

学位取得者／学位記

●平成28年度 (2016.4~2017.3) ●

●学位取得者

宮原由起

Negative feedback loop of cholesterol regulation is impaired in the livers of patients with Alagille syndrome.

Clin Chim Acta, 440 (2) : 49-54, 2015

取得年月日：2017年1月10日

木村武司

Limited immunogenicity of human induced pluripotent stem cell-derived cartilages.

Tissue Engineering Part A, 22 (23-24) : 1367-1375, 2016

取得年月日：2017年1月26日

坂野公彦

Systematic cellular disease models reveal synergistic interactions of trisomy 21 and GATA1 mutations in hematopoietic abnormalities

Cell Rep, 15 (6) : 1228-1241, 2016

取得年月日：2016年9月23日

那波伸敏

Constitutively active form of natriuretic peptide receptor 2 ameliorates experimental pulmonary arterial hypertension.

Mol Ther Methods Clin Dev. 3 : 16044, 2016

取得年月日：2017年1月10日

藤原 誠

Successful induction of sclerostin in human-derived fibroblasts by 4 transcription factors and its regulation by parathyroid hormone, hypoxia, and prostaglandin E2

Bone 85 : 91-98, 2016

取得年月日：2016年11月9日

近藤秀仁

Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans : a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms

Hum Mol Genet 26 (1) : 173-183, 2017

取得年月日：2017年1月10日



Negative feedback loop of cholesterol regulation is impaired in the livers of patients with Alagille syndrome.

宮原 由起

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Clin Chim Acta, 440 (2): 49-54, 2015

●目的

アラジール症候群 (AGS) は、JAG1 遺伝子または NOTCH2 遺伝子を責任遺伝子とし、毛細胆管の減少による胆汁うっ滞の他、特異顔貌、椎体異常、心血管系の異常、眼科的異常を複数伴う稀な先天異常症候群である。AGS の特徴的な症状として著しい高コレステロール血症があるが、この病態についてこれまで十分に解明されていない。そこで本症候群における高コレステロール血症をきたす分子学的機序について AGS 患者肝検体を用いて検討を行った。

●方法ならびに結果

胆汁うっ滞がコレステロール値に寄与しているのかを検討するために、23 名の AGS 患者の血清コレステロール値と血清胆汁酸値を後方視的に集積した。血清コレステロール値は血清胆汁酸値と有意に正の相関を示し、胆汁うっ滞が高コレステロール血症に関与していることが確認された。

次に肝移植を受けた 5 名の AGS 患者の肝組織を用いて、肝組織中の胆汁酸とコレステロールの含有量を測定したところ、健常児肝と比較し肝内のコレステロールおよび胆汁酸の含有量は有意に増加していた。肝内コレステロール量を一定に保つためのホメオスタシスの dysregulation が起きていることが示唆されたため、肝細胞におけるコレステロール制御に関わる分子について検討した。LDLR、SR-B I、HMGCR、CYP7A1、ABCA1、ABCG1、ABCG5、ABCG8、LXR α などについて、定量的リアルタイム PCR 解析を行った。成熟型 SREBP2 についてウエスタンブロット法にて蛋白定量を行った。

コレステロール合成における律速酵素である HMGCR、およびコレステロールを血液から細胞内へ取り込むトランスポーター LDLR と SRB I の発現レベルは増加し、コレステロールから胆汁酸への異化に必要な酵素である CYP7A1 の発現レベルは有意に低下していた。肝細胞から胆汁中へコレステロールを排出するトランスポーター ABCG5 および ABCG8、血液中へ排出するトランスポーター ABCG1 の発現は増加していた。

これらの制御にかかわる核内レセプターの発現を検討したところ、胆汁酸をリガンドとする FXR はコントロールと比較し発現レベルに差は認めなかったが、その下流にあり CYP7A1 を負に制御する SHP の発現は増加していた。肝細胞内の酸化コレステロールをリガンドとし ABCGs を正に制御する LXR α の発現も増加していた。これらはいずれも肝細胞内での胆汁酸や酸化コレステロールが増加したために起きた生理的反応と考えられたため、次に HMGCR、LDLR の発現を制御する SREBP2 について検討を行った。

