

幹細胞技術とモデルマウスを用いた  
Perry 病に関する研究

(要約版)

2023

福井 悠斗



# 目次

緒言 .....	1
第一章 Perry 病原因遺伝子変異が DCTN1 凝集体形成に与える影響の解明 .....	3
実験方法 .....	5
実験結果 .....	7
考察 .....	11
第二章 Perry 病病態モデルの構築と病態発症機序の解明 .....	13
総括および結論 .....	16
謝辞 .....	17
引用文献 .....	18

## 緒言

Perry 病は、DCTN1 遺伝子のミスセンス変異を原因とする常染色体顕性遺伝性の神経変性疾患であり、パーキンソニズム、うつ症状、体重減少および中枢性低換気を呈する希少疾患である。Perry 病は 50 歳前後に発症し約 5 年で死亡する予後不良の疾患であるが、有効な治療薬は未だ開発されていない。Perry 病原因遺伝子変異として、DCTN1 遺伝子におけるミスセンス変異が多数同定されており、Perry 病患者死後脳では DCTN1 陽性凝集体に加えて他の神経変性疾患でも見られる TDP-43 凝集体が存在することが示されている。Perry 病患者死後脳におけるセロトニン神経の変性脱落から、本疾患の病態形成におけるセロトニン神経の重要性が示唆されているが、その詳細は未だ不明である。

本研究の第一章では、神経変性疾患病態と密接に関わる細胞内凝集体形成に Perry 病原因遺伝子変異が与える影響を網羅的に解析した。また第二章では、セロトニン神経変性脱落が生じる Perry 病の疾患モデルとして、Perry 病原因遺伝子変異を導入したヒト iPS 細胞を樹立するとともに、セロトニン神経へと分化誘導しその表現型を解析した。さらに、Perry 病原因遺伝子変異を導入したマウスを作製し行動学的検討に供した。

本研究により得られた新奇知見は以下の通りである。

第一章では、ALS および健常者で見出された変異 DCTN1 は野生型同様の微小管状の局在を示したのに対し、Perry 病原因変異 DCTN1 の全てが凝集体を形成することを見出した。さらに、野生型 DCTN1 の存在下ではこの凝集体形成が顕著に抑制されることを見出した。

第二章では、セロトニン神経への頑健な分化誘導方法を確立し、ヒト iPS 細胞に Perry 病原因変異を導入することで、病態モデルセロトニン神経を作製することに成功した。さらに、野生型マウスに Perry 病原因変異を導入することで病態モデルマウスを作製した。作製したモデルを解析することで、Perry 病におけるセロトニン神経病理を再現し、核酸医薬の有効性を示唆する知見を得た。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ANOVA	analysis of variance
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
ASO	antisense oligonucleotides
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCTN1	dynactin I
dHMN	distal hereditary motor neuropathies
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DQ	dasatinib and quercetin
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FTLD	frontotemporal lobar degeneration
GFP	green fluorescent protein
HC	healthy control
HSP	heat shock protein
iPS	induced pluripotent stem
miRNA	micro RNA
MND	motor neuron disease
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	PBS containing 0.1% Triton X-100
PCR	polymerase chain reaction
PLL	poly-L-lysine
PSP	progressive supranuclear palsy
RNA	ribonucleic acid
SHH	sonic hedgehog
TDP-43	transactive response DNA-binding protein of 43 kD
WT	wildtype

## 第一章

# Perry 病原因遺伝子変異が DCTN1 凝集体形成に与える影響の解明

Perry 病は、常染色体顕性遺伝性の希少神経変性疾患であり、パーキンソン症状、うつ病/無気力、予期せぬ体重減少、および中枢性低換気症を主徴とする[1]。世界中の患者数は 100 人未満で、発症の平均年齢は 49 歳である[2][3]。発症から死亡までの平均病期が 5 年であること[2][3]であり、非常に予後の悪い疾患である。初期症状としてうつ病/無気力を示し、疾患後期では夜間の低換気が観察され、呼吸不全、不眠症が最大の死因である[3][4]。Perry 病原因遺伝子変異として、dynactin I 遺伝子 (DCTN1) におけるミスセンス変異が F52L、G67D、G71A、G71E、G71R、T72P、Q74P、および Y78C の 9 種類が同定されており、全て DCTN1 のエクソン 2 に位置している[3][5-12]。患者数が限られているため、正確には算出できないが、Perry 病の浸透度はほぼ 100% であると考えられる[13]。DCTN1 遺伝子は dynactin 複合体の構成タンパク質である p150<sup>glued</sup> をコードしており、軸索逆向性輸送における微小管結合において重要な役割を果たしている[14][15]。しかし、DCTN1 変異が Perry 病の疾患病態をもたらすメカニズムはいまだ不明のままである。

組織学的解析では、Perry 病患者の基底核および脳幹の神経細胞に TDP-43 および dynactin 陽性の凝集体が存在することが示されている[14]。最近では、TDP-43 凝集体を死後組織で確認することに基づいて、多くの神経変性疾患、ALS や TDP-43 を含む前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP) を含む「TDP-43 プロテノパシー」と考えられている[16][17]。さらに、アミロイドβ、リン酸化タウ、αシヌクレインなどの脳内タンパク質凝集体がアルツハイマー病とパーキンソン病など神経変性疾患で数多く報告されている[18][19]。これらの報告から、タンパク質凝集体が多様な神経変性疾患の病因において重要な役割を果たす可能性が示唆されている。かかる神経変性疾患に関する知見と一致して、Araki らは p150<sup>glued</sup> のいくつかの変異体 (F52L、G59S、G71R) が細胞質にまばらに分布し、細胞内凝集体を形成する一方、野生型 p150<sup>glued</sup> は凝集体を形成せず、微小管に沿った糸状の分布を示すことを報告している[5]。Perry 病の DCTN1 変異が 2009 年に発見されて以来、現在までに全世界で 18 以上の家族で 12 種類の変異が同定された[3]のに対して、DCTN1 ミスセンス変異は遠位性家族性モーターニューロパシー (dHMN)、運動ニューロン病 (MND) [20-22]、ALS[23]、FTLD、および進行性核上性麻痺 (PSP) などの神経変性疾患の患者、および健常対照群 (HC) で報告されている[24]。先行研究では、一部の DCTN1 ミスセンス変異が p150<sup>glued</sup> の誤局在とタンパク質凝集体形成を引き起こすこ

