

審査の結果の要旨

氏名 中元 ふみ子

本研究は、*COQ2* 変異によるコエンザイム Q10 合成障害が発症リスクとなると考えられる多系統萎縮症 (MSA) 患者に対する、コエンザイム Q10 補充療法の可能性を検討するため、*COQ2* 変異をもつ MSA 患者および変異をもたない 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、コエンザイム Q10 の機能である電子伝達系機能や抗酸化作用に対する解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *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。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、免疫化学染色により未分化マーカー (NANOG, *OCT4*) 発現を確認し、胚様体 (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。健常者および MSA 患者由来 iPS 細胞 (MSA1, MSA5) 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。
2. iPS 細胞由来神経細胞においてアポトーシスマーカー (cleaved caspase 3) および神経細胞マーカー (β III-tubulin) に対する免疫化学染色を行い、神経細胞の cleaved caspase 3 陽性率を In Cell Analyzer 6000 system を用いて解析したところ、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、*COQ2* 変異をもつ MSA1 由来神経細胞においてはコエンザイム Q10 添加群でアポトーシスが減少した。
3. 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) システムを用いて細胞内コエンザイム Q10 量を解析したところ、MSA 患者由来 iPS 細胞 (MSA1, MSA5) において健常者と比較して低下していた。
4. コエンザイム Q10 の減少による電子伝達系機能の評価をするにあたり、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。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

合は、*COQ2* 変異をもつ *MSA1* では健常群と比較して有意に増加していた。

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 量の割合は、*MSA1* は健常者と比較して有意に減少した。

6. iPS 細胞における酸素消費速度を測定し、予備呼吸能(最大呼吸/基礎呼吸 x100[%])を評価したところ、*MSA* 患者由来 iPS 細胞 (*MSA1*, *MSA5*) において健常者と比較して低下していた。

7. iPS 細胞由来神経細胞を CellROX® Green Reagents (活性酸素種マーカー) と反応させた後、 β III-tubulin に対する免疫化学染色を行い、神経細胞の CellROX 陽性率を In Cell Analyzer 6000 system を用いて解析したところ、*COQ2* 変異をもつ *MSA1* 由来神経細胞では健常者と比較して活性酸素種の増加が認められた。*COQ2* 変異をもたない *MSA5* は健常者と比較してわずかに増加傾向であったが、有意差は認められなかった。

以上、本論文は *COQ2* 変異をもつ *MSA* 患者での、コエンザイム Q10 関連の機能障害を示す、活性酸素種の増加とグルコース欠乏環境下におけるアポトーシスの高度な増加を認めた。また、コエンザイム Q10 添加によって有意差をもってアポトーシスが減少することを観察した。これらの結果は、特に *COQ2* 変異をもつ *MSA* 患者に対するコエンザイム Q10 補充療法が有効である可能性を支持するものであり、*MSA* に対する治療法開発への貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。