

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文  
要 約

表 題 オートファジー病 SENDA/BPAN に対する治療法開発を目指した  
分子生物学的病態解明

申 請 者 氏 名 月田貴和子

担当指導教員氏名 村松一洋

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
専攻 地域医療学系  
専攻分野 生殖・発達分野  
専攻科 成育医学

使用文字数 2633 字

## 論 文 要 旨

氏名 月田 貴和子

### 表題

### オートファジー病 SENDA/BPAN に対する治療法開発を目指した分子生物学的病態解明

#### 1 研究目的

Static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA)/ $\beta$ -propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN)は、小児期から知的発達が停滞し、成人期にジストニアやパーキンソン様症状を呈する神経変性疾患である。大脳基底核に鉄沈着の所見を認め、脳内鉄沈着を伴う神経変性症 (neurodegeneration with brain iron accumulation : NBIA) に属する。

原因遺伝子の *WDR45* は、オートファジーに重要な分子 WIPI4 をコードする。オートファジーとは細胞内成分をリソソーム酵素により分解する機構で、細胞内品質を維持する他、栄養素をリサイクルする役割を担う。WIPI4 はオートファジーの初期段階に関与するが、鉄代謝との直接的な関係は全くわかっていない。他の主要なオートファジー関連遺伝子の異常による鉄沈着の報告はなく、SENDA/BPAN の病態生理は不明である。本研究では、SENDA/BPAN における鉄代謝の障害起点を探り、オートファジー機能との関係を明らかにする。さらに、遺伝子導入による表現型の改善

を目指し、治療法開発の基盤を確立する。

## 2 研究方法

患者・健常者由来の線維芽細胞を用いて、オートファジー活性およびオートファジーと鉄代謝に関連する分子を評価した。オートファジーは飢餓によって誘導され、リソソームで細胞内成分を分解する。そこで、飢餓培地でオートファジを誘導する条件とリソソーム阻害薬でオートファジーを阻害する条件を設け、オートファジーによる分解能力を評価した。オートファジーの分解基質である LC3 のウェスタンブロットや、GFP 標識した LC3 の蛍光輝度の変化量から、オートファジー活性を定量した。鉄代謝に関しては、二価鉄（自由鉄）、三価鉄（貯蔵鉄）、細胞内への鉄の取り込みを担うトランスフェリンレセプターと divalent metal transporter 1 (DMT1)、排出を担うフェロポルチン (FPN)、細胞内に鉄を貯蔵するフェリチン、フェリチン関連分子の発現量を調べた。また、AAV ベクターによる *WDR45* の遺伝子導入によって、表現型が改善するか評価した。

## 3 研究成果

患者細胞では、WIPI4 のタンパク発現量が低下ないし欠損していた。オートファジー活性は、ウェスタンブロットを用いた方法でも、GFP-LC3 を用いた方法でも、健常者の半分程度に減少していた。フェリチンの分解能は著しく低下しており、フェリチンが著増していた。二価鉄、三価鉄の量や、DMT1、FPN のタンパク発現量にも変化がみられた。また、フェリチン関連分子が著しく減少していた。患者細胞に *WDR45* を遺伝子導入したところ、WIPI4 のみならずフェリチン関連分子のタンパク発現量が回復し、フェリチンや DMT1、FPN の発現量も健常者細胞レベルに改善した。

#### 4 考察

鉄は二価鉄および三価鉄として細胞内に存在する。二価鉄は酸化還元反応の中心として様々な生理学的生化学的反応に利用される一方、過剰になると活性酸素種を生じて細胞傷害をもたらす。そのため、細胞内の鉄の恒常性は厳格に調整されている。余剰な鉄は、安定で低毒性の三価鉄としてフェリチンに貯蔵され、鉄需要が高まった時にはフェリチンが分解され、貯蔵されていた三価鉄が二価鉄に還元されて細胞質に放出される。

これまで SENDA/BPAN を含む NBIA では、大脳基底核への鉄沈着が共通する症候であることから、過剰な二価鉄による中枢神経傷害が病態形成の核であると認識されてきた。そのため、鉄のキレート療法が治療法として挙げられている。しかし、SEND A/BPAN に関しては鉄キレート剤の投与により症状が増悪し、中断によって改善することが報告されている。本研究により、SEND A/BPAN における鉄イオンや、その輸送体の量的変化が明らかとなり、細胞傷害性の原因について新たな見解が示された。

*WDR45* 遺伝子導入により、患者細胞の鉄代謝が正常化したことは、病態を是正する主要な手法になり得ると考えられ、今後の治療法開発の展開が期待される。また、*WIPI4* はフェリチン関連分子の安定化に関与することが示唆される。

#### 5 結論

(甲種)

本研究では、これまで未解明であった SENDA/BPAN における、鉄代謝異常をきたす病態について解明した。また、*WDR45* の遺伝子導入により表現型が回復した結果から、正常遺伝子機能を補うことで、表現型を回復させることが可能であることも併せて示した。