とが示されているが、この細胞表現型がすべての DCTN1 変異に共通しているかどうかは未だ不明である。さらに、Perry 病は常染色体優性の遺伝性疾患であるため、生理学的条件下で DCTN1 変異体が野生型タンパク質と共存するが、野生型 p150<sup>glued</sup> の存在が変異型 p150<sup>glued</sup> の凝集体の形成をどのように影響を与えるかも不明のままである。

そこで本研究では、p150<sup>glued</sup> の変異体の細胞内局在に与える影響を網羅的に検討し、さらに野生型 p150<sup>glued</sup> を変異体と共発現させることで変異体凝集体の形成に及ぼす影響を評価した。

## 実験方法

### ベクター作製

pCAG-ALFA-DCTN1 (WT) の構築には、HEK 293T 細胞由来のヒト cDNA から DCTN1 フラグメントを PCR により増幅し、ALFA タグ配列[25]を N 末端に挿入した。次に、そのフラグメントを pCAG-EGxxFP (addgene #50716) から得られた pCAG の骨格に NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (E2621, Ipswich, MA, USA) を使用してライゲーションした。必要なプライマーは NEbuilder Assembly ツール (<https://nebuilder.neb.com>) を用いて設計した。pCAG-ALFA-DCTN1 (F52L, K56R, G59S, G67D, G71A, G71E, G71R, T72P, Q74P, Y78C, I87T, R1049Q, R1101K) の作製には、野生型フラグメントから変異 DCTN1 フラグメントを PCR で全長を増幅し、NEbuilder HiFi DNA Assembly Master Mix を使用してライゲーションした。pCAG-GFP-DCTN1 (WT) の構築には、HEK 293T 細胞由来のヒト cDNA から DCTN1 フラグメントを PCR で増幅した。さらに、pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-backbone[26]から GFP フラグメントを PCR で増幅し、GS リンカー配列 ((GGGGS)<sup>2</sup>)を N 末端に挿入した。その後、これらのフラグメントを pCAG-EGxxFP (addgene #50716) から得られた CAG 骨格と NEbuilder HiFi DNA Assembly Master Mix を使用してライゲーションした。

### HEK293T 細胞における ALFA タグ付き p150<sup>glued</sup> 過剰発現

HEK 293T 細胞として Lenti-X 293T 細胞 (Clontech, Mountain View, CA, USA) を使用した。HEK 293T 細胞は PLL でコーティングされたカバーガラス (Matsunami glass, Osaka, Japan) 上で 24 ウェルディッシュに 50%~60%コンフルエンスまで培養した。その後、クローニングベクター (pCAG-ALFA-DCTN1 (WT, F52L, K56R, G59S, G67D, G71A, G71E, G71R, T72P, Q74P, Y78C, I87T, R1049Q, R1101K)) の 0.8 µg と lipofectamine 2000 (ThermoFisher scientific, Carlsbad, CA, USA) の 1.6 µL を 100 µL の Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に添加した。15 分のインキュベーション後、プラスミド混合物をディッシュに滴下し、37°C でインキュベーションしました。解析はトランスフェクションの 24 時間後に行った。

## HEK293T 細胞における GFP で標識した野生型 p150<sup>glued</sup> および ALFA タグ付き p150<sup>glued</sup> の共過剰発現

HEK 293T 細胞 (Clontech, Mountain View, CA, USA) は PLL でコーティングされたカバーガラス (Matsunami glass, Osaka, Japan) 上で 24 ウェルディッシュに 50%~60%コンフルエンスまで培養した。その後、0.4  $\mu$ g のクローニングベクター (pCAG-ALFA-DCTN1 (WT, F52L, K56R, G59S, G67D, G71A, G71E, G71R, T72P, Q74P, Y78C, I87T, R1049Q, R1101K)) と、0.4  $\mu$ g のクローニングベクター (pCAG-GFP-DCTN1 (WT)) と、lipofectamine 2000 (ThermoFischer scientific, Carlsbad, CA, USA) 1.6  $\mu$ L を 100  $\mu$ L の Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に添加した。15 分のインキュベーション後、プラスミド混合物をディッシュに滴下し、37°C でインキュベーションした。解析はトランスフェクションの 24 時間後に行った。

## 免疫細胞化学

ALFA タグ付き野生型および変異 p150<sup>glued</sup>、GFP で標識した野生型 p150<sup>glued</sup> をトランスフェクトした HEK293T 細胞は、まず 37°C の PBS で 30 秒間 1 回洗浄後、メタノール (-20°C) で固定した。その後、これらの細胞は透過処理のために 4°C の 0.1% Triton X-100 を含む PBS (PBS-T) を 2 回 5 分ずつ処置し、4°C の PBS で 5 分間洗浄後、室温で 30 分間 1.5%BSA (01281-97, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む PBS (ブロッキングバッファー) でブロッキングした。細胞はブロッキングバッファー中で希釈された以下の一次抗体でインキュベートした: goat polyclonal anti-p150<sup>glued</sup> antibody (1:200; ab11806, abcam, Cambridge, UK)、rabbit polyclonal anti-ALFA antibody (1:1000; N1581, NanoTag Biotechnologies, Göttingen Germany)、goat polyclonal anti-GFP antibody (1:500; MSFR101910, Frontier institute, Hokkaido, Japan)。インキュベーション後、細胞は 10 分間ごとに 3 回 PBS で洗浄し、Alexa Fluor 488 標識の donkey anti-goat IgG (1:300; A11058, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) および Alexa Fluor 594 標識の donkey anti-rabbit IgG (1:300; A21207, Life Technologies) で 1 時間室温でインキュベートした。その後、ガラス切片を PBS で 3 回洗浄し、DAPI Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) でスライドガラスに乗せた。蛍光画像は FluoView FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) およびソフトウェア (FV10i-SW, Olympus, Tokyo, Japan; Image J, NIH, Bethesda, MD, USA) を使用した。我々は p150<sup>glued</sup> の凝集体を、細胞質内で糸状の分布を示さない蛍光の蓄積と定義した。凝集体の定量はブラインドで行った。結果は各突然変異に無作為に選択された 5 つの視野からの定量を表しており、3~5 回の実験を総合した。

