

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、機能的解析による
DNM1L 遺伝子関連脳症の病態解明

うえ まつ けん じ
植 松 賢 司

(成長発達臨床医学専攻)

防衛医科大学校

令和3年度

目次

| | | |
|--|------------------------------|------|
| 第1章 緒言 | | |
| 第1節 | <i>DNMIL</i> 遺伝子について | 1 頁 |
| 第2節 | <i>DNMIL</i> 変異によるヒト疾患について | 2 頁 |
| 第3節 | 今回の研究の目的 | 2 頁 |
| 第2章 <i>DNMIL</i> 変異を有する脳症患者の同定とその臨床的特徴 | | |
| 第1節 | 症例 1 (NDMC 例) | 5 頁 |
| 第2節 | 症例 2 (KA 例) | 5 頁 |
| 第3章 材料と方法 | | |
| 第1節 | 疾患由来 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導とその証明 | 7 頁 |
| 第2節 | 分化神経細胞におけるミトコンドリア形態解析 | 8 頁 |
| 第3節 | 分化神経細胞における Mitophagy の評価 | 9 頁 |
| 第4節 | 分化神経細胞におけるミトコンドリア膜電位解析 | 10 頁 |
| 第5節 | 分化神経細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度の測定 | 11 頁 |
| 第4章 結果 | | |
| 第1節 | 疾患由来 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導とその証明 | 13 頁 |
| 第2節 | 分化神経細胞におけるミトコンドリア形態解析 | 13 頁 |
| 第3節 | 分化神経細胞における Mitophagy の評価 | 14 頁 |
| 第4節 | 分化神経細胞におけるミトコンドリア膜電位解析 | 14 頁 |
| 第5節 | 分化神経細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度の測定 | 14 頁 |
| 第5章 考察 | | 16 頁 |
| 第6章 結論 | | 21 頁 |
| 謝辞 | | 22 頁 |
| 略語一覧 | | 23 頁 |

引用文献

24 頁

図表

28~43 頁

第1章 緒言

我々の研究グループでは、*Dynamamin 1-like (DNM1L)*変異を有し、早期乳児てんかん性脳症 (early infantile epileptic encephalopathy : EIEE)と Leigh 脳症様の臨床病型を呈した症例を経験した。この症例については、平成 30 年度座波の学位論文「早期乳児てんかん性脳症および Leigh 脳症様の表現型を呈した *DNM1L* 遺伝子関連脳症についての iPS 細胞を用いた病態解析」で報告された。また、熊本大学でも *DNM1L* 関連脳症の症例がみられた。本研究では、本校及び熊本大学の 2 例の患者由来 induced pluripotent stem (iPS) 細胞から分化誘導した神経細胞におけるミトコンドリアの形態及び機能に注目して解析を進め、*DNM1L* 遺伝子関連脳症の発症機構を明らかにすることを目的とした。

第1節 *DNM1L* 遺伝子について

DNM1L は、細胞内のミトコンドリアおよびペルオキシソームの分裂を制御する DRP1 をコードする核遺伝子である。DRP1 は dynamin スーパーファミリーに属する蛋白質であり、GTPase domain, central domain, variable domain, GTPase effector domain (GED) の各ドメインをもち、ミトコンドリアおよびペルオキシソーム分裂において主要な役割を担っている(1)。DRP1 は細胞質内に広く分布するが、ミトコンドリアやペルオキシソームの分裂にあたり、分裂部位の周囲に集合し、四量体およびその高次アッセンブリーを形成し、GTPase 活性により分裂を遂行するが、central domain のミスセンス変異は、DRP1 が四量体形成した以降の機能が障害されている(2)。

細胞内において、ミトコンドリアは融合・分裂を行いながらダイナミックに形態を変化させており、ミトコンドリア機能の恒常性を維持していると考えられている(1)。細胞寿命の長い神経細胞においては、新たにミトコンドリアの供給を受けることができないため、ミトコンドリアの恒常性維持は非常に重要であり、従って何らかの理由により

ミトコンドリアの機能異常が生じた場合、神経細胞のダメージを来しやすい。DRP1 は、ミトコンドリアの分裂に関与するほぼ唯一の蛋白質であり、その機能異常が中枢・末梢神経障害に関与することは明らかであるが、詳細なメカニズムについてはまだ不明な点が多い。

第2節 *DNM1L* 変異によるヒト疾患について

DNM1L 変異によるヒトの疾患については、Waterham らが小頭症、筋緊張低下、乳酸アシドーシスを呈し、生後 1 か月で死亡した小児例を報告したのが最初である(1)。我々の経験した症例は、乳児期早期から重度の筋緊張低下、脳波で suppression-burst を伴う難治性てんかん、進行性の脳・脳幹部萎縮を呈し、生後 18 か月で死亡した(3)。他にも *DNM1L* 変異により、先天性の筋緊張低下、てんかん、知的障害、視神経炎など種々の中枢神経障害を来すことが報告されている ((1), (4), (5), (6), (7) 表 1)。患者由来の皮膚線維芽細胞の観察では、管状に異常伸展したミトコンドリア、ペルオキシソームを認めており、*DNM1L* 変異が dominant negative に作用し、ミトコンドリア、ペルオキシソームの分裂阻害を生じることが示されている (1, 3, 8)。

第3節 今回の研究の目的

DNM1L 変異による DRP1 機能の異常については、これまでに哺乳類細胞、酵母、ショウジョウバエなどでの報告がなされている。線維芽細胞におけるミトコンドリアやペルオキシソームの形態異常を示す報告が多いが(1, 3, 4)、ショウジョウバエでの強制発現により唾液腺や筋組織における著明な形態異常、分布異常を示す報告もある(5)。しかし神経細胞における形態や機能の異常については、これまでに報告がない。

DRP1 のマウスにおけるホモログである Drp1 を欠失したマウスは、胎生致死を示

し、神経、心臓、肝臓など全身の臓器に影響が及んでいるが、特に前脳の発達に強い障害が生じている(9)。Drp1 欠失神経細胞では、神経突起の減少やシナプスの無形成が観察されており、原因としてミトコンドリアの凝集により神経細胞内でのミトコンドリア分布に異常があり、エネルギー不足が生じることが考えられている(9)。細胞内でのミトコンドリア分布の異常については、特に高度の細胞極性を示す神経細胞でその影響が大きいと考えられている(9)。

また DRP1 によるミトコンドリアの分裂は、細胞内で何らかのダメージを受けたミトコンドリアの一部を感知して分離し、ミトファジーにより処理するミトコンドリア品質管理システムに関与していると考えられており(10)、*DNM1L* 変異によりこのミトコンドリア品質管理システムも機能し難くなることが予想される。Mitophagy とはミトコンドリア分解に特化した autophagy の一種で、損傷後に機能回復しないミトコンドリアを autophagosome 内に取り込み、リソソームが結合することで autolysosome を形成して、消化する機構である(図 1、図 2a, b)。飢餓培地の酵母において mitophagy が起きた際に、取り込まれたミトコンドリアが粒状に観察された報告があることから(11)、mitophagy ではミトコンドリアを粒状に分裂させて取り込む必要があると考えられる。DRP1 はミトコンドリアの分裂制御を介して、mitophagy に関与するという報告がある(12, 13)。また、autophagosome 形成に必要な Light-Chain-III 蛋白質に働くことで autophagosome 形成へ関与し、mitophagy 機能自体に関与する報告もある(14)(図 1)。

細胞保護の観点からは、DRP1 がミトコンドリア分裂制御を介して、酸化ストレスの抑制とそれに伴う細胞死を予防するという報告がある(15)。代表的なミトコンドリア病である MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes) や、ミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I の異常を有する Leigh 脳症患者の線維芽細胞において、細胞内 DRP1 は有意に増加し、ミトコンドリアの著明な断片化を来たし、その結果酸化ストレスの増加によるアポトーシスを抑制するとされる(15)。

以上の先行研究を踏まえて、*DNM1L* 変異による脳症発症機序について以下の仮説を立てた (図 3)。

- ① *DNM1L* 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* 変異による DRP1 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酸素消費速度 (oxygen consumption rate: 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。

今回我々は、*DNM1L* 変異を有する 2 症例の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、さらに iPS 細胞を神経細胞に分化誘導し、神経細胞におけるミトコンドリアの形態、酸素消費速度、膜電位、およびミトファジーなど、多方面から機能評価を行った。*DNM1L* 変異による疾患の主座となるのは高い細胞極性をもつ神経細胞であり、その病態メカニズムの解明を目指した。

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」、及び受付番号 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、同研究所より疾患 iPS 細胞を供与された。熊本大学とは、「研究資料の

提供に関する覚書(Material Transfer Agreement)」を締結し、疾患 iPS 細胞を供与された。

第 2 章 *DNM1L* 変異を有する脳症患者の同定とその臨床的特徴

以下に今回の研究対象とした *DNM1L* 変異を有する脳症患者 2 例について、遺伝子変異および臨床的特徴を提示する。

症例 1 (*NDMC* 例) (図 4-6)

症例 1 については、以前報告されている(3)。簡潔にまとめると、生後 1 か月から哺乳不良及び体重増加不良を認め、生後 6 か月から乳児 spasms が出現し、脳波では suppression-burst を示した (図 5b)。てんかんは各種治療に抵抗性であり、著明な知的および運動発達の遅滞を認めた。生後 18 か月で呼吸不全及び心不全のため死亡した。全エクソーム解析で *DNM1L* 遺伝子の central domain に新規ミスセンス変異 (c.1217T>C, p.Leu406Ser) をヘテロ接合性に認めた (図 6a)。ゲノムデータベースに記載のない変異であり、SNP 機能予測アルゴリズム (SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster) による解析は、いずれも病的意義を示す結果であった。遺伝子変異が central domain に存在したこと、また皮膚線維芽細胞の細胞染色でミトコンドリアおよびペルオキシソームの形態異常を認めたことから、この遺伝子変異が疾患の原因であると判断した(3)。骨格筋の組織病理所見では異常を認めなかったが、脳実質の組織病理所見で動眼神経核、上丘を中心に広範囲に血管増生と海綿状変化を認め、神経細胞脱落の所見を認めた(図 5c, d)。

症例 2 (KA 例)

1 歳までは定型発達で、体格もよく生育していた。1 歳過ぎに突発性発疹への罹患を契機に急激に呼吸不全と心不全が進行し、気管挿管及び人工呼吸管理、体外式膜型人工肺装着を要した。治療抵抗性の多臓器不全（心不全、腎不全、肝不全、呼吸不全）を認め、現在の活動度は寝たきりの状態である。細胞外フラックスアナライザーを用いた患者の線維芽細胞の解析で、OCR の低下（正常コントロールの 20%）を認め、ミトコンドリア病の存在が疑われた。全エクソーム解析にて、*DNM1L* の variable domain に新規ミスセンス変異(c.1757C>A, p.Thr586Lys)を認めた(図 6b)。SNP 機能予測アルゴリズム（SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster）は SIFT では tolerant であったが、PolyPhen2; possibly damaging, MutationTaster; disease causing の結果を示した。dbSNP、ExAc、3.5KJPN などのゲノムデータベースに記載のない変異であり、OCR の結果と合わせて病的意義のある変異であると考えた。

