

Chédiak-Higashi 症候群における
神経障害の病態解析

なか むら やす こ
中 村 康 子
(成長発達臨床医学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

目次

第1章 緒言	1~2 頁
第2章 国内における Chédiak-Higashi 症候群患者データの収集と解析	3~6 頁
第3章 Chédiak-Higashi 症候群患者由来線維芽細胞を用いたオートファゴソーム、オートリソソームおよびリソソームの形態異常と機能異常	7~12 頁
第4章 Chédiak-Higashi 症候群患者由来の iPS 細胞を用いた神経細胞への分化誘導	13~18 頁
第5章 考察	19~21 頁
第6章 結論	22 頁
謝辞	23 頁
単語・略語説明	24~25 頁
引用文献	26~28 頁
図表	29~48 頁

第1章 緒言

Chédiak-Higashi 症候群(CHS)は原発性免疫不全症であり、1952年にChédiakにより、白血球に巨大顆粒を認める疾患として初めて報告された(1)。また、1954年にHigashiにより、これらの巨大顆粒はペルオキシダーゼ染色で陽性であることが報告された(2)。巨大顆粒は、肥大化したリソソームである(3)(4)。

遺伝形式は、常染色体劣性遺伝形式をとり、世界で500例未満、本邦では15例と報告されている(5)(6)。臨床的には、易感染症、部分白子症、出血傾向、進行性の神経障害を認め、約85%を占める小児型では、accelerated phase とよばれる発熱、脾腫、骨髄抑制などを伴う血球貪食症候群(Hemophagocytic lymphohistiocytosis; HLH)を小児期早期に発症し、骨髄移植をしなければ致死性である。一方、約10-15%を占める思春期・成人型では、小児期早期にHLHは発症しないものの、進行性の神経障害を発症する(7)。

CHSは、神経変性疾患の一つとする報告もある(8)。神経症状としては、認知機能障害、小脳失調、パーキンソニズム、末梢神経障害、学習障害、注意欠陥多動性障害などを若年発症する(9)(10)。小児型のCHSで、小児期から学習障害を呈し、後に頭部MRI(magnetic resonance imaging)で進行性のびまん性白質病変を認め、神経症状が増悪した報告がある(7)(11)(12)。一方、学童期や成人期型では、加齢に伴い神経障害が進行する症例も報告されている(13)(14)(15)。また、骨髄移植後も神経障害が残存することが知られている(16)(17)。しかし、CHSの神経障害についての病態は不明な点が多く、大きな問題である。

原因遺伝子は、1q42.3(MIM#214500)に存在する*CHS1/LYST*(lysosomal trafficking regulator)である。多くの症例では、ナンセンス変異またはヌル変異であり、CHS1/LYST蛋白の欠陥を引き起こす(7)。CHS1/LYST蛋白は、細胞質に広く発現している。詳細な蛋白の機能はわかっていないが、CHSでは、巨大なリソソームが認められることから、CHS1/LYST蛋白は、リソソームの大きさや細胞内輸送の調節に関わっていると考えられている(18)。

リソソームは、一重膜からなる内腔が酸性の細胞小器官で、約50個の加水分解酵素を含み、エンドサイトーシスやオートファジーにより、とりこんだ成分を分解する(19)。また、細胞質のカルシウムイオンの濃度上昇に応答したエキソサイトーシスにより、内容物を放出する役割も持ち、これは、細胞膜上の損傷を修復する際に重要である(20)(21)(22)。

我々は16歳時に初めてCHSと診断された症例を経験した。乳幼児期にHLHを発症しておらず、思春期・成人型と診断したが、Epstein-Barr virus(EBV)の持続感染があり、軽度知的障害や多発神経炎を認めた。また、国内の他施設の症

例 5 例の臨床データを収集し解析した。

本研究の目的は、CHS の神経障害が生じる病態を明らかにすることである。そして、CHS をモデルとして、他の神経変性疾患の病態解明につなげていくことを目的とする。

CHS の患者の臨床データの解析、CHS 患者の皮膚より採取した線維芽細胞を用いた、オートファゴソーム、オートリソソームおよびリソソームの解析、CHS 患者の線維芽細胞または末梢血単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear cells ; PBMC)から疾患 iPS 細胞を樹立し、神経細胞へ分化誘導し、健常者由来 iPS 細胞と比較検討することで、病態解明を進めることとした。

なお、本研究はヒト検体を用いるため、防衛医科大学校倫理委員会の承認(受付番号 1275 「先天性免疫不全症の遺伝子解析研究同意患者を対象にしたヒト iPS 細胞を用いた病態解明」)(受付番号 1204 「疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬・疾患研究」)を得て iPS 細胞樹立、及び機能解析を実施した。

検体採取に際しては、対象者の保護者に研究内容を文書と口頭により説明し、署名同意を得た。また、共同研究施設である京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)との共同研究契約「ヒト患者 iPS 細胞を用いた先天性免疫不全症の病態解明」に基づき、疾患 iPS 細胞を CiRA より供与された。

第2章 国内における CHS 患者データの収集と解析

第1節 背景

我々は、上口唇の腫脹を機に、易感染性を疑われ、好中球減少および、血液像で好中球、好酸球、リンパ球に巨大顆粒を認め、CHS を疑われた 16 歳女兒を経験した。診断を行うため、*LYST* 遺伝子解析を行うこととした。

また、我々の症例では、EBV に持続感染しているにも関わらず、HLH を未発症であった。神経症状は、軽度知的障害や多発神経炎を認めた。早期に HLH を発症する小児型の CHS では、細胞傷害性 T 細胞(Cytotoxic T cell ; CTL)活性が有意に低下しており、HLH を発症していない思春期型や成人型の CHS では、正常下限であったという報告がある(23)。*LYST* 蛋白の機能は、リソソーム関連の細胞小器官の大きさや分裂、分泌にかかわると考えられているが、詳細な機能は解明されていない(24)。

そこで、我々の症例(以下、Pt1 と記載する。)の *LYST* 変異と *LYST* 蛋白発現を解析し、他施設の CHS 患者のデータを収集し解析することとした。

第2節 対象および方法

(1) 対象

Pt1 と両親の末梢血より抽出した genomic DNA(以下、gDNA)および RNA を解析した。*LYST* 遺伝子解析に関する同意を取得した。

(2) *LYST* 遺伝子のサンガーシーケンス

抽出した gDNA を、*LYST* 遺伝子のエクソンおよびエクソン・イントロン境界領域を含む部分を Polymerase Chain Reaction(PCR)法により増幅した。

PCR 反応物をシーケンス反応液として調整し、Dye Terminator 法により増幅反応を行った。シーケンス反応物を精製した後に、Genetic Analyzer で遺伝子配列を決定した。

(3) *LYST* 遺伝子の Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法

抽出した RNA を、SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen, Waltham, MA)を使用して、cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、RT-PCR 法によりエクソン 6 を含む領域を増幅した。

RT-PCR 反応物をシーケンス反応液として調整し、Dye Terminator 法により増幅反応を行った。シーケンス反応物を精製した後に、Genetic Analyzer で遺伝子配列を決定した。

(4) LYST 蛋白のウェスタンブロッティングによる検出

10cm ディッシュに 70%コンフルエントになるように培養した線維芽細胞に、0.5%TritonX-100、0.5%NP-40 を添加した氷冷 PBS を 100 μ l 加え、細胞をスクレーパーで剥がして回収した。得られた細胞液を、4°Cで 20 分間、15000rpm で遠心し、上清を回収し、使用するまで-80°Cで保存した。得られた蛋白抽出液の濃度は、すべて Qubit フルオロメーター(Invitrogen, Waltham, MA)で測定した。各サンプル 30 μ g を用いて、10%アクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、蛋白をゲルからポリフッ化ビニリデン(polyvinylidene fluoride ; PVDF)膜に転写し、2%スキムミルクでブロッッキングを行い、マウスモノクローナル抗 LYST 抗体(clone 3H1, Abnova, Walnut, CA)とラビットポリクローナル抗 GAPDH 抗体(Abcam, Cambridge, USA)を 2 時間室温で反応させた。反応後洗浄し、化学発光材を使用して、LYST 蛋白を LAS-4000 mini(富士フィルム, 東京)で検出した。得られた LYST 蛋白と GAPDH 蛋白の発現について、その発光度を Multi-Gauge(富士フィルム, 東京)を用いて数値化し、LYST 蛋白の発光度を内因性コントロール蛋白 GAPDH の発光度で除した値で患者および健常コントロールの LYST 蛋白発現の値とし評価した。

(5) 臨床所見

我々の症例 Pt1 以外にも、他施設の小児型 CHS2 例(Pt2、Pt3)および成人型 CHS3 例(Pt4、Pt5、Pt6)について、*LYST* 遺伝子変異、検査所見および臨床所見を患者の主治医および診療記録から情報を得て解析した。

第 3 節 結果

(1) 遺伝子解析結果

Pt1 とその両親の gDNA を用いたサンガーシーケンスにより、*LYST* 遺伝子全 51 エクソンの塩基配列を解析し、NM_000081.2 : c.3393+1G>T 変異を同定した。変異は、Pt1 ではホモ接合体、両親ではヘテロ接合体で見つかった(図 1)。この部位は、エクソン 6 のスプライス供与部位に相当し、イントロン 6 の 5'末端から 1 番目の塩基の変異になり、他に報告のない新規変異であった。また、RT-PCR 法によるエクソン 6 を含む領域の塩基配列の解析では、Pt1 のエクソン 6 が欠失し、フレームシフトからエクソン 7 内でストップコドンになる配列と、別の代替スプライシングの結果、669 塩基のインフレーム欠失をおこすと考えられる配列の両方の結果を得た(図 2)。

(2) LYST 蛋白のウェスタンブロッティングによる検出結果

ウェスタンブロッティングによる、線維芽細胞由来 LYST 蛋白の発現解析で

は、CHS の細胞では、発現は認めるものの、健常者と比較して低下していた。Pt1 の LYST 蛋白バンドのシグナル強度は、健常コントロールの 31.3%であった(図 3)。

(3) 我々の症例の臨床的特徴

我々の症例は、15 歳時に、上口唇の腫脹が出現し、口腔外科にて、粘液嚢胞が感染を起こした腫瘤を認め、レントゲン上、全顎にわたる歯槽骨吸収像が見られ、易感染性を疑われた。臨床症状では、部分的色素脱失と肝腫大、および上下肢の深部腱反射の消失を認めたが、乳児期に HLH の発症や易感染の既往歴はなかった。家族歴では、近親婚は認めなかった。血液検査では、好中球減少、血液像で好中球、好酸球、リンパ球に巨大顆粒を認め、Natural Killer(NK)細胞活性は低下していた。また、EBV 特異抗体は既感染を示していたが、EBV の持続感染を認めた。髄液検査では細胞数は正常だが、蛋白の軽度増加を認めた。WISC-IV(Wechsler Intelligence Scale for Children-Fourth Edition)知能検査では、全検査の知能指数(Intelligence Quotient ; IQ)は 75 と境界領域であった。神経伝導検査や脳波検査では、異常は認めなかった。頭部 MRI(Magnetic Resonance Imaging)では、小脳虫部上部の狭小化を認めたが、腰椎 MRI では明らかな異常は認めなかった。17 歳時に汎血球減少と多発神経炎が出現し、造血幹細胞移植を行った。移植後も神経障害は残存していた。

(4) 他施設の CHS5 症例の臨床的特徴

我々の症例と他施設の CHS との臨床像や検査所見を比較した表を示す(表 1)。なお、他施設の小児型 CHS は Pt2 および Pt3、成人型 CHS は Pt4、Pt5、Pt6 である。

HLH を発症したのは、Pt2、Pt3 で、発症時年齢は、それぞれ 1 歳、4 歳であった。Pt2、Pt3 は造血幹細胞移植(Hematopoietic Stem Cell Transplantation ; HSCT)を施行した。Pt4、Pt5、Pt6 は HLH を未発症で、易感染も認めなかったが、EBV にいずれも持続感染していた。NK 活性および細胞傷害性 T 細胞(Cytotoxic T cell ; CTL)活性は、解析できた Pt2~Pt6 の全例において低下していた。

神経障害に関しては、Pt3 では、WISC-III で全 IQ76 と境界領域であり、頭部 MRI にて、両側の白質病変を移植前から認めていた。Pt4、Pt5、Pt6 においても軽度知的障害を認めた。Pt2 は年少のために、知的障害は評価できていない。なお、造血幹細胞移植後の患者 Pt3 でも知的障害は認められた。

第 4 節 考察

我々の症例では、*LYST*変異により、不完全な *LYST* 蛋白が作られる結果、リソソームの形態異常や機能異常をきたすことが予想された。EBV の持続感染には、*LYST* 蛋白機能低下によるリンパ球の機能障害が関わっていると考えられた。神経障害については、他施設の症例も含めると、軽度知的障害を評価可能な 5 例中全例に認めた。また、これはこれまでの報告と一致していた(9)。

第 5 節 小括

国内の *CHS6* 症例を集め、評価可能な 5 症例全例で、神経障害を認めた。神経障害に関しては、認知機能障害、末梢神経障害があり、これまでの報告と一致していた。

第3章 CHS 患者由来線維芽細胞を用いたオートファゴソーム、オートリソソームおよびリソソームの形態異常と機能異常

第1節 背景

CHS 患者やモデルマウスであるベージュマウス由来の細胞には、細胞の核周囲近傍に集まる巨大なリソソームを認める。CHS 患者由来細胞の巨大顆粒が、リソソームに由来することは、1966年に White らにより初めて報告された(4)。

リソソームは一重膜からなる細胞小器官で、内部に加水分解酵素を含み、細胞内老廃物を処理する。

また、リソソームは、細胞内の不要なタンパク質や細胞小器官を、オートファジーと呼ばれる過程により、再利用または代謝する。この過程では、まず二重膜で構成される隔離膜が徐々に伸長し、不要物を覆いオートファゴソームを形成する。さらに、オートファゴソームとリソソームが融合することにより、オートリソソームを形成する。そして、この段階で、オートリソソーム内の加水分解酵素により不要物は分解を受ける。この過程は、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患に関与していることが報告されている(25)。

また、細胞膜が損傷されると、リソソームからカルシウム依存性のエキソサイトーシスが生じ、細胞膜が修復される(22)。CHS では、リソソームのエキソサイトーシスが障害されているという報告がある(26)。この報告では、エレクトロポレーションにより細胞膜を損傷している(26)。しかし、近年、より生理的な細胞膜の損傷の方法として、細胞を搔爬する方法や、ストレプトリシンO (Streptolysin O, SLO)による方法が推奨されている(27)。また、細胞膜の損傷や修復をライブイメージングすることも可能となった。

第2節 材料および方法

(1) 線維芽細胞での PAS 染色

Pt1、Pt2、Pt3 より皮膚生検を行い樹立した線維芽細胞を用いた。これらの患者由来の線維芽細胞を培養し、PAS 染色を行った。観察は蛍光顕微鏡システム BZ-X700 (キーエンス, 大阪)で行った。

(2) 線維芽細胞での電子顕微鏡の試料作製

Pt1、Pt2、Pt3 より皮膚生検を行い樹立した線維芽細胞を用いた。これらの患者由来の線維芽細胞を培養し、電子顕微鏡の試料作製を行った。4%パラホルムアルデヒドで固定した後、2%パラホルムアルデヒドおよび 2.5%グルタルアルデヒドで前固定し、さらに 2%オスミウムで後固定を行った。観察は透過電子顕微鏡 JEM-1400Plus (日本電子, 東京)で行った。

(3) リソソームの局在解析

Pt1 より皮膚生検を行い樹立した線維芽細胞を用いた。Pt1 由来の線維芽細胞を培養し、免疫染色を行った。4%パラホルムアルデヒドで固定し、一次抗体反応として、リソソームの膜関連蛋白である LAMP2 に対する抗体である抗 LAMP2 抗体 (GeneTex, Irvine, CA)、二次抗体として、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, Waltham, MA)を用いた。観察は蛍光顕微鏡システム BZ-X700 (キーエンス, 大阪) で行った。

また、リソソームを染色する LysoTracker Green DND-26 (Invitrogen, Waltham, MA) と AcidiFluor ORANGE (五稜化薬, 札幌) で生細胞を染色した。調整は、それぞれ培養液で 2 μ M と 50nM に希釈し、LysoTracker Green DND-26 は 37°C で 3 分間、AcidiFluor ORANGE は 3 時間インキュベートし、標識した。観察は蛍光顕微鏡を用いて行った。