## 統計解析

全てのデータは平均値  $\pm$  標準誤差で表示した。One-way ANOVA の後に Tukey 検定を用いて、GraphPad Prism (version 10, GraphPad Software) で解析した。危険率 5%未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

## 実験結果

### 野生型および変異型 p150<sup>glued</sup> の細胞内分布

Perry 病に関する病理報告では、黒質および青斑核での重篤な神経細胞の喪失、および残存する神経細胞での DCTN1 陽性凝集体が認められている[4][27]。Perry 病の病理を再現するために、HEK293T 細胞に過剰発現した野生型および変異型 p150<sup>glued</sup> の細胞内分布を検討した (図 1-1A)。これまでの Perry 病患者で報告された変異体に加えて、他の神経変性疾患と健常者で認められるミスセンス変異も検討した。DCTN1 の G59S 変異は以前に家族性運動ニューロン疾患[20]で同定されており、声帯麻痺を特徴とすることが Perry 病[21]とは異なる。p150<sup>glued</sup> の G59S 変異は、微小管結合能力の低下と細胞内で凝集することが報告されている[22]。また、DCTN1 の R1049Q および R1101K 変異は、散発性 ALS 患者の大規模な遺伝子スクリーニングで見出されており[23]し、I87T 変異は健康な対照者で同定されている[24]。免疫細胞化学解析の結果、ALFA タグ付きの野生型 p150<sup>glued</sup> は、既報[5][14][23]に一致する糸状の細胞質分布を示した (図 1-1B)。この結果から、ALFA タグの追加は p150<sup>glued</sup> の局在に影響を与えなかったことが示される。野生型と同様に、ALFA タグの付いた K56R、I87T、R1049Q、および R1101K 変異は糸状の細胞質分布を示した (図 1-1B)。一方で、Perry 病原因変異 (F52L、G67D、G71R、G71A、G71E、T72P、Q74P、および Y78C) および MND で見られた G59S 変異に関連する変異型 p150<sup>glued</sup> は、細胞質に様々な大きさの凝集体を形成することが示された (図 1-1B、C)。変異体を発現する細胞の中で p150<sup>glued</sup> 陽性の凝集体を持つ細胞の割合を定量すると、野生型よりも変異体群で有意に高かった ( $F_{13,32} = 53.5$ ,  $P < 0.001$ , one-way ANOVA ;  $P < 0.001$ , Tukey の多重比較検定 ; 図 1-1D)。

