

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07763

研究課題名（和文）孤発性IRF2BPL変異の患者由来iPS細胞を用いたNEDAMSS病態モデル確立

研究課題名（英文）In vitro model of NEDAMSS pathology using patients-derived iPS cells with sporadic IRF2BPL mutation

研究代表者

井上 健一（Inoue, Kenichi）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90587974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：同一のIRF2BPL変異を有する2症例の患者iPS細胞を樹立して、新規疾患NEDAMSSの病態モデルを確立した。

iPS細胞からSMAD二重阻害で分化誘導した皮質ニューロン・アストログリアの共培養を、電子顕微鏡解析に用いた。そこで患者由来のニューロンで、多数のオートファジー様小体が観察された。オートファジー様小体は、multivesicular bodyやlamellar bodyから、自己消化が進行して空胞に変化したものまで、様々な形態をしていた。同期間培養した健康ニューロンではこのような像は観察されず、患者ニューロンが脂質代謝の異常を起こし、神経変性の途上にあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NEDAMSSは、致死性の小児神経変性疾患である。NEDAMSSの責任遺伝子として、IRF2BPLの孤発性点突然変異が同定された。ところが翻訳された変異タンパクの機能や責任病変は、殆ど分かっていなかった。本研究は世界ではじめてNEDAMSS患者由来iPS細胞を2症例樹立し、病態モデルを確立した。電子顕微鏡観察では患者由来ニューロンの神経変性様表現型（オートファゴソーム過剰活動、脂質代謝異常）が再現され、目標の一部を達成した。また正常型・変異型のIRF2BPLタンパク質の結合タンパクを複数（PKM, IRF2BP1, BP2, BPL）同定したため、引き続き病態メカニズムを追究していく。

研究成果の概要（英文）：Here we established in vitro disease model for a newly identified pediatric disease, NEDAMSS. We used iPS cells from two NEDAMSS patients with the identical IRF2BPL mutation. Dual SMAD inhibition successfully differentiated iPS cells into cortical neurons and astrocytes. Co-cultures of neurons and astrocytes were analyzed using electron microscopy. In neurons derived from patients, numerous autophagy-like bodies were observed. These autophagy-like bodies displayed various forms, ranging from lamellar bodies and multivesicular bodies to vacuoles formed by advanced autophagic digestion. Such structures were not observed in neurons from healthy sibling controls cultured for the same period, suggesting that the patient neurons exhibit lipid metabolism abnormalities and are in the process of neurodegeneration.

研究分野：神経病態学

キーワード：IRF2BPL NEDAMSS 患者由来iPS細胞 皮質ニューロン アストログリア lamellar body multivesicular body

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NEDAMSS(NEurodevelopmental Disorder with regression, Abnormal Movements, loss of Speech, and Seizures)は、2018年に発見された小児神経変性疾患である。NEDAMSSの責任遺伝子として、IRF2BPLの孤発性点突然変異が同定された。ところが翻訳された変異タンパクの機能や責任病変は、殆ど分かっていなかった。IRF2BPL遺伝子の変異は、NEDAMSSの他にウェスト症候群(指定難病145)、自閉症の患者で発見されている。

2. 研究の目的

NEDAMSS患者から樹立されたiPS細胞を用いて、in vitroにおける病態再現を試みる。また野生型および変異型のIRF2BPLタンパク質と結合する因子を探索し、発症の分子メカニズムを追究する。

3. 研究の方法

2症例のNEDAMSS患者/健常きょうだいの血液からiPS細胞を樹立した。核型解析で染色体が揃わないクローンを除外した結果、患者由来ときょうだい由来でそれぞれ4クローン(EL1, EL6, P1, P11)、3クローン(EL4, EL10, S8)が得られた。

患者由来iPS細胞を活用して、二つの異なる手法で大脳皮質ニューロンを作成した。(1)分化誘導を促進するNGN2遺伝子をiPS細胞で強制発現し、純度の高い皮質ニューロンを分化誘導する。(2)SMAD二重阻害でiPS細胞から神経幹細胞を分化誘導し、皮質ニューロンとアストログリアを分化誘導・共培養する。