(4) DAP Green によるオートファゴソーム・オートリソソームの検出

解析する前日に、 7.5×10^3 個/ml となるように、健常者由来線維芽細胞 2 種類、Pt1 および Pt2 由来線維芽細胞をそれぞれ、8 ウェルのイメージング用チャンバー(8008-16, zell-Kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, Germany) に播き、10%FBS、100U ペニシリンおよび 0.1mg/ml ストレプトマイシン含有の DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) で 24 時間培養した。オートファゴソームおよびオートリソソームを検出する試薬である DAP Green (同仁化学研究所, 熊本) を DMSO に溶解し、0.1mM のストック溶液を作成した。さらにこれを、終濃度が 0.25 μ M となるように培養培地で希釈し、培養細胞に添加した。37°C で 30 分インキュベートし、2 回培養培地で洗浄した。その後、10%FBS を含むアミノ酸含有の DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) と FBS およびアミノ酸不含の DMEM (富士フィルム和光純薬, 大阪) にそれぞれ培地を交換した。37°C、5%CO₂ 投与下で染色 1 時間後の DAP Green の蛍光輝度を測定した。各サンプルの線維芽細胞を、ランダムな視野で、100 個になるまで視野を移動してカウントした。閾値は蛍光輝度のヒストグラムの谷の部分である 99 に設定し、閾値以上の輝度を持つ細胞の割合をサンプル間で比較した。

(5) 線維芽細胞におけるリソソームのエキソサイトーシスの解析

(i) フローサイトメトリーによるリソソームのエキソサイトーシス解析

正常線維芽細胞と Pt2 の線維芽細胞を 6 ウェルプレートに、48 時間で 70% コンフルエントになるように播いた。48 時間後に、培地を 37°C に温めておいたカルシウム含有 DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) 1ml またはカルシウム不含有 DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) 1ml にそれぞれ置き換え

た。そして、すばやくスクレーパーを使用して細胞を掻きとりチューブに回収した。掻きとり方は、ウェルの外側から円を描いた後、中心部を上から下へ掻きとるという順序に統一した。回収した細胞は、3回ピペッティングを行い、37°Cのウォーターバスで5分間温めた。その後、30秒間氷上に移して、膜修復の反応を停止させ、Propidium Iodide (PI) 核染色液 (Invitrogen, Waltham, MA) で5分間染色してから、フローサイトメトリーを行った。また、対照群はスクレーパーを使用せず、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 3分間で処理し、PI核染色液で染色してからフローサイトメトリーを行った。PI陰性細胞のカットオフ値は、PIで染めていない細胞集団を基準に設定した。また、グラフの縦軸は、細胞数のピークがそれぞれ1になるようにノーマライズした。

(ii) FM1-43によるリソソームのエキソサイトーシス解析

35 mmガラスボトムディッシュ (MatTek, Ashland, MA) に、細胞を70%コンフルエントになるように培養し、氷冷したカルシウム不含有のDMEMで細胞を2回洗った。ストレプトリジンO (バイオアカデミア, 大阪) 400ng/ml 含有かつFM1-43 (Invitrogen, Waltham, MA) 4 μ Mを含む4°Cのカルシウム含有DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) またはカルシウム不含有DMEM (Invitrogen, Paisley, UK) をディッシュの細胞に加え、それぞれ5分間反応させた。ディッシュの培地を少量残し、顕微鏡上の37°C、5%CO₂の培養チャンバーに移した。

FM1-43は、通常、細胞膜に結合し、透過することなく膜にとどまり蛍光を発するが、細胞膜が損傷されると、細胞内に急速に流入し、細胞小器官の膜にも結合し蛍光を発する。FM1-43 4 μ Mを含む37°Cのカルシウム含有DMEMまたはカルシウム不含有DMEMをディッシュに加え、蛍光顕微鏡 (キーエンス, 大阪) の40倍対物レンズにてタイムラプス撮影 (1フレーム10秒ごと、4分間) を行い、時間経過における細胞内のFM1-43の輝度値の推移を解析した。それぞれサンプルごとに実験は3回行った。

(6) 統計学的解析

全データは平均値±標準偏差にて表した。2群間比較は、Unpaired t test またはMann Whitney U-testを用いた。統計学的解析には、GraphPad Prism Version 6.07 (GraphPad Software, San Diego, California, USA)を使用した。

第3節 結果

(1) 線維芽細胞でのPAS染色

Pt1、Pt2、Pt3 の線維芽細胞の PAS 染色では、いずれの細胞も細胞質に PAS 陽性の巨大顆粒を認めた (図 4)。

(2) 線維芽細胞の電子顕微鏡標本の所見

CHS の線維芽細胞では、正常線維芽細胞には認めない最大直径約 $1\mu\text{m}$ の黒色顆粒を多数認めた (図 5)。また、一部の黒色顆粒は、二重膜構造で包まれているオートファゴソーム内にも認めた (図 5 (B))。CHS の線維芽細胞では、オートファゴソームを認めた (図 5 (B))。また、非連続切片における異なるリソソーム上での、Pt2 と正常線維芽細胞のリソソームの切断面の面積を比較したところ、Pt2 のリソソーム($n=10$)は、正常線維芽細胞のリソソーム($n=18$)よりも有意に広がった($p<0.0001$) (図 5 (E))。

(3) リソソームの局在解析

Pt1 の線維芽細胞において、LAMP2 の発現は正常線維芽細胞よりも増加していた(図 6 (A)(B))。また、AcidiFluor ORANGE(五稜化薬, 札幌)と LysoTracker Green DND-26 染色において、Pt1 の線維芽細胞では、肥大したリソソームが存在した(図 6 (C)(D)(E)(F))。

(4) DAP Green によるオートファゴソーム・オートリソソームの検出

アミノ酸含有培地における、閾値 99 以上の輝度を持つ細胞数の割合は、Pt1 は $5.55\pm 0.13\%$ 、Pt2 は $4.72\pm 0.37\%$ であり、ともに正常線維芽細胞の 0%と比べ多かった(図 7 (A)(B))。また、アミノ酸不含培地における閾値 99 以上の輝度を持つ細胞数の割合は、正常線維芽細胞の 2 種類の細胞では、 $18.48\pm 1.75\%$ および $13.74\pm 1.72\%$ 、Pt1 の線維芽細胞では $14.60\pm 1.01\%$ であったのに対し、Pt2 の線維芽細胞は $34.86\pm 1.89\%$ であった(図 7 (C)(D))。

(5) 線維芽細胞におけるリソソームのエキソサイトーシスの解析

(i) フローサイトメトリーによるリソソームのエキソサイトーシス

PI 染色で陰性となる細胞の割合は、スクレーピングによる細胞搔爬後、カルシウム含有培地下にした場合、正常では $46.23\pm 1.518\%$ 、Pt2 では $15.15\pm 1.395\%$ で、Pt2 が有意に低かった($p<0.0001$)(図 8 (A))。カルシウム不含培地下の場合においても、正常では $9.023\pm 0.900\%$ 、Pt2 では $4.763\pm 0.792\%$ で、Pt2 が有意に低かった($p=0.0035$)(図 8(B))。また、細胞搔爬後、カルシウム含有培地を投与した群の PI 染色陰性細胞の割合から、細胞搔爬後、カルシウム不含培地を投与した群の PI 染色陰性細胞の割合を引いた値は、正常では平均 37.207% 、Pt2 では平均 10.387% であった(図 8 (C))。以上より、Pt2 で

は、正常と比較して、細胞膜の修復に障害がみられ、細胞膜損傷によるカルシウム依存性のリソソームのエキソサイトーシスが障害されていることが示唆された。

また、細胞搔爬をせずに細胞剥離剤で処理後、カルシウム含有培地下にした場合、正常では $95.45 \pm 2.361\%$ 、Pt2 では $95.28 \pm 3.533\%$ で、有意差は認めなかった ($p=0.9471$)。細胞搔爬をせずに細胞剥離剤で処理後、カルシウム不含培地下にした場合、正常では $96.84 \pm 3.423\%$ 、Pt2 では $94.83 \pm 4.219\%$ で、有意差は認めなかった ($p=0.5571$)。

(ii) FM1-43 によるリソソームのエキソサイトーシス解析

SLO による細胞膜損傷後に FM1-43 で染色された線維芽細胞内の輝度は、カルシウム含有培地よりもカルシウム不含培地のほうが、Pt2 および正常線維芽細胞ともに高かった(図 9)。また、タイムラプス撮影開始後の線維芽細胞内の FM-1 の輝度値は、カルシウム含有培地では、Pt2 のほうが正常線維芽細胞よりも有意に高かった (図 9)。

第 4 節 考察

患者由来線維芽細胞には、リソソームの形態異常を認めた。また、CHS の線維芽細胞では、基底状態において、オートファゴソームおよびオートリソソームの輝度が亢進していた。これは、オートファゴソームまたはオートリソソームの肥大または、数の増加を反映していると考えられる。

アルツハイマー病などの神経変性疾患では、リソソームの機能低下を認め、基底状態の神経細胞において、オートファゴソームが増加していることが報告されている(25)。CHS の神経細胞におけるオートファゴソームおよびオートリソソームの基底状態での評価は第 4 章にて報告する。

また、CHS の線維芽細胞では、細胞膜損傷後のカルシウム含有培地において、正常線維芽細胞よりも、細胞膜修復が起こらなかったことから、CHS の線維芽細胞では、細胞膜修復のためのカルシウム依存性のリソソームのエキソサイトーシスが障害されていることが示された。

第 5 節 小括

CHS 患者由来線維芽細胞において、光顕では、リソソームの LAMP2 発現は増加していた。また、肥大したリソソームが存在した。電顕では、肥大したリソソームとオートファゴソームを認めた。また、基底状態のオートファゴソームまたは、オートリソソームの膜、または数の増加が示された。リソソームの機能に関しては、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ることが示された。

第4章 CHS 患者由来の iPS 細胞を用いた神経細胞への分化誘導

第1節 背景

CHS による神経障害の機序は不明である。CHS における神経変性症状は、*LYST* 変異に伴い、神経細胞のリソソームに関連した細胞小器官の細胞内輸送が障害されることが原因ではないかと考えた。そこで、患者由来の iPS 細胞を樹立し、神経細胞に分化誘導させ、病態を再現することを試みた。

第2節 対象および方法

(1) iPS 細胞の樹立

CHS 患者 6 例の線維芽細胞および PBMC から iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞への樹立は、共同研究を行っている京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) にて行った。コントロールとしての正常 iPS 細胞は (Phenocell SAS, evry cedex, Paris, FRANCE) を使用した。

(2) iPS 細胞の培養、継代

初回の培養液としては、維持培養培地である Stem Fit AK02N (味の素, 東京) に約 1/1000 量の Y-27632 (10mM) を加えたものを使用した。CiRA のプロトコールに従い、Laminin-511 E8 (i-Matrix) でプレコーティングした 6well に iPS 細胞 13000 個/well で播種した。Stem-Fit+Y 培地は 1.5ml/well とした。37°C、CO₂ インキュベーターで培養した。翌日からは Y-27632 の入っていない維持培養培地に交換した。70-90% コンフルエントとなる 7 日前後まで培養を行った。

(3) iPS 細胞のドーパミン作動性神経細胞への分化誘導

Sendai Virus (SeV) を用いて、iPS 細胞へ分化遺伝子を導入した。SeV の F 遺伝子をゲノムから欠失させ、非伝播型に改変したベクターを用いた (図 10)。SeV18/TSΔF ベクターは、センダイウイルス Z 株に由来する動物細胞用発現ベクターで、HN 遺伝子、M 遺伝子に温度感受性変異を導入し、かつ P 遺伝子、L 遺伝子にも、持続感染型センダイウイルスベクター由来の変異を導入している。外来遺伝子は、SeV/TSΔF ベクターの 3' 端に導入している。また、外来遺伝子として、Neurogenic transcription factor (神経細胞分化遺伝子) を挿入している。具体的なプロトコールは Quick-Neuron™ Dopaminergic SeV Complete Kit (Elixirgen Scientific, Baltimore, MD) に従って行った (図 11)。

(4) iPS 細胞のコリン作動性神経細胞への分化誘導

Sendai Virus (SeV) を用いて、iPS 細胞へ分化遺伝子を導入した。SeV の F 遺伝子をゲノムから欠失させ、非伝播型に改変したベクターを用いた (図 10)。SeV18/TSΔF ベクターは、センダイウイルス Z 株に由来する動物細胞用発現ベクターで、HN 遺伝子、M 遺伝子に温度感受性変異を導入し、P 遺伝子、L 遺伝子にも持続感染型センダイウイルスベクター由来の変異を導入している。外来遺伝子は、SeV/TSΔF ベクターの 3' 端に導入している。また、外来遺伝子として、Neurogenic transcription factor (神経細胞分化遺伝子) を挿入している。具体的なプロトコールは Quick-Neuron™ Cholinergic SeV Complete Kit (Elixirgen Scientific, Baltimore, MD) に従って行った (図 12)。

(5) iPS 細胞の GABA 作動性神経細胞への分化誘導

Sendai Virus (SeV) を用いて、iPS 細胞へ分化遺伝子を導入した。SeV の F 遺伝子をゲノムから欠失させ、非伝播型に改変したベクターを用いた (図 10)。SeV18/TSΔF ベクターは、センダイウイルス Z 株に由来する動物細胞用発現ベクターで、HN 遺伝子、M 遺伝子に温度感受性変異を導入し、かつ P 遺伝子、L 遺伝子にも持続感染型センダイウイルスベクター由来の変異を導入している。外来遺伝子は、SeV/TSΔF ベクターの 3' 端に導入している。また、外来遺伝子として、Neurogenic transcription factor (神経細胞分化遺伝子) を挿入している。具体的なプロトコールは Quick-Neuron™ GABAergic SeV Complete Kit (Elixirgen Scientific, Baltimore, MD) に従って行った (図 13)。

(6) 分化細胞の免疫染色

(i) ドーパミン作動性神経細胞

ドーパミン作動性神経細胞では、Day12 に、1 次抗体反応として、Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) Antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、Anti-Dopamine Antibody (Abcam, England and Wales, UK) を用いた。二次抗体反応は Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (Invitrogen, Waltham, MA)、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, Waltham, MA) を用いた。観察は蛍光顕微鏡システム BZ-X700 (キーエンス, 大阪) で行った。

(ii) コリン作動性神経細胞

コリン作動性神経細胞では、Day6 に、1 次抗体反応として、Neuron-specific beta-III Tubulin Antibody (R&D systems, Minneapolis, Miami, FL)、Choline Acetyltransferase (ChAT) Antibody (Gene Tex, Irvine, CA) を用いた。二次抗体反応は Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (Invitrogen,

Waltham, MA)、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, Waltham, MA)を用いた。観察は蛍光顕微鏡システム BZ-X700 (キーエンス, 大阪)で行った。

(iii) GABA 作動性神経細胞

GABA 作動性神経細胞では、Day12 に、1 次抗体反応として、Neuron-specific beta-III Tubulin Antibody (R&D systems, Minneapolis, Miami, FL)、Parvalbumin Antibody (Abcam, England and Wales, UK)を用いた。二次抗体反応は Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (Invitrogen, Waltham, MA)、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, Waltham, MA)を用いた。観察は蛍光顕微鏡システム BZ-X700 (キーエンス, 大阪)で行った。

(7) ドーパミン作動性神経細胞および剖検例の中脳黒質神経細胞の PAS 染色

ドーパミン作動性細胞を Day15 に PAS 染色した。また、易感染性、部分白子症があり、生後 9 か月に HLH を発症し死亡した、国内の他施設の剖検例 (死亡例であり、遺伝子解析や各種検査はされていなかったため、表 1 には含めていない) のパラフィン切片から中脳黒質神経細胞の PAS 染色を行った。観察は蛍光顕微鏡システム BZ-X700 (キーエンス, 大阪)で行った。

(8) ドーパミン作動性神経細胞での電子顕微鏡の試料作製

ドーパミン作動性細胞を Day11 に 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、2%パラホルムアルデヒドおよび 2.5%グルタルアルデヒドで前固定し、さらに 2%オスミウムで後固定を行った。観察は透過電子顕微鏡 JEM-1400Plus (日本電子, 東京)で行った。

(9) 分化細胞の細胞小器官の染色

(i) リソソーム

ドーパミン作動性神経細胞およびギャバ作動性神経細胞では、Day12 に、コリン作動性神経細胞では、Day6 に、一時抗体反応として、LAMP2 抗体 (GeneTex, Irvine, CA) を用いてライソソームの膜を染色した。二次抗体反応は、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, Waltham, MA)を用いた。観察は蛍光顕微鏡システム (キーエンス, 大阪)で行った。

(ii) オートファゴソームおよびオートリソソーム

オートファゴソームおよびオートリソソームを検出する試薬である DAP

Green (同仁化学研究所, 熊本)を DMSO に溶解し、0.1mM のストック溶液を作成した。さらに培養培地である Quick-Neuron™ Dopaminergic Maintenance Medium (Elixigen Scientific, Baltimore, MD)で、終濃度が 0.25 μ M となるように希釈し、Day16 のドーパミン作動性神経細胞に添加した。37°Cで 30 分インキュベートし、2 回培養培地で洗浄した。染色開始から 1~2 時間後に、DAP Green の蛍光輝度を測定した。各サンプルの線維芽細胞を、ランダムな視野で、100 個になるまで視野を移動してカウントした。閾値は蛍光輝度のヒストグラムの谷の部分である 70 に設定し、閾値以上の輝度を持つ細胞の割合をサンプル間で比較した。観察は蛍光顕微鏡システム (キーエンス, 大阪)で行った。

(10) 統計学的解析

全データは平均値±標準偏差または標準誤差にて表した。2 群間比較は、Unpaired t test、または Mann Whitney U-test を用いた。統計学的解析には、GraphPad Prism version 6.07 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) を使用した。