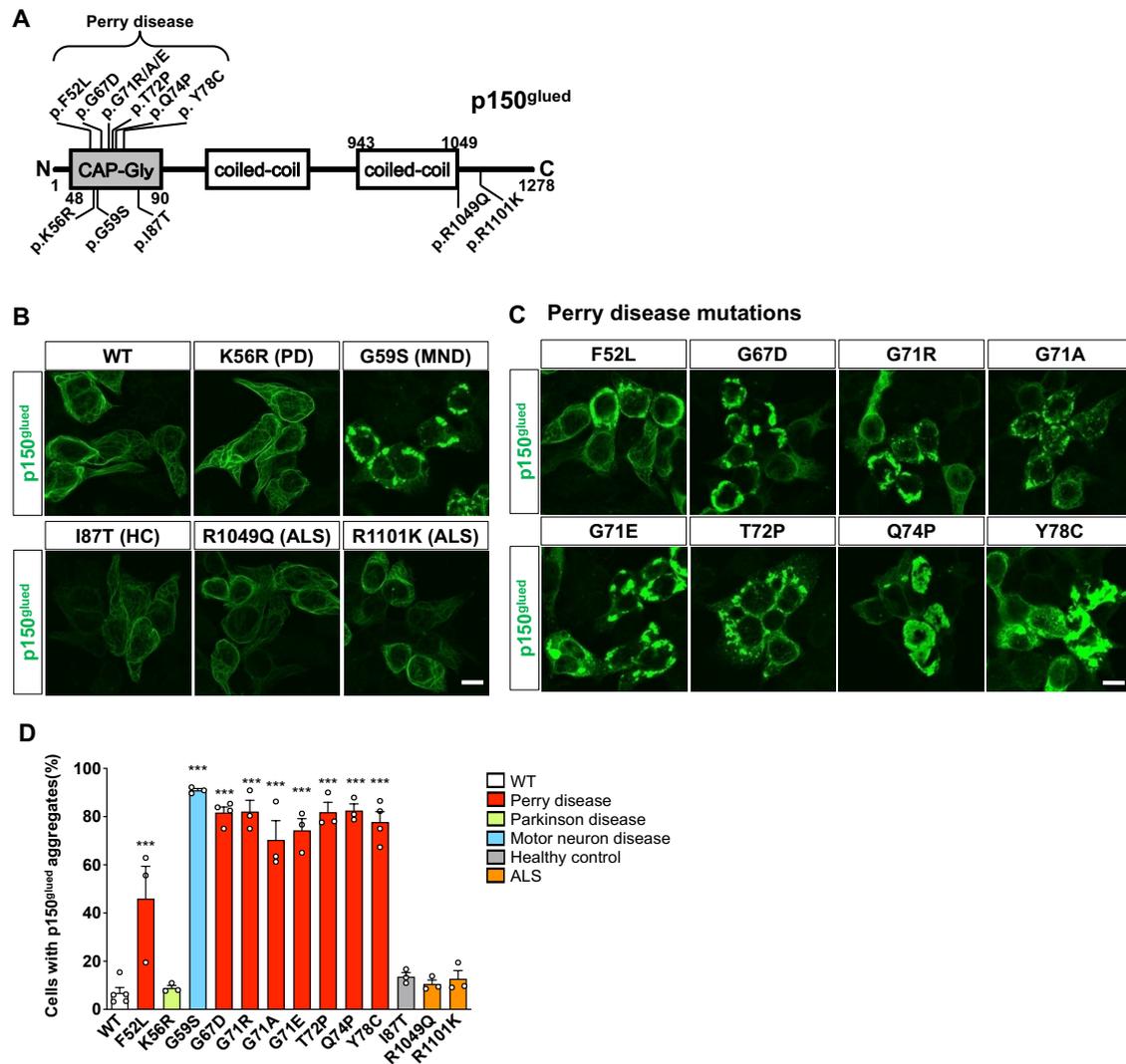


図 1-1 野生型および変異型 p150<sup>glued</sup> の細胞内分布

- (A) ダイナクチンの p150<sup>glued</sup> サブユニットの概略図。CAP-Gly; 微小管結合ドメイン。
- (B、C) ALFA タグ付き野生型 (WT) および Perry 病以外の変異体 p150<sup>glued</sup> を過剰発現した HEK293T 細胞 (B)、および Perry 病原因変異体 p150<sup>glued</sup> (C) は p150<sup>glued</sup> に対する抗体を用いて免疫染色した。スケールバー: 10 μm。PD; パーキンソン病。MND: 運動ニューロン病。HC; 対照群。ALS; 筋萎縮性側索硬化症。
- (D) 凝集体を含む p150<sup>glued</sup> 陽性細胞の割合。\*\*\*P < 0.001 vs. WT、by ordinary one-way ANOVA、post hoc Tukey's Multiple Comparison Test。独立した 2 回の実験で n = 3-5 の生物学的反復で検討した。データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

### 野生型 p150<sup>glued</sup> と変異体を同時に過剰発現させると、 変異型 DCTN1 の凝集を抑制する

Perry 病は常染色体顕性遺伝性の疾患であり、生理的条件下では DCTN1 変異体は野生型のタンパク質と共存している。変異体が生理的条件下で野生型のタンパク質の分布を妨げるかどうかを検討するために、GFP で標識した野生型 p150<sup>glued</sup> と ALFA タグの付きの変異体 p150<sup>glued</sup> を同時に過剰発現させた。免疫細胞化学解析の結果、ALFA タグの付きの野生型 p150<sup>glued</sup> および K56R、I87T、R1049Q、および R1101K 変異は、GFP で標識した野生型タンパク質との共存条件下においても単体での発現と同様に糸状の細胞質分布を示した (図 1-2A)。Perry 病原因変異体 p150<sup>glued</sup> (F52L、G67D、G71R、G71A、G71E、T72P、Q74P、および Y78C) の一部は、GFP 標識野生型 p150<sup>glued</sup> の細胞内分布と同様に糸状の細胞質分布を示したが、もう一部では単体での発現時に比べて数は少ないものの p150<sup>glued</sup> の凝集体形成が認められた (図 1-2B)。一方で、G59S 変異体は野生型 p150<sup>glued</sup> が存在していても単体での発現時と同様に細胞質の凝集体を形成した (図 1-2A)。定量解析の結果、F52L 変異体と G59S 変異体を除く Perry 病変異体の全てを発現する細胞は、GFP と ALFA の両方に陽性な細胞の中で ALFA 陽性の凝集体を持つ細胞の割合が野生型よりも有意に高かった ( $F_{13,28} = 45.7, P < 0.001$ , one-way ANOVA ;  $P < 0.01$  (G67D、G71A 及び T72P) ,  $P < 0.001$  (G59S、G71E、Q74P、G71R 及び Y78C) , Tukey の多重比較検定 ; 図 1-2C)。

