

# 論文の内容の要旨

論文題目 多系統萎縮症患者由来 iPS 細胞を用いた病態機序に関する研究

氏名 中元ふみ子

## 1. 序文

多系統萎縮症 (Multiple System Atrophy; MSA) は、成人発症の進行性神経変性疾患で、小脳失調、パーキンソニズム、自律神経障害を特徴とする。一般的に、MSA は孤発性の疾患と認識されているが、稀に多発家系がみられること、小脳失調が前景に立つ MSA-C とパーキンソニズムが前景に立つ MSA-P の相対比率が日本と欧米では異なることから、病態に何らかの遺伝的背景があることが示唆されており、先行研究において、機能障害性 *COQ2* 変異が MSA 発症のリスクとなっていることが見出されている。

*COQ2* 遺伝子によりコードされる *COQ2* タンパク質は、コエンザイム Q10 (CoQ10) の生合成に必須の酵素であり、*COQ2* 変異により、CoQ10 の合成が低下すると考えられる。CoQ10 はミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系に参与するほか、抗酸化物質として知られていることから、*COQ2* 変異による ATP 産生の減少や酸化ストレスに対する脆弱性の増加が MSA の病態機序として想定される。もし CoQ10 の機能と関連した ATP 産生の低下や酸化ストレスに対する脆弱性の増加が MSA の病態機序に関連する場合、CoQ10 の補充による治療介入の可能性が期待される。

その可能性を検討する為に、MSA 患者の神経系における CoQ10 に関連した機能障害の存在と、MSA に特異的な所見であるオリゴデンドロサイトにおける glial cytoplasmic inclusion の出現や神経細胞死 (アポトーシス) といった MSA 病態への関与を示す必要がある。その為には、iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) 技術を用いた患者由来の生きた神経系細胞で解析を行うことが有用と考えられる。

以上より、本研究では、MSA 患者由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞を用いて、アポトーシスの評価と電子伝達系機能、抗酸化作用に対する解析を行い、*COQ2* 変異をもつ MSA 患者および変異をもたない MSA 患者の神経細胞における CoQ10 関連の機能障害の有無を明らかにするとともに、細胞機能障害の MSA 病態への関与について検証することを目的とする。

## 2. 方法

### 2.1. MSA 患者由来 iPS 細胞の樹立と分化誘導

*COQ2* 変異をもつ 2 名の MSA 患者 (MSA1, p.[R387\*];[V393A] ; MSA2, p.V393A) および *COQ2* 変異をもたない 3 名の MSA 患者 (MSA3, MSA4, MSA5) の末梢血単核球に、エレクトロポレーションにより 6 つの遺伝子 (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *dominant-negative p53*) を発現するエピゾーマルベクター群を導入することにより、iPS 細胞を樹立した。

神経細胞-オリゴデンドロサイト同時誘導 (分化誘導法 1) , 中脳・後脳領域神経細胞への誘導 (分化誘導法 2) は、既出の論文の方法に若干の変更を加えて行った。

## 2.2. アポトーシスの解析

iPS 細胞由来神経細胞（分化誘導法 1）の接着培養 5 週後の培地中に 25  $\mu$ M CoQ10 を添加して 7 日間培養後、更に 7 日間解析用培地中で培養した。4% paraformaldehyde (PFA) 溶液で固定し、cleaved caspase 3（アポトーシスマーカー）および  $\beta$ III-tubulin（神経細胞マーカー）に対する免疫染色を行い、神経細胞の cleaved caspase 3 陽性率を In Cell Analyzer 6000 system を用いて解析した。

## 2.3. 細胞内 CoQ10 量の解析 (iPS 細胞)

iPS 細胞に対して、三連四重極型 LC-ESI-MS/MS (liquid chromatography-electro spray ionization-tandem mass spectrometry) システムを用いて解析した。各検体について、CoQ10 量と内部標準物質（重水素標準した CoQ10）との比を定量し、更にタンパク量で補正した値を用いた。