これら 2 症例の内、症例 1 については、過去に同じ central domain における変異報告がみられており、過去の報告とほぼ同様にてんかん性脳症、発達障害、眼球運動障害を呈していた(表 1)。症例 2 の変異部位については、過去に報告がみられていない。

第3章 材料と方法

第1節 疾患由来 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導とその証明

iPS 細胞培養

患者由来 iPS 細胞は、NDMC 例及び KA 例を用いた。NDMC 例については、京都大学 iPS 細胞研究所との共同研究により iPS 細胞を樹立した。KA 例については、熊本大学において樹立された iPS 細胞の供与を受けた。コントロールとして、アジア人由来健康人 iPS 細胞(Phenocell SAS, Grasse, France)を使用した。iPS 細胞の培養液は、Stem Fit AK02N (味の素、東京)を使用した。継代時の培養液は、終濃度 $10 \mu\text{M}$ の Y-27632 入り培養液を使用した。コーティング剤は Laminin-511 E8 (i-Matrix) を $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で使用した。

神経細胞への分化

Sendai Virus (以下、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、非伝播型に改編したベクターを用いた。SeV18/TS Δ F 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、且つ 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/TS Δ F ベクターの 3'端に導入している。神経細胞への分化は、Quick-NeuronTM Mixed SeV Complete kit (Elixigen Scientific, Baltimore, MD)を用いて行った(図 7)。

分化神経細胞の観察

神経細胞の観察は、Olympus IX-70 (Olympus、東京)を用い、対物レンズの倍率は

20 倍で、蛍光抗体の観察は Keyence BZ-X700(キーエンス、大阪)を用いた。対物レンズの倍率は 100 倍（油浸）で観察した。

分化神経細胞の免疫染色

分化神経細胞を 4%のバラホルムアルデヒドで固定した後、1 次抗体として、神経細胞へ特異的に染色される抗 neuron-specific beta-III Tubulin Antibody (以下、TUBB-III 抗体) (R&D systems, Minneapolis, FL)を 500 倍希釈で用いた(16)。その後、二次抗体として、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, Waltham, MA)を 2000 倍希釈で用いた。

第 2 節 分化神経細胞におけるミトコンドリア形態解析

DNM1L 変異は皮膚線維芽細胞で管状に伸長したミトコンドリアの形態異常を示す。我々は iPS 細胞から分化誘導させた神経細胞の観察において、ミトコンドリアが同様の形態異常を示すことを見いだした（非表示データ）。コントロール神経細胞との差を明らかにするため、電子顕微鏡による定量的な解析を試みた。

電子顕微鏡による観察として、4well の Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)上に播種した分化神経細胞を 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混合液により 2 時間の前固定を行い、さらに 1%オスミウムによる 1 時間の後固定により試料作製を行った。電子顕微鏡 JEM-1400Plus (日本電子, 東京)を用い、ミトコンドリアを 2000—3000 倍で平面方向において観察した。ミトコンドリア長径測定は Keyence 蛍光顕微鏡の付属ソフトである Keyence Analyzer (キーエンス、大阪)に撮影画像を取り込んで行った。

アラインメントが不明瞭なものや、画像内に収まらずに切れているミトコンドリアは除外し、境界が明瞭なものを計測した。分枝しているミトコンドリアについては、

最も長い分枝で測定した。

測定した全ミトコンドリア長径の比較を Kruskal-Wallis 検定で行った。また、健康人由来神経細胞におけるミトコンドリア長径の 90%ile 値である $1.74\mu\text{m}$ 以上を「伸長したミトコンドリア」と判定し、「伸長したミトコンドリア」の個数が疾患と健康人由来神経細胞間で差があるかの比較検討を χ^2 検定で行った。統計分析は Prism (version 6.07; GraphPad software, CA) を使用した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

第3節 分化神経細胞における Mitophagy の評価

Mitophagy は第1章に示す通り、ミトコンドリアの品質管理の一端を担っており、DRP1 は、autophagosome 形成を通して mitophagy の進行に関与していると考えられる(図2)。そのため、*DNM1L* 変異を有する場合、ミトコンドリア形態異常により伸長したミトコンドリアを autophagosome 内に取り込むことができなくなり、異常ミトコンドリアを消化できないと考えられる。そこで我々は *DNM1L* 変異をもつ分化神経細胞において、mitophagy 障害についての評価を行った。

Mitophagy の評価として、Mitophagy Detection Kit (同仁化学、熊本)を用いた(17)。ミトコンドリアがリソソームと融合し、酸性条件下に置かれることで mitophagy dye の赤色蛍光強度が増大し、lyso dye の緑色蛍光と merge された部分で mitophagy が生じていると判断する(図 2)。ミトコンドリアを終濃度 $0.1\mu\text{M}$ の赤色蛍光 mitophagy dye で染色した後、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で 30 分間培養した。続いて、ライソゾームを緑色蛍光の lyso dye を終濃度 $1\mu\text{M}$ で染色した後、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で 30 分間培養し、観察した。蛍光観察は Leica TCS SP8X (Leica, Wetzlar, Germany)で行った。

核周囲のミトコンドリアにおいて、mitophagy dye の強い赤色蛍光と lyso dye の緑色蛍光とが merge して黄色蛍光となる部分を mitophagy が生じたミトコンドリアと判断した。mitophagy の生じたミトコンドリアの数を測定し、細胞数で補正して算出した。

正常は 79 個、NDMC は 84 個、KA は 68 個の細胞で測定した。

統計分析は Prism (version 6.07) を使用し、Dunnett 検定を用いた。全てのデータは、平均値±標準誤差で表現した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

第4節 分化神経細胞におけるミトコンドリア膜電位解析

ミトコンドリアはその膜電位を利用して酸化的リン酸化によりエネルギー産生を行うため、膜電位はミトコンドリア機能を反映する。つまり、ミトコンドリア膜電位低下は、その機能低下を示す。DNMIL 変異を有する場合、異常ミトコンドリアが蓄積し、そのミトコンドリアは膜電位が低下していると考えられる。実際に同遺伝子変異を有する患者由来線維芽細胞におけるフローサイトメーターを用いた評価では、膜電位の低下が報告されている(18)。今回我々は、ミトコンドリア膜電位依存性の高い 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolo-carbocyanine iodide (JC-1) と呼ばれる蛍光色素を用いて、疾患由来神経細胞におけるミトコンドリア膜電位の評価を行った(19)。JC-1 色素は膜電位の高いミトコンドリアに集積することで polymer を形成して赤色蛍光を発する一方、膜電位の低いミトコンドリアでは集積する濃度が低く monomer として緑色蛍光を発するという特徴がみられる。

ミトコンドリア膜電位評価として、JC-1 MitoMP Detection Kit (同仁化学、熊本) を使用した。本 kit は JC-1 色素と専用の Imaging Buffer で構成されている。まず、終濃度 $1 \mu\text{M}$ の JC-1 抗体溶液を分化神経細胞に入れ、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で 30 分間培養した。その後、Imaging Buffer 2ml/well に置換して観察を行った。各群 50 個の細胞を観察し、撮影画像を Keyence Analyzer (キーエンス、大阪) へ取り込み、膜電位の高い赤色の蛍光輝度と膜電位の低い緑色の蛍光輝度の比率を算出した。蛍光の観察は Leica TCS SP8X (Leica) で行った。統計分析は Prism (version 6.07) を使用し、Dunnett 検定を用いた。全てのデータは、平均値±標準誤差で表現した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定し

た。

第5節 分化神経細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度の測定

ミトコンドリアは酸化的リン酸化の過程で、内膜に存在する I～V の呼吸鎖酵素複合体を用いて ATP 産生を行っている。複合体 I, II は ATP 産生に必要な大部分の H⁺ を産生し、その H⁺ と酸素の消費により複合体 IV, V で ATP が産生される。そこで、複合体 I, II の基質や阻害剤投与により経時的なミトコンドリア酸素消費量の変化、つまり OCR 変化を起こすとともに、複合体 IV, V でのミトコンドリアにおける ATP 産生量を観察できる。DNM1L 変異によりミトコンドリア機能に異常を来した場合、OCR に変化を来すことが予想されるため、その測定を試みた。

OCR の測定には、OROBOROS Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) を用いた。測定原理は以下の通りである。OROBOROS 測定室内にある酸素センサー内の電極において、酸素分子が還元される。その際に生じる電流が酸素濃度に比例するため、その電流を測定することで、内部の酸素濃度を反映する。経時的な酸素濃度をモニターでき、OCR を計測できる。

続いて、Assay の流れは以下の通りである。剥離した神経細胞を専用の測定用 buffer に溶解した細胞懸濁液を OROBOROS の測定室内に入れた後、経時的に測定室内の酸素消費速度をモニターしながら、負荷薬剤を投与していく。まず、ミトコンドリアへ基質や阻害剤を到達させるために細胞膜の透過性を高める Digitonin 10mg/ml を 1 μ l 投与した。続いて、基質である Pyruvate 2M 及び L-Malic acid 800mM の 1:1 混合液を 10 μ l, Adenosine diphosphate (以下、ADP) 500mM を 10 μ l, Succinate 1M 20 μ l を投与した。酸素消費量の増加を確認した後、複合体 I の阻害剤である Rotenone 1mM 1 μ l、複合体 II の阻害剤である Antimycin A 5mM 1 μ l を投与し、complex I & II の OCR 測定を行い、百万細胞数当たりで算出した。

統計分析は Prism (version 6.07) を使用し、検定法は Dunnett 検定を用いた。全てのデータは、平均値±標準誤差で表現した。p<0.05 を統計的に有意であると判定した。

第4章 結果

第1節 疾患由来 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導とその証明

疾患由来線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞に神経分化遺伝子を SeV ベクターにより導入し、神経細胞への分化誘導を行った結果、10日間で神経突起様構造物の伸長が見られた(図8)。

続いて、分化誘導した細胞が神経細胞へ分化しているか確認をするため、免疫染色を行った結果、疾患由来及び健常人由来細胞のいずれにおいても神経細胞で特異的に染色される抗 TUBB-III抗体による染色が確認され、神経細胞へ分化していることが確認された(図8)。以上から、免疫染色でも神経特異的な抗体での染色が認められ、神経細胞へ分化していることを確認した。

第2節 分化神経細胞におけるミトコンドリア形態解析

疾患由来神経細胞および健常人由来神経細胞において、電子顕微鏡によるミトコンドリアの形態解析を行った結果、疾患由来神経細胞のミトコンドリア長径は、最大値が NDMC 例 $7.656\mu\text{m}$ 、KA 例 $7.26\mu\text{m}$ と伸長したミトコンドリアが見られ、中央値も NDMC 例 $0.604\mu\text{m}$ 、KA 例 $0.753\mu\text{m}$ と正常の平均値 $0.491\mu\text{m}$ に比して、長径の大きいミトコンドリアが統計学的に有意に多かった (Kruskal-Wallis 検定、NDMC 例 : $p=7.2\times 10^{-4}$ 、KA 例 : $p=4.5\times 10^{-8}$) (図9)。また、疾患由来神経細胞における長径 $1.74\mu\text{m}$ 以上の伸長したミトコンドリアの個数は NDMC 例が 343 個中 42 個(12.2%)、KA 例が 281 個中 42 個(14.9%)と、健常人由来神経細胞の 359 個中 19 個 (5.3%)に対して統計学的に有意に多かった (χ^2 検定、NDMC 例 : $p=0.0000622$ 、KA 例 : $p=0.0012$) (図9a-d)。