第3節 結果

(1) iPS 細胞の樹立と神経細胞への分化誘導と免疫染色結果

CHS の P1~P6 の患者から iPS 細胞を樹立した。また、4 例の iPS 細胞をドーパミン作動性神経細胞、コリン作動性神経細胞、GABA 作動性神経細胞へ分化させた (図 14、図 15、図 16)。

(2) iPS 由来神経細胞および剖検例の中脳黒質神経細胞の PAS 染色結果

CHS の iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞では、細胞質に PAS 染色陽性の巨大顆粒を認めた (図 17 (C) (D))。また、リポフスチン様の顆粒を認めた。正常細胞では、これらの顆粒は認めなかった (図 17 (A))。剖検例の中脳黒質神経細胞にも、細胞質に PAS 染色陽性の顆粒を認めた (図 17 (B))。

(3) iPS 由来神経細胞の電子顕微鏡所見

リソソームおよびミトコンドリアは、Pt2 の細胞では、核周囲に局在化していた (図 18(A))。リソソームの直径は、正常の iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞では、直径約 0.5 μ m であったが、Pt2 の iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞では、直径約 1 μ m と巨大化したものを認めた (図 18 (B)(C)(D)(E))。非連続切片における異なるリソソーム上で、Pt2 と正常の iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞のリソソームの切断面の面積を比較したところ、Pt2 のリソソーム

(n=16) は、正常の iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞細胞のリソソーム (n=20) よりも有意に広がった ($p < 0.0001$) (図 18)。リソソーム内部には、Pt2 の細胞では、正常の細胞では認めない、黒色顆粒やフィラメント様の構造物を含んでいた (図 18 (D)(E))。ミトコンドリアは、Pt2 では一部、多形性と肥大化を認めた (図 18(C))。

(4) iPS 由来神経細胞の細胞小器官の染色結果

(i) リソソーム

蛍光免疫染色では、Pt2 の iPS 由来神経細胞において、細胞質の LAMP2 発現を核周囲に局在化して認め、輝度は正常細胞よりもいずれも高かった (図 19、図 20、図 21)。

(ii) オートファゴソームおよびオートリソソーム

DAP Green で染色された iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞の輝度値は、正常細胞に比べて、CHS では有意に高かった ($p < 0.0001$)。

また、DAP Green の輝度の閾値が 70 以上の細胞の割合は、正常 iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞では、 $9.927 \pm 0.837\%$ であったのに対し、Pt2 の iPS 由来ドーパミン作動性神経細胞では、 $73.9 \pm 1.852\%$ と有意に多かった ($p < 0.0001$) (図 22)。

第4節 考察

今回、CHS の iPS 細胞から分化させたドーパミン作動性神経細胞において、PAS 染色陽性の巨大顆粒を認め、一部にリポフスチン様の顆粒を認めた。また、電子顕微鏡所見では、肥大したリソソームを認め、内部に黒色顆粒および一部フィラメント様の構造物を認めた。過去の報告で、CHS の剖検例の神経細胞では、PAS 染色陽性のリポフスチン様の顆粒を認め、電子顕微鏡では、リソソームが肥大化し、内部には、微細な電子密度の低い粒子、フィラメント様または膜様の構造物と脂肪滴が、一重膜に包まれていたとされている (28)。したがって、CHS 患者 iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞の所見は、過去の報告と一致しているといえる。

ミトコンドリアの形態異常について、CHS での報告はないが、我々の解析では、ミトコンドリアの一部に多形性と肥大を認めた。したがって、CHS においてミトコンドリアの形態異常の存在が新たに示された。

過去に CHS におけるオートファゴソームやオートリソソームの異常の報告はないが、CHS の iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞では、基底状態において、オートファゴソームまたはオートリソソームの染色による輝度が亢進していた。

CHS では、リソソームの機能低下により、オートファゴソームやオートリソソームなどのオートファゴソーム関連構造体が分解されず、それらの構造体の数が増加している可能性、または、オートファゴソームやオートリソソーム膜の増加が考えられた。

第5節 小括

CHS のドーパミン作動性 iPS 由来神経細胞において、PAS 染色陽性の巨大顆粒およびリポフスチン様顆粒を認めた。リソソームは肥大しており、内部に黒色顆粒およびフィラメント様の構造物を含んでいた。また、基底状態において、オートファゴソームおよびオートリソソームの膜、または数の増加が示唆された。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。

第5章 考察

(1) 我々の症例および国内の5症例の臨床的特徴について

国内6症例のCHSデータ収集において、全例で*LYST*遺伝子変異を認めた。また、神経症状は、小児型、思春期・成人型に関わらず、評価可能な全例に認められた。したがって、*LYST*遺伝子変異とCHSにおける神経症状の関連性が示唆された。

CHSの神経症状に関しては、CHSの思春期・成人型において、腱反射の消失、頭部MRIで小脳虫部上部の狭小化を認めることが報告されており、Pt1の所見と一致していた(29)。CHSは神経変性疾患である(8)。CHSのモデルマウスでは、年齢とともに巨大顆粒が増加し、運動失調などの進行性の神経症状を呈し、ブルキンエ細胞の変性を認める(30)。神経障害としては、認知機能障害、小脳失調、パーキンソニズム、末梢神経障害、学習障害などがある(9)(10)。また、小児型のCHSでは、頭部MRI(magnetic resonance imaging)で白質病変を認めた報告がある(7)(11)(12)。一方、学童期や成人期になり、始めて神経症状を発症する症例も報告されている(13)(14)(15)。骨髄移植後も神経障害は残存する(16)(17)。これらの報告は、Pt1、Pt3~Pt6の所見と一致していたことから、これらのCHS患者に認めた神経所見も神経変性症状の一つと考えられた。また、神経細胞においても、巨大顆粒を認めることは過去の文献や剖検例で確認できたことから、神経障害と巨大顆粒との関連が示唆された。

(2) CHS患者由来細胞におけるリソソーム

CHS患者iPS細胞由来のドーパミン作動性神経細胞、コリン作動性神経細胞、ギャバ作動性神経細胞において、線維芽細胞と同様のリソソームの肥大と核周囲への局在化を認めたことから、リソソームの形態異常を患者iPS由来神経細胞においても再現できたといえる(図17、図18、図19、図20、図21)。

また、CHS患者由来線維芽細胞を用いて、細胞膜損傷後の膜修復に関わるリソソームのカルシウムイオン依存性エキソサイトシスがCHSでは障害されており、リソソーム機能が低下していることが示された(図8、図9)。したがって、CHSでは、線維芽細胞と同様の機序で、神経細胞においてもリソソーム機能が低下しており、神経障害を生じると考えられる。

(3) CHS患者由来細胞におけるオートファゴソームおよびオートリソソーム

CHS患者由来線維芽細胞においては、基底状態においてオートファゴソームを認めた(図5)。また、CHS患者由来線維芽細胞およびiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞において、基底状態でのオートファゴソームまたはオートリ

ソソームの輝度が、いずれも亢進していた(図 7、図 22)。これは、オートファゴソームまたはオートリソソームの膜、または数の増加を反映している。

アルツハイマー病において、リソソーム機能の低下により、基底状態でのオートファゴソームが増加していることは、CHS のリソソーム機能の低下により、オートファゴソームの数が増加するという仮説と一致する。

一方、CHS のモデル黄色ショウジョウバエを用いた解析で、肥大したオートファゴソームを認めたという報告があり、CHS 患者由来細胞のオートファゴソームの膜が肥大化しているという仮説と一致する(31)。

したがって、オートファゴソームまたはオートリソソームの膜、または数の増加は、リソソーム機能の低下と関わっている可能性が考えられた。

(4) CHS 患者由来細胞におけるミトコンドリア

CHS 患者 iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞の電顕において、ミトコンドリアの多形性と肥大を認めた(図 18(C))。アルツハイマー病やパーキンソン病などでは、異常なミトコンドリアが蓄積し、神経障害を引き起こすとされる(32)。CHS でも同様に、ミトコンドリア異常により神経障害が引き起こされる可能性がある。

(5) CHS 患者由来細胞における PAS 陽性物質

CHS 患者由来線維芽細胞、iPS 細胞由来神経細胞において、PAS 染色陽性の巨大顆粒およびリポフスチン様顆粒を認めた(図 17 (C)(D))。この PAS 染色陽性物質は、電顕では、黒色およびフィラメント様の構造物であり、これらの所見は CHS 患者の剖検例の神経細胞の所見と一致していた(28) (図 18)。CHS のリポフスチン様物質は、加齢とともに増加することが報告されている(28)。したがって、CHS においても、加齢により蓄積したリポフスチン様物質がさらにリソソーム機能を低下させ、神経変性を生じさせていると考えられる。

以上の結果から、CHS のドーパミン作動性神経細胞において神経変性が生じる病態仮説を策定したので以下に述べる。

神経変性疾患では、リソソームの機能低下により、老廃物が蓄積し、神経変性が生じることがわかっている。例えば、リソソームの関わるエンドサイトーシス経路やオートファジーの経路の異常が病態に関与している(33)。また、損傷したタンパク質や細胞小器官が沈着すると、リソソーム機能はさらに低下するという報告がある(8)。

CHS では、リソソームのカルシウム依存性エキソサイトーシス機能障害(図 8、9)、また、オートファゴソームやオートリソソームの異常(図 7、22)、不整ミト

コンドリアに加え、リポフスチン様顆粒やリソソーム内の PAS 陽性物質などが沈着する(図 17、図 18)。これらにより、リソソーム機能がさらに低下すると考えられる(図 23)。

以上から、CHS では、LYST が細胞内輸送に関わる分子であることやその変異により、リソソーム、オートファゴソーム、オートリソソーム、ミトコンドリアなどの細胞小器官の形成異常、機能異常が起こり、神経変性が起きたと考えられた(図 24)。

第6章 結論

(1) CHS6 症例の臨床像の解析を行い、全例に *LYST* 遺伝子変異を認め、神経障害は、評価可能な 5 例に認めた。

(2) CHS 患者由来線維芽細胞では、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。

(3) CHS 患者の iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞では、リソソームの肥大、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の局在化を認めた。

(4) CHS における神経障害は、リソソーム機能低下などの細胞小器官の異常によることが示唆された。

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、全般にわたりご指導を賜りました防衛医科大学校小児科学講座 野々山恵章教授に深謝いたします。また、ご指導賜りました先生方、貴重な症例をご紹介下さいました先生方、そして検体採取に御同意下さいました患者様および保護者の方々に心より感謝申し上げます。

防衛医科大学校小児科学講座

小倉 由美 先生

賀佐 希美子 様

防衛医科大学校薬理学講座

佐藤 泰司 先生

防衛医科大学校再生発生学講座

伊藤 正孝 先生

防衛医科大学校臨床検査医学講座

富永 晋 様

防衛医科大学校共同研究施設

市来 やよい 様

京都大学 iPS 細胞研究所

齋藤 潤 先生

大澤 光次郎先生

かずさ DNA 研究所

小原 收 先生

成育医療センター

今留 謙一 先生

石川 百合子 様

九州大学小児科学講座

大賀 正一 先生

白石 暁 先生

大阪大学大学院医学研究科

口腔外科学

辻 忠孝 先生

松山赤十字病院病理診断科

大城 由美 先生

済生会松阪総合病院内科

上村 泰弘 先生

岐阜大学小児科学講座

大西 秀典 先生

静岡県立こども病院

堀越 泰雄 先生

【単語・略語説明】

iPS 細胞(induced pluripotent stem cell : 人工多能性幹細胞)

体細胞に山中 4 因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入して樹立される ES 細胞に類似した多能性幹細胞。2006 年に山中伸弥教授の研究グループにより世界で初めてマウス体細胞を用いて樹立された。受精卵を破壊する必要がなく、患者自身の細胞から作製することが可能である。

ペルオキシダーゼ染色

骨髄で産生される顆粒球系および単球系の細胞質に含まれる酵素であるペルオキシダーゼ(oxidase)を染色する方法。

ナンセンス変異

アミノ酸に対応するコドンが終止コドンに変化する突然変異。

ヌル変異

正常に機能できる遺伝子産物が全く発現しなくなるような突然変異。遺伝子産物自体が全く発現しない場合と、発現しても何らかの障害によりその機能が発揮できない場合が考えられる。

エンドサイトーシス

細胞が外部の物質を取り込む過程の一つ。細胞膜の一部が物質を包み込むようにして陥没し、細胞膜から遊離して小胞を形成する。

エクソン

遺伝子のうち最終的に mRNA として発現される遺伝子部分。イントロンがスプライシングにより除かれ mRNA となる。

イントロン

真核生物の遺伝子配列の中に存在し、構造遺伝子領域を分断しその間に入り込んでいるアミノ酸をコードする領域とは関係のない塩基配列。

スプライス供与部位

一般に mRNA 前駆体のエクソン/イントロン/エクソンの両境界付近であるスプライス部位には、コンセンサス配列という配列が存在し、正確な位置でのスプライスを可能にしている。特にイントロンの 5'末端のことで、GU は種を

問わずほとんどすべての mRNA 前駆体のイントロンで見出される配列である。スプライシングを受ける部位の決定に重要な役割を持つと考えられている。

スプライシング

真核生物の DNA にはイントロンが存在している。エクソンだけからなる成熟した mRNA になるためには、転写された mRNA 前駆体からこのイントロンを切り除き、エクソンを互いに連結させる必要がある。この過程のこと。

PAS 染色(Periodic Acid Schiff 染色)

粘液質の証明方法として考案され、その後、血球の多糖類証明法として応用されるようになった。原理としては、多糖類の中のグリコール基が過ヨウ素酸によりアルデヒド基に変化するが、これに Schiff 試薬中の塩基性フクシンが反応し、赤色または紫紅色の物質が形成される。

Y-27632

細胞内透過性を有する ATP 拮抗的に作用する強力な ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase) 特異的阻害剤で、Ca²⁺受容体アゴニストの強力な阻害剤として働く。幹細胞における生存率向上に働くことが知られており、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞の細胞分散時の細胞死を抑制、凍結保存後の生存率向上する効果が知られている。

Sendai Virus

パラミクソウイルス科レスピロウイルス属のウイルス。1 本鎖 RNA を持ち、マウスなどを宿主とする。ヒトへの病原性の報告もなく、培養細胞内での増殖も良好であり、遺伝子導入ベクターとして広く利用されている。F 遺伝子を欠失させ、N 遺伝子上流に外来遺伝子を挿入するタイプのベクターが良く用いられる。

神経変性疾患

中枢神経・末梢神経の特定の細胞集団が選択的に脱落することにより、その神経細胞集団が担っていた機能喪失に基づく種々の臨床症状を呈する疾患群。

エキソサイトーシス

細胞質の分泌小胞の膜が細胞膜に融合する結果、小胞内腔と細胞外液が交通し、分泌小胞の内容物が細胞外に放出される現象のこと。

【引用文献】

1. Chediak MM. [New leukocyte anomaly of constitutional and familial character]. *Rev Hematol.* 1952;7(3):362-7.
2. Higashi O. Congenital gigantism of peroxidase granules; the first case ever reported of qualitative abnormality of peroxidase. *Tohoku J Exp Med.* 1954;59(3):315-32.
3. Spicer SS, Sato A, Vincent R, Eguchi M, Poon KC. Lysosome enlargement in the Chediak-Higashi syndrome. *Fed Proc.* 1981;40(5):1451-5.
4. White JG. The Chediak-Higashi syndrome: a possible lysosomal disease. *Blood.* 1966;28(2):143-56.
5. Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(1):22-9.
6. Nagai K, Ochi F, Terui K, Maeda M, Ohga S, Kanegane H, et al. Clinical characteristics and outcomes of chediak-Higashi syndrome: a nationwide survey of Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(10):1582-6.
7. Karim MA, Suzuki K, Fukai K, Oh J, Nagle DL, Moore KJ, et al. Apparent genotype-phenotype correlation in childhood, adolescent, and adult Chediak-Higashi syndrome. *Am J Med Genet.* 2002;108(1):16-22.
8. Lie PPY, Nixon RA. Lysosome trafficking and signaling in health and neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 2019;122:94-105.
9. 東 音. チェディアク・東症候群 ことにその神経症状および予後について. *小児科臨床.* 1988;41(6):1219-24.
10. Shirazi TN, Snow J, Ham L, Raglan GB, Wiggs EA, Summers AC, et al. The neuropsychological phenotype of Chediak-Higashi disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):101.
11. Ballard R, Tien RD, Nohria V, Juel V. The Chediak-Higashi syndrome: CT and MR findings. *Pediatr Radiol.* 1994;24(4):266-7.
12. Herman TE, Lee BC. Accelerated phase of Chediak-Higashi syndrome diffuse white-matter-enhancing lesions. *Pediatr Radiol.* 1999;29(7):527-9.
13. Silveira-Moriyama L, Moriyama TS, Gabbi TV, Ranvaud R, Barbosa ER. Chediak-Higashi syndrome with parkinsonism. *Mov Disord.* 2004;19(4):472-5.
14. Bhambhani V, Introne WJ, Lungu C, Cullinane A, Toro C. Chediak-Higashi syndrome presenting as young-onset levodopa-responsive parkinsonism. *Mov Disord.* 2013;28(2):127-9.
15. Weisfeld-Adams JD, Mehta L, Rucker JC, Dembitzer FR, Szporn A,

Lublin FD, et al. Atypical Chediak-Higashi syndrome with attenuated phenotype: three adult siblings homozygous for a novel LYST deletion and with neurodegenerative disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:46.