SREBP2 はコレステロールを一定に保つための主要な因子である。ER 膜上のコレステロールが減少すると、それを感知した SCAP が構造変化をおこし、SREBP2 を ER 膜上にとどめている INSIG と離れ、SCAP がアンカー蛋白として SREBP2 をゴルジ体に運び、SREBP2 はそこで切断を受け成熟型蛋白となって標的遺伝子である HMGCR や LDLR を発現させ、細胞内コレステロール量を一定に保つように働く。AGS の肝内コレステロール含有量はコントロール肝と比較して増加していたが、SREBP2、SCAP の mRNA 量は、AGS とコントロール間で発現レベルに差を認めず、成熟型 SREBP2 の発現レベルも差は認めなかった。

● 総括

AGSの肝内コレステロール含有量は健常児肝と比較して増加していた。これはLDLR、SR-B I、HMGCRの発現増加、CYP7A1の発現低下によることが示唆された。AGS肝ではコレステロール含有量が増加しているにも関わらず成熟型SREBP2は抑制されておらず、このことがコレステロール制御のdysregulationの一因と考えられた。

● 本人コメント

臨床3年目より肝疾患を持つ子供たちの診療に携わってきましたが、この診療の中で生じた疑問の一つに、なぜAlagille症候群では高コレステロール血症をきたすのかということがありました。これを直接、大学院の研究テーマにでき、患者さんを感じながら研究できたことは臨床医学を志す私にとって幸いなことでありました。成果としては、新たな疑問を生みだしたに過ぎませんが、小さな一石を投じることはできたのではないかと考えています。出産、育児という時間を左右する出来事で一時休学し、復帰を非常に悩んだ時期がありましたが、叱咤激励し続け、復学を後押ししていただいた先生には感謝し尽せません。また大藪教授をはじめご協力、ご助言いただいた先生方にもこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。



Limited immunogenicity of human induced pluripotent stem cell-derived cartilages.

木村 武司

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Tissue Engineering Part A, 22 (23-24):

1367-1375, 2016

● 目的

関節軟骨は再生能が乏しい組織であり、一旦傷つくと自然に治癒することが困難である。日本では自己培養軟骨細胞を移植することで傷ついた軟骨を修復する治療が既に実用化されているが、採取と移植の2度の手術が必要で得られる組織も限られていることが課題である。軟骨は免疫原性が低く拒絶反応を起こし難い組織であり、海外では小児ドナーから採取された軟骨を用いた同種他家移植も行われている。移植に当たって免疫抑制の必要はなく既に7000例以上に移植され良好な成績が報告されているが、ドナー数は限られている。そこで今回、我々はヒトiPS細胞由来の軟骨が新しい移植用の細胞/組織の供給源となり得るかどうか評価するために、ヒトiPS細胞由来軟骨細胞や組織の免疫原性について解析を行った。

● 方法ならびに結果

ヒトiPS細胞から軟骨組織 (hiPS-Carts) を誘導し、そこから細胞外マトリックスを取り除いた細胞の部分 (hiPS-Chon) を分離した。比較として、ヒトの軟骨組織を取り出して培養した細胞 (hPC) をもちいて、免疫原性について検討を行った。

まず主要な免疫反応の元となるHLAの発現についてフローサイトメトリー、免疫組織化学、qRT-PCRでそれぞれ調べた。すると、体中の多くの細胞に発現しているHLA-ABCは、hiPS-Chonではあまり発現しておらず、免疫細胞に主に発現しているHLA-DRDPDQについても発現していなかった。