以上から、疾患由来神経細胞には、健常人由来神経細胞と比較して、伸長したミトコンドリアが多いことが示された。

第3節 分化神経細胞における Mitophagy の評価

疾患由来神経細胞および健常人由来神経細胞において、mitophagy の評価を行った結果、健常人由来神経細胞は細胞数当たりの mitophagy の生じているミトコンドリア数が 3.278 ± 0.155 個 (N=79) であったが、疾患由来神経細胞では NDMC 例 0.754 ± 0.379 個 (N=84)、KA 例 1.162 ± 0.03 個 (N=68) と細胞数当たりの mitophagy が生じるミトコンドリアの有意な低下を認めた (Dunnett 検定: NDMC 例: $p=0.0081$ 、KA 例: $p=0.013$) (図 10a, b)。以上から、疾患由来神経細胞のミトコンドリアでは mitophagy 障害が生じていると考えられた。

第4節 分化神経細胞におけるミトコンドリア膜電位解析

疾患由来神経細胞および健常人由来神経細胞において、JC-1 色素を用いてミトコンドリア膜電位の解析を行った結果、JC-1 色素の赤と緑の蛍光強度の平均比率が健常由来神経細胞の 0.412 ± 0.023 (N=50) と比較して、疾患由来神経細胞は NDMC 例 0.283 ± 0.0074 (N=50)、KA 例 0.240 ± 0.0025 (N=50) と統計学的に有意に低下していた (Dunnett 検定、NDMC 例: $p<0.001$ 、KA 例: $p<0.001$) (図 11a, b)。以上から、疾患由来神経細胞の定常状態におけるミトコンドリア膜電位は健常人由来神経細胞と比較して、低下していることを示した。

このことから、疾患由来神経細胞はミトコンドリア機能が低下していると考えられた。

第5節 分化神経細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度の測定

疾患由来神経細胞および健常人由来神経細胞において、OROBOROS を用いて OCR 測定を行った (図 12a-c)。ミトコンドリア複合体 I 及び II での酸素消費速度の平均は、

健常人由来神経細胞が 31.38 ± 6.74 pmol/sec*Million (N=4) であったのと比較して、疾患由来神経細胞では NDMC 例は 15.75 ± 9.54 pmol/sec*Million (N=3)、KA 例は 8.92 ± 3.99 pmol/sec*Million (N=3) であり、ミトコンドリア複合体 I, II の酸素消費速度が有意に低下した (Dunnett 検定、NDMC 例 $p=0.047$ 、KA 例 $p=0.00312$) (図 13a-c、図 14)。

以上から、疾患由来神経細胞のミトコンドリアでは、健常人由来神経細胞と比較して複合体 I, II の酸素消費速度が低下していることが示された。

第5章 考察

我々は2症例の *DNM1L* 変異を有する患者由来 iPS 細胞及び分化神経細胞を用い、*DNM1L* 関連脳症の病態解明を行った。第1章第9節で示した以下の仮説(図3)を基に解析を進めた。

- 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、同遺伝子変異を有する神経細胞においてミトコンドリア形態、機能異常が生じ、脳症の発症が予想されると考えた。本研究で得られた結果をこの仮説に沿って考察する。

神経細胞への分化について

本研究では iPS 細胞から神経細胞への分化誘導に Elixigenscientific 社の分化キットを用いた。その結果、神経突起様の構造物を分化 10 日目に確認した。分化した細胞が神経細胞であることは、その形態と抗 TUBB-III 抗体による免疫染色で証明した。TUBB-III は、神経細胞の成熟度に関わらず陽性になるため、分化の確認に適切であると考えた。TUBB-III は精巣にも発現するが、光学顕微鏡による形態観察で神経突起様の構造物の伸

長を認めており、TUBB-IIIが陽性であったことと合わせて、神経細胞に分化したと考えた。

ミトコンドリア形態解析について

ミトコンドリア形態の解析については、電子顕微鏡によって明確に観察することができ、長径の計測が可能であった。ただし、平面での解析になるため、垂直方向にミトコンドリアを追跡できず、長いミトコンドリアを計測できないというバイアスが存在する。立体的に見るとミトコンドリアが円盤状に拡大している可能性があるが、共焦点レーザー顕微鏡による観察では皮膚線維芽細胞と同様に、長軸方向に管状に伸長するミトコンドリアを認めている（非表示データ）。また各群共に一定数、伸長したミトコンドリアを計測しきれない可能性はあるが、300個近くのミトコンドリアを計測しており、結果が変わるほどの影響はないと考えた。

DNM1L 変異をもつ神経細胞におけるミトコンドリア形態異常の報告はこれまでにない。我々は神経細胞で初めて形態の異常を示すことができた（図 9a-d）。これは *DNM1L* 変異を有する線維芽細胞でのミトコンドリア形態異常の報告と一致する(7)。

Mitophagy 障害について

我々は *DNM1L* 変異神経細胞における mitophagy 障害を示した（図 10）。このことは、*DNM1L* 遺伝子をノックダウンさせたマウス心筋細胞において、mitophagy 低下を示した過去の報告と一致する(14)。本研究は *DNM1L* 変異による mitophagy 障害が神経細胞で起きていることを直接的に初めて示したものである。

ミトコンドリア機能低下について

ミトコンドリア機能低下については、*DNM1L* 変異を有する患者由来線維芽細胞にお

いて、ミトコンドリア呼吸鎖活性や酸素消費量の低下を認める報告がある (7, 18)。本研究の 2 症例では、線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア酸素消費量の低下を確認している (第 2 章第 1 節及び第 2 節)。今回は更に研究を進め、神経細胞を用いたミトコンドリア機能解析として、ミトコンドリア膜電位と ATP 産生評価を行った。

ミトコンドリア膜電位はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によるエネルギー産生に必要であり、その低下はミトコンドリアでのエネルギー産生が低下していることを反映する。我々は JC-1 を用いて、疾患由来神経細胞におけるミトコンドリア膜電位低下を示した (図 11a, b)。今回の結果は、*DNM1L* 遺伝子変異を有する線維芽細胞におけるミトコンドリア膜電位低下をフローサイトメーターで示した過去の報告と一致している (18)。

また、ミトコンドリア機能低下の証明として、OROBOROS を用いて神経細胞における OCR 低下を示した (図 13a-c, 14)。別の機器を用いて酸素消費速度を評価した過去の報告でも *DNM1L* 変異を有する患者由来線維芽細胞の OCR 低下を認めており (18)、本研究の結果と一致している。OCR 低下はミトコンドリアの ATP 産生低下を反映するため、疾患由来神経細胞では、ATP 産生の低下があると考えられた。

***DNM1L* 変異の神経症状発症への関与について**

DNM1L 変異によるヒト疾患は、我々の症例も含めて複数報告されているが、その表現形には多様性がみられる ((1), (4), (5), (6), (7) 表 1)。生後すぐから筋緊張低下、てんかん、視神経炎などの症状を呈し、乳児期～早期幼児期に死亡する症例が多いが、我々の症例 2 や他の症例 (6, 20) のように、乳児期に致死的な経過をたどらないものもある。*DNM1L* 以外の遺伝子変異が、疾患修飾遺伝子として表現形の多様性に関与している可能性はあるが、大部分の報告は網羅的遺伝子解析の結果 *DNM1L* に病的遺伝子変異を認めたものであり、また線維芽細胞においてミトコンドリア、ペルオキシソームに形

態異常が観察されることから、*DNMIL* 変異が神経症状の出現に主要な役割を果たしていると考えられる。

DNMIL 遺伝子は、ミトコンドリアの分裂だけではなく、ペルオキシソームの分裂にも関与している(1, 21, 22)。ペルオキシソーム形成異常やペルオキシソーム酵素欠損によるペルオキシソーム病の存在が知られており、新生児期から筋緊張低下、けいれんなどの中枢神経障害を呈しうる(23)。しかし *DNMIL* 変異による症例では、ペルオキシソーム病で認められる顔貌異常や脳皮質の形成異常、極長鎖脂肪酸の増加などを認めないことが多いため(20)、やはり主な病態としてはミトコンドリアの分裂異常に依るところが大きいと考えられる。

本研究で示した仮説について

以下に本研究で証明できたことを示す (図 15)。

DNMIL 遺伝子異常による形態異常を電子顕微鏡による観察で示し、mitophagy 異常を mitophagy detection kit で示した。ミトコンドリア機能異常については、膜電位異常を JC-1 にて、ATP 産生低下を OCR 測定にて示した。以上の結果から、*DNMIL* 遺伝子関連脳症の病態解明の手がかりを得ることができた。なお、神経細胞機能異常から脳症発症に至る過程で神経細胞のアポトーシスが生じると考えている。この証明は今後の課題である。

本研究のリミテーションとして、*DNMIL* 変異のゲノム編集や、あるいは正常な DRP1 蛋白質の導入によりミトコンドリア形態や機能が回復するレスキュー実験を行っていないことがある。今回の実験結果をより確実に証明するためには、iPS 細胞のゲノム編集、あるいは分化させた神経細胞での正常な DRP1 蛋白質の発現実験を行い、今回観察された神経細胞の異常が回復することを観察する必要がある。

我々は本研究を通して *DNMIL* 遺伝子関連脳症の病態にミトコンドリアの形態及び

機能の異常が関連していることを示した。今後は神経細胞機能解析や神経細胞のアポトーシスについての解析を進め、*DNM1L* 遺伝子関連脳症の疾患モデルを確立し、ミトコンドリア病及び脳症全般の病態解明につなげると共に、ミトコンドリア機能改善薬による脳症の治療に展開したいと考えている。

第6章 結論

- 1) 患者由来 iPS 細胞を樹立し、神経細胞を分化誘導した。
- 2) 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と mitophagy 障害を示した。
- 3) 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。

以上から *DNM1L* 変異がミトコンドリア形態及び機能異常を起こし、その結果、神経細胞異常を来すことが示された。これらの *in vitro* の実験結果に基づき、*DNM1L* 遺伝子関連脳症の発症に至る病態の一端を解明することができた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、防衛医科大学校小児科学講座教授 野々山恵章先生を始めとした医局員の先生方には、研究環境面でのご配慮を頂きました。厚く御礼申し上げます。

また、御助言、御協力を賜りました横浜市立大学遺伝学教室教授 松本直通先生、京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門准教授 齋藤潤先生、熊本大学大学院生命科学研究部小児科准教授 松本志郎先生、防衛医科大学校再生発生学講座准教授 伊藤正孝先生、東京都健康長寿医療センター研究所生体調節機能研究員 藤田泰典先生、同部門研究副部長 大澤郁朗先生、東北工業大学工学部教授 鈴木郁郎先生に深く感謝の意を表します。

略語一覽

ACTH: adrenocorticotropic hormone

ADP: adenosine diphosphate

ATP: adenosine triphosphate

CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

DNA: deoxyribonucleic acid

DNM1L: dynamin 1-like

DRP1: dynamin-related protein1

EIEE: early infantile epileptic encephalopathy

GTPase: guanosine triphosphate -binding proteins

iPS cell: induced pluripotent stem cell

JC-1: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolo-carbocyanine iodide