16. Tardieu M, Lacroix C, Neven B, Bordigoni P, de Saint Basile G, Blanche S, et al. Progressive neurologic dysfunctions 20 years after allogeneic bone marrow transplantation for Chediak-Higashi syndrome. *Blood.* 2005;106(1):40-2.

17. Zarzour W, Kleta R, Frangoul H, Suwannarat P, Jeong A, Kim SY, et al. Two novel CHS1 (LYST) mutations: clinical correlations in an infant with Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metab.* 2005;85(2):125-32.

18. Perou CM, Leslie JD, Green W, Li L, Ward DM, Kaplan J. The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29790-4.

19. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(9):623-35.

20. Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997;137(1):93-104.

21. Andrews NW. Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.* 2000;10(8):316-21.

22. Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca⁽²⁺⁾-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell.* 2001;106(2):157-69.

23. Jessen B, Maul-Pavicic A, Ufheil H, Vraetz T, Enders A, Lehmborg K, et al. Subtle differences in CTL cytotoxicity determine susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice and humans with Chediak-Higashi syndrome. *Blood.* 2011;118(17):4620-9.

24. Durchfort N, Verhoef S, Vaughn MB, Shrestha R, Adam D, Kaplan J, et al. The enlarged lysosomes in beige j cells result from decreased lysosome fission and not increased lysosome fusion. *Traffic.* 2012;13(1):108-19.

25. Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med.* 2012;44(2):89-98.

26. Huynh C, Roth D, Ward DM, Kaplan J, Andrews NW. Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak-Higashi/beige cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(48):16795-800.

27. Preface. Lysosomes and lysosomal diseases. *Methods Cell Biol.* 2015;126:xvii-xviii.
28. Sung JH, Stadlan EM. Neuropathological changes in Chediak-Higashi disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1968;27(1):156-7.
29. Introne WJ, Westbroek W, Groden CA, Bhambhani V, Golas GA, Baker EH, et al. Neurologic involvement in patients with atypical Chediak-Higashi disease. *Neurology.* 2017;88(7):e57-e65.
30. Rudelius M, Osanger A, Kohlmann S, Augustin M, Piontek G, Heinzmann U, et al. A missense mutation in the WD40 domain of murine Lyst is linked to severe progressive Purkinje cell degeneration. *Acta Neuropathol.* 2006;112(3):267-76.
31. Rahman M, Haberman A, Tracy C, Ray S, Kramer H. *Drosophila* mauve mutants reveal a role of LYST homologs late in the maturation of phagosomes and autophagosomes. *Traffic.* 2012;13(12):1680-92.
32. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet.* 2009;18(R2):R169-76.
33. Guo F, Liu X, Cai H, Le W. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathol.* 2018;28(1):3-13.

図1

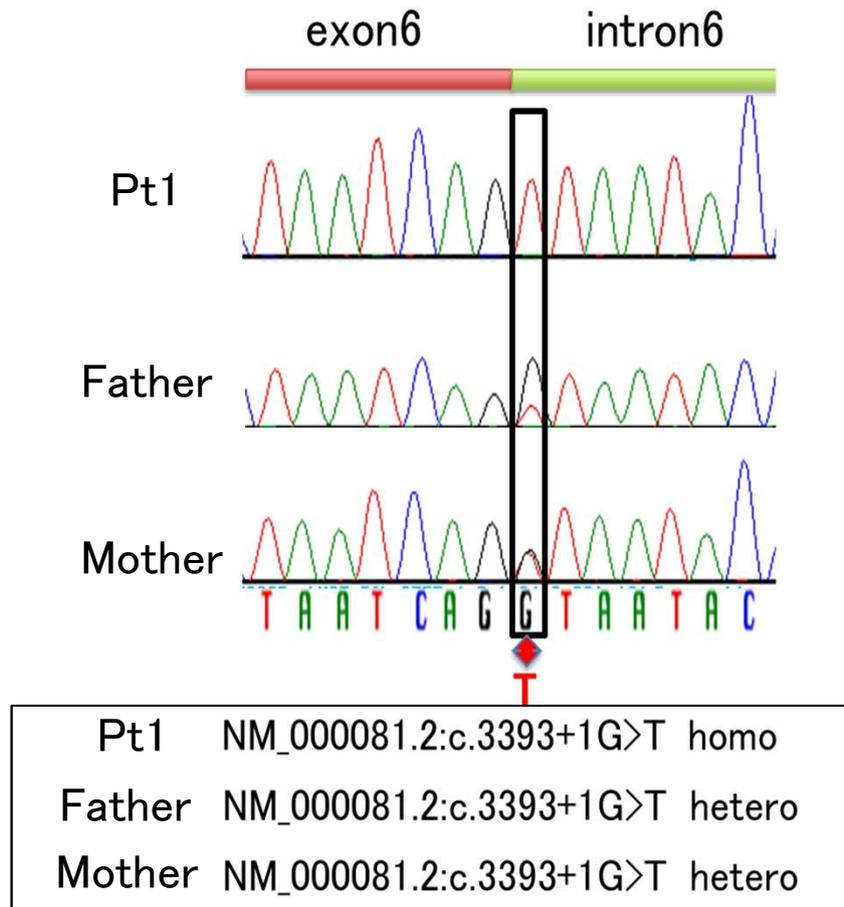
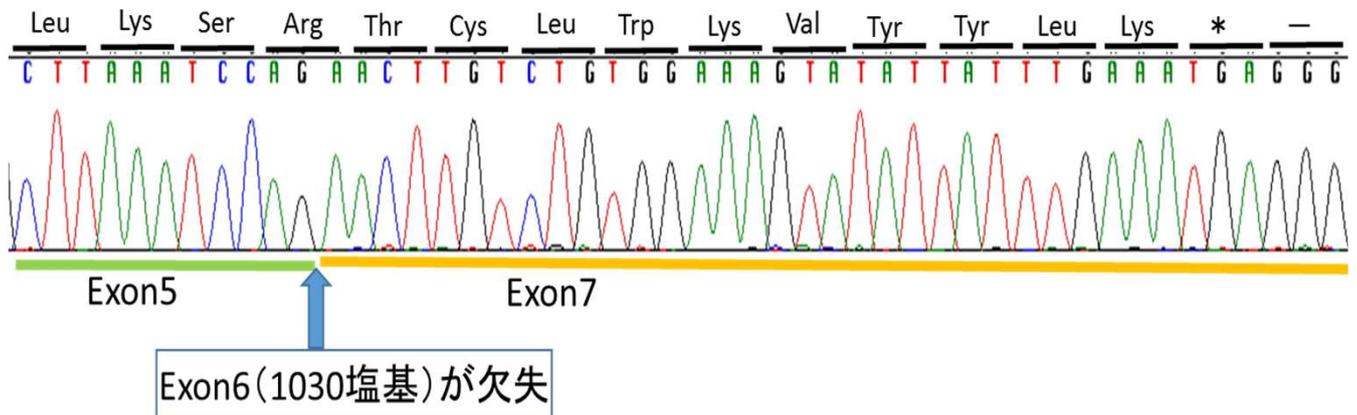


図1 *LYST*遺伝子のgDNAシーケンス波形
Pt1ではhomo、両親ではheteroの、c.3393+1G>T変異を認めた。
イントロン6の5'末端から1番目の塩基がGからTに置換。

図2

(A)



(B)

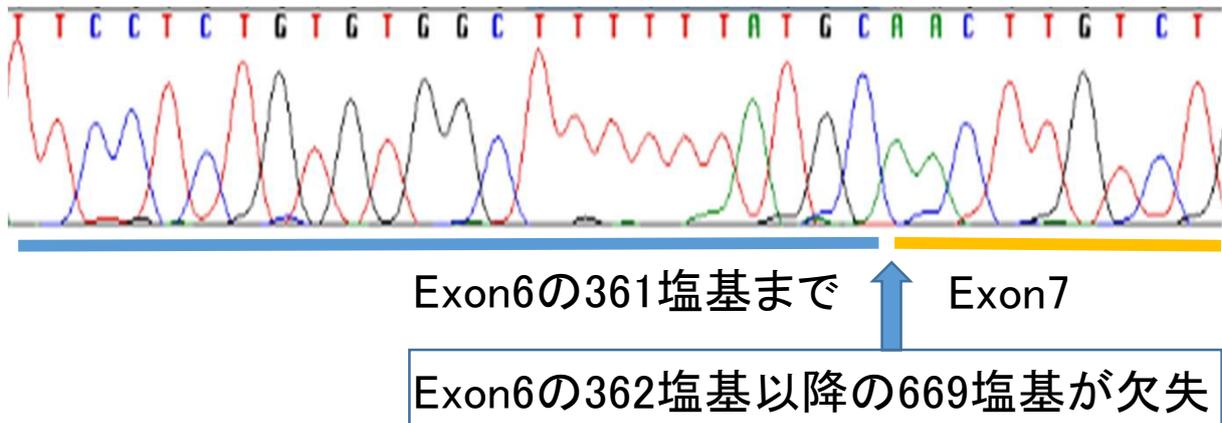


図2 Pt1のLYST遺伝子RT-PCR産物のシーケンス

(A)エクソン6が欠失し、フレームシフトを来した結果、

エクソン7内で終始コドン*となる場合。

(B)代替スプライシングの結果、669塩基のインフレーム欠失を起こす場合。

図3

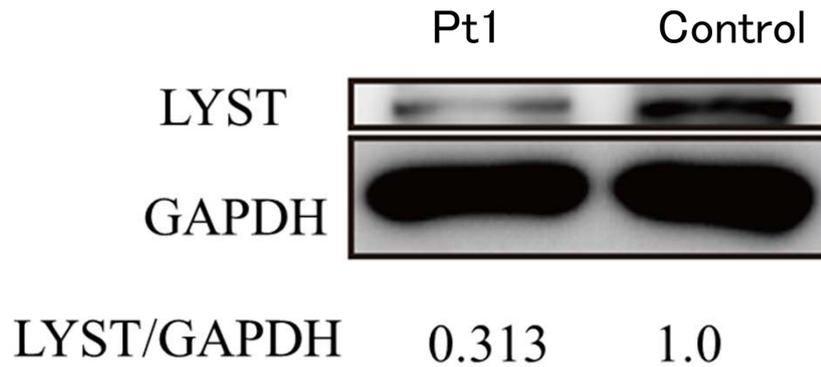


図3 LYST蛋白の発現

線維芽細胞抽出蛋白を用いて、Chediak東症候群患者および健常コントロールのGAPDHとLYSTの発現をウェスタンブロッティングで検出した。

数値は、内因性コントロールであるGAPDHの発現度でLYST蛋白の発現度を除したものであり、同時に行った健常コントロールの値を1.0とし、各患者の相対値を示している。Pt1のLYST蛋白バンドのシグナル強度は、健常コントロールの31.3%と低下していた。

表1

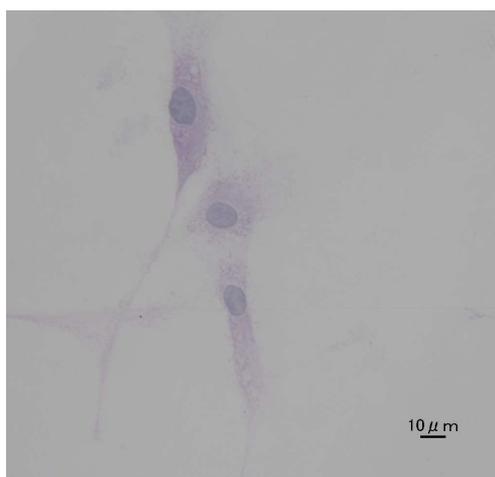
Pt	診断時の年齢	現在の年齢	神経障害	易感染性	LYST 遺伝子変異	NK 活性	CTL 活性	EBV 持続感染	HLH	HSCT	outcome
1 (自験例)	16y	18y	+ 軽度知的障害 多発神経炎 小脳軽度萎縮	-	c.3393+1G>T homo p.Asn1132ThrfsX11	4%	↓	+	-	+	Alive
2	1y (小児型)	2y	-	+	c.1673dupT,p.Leu558fs c.5506C>T,p.Arg1836x truncated mutation	3%	↓	-	pre HPS+ 1y	+	Alive
3	4y2m (小児型)	12y	+ 軽度知的障害 大脳白質病変	+	c.3944-3945 ins C,hetero p.T1315fsX1331	0.71%	↓	-	+ HPS+ 4y	+ 4y6m	Alive
4	3y	31y	+ 軽度知的障害	-	c.5541-5542delAA, p.Q1847fsX1850.	4.9%	↓	+	-	-	Alive
5	1y	28y	+ 軽度知的障害	-	c.5541-5542delAA, p.Q1847fsX1850.	7.6%	↓	+	-	-	Alive
6	1m	25y	+ 軽度知的障害	-	c.5541-5542delAA, p.Q1847fsX1850.	3.8%	↓	+	-	-	Alive

表1 Chediak東症候群の患者の臨床像

図4

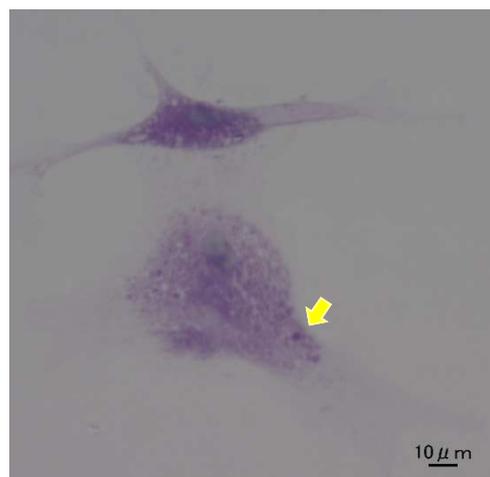
(A)

Control



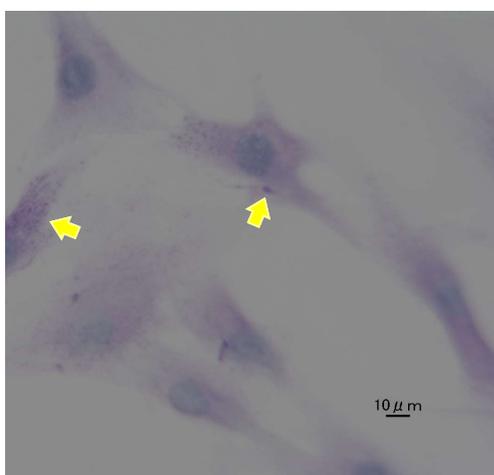
(B)

Pt1



(C)

Pt2



(D)