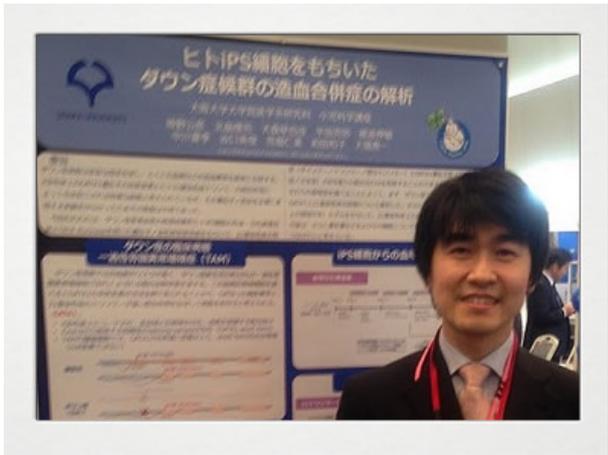
実際に移植する際には細胞ではなく、細胞外マトリックスをまとった軟骨組織の状態で移植することを想定している。HLA型が不一致であるhiPS-Carts/hPCとリンパ球と混合しin vitroでリンパ球の増殖反応をフローサイトメトリーとELISAによって検出したところ、hiPS-CartとhPCのどちらにおいてもリンパ球の増殖は惹起されなかった。NK細胞についても共培養後の活性化マーカー (CD69) を解析したが、hiPS-CartsによるNK細胞の活性化は見られなかった。また、軟骨細胞にはリンパ球の増殖反応を抑制する働きがあることがこれまでに報告されており、予め刺激を加えたリンパ球との共培養を行ったところhiPSC-CartsはhPCと同様にリンパ球の増殖を抑制した。

● 総括

ヒトiPS細胞から作製した軟骨組織は、形態的にはヒトの体から採取した軟骨組織と類似しているが、移植時の免疫反応についても同程度の低反応性が期待できるかは不明であった。今回の研究成果により、ヒトiPS細胞から作製した軟骨組織は、ヒトの体から採取した軟骨組織と同程度に免疫反応が少ないことが明らかとなった。あくまでin vitroでの成果であり今後動物モデルでの検討も必要であるが、新しい軟骨組織の供給源としてiPS細胞が利用できる可能性が示された。またHLA不一致でも移植することができる可能性があり、今後の幅広い臨床応用が期待できる。

●本人コメント

私は京都大学iPS細胞研究所(CiRA)の妻木範行教授の元で指導を受けました。CiRAは言わずと知れた山中伸弥教授が所長を務める、世界から注目を集める研究機関です。当初はおっかなびっくりでしたが、たくさんの方に助けて頂き充実した研究生生活を送ることができました。この研究はiPS細胞を用いた軟骨再生医療に関わる成果としてまとめたもので、in vitroでの免疫反応を評価する実験系の構築に苦労しました。最先端の環境で学ぶチャンスを与えてくださった大藪教授をはじめ小児科のスタッフの方々、それからいつも助けて頂いた妻木教授と妻木研メンバーにこの場を借りて御礼申し上げます。今後はもう一つの研究テーマである疾患特異的iPS細胞を用いた研究を進めたいと考えています。



Systematic cellular disease models reveal synergistic interactions of trisomy 21 and GATA1 mutations in hematopoietic abnormalities

坂野 公彦

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Cell Rep, 15 (6) : 1228-1241, 2016

●目的

ダウン症候群は21番染色体が3本あることによって引き起こされる、最も高頻度な染色体異常である。多くの合併症を有するなかで、とくに白血病のリスクが高いことが知られており、ダウン症候群新生児の約10%が一過性骨髄増殖症 (TAM; transient abnormality of myelopoiesis) と呼ばれる類白血病状態を呈し、その3-4割が急性巨核芽球性白血病へと進展する。最近、疾患集団の全ゲノム解析により、X染色体上の転写因子GATA1の短縮型変異と21トリソミーの両者が存在することがTAMの病態形成に必要十分であることが報告された。一方で21番染色体上のどの領域やどの遺伝子が病態発症と関わるのか、またGATA1変異とどのような相互作用をするのかについては、染色体数や各遺伝子の状態を正確に表す実験モデル系がなかったため、研究が進んでいなかった。

そこで今回われわれは、ダウン症候群患児由来のヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) とゲノム編集技術という2つの方法を用いることで、TAMの病態発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