MELAS: mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes

MRI: magnetic resonance imaging

OCR: oxygen consumption rate

SD: standard deviation

SeV: Sendai Virus

TUBB-III: neuron-specific beta-III tubulin

引用文献

1. Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med*. 2007;356(17):1736-41.
2. Chang CR, Manlandro CM, Arnoult D, Stadler J, Posey AE, Hill RB, Blackstone C. A lethal de novo mutation in the middle domain of the dynamin-related GTPase Drp1 impairs higher order assembly and mitochondrial division. *J Biol Chem*. 2010;285(42):32494-503.
3. Zaha K, Matsumoto H, Itoh M, Saito H, Kato K, Kato M, Ogata S, Murayama K, Kishita Y, Mizuno Y, Kohda M, Nishino I, Ohtake A, Okazaki Y, Matsumoto N, Nonoyama S. DNM1L-related encephalopathy in infancy with Leigh syndrome-like phenotype and suppression-burst. *Clin Genet*. 2016;90(5):472-4.
4. Vanstone JR, Smith AM, McBride S, Naas T, Holcik M, Antoun G, Harper ME, Michaud J, Sell E, Chakraborty P, Tetreault M, Majewski J, Baird S, Boycott KM, Dymont DA, MacKenzie A, Lines MA. DNM1L-related mitochondrial fission defect presenting as refractory epilepsy. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(7):1084-8.
5. Chao YH, Robak LA, Xia F, Koenig MK, Adesina A, Bacino CA, Scaglia F, Bellen HJ, Wangler MF. Missense variants in the middle domain of DNM1L in cases of infantile encephalopathy alter peroxisomes and mitochondria when assayed in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*. 2016;25(9):1846-56.
6. Fahrner JA, Liu R, Perry MS, Klein J, Chan DC. A novel de novo dominant negative mutation in DNM1L impairs mitochondrial fission and presents as childhood epileptic encephalopathy. *Am J Med Genet A*. 2016;170(8):2002-11.
7. Diez H, Cortes-Saladelafont E, Ormazabal A, Marmiese AF, Armstrong J, Matalonga L, Bravo M, Briones P, Emperador S, Montoya J, Artuch R, Giros M, Garcia-Cazorla A. Severe

infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein. *Mov Disord.* 2017;32(7):1108-10.

8. Verrigni D, Di Nottia M, Ardisson A, Baruffini E, Nasca A, Legati A, Bellacchio E, Fagiolari G, Martinelli D, Fusco L, Battaglia D, Trani G, Versienti G, Marchet S, Torraco A, Rizza T, Verardo M, D'Amico A, Diodato D, Moroni I, Lamperti C, Petrini S, Moggio M, Goffrini P, Ghezzi D, Carrozzo R, Bertini E. Clinical-genetic features and peculiar muscle histopathology in infantile DNM1L-related mitochondrial epileptic encephalopathy. *Hum Mutat.* 2019;40(5):601-18.

9. Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol.* 2009;11(8):958-66.

10. Cho HM, Ryu JR, Jo Y, Seo TW, Choi YN, Kim JH, Chung JM, Cho B, Kang HC, Yu SW, Yoo SJ, Kim H, Sun W. Drp1-Zip1 interaction regulates mitochondrial quality surveillance system. *Mol Cell.* 2019;73(2):364-76 e8.

11. Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.* 1992;119(2):301-11

12. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol.* 2018;20(9):1013-22.

13. Pryde KR, Smith HL, Chau KY, Schapira AH. PINK1 disables the anti-fission machinery to segregate damaged mitochondria for mitophagy. *J Cell Biol.* 2016;213(2):163-71.

14. Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, Zhai P, Sciarretta S, Toli J, Nomura M, Mihara K, Egashira K, Ohishi M, Abdellatif M, Sadoshima J. Endogenous Drp1 mediates mitochondrial

autophagy and protects the heart against energy stress. *Circ Res.* 2015;116(2):264-78.

15. Tokuyama T, Hirai A, Shiiba I, Ito N, Matsuno K, Takeda K, Saito K, Mii K, Matsushita N, Fukuda T, Inatome R, Yanagi S. Mitochondrial dynamics regulation in skin fibroblasts from mitochondrial disease patients. *Biomolecules.* 2020;10(3):450-62.

16. Hoffman PN. Distinct roles of neurofilament and tubulin gene expression in axonal growth. *Ciba Found Symp.* 1988;138:192-204.

17. Iwashita H, Torii S, Nagahora N, Ishiyama M, Shioji K, Sasamoto K, Shimizu S, Okuma K. Live cell imaging of mitochondrial autophagy with a novel fluorescent small molecule. *ACS Chem Biol.* 2017;12(10):2546-51.

18. Hogarth KA, Costford SR, Yoon G, Sondheimer N, Maynes JT. DNMI1L variant alters baseline mitochondrial function and response to stress in a patient with severe neurological dysfunction. *Biochem Genet.* 2018;56(1-2):56-77.

19. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 2012;3(11):e430.

20. Assia Batzir N, Bhagwat PK, Eble TN, Liu P, Eng CM, Elsea SH, Robak LA, Scaglia F, Goldman AM, Dhar SU, Wangler MF. De novo missense variant in the GTPase effector domain (GED) of DNMI1L leads to static encephalopathy and seizures. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2019;5(3).

21. Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8597-605.

22. Li X, Gould SJ. The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J Biol Chem.* 2003;278(19):17012-20.

23. Braverman NE, Raymond GV, Rizzo WB, Moser AB, Wilkinson ME, Stone EM,

Steinberg SJ, Wangler MF, Rush ET, Hacia JG, Bose M. Peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger spectrum: An overview of current diagnosis, clinical manifestations, and treatment guidelines. *Mol Genet Metab.* 2016;117(3):313-21.

ミトコンドリア品質管理機構

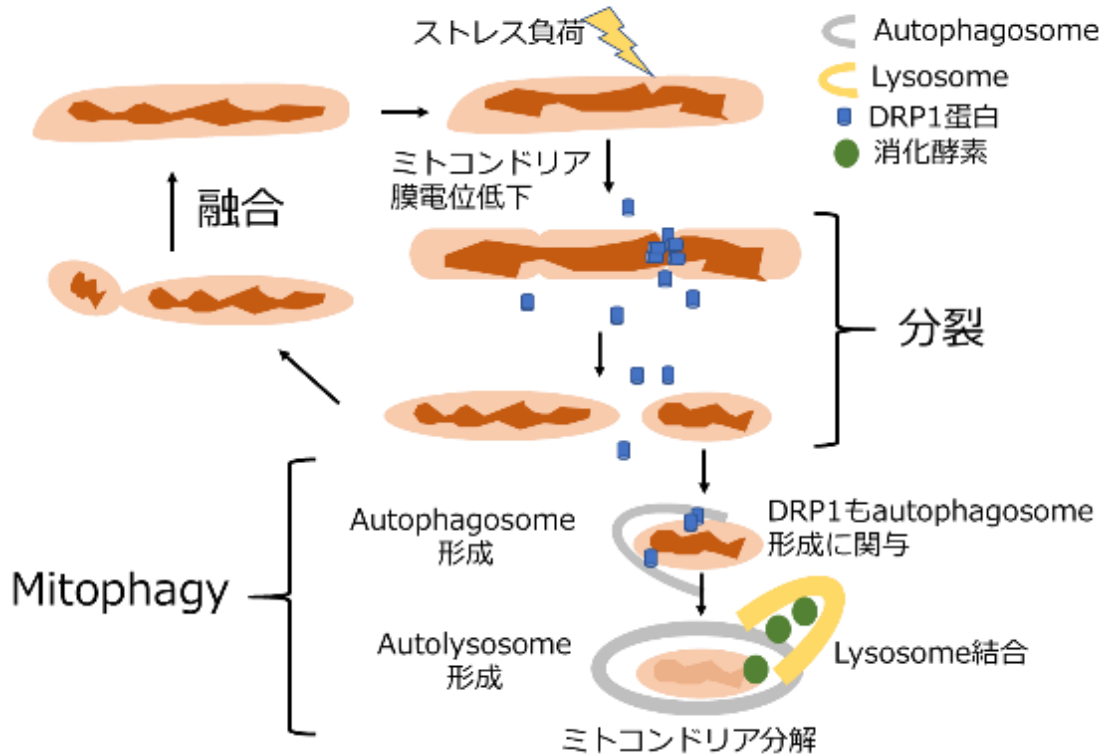
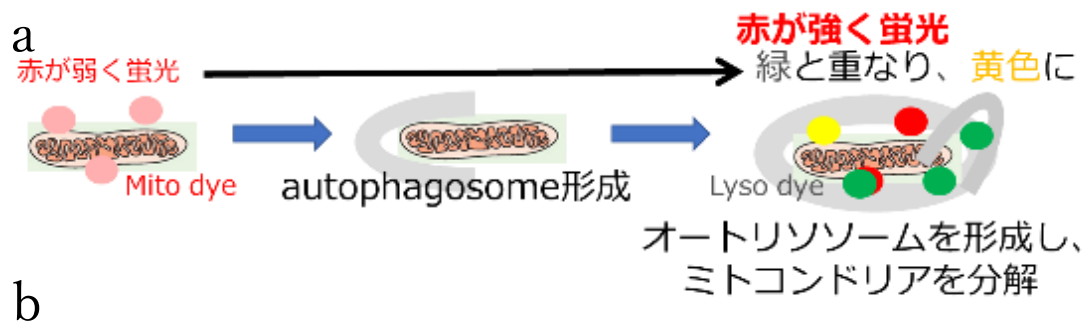


図1 ミトコンドリア品質管理モデルにおける DRP1 蛋白の働き

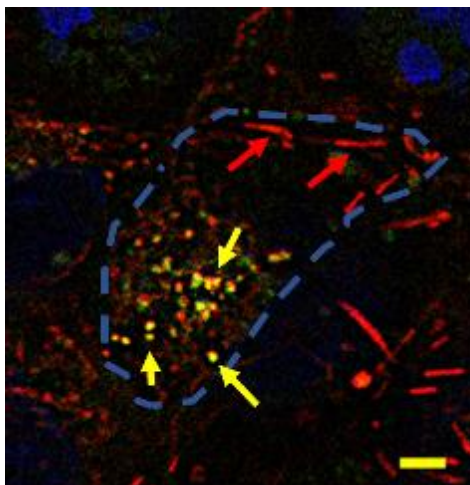
ミトコンドリアの分裂と融合及び、mitophagy による品質管理機構と機構内での DRP1 蛋白の作用を示す。

ミトコンドリアがストレス負荷により障害されるとその膜電位が低下し、障害部分が分裂で切り離され、autophagosome に取り込まれ、mitophagy の過程で分解される。

DNM1L にコードされた DRP1 蛋白はミトコンドリア外膜蛋白の誘導でリング状にミトコンドリアへ集積し、リングが収縮することで分裂を起こす。また、autophagosome 形成で mitophagy に関与している。



b



黄矢印

Mitophagyが起きている

赤矢印

Mitophagyが起きていない

○ 神経細胞体

図2 Mitophagyの過程と mitophagy detection kit について

a mitophagy detection kit の模式図

Mitophagy detection kit では、mito dye (桃色円) は mitophagy が起こると強く蛍光し (赤色円)、lyso dye (緑色円) がリソソームへ集積して mito dye と重なって観察される (黄色円)。これにより mitophagy が生じているミトコンドリアを観察できる。

b 蛍光顕微鏡で観察した神経細胞における mitophagy

神経細胞体 (青点線内) において、mito dye によりミトコンドリアが赤く染色される。

Mitophagy の起きていないミトコンドリア (赤矢印) は蛍光が弱い、mitophagy の起きているミトコンドリアは蛍光が強く、lyso dye と merge される (黄矢印)。