作成した皮質ニューロン・アストログリアの純度は、各種マーカーの免疫染色で確認した。患者・健常きょうだいの遺伝子発現プロファイル、マイクロアレイ(iPS細胞)およびRNA-Seq(神経幹細胞、アストログリア)で解析した。細胞死の感受性を定量するため、MG132(プロテオソーム阻害剤)を作用させた。皮質ニューロンの電気生理と超微細形態は、それぞれパッチクランプ法と透過性電子顕微鏡によって観察した。

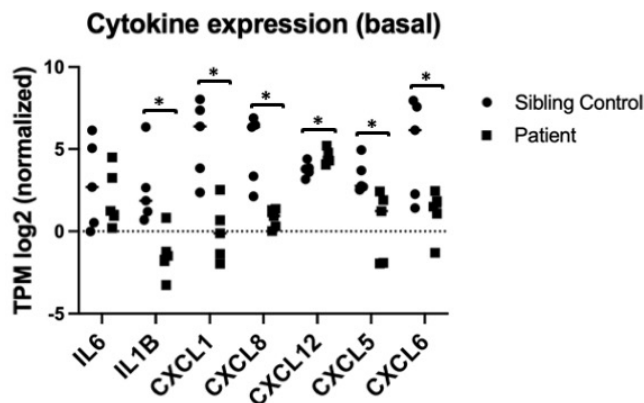
2症例の患者iPS細胞に、同一のIRF2BP点突然変異(c.519C>G)が確認されている。変異型IRF2BPL遺伝子はチロシン残基がストップコドンに置換されるため、C末端領域を大きく欠損したタンパク質が合成されると予想される。ところがウェスタンブロッティングに使用できるIRF2BPL抗体は、C末端を認識するものしか市販されていない。このような技術的限界から、患者iPS細胞における正常型/変異型IRF2BPLタンパク質の量比を測定することができなかった。この問題を解決するために、IRF2BPLの全長領域をカバーするペプチド断片を質量分析で絶対定量した。

野生型および変異型のIRF2BPLタンパク質と結合する因子を探索するため、N末端にアフィニティタグを融合したプラスミドベクターを作成した。これを神経芽腫細胞株、髄芽腫細胞株および膠芽腫細胞株で強制発現させ、IRF2BPLタンパク質を安定して合成する発現株を樹立した。アフィニティタグで精製したIRF2BPLタンパク質複合体を、質量分析で同定した。

4. 研究成果

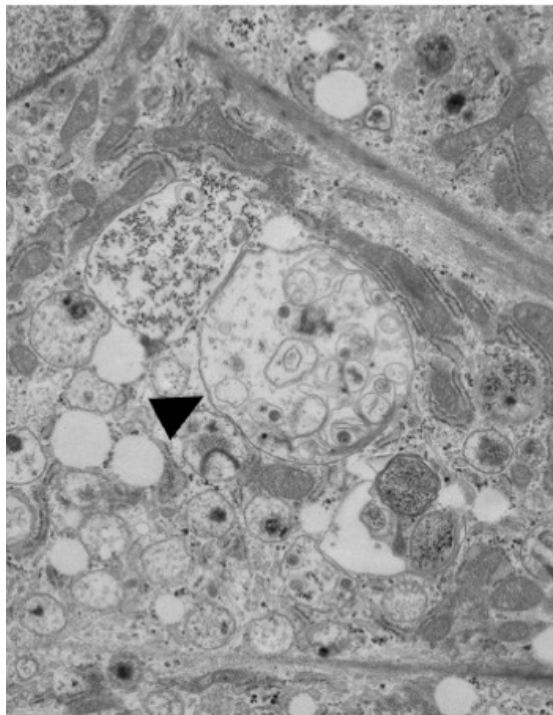
はじめにNGN2強制発現系で、患者由来ニューロンの細胞死感受性を調べた。しかしながら選択的オートファジー制御因子p62の合成およびアポトーシスメディエーターCaspase-3の切断には、患者/健常間に差が見られなかった。

