

## 論文の内容の要旨

### 1 申請者

防衛医科大学校 植松 賢司

### 2 論文題目

iPS 細胞由来分化神経細胞を用いたミトコンドリアの形態的、機能的解析及び、神経細胞活動電位解析による *DNM1L* 遺伝子関連脳症の病態解明

### 3 論文の内容の要旨 (博士：2,000 字程度)

今回、我々は *Dynamin-1-like gene* (以下、*DNM1L* 遺伝子) 異常を有し、早期乳児てんかん性脳症と Leigh 脳症様の臨床病型を呈した非常にまれな症例を経験した。熊本大学の同遺伝子関連脳症と合わせた 2 例の *DNM1L* 遺伝子変異を有する患者由来 iPS 細胞から神経細胞を分化し、ミトコンドリアの形態及び機能の解析、神経細胞活動の解析を通して、同遺伝子関連脳症の病態解明を行った。

*DNM1L* 遺伝子異常を有する患者は発達障害、眼球運動障害、てんかん性脳症を起こすと報告されている。また、*DNM1L* 遺伝子は、ミトコンドリアの分裂に関与しており、過去に同遺伝子異常を有する患者由来線維芽細胞において伸長したミトコンドリアの形態異常の報告がある。また、機能解析として、同遺伝子異常を有する患者由来線維芽細胞におけるミトコンドリア膜電位や酸素消費量の低下を認めた報告がある。しかしながら、同遺伝子変異を有する神経細胞での形態及び機能解析の報告は過去に存在しない。

そこで我々は本変異による脳症の病態解明のため、神経細胞での解析を要すると考えた。

これまでの研究報告を踏まえて、以下の様な仮説を提唱した。

- ① *DNM1L* 遺伝子変異による分裂障害から伸長したミトコンドリアが形成され、形態異常を呈する。
- ② *DNM1L* 遺伝子変異による DRP1 蛋白のミトコンドリア集積障害から、autophagosome が形成されず、その結果 mitophagy 障害を生じる。
- ③ ①及び②から異常ミトコンドリアを取り込めない、または処理できないため、品質管理が困難となり、神経細胞内に異常ミトコンドリアが蓄積する。異常ミトコンドリアは、ミトコンドリア膜電位の低下と OCR の低下というミトコンドリア機能障害を来す。
- ④ 神経細胞活動に異常を生じる。

以上の仮説から脳症を発症すると考えた。

仮説に基づいて、患者線維芽細胞由来の iPS 細胞から神経細胞を分化誘導し、そのミトコンドリアにおける形態および機能の解析、神経細胞の活動解析を行った。

まず、分化誘導した細胞が神経突起様の構造物を伸ばしていることを確認し、合わせて免疫染色にて神経細胞に特異的な TUBBIII 抗体の発現を確認した。

次に電子顕微鏡で分化神経細胞におけるミトコンドリアの形態を観察した結果、伸長したミトコンドリアが健常人由来の神経細胞と比して多く存在しており、患者由来神経細胞で初めてミトコンドリアの形態異常があることを示した。

また、分化神経細胞における mitophagy の評価を行った結果、患者由来神経細胞で mitophagy 障害が生じていることを示した。

続いて、分化神経細胞におけるミトコンドリアの機能解析として、JC-1 抗体によるミトコンドリア膜電位の評価を行い、患者由来神経細胞でのミトコンドリア膜電位低下を示した。

更に分化神経細胞のミトコンドリアにおける酸素消費速度の解析を行った結果、患者由来神経細胞では複合体 I、II における酸素消費速度が低下していることを示した。

最後に神経細胞活動の評価として、微小電極アレイを用いた活動電位評価を行った。ミトコンドリア膜電位を低下させることで、機能低下を起こす m-chlorophenylhydrazine (CCCP) を負荷し、神経細胞発火数及び同期バースト発火数が低下していたことから、神経細胞活動が低下していることを示した。

以上の結果を踏まえ、以下の様に結論付けた。

- ・患者由来 iPS 細胞を樹立し、神経細胞を分化誘導した。
  - ・分化誘導した神経細胞における疾患のミトコンドリア形態異常及び mitophagy 障害を示した
  - ・分化誘導した神経細胞におけるミトコンドリア機能異常を証明した
  - ・分化誘導した神経細胞機能低下を証明した
  - ・DNM1L 関連脳症の病態を解明し、in vitro における疾患モデルを構築した。
- 今後はこの疾患モデルを利用して、脳症全般の病態解明やミトコンドリア機能改善薬による脳症治療開発への発展が期待できる。

#### 4 キーワード（5 個程度）

「DNM1L 遺伝子」、「ミトコンドリア形態異常」、「ミトコンドリア膜電位」、「mitophagy」、「ミトコンドリア酸素消費速度」、「微小電極アレイ」、「脳症」