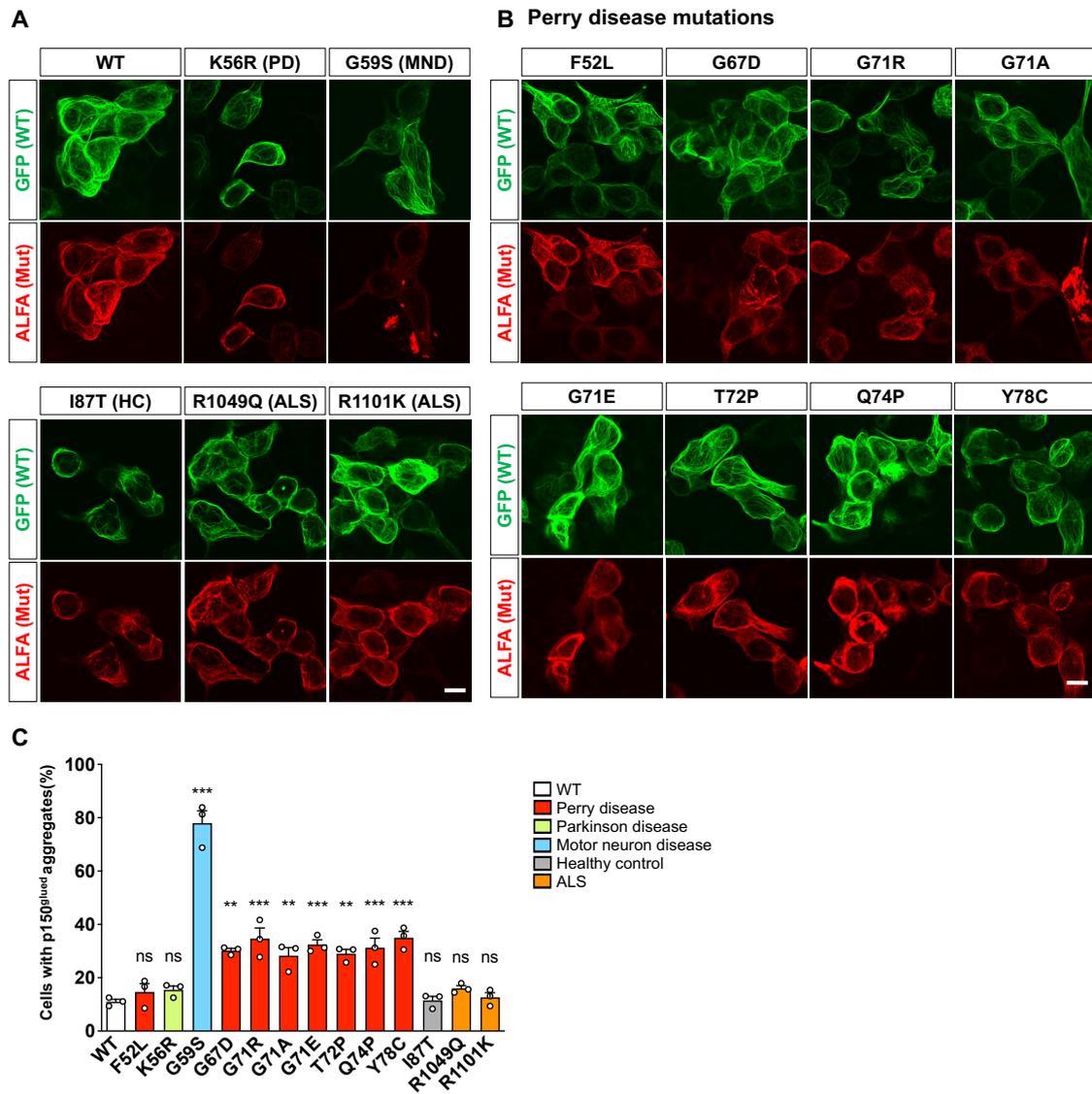


図 1-2 野生型 p150<sup>glued</sup> と変異体を同時に過剰発現させると、変異型 DCTN1 の凝集を抑制する  
 (A、B) Perry 病以外の ALFA タグ付き野生型 (WT) および変異体 p150<sup>glued</sup> を過剰発現した HEK293T 細胞 (A) および Perry 病原因変異体 p150<sup>glued</sup> (B) は、GFP または ALFA の抗体で免疫染色した。  
 スケールバー : 10  $\mu$ m。  
 (C) ALFA 陽性凝集体を含む GFP および ALFA 二重陽性細胞の割合。\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001、\*\*\*P < 0.001 vs WT、by ordinary one-way ANOVA、post hoc Tukey's Multiple Comparison Test。独立した 2 回の実験で n = 3-5 の生物学的複製で検討した。  
 データは平均値  $\pm$  標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

## 考察

本研究では、ALS および健常者で見出された変異 DCTN1 は野生型同様の微小管状の局在を示したのに対し、Perry 病原因変異 DCTN1 の全てが凝集体を形成することを見出した。さらに、野生型 DCTN1 の存在下ではこの凝集体形成が顕著に抑制されることを見出した。これらの結果は、Perry 病患者の非変異アレル由来の DCTN1 による疾患抑制の可能性を示唆するものである。

F52L 変異体は Perry 病変異体の中で比較的少ない凝集体を示した。この変異を有する患者は日本で見られ、病気の進行が比較的遅く、発病は 48~70 歳である[5]。したがって、F52L 変異体が細胞内凝集体を生成する傾向が弱いため、この病気の進行が遅い可能性が考えられる。また、凝集体を形成した変異体の中でも、特に Perry 病原因変異体で野生型タンパク質と共発現した際に凝集体形成能の低下が顕著に見られた。また、Perry 病以外で凝集体形成が見られた G59S 変異を有する患者では下位運動ニューロンでのみ神経変性が見られる[21]。Perry 病の患者の神経変性は基底核、脳幹、上位運動ニューロンで観察されるため、Perry 病とは異なった病理を示す[3]。G59S 変異体は Perry 病変異体よりも強力な凝集体形成能力を示し、これは野生型 p150<sup>glued</sup> との共発現時においても凝集体形成能に変化は見られなかった。これらの結果は、G59S 変異体を有する患者の病気の発症は 30 歳であり、Perry 病の 49 歳よりもはるかに早いことと関連している[20]。したがって、細胞内凝集体形成の強さが病気の早期発症と関連している可能性が考えられる。

p150<sup>glued</sup> は、コイルドコイルドメイン間の相互作用を介して二量体を形成し、その機能を発揮する[28]。そのため、野生型および変異タンパク質の共発現時に二量体を形成することが予想される。野生型と共発現した場合に変異タンパク質による凝集体の抑制が見られることから、野生型タンパク質は変異タンパク質と積極的に相互作用し、p150<sup>glued</sup> 変異体の誤局在を防ぐ可能性が考えられる。一方で、G59S 変異は折りたたみ構造の変化を通じて機能の障害を引き起こすことが知られており[20]、野生型タンパク質は G59S 変異体とは二量体を形成できず、その凝集能力を抑制できない可能性がある。

Dctn1 のホモノックアウトマウスは胚致死性である[29]が、Dctn1 ヘテロノックアウトマウスでは、Dctn1 G59S ヘテロノックインマウスで観察された神経病理学的異常が観察されていない[29]。これらの結果から、Perry 病が DCTN1 のタンパク質発現の減少によるものではなく、新規毒性機能の獲得から起こる可能性があることが示唆される。本研究では、野生型および変異 p150<sup>glued</sup> を共発現すると見かけ上は正常な細胞内局在を示したが、変異体の誤局在の抑制が機能の正常化につながるかどうかについては、さらなる検討が必要である。

Perry 病変異体は過剰発現すると細胞内凝集体を形成することを見出したが、凝集体形成のメカニズムはまもなく未解明である。本研究では、野生型 p150<sup>glued</sup> の発現による変異 p150<sup>glued</sup> の凝集体形成が抑制されたことから、内因性標的である微小管への結合の減少が凝集体形成を引き起こすことが考えられる。実際に、最近の研究によれば、RNA 結合タンパク質である TDP-43 は、RNA 結合の減少および HSP70 結合の低下により、細胞核および細胞質の凝集体を形成することが示唆されている[30]。しかし、変異 p150<sup>glued</sup> 凝集体に何が含まれているのかはいまだ不明のままである。これまでの研究で、変異 p150<sup>glued</sup> を過剰発現させた細胞での細胞質凝集体は TDP-43 と共局在しなかったことが報告されている[31][32]。一方で、Perry 病の患者の iPS 細胞から分化したドーパミン神経で p150<sup>glued</sup> とユビキチンを含む細胞内凝集体が見つかり[32]、変異 p150<sup>glued</sup> 凝集体は生理的条件下ではタンパク質分解経路を介して分解されることが考えられる。また、最近の研究では、ALS、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患で見られるタンパク質凝集体の詳細な構造が、クライオ電子顕微鏡によって同定されている[33-35]。そのため、同様に Perry 病患者および Perry 病特異的な iPS 細胞からのタンパク質凝集体の構造を解析することで、Perry 病の生物学的基盤および治療薬開発に資する知見が得られると考えられる。

