

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893162

研究課題名(和文)ペルオキシソーム酵素の新規変異によるミトコンドリア異常を介した神経細胞死の機構

研究課題名(英文)The mechanism of neuronal cell death induced by a new mutation of peroxisomal enzyme via the mitochondrial dysfunction

研究代表者

松田 由喜子(Matsuda, Yukiko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・研究員

研究者番号：10735301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソーム解析により新規に同定したSCD原因遺伝子HSD17B4の病態発症機序を明らかにするため、患者由来線維芽細胞を用いて解析した。HSD17B4はDBPをコードし、DBPが機能するためには蛋白質分解酵素により切断された断片が必要である。患者線維芽細胞ではその蛋白質断片が減少していた。DBPの基質であるVLCFAの患者血清中の蓄積は見られず、細胞内における脂質の蓄積も観察されなかった。神経細胞におけるさらなるDBPの変異検討を行うために、同患者由来線維芽細胞を用いてiPS細胞を樹立した。

研究成果の概要(英文)：A novel causative gene of SCD, HSD17B4, whose mutation was newly identified by exome analysis of SCD patients, was analyzed using patient-derived fibroblasts. HSD17B4 encodes the DBP enzyme, which requires proteolysis and multimerization to be functional. The mutation decreased the proteolytically processed fragment of DBP in the patient fibroblasts. The amount of VLCFA, a DBP substrate, in serum did not show significant change, and the accumulation of intracellular lipids was not detected. We generated iPSCs from the patient-derived fibroblasts. We will further analyze SCD pathogenesis using neuronally differentiated iPSCs.

研究分野：神経科学

キーワード：ペルオキシソーム 脊髄小脳変性症 脂肪酸代謝

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室では、これまで SCD の臨床遺伝学的研究を行ってきており、2000 名以上の SCD 患者検体を持つ。家族性 SCD の新規原因遺伝子を同定することを目的として、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析により、SCD の原因遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、2つの家系に共通して、ペルオキシソーム蛋白質をコードする *HSD17B4* が、常染色体劣性遺伝性 SCD の新規原因遺伝子として見つかった。

HSD17B4 の遺伝子産物はペルオキシソーム酸化酵素 DBP 蛋白質であり、ミトコンドリアで代謝できない極長鎖脂肪酸 (VLCFA) などを酸化する。酵素活性が欠失すると、血中の VLCFA が蓄積する。

HSD17B4 は、他の神経変性疾患 (ペロー症候群、DBP 欠損症) において原因遺伝子として報告されているが、*HSD17B4* 変異による神経細胞障害の詳細なメカニズムは明らかにされていない。各々の疾患において、変異部位、症状、DBP の酸化酵素活性における影響が異なる。最も重篤な症状をきたす DBP 欠損症では酵素活性が消失し VLCFA の蓄積を引き起こすが、ペロー症候群や SCD においては VLCFA の蓄積が見られない。DBP の組織特異的ノックアウト (KO) マウスを用いた研究で、オリゴデンドロサイト特異的または神経細胞特異的に DBP を KO すると、両者において VLCFA の上昇が見られたが、オリゴデンドロサイト特異的 KO マウスでは神経細胞死が起こらなかった。VLCFA の蓄積だけでは神経細胞死を説明できない。

表現型の強い DBP 欠損症では酵素活性が消失するが、本研究課題である *HSD17B4* の変異は、酵素活性の低下が通常の条件では検出できない程、軽度の表現型である可能性が高い。しかし、中年以後に小脳神経細胞死が起きるといった慢性進行性の経過をたどる神経変性症のモデル細胞として適切であり、今まで見つけられなかったペルオキシソーム酵素の病態機序を明らかにできるのではないかと考えた。

また一方、VLCFA に差が見られない点で共通するペロー症候群において、現在までに報告されている他の原因遺伝子がすべてミトコンドリアで働く分子であった。申請者らも、新たにペロー症候群の原因遺伝子を同定したが、ミトコンドリアで働くヘリケース分子であった。

以上の背景から、*HSD17B4* 変異が、ミトコンドリア機能と関連して SCD における神経細胞変性死を引き起こしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは、エクソーム解析から劣性の脊髄小脳変性症 (SCD) において、ペルオキシソ

ーム酸化酵素 (DBP) をコードする遺伝子 (*HSD17B4*) を新規原因遺伝子として同定した。*HSD17B4* 変異がどのような分子機構で SCD を引き起こすのか、明らかにすることが本研究の目的である。

DBP 欠損症では、極長鎖脂肪酸 (VLCFA) の蓄積がスクリーニングに用いられ、酵素活性の欠失の指標としているが、本家系では VLCFA の蓄積は認められなかった。また、患者由来線維芽細胞を用いた予備実験から、ミトコンドリア形態異常を示唆する所見が得られていた。本研究は、ペルオキシソーム機能不全がミトコンドリアなどと関連しながら、最終的に神経細胞変性死に至る新たな SCD 発症経路を明らかにし、治療法の開発に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 患者由来と健常者由来の線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア機能不全が起こっているか調べるために、刺激なしの状態でのミトコンドリアの形態やミトコンドリア DNA のコピー数、グルコース枯渇刺激や酸化によるエネルギー獲得阻害剤 (CCCP) 投与によるミトコンドリアの形態変化に違いがないか検討した。

(2) 患者由来線維芽細胞において、*HSD17B4* 変異がコードする蛋白質 DBP 分子の発現分布や酵素活性に変化が起こっているか、*HSD17B4* 特異的に認識する N 末抗体および C 末抗体を用いて免疫染色や蛋白質電気泳動を行い検討した。

(3) *HSD17B4* の働きの一つである脂質代謝に関しては Oil Red O 染色により脂質量や分布を観察した。

(4) SCD の主症状である小脳プルキンエ細胞の神経変性死を観察するため、患者由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を試みた。4種の初期化因子を含む3種の発現用エキソマルベクター (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) をエレクトロポレーションにより患者由来線維芽細胞に導入した。

4. 研究成果

(1) 患者由来線維芽細胞におけるミトコンドリア機能の検討

2例の患者由来線維芽細胞と健常者由来線維芽細胞を用いて、何も刺激しない状態でのミトコンドリアの形態とミトコンドリア DNA のコピー数に違いがないか確認した。ミトコンドリア遺伝子上にコードされている Cytochrome C と染色体遺伝子上にコードされている APP を指標にして、遺伝子の定量 PCR を行ったが、ミトコンドリア DNA のコピー数に有意な差は見られなかった。また、Cytochrome C 抗体および TOM20 抗体で免疫染色を行ったが、違いは見られなかった。予備

実験でミトコンドリアを Mito Tracker を用いて染色した際、患者由来線維芽細胞においてミトコンドリアのフラグメンテーションの像が見られたが、定量による詳細な解析が必要である。酸化によるエネルギー獲得阻害剤 (CCCP) 投与によるミトコンドリアの形態変化においては差を見いだせなかった。グルコース枯渇刺激による形態変化に関しては、さらなる検討が必要である。

(2)患者由来線維芽細胞における *HSD17B4* 遺伝子発現に関する検討

原因遺伝子である *HSD17B4* 遺伝子の変異により、*HSD17B4* 遺伝子がコードする DBP 蛋白質の細胞内発現分布を患者線維芽細胞を用いて検討した。DBP 分子はペルオキシソーム内に取り込まれた後、ダイマーを形成し、2つのフラグメント(サブユニットとサブユニット)に蛋白質切断を受ける。*HSD17B4* 変異は N 末フラグメント(サブユニット)に存在する。N 末フラグメント、C 末フラグメント各々に対する特異的抗体を用いて、細胞染色により各々の細胞内局在を解析した。細胞内の分布においては健常者由来線維芽細胞と違いが認められなかった。同抗体を用いて生化学的な解析を行ったところ、患者由来線維芽細胞において DBP 分子の蛋白質切断量における低下が検出された。*HSD17B4* 変異によりペルオキシソーム内の機能的な DBP 分子の発現量が部分的に低下している可能性が示唆された。

