH 陽性神経細胞の分化誘導、表現型の解析については過去の報告に準じた方法を用いていることから、十分な正確性がある。

4. 表現の明確さ

Perry 症候群患者の臨床症状や検査所見について詳細に検討されている。また、患者由来の TH 陽性神経細胞で病態の一部再現に成功している。明確な表現で記載されており、その結果も信頼に値する。

5. 主な質疑応答

以上の研究内容に対して、審査員により、実験方法、結果の解釈、臨床的な意義に関する質疑が行われた。下記のような多数の質問があり、活発な討議が行われた。

Q1 : TDP-43 が後々凝集するとのことだが、それは二次的な凝集であるのかという議論があると思う。ダイナクチンと TDP-43 との関係は？

A1 : ダイナクチンは TDP-43 を輸送していると考えられ、ダイナクチンの障害をきたした後に TDP-43 が凝集するのではないかと考えている。また、Perry 症候群は TDP-43 プロテイノパチーの一つに分類されるが、TDP-43 プロテイノパチーの代表的な疾患である筋萎縮性側索硬化症とは TDP-43 の病理像が異なり、TDP-43 の電子顕微鏡所見はアルツハイマー病の所見と類似している。これらの結果も TDP-43 凝集は二次的な凝集であることを示唆していると考ええる。

Q2 : 今回の研究では患者由来 iPS 細胞で TDP-43 の凝集がみられることを期待したと思うが、結果的には TDP-43 の凝集がみられないということか？

A2 : iPS 細胞由来の神経細胞は未熟な細胞であり、今後は長期培養や熱処理、ソルビトールの負荷などを行い、TDP-43 の凝集体がみられるか検討すべきである。

Q3 : Perry 症候群の中枢性呼吸障害の機序についてとドパミン神経細胞以外の障害はみら

れるか？

A3：中枢性呼吸障害に関しては、坪井教授らが Perry 症候群の病理学的検討において呼吸中枢の神経細胞脱落を報告している。また、Mayo Clinic との共同研究で我々は、Perry 症候群において TDP-43 の凝集体が脳にもみられることを報告しており、ドパミン神経細胞以外の神経細胞も障害をきたす。今後は様々な神経細胞を分化誘導し、比較検討が必要である。

Q4：HEK293T 細胞と iPS 細胞を用いて蛋白凝集体がみられることは分かったが、神経細胞死をきたすかという議論は論文に記載されていない。

A4：神経変性疾患では異常蛋白質が凝集し、神経細胞死をきたすと考えられている。Perry 症候群においても同様の機序で神経細胞死が起こると考えている。今後は、TH 陽性神経細胞で神経細胞死についての検討が必要である。

Q5：神経細胞死には p150^{glued} と TDP-43 凝集の両方が必要であるか？

A5：TDP-43 が保護的に作用する可能性も否定できないが、ハエを用いた研究で TDP-43 の蛋白量を減少させることにより、Perry 症候群の表現型が改善されとの報告もあり、TDP-43 と細胞死の関連はあると考える。今後は TDP-43 凝集がみられるモデル作成を目指す。

Q6：HEK293T 細胞のトランスフェクションの際、ベクターは何を使用したか？

A6：市販の CMV を使用した。

Q7：HEK293T 細胞のトランスフェクションでは GFP のタグがついているが、濃度検討は行ったか？

A7：濃度検討は行った。トランスフェクション効率は異なるが、GFP 陽性の F52L 変異の細胞で凝集体がみられた。過去の報告では GFP なしの細胞でも凝集体は報告されている。また WT では凝集体はみられず、GFP による凝集とは考えにくい。

Q8：今後は動物実験を予定しているか？

A8：過去に坪井教授が報告した G71A 変異のトランスジェニックマウスを作成し、現在、投稿準備中である。また、ノックインマウスも作成中で、理化学研究所との共同研究を継続している。

