

# 要 約

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	二 瓶 義 廣
------	-------	---	-----	---------

## 主 論 文 題 名

### Enhanced Aggregation of Androgen Receptor in Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neurons from Spinal and Bulbar Muscular Atrophy

(球脊髄性筋萎縮症iPS細胞由来神経細胞におけるアンドロゲン受容体の凝集亢進)

## ( 内 容 の 要 旨 )

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子のCAGリピート数の異常延長を原因とする緩徐進行性の下位運動ニューロン疾患である。AR遺伝子におけるCAGリピート数は正常では9~36であるが、SBMA患者では38~62に延長している。SBMA患者の剖検組織では、脊髄前角や脳幹の運動ニューロンの核内に変異ARがびまん性に蓄積しており、本疾患の主要な病態機序と考えられている。今回我々は、SBMA患者由来iPS細胞の樹立と神経細胞への分化誘導を行い、ARについて生化学的解析を行った。

まず嚔下性肺炎にて死亡した80代男性患者より皮膚組織を採取して線維芽細胞を培養した。培養増殖させた皮膚線維芽細胞に対してHuman iPS Cell Generation Vector Set (Takara) を用いてOct4, Sox2, NANOG, Klf4, c-myc の5因子を形質導入し、iPS細胞を樹立した(SBMA-iPSC)。樹立したSBMA-iPSCから胚様体を樹立し、neurosphere法を用いて神経前駆細胞を得た。神経前駆細胞にレチノイン酸とソニックヘッジホッグを添加し、Hb9;GFPレポーター蛋白を形質導入して運動ニューロンのマーカーであるHb9陽性細胞を確認した。また、同様に運動ニューロンのマーカーであるislet1陽性細胞も確認した。

次に、GeneScan Analysis™ を用いて各分化段階におけるAR遺伝子内のCAGリピート数を検討した。SBMA患者の線維芽細胞のCAGリピート数は47と49の2種の細胞が存在したが、iPSCの2クローンではいずれも47のみであった。継代数を50まで重ねてもリピート数に変化はなく、神経細胞に分化させても安定していた。

ウェスタンブロットアッセイにて線維芽細胞、