Pt3

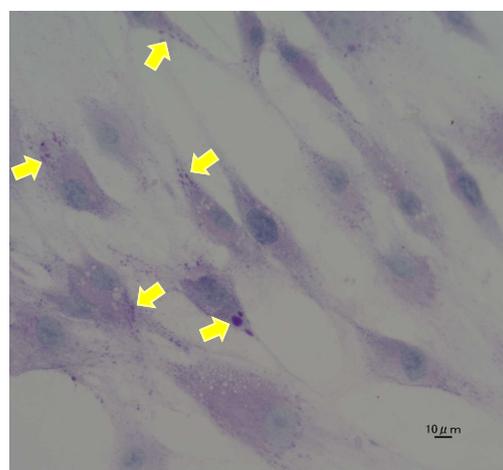


図4 線維芽細胞のPAS染色

(A)正常線維芽細胞 (B) Pt1の線維芽細胞 (C) Pt2の線維芽細胞

(D) Pt3の線維芽細胞

黄矢印はPAS染色陽性の巨大顆粒。

図5

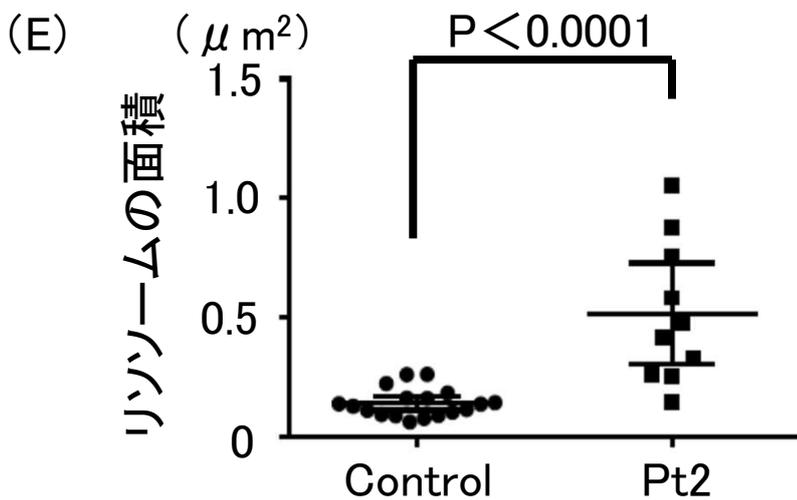
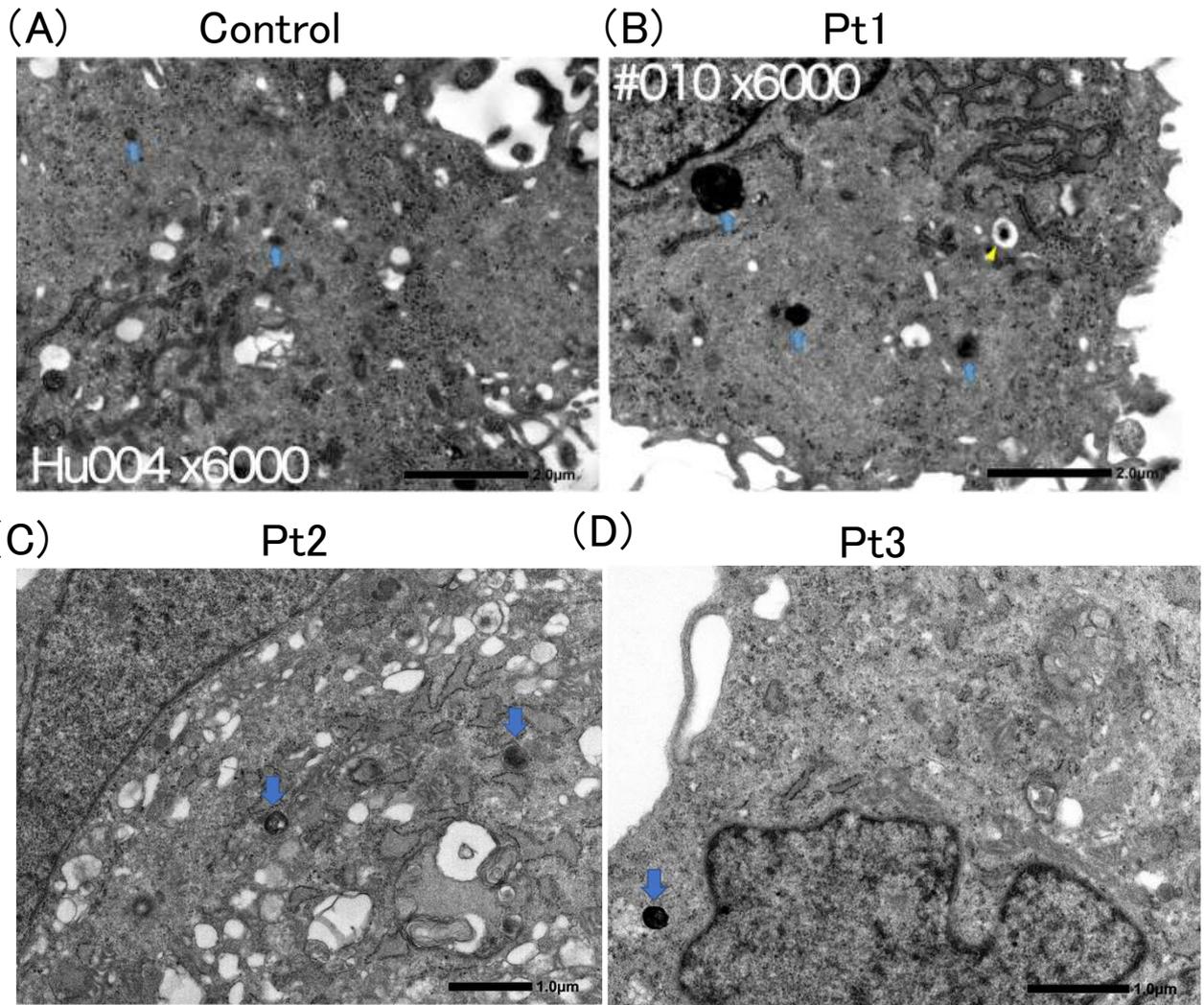


図5 線維芽細胞の電顕像およびリソソームの面積の比較

(A) 正常線維芽細胞 (B) Pt1の線維芽細胞 (C) Pt2の線維芽細胞

(D) Pt3の線維芽細胞 (E) Pt2の線維芽細胞と正常線維芽細胞のリソソームの切断面の面積

青矢印はリソソーム、黄矢頭はオートファゴソーム。

Pt1、Pt2、Pt3では、リソソームが巨大化しており、リソソームおよびオートファゴソーム内に黒色顆粒を認める。エラーバーは標準偏差を用いた。

図6

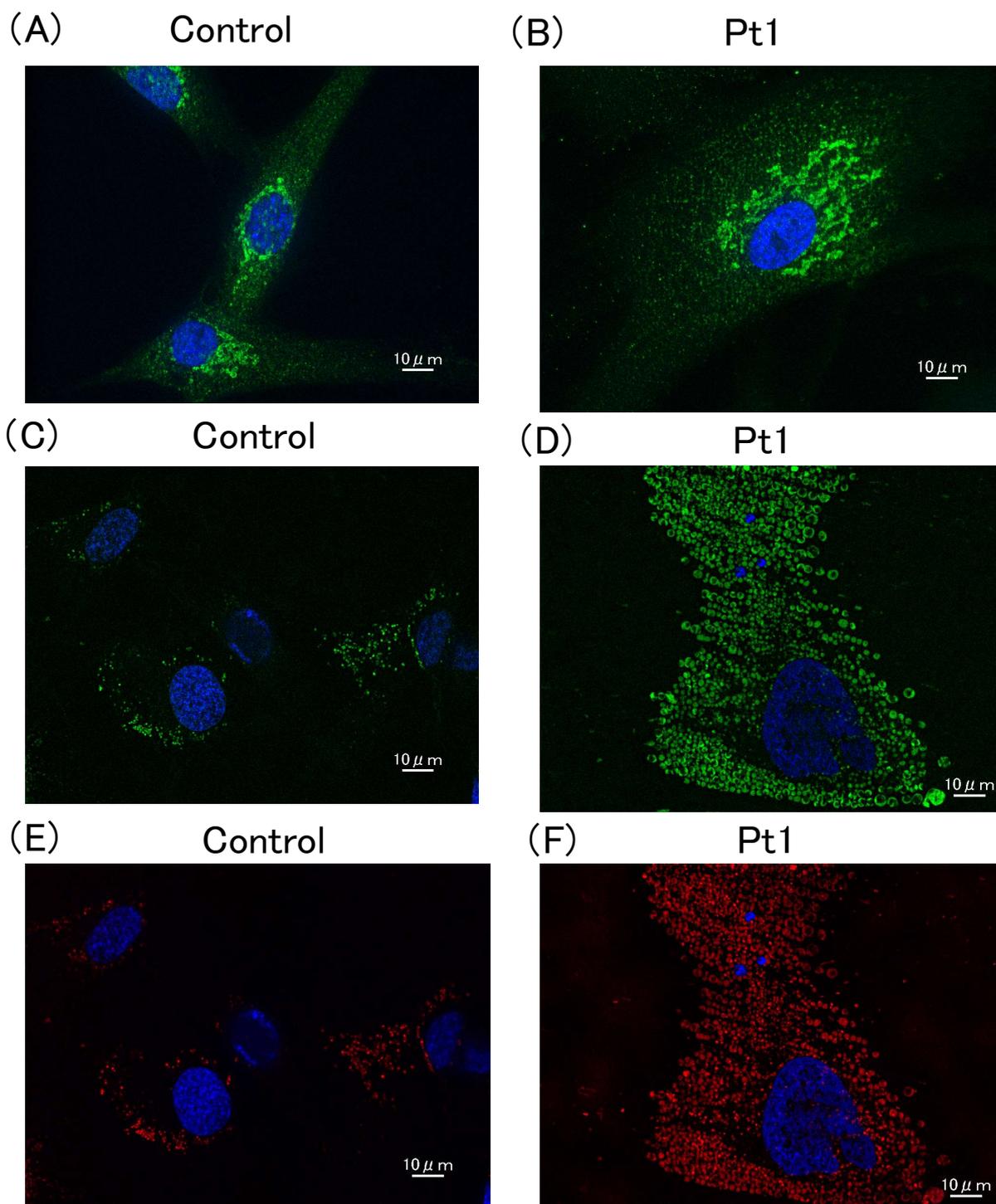


図6 線維芽細胞におけるリソソームの免疫染色

(A) 正常線維芽細胞の LAMP2抗体による免疫染色

(B) Pt1の線維芽細胞のLAMP2抗体による免疫染色

(C) 正常線維芽細胞のLysoTracker Green DND-26による染色

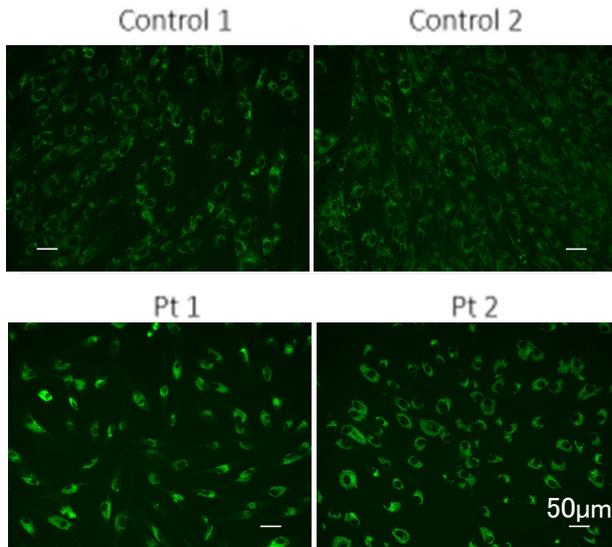
(D) Pt1の線維芽細胞のLysoTracker Green DND-26による染色

(E) 正常線維芽細胞のAcidiFluor Orangeによる染色

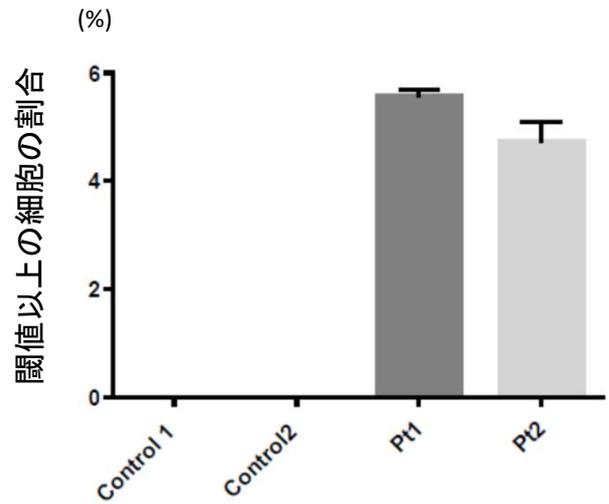
(F) Pt1の線維芽細胞のAcidiFluor Orangeによる染色

図7

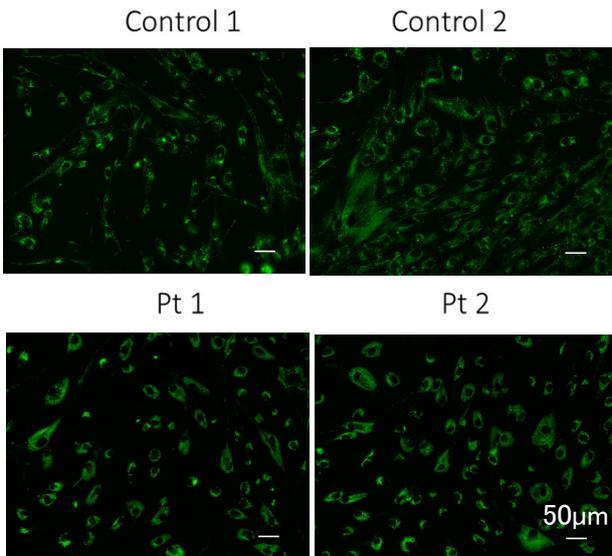
(A) A(+) $F(+)$ G(+) 培地



(B) A(+) $F(+)$ G(+) 培地



(C) A(-) $F(-)$ G(+) 培地



(D) A(-) $F(-)$ G(+) 培地

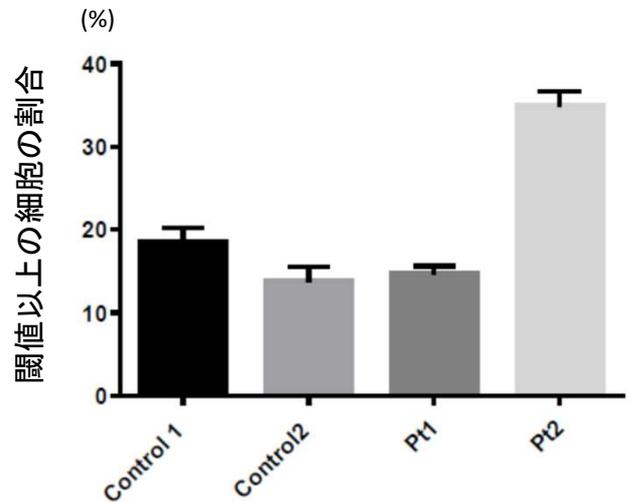


図7 DAP Greenによるオートファゴソーム・オートリソソームの検出

Control 1、Control 2は正常線維芽細胞、Pt1、Pt2はCHSの線維芽細胞。

Aはアミノ酸、Fは10%FBS、Gはグルコース。Bars: 10 μ m

(A)アミノ酸、10%FBSを含有するDMEM培地におけるDAPGreenの輝度。

(B)アミノ酸、10%FBSを含有するDMEM培地におけるDAPGreen染色後の閾値99以上の輝度を持つ細胞の割合の推移。

(C)FBSおよびアミノ酸を不含のDMEM培地におけるDAPGreenの輝度。

(D) FBSおよびアミノ酸を不含のDMEM培地におけるDAPGreen染色後の閾値99以上の輝度を持つ細胞の割合の推移。

エラーバーは、標準偏差を用いた。

図8

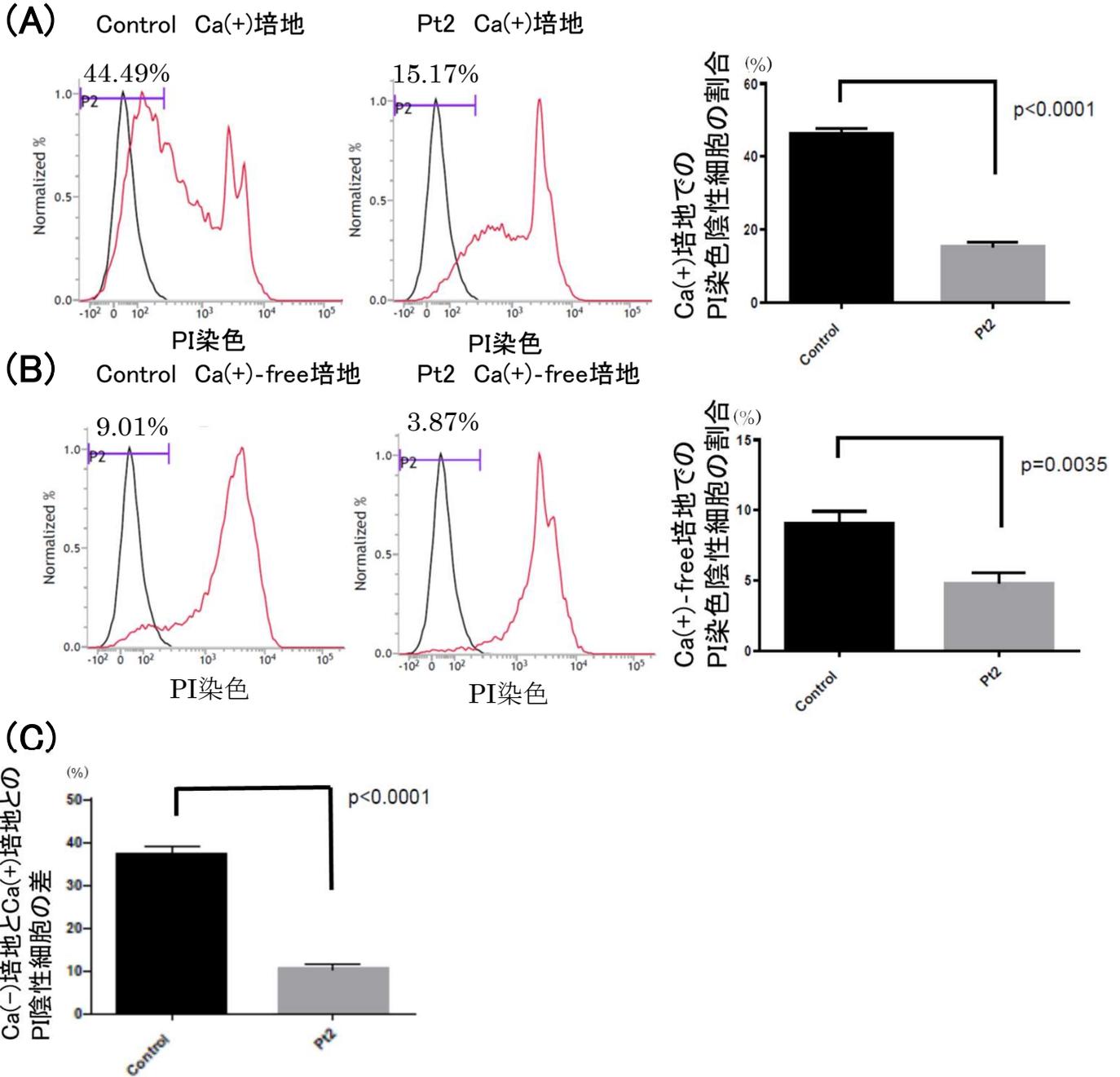


図8 スクレーピングによる細胞質膜損傷後のPI染色によるフローサイトメトリー解析。

横軸は、PI染色の強度、縦軸は細胞数のピークを1としてノーマライズした値を示す。スクレーピングなし、かつPI染色していない細胞のフローサイトメトリー(黒)をもとに、それぞれのPI陰性細胞のカットオフ値を設定した。