その後の報告で、NEDAMSSの表現型はアストログリアを介している可能性が示唆された(Sinha Ray et al., Cell Rep., 2022)。NGN2強制発現系は比較的純度の高い皮質ニューロンから構成されるため、アストログリアの病態への影響がマスクされている可能性を疑った。iPS細胞からSMAD二重阻害で分化誘導した神経幹細胞でRNA-Seq解析を実施したところ、患者/健常の比較で顕著な差は見られなかった。ところが同じ実験をアストログリアで実施すると、患者vs健常の比較で複数の炎症性サイトカインの発現低下が観察された。

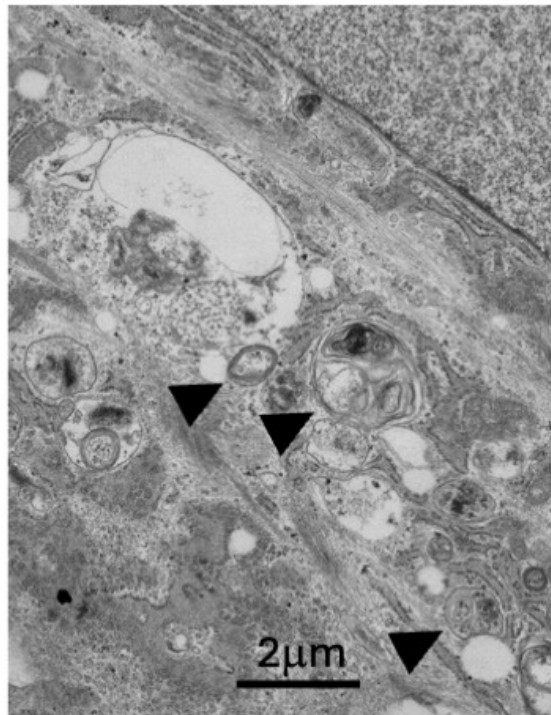


そこで神経幹細胞から自発的に分化した皮質ニューロン・アストログリアの共培養を、電子顕微鏡・電気生理解析に用いた。電子顕微鏡解析で患者・健常細胞ともに、ミエリンを貪食するアストログリアの存在が示唆された。また患者由来のニューロンで、多数のオートファジー様小体が観察された。オートファジー様小体は、multivesicular body や lamellar body から、自己消化が進行して空胞に変化したものまで、様々な形態をしていた。同期間培養した健常ニューロンではこのような像は観察されず、患者ニューロンが脂質代謝の異常を起こし、神経変性の途上にあることが示唆された。