スケールバー : 5 μ m

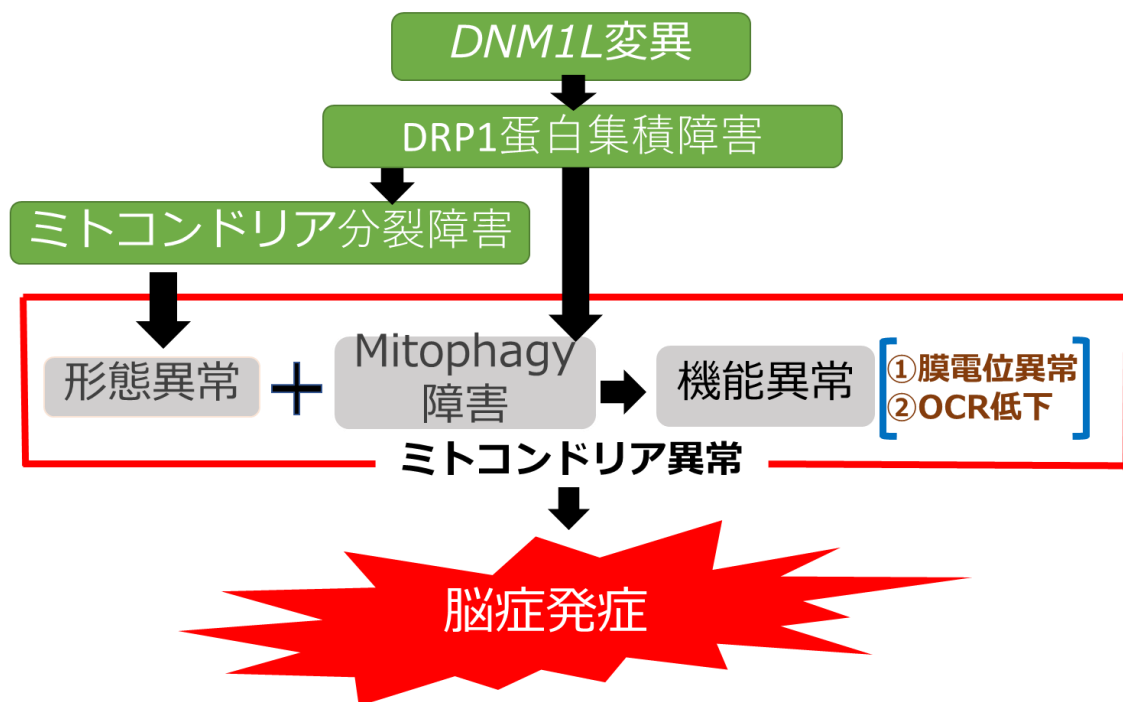


図3 *DNMT1* 遺伝子変異による脳症発症の病態仮説

DNMT1 遺伝子変異による脳症発症の病態仮説を示す。

DNMT1 遺伝子変異から、DRP1 蛋白の集積障害及びミトコンドリア分裂障害を生じる。

そこから、形態異常、mitophagy 障害、ミトコンドリア機能異常（膜電位異常、ATP 産生低下）といったミトコンドリア異常を呈する。それにより神経細胞異常を来す。

以上から脳症を発症する可能性があると考えた。

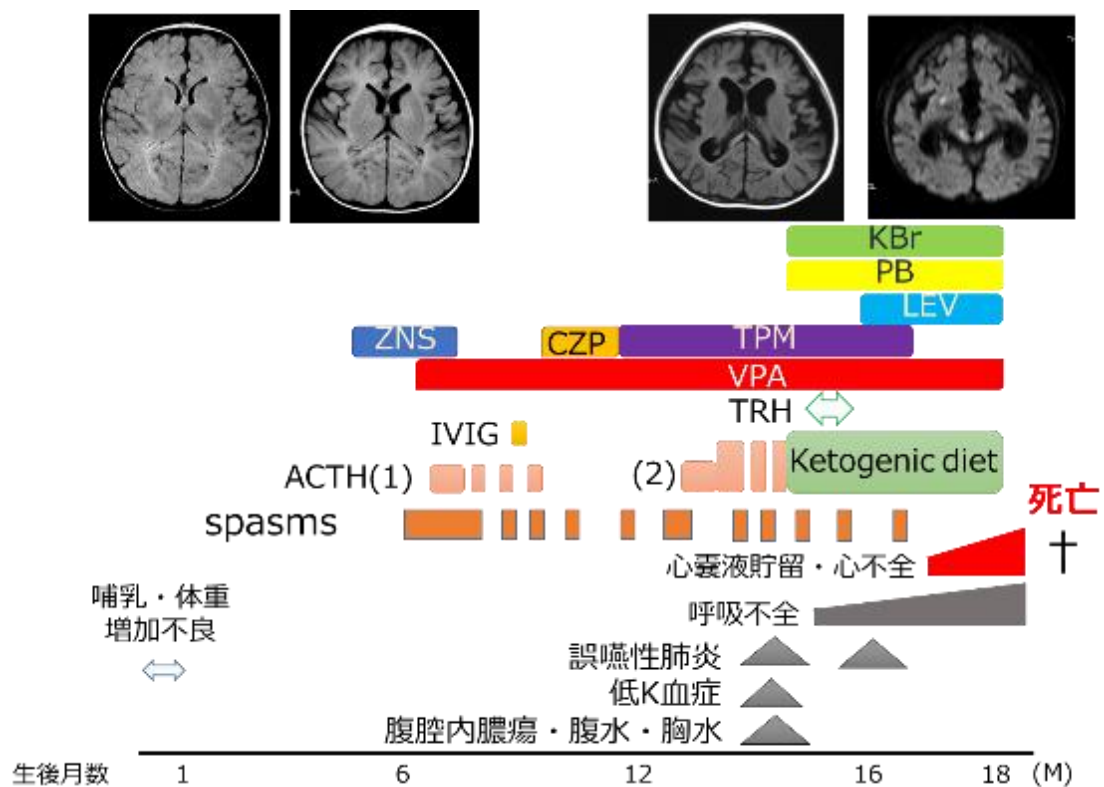


図4 症例1の臨床経過

乳児期より体重増加不良、infantile spasms を認めたため、ACTH、IVIG、抗てんかん薬による発作コントロールを行ったが、その後も発作は難治に経過した。感染症罹患を契機に呼吸不全、心不全を呈し、1歳6か月時に死亡した。

CZP: clonazepam, IVIG: intravenous immunoglobulin, KBr: potassium bromide, LEV: levetiracetam, PB: phenobarbital, TPM: topiramate, TRH: thyrotropin-releasing hormone, VPA: sodium valproate, ZNS: zonisamide

Zaha K et al, Clin Genet 2016 (3)より引用

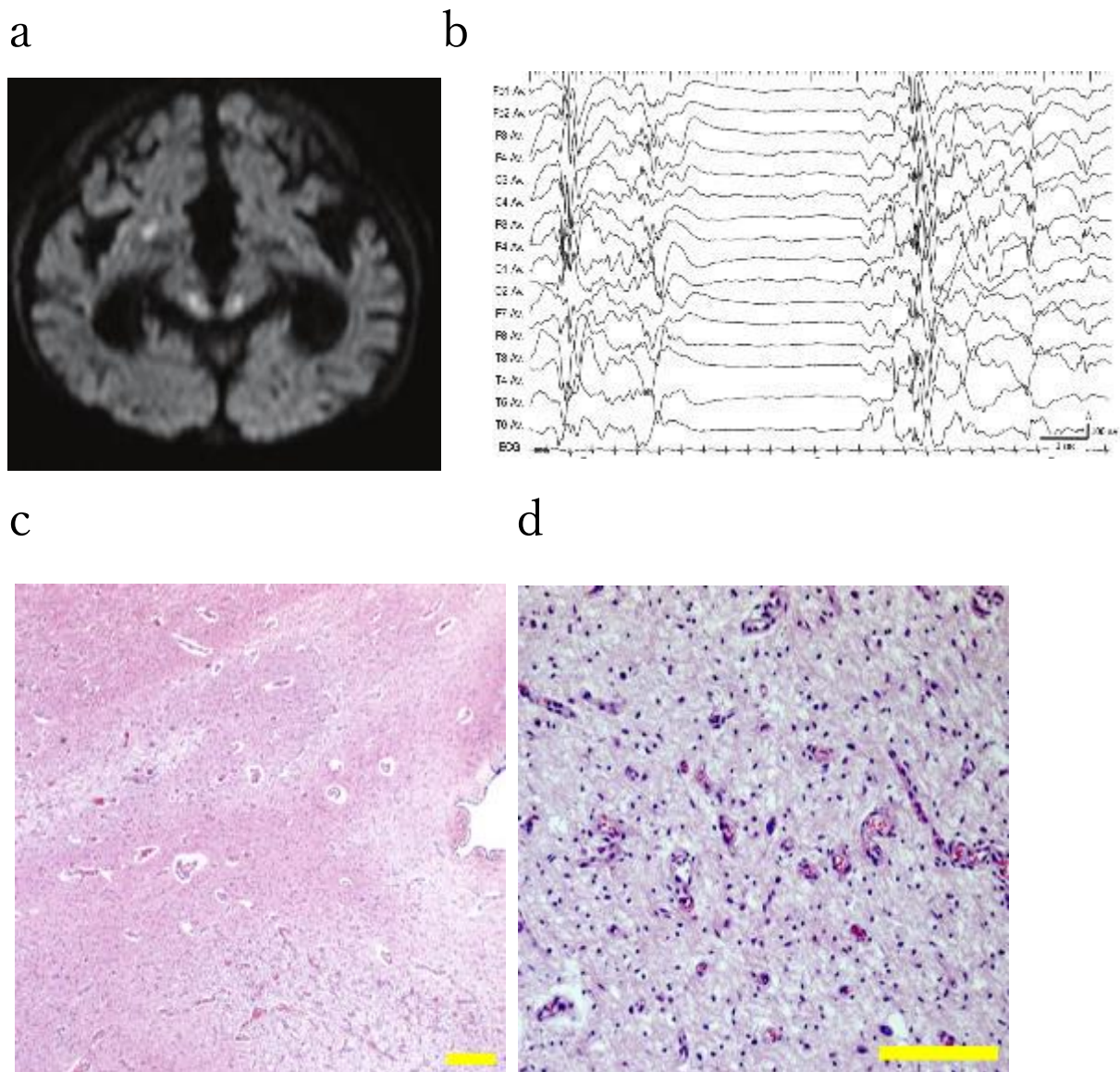


図5 症例1の検査所見及び病理像

a 頭部 MRI 拡散強調像 (1歳5か月時)