## 2.4. 電子伝達系機能の解析

### 1) ガラクトース培地によるアポトーシス量の変化

CoQ10 の減少による電子伝達系機能の変化を評価するにあたり、細胞のエネルギー産生が酸化的リン酸化に依存するように、グルコースを含まない解析用培地（ガラクトース培地）を調製し、解析を行った。また、比較対照としてグルコースを含む解析用培地（グルコース培地）も作成した。

iPS 細胞由来神経細胞（分化誘導法 1）の接着分化 6 週間後にガラクトース培地またはグルコース培地中で 7 日間培養後、4%PFA 溶液で固定し、免疫染色を行い、cleaved caspase 3 陽性神経細胞の割合を算出した。

### 2) ガラクトース培地, CoQ10 添加による ATP 量の変化

iPS 細胞由来神経細胞（分化誘導法 1）を接着分化 1 日後の培地中に 25  $\mu$ M CoQ10 を添加して 6 日間培養後、ガラクトース培地またはグルコース培地中で 4 日間培養した。解析にあたっては、細胞に CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay 試薬を添加して反応させた後、ルミノメーターで測定した発光量より ATP の定量を行った。

### 3) 酸素消費速度 (OCR) の測定 (iPS 細胞)

iPS 細胞の酸素消費速度 (oxygen consumption rate, OCR) は、XF24-3 Extracellular Flux Analyzer を用いて解析した。測定の手順は、まず試薬添加前の OCR を測定し、その後 ATP 合成酵素の阻害剤であるオリゴマイシン、次に、脱共役剤である carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy phenylhydrazone (FCCP) を加え、最後にロテノン（呼吸鎖複合体 I 阻害剤）とアンチマイシン A（複合体 III 阻害剤）を加え、非ミトコンドリア性酸素消費を測定した。最初の OCR と FCCP 添加後の OCR からそれぞれ非ミトコンドリア性酸素消費を引いた差をそれぞれ基礎呼吸、最大呼吸とし、基礎呼吸に対する最大呼吸の割合を予備呼吸能とした。

## 2.5. 活性酸素種の解析

iPS 細胞由来神経細胞（分化誘導法 2）を接着分化 11 日後に 5  $\mu$ M CellROX<sup>®</sup> Green Reagents（活性酸素種マーカー）と反応させた後、細胞を 4%PFA 溶液で固定し、 $\beta$ III-tubulin に対する免疫染色を行った。神経細胞の CellROX 陽性率は In Cell Analyzer 6000 system を用いて解析した。

### 3. 結果

#### 3.1. MSA 患者由来 iPS 細胞の樹立と分化誘導

MSA1, MSA2, MSA3, MSA4, MSA5 のサンプルから iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞クローンは PCR によるエピゾーマルベクタープラスミドの消失確認を行い、患者毎に 3 クローンずつを選抜した。選択クローンについては、免疫化学染色による未分化マーカー (NANOG, OCT4) 発現を確認し、EB 形成を介して分化させた細胞を免疫化学染色することにより、多分化能を確認した。更に、*COQ2* 遺伝子のシーケンシングを行い、変異が保持されていることを確認した。以降の解析には、MSA1, MSA5 由来 iPS 細胞を用いた。

分化誘導法 1, 2 いずれの培養法においても、健常者および MSA 患者由来 iPS 細胞において、神経細胞への分化が確認され、その誘導効率に有意差は認められなかった。

#### 3.2. アポトーシスの解析

神経細胞のアポトーシスマーカー陽性率 (平均±標準誤差) は、MSA1 (10.8±6.2%), MSA5 (14.0±12.8%); 201B7 (3.6±4.1%), 1201C1 (3.5±3.1%), HKC1 (4.4±2.1%) であり、MSA 患者由来神経細胞では健常者と比較して有意にアポトーシスの増加が認められた。また、MSA 患者由来神経細胞においては CoQ10 添加群でアポトーシスが減少する傾向が見られた。

#### 3.3. 細胞内 CoQ10 量の解析 (iPS 細胞)

CoQ10 含量 (内部標準物質との比のタンパク質量に対する割合 (平均±標準誤差) は、MSA1 (0.691±0.06), MSA5 (0.747±0.13); 201B7 (1.03±0.166), HKC1 (1.02±0.159) であり、MSA 患者由来 iPS 細胞において健常者と比較して低下していた。