エラーバーは標準偏差を用いた。

(A)細胞搔爬後、カルシウム含有培地を投与した群。

(B)細胞搔爬後、カルシウム不含培地を投与した群。

(C)細胞搔爬後、カルシウム含有培地を投与した群のPI染色陰性細胞の割合から、細胞搔爬後カルシウム不含培地を投与した群のPI染色陰性細胞の割合を引いた値の比較。

図9

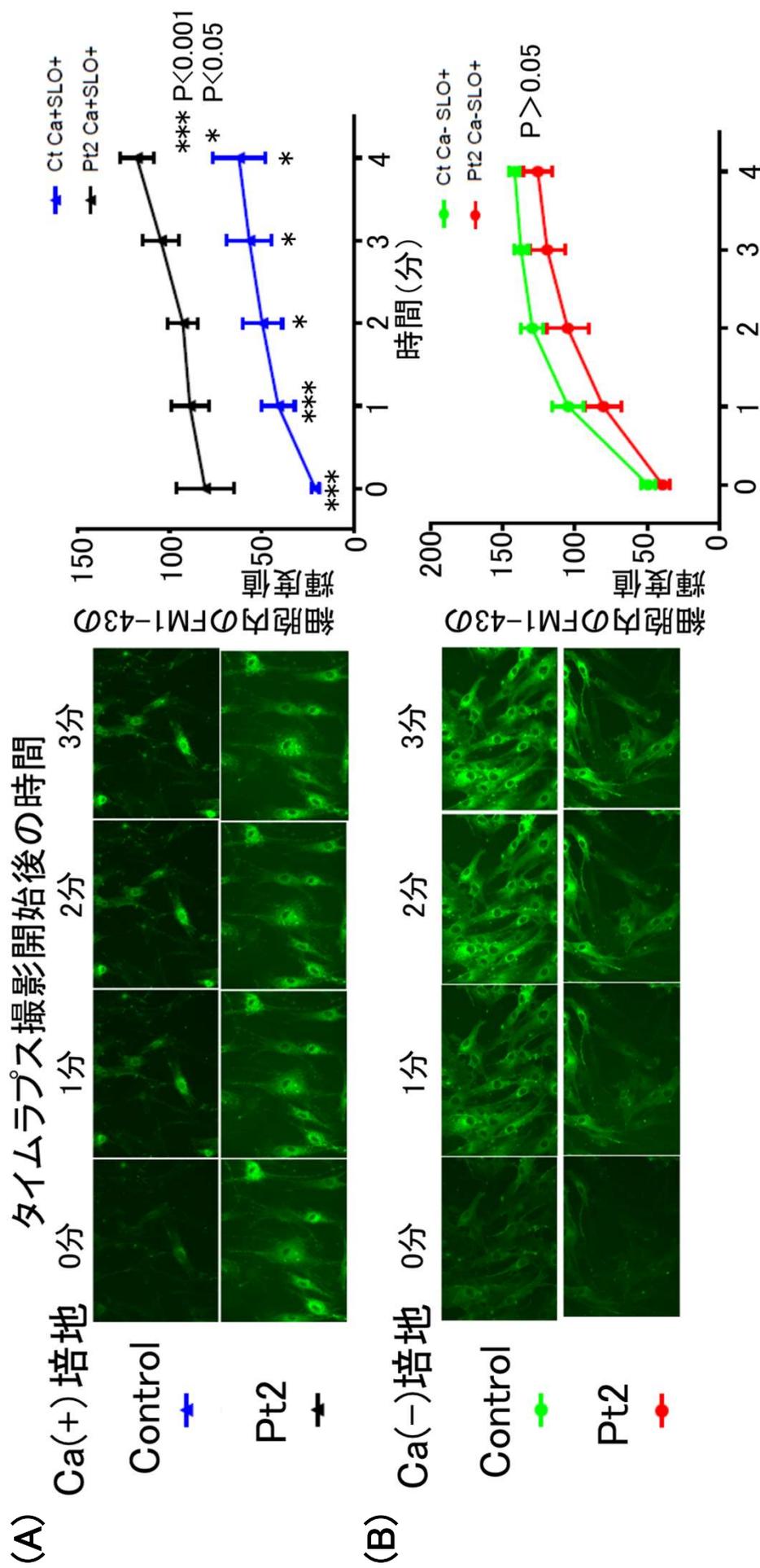


図9 FM1-43染色によるリソソームのエキソサイトーシス解析。

(A) SLO投与後、カルシウム含有培地下でFM1-43による染色をタイムラプス撮影した画像、およびタイムラプス撮影開始からの時間経過とFM1-43の細胞内の輝度値の推移。

(B) SLO投与後、カルシウム不含有培地下でFM1-43による染色をタイムラプス撮影した画像、およびタイムラプス撮影開始からの時間経過とFM1-43の細胞内の輝度値の推移。

SLO投与による細胞膜損傷後、カルシウム存在下では、Pt2の線維芽細胞は、正常線維芽細胞よりも細胞内のFM1-43の輝度値が有意に上昇した。エラーバーは標準偏差を用いた。