Q9：iPS 細胞のコントロールを家系内の遺伝子非保因者としなかった理由は？

A9：倫理的な問題で困難であり、健常人の検体を使用した。

Q10：神経細胞の分化誘導に関して、今回の研究では治療に使う必要はない。Nanog に dye を入れるなどの検討はしなかったか？

A10 : 本研究は、京都大学 iPS 細胞研究所の高橋淳教授との共同研究でもある。高橋研究室はドパミン神経細胞移植について研究を行っており、高橋研究室の分化誘導法を基本にし、TH 陽性神経細胞の分化誘導を行った。TH 陽性神経細胞の分化誘導効率が低かったため、ウェスタンブロッティングなどの検討が行えなかった。今後は、他の分化誘導法についても試みる必要がある。

Q11 : ユビキチンの染色はどのように行ったか？

A11 : 単純に免疫染色を行った。

Q12 : ユビキチンの染色では、バックグラウンドがあまり染色されていないが、ユビキチンがダウンレギュレートされているのではないか。NF- κ B シグナルが下がっているのではないか。それを除外すべきで、プロモーター領域の検討が必要かもしれない。

A12 : その通りであり、今後検討が必要である。

Q13 : ダイナクチン凝集体と TDP-43 凝集体との相互作用はあるか？

A13 : ダイナクチンは軸索輸送において重要な役割があり、TDP-43 の輸送に関連していると考えられる。ダイナクチンの障害で TDP-43 が凝集すると考えている。実際、筋萎縮性側索硬化症患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞で TDP-43 mRNA 輸送の障害が報告されており、*DCTN1* 遺伝子変異を有する Perry 症候群でも TDP-43 の輸送障害は検出できると考える。将来的には、Perry 症候群患者 iPS 細胞由来の神経細胞でも TDP-43 やミトコンドリアなどの軸索輸送をカイモグラフなどで検討すべきである。

Q14 : HEK293T 細胞を使用した理由は？

A14 : HEK293T 細胞は扱いやすい細胞だからである。

Q15 : 今回の研究で iPS 細胞由来の神経細胞だけでもインパクトがあり、培養細胞を用いる必要があったのか？

A15 : 培養細胞に GFP のタグをつけてトランスフェクションすることにより明瞭な凝集体を検出することができ、比較のために使用した。

Q16 : α -tubulin の染色で HEK293T 細胞では微小管の構造が乱れているようにも見える。ダイナクチンは逆行輸送に関連しており、ミトコンドリアなどの輸送についての関りはあるか？

A16 : ダイナクチンは細胞小器官の輸送にも関係している。筋萎縮性側索硬化症患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞では、報告がある。*DCTN1* 遺伝子変異を有する患者由来の神経細胞で軸索輸送に関して検討した報告はないため、今後検討すべきである。

Q17 : p150^{glued} は細胞内の輸送にどのように関与しているのか？

A17 : 細胞内輸送に重要なタンパクはダイニンと考えるが、p150^{glued} の異常により輸送のスピードの低下や輸送の向きの障害、輸送される数の減少などがみられるかもしれない。培養細胞での検討では、*DCTN1* 変異の運動ニューロン病において Perry 症候群の変異と比較して凝集体をつくりやすく、細胞内輸送の障害も異なると報告されており、変異の場所により、微小管との結合能の違いがみられ、輸送の障害も異なる可能性がある。

Q18 : iPS 細胞由来の神経細胞では凝集体ができていますが、患者は成人発症である。発症まではダイニンなどで機能を補っているのか？

A18 : パーキンソン病などでは多くのドパミン神経細胞が減少し、症状をきたす。Perry 症候群においても症状出現前にドパミン神経障害が進行していることが証明されており、若い時期から神経細胞障害をきたしている可能性がある。iPS 細胞由来の神経細胞は未熟な細胞であり、これらの所見と一致しているのかもしれない。

Q19 : 8 種類の *DCTN1* 変異での違いは？

A19 : 今回の F52L 変異の家系は他の変異の症例と比較すると症状は軽度であり、細胞内輸送障害も軽度であるかもしれない。他の変異に関しては臨床上、明らかな差はみられない。

Q20 : *DCTN1* 変異の蛋白の立体構造については報告されているか？

A20 : 既に報告されている。蛋白構造の変化により微小管との結合能が異なる可能性はある。

本論文は、内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確性および質疑応答の結果を踏まえ、博士学位論文に値すると評価された。