●方法ならびに結果

まず、健常児由来の血球、ダウン症候群患児由来の血球 (GATA1遺伝子正常)、そしてTAM発症中のダウン症候群患児由来の芽球 (GATA1短縮型変異) に、山中4因子を導入し、それぞれヒトiPS細胞を作製した。さらに、TALEN, CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術を応用し、21番染色体が2本 (ダイソミー) および3本 (トリソミー) の各々において、GATA1遺伝子正常、短縮型変異、欠失の3種類のヒトiPS細胞を作製し、それらを血球分化させ表現型を比較した。さらに、21番染色体上で推定されていたTAM責任領域 (4-Mb領域) やその領域内の単一もしくは複数の遺伝子を、1コピーのみを欠いた部分21トリソミーiPS細胞も同様に作製し、21番染色体やその責任領域・遺伝子が果たす役割や、GATA1短縮型変異との関連について検討した。

(1)21トリソミー (4-Mb責任領域の3コピー) は血液前駆細胞を増加させる。

まず、GATA1正常の3種類 (21ダイソミー・21トリソミー・部分21トリソミー) のiPS細胞から血球分化して得られるCD43+細胞 (血液前駆細胞に相当) は、21トリソミーで有意に増加し、4-Mb責任領域の欠失 (部分21トリソミー) でその効果がキャンセルされることがわかった。

(2)GATA1短縮型変異は異常巨核球分化 (CD34+CD41+細胞) を引き起こす。

次にGATA1正常、短縮型、欠失の3者を比較すると、CD34+CD41+という未熟な巨核球の細胞表面マーカーを発現する細胞が、GATA1短縮型iPS細胞から有意に産生され、中でも21トリソミーGATA1短縮型で最も多く産生された。

(3)各血球分化細胞群の遺伝子発現量解析の結果から、21トリソミー (4-Mb責任領域の3コピー) はGATA1短縮型の発現を増加させること、またレンチウイルスを用いた過剰発現実験にてGATA1短縮型の発現上昇により異常巨核球CD34+CD41+細胞が増加することがわかった。

(4)以上に加え、より詳細に1つの21番染色体のみ責任遺伝子を単独もしくは複数欠失させたiPS細胞からの血球分化解析結果に基づき、血液前駆細胞増加の責任候補遺伝子としてRUNX1、GATA1短縮型の発現量増加の責任候補遺伝子としてERG, ETS2, RUNX1の3遺伝子を同定した。

●総括

TAMの病態発症メカニズムにおいて、21番染色体上の4Mb責任領域（特にRUNX1）が3コピーあることが血液前駆細胞数の増加につながり、GATA1短縮型変異があることが異常巨核球の産生を引き起こし、さらに4Mb責任領域（特にERG, ETS2, RUNX1）が3コピーあることがGATA1短縮型の発現増加を引き起こすことがわかった。これらの現象が相乗的に働くことにより、TAMの病態が生じていると考えられた。以上の結果は、遺伝子異常+染色体変化に伴って生じる腫瘍発生の病態解析に広く応用できるものと考えられる。

●本人コメント

この度は、大藪先生、北畠先生をはじめ、多くの先生方にご指導頂き、本当に有難うございました。この論文は、ダウン症候群のお子さん、そしてそのご両親のご協力があったからこそ完成できた、と言えると思います。ある重症TAMのダウン症候群のお子さんは、残念ながら生後1か月弱で亡くなりました。しかしそのお子さんの血液細胞はiPS細胞になり、TAMの原因の解明に力を与えてくれました。亡くなられて数年後、ご両親にお子さんのiPS細胞を見て頂きました。「細胞の形でずっと生き続けられています。とても綺麗なiPS細胞です」とお伝えしました。顕微鏡をのぞきながら、大変喜んでおられたご両親の姿はこれからも忘れることはないと思います。有難うございました。



Constitutively active form of natriuretic peptide receptor 2 ameliorates experimental pulmonary arterial hypertension.