基底核、間脳に拡散強調像で高信号を認める。また大脳皮質の萎縮、脳室の拡大を認める。

b 脳波 (6か月時) Suppression-burst pattern を認める。

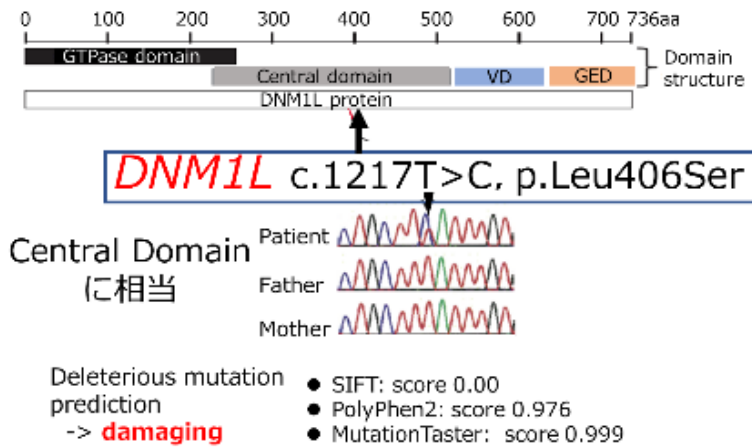
c, d 脳実質の組織病理所見 (HE 染色)

動眼神経核、上丘に血管増生と海綿状変化を伴う神経細胞の脱落像を認める。

スケールバー：100 μ m

Zaha K et al, Clin Genet 2016 (3)より引用

a



b

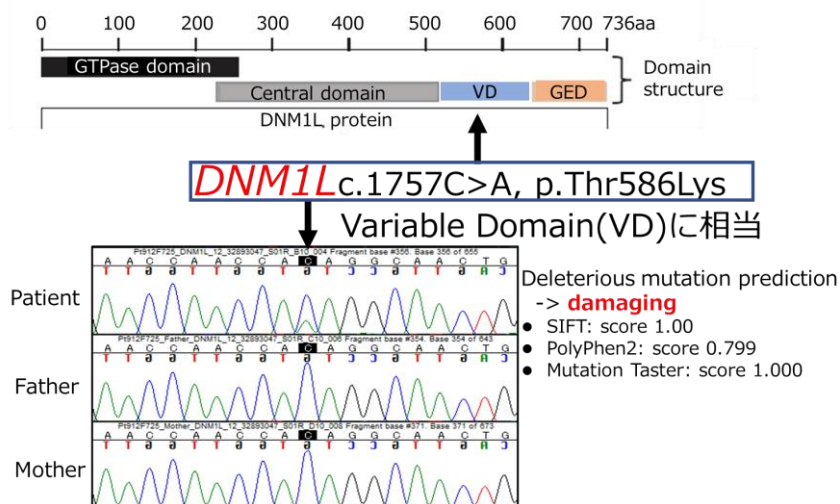


図6 2症例の全エクソーム解析および Sanger シークエンス解析結果

a 症例1 遺伝子解析結果 (Zaha K et al. Clin Genet 2016 (3)から引用)

Central domain 領域に missense 変異を検出した。SNP 機能予測アルゴリズム (SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster) による解析は、いずれも病的意義を示す結果であった。

b 症例2 遺伝子解析結果

Variable domain 領域に missense 変異を検出した。SNP 機能予測アルゴリズムは SIFT では tolerant であったが、PolyPhen2; possibly damaging, MutationTaster; disease causing の結果を示した。dbSNP、ExAc、3.5KJPNなどのゲノムデータベースに記載のない変異であり、OCRの結果と合わせて病的意義のある変異と考えられた。

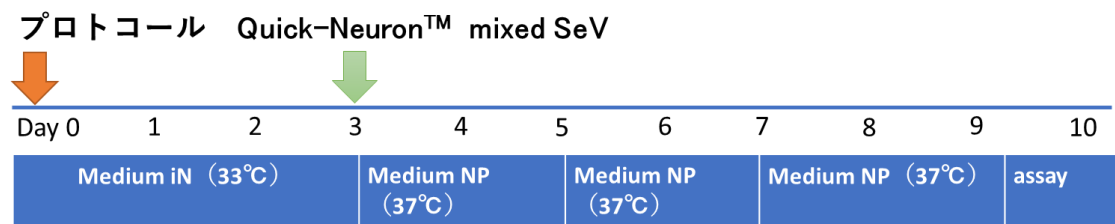


図7 神経細胞の分化誘導法

Elixirgenscientific 社の Quick-Neuron mixed SeV プロトコールを示す。

Day0、iPS細胞に SeV を感染させる（茶色矢印）。Day3 までは 33°C で培養し、継代後 37°C で培養を行う（緑色矢印）。継代後、7 日間維持培養を行った後、assay を行う。

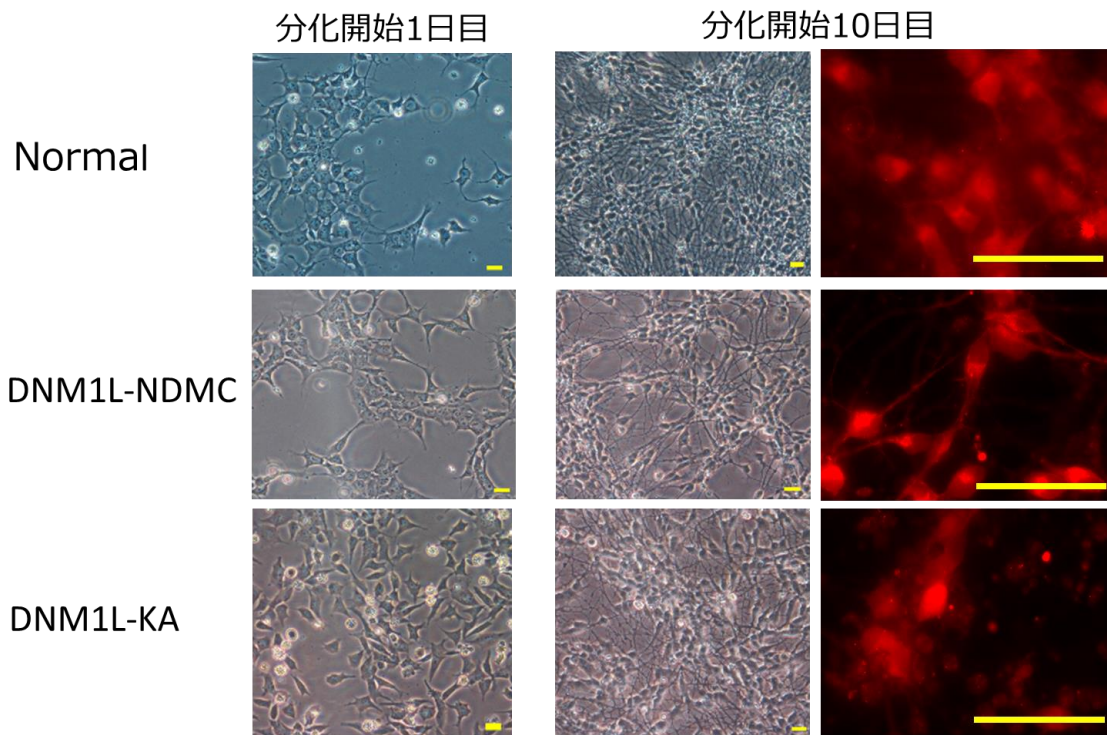
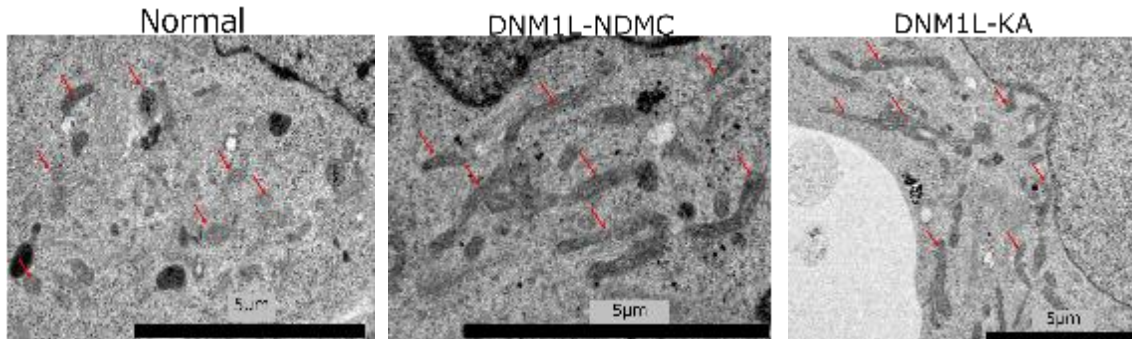


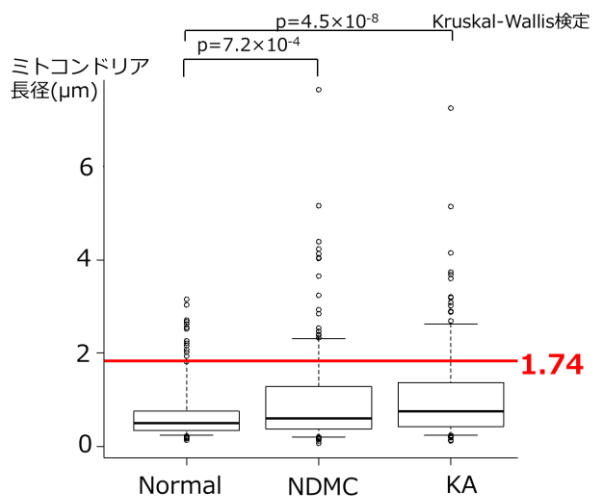
図8 神経細胞への分化誘導とその証明

分化開始1日目と10日目の培養細胞における位相差顕微鏡像(左、中央カラム)と分化開始10日目の蛍光顕微鏡像(TUBB-III染色、右カラム)を示す。10日で神経突起様構造物の伸長が見られ、TUBB-III発現を確認し、神経細胞に分化したことを証明した。スケールバー
左・中央カラム：10 μ m、右カラム：50 μ m

a



b



c

| | 最小値 | 25% | 中央値 | 75% | 最大値 | N |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Normal | 0.141 | 0.341 | 0.491 | 0.757 | 3.155 | 359 |
| NDMC | 0.067 | 0.369 | 0.604 | 1.279 | 7.656 | 343 |
| DNM1L-KA | 0.118 | 0.418 | 0.753 | 1.367 | 7.26 | 281 |

d

| | Normal | NDMC | KA |
|-----------|-----------|------------|------------|
| 1.74 μm ≥ | 19 (5.3%) | 42 (12.2%) | 42 (14.9%) |
| 1.74 μm < | 340 | 301 | 239 |

図9 分化神経細胞におけるミトコンドリアの形態解析

a 分化神経細胞の電子顕微鏡像

細胞質内のミトコンドリアを赤矢印で示す。スケールバーは5 μmである。

b ミトコンドリア長径のドットチャート

患者由来神経細胞のミトコンドリア長径は、健常人由来のものとは統計学的に有意に大きい (NDMC例: $p=7.2 \times 10^{-4}$ 、KA例: $p=4.5 \times 10^{-8}$)。

