

## 論文の内容の要旨

### 1 申請者

防衛医科大学校 中村 康子

### 2 論文題目

Chédiak-Higashi 症候群における神経障害の病態解析

### 3 目的

Chédiak-Higashi 症候群の神経障害の病態を *LYST* 遺伝子解析、臨床データ収集および患者由来の線維芽細胞や iPS 細胞を用いた解析により明らかにする。

### 4 対象並びに方法

患児および両親の gDNA を用いて、*LYST* 遺伝子のターゲットシーケンスを行い、1 例の *LYST* 遺伝子変異部位を同定し、*LYST* 蛋白の発現について解析した。

Chédiak-Higashi 症候群の患者から採取した線維芽細胞を用いて、巨大顆粒の有無やリソソームの形態について評価した。また、リソソーム機能について解析した。

Chédiak-Higashi 症候群の皮膚由来線維芽細胞から疾患 iPS 細胞を樹立し、神経細胞へ分化誘導し、巨大顆粒の有無やリソソームの異常の有無を評価した。オートファゴソーム、オートリソソームやミトコンドリアなどの細胞小器官の形態について評価した。

### 5 成績

Chédiak-Higashi 症候群の患児の遺伝子変異が、*LYST* 遺伝子のスプライスサイト変異 (NM\_000081.2 : c. 3393+1 G> T) であることを同定した。患者由来の線維芽細胞での *LYST* 蛋白発現は、31.3%と低下していた。同様にして、多施設の 5 名の Chédiak-Higashi 症候群患者の臨床データを収集し、解析した。全 6 症例のうち、幼児以外の 5 症例で神経障害を認め、造血幹細胞移植後も神経障害は改善せず、神経障害が大きな問題であることが分かった。

患者由来の線維芽細胞では、リソソームの肥大化を認めた。電子顕微鏡標本では、患者由来の線維芽細胞のリソソームに、最大約 1  $\mu$ m の黒色顆粒を認め、オートファゴソーム内にも黒色顆粒を認めた。栄養飢餓を誘導していない基底状態において、正常由来線維芽細胞に比べて、患者由来線維芽細胞のオートファゴソームやオートリソソームの蛍光輝度は、亢進していた。細胞膜の損傷によるリソソームのカルシウム依存性エキソサイトーシスの解析では、患者由来線維芽細胞は、正常由来線維芽細胞と比べて、細胞膜の修復が低下していた。

患者の iPS 細胞由来のコリン作動性神経細胞、GABA 作動性神経細胞、ドーパミン作動性神経細胞の免疫染色では、リソソーム膜関連蛋白である LAMP2 の発現の輝度亢進および核周囲への局在化を認めた。PAS 染色では、PAS 染色陽性の巨大顆粒、およびリポフスチ

ン様の顆粒を認めた。電子顕微鏡では、内部に黒色顆粒やフィラメント様の構造物を含む直径約  $1\mu\text{m}$  の巨大リソソームを認めた。ミトコンドリアは一部に多形性と肥大を認めた。また、リソソームおよびミトコンドリアは、核周囲に局在化していた。

基底状態において、iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞のオートファゴソームやオートリソソームの蛍光輝度は亢進していた。

## 6 考 察

LYST 蛋白は、細胞質に広く発現し、リソソームの大きさや輸送の調節に関わるとされる。また、リソソームは、エンドサイトーシスやオートファジーにより取り込んだ成分を分解する以外に、細胞質のカルシウムイオン濃度に依存したエキソサイトーシスにより、細胞膜損傷後の修復を行う。

Chédiak-Higashi 症候群の線維芽細胞で、カルシウム存在下での細胞膜損傷後の修復が低下していたことから、リソソームのカルシウム依存性エキソサイトーシスに障害があることが示された。

Chédiak-Higashi 症候群の iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞では、リソソームの肥大化以外にも、オートファゴソーム、オートリソソームおよびミトコンドリアの形態、リソソームおよびミトコンドリアの局在化の異常が認められ、LYST 蛋白の機能低下との関連が示唆された。

## 7 結 論

Chédiak-Higashi 症候群の患者 6 症例の臨床像の解析を行い、全例に *LYST* 遺伝子変異を認めた。また、神経障害は、評価可能な 5 例に認めた。

Chédiak-Higashi 症候群の線維芽細胞では、細胞膜損傷後の修復過程における、リソソームのカルシウム依存性エキソサイトーシスが障害されていた。

Chédiak-Higashi 症候群の iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞では、リソソームの肥大化、オートファゴソーム、オートリソソームの膜または数の増加、ミトコンドリアの形態異常、リソソームおよびミトコンドリアの核周囲への局在化を認めた。

Chédiak-Higashi 症候群における神経障害は、リソソーム機能の低下などの細胞小器官の異常によるものと考えられた。