(3)*HSD17B4* 変異における脂質代謝における変化

患者由来線維芽細胞における脂質量を調べるため、Oil Red O 染色を行ったが、健常者由来線維芽細胞と差を見出だせなかった。

(4)患者由来線維芽細胞を用いた iPS 細胞の樹立

神経細胞における変異 DBP 分子の作用機序を明らかにするため、*HSD17B4* 変異を持つ患者由来線維芽細胞を用いて iPS の作製を試みた。結果、多能性マーカーであるアルカリホスファターゼ陽性かつ多能性状態で特異的に発現する胚抗原(Oct3/4, SSEA4)陽性の複数の iPS 株を作製することに成功した。SCD の主症状が小脳プルキンエ細胞の神経細胞死であることから、現在、作製した患者線維芽細胞由来 iPS 細胞を用いて小脳プルキンエ細胞に分化誘導させている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1 .Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, Miyamoto R, Ohsawa R, Ohtake T, Ohtobe R, Watanabe M, Maruyama H, Hashimoto K, Kawakami H. A mutation in the low voltage-gated calcium channel *CACNA1G*

alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol Brain*. (査読有) 2015 Dec 29;8:89. doi: 10.1186/s13041-015-0180-4.

2. Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, Walsh T, Ohsawa R, Newby M, Hiraki-Kamon K, Kuramochi M, Lee MK, Kleivit RE, Martin A, Maruyama H, King MC, Kawakami H. Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology*. (査読有) 2014 Nov 25;83(22):2054-61.

doi: 10.1212/WNL.0000000000001036.

[学会発表](計6件)

1. 松田由喜子「Perrault 症候群の原因遺伝子 *C10orf2* の変異による mtDNA 維持機構の障害。」第 161 回原医研セミナー・広島, 2014 年 12 月 18 日

2. 森野豊之, 松田由喜子, Sarah B Pierce, 平木啓子, 丸山博文, Mary-Claire King, 川上秀史「Perrault 症候群の原因遺伝子 *C10orf2* の変異による mtDNA 維持機構の障害。」日本人類遺伝学会第 59 回大会・東京, 2014 年 11 月 20 日

3. Hiroyuki Morino, Yukiko Matsuda, Ryosuke Ohsawa, Keiko Hiraki, Takashi Kurashige, Yuishin Izumi, Yu Yamazaki, Tetsuya Takahashi, Akihiko Takashima, Yoshiyuki Soeda, Tomohiro Miyasaka, Makoto Higuchi, Naruhiko Sahara, Tetsuya Suhara, Hitoshi Shimada, Hirofumi Maruyama, Hideo Ito, Hideshi Kawakami 「A novel insertion mutation of *MAPT* causes FTDP-17 with distinct pathology。」ASHG 64th Annual Meeting. San Diego, USA, 2014 年 10 月 20 日

4. 川上秀史, 森野豊之, 松田由喜子, 大澤亮介, 平木啓子, 倉重毅志, 和泉唯信, 山崎雄, 高橋哲也, 高島明彦, 添田義行, 宮坂知宏, 樋口真人, 佐原成彦, 須原哲也, 島田 斉, 伊東秀文, 丸山博文「FTDP-17 の原因遺伝子 *MAPT* の新規挿入変異の同定と生化学的解析。」第 57 回日本神経化学学会大会・奈良, 2014 年 9 月 30 日

5. 森野豊之, 松田由喜子, 平木啓子, 倉重毅志, 和泉唯信, 山崎 雄, 高橋哲也, 丸山博文, 伊東秀文, 川上秀史「FTDP-17 の原因となる *MAPT* の新規挿入変異の同定。」第 37 回日本神経科学学会学術大会・神奈川, 2014 年 9 月 11 日

6. 川上秀史, 森野豊之, 松田由喜子, 平木啓子, 大澤亮介「ミトコンドリア DNA の維持機構に関する Perrault 症候群の新規原因遺伝子の同定。」第 10 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス(報告書 p51-54)。長崎, 2014 年 5 月 31 日

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

松田 由喜子 (Matsuda Yukiko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・研究員

研究者番号：10735301