那波 伸敏

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Mol Ther Methods Clin Dev, 3: 16044, 2016

● 目的

CNPは、骨や心臓、血管内皮細胞等で発現するナトリウム利尿ペプチドである。その受容体である Natriuretic Peptide Receptor 2 (NPR2)は一回膜貫通型で、細胞内でGuanylyl cyclaseと共役し、GTPをcGMPに転換することで様々な細胞内シグナル伝達に関与している。血管平滑筋細胞においては、cGMP経路は重要な血管拡張シグナルであり、細胞内cGMPの増加は、様々な経路で細胞内カルシウム濃度を低下させ、平滑筋細胞の弛緩を誘導する。現在、NO/cGMP経路は肺動脈性肺高血圧症(PAH)の治療ターゲットの一つとしてNO、PDE5阻害薬等が臨床応用されているが、このCNP/cGMP経路を介した治療薬はない。以前に我々は高身長と骨変形を呈する一家系において、NPR2の機能獲得型変異体を発見し報告した。本研究ではこのNPR2の機能獲得型変異体をPAHの治療に応用することを目的とする。

● 方法ならびに結果

高い遺伝子導入効率と安全性からヒトへの遺伝子導入のツールとして期待されているセンダイウイルスベクターを用いてセルラインであるヒト肺動脈平滑筋細胞(PASMC)と肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞へコントロール蛍光蛋白、野生型NPR2(WT)、機能獲得型変異NPR2(caNPR2)を導入し、細胞内cGMPレベルへの影響、増殖とApoptosisへの影響を検討した。次に、PAH動物モデルとしてVEGF阻害薬を用いてSugen PAH rat modelを作成した。センダイウイルスベクターを用い、コントロール蛍光蛋白、野生型NPR2(WT)、caNPR2を血管内投与により肺へ遺伝子導入し、治療効果を組織学的、血行動態的に検討した。caNPR2を導入したヒト肺動脈平滑筋細胞においては、細胞内cGMPは著増し(control, 0.19 ± 0.12 pmol/ml; WT, 38.3 ± 29.6 pmol/ml; caNPR2, $2,460 \pm 577$ pmol/ml; $n=3$; $P<0.01$)、EdU陽性細胞の比率で検討した細胞増殖能の低下を認めた。一方、Apoptosisの増加は認めなかった。また同様に、肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞でもcaNPR2を導入した細胞で細胞内cGMPは著増し(control, 3.21 ± 0.378 pmol/ml; WT, 6.80 ± 0.438 pmol/ml; caNPR2, 621 ± 28.1 pmol/ml; $n=3$; $P<0.01$)、EdU陽性細胞の比率で検討した細胞増殖能の低下を認めた。一方、Apoptosisの増加は認めなかった。Sugen PAH ratにおける検討では、コントロール蛍光蛋白、野生型(WT)投与群と比較して、caNPR2投与群では、右室圧の低下(control, 61.8 ± 7.4 mmHg; WT, 62.4 ± 6.1 mmHg; caNPR2, 46.4 ± 4.7 mmHg; $n=8$; $P<0.01$)、右室圧、左室圧比の低下を認めた。また、組織学的検討では肺小動脈中膜肥厚の改善、肺細小動脈の閉塞減少を認め、肺高血圧血管病変の抑制をin vivoで確認した。組織学的改善のメカニズムを検討するため、細胞増殖をPCNA陽性細胞率で、Apoptosisをcleaved caspase-3陽性細胞率で検討した。コントロール蛍光蛋白、野生型(WT)、caNPR2投与群の間で、Apoptosisに差は認めなかったが、caNPR2投与群では肺小動脈平滑筋細胞でのPCNA陽性率は減少し、増殖抑制が関与していたことが示唆された。

● 総括

恒常活性型NPR2の遺伝子治療は、肺高血圧モデルラットで治療効果を認め、in vitroでの効果も確認できた。今後臨床応用に向けさらに検討する予定である。

●本人コメント

博士課程では以下の3つのプロジェクトに携わる機会を頂きました。①学位論文の研究となった、肺高血圧症モデル動物の遺伝子治療としてナトリウム利尿ペプチドB型受容体の機能獲得型変異体を応用する研究、②染色体異常患者における細胞ストレスをiPS細胞を用いて解析する研究、③ソーシャルネットワークサービスのbig dataを用いて予防接種に関する人々の疑問を解析する研究です。そして、これらの研究を国内外の学会や学術誌に発表し、いくつかの賞を頂くことができました。このように非常に充実した大学院生活を過ごすことができたのも、大菌教授をはじめ小児科内外の様々な先生方に御指導頂いたことによるものと思っております。心より感謝申し上げます。