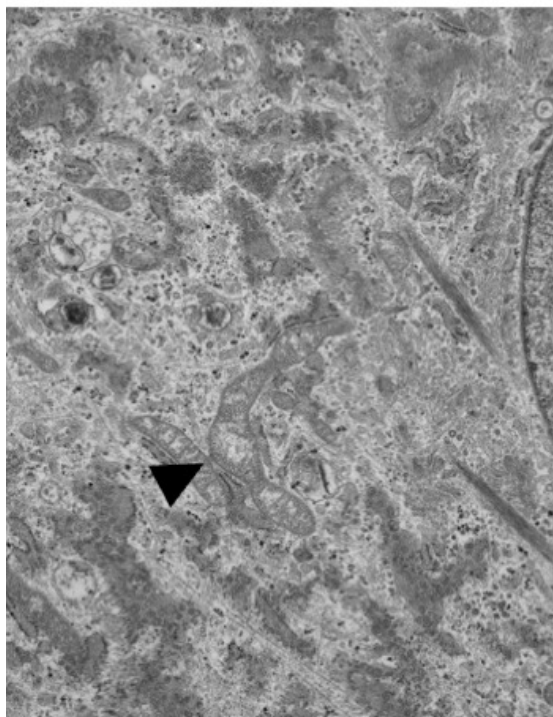
multivesicular body



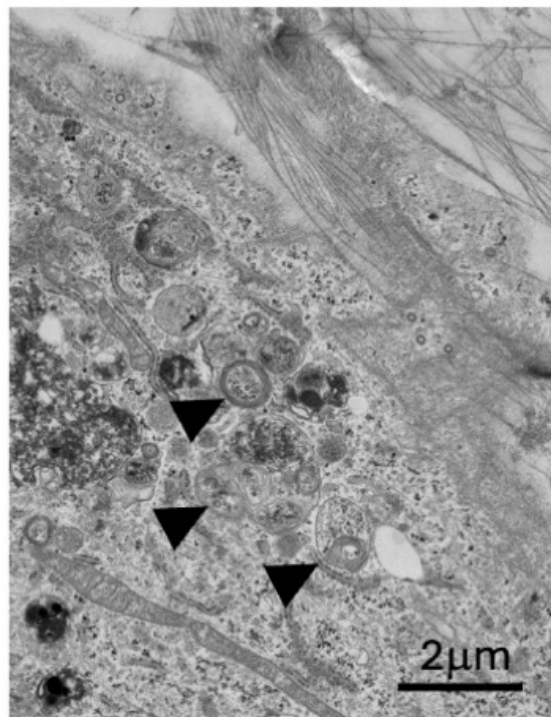
lamellar body



swollen mitochondria



lamellar body



パッチクランプを用いた電気生理解析では、神経幹細胞から皮質ニューロンの分化・成熟に伴い、ナトリウム電流の波形に変化が見られた。具体的にはピークとなるスパイクが、一つから複数見られる方向に変化した。成熟度とスパイクパターンの相関を調べると、患者の方が健常ニューロンよりも成熟が早い傾向があった。

次に患者細胞における野生型・変異型 IRF2BPL タンパク質の細胞内局在定量を試みた。全長 IRF2BPL をカバーする 10 種類のペプチドを合成し、安定同位体標識によって内部標準試料を作成した。このうち N 末端の 6 種類は正常型・変異型タンパク質の両方を検出するが、C 末端の 4 種類は正常型タンパク質しか検出しない（ミスセンス変異で全長の 1/5 の長さしか合成されないため）。ところが iPS 細胞から調整したペプチドを計測すると、C 末端の 4 種類が検出感度以下であった。現在これらのペプチドが患者／健常細胞で定量レンジに乗るように、測定条件のトラブルシュートを実施している。

最後に野生型 IRF2BPL および変異型 IRF2BPL 安定発現細胞株を用いて、タンパク質複合体の精製を試みた。アフィニティタグで共沈降したタンパク質複合体の中に、IRF2BP ドメインを共有するファミリータンパク質、IRF2BP1、IRF2BP2 の結合を確認した。同様に変異型 IRF2BPL をアフィニティタグで精製したところ、内因性の IRF2BPL が共沈降していた。アフィニティ樹脂に結合しない内因性 IRF2BPL も大量に誘導されていたことから、変異型 IRF2BPL は内因性 IRF2BPL の遺伝子発現を誘導することが示唆された。以上の結果から、変異型 IRF2BPL はそれ自身が内因性 IRF2BPL タンパク質を発現誘導し、互いに結合することが明らかとなった。また野生型 IRF2BPL タンパク質はファミリーである IRF2BP1、IRF2BP2 と結合していることから、このタンパク質は IRF2BP ドメインを介して、ファミリータンパク質同士で協働することが示唆された。また野生型・変異型 IRF2BPL の結合タンパク質として、糖代謝酵素である PKM を同定した。これらのタンパク質複合体が病態に及ぼす意義が、今後の課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ken-ichi INOUE
2. 発表標題 Differentiation of NEDAMSS derived iPS cells to neural stem cells and astrocytes.
3. 学会等名 IRF2BPL consortium research meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中館 和彦 (Nakadate Kazuhiko) (80372895)	明治薬科大学・薬学部・教授 (32684)	
研究分担者	山内 忍 (Yamauchi Shinobu) (70433589)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究分担者	相馬 良一 (Sohma Ryo-ichi) (20868054)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

米国	University of California San Diego	Baylor College of Medicine	The university of Alabama at Birmingham	
カナダ	Max Rady College of Medicine			