

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

PPT1 遺伝子変異による若年型神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明

分担研究者：高村 歩美（財）脳神経疾患研究所先端医療研究センター 主任研究員）

研究要旨

神経セロイドリポフスチン症の1つである CLN1 は、ライソゾーム酵素 Palmitoyl Protein Thioesterase1 (PPT1) 遺伝子欠損により発症し、進行性の視力障害、てんかん、運動退行、知的障害を伴う常染色体劣性遺伝病である。発症機構や臨床症状と遺伝子変異との関連性は明らかになっていない。そこで本研究は、CLN1 と診断された日本人 2 例の皮膚繊維芽細胞を用いた病態解析を目的とした。変異型 PPT1 の細胞内局在の変化や、オートファジーやミトコンドリア機能異常による細胞障害が明らかとなり、今後の更なる詳細な病態解析と、これらの病態を標的とする新しい治療法に関する研究が必要であると考えられた。

研究協力者

大樂武則（財）脳神経疾患研究所 研究員

藤崎美和（財）脳神経疾患研究所 嘱託研究員

A．研究目的

ライソゾーム病である神経セロイドリポフスチン症（CLN）は、進行性の視力障害、てんかん、運動退行、知的障害を呈する疾患群である。原因遺伝子CLN1-8,10-14が同定されており、神経細胞変性と細胞内リポフスチン蓄積が共通所見であるが同じ遺伝子型でも発症年齢により異なる臨床経過を示す場合もあり、各遺伝子型による発症機構の解明は困難である。根本的治療法はなく病態解明が期待されている。

PPT1遺伝子変異により発症した若年型CLN1、日本人2例について分子生物学的手法による病態解析を行い、PPT1遺伝子変異が引き起こす直接的な細胞障害のメカニズム解明を目的とした。

B．研究方法

若年型CLN1の確定診断は、乾燥濾紙血並びに白血球中のPPT1活性測定とPPT1遺伝子変異解

析により実施した。患者の皮膚繊維芽細胞の変異型PPT1のプロセッシングや細胞内局在の変化を検討した。

また、PPT1の生理学的機能の観点から、PPT1欠損による細胞障害メカニズムについてPPT1関連タンパク質や種々の細胞内現象を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、（財）脳神経疾患研究所の倫理委員会の承認を得て実施した。対象者の血液、皮膚繊維芽細胞は、文書を用いた説明の後、署名による同意を得た。

C．研究結果

1. CLN1 患者の確定診断

日本人患者 2 例の乾燥濾紙血並びに、白血球の PPT1 活性は顕著に低下しており、新規 1 か所を含む遺伝子変異が 2 か所同定され確定診断に至った。

2. 変異型 CLN1 の細胞内発現と局在変化

本症例の変異型 PPT1 は、発現しているものの

異所性の局在を示した(図1)。また、これらの変異型 PPT1 は Triton X-100 不溶性分画に増加していた。

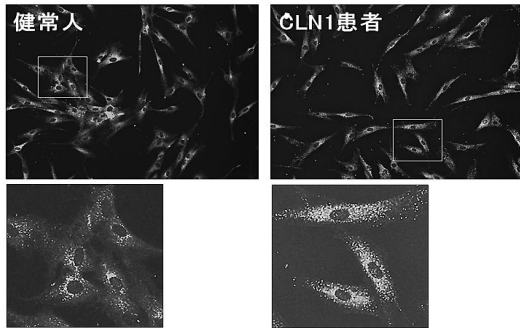


図1 変異型PPT1の細胞内局在

3. CLN1 細胞における脂質ラフトを介したエンドサイトーシスの亢進

変異型 PPT1 は、主に脂質ラフト(Triton X-100 不溶性分画)に集積していたことから、脂質ラフトを介したエンドサイトーシスのプローブである蛍光標識 cholera toxin b subunit(CTB)の取込み実験を行った。患者細胞では細胞膜や細胞内に取り込まれる CTB 量が増加しており、エンドサイトーシスの亢進が示された(図2)。