結論として、ALS および健常者で見出された変異 DCTN1 は野生型同様の微小管状の局在を示したのに対し、Perry 病原因変異 DCTN1 の全てが凝集体を形成することを見出した。さらに、野生型 DCTN1 の存在下ではこの凝集体形成が顕著に抑制されることを見出した。凝集体形成のメカニズムおよび凝集体内に何が含まれるのかを明らかにすることで、Perry 病の病態メカニズムの解明および治療薬開発に資する知見が得られると考えられる。

## 第二章

### Perry 病病態モデルの構築と病態発症機序の解明

Perry 病は、常染色体顕性遺伝性の神経変性を示す希少疾患であり、パーキンソン症状、うつ病/無気力、予期せぬ体重減少、および中枢性低換気症を主徴とする[1]。世界中の患者数は 100 人未満で、発症の平均年齢は 49 歳である[2][3]。発症から死亡までの平均病期が 5 年であること[2][3]であり、非常に予後の悪い疾患である。初期症状としてうつ病/無気力を示し、疾患後期では夜間の低換気が観察され、呼吸不全、不眠症が最大の死因である[3][4]。Perry 病患者死後脳解析では、延髄の不確縫線核および淡蒼縫線核においてセロトニン神経細胞数が顕著に減少していることが報告されている。呼吸中枢である延髄におけるセロトニン神経の活動は CO<sub>2</sub> 誘発性の換気量増加反応を制御するため[36]、低換気の症状を示す Perry 病の病態との強い関連が示唆されている。また、背側縫線核などの他の脳部位におけるセロトニン神経はうつ症状などの精神症状においても重要な役割を果たしていることから[37]、本疾患の病態形成におけるセロトニン神経の重要性が示唆されているが、その詳細は未だ明らかにされていない。

iPS 細胞を用いた研究は、病態モデリング、薬剤スクリーニング、根本的なメカニズム解明において重要な役割を果たしている。特に、神経疾患や精神疾患など、患部細胞や病原部位へのアクセスが制限されている疾患に対しては、その有効性が期待されている。実際に、神経変性疾患である ALS においては患者由来 iPS 細胞から効率的に運動ニューロンを生成し、薬剤スクリーニングが行われている[38]。その結果、潜在的な治療薬候補としてロピニロールが同定され、現在第 1/2a 相試験が実施され有効性が示されている[39]。そのため、iPS 細胞を用いた研究は特に神経変性疾患において非常に有用であることが示唆されている。

また、ヒト iPS 細胞は多分化能を有し、発生工学に即した分化誘導手法を用いることでセロトニン神経へと分化させることができる[40]。しかし、この手法は、①誘導に非常に長い培養期間を要すること、②ソニックヘッジホッグ(SHH)など腹側-背側軸や吻側-尾側軸形成に関わる分泌タンパク質シグナリングの精密な調節が必須であり、ヒト iPS 細胞のクローンごとの性質の差による影響を受けやすいと考えられる。このことから、多数の患者から一定の品質でセロトニン神経を得るためには、多大な時間や労力が必要となると考えられる。また、疾患の原因を解明する上では、健常者と患者由来の iPS 細胞を同一条件で分化させ、比較することが重要であるため、iPS 細胞クローンごとに分化条件を変化させることは好ましくない。しかし、分泌タンパク質シグナリングの精密な調節が必須である既存の分化方法では、個々の

iPS 細胞ごとに条件を変化させる必要があると考えられる。従って、頑強性のある新たなセロトニン神経への分化手法の有用性は極めて高いと考えられる。

ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来のニューロンでは加齢に関連したマーカーが初期化されることが報告されている[41]。そのため、加齢性疾患モデルにおける神経変性は長期培養が必要である可能性が高いが、ヒト iPS 細胞由来のニューロンを実際に数年間 *in vitro* で培養することは非常に困難である。*in vitro* での加齢を模倣するための手法として、早老症の一種であるハッチンソン・ギルフォードプロジェリア症候群[42-44]に見られるタンパク質プロジェリンを過剰発現する手法があげられる。プロジェリンは、核膜タンパク質ラミン A をコードする LMNA 遺伝子のスプライシング変異によってより短い転写物として生じる。プロジェリンは異常に核膜に蓄積し、ラミン A の機能阻害によりヘテロクロマチンの形成、DNA 損傷応答、細胞周期、遺伝子の転写、およびテロメアの維持などの複数の核内経路を障害することで、老化細胞様の変化をもたらす[45]。実際に、遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞から誘導されたドーパミン神経は、通常条件下では野生型との間で表現型に差が認められなかったのに対して、プロジェリンを外因的に発現させることで対照群に比べて樹状突起数の減少やアポトーシスマーカーの発現上昇が生じることが報告されている[41]。そのため、特に長期培養の難しい iPS 由来神経において、プロジェリン発現による *in vitro* 加齢モデルの有用性が示唆されている。

近年、老化細胞を選択的に標的として排除する「セノリティクス」という概念に注目が集まっている。老化細胞は分裂を停止し、組織内に蓄積することで、さまざまな加齢関連疾患や慢性疾患の原因となる可能性がある。Src をはじめとする幅広いチロシンキナーゼに対して阻害作用のあるダサチニブと抗酸化フラボノイドであるケルセチン（以下、DQ と称する）は老化細胞除去作用を有することが示されており、この作用が老化過程の遅延または改善に寄与する可能性が注目されている[46]。加齢性疾患である Perry 病においても DQ による老化細胞の除去が有効である可能性が考えられる。

