

論 文 内 容 要 旨

題目 Proteasome impairment in neural cells derived from HMSN-P patient iPSCs

(近位筋優位運動感覚ニューロパチー (HMSN-P) 患者 iPSC 細胞から分化した神経細胞はプロテアソーム障害を認める)

著者 Nagahisa Murakami, Keiko Imamura, Yuishin Izumi, Naohiro Egawa, Kayoko Tsukita, Takako Enami, Takuya Yamamoto, Toshitaka Kawarai, Ryuji Kaji, and Haruhisa Inoue  
平成 29 年 2 月 15 日発行 Molecular Brain 第 10 巻 第 7 号  
に発表済

内容要旨

近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー (Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement, HMSN-P) は、常染色体優性形式をとる、家族性の神経変性疾患であり、日本で初めて報告された。1997 年に HMSN-P 患者家系が報告されて以降、2013 年に韓国、2015 年にイランで HMSN-P の患者家系が報告されるなど、HMSN-P は日本固有の疾患ではなく全世界で報告されている。HMSN-P は難病で知られる筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と共通点が多く、進行性の筋萎縮・呼吸不全をきたし、進行期には人工呼吸器管理が必要となる難治性疾患である。HMSN-P の原因遺伝子として *TFG* の変異が 2012 年に東京大学・徳島大学の研究グループにより同定された。*TFG* 遺伝子はその変異が HMSN-P を引き起こす他、変異の場所により遺伝性痙性対麻痺やシャルコー・マリー・トゥース病などの神経変性疾患を引き起こすことが知られており、神経にとって重要な遺伝子であることが想定されている。

*TFG* の機能については近年様々な報告がなされているものの、HMSN-P の発症のメカニズムについて、詳細はまだ明らかになっていなかった。そこで、我々は、HMSN-P 患者由来の iPSC 細胞から脊髄の運動神経細胞へと分化させることで、病態を再現するとともに、CRISPR-Cas9 システムと呼ばれるゲノム修復技術を用いて、遺伝子修復 iPSC 細胞を作製し、HMSN-P 患者由来 iPSC 細胞と比較することで、HMSN-P のメカニズムを検証することとした。

## 様式(8)

HMSN-P 患者 2 名の皮膚細胞から、対照群として健常者 3 名の皮膚細胞及び血液細胞から iPS 細胞を作製した。iPS 細胞を、無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法) により脊髄運動神経細胞へと分化させた。患者由来 iPS 細胞と対照群との間で、運動神経細胞やグリア細胞への分化効率に差は見られなかった。

運動神経細胞において、TFG 蛋白の蓄積を調べたところ HMSN-P 運動神経細胞内で TFG タンパク質が蓄積していた。異常蛋白の蓄積にはユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) の機能障害が関連していることが知られている。神経変性疾患である ALS や認知症においても同様に UPS の機能低下が認められる。そこで HMSN-P 運動神経細胞のプロテアソーム活性について測定をしたところ、対照群と比較して低下していた。さらに HMSN-P 運動神経細胞ではユビキチン化タンパク質が増加していた。UPS 機能障害と運動神経細胞の細胞死との関連をみるために 3 ヶ月の期間、培養を続けたが、HMSN-P 運動神経細胞の細胞死は認められなかった。HMSN-P は成人発症の疾患であり、HMSN-P 運動神経細胞の細胞死を再現するには何らかのストレスが必要であることが想定された。加齢とともに UPS 機能は生理的に衰えていくことが知られているため、ストレスの中でも UPS 阻害剤に着目し、HMSN-P 運動神経細胞及び対照群に加えたところ、対照群よりも細胞の脆弱性を認めた。

HMSN-P の原因が TFG 遺伝子の変異によるものか確認するため、iPS 細胞の段階で原因となっている遺伝子変異を、ゲノム編集技術により修復し、脊髄の運動神経細胞へ誘導し、HMSN-P 患者と遺伝子情報が変異箇所を除いて同じである遺伝子修復 iPS 細胞を作製した。この遺伝子修復により、HMSN-P 患者運動神経細胞に見られた TFG 蛋白の蓄積は消失した。さらにプロテアソームの活性の回復を認め、UPS 阻害剤による細胞の脆弱性についても改善を認めた。本研究により、今後の HMSN-P の疾患研究及び治療薬の探査に貢献することが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第	号	氏名	村上 永尚
審査委員	主査	福井 清	副査	勢井 宏義
	副査	井本 逸勢		

- 題目 Proteasome impairment in neural cells derived from HMSN-P patient iPSCs  
(近位筋優位運動感覚ニューロパチー(HMSN-P)患者 iPSC 細胞から分化した神経細胞はプロテアソーム障害を認める)
- 著者 Nagahisa Murakami, Keiko Imamura, Yuishin Izumi, Naohiro Egawa, Kayoko Tsukita, Takako Enami, Takuya Yamamoto, Toshitaka Kawarai, Ryuji Kaji and Haruhisa Inoue  
平成29年2月15日発行 Molecular Brain 第10巻 第7号  
に掲載済  
(主任教授 梶 龍児)
- 要旨 近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー(Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement, HMSN-P)は、常染色体優性形式の家族性の神経変性疾患である。HMSN-P は難病で知られる筋萎縮性側索硬化症(ALS)と共通点が多く、進行性の筋萎縮・呼吸不全をきたす難治性疾患である。HMSN-Pの原因遺伝子として *Tropomyosin-receptor kinase Fused Gene (TFG)*の変異が同定された。TFGの機能については近年様々な報告がなされているものの、HMSN-Pの発症のメカニズムについて、詳細は明らかになっていなかった。そこで、申請者は、HMSN-P患者由来の iPSC 細胞を運動神経細胞へと分化させることで、病態を再現するとともに、CRISPR-Cas9 システムと呼ばれるゲノム修復技術を用いて、遺伝子修復 iPSC 細胞を作製し、HMSN-P 患者由来 iPSC 細胞と比較することで、HMSN-P のメカニズムを検証することとした。

HMSN-P 患者 2 名の皮膚細胞から、対照群として健常者 3 名の皮膚細胞及び血液細胞から、iPS 細胞を作製した。iPS 細胞を、無血清凝集浮遊培養法により運動神経細胞へと分化させた。

得られた結果は以下の通りである。

1. 患者由来 iPS 細胞と対照群との間で、運動神経細胞やグリア細胞への分化効率に差は見られなかった。
2. HMSN-P 運動神経細胞内で TFG タンパク質の蓄積を認めた。
3. HMSN-P 運動神経細胞のユビキチン・プロテアソーム (UPS) 活性は対照群と比較して低下しており、ユビキチン化タンパク質が増加していた。
4. UPS 阻害剤に対する細胞の脆弱性が HMSN-P 運動神経細胞では対照群よりも亢進していた。
5. HMSN-P の原因が *TFG* 遺伝子の変異によるものか確認するため、iPS 細胞の段階で原因となっている遺伝子変異を、ゲノム編集技術により修復したところ、HMSN-P 患者運動神経細胞に見られた TFG 蛋白の蓄積は消失し、UPS 活性の回復を認めた。

本研究は、HMSN-P の病態の一部を明らかにするとともに、方法的にも、その治療薬探索に大きく貢献しうるものと考えられ、学位授与に値すると考えられた。