

氏 名	利川 寛実
(ふりがな)	(としかわ ひろみつ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙博医第9号
学位審査年月日	令和4年1月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	N-Acetylcysteine prevents amyloid- $\beta$ secretion in neurons derived from human pluripotent stem cells with trisomy 21 (N-アセチルシステインはダウン症候群患者多能性幹細胞由来の神経細胞からのアミロイド- $\beta$ 分泌を抑制する)
論文審査委員	(主) 教授 荒若 繁樹 教授 瀧谷 公隆 教授 矢野 貴人

### 学位論文内容の要旨

#### 《序 文》

ダウン症候群 (DS) は、21 番染色体を 3 本持つ (トリソミー21) 先天性の染色体異常症であり、出生 800~1000 人に 1 人の割合で発生する。特徴的な顔貌を示し、先天性心疾患や骨格、免疫の異常など様々な症状を認める。加えて、発達障害および知的障害を伴うことを特徴とする。

知的障害に関連して、DS 患者は若年性アルツハイマー病 (AD) を発症する割合が高いことが報告されている。その原因として、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子のコピー数増加が挙げられる。APP 遺伝子は 21 番染色体上にあるため、DS 患者では APP 遺伝子が 3 コピー存在する。APP 遺伝子がコードするタンパク質産物は AD 脳に沈着する

アミロイドβタンパク質 (Aβ) の前駆体である。そのため、DS 患者脳では *APP* 遺伝子のコピー数の増加に伴い Aβの産生が増えることによって、AD 様の病理変化が出現すると考えられている。ペプチド長が異なる Aβ断片の中で Aβ42 と呼ばれる分子種の産生が、認知機能障害の発症に影響を与えると考えられている。また、神経障害における酸化ストレスの関与が考えられている。DS では、21 番染色体上にある *superoxide dismutase 1 (SOD1)* 遺伝子のコピー数も増加するために、酸化ストレスが惹起されると推測されている。そのため、抗酸化剤による治療の有効性が考えられている。

本研究では、DS 患者の多能性幹細胞由来の神経細胞を用い、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) の投与が、神経細胞の Aβ分泌にどのような効果を及ぼすかを検討した。

#### 《方 法》

*Neurogenin2 (NGN2)* 遺伝子を過発現する確立された神経分化の手法を用い、DS 患者のヒト多能性幹細胞 (D-iPSCs) を神経細胞 (D-iNs) に分化させた。また、D-iPSCs から 21 番染色体を 1 本削除した細胞を作成 (E-iPSCs) し、同様に神経細胞 (E-iNs) に分化させた。この 2 つの神経細胞が培養液中に分泌する Aβ40、Aβ42 の量を ELISA で測定した。次に、D-iNs、E-iNs に過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) と NAC による処理を施し、Aβ40、Aβ42 の分泌量の変化を調べた。また、処理後の *APP*、*SOD1* 遺伝子の発現量を RT-qPCR で測定した。加えて、健常の胚性幹細胞 (KhES1) と、その細胞に 21 番染色体を 1 本挿入した人工的な DS 細胞を神経細胞に分化させ、分泌された Aβ40、Aβ42 量を測定した。また、NAC による分泌量の変化を検討した。

#### 《結 果》

D-iPSCs、E-iPSCs とともに、分化開始後 day5 には軸索伸長など神経細胞に観察される形状変化が確認された。Day8 では、ほぼすべての細胞で神経細胞に特異的なマーカータンパク質 (Tbr2、Tuj1) の発現が認められ、D-iNs、E-iNs への分化が確認された。神経

分化後は、day8-day10、day10-day12、day12-day14 に期間を区切り、それぞれの期間でD-iNsとE-iNsから分泌されるA $\beta$ 40、A $\beta$ 42の量を測定した。A $\beta$ 40、A $\beta$ 42はday8-day10においても分泌されており、またいずれの期間においてもD-iNsはE-iNsに比べ多くのA $\beta$ 40、A $\beta$ 42を分泌していた。

次に、day8-day10においてNAC 500  $\mu$ M、NAC 1 mM、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu$ Mの処理を別々に施し、A $\beta$ の分泌量を計測した。高用量のNAC (1mM) ではA $\beta$ 分泌量は減少し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理ではA $\beta$ 分泌量は増加していた。