図10

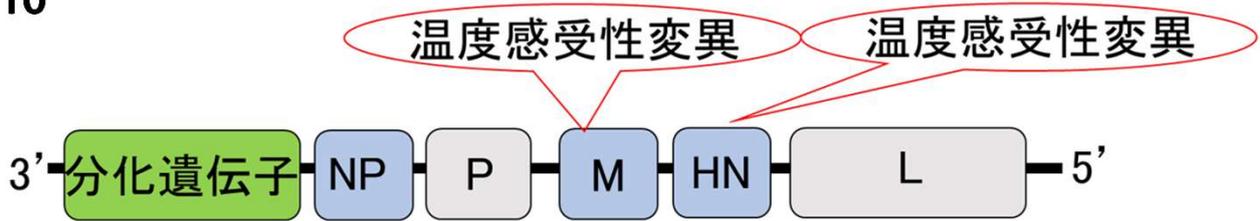


図10 F遺伝子欠失非伝播型センダイウイルスベクターの構造

図11

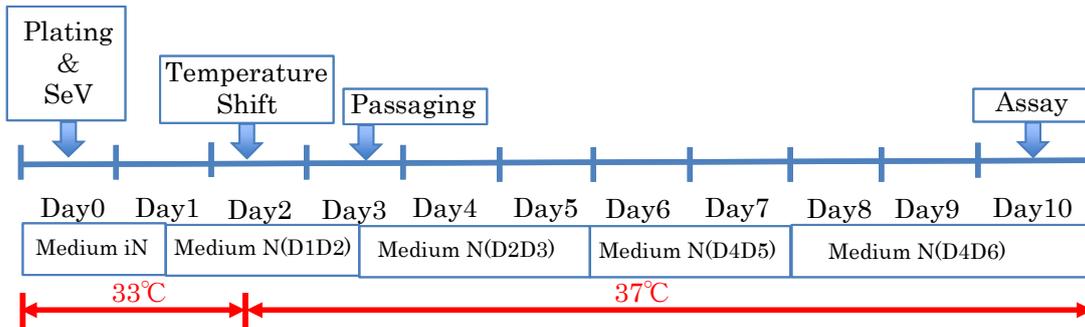


図11 Quick-Neuron™ Dopaminergic SeV Complete Kit プロトコール

図12

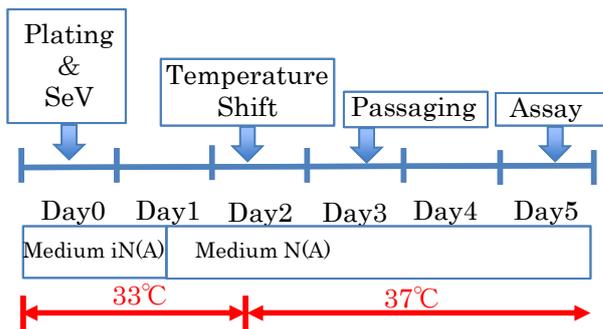


図12 Quick-Neuron™ Cholinergic SeV Complete Kit プロトコール

図13

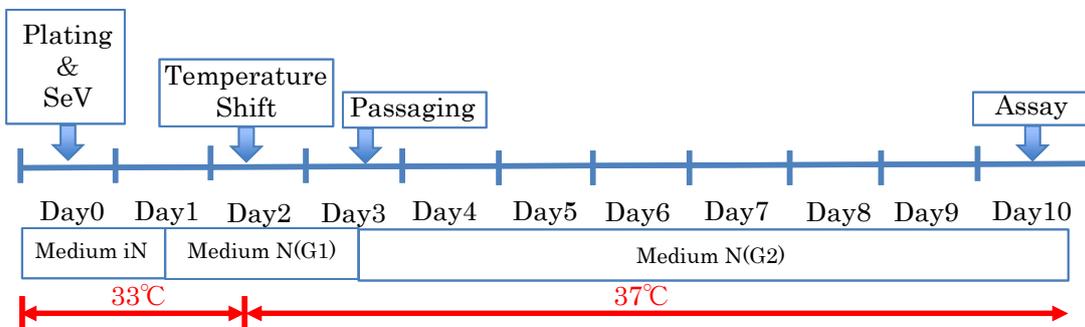


図13 Quick-Neuron™ GABAergic SeV Complete Kit プロトコール

図14

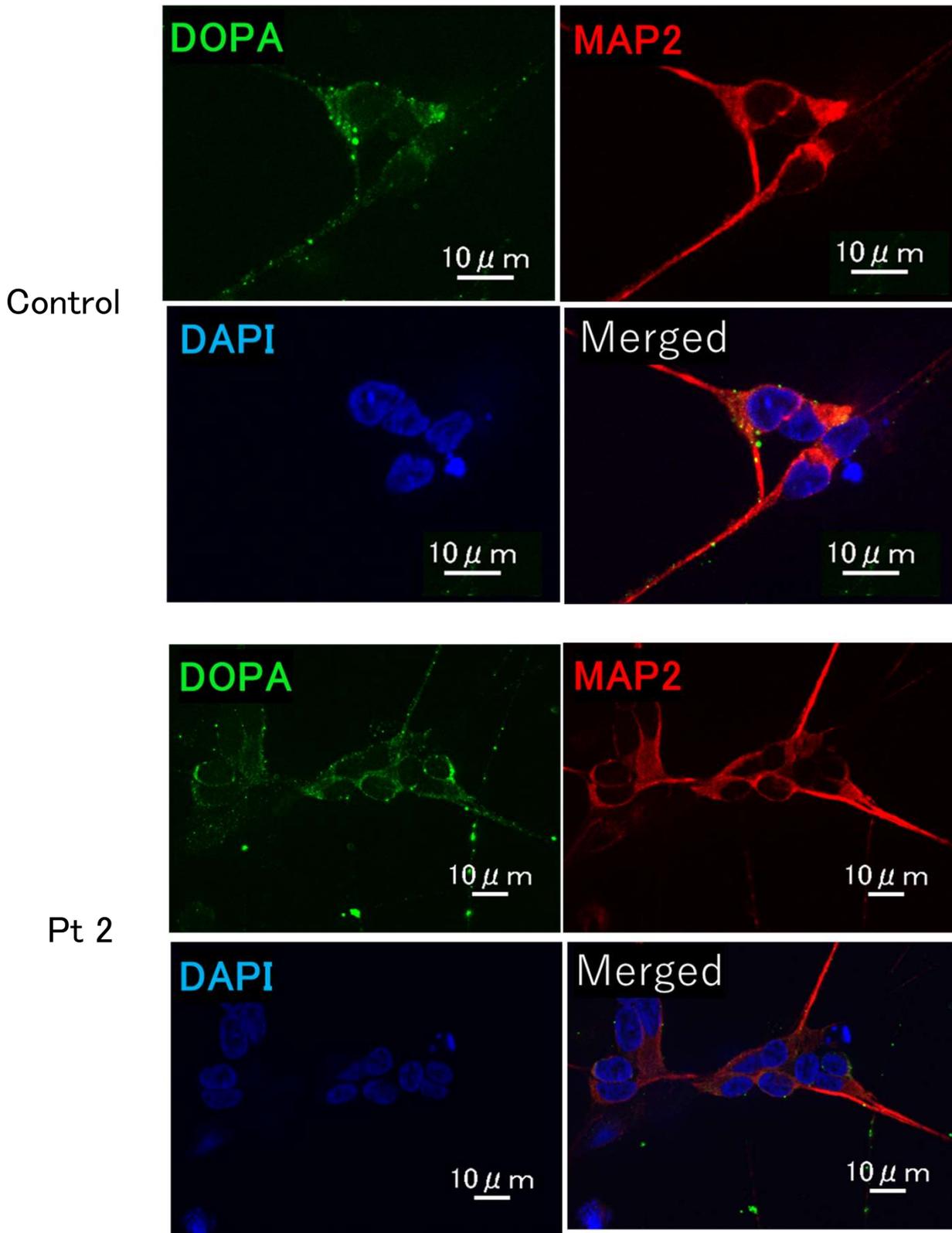


図14 ドーパミン作動性神経細胞の免疫染色 Bars: 10 μ m

図15

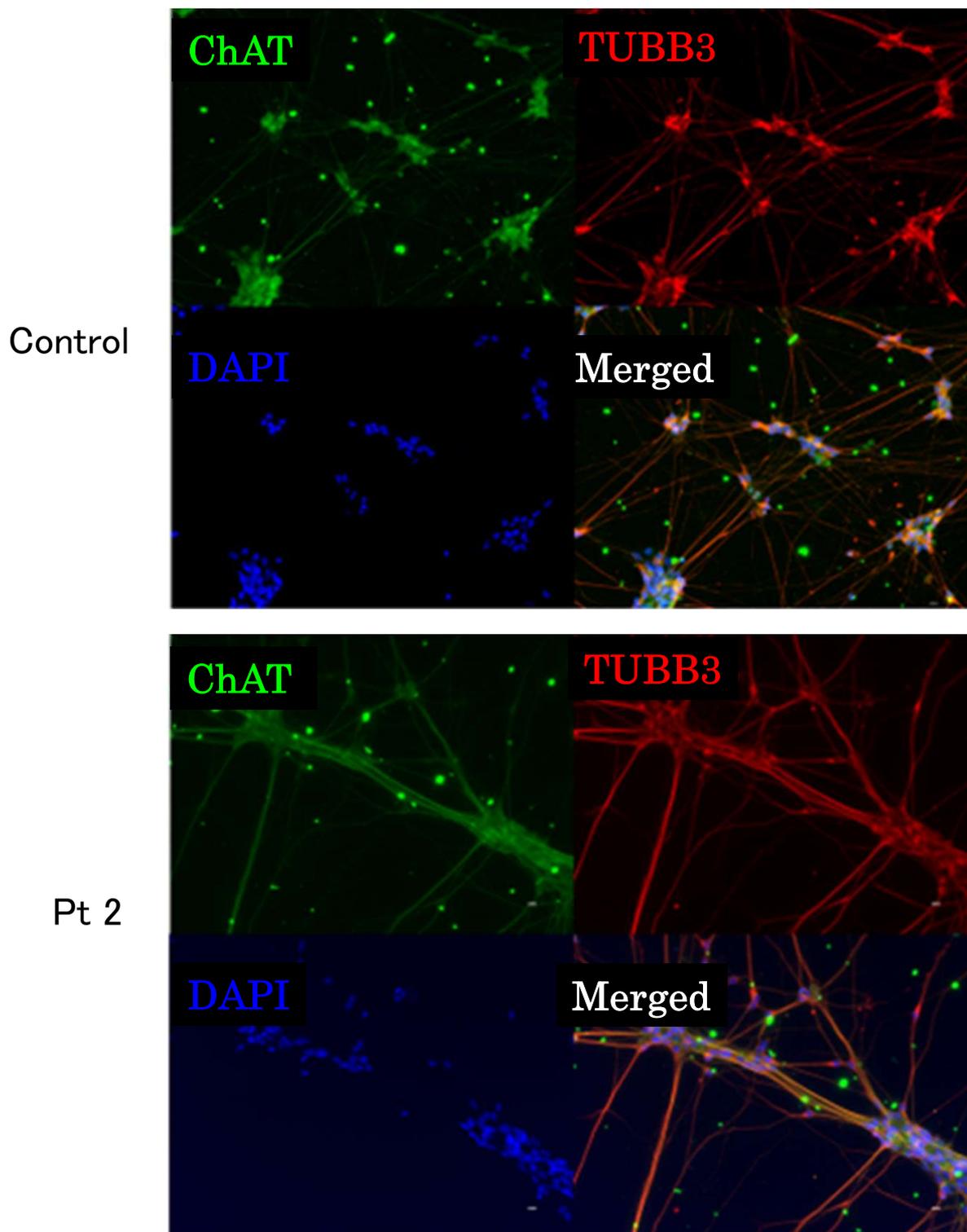


図15 コリン作動性神経細胞の免疫染色 Bars: 10 μ m

図16

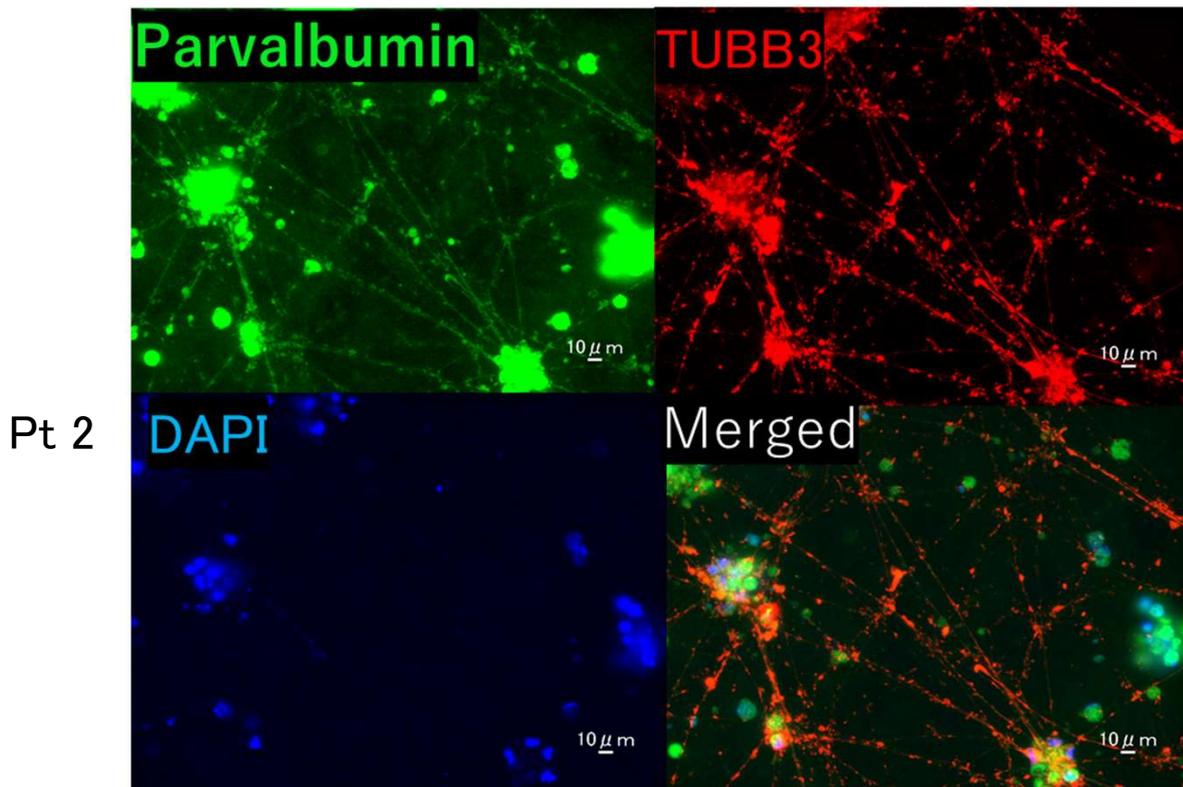
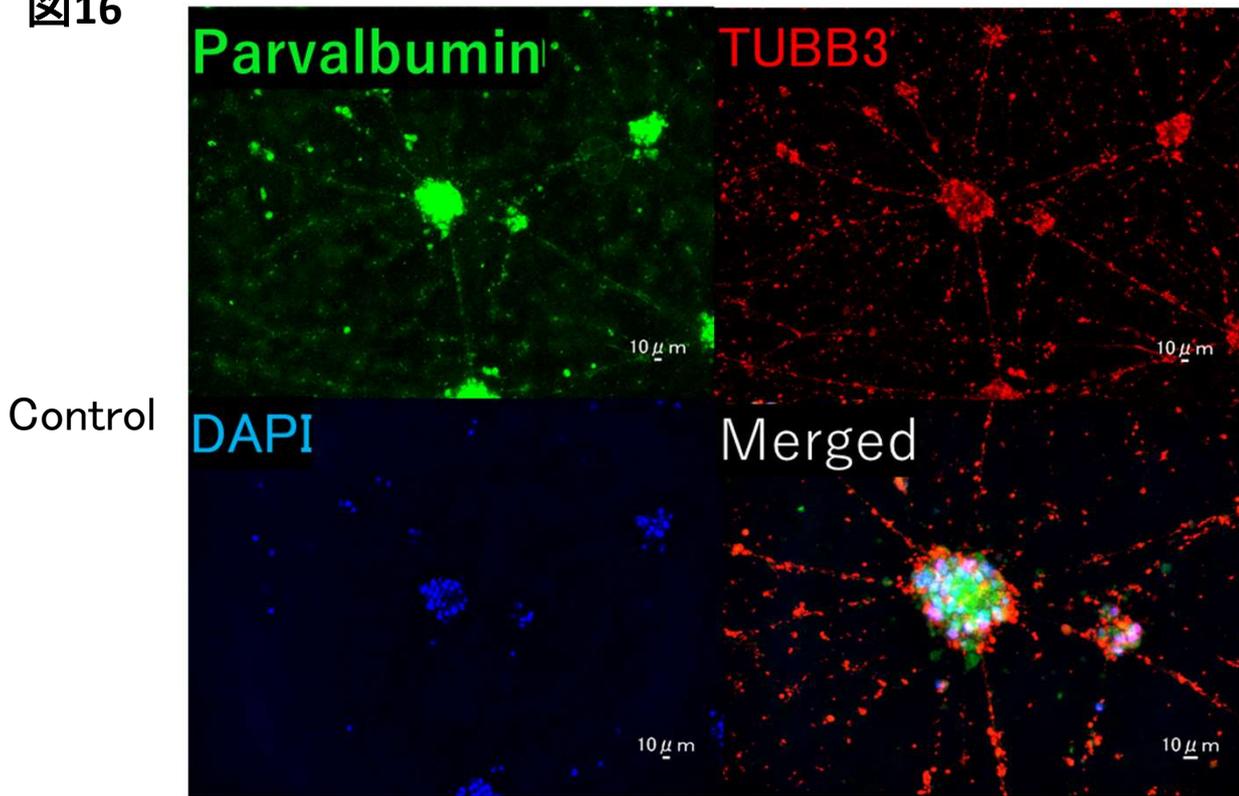
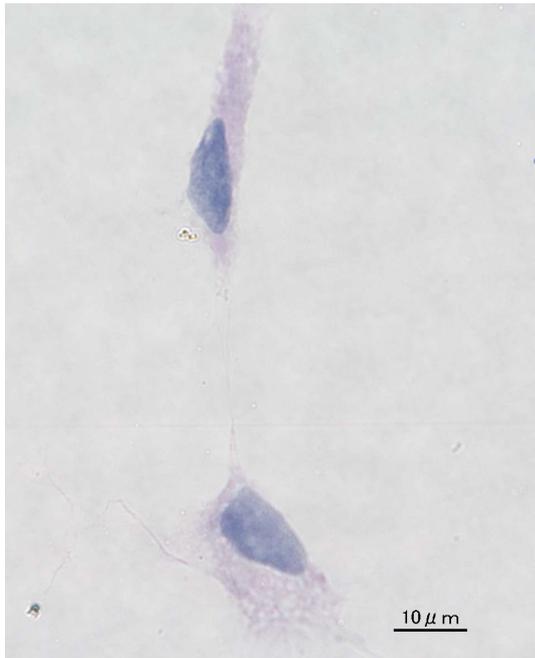


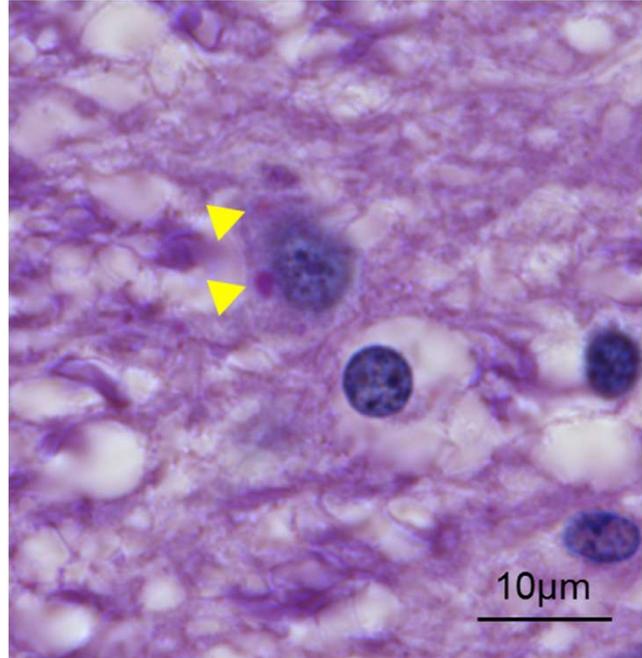
図16 GABA作動性神経細胞の免疫染色

図17

(A) Control



(B) CHS 剖検例



(C) Pt 1



(D) Pt 2

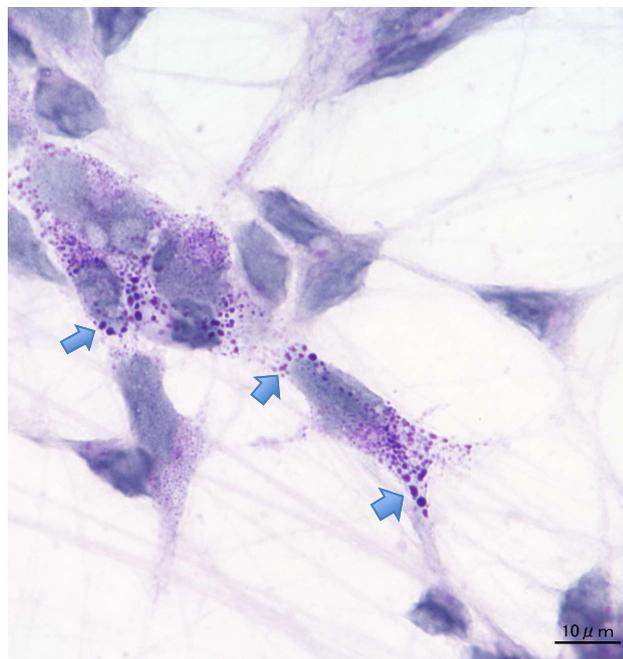
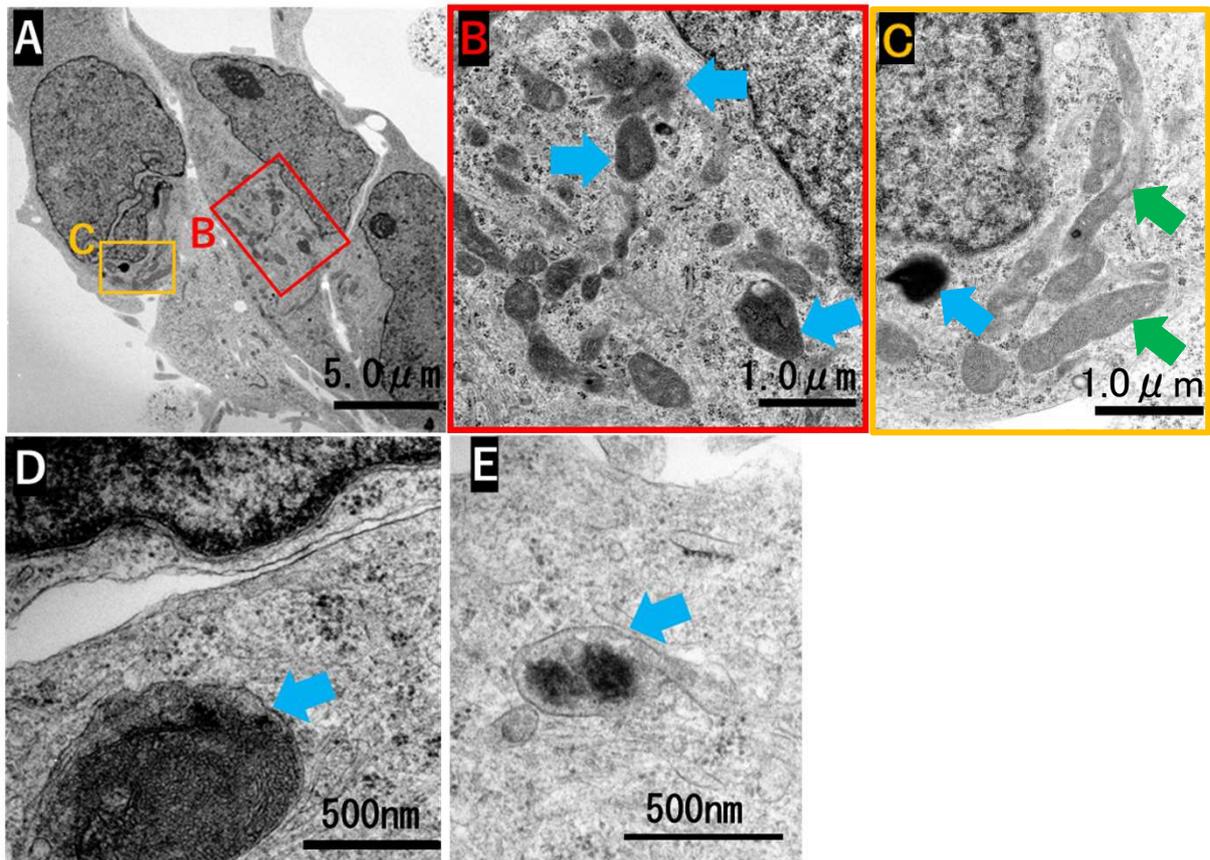


図17 ドーパミン作動性神経細胞のPAS染色および生後9か月の剖検例の中脳黒質神経細胞
黄色矢頭はPAS染色陽性の巨大顆粒、青矢印はリポフスチン様のPAS染色陽性顆粒
(A) 正常iPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞 (B) CHS剖検例の中脳黒質神経細胞
(C) Pt1のiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞
(D) Pt2のiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞

図18

Pt 2



Control

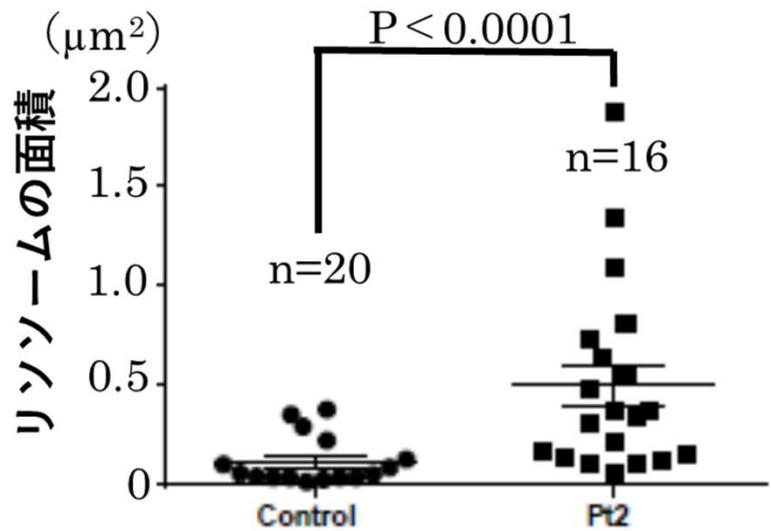
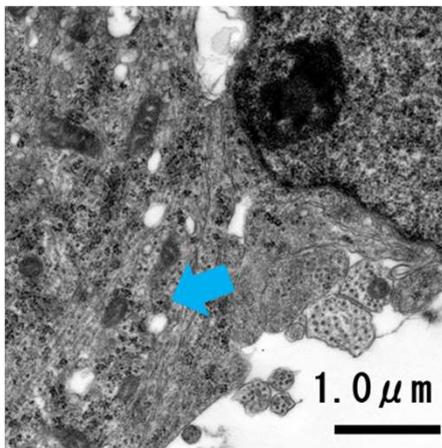