#### 3.4. 電子伝達系機能の解析

##### 1) ガラクトース培地によるアポトーシス量の変化

細胞の ATP 産生が酸化的リン酸化に依存するガラクトース培地においても、アポトーシスマーカー陽性神経細胞の割合 (平均±標準誤差) は、MSA1 (19.3±14.4%), MSA5 (12.7±7.08%); 201B7 (3.06±4.23%), 1201C1 (4.06±2.74%), HKC1 (3.93±4.31%) であり、MSA 患者由来神経細胞において健常者と比較して有意にアポトーシスの増加が見られた。ガラクトース培地使用に伴うアポトーシス細胞の増加割合 (ガラクトース培地/グルコース培地) は、MSA1 (2.51±0.57%) では健常群 (201B7 (0.994±0.24%), 1201C1 (1.23±0.13%), HKC1 (1.09±0.21%)) と比較して有意に増加していた。

##### 2) ガラクトース培地, CoQ10 添加による ATP 量の変化

グルコース培地で培養した際の ATP 量に対するガラクトース培地で培養した際の ATP 産生量の割合 (中央値 (四分位範囲)) は、MSA1 (0.958 (0.893-0.962)), MSA5 (0.861 (0.756-0.994)); 1201C1 (1.08 (1.05-1.22)) であり、MSA1 は健常者 (1201C1) と比較して有意に減少した。

CoQ10 を添加しなかった場合の ATP 量に対する添加した場合の ATP 産生量の割合（中央値（四分位範囲））は、MSA1 (1.08 (1.06-1.41)), MSA5 (2.11 (1.02-2.23)) ; 1201C1 (1.04 (0.99-1.41)) であり、3 群間の有意差は得られなかったが、いずれにおいても CoQ10 添加群において非添加群と比較して増加する傾向が認められた。

### 3) 酸素消費速度 (OCR) の測定 (iPS 細胞)

MSA 患者由来 iPS 細胞における予備呼吸能（平均±標準誤差）は、MSA1 (154.8±6.0%), MSA5 (127.3±12.1%) ; 201B7 (186.9±2.2%), HKC1 (171.5±13.3%) であり、MSA 患者由来 iPS 細胞において健常者と比較して低下していた。

## 3.5. 活性酸素種の解析

CellROX 陽性細胞の割合（平均±標準誤差）は、MSA1 (16.7±2.4%), MSA5 (7.10±2.3%) ; 201B7 (3.31±0.7), 1201C1 (5.21±2.2), HKC1 (5.62±1.7) であり、MSA1 で健常者および MSA5 と比較し有意に増加していた。MSA5 は健常者細胞と比較してわずかに高い傾向があったが、有意差は認められなかった。

## 4. 考察

COQ2 変異を 2 アレルにもつ MSA 患者 (MSA1) 由来 iPS 細胞内 CoQ10 含量は健常者より低下しており、神経細胞のアポトーシス増加の理由として、COQ2 変異による CoQ10 合成障害により CoQ10 関連の細胞機能障害がある可能性が考慮された。電子伝達系でのエネルギー代謝と細胞死の相関について評価した所、グルコース欠乏条件下のアポトーシス増加率が健常者と比較し MSA1 では有意に上昇しており、解糖系を抑制することにより ATP 産生低下が生じアポトーシスが誘発された可能性が推測された。抗酸化作用に対する解析では、MSA1 由来神経細胞では、活性酸素種が健常者や MSA5 と比較して増加しており、抗酸化作用の障害があることが示唆された。更に、CoQ10 関連の細胞機能障害がアポトーシスと関連していることを確認する為に、CoQ10 添加による上記解析の変化を観察した所、CoQ10 添加により ATP が増加傾向を示し、アポトーシスが減少した。以上の結果から、MSA1 由来神経細胞には電子伝達系での ATP 産生障害、抗酸化作用の障害が存在すること、アポトーシス増加にはこれらの機能障害が影響している可能性があること、CoQ10 添加によりアポトーシスが減少することが示唆された。

一方で、変異をもたない MSA 患者の神経細胞 (MSA5) では、統計学的有意差は認めなかったが、健常者と比較して軽度な機能障害を有している可能性が示唆された。更に、CoQ10 添加によりアポトーシスの減少傾向が認められ、CoQ10 関連の細胞機能障害が神経細胞死に関与している可能性が考えられた。