また上記の処理による酸化ストレスの変化が、D-iNsとE-iNsにおける*APP*、*SOD1*遺伝子の発現に与える影響をRT-qPCRで調べた。NAC、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理は、D-iNsとE-iNsにおいて、ともに*APP*、*SOD1* mRNAの発現量を増加させていた。

KhES1と、そこから作成した人工的なDS細胞も、同様の分化方法でTbr2、Tuj1を発現しており、良好に神経細胞に分化していることが確認された。人工的なDS細胞由来の神経細胞は、健常細胞由来の神経細胞よりも多くのA $\beta$ 40、A $\beta$ 42を分泌しており、NACはそのA $\beta$ 42の分泌量を減らしていた。

## 《考 察》

本研究では、DS由来のiPSCsとその同質遺伝子的な健常コントロール細胞を用いて実験を行った。DS患者由来の神経細胞ではより多くのA $\beta$ が、分化後早期から分泌されていた。また、抗酸化剤であるNACは過剰なA $\beta$ 分泌を有意に抑制した。

DSにおける酸化ストレスの増加に対して、現在まで様々な抗酸化物質による治療が試みられてきた。しかしその効果は部分的であり、またモデル動物でのみ観察されることが多い。本研究では、NACがヒト多能性幹細胞由来の神経細胞からのA $\beta$ 分泌を減少させることを見出した。NACはグルタチオンの前駆体であり、DS患者のヒト多能性幹細胞由来の神経細胞の酸化ストレスによる細胞死を防ぐことが知られている。また、NAC投与によりADモデルマウスおよびラットの認知記憶行動が改善され、神経炎症が抑制される効果も報告されている。以上から、NACは脳全体の酸化ストレスを軽減し、神経細胞保護効果を

発揮すると考えられる。今回の研究結果からも、NACがDS患者の認知機能の予後を改善することが期待される。

一方、NACの投与により *APP* mRNA の発現量は低下しなかった。このことは、NACの抗酸化作用は、転写後の *APP* タンパク質の切断に影響を与えている可能性を示唆している。

NACはその抗酸化作用により、様々な神経精神疾患や神経変性疾患を対象とした臨床試験が行われている。本研究では、DS患者の多能性幹細胞由来神経細胞におけるNACの効果を示した。今後、この神経保護効果がA $\beta$ や酸化ストレスを伴う疾患に応用される可能性が示唆される。

(様式 乙7)

## 論文審査結果の要旨

ダウン症候群 (DS) は、21 番染色体を 3 本持つ (トリソミー21) 先天性の染色体異常症である。発達障害および知的障害の出現を特徴とし、若年性アルツハイマー病 (AD) を発症する割合が高い。その原因として、21 番染色体上にある *APP* 遺伝子コピー数の増加が挙げられる。*APP* タンパクはアミロイドβ (Aβ) の前駆体であり、Aβの蓄積が AD 様症状を引き起こす原因と考えられている。また、DS では高い酸化ストレスが神経障害を引き起こすことに関与していると考えられている。Aβの蓄積と酸化ストレスの増加の関連性が指摘されていることから、抗酸化剤による治療の有効性が想定される。

本研究では DS 患者の神経細胞に抗酸化剤である N-アセチルシス테인 (NAC) を投与し、Aβ分泌に及ぼす効果を検討した。方法として、DS 由来の iPS 細胞とその同質遺伝子的な健常コントロール細胞を作成し、さらに神経細胞に分化させた細胞を使用した。その結果、神経細胞から分泌される Aβ量は DS 細胞で有意に高値であった。NAC は Aβ分泌の増加を有意に抑制していた。健常の胚性幹細胞と、それと同質遺伝子的なトリソミー21 を作成し検討したところ、NAC の投与が増加した Aβの分泌を抑制していた。

NAC は AD のモデルマウスの認知機能を改善する効果や、酸化ストレスによる神経細胞死を改善する効果を示すことが報告されており、様々な神経心理疾患、神経変性疾患での研究が進んでいる。本研究では、DS 患者の iPS 細胞に由来する神経細胞において、NAC の投与が Aβの分泌増加を抑制することを見出した。DS 患者の知的障害に対する治療法の 1 つとして可能性が示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Scientific Reports 11(1): 17377, 2021 Aug

doi: 10.1038/s41598-021-96697-7.