図18 ドーパミン作動性神経細胞の電顕像およびリソソームの切断面の面積

青矢印:リソソーム、緑矢印:ミトコンドリア

A~E:Pt2のiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞

BとCはそれぞれ、Aの赤枠B、黄色枠Cの拡大。

最下段:正常iPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞

グラフは、リソソームの切断面の面積の比較。エラーバーは標準誤差を用いた。

図19

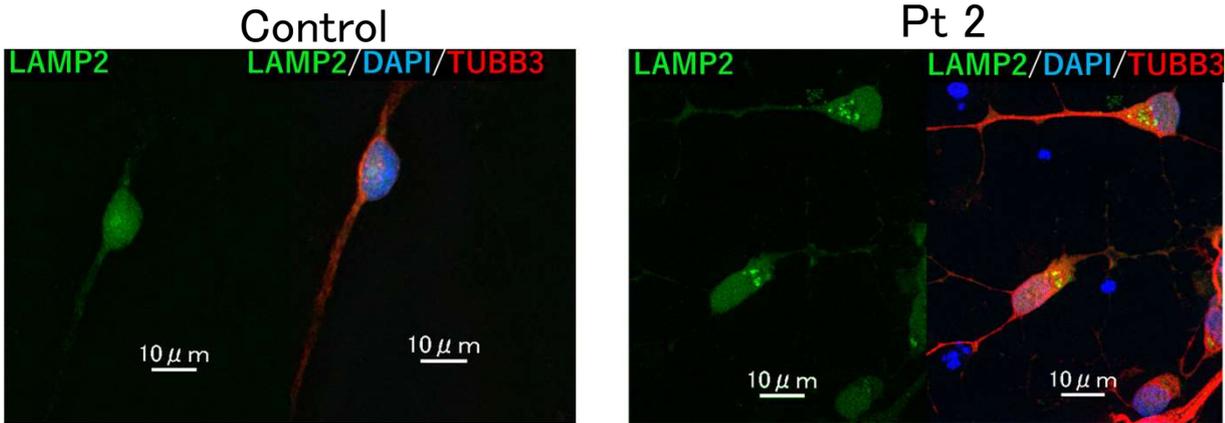


図19 ドーパミン作動性神経細胞のリソソームの免疫染色

図20

Control

Pt 2

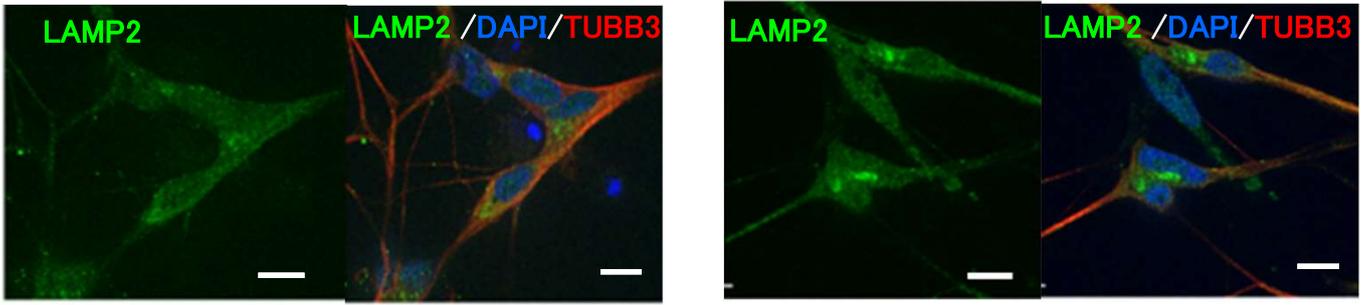


図20 コリン作動性神経細胞のリソソームの免疫染色 Bars:10 μm

図21

Control

Pt 2

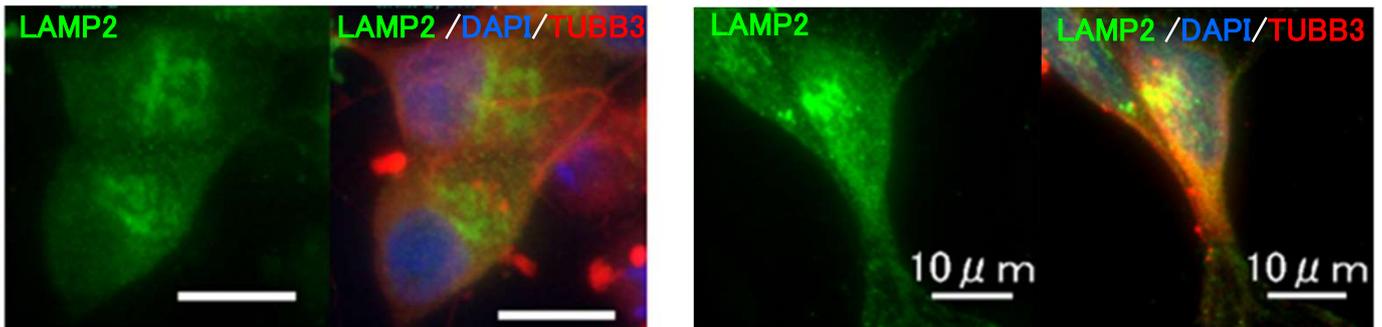


図21 GABA作動性神経細胞のリソソームの免疫染色 Bars:10 μm

図22

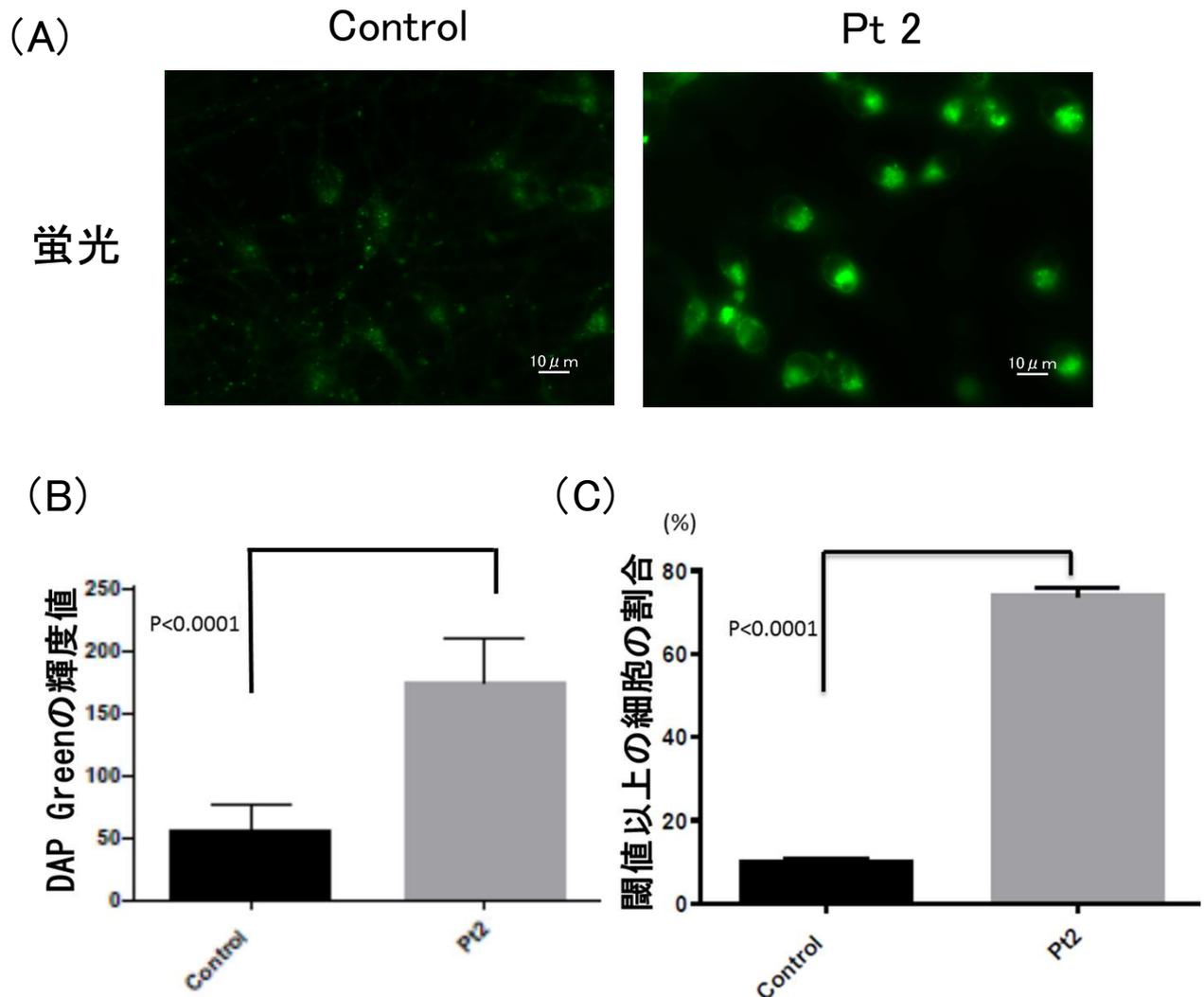


図22 DAP Green染色によるドーパミン作動性神経細胞のオートファゴソームおよびオートリソソームの検出。

- (A) 正常およびPt2のiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞のDAP Green染色。
- (B) 正常およびPt2のiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞のDAP Green染色の輝度値。
- (C) DAP Greenの輝度値が70以上のiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞の割合。
エラーバーは標準偏差を用いた。

図23

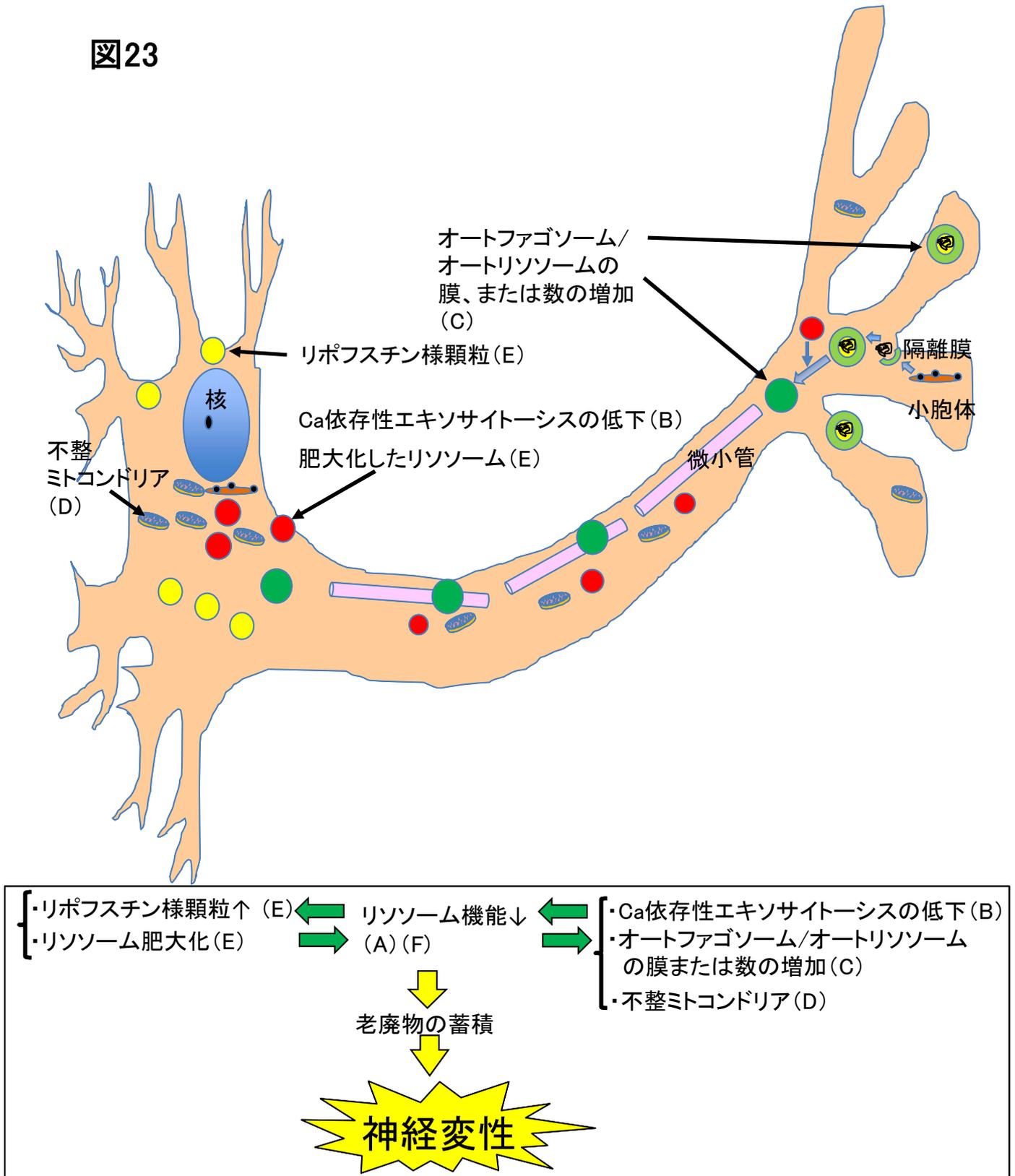


図23 CHSのドーパミン作動性神経細胞における神経変性の病態仮説

リソソーム機能が低下すると(A)、老廃物が蓄積し、神経変性が生じることがわかっている。CHSでは、リソソームのカルシウム依存性エキソサイトーシスによる機能低下(B)、またオートファゴソームやオートリソソームの膜または数の増加(C)、不整ミトコンドリア(D)に加え、リポフスチン顆粒やリソソーム内のPAS陽性物質などが増加(E)していることにより、リソソーム機能がさらに低下する(F)と考えられる。

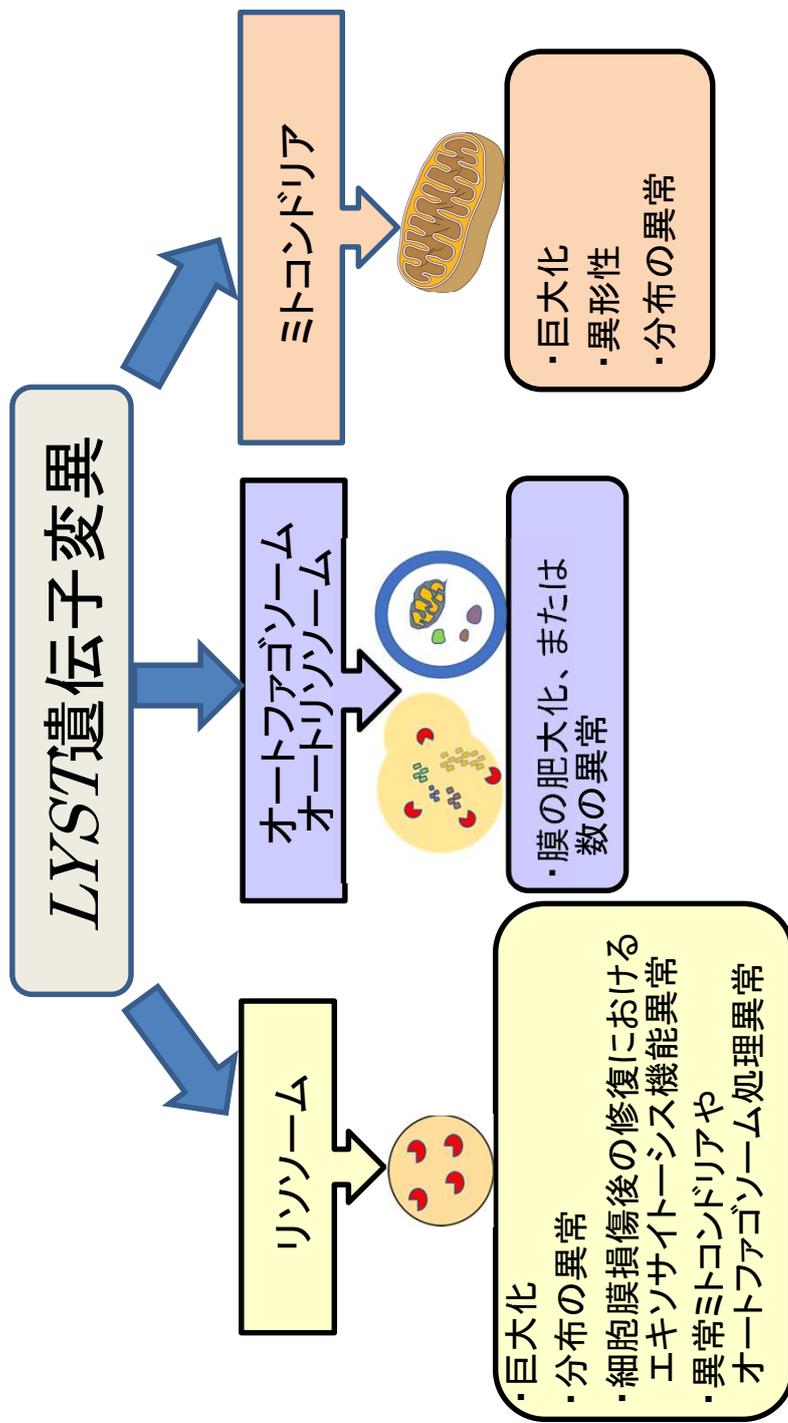


図24 LYST遺伝子変異による細胞小器官の形成異常、機能異常の仮説