核酸医薬は遺伝性疾患における創薬モダリティとして最適なものの一つであると考えられる。これらは疾患固有の遺伝子異常を標的とし、異常タンパク質の発現を抑制することで病態の根本に働きかけ、疾患の進行を遅らせることで、症状の改善が期待される。米国では、アンチセンスオリゴ（ASO）を用いたスピラザが遺伝性疾患である脊髄性筋萎縮症に対する治療薬として承認され、核酸医薬の有効性が示されている [47]。これらの報告は、遺伝性希少疾患における核酸医薬による根本的治療の可能性を強く示唆している。

かかる背景の下、本章では、まず頑強性のある新たなセロトニン神経への分化手法を構築した。続いて、セロトニン神経変性脱落が生じる Perry 病の疾患モデルとして、Perry 病原因遺伝子変異を導入したヒト iPS 細胞を樹立するとともに、セロトニン神経へと分化誘導しその表現型を解析した。さらに、加齢性モデルとしてプロジェリンをセロトニン神経に発現させ、その表現系を解析した。また、Perry 病原因遺伝子変異を導入したマウスを作製し行動学的検討に供した。最後に、Perry 病原因変異体の特異的にノックダウンすることでセロトニン神経における治療効果を検討した。

本研究で著者は、より簡便で頑健なセロトニン神経への分化誘導方法を確立し、ヒト iPS 細胞およびマウスに Perry 病原因変異を導入することで、病態モデルセロトニン神経および病態モデルマウスを作製することに成功した。作製したモデルを解析することで、Perry 病におけるセロトニン神経病理を再現し、Perry 病原因変異体の特異的にノックダウンすることでセロトニン神経病理を改善した。

## 総括および結論

本研究においては、幹細胞技術とモデルマウスを用いて Perry 病原遺伝子変異の影響について検討を行い、以下の知見を得た。

### 第一章

- ・ ALS および健常者で見出された変異 DCTN1 は野生型同様の微小管状の局在を示したのに対し、Perry 病原因変異 DCTN1 の全てが凝集体を形成することを見出した。
  - ・ 野生型 DCTN1 の存在下ではこの凝集体形成が顕著に抑制されることを見出した。
- これらの結果は、Perry 病患者の非変異アレル由来の DCTN1 による疾患抑制の可能性を示唆するものである。

### 第二章

- ・ セロトニン神経発生に重要な転写因子 7 種類を様々な組み合わせで発現させた結果、ASCL1 および LMX1B の発現により機能的なセロトニン神経への分化誘導が可能であることを見出した。
- ・ ゲノム編集技術を用いて G67D あるいは Y78C の変異を片側のアレルのみに導入した iPS 細胞および一塩基挿入によるヘテロノックアウト iPS 細胞を樹立した。
- ・ プロジェリンを発現した G67D および Y78C 変異 iPS 細胞においてセロトニン神経細胞数の減少が観察された。
- ・ G67D ノックインマウスを作製し行動学的解析に供した結果、雌マウスにおけるうつ様行動の増加および雄マウスにおけるストレス脆弱性の増加を見出した。
- ・ 6 ヶ月齢ヘテロノックイン雌マウスにおいて黒質ドーパミン神経細胞数に変化が見られなかったのに対して、背側縫線核セロトニン神経細胞数は減少していた。
- ・ プロジェリンを発現させた Y78C 変異株で見られたセロトニン神経細胞数の減少は Y78C の特異的なノックダウンにより改善された。

これらの結果は、細胞老化と変異の相乗的効果によるセロトニン神経変性脱落が Perry 病の病態形成に関わることを示唆している。

以上、著者は DCTN1 変異体の網羅的解析により、Perry 病原因変異 DCTN1 の全てが凝集体を形成すること、野生型 DCTN1 による凝集体形成抑制の可能性を見出した。また、迅速かつ頑健なセロトニン神経への分化誘導方法を新たに確立し、ヒト iPS 細胞およびマウスに Perry 病原因変異を導入することで、病態モデルセロトニン神経および病態モデルマウスを作製することに成功した。作製したモデルを解析することで、Perry 病におけるセロトニン神経病理を再現し、核酸医薬の有用性を示唆する知見を得た。上記の研究成果は、Perry 病の病態解明および治療薬開発に資する基礎的な知見となるものである。

## 謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科名誉教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました和歌山県立医科大学薬学部教授 中川貴之先生ならびに京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、助教 永安一樹 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました和歌山県立医科大学薬学部医療薬学部部門長・教授 赤池昭紀 先生、富山大学大学院総合医薬学研究科教授 久米利明 先生、神戸薬科大学薬学部講師 泉安彦 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、共同研究者として多大なる御協力および御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科教授 橋本均 先生、准教授 笠井淳司 先生、馬場優志博士、東京農業大学生命科学部教授 中澤敬信 先生および広島大学大学院医系科学研究科教授 吾郷 由希夫先生に深く感謝いたします。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言を頂きました京都大学大学院医学研究科助教 浅岡希美 先生および大阪公立大学大学院医学研究科助教 河合洋幸 先生をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。