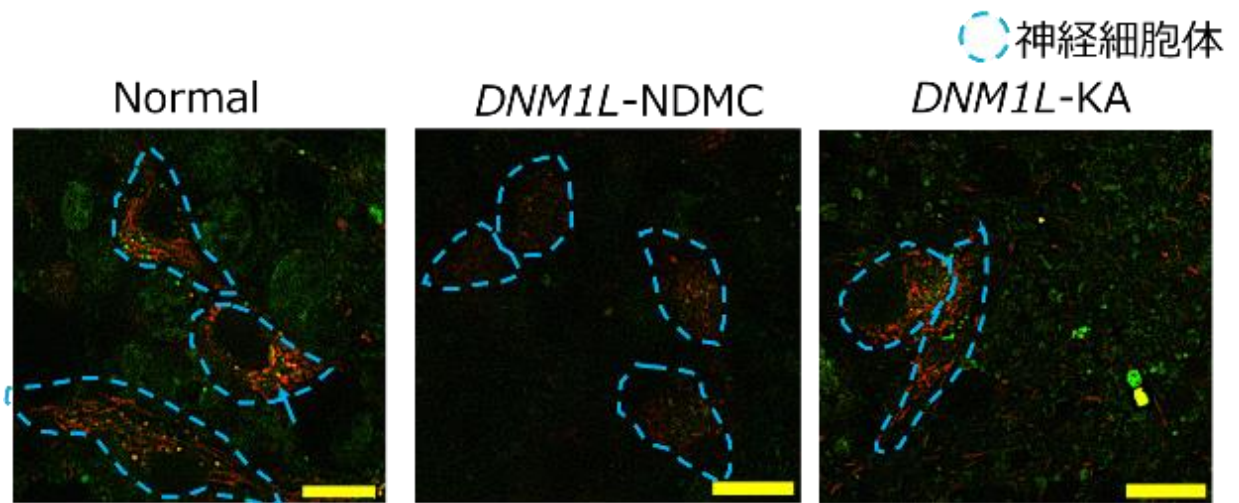
c ミトコンドリア長径測定データ

健常人、NDMC、KA例の中央値はそれぞれ、0.491 μm、0.604 μm、0.753 μmであった。

d ミトコンドリア長径2×2分割表

1.74 μm以上に伸長したミトコンドリアは健常人、NDMC、KA例でそれぞれ19個(5.3%)、KA例42個(14.9%)、42個(12.2%)で、患者由来神経細胞における伸長したミトコンドリアは、健常人由来のものとは有意に多かった (NDMC例: $p=0.0000622$ 、KA例: $p=0.0012$)。

a



b

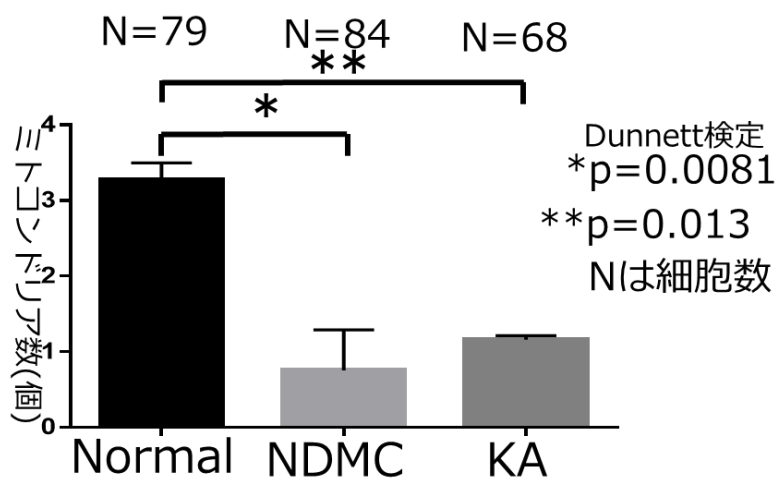


図 10 分化神経細胞における Mitophagy の評価

a 分化神経細胞での染色像

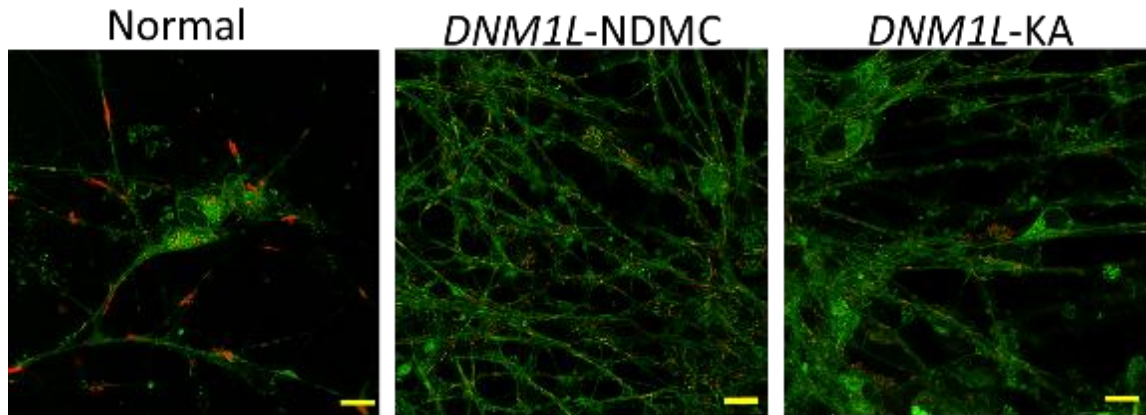
分化神経細胞（青色点線内部）を mitophagy detection kit で染色し、観察した像を示す。黄色蛍光の部分が mitophagy の生じているミトコンドリア（黄色矢印）である。スケールバー：10 μ m

b 解析結果

細胞当たりの mitophagy が生じているミトコンドリア数の解析結果を示す。

健常人由来神経細胞と比較し、疾患由来神経細胞では細胞数当たりの mitophagy の低下を有意に認めた（*NDMC例： $p=0.0081$ 、**KA例： $p=0.013$ ）。

a



b

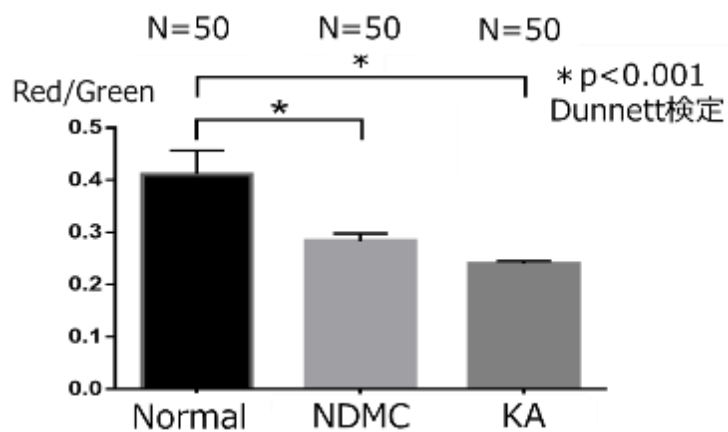


図 11 分化神経細胞におけるミトコンドリア膜電位解析

a 分化神経細胞におけるJC-1色素による染色像

膜電位の高いミトコンドリアがpolymerを形成して赤色に染色され、膜電位の低いミトコンドリアはmonomerとして緑色に染色される。スケールバー：10 μ m

b 分化神経細胞におけるミトコンドリア膜電位の解析結果

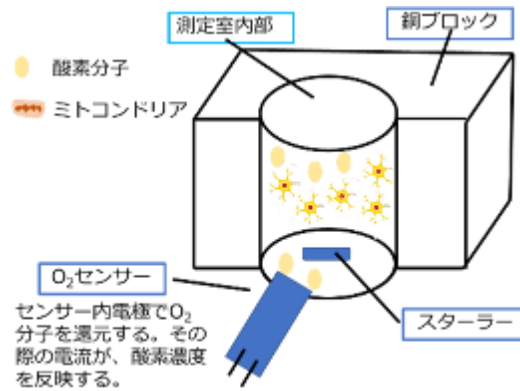
赤と緑の蛍光強度の比を算出した。

健常人由来神経細胞と比較して疾患由来神経細胞では赤色の蛍光輝度が弱く、有意にミトコンドリア膜電位低下がみられた（NDMC例： $p < 0.001$ 、KA例： $p < 0.001$ ）。