Successful induction of sclerostin in human-derived fibroblasts by 4 transcription factors and its regulation by parathyroid hormone, hypoxia, and prostaglandin E2

藤原 誠

大阪大学大学院歯学研究科 小児口腔科 助教

Bone, 85:91-98, 2016

● 目的

スクレロスチンはSOSTがコードする分泌性蛋白質であり、骨細胞において特異的に発現し、WNTシグナル阻害による骨形成抑制作用を有する。SOSTおよびスクレロスチンの発現調節機構には未解明な点が多いが、その解析のために骨細胞を用いるには採取・培養における困難が多い。そこで我々は、採取容易なヒト皮膚線維芽細胞におけるSOSTおよびスクレロスチン発現の誘導を目指した。

● 方法ならびに結果

ヒト骨肉腫由来株の骨芽細胞株SaOS-2を分化または維持培養し、それぞれの発現遺伝子をマイクロアレイにより比較解析することで、SOST発現に関わる可能性のある転写因子を選択した。これらの因子を、レトロウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞において強制発現させ、SOST発現を最も効果的に誘導し得る転写因子群を検索した。結果、ATF3, KLF4, PAX4, SP7の4因子の導入において、ヒト線維芽細胞における誘導SOST発現は対照と比べ1週で199倍、4週で1439倍の著明な増加を認めた。4因子はそれぞれ免疫組織染色により骨細胞に生理的に発現していることを確認したが、それぞれ単独では線維芽細胞においてSOST発現を有意に誘導し得なかった。4因子導入後4週での線維芽細胞の培養上清におけるスクレロスチンをELISA法にて測定し得（平均21.2 pmol/l）、この培養上清がWNTシグナルを抑制することをレポーターアッセイにより確認した。次に既知のSOST調節因子であるPTH、低酸素培養、PGE2について、誘導SOSTおよびスクレロスチンに対する発現制御を検討した。PTHはSOST発現抑制作用が知られるが、線維芽細胞での誘導SOST発現は、4週間のPTH 100nM添加により非添加の62.3 %に有意に抑制され、誘導スクレロスチン濃度も有意に減少した（非添加31.2 pmol/L、添加5.7 pmol/L）。また低酸素条件は生理的にはSOST発現を増加させる報告があるが、4因子による線維芽細胞での誘導SOST発現は、正常酸素培養下と比し低酸素培養下では162 %の有意な増加を認めた。PGE2は骨細胞においてPGE2受容体のEP2またはEP4を介してSOST発現を抑制するが、PGE2の添加により、4因子による誘導SOSTでは非添加と比し16倍の有意な発現増加を認めた。4因子を導入した線維芽細胞では、EP1の発現のみが著明に誘導されており、EP1アンタゴニストONO-8130によりPGE2の線維芽細胞における誘導SOST発現増強強化が相殺されることから、4因子導入後の線維芽細胞ではEP1を介したPGE2による誘導SOST発現調節機構が存在する可能性が示唆された。

● 総括

我々は4つの転写因子ATF3, KLF4, PAX4, SP7の導入によりヒト皮膚線維芽細胞におけるSOST及びスクレロスチン発現誘導法を確立した。誘導SOST及びスクレロスチン発現は、既知のSOST調節因子であるPTHや低酸素により、骨細胞における内因的なSOST発現と同様の制御を受けた。またEP1を介したPGE2による未知のSOST発現調節機構が存在する可能性も示された。今後この手法が正常または疾患特異的なSOST制御機構の解明、さらにはスクレロスチン阻害を戦略とした骨脆弱性疾患に対する創薬につながる事が期待できる。