また、本研究の遂行に多大なる御協力を頂きました、榊中このみ 修士、野口拓馬 学士、安藤千紘 博士、萩原雅子 学士に心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました日本学術振興会および京都大学大学院教育支援プログラムに深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Perry, T. L. *et al.* Hereditary Mental Depression and Parkinsonism With Taurine Deficiency. (1975).
2. Konno, T. *et al.* DCTN1-related neurodegeneration: Perry syndrome and beyond. *Parkinsonism and Related Disorders* vol. **41** 14–24 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.06.004> (2017).
3. Mishima, T. *et al.* Establishing diagnostic criteria for Perry syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **89**, 482–487 (2018).
4. Farrer, M. J. *et al.* DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nat Genet* **41**, 163–165 (2009).
5. Araki, E. *et al.* A Novel DCTN1 mutation with late-onset parkinsonism and frontotemporal atrophy. *Movement Disorders* **29**, 1201–1204 (2014).
6. Chung, E. J. *et al.* Expansion of the clinicopathological and mutational spectrum of Perry syndrome. *Parkinsonism Relat Disord* **20**, 388–393 (2014).
7. Bhatia, K. P. *et al.* Familial parkinsonism with depression: A clinicopathological study. *Ann Neurol* **34**, 842–847 (1993).
8. B Lechevalier *et al.* Familial parkinsonian syndrome with athymhormia and hypoventilation. *Rev Neurol (Paris)* **148**, 39–46 (1992).
9. Pretelt, F., Castañeda Cardona, C., Tacik, P., Ross, O. A. & Wszolek, Z. K. Latin America's first case of Perry syndrome and a new treatment option for respiratory insufficiency. *Journal of Neurology* vol. **261** 620–621 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7262-6> (2014).
10. Felicio, A. C. *et al.* In vivo dopaminergic and serotonergic dysfunction in DCTN1 gene mutation carriers. *Movement Disorders* **29**, 1197–1201 (2014).
11. Ohshima, S. *et al.* Autonomic failures in Perry syndrome with DCTN1 mutation. *Parkinsonism Relat Disord* **16**, 612–614 (2010).
12. Tacik, P. *et al.* Three families with Perry syndrome from distinct parts of the world. *Parkinsonism Relat Disord* **20**, 884–888 (2014).
13. Nlm Citation: Dulski, J. *et al.* DCTN1-Related Neurodegeneration. (2010).
14. Wider, C. *et al.* Elucidating the genetics and pathology of Perry syndrome. *J Neurol Sci* **289**, 149–154 (2010).
15. Waterman-Storer, C. M. *et al.* The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1) (actin-related protein/cytoplasmic dynein/microtubule-binding domain/Glued/microtubule motor). *Cell Biology* **92** (1995).
16. Wider, C. *et al.* Pallidonigral TDP-43 pathology in Perry syndrome. *Parkinsonism Relat Disord* **15**, 281–286 (2009).
17. Mishima, T. *et al.* Perry syndrome: A distinctive type of TDP-43 proteinopathy. *J Neuropathol*

- Exp Neurol* **76**, 676–682 (2017).
18. Andrade-Guerrero, J. *et al.* Advancing Alzheimer’s Therapeutics: Exploring the Impact of Physical Exercise in Animal Models and Patients. *Cells* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells12212531> (2023).
  19. Allen, S. G. *et al.* Peptide-based approaches to directly target alpha-synuclein in Parkinson’s disease. *Mol Neurodegener* **18**, 80 (2023).
  20. Puls, I. *et al.* Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* **33**, 455–456 (2003).
  21. Puls, I. *et al.* Distal Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Caused by Dynactin Mutation. *Ann Neurol* vol. 57 (2005).
  22. Levy, J. R. *et al.* A motor neuron disease-associated mutation in p150Glued perturbs dynactin function and induces protein aggregation. *Journal of Cell Biology* **172**, 733–745 (2006).
  23. Stockmann, M. *et al.* The dynactin p150 subunit: Cell biology studies of sequence changes found in ALS/MND and Parkinsonian Syndromes. *J Neural Transm* **120**, 785–798 (2013).
  24. Vilariño-Güell, C. *et al.* Characterization of *DCTN1* genetic variability in neurodegeneration. [www.neurology.org](http://www.neurology.org) (2009).
  25. Götzke, H. *et al.* The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nat Commun* **10**, (2019).
  26. Tanaka, K. *et al.* Secreted PLA2-III is a possible therapeutic target to treat neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun* **568**, 167–173 (2021).
  27. Tsuboi, Y. *et al.* Neurodegeneration involving putative respiratory neurons in Perry syndrome. *Acta Neuropathol* **115**, 263–268 (2008).
  28. Schroer, T. A. Dynactin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* vol. 20 759–779 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623> (2004).
  29. Lai, C. *et al.* The G59S mutation in p150glued causes dysfunction of dynactin in mice. *Journal of Neuroscience* **27**, 13982–13990 (2007).
  30. Yu, H. *et al.* HSP70 chaperones RNA-free TDP-43 into anisotropic intranuclear liquid spherical shells. *Science (1979)* **371**, (2021).
  31. Ishikawa, K. I. *et al.* p150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLoS One* **9**, (2014).
  32. Mishima, T. *et al.* Cytoplasmic aggregates of dynactin in iPSC-derived tyrosine hydroxylase-positive neurons from a patient with Perry syndrome. *Parkinsonism Relat Disord* **30**, 67–72 (2016).
  33. Zhang, W. *et al.* Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer’s and Pick’s diseases. (2019) doi:10.7554/eLife.43584.001.
  34. Schweighauser, M. *et al.* Structures of  $\alpha$ -synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature* **585**, 464–469 (2020).
  35. Arseni, D. *et al.* Structure of pathological TDP-43 filaments from ALS with FTLD. *Nature* **601**,

- 139–143 (2022).
36. Brust, R. D. *et al.* Functional and developmental identification of a molecular subtype of brain serotonergic neuron specialized to regulate breathing dynamics. *Cell Reports* **9**, 2152-2165 (2014)
  37. Nishitani, N. *et al.* Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology* **44**, 721-732 (2019).
  38. Fujimori, K. *et al.* Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med* **24**, 1579-1589 (2018).
  39. Mazzini, L. *et al.* iPSC-based research in ALS precision medicine. *Cell Stem Cell* **30**, 748-749 (2023).
  40. Lu, J. *et al.* Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **34**, 89-94 (2016).
  41. Miller, J. D. *et al.* Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* **13**, 691-705 (2013).
  42. Scaffidi, P. *et al.* Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* **11**, 440-5 (2005).
  43. Scaffidi, P. *et al.* Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* **312**, 1059-63 (2006).
  44. Hennekam, Raoul C M. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* **140**, 2603-24 (2006).
  45. Dechat, T. *et al.* Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* **22**, 832-53 (2008).
  46. Novais, E. J. *et al.* Long-term treatment with senolytic drugs Dasatinib and Quercetin ameliorates age-dependent intervertebral disc degeneration in mice. *Nat Commun* **12**, 5213 (2021).
  47. Kulkarni, J. A. *et al.* The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat Nanotechnol* **16**, 630-643 (2021).