a



b



c

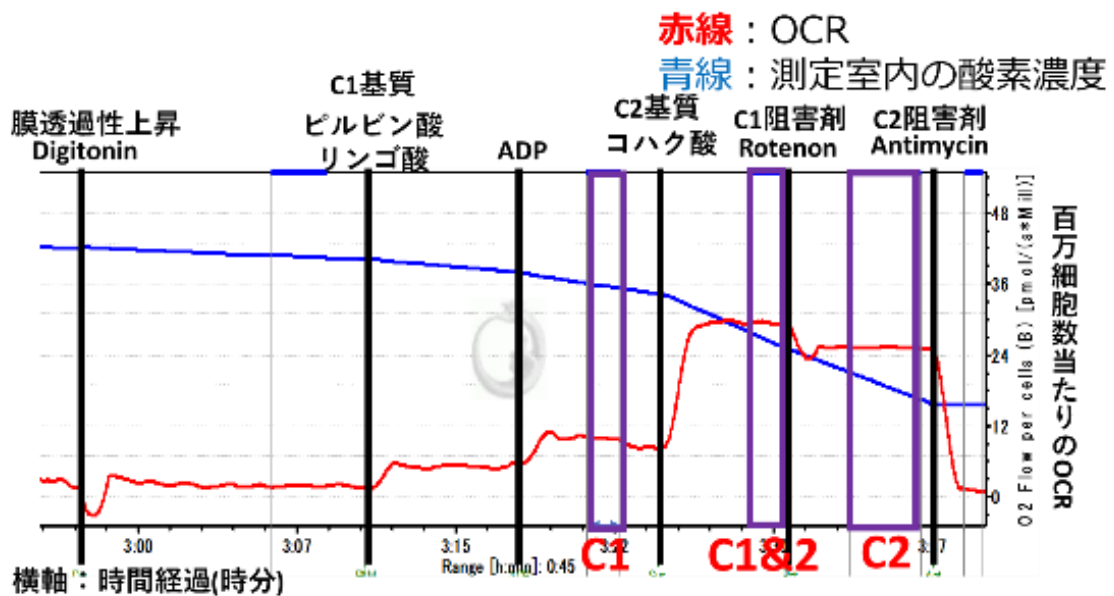


図 12 分化神経細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度 (OCR) の測定

a OROBOROS-O2k の機器写真

測定室内部に細胞懸濁液を入れて、側面の O₂ センサーで酸素濃度を測定する。

b OROBOROS-O2k 測定室内部の模式図

測定室内部の酸素濃度を O₂ センサー内で電流に変換して測定する。

c OCR 変化のグラフ

縦軸が百万細胞数当たりの OCR、横軸が時間経過を示す。

C I : 複合体 I の酸素消費速度、C II : 複合体 I の酸素消費速度、

C I & II : 複合体 I & II の酸素消費速度

ADP: adenosine diphosphate, OCR: oxygen consumption rate

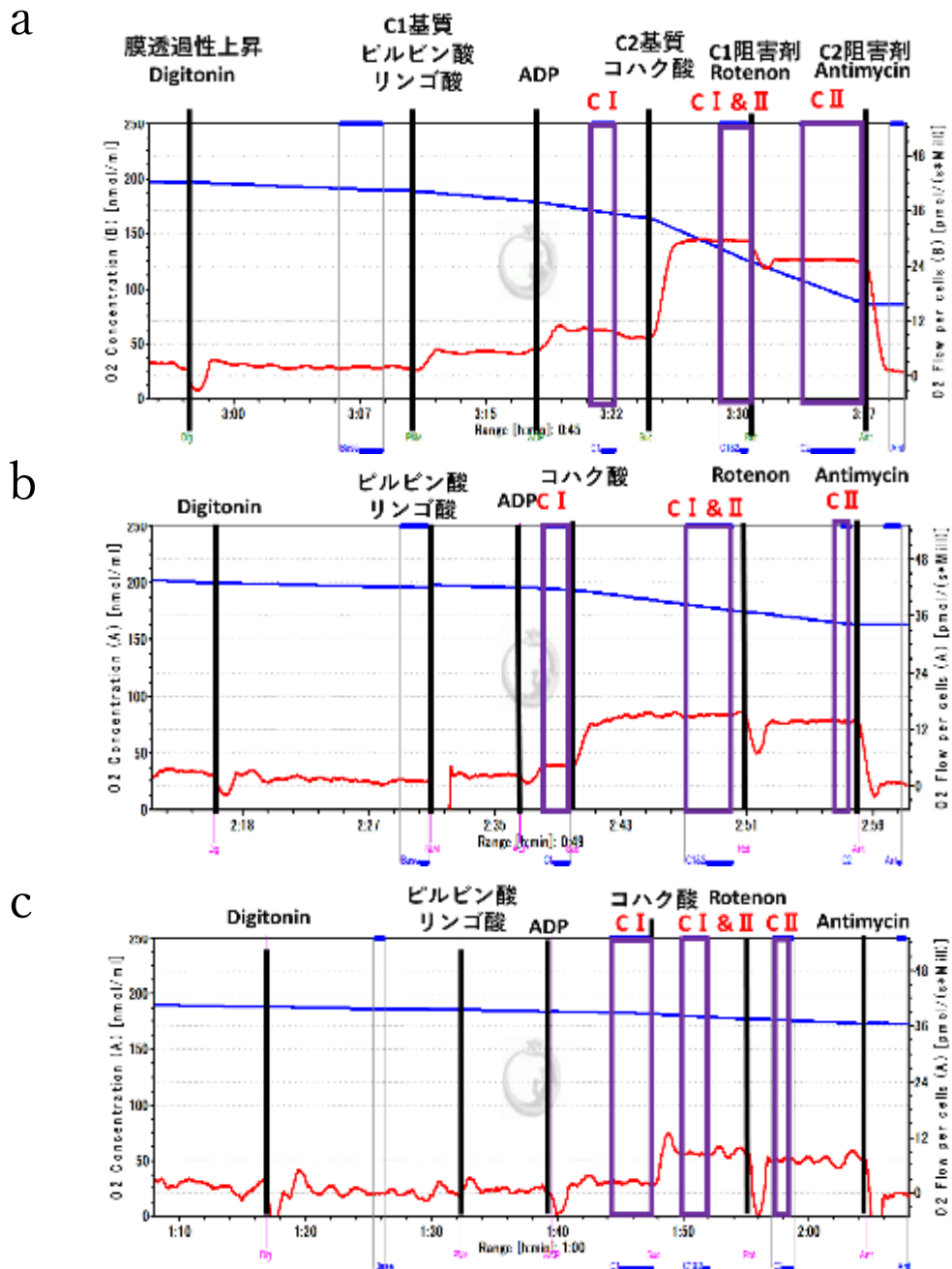


図 13 各神経細胞における酸素消費速度 (OCR) 測定結果

a 健常人由来分化神経細胞におけるOCR測定結果を示す。

b NDMC例由来分化神経細胞におけるOCR測定結果を示す。

c KA例由来分化神経細胞におけるOCR測定結果を示す。

測定室内の酸素濃度(青線)を基にOCR(赤線)を算出する。

C I : 複合体 I の酸素消費速度、C II : 複合体 I の酸素消費速度

C I & II: 複合体 I & II の酸素消費速度

ADP: adenosine diphosphate, OCR: oxygen consumption rate

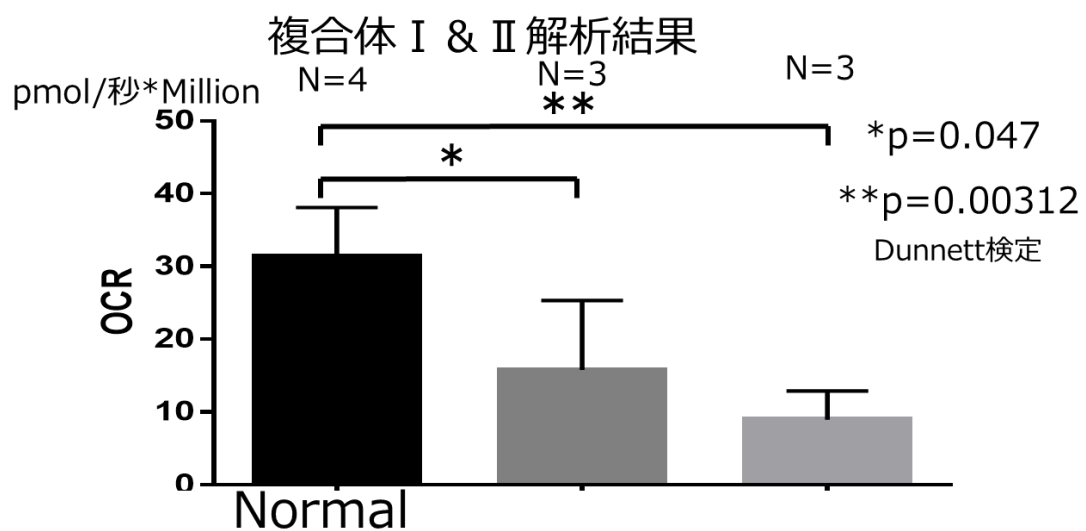


図 14 各神経細胞における酸素消費速度 (OCR) 解析結果

複合体 I + II (図 12、図 13 の C I & II に相当) の OCR 解析結果を示す。

患者由来神経細胞で健常人由来神経細胞に比して、OCR低下を有意に認めた (NDMC例: $p=0.047$ 、KA例: $p=0.00312$)。

OCR: oxygen consumption rate

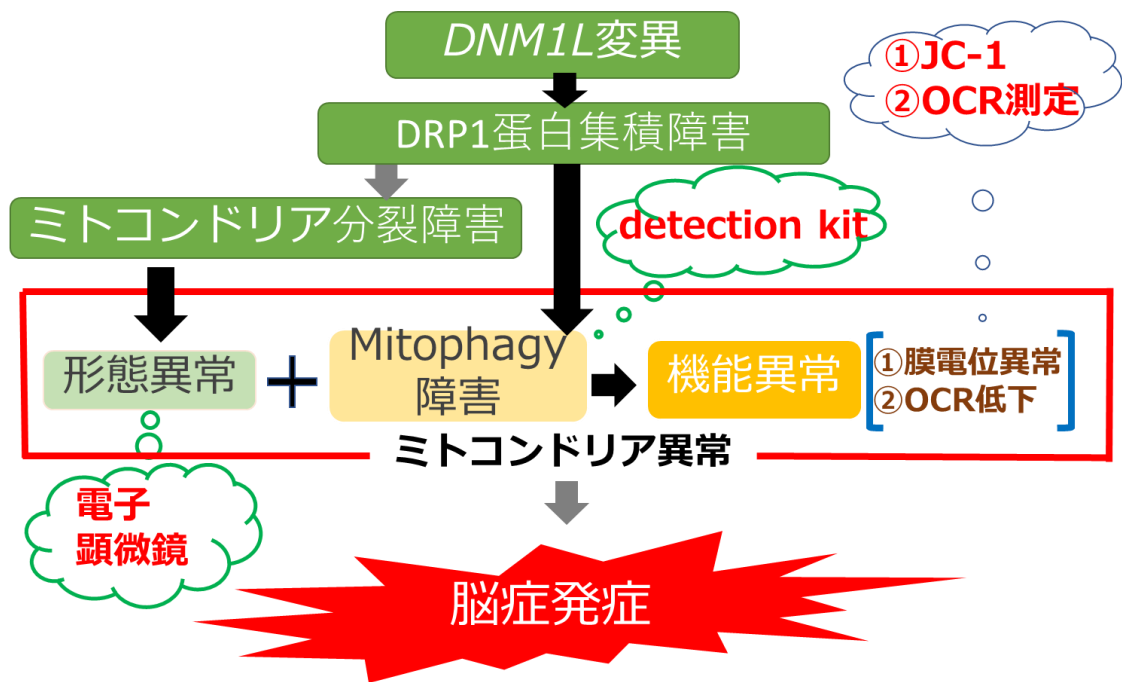


図 15 *DNMI1* 変異による神経症状の病態仮説とその証明

DNMI1 関連脳症の病態仮説とその証明をシェーマにして示す。*DNMI1* 遺伝子異常によるミトコンドリア分裂障害による形態異常を電子顕微鏡による観察で示し、mitophagy 異常は mitophagy detection kit で示した。ミトコンドリア膜電位異常を JC-1、OCR 低下にて示した。

JC-1: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolo-carbocyanine iodide

| | Pt. 1 Waterham et al., 2007 ⁽¹⁾ | Pt. 2 Vanstone et al., 2015 ⁽⁴⁾ | Pt. 3 Chao et al., 2016 ⁽⁵⁾ | Pt. 4 Chao et al., 2016 ⁽⁵⁾ | Pt. 5 Fahrner et al., 2016 ⁽⁶⁾ | Pt. 6 Fahrner et al., 2016 ⁽⁶⁾ | Pt. 7 Diez et al., 2017 ⁽⁷⁾ |
|--------------------------|---|---|---|---|--|--|---|
| 発症年齢 | 6 d | 6 m | 14 m | 4 d | 4 y | 5 y | 3m |
| 死亡年齢 | 37 d | Alive | 5 y | 11 m | Alive | Alive | 2.5y |
| 筋緊張低下 | + | n.a. | + | + | + | +/- | + |
| 眼振 | + | n.a. | + | - | n.a. | n.a. | + |
| てんかん | n.a. | + | + | n.a. | + | + | - |
| Increased lactate in CSF | + | n.a. | n.a. | n.a. | - | - | + |
| Abnormal MRC enzymology | - | - | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | - |
| <i>DNM1L</i> 変異 | c.1184C>A p.A395D | c.1085G>A p.G362D | c.1048G>A p.G350R | c.1135G>A p.E379K | c.1207C>T p.R403C | c.1207C>T p.R403C | c.1337G>T p.C446P |

表 1 症例 1 と同じ central domain に *DNM1L* 遺伝子変異を有した既報告症例のまとめ

症例 1 と同部位の *DNM1L* 遺伝子変異を有する既報告症例のまとめを示す。

発症年齢、死亡年齢、筋緊張低下、眼振、てんかん発作の有無、乳酸上昇、ミトコンドリア呼吸鎖活性低下の有無、変異部位に着目してまとめた。

CSF: cerebrospinal fluid (脳脊髄液), MRC: mitochondrial respiratory chain (ミトコンドリア呼吸鎖), n.a.: not applicable