

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書
オートファジーとライソゾーム病の関連について

分担研究者：秋山けい子
脳神経疾患研究所 先端医療研究センター & 遺伝病研究所：研究員

研究要旨

ニーマン・ピック病 C 型 (NPC) は、小脳プルキンエ細胞をはじめとする種々の神経細胞の進行性脱落や反応性グリオシスを臨床像として示すことが報告されている。また、NPC 患者由来線維芽細胞を用いた解析では、NPC 患者におけるオートファジー不全を示唆した。本研究では NPC 患者に由来する iPS 細胞株を用いて、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞におけるオートファジー動態を検証した。

A . 研究目的

ニーマン・ピック病C型 (NPC) 患者に由来するiPS細胞株を用いて、神経病理モデルを確立後、中枢神経系細胞におけるオートファジー不全を検証する。

認めなかった。よって、神経幹細胞ではオートファジー不全が生じていない可能性が示唆された。今後、同細胞を神経細胞へと分化/成熟させることで、成熟神経細胞におけるオートファジー動態を解析する。

B . 研究方法

NPC患者由来iPS細胞を神経幹細胞へと分化させた後、同細胞の生化学的特性を免疫細胞染色法によって評価した。また、オートファジー動態に関わる因子の発現量をWestern blot法によって解析した。

D . 考察

疾患特異的iPS細胞を用いた実験により、NPC患者由来iPS細胞も健常人由来iPS細胞と同等の神経分化能を有することが明らかになった。また、これらの神経幹細胞は、コレステロールや脂肪滴の蓄積などの疾患特異的な表現型を示すことも確認された。しかしながら、NPC患者由来線維芽細胞で認められたオートファジー動態の異常は認められず、病態評価に対する神経細胞への分化/成熟の必要性が示唆された。一方、オートファジーは細胞の生存/増殖とも密接に関係していることから、これらを指標にオートファジー阻害物質に対する感受性の違いを検証することも必要であろう。疾患特異的iPS細胞を用いた病態モデリングを進め、新規治療ターゲットを発見することを今後の課題とする。

C . 研究結果

iPS細胞はPSC Neural Induction Mediumを用いて神経幹細胞へと分化させた。その後AlbuMAX I, Lipid-Rich BSAを含むNeural Expansion Medium中で維持を行なった。同細胞に対するFilipin染色を実施した結果、NPC患者由来細胞におけるコレステロールの蓄積が認められた。また、Lipi-Dye試薬を用いた脂肪滴染色では、NPC患者由来細胞における脂肪滴の蓄積も認められた。これらのコレステロールや脂肪滴は後期エンドソーム/ライソゾーム区画に蓄積するため、抗LAMP1抗体によるライソゾームの増加を検証した結果、NPC患者由来細胞におけるLAMP1陽性ライソゾームの増加が認められた。

同培養条件下におけるオートファジー動態を評価した結果、オートファジー基質であるp62の蓄積や、LC3の活性化 (LC3-IIの増加) は、健常人- NPC患者間で有意な差は

E . 結論

疾患特異的iPS細胞に由来する疾患モデル神経幹細胞の作成は、NPCに特異的な表現型を示すことが明らかになった。よって、同モデルから神経系細胞を作成することで、生検 (バイオプシー) が困難な中枢神経細胞に対する病理解析への進展が期待される。また、オートファジー不全という観点から同疾患に

対する解析アプローチを継続することで、ライソゾーム病における神経脱落機構の解明に貢献していきたい。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hossain MA, Wu C, Yanagisawa H, Miyajima T, Akiyama K., Eto Y. Future clinical and biochemical predictions of Fabry disease in females by methylation studies of the *GLA* gene. *Mol Gent Metab Rep.* 2019 Jul;20:100497.

2. 学会発表

- 1) Development of neuropathological model using Niemann-Pick type C patient-derived iPSCs.; Saito R., Miyajima T., Wu Chen, M. Arif Hossain, Itagaki R., Akiyama K., Iwamoto T., Eto Y., The 140th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan., Kyoto, Mar. 25–28, 2020.
- 2) Development of neuropathological model using Niemann-Pick type C patients derived iPSCs.; Saito R., Miyajima T., Wu Chen, M. Arif Hossain, Itagaki R., Akiyama K., Iwamoto T., Eto Y., *WORLDSymposium* 16th Annual Research Meeting., Orlando, Feb. 10–13, 2020.
- 3) An update on biomarkers of 7-ketocholesterol, lyso-sphingomyelin, bile acid-408 and glucosyl-sphingosine for Niemann-Pick disease type C.; Wu Chen, Iwamoto T. M. Arif Hossain, Akiyama K. Igarashi J., Miyajima T., Saito R., Eto Y., *WORLDSymposium* 16th Annual Research Meeting., Orlando, Feb. 10–13, 2020.
- 4) DNA methylation study of *GLA* gene and its association with autophagy and clinical severity of heterozygous Fabry disease females.; M. Arif Hossain, Wu Chen, Yanagisawa H., Miyajima T., Saito R., Akiyama K., Eto Y., *WORLDSymposium* 16th Annual Research Meeting., Orlando, Feb. 10–13, 2020.
- 5) DNA methylation study of *GLA* gene and its association with autophagy and clinical severity of heterozygous Fabry females.; M. Arif Hossain, Wu Chen, Yanagisawa H., Miyajima T., Saito R., Akiyama K., Eto Y., The 64st Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics., Nagasaki, Nov. 6–9, 2019.
- 6) Development of neuropathological analysis model using iPSC-derived neural cells from

Niemann-Pick type C patients.; Saito R., Miyajima T., Wu Chen, M. Arif Hossain, Itagaki R., Akiyama K., Iwamoto T., Eto Y., The 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases., Akita, Oct. 24–26, 2019.

- 7) Combination of lysosphingomyelin, 7-ketocholesterol and bile acid W-408 for diagnosis of Niemann Pick disease type C by MS/MS.; Wu Chen, Iwamoto T. Akiyama K. Miyajima T., Igarashi J., M. Arif Hossain, Saito R., Eto Y., The 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases., Akita, Oct. 24–26, 2019.
- 8) Future clinical and biochemical predictions of Fabry disease in females by methylation studies of the *GLA* gene.; M. Arif Hossain, Wu Chen, Yanagisawa H., Miyajima T., Akiyama K., Saito R., Eto Y., The 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases., Akita, Oct. 24–26, 2019.
- 9) 神経セロイドリポフスチン症 1・2 型; PPT1 および TPP1 の酵素特性と金属イオンによって及ぼされる影響の検討; Itagaki R., Endo M., M. Arif Hossain, Akiyama K., Miyajima T., Wu Chen, Iwamoto T., Saito R., Igarashi J., Eto Y., The 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases., Akita, Oct. 24–26, 2019.

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし