

氏 名	つき 月 田 貴和子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 659 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 久 米 晃 啓 (委 員) 教 授 岩 本 禎 彦 教 授 森 田 光 哉

論文内容の要旨

1 研究目的

Static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA)/ β -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ー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、SENDA/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、SENDA/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

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。

論文審査の結果の要旨

本研究において申請者は、static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA) / β -propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) の原因遺伝子 *WDR45* とその産物である WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4 (WIPI4) の機能解析と患者の病態解析を行った。論文の骨子は以下の通りである。

1. 患者 4 名における *WDR45* 転写産物量は欠損～中等度低下～正常とさまざまであったが、産物である WIPI4 蛋白は欠損ないし中等度減少していた。患者細胞ではオートファジー活性が低下しており、WIPI4 蛋白がオートファジーの初期過程に重要な役割を果たしていることが裏付けられた。

2. 患者では中枢神経系、特にドパミン作動性神経に鉄が沈着していることは報告されてきたが、その本態は不明であった。申請者は、患者細胞を用いて、沈着するのは二価鉄ではなく三価鉄であり、主にフェリチンの形で貯蔵鉄として存在することを示した。
3. 患者細胞では二価鉄の取り込みは促進、排出は減少していた。
4. 患者細胞ではフェリチン分解活性が著明に低下しており、WDR45 遺伝子変異が貯蔵鉄利用を妨げていることが示唆された。
5. 以上から、患者では、細胞のエネルギー代謝に必要な二価鉄は不足気味であることが示唆された。この仮説に立つと、脳に沈着している鉄の減少を狙って患者に鉄キレート剤を投与すると、むしろ病勢が悪化するという現象がよく説明できる。
6. さらに、AAV ベクターを用いて患者細胞に正常 WDR45 遺伝子を導入すると、オートファジー活性が回復した。

以上より、これまで謎であったオートファジーと鉄代謝の関連の一端が明らかとなり、SENDA/BPAN における細胞死と鉄沈着の関係が示唆された。すなわち、SENDA/BPAN における神経細胞死は過剰鉄による活性酸素種産生などの細胞ストレスによって引き起こされるものではなく、むしろ、貯蔵鉄の利用障害によって細胞のエネルギー需要が満たされないことに由来するのではないかという、病態形成の本質に迫る研究成果である。さらに、遺伝子治療によって病態改善が望める可能性も示され、発展性も大きい。

学位論文として十分な質を有しており、若干の語句修正をもって合格とした。論点を明らかにして投稿論文を作成すれば、有力な学術誌に掲載されることも十分可能であろう。

最終試験の結果の要旨

申請者は学位論文の順にそって研究内容の発表を行った。臨床的な背景から研究成果を十分に理解できるように説明し、結果から得られる考察を適切に述べた。発表の内容は論文審査の結果に述べた通りである。

審査員からは 2 点質問があった。

1. X 連鎖劣性遺伝型式で継承される SENDA4 症例のうち、3 例は女性例であった。女性例は全て、X 染色体不活化の偏りによって発症したことが示されたが、線維芽細胞発現 WIPI4 蛋白発現量と臨床症状との相関がそれほど明らかでない 1 症例についてどう考えるか？

→申請者はこの質問に対し、考えられる可能性について明確に答えた。

2. イムノブロットを用いたオートファジー活性の評価はどのようにしてなされたのか？

→申請者はこの質問に対しても、実験系に加えた試薬の作用と結果として得られるリードアウトからオートファジー活性が推定できることを明確に答えた。

このように、申請者はいずれの質問にも的確に返答することができ、研究全体を通して自らがを行い、十分に意義や実験系の限界を理解していることを示した。

以上より、発表、質疑応答の内容から研究者として十分な資質を有しており、医学博士号に値すると判断し、最終試験に合格とした。