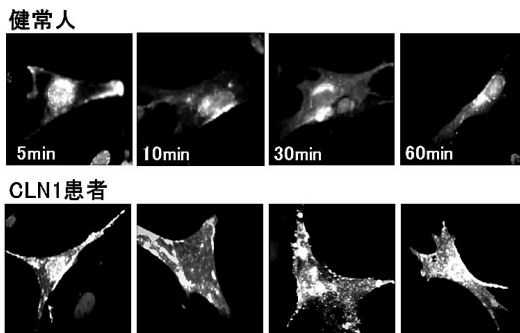


図2 エンドサイトーシス(CTBの取込み)の亢進

4. オートファジーの異常

患者細胞では、飢餓条件下におけるオートファゴソームのマーカーである LC3 の発現が上昇していた。興味深いことに、通常培養条件下において、すでに細胞質型である LC3 の発現量が顕著に増加しており、適切なタイミングでオートファジーが誘導されていない事が示された。

5. ミトコンドリアの機能障害

ミトコンドリア膜電位の蛍光プローブである JC-1 を用いて患者細胞を観察した結果、膜電位の消失が見られた。PPT1 遺伝子変異による細胞障害の下流には、ミトコンドリア機能異常が関与していることが示された。

D . 考察

PPT1 の生理的機能は、脱パルミトイル化酵素であり、パルミトイル化により細胞膜に繋ぎ止められている種々のタンパク質(受容体、イオンチャネル、細胞接着因子など)を膜から解放する役割を担っている。脂質ラフト分画の変異型 PPT1 の集積により、パルミトイル化を受ける種々のタンパク質の膜から細胞質への過剰な取込みを引き起こし、細胞障害を誘導している事が考えられた。

E . 結論

2 例の PPT1 活性は低下しており、新規 1 か所を含む遺伝子変異が 2 か所同定された。変異型 PPT1 は翻訳後糖鎖修飾を受けるものの、細胞内局在に変化が見られた。特に Triton X-100 不溶性分画への局在が増加しており、細胞膜上の脂質ラフトで働く PPT1 の生理学的機能の異常が示唆された。オートファジーやミトコンドリア機能異常も示された。今後は、変異型 PPT1 が直接作用するパルミトイル化タンパク質の同定をはじめ、CLN1 の新しい治療標的を視野に入れた更なる詳細な病態解析を行う必要がある。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohba C, Osaka H, Takamura A et al: Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. Neurogenetics. 2013 Nov;14(3-4):225-32
- 2) Takamura A, Sakai N, Eto Y et al: The useful preliminary diagnosis of

Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. Mol Genet Metab. 2013 Nov;110(3):401-4.

2. 学会発表

- 1) Takamura A, Fujisaki M, Ida H, Ohashi T, Eto Y. Abnormal Intracellular Membrane Traffic in Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Mutated Cases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, Nov. 2013
- 2) Fujisaki M, Takamura A, Diraku T, Ohashi T, Ida H, Eto Y. Enzymatic screening using dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) in Japanese. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, Nov. 2013
- 3) 高村歩美, 藤崎美和, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝. PPT1 遺伝子変異による若年型神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明. 日本人類遺伝学会 第58回大会. 宮城, 2013.11
- 4) Takamura A, Sakai N, Shinpo M, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y. THE USEFUL PRELIMINARY DIAGNOSIS OF NIEMANN-PICK DISEASE TYPE C BY FILIPIN TEST IN BLOOD SMEAR. The12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM). Spain, Sep. 2013
- 5) Fujisaki M, Takamura A, Diraku T, Ohashi T, Ida H, Eto Y. ENZYMATIC SCREENING IN DRIED BLOOD SPOTS AND GENE

ANALYSIS OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS IVA (MPS IVA) IN JAPANESE. The12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM). Spain, Sep. 2013

- 6) 高村歩美, 酒井規夫, 新竈理子, 山本真也, 成田綾, 大野耕策, 井田博幸, 衛藤義勝. The useful preliminary diagnostic procedure of Niemann-Pick type C - Filipin test in blood smear-. ニーマンピック病C型シンポジウム 東京 - 診断と治療 -. 東京, 2013.4

G . 知的財産権の出願・登録状況
該当なし