●本人コメント

学位研究は、大藪教授から「骨細胞を作る」というテーマを与えられて始まりました。結果的に少しテーマからずれましたが、骨細胞に特異的な蛋白であるスクレロチンの発現をヒト皮膚線維芽細胞に誘導し得て、成果としてまとめることが出来ました。約6年間の研究生活の間も、我儘を言って腎臓外来や関連病院の専門外来などの臨床も続けさせて頂き、大藪教授および腎研の先生方には大変ご迷惑をおかけし申し訳ありませんでした。研究・臨床の両面で大変充実した大学院生活を過ごせたことを深謝いたします。また小児科内のグループを超えて、多くの先生から研究の御助言・ご協力を頂きましたことも、この場を借りて御礼申し上げます。



Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms

近藤 秀仁

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Hum Mol Genet, 26 (1): 173-183, 2017

●目的

ムコ多糖症 (MPS) は、グリコサミノグリカン (GAG) を分解するリソソーム酵素の遺伝的欠損による疾患である。我々は、粗な顔貌、肝脾腫、骨格異常、呼吸障害、精神遅滞、および尿中GAGの過剰分泌といったMPSに特徴的な症状・検査所見を示す13人のヤクート人患者を同定したが、リソソーム酵素の欠損は認めなかった。これらの患者は、心不全、腎障害、造血障害といったMPSに典型的ではない症状も併発し、心肺機能不全により1-2歳で死亡した。これまで報告されているMPSと異なる特徴を呈しており、疾患の原因と機序について解析した。

●方法ならびに結果

疾患の原因遺伝子を特定するため、エクソーム解析を施行し、13人の患者全員にVPS33A遺伝子 c.1492C> T (p.Arg498Trp) のホモ変異を同定し、患者の健常な両親には全てヘテロ変異を同定した。VPS33A遺伝子はこれまで、ヒトの疾患原因遺伝子としては報告されていない。VPS33A遺伝子c.1492C> T (p.Arg498Trp) 変異が常染色体劣性遺伝形式で、この疾患の原因となっていると考えられた。VPS33Aタンパクは、エンドサイトーシスおよびオートファジー経路に関与すると報告されているが、患者細胞では、これらの経路は障害されていなかった。VPS33Aはdomain 1, 2, 3a, 3bの4つのdomainから構成されており、domain 3aおよび3bがエンドサイトーシスおよびオートファジー経路に重要な機能を持つと報告されている。今回同定した変異(p.Arg498Trp)はdomain 2に属しており、domain 2の機能がdomain 3a, 3bとは異なることを示唆した。我々は、患者細胞とRNAiを用いたVPS33Aノックダウン細胞の解析において、GAGの蓄積とリソソーム内pHの低下を同定した。リソソーム内pH低下は、リソソームの機能不全を引き起こし、GAGなどの基質蓄積の原因になると報告されており、我々の症例でもGAGの蓄積とリソソーム内pHの低下が関連している可能性が考えられた。

●総括

VPS33A遺伝子における特定の変異によって引き起こされる、MPSに類似した新たな疾患を報告する。我々の結果は、GAGの代謝制御とリソソーム内pHの低下という、VPS33A遺伝子の新たな機能を示唆している。この疾患はリソソーム酵素欠損を原因としない新しいタイプのMPSと考えられる。

●本人コメント

阪大小児科・代謝研究室では長年、ライソゾーム病の診断・治療・研究を行っています。特にI cell病に関してはこれまで多くの研究成果を発信しており、ちょうど私の大学院入学時に、ロシア連邦サハ共和国で多発しているI cell病類似疾患に関して症例相談がありました。大菌教授・酒井教授から「疾患の原因究明」というテーマを与えられ、サハ共和国の研究室との共同研究が始まりました。エクソーム解析により原因遺伝子VPS33Aは比較的速やかに同定できましたが、遺伝子の機能解析では従来の報告と異なる結果しか得られず苦労しました。しかし、そのおかげでVPS33A遺伝子の新たな機能を示唆する結果を得て、何とか成果としてまとめることが出来ました。今後は疾病発症のメカニズム解明や、臨床像の詳細な解析などを目指した

いと考えています。大園教授をはじめ、小児科内のみならず、様々な研究室の方々にご指導、ご協力をいただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

(大阪大学大学院 医学系研究科 小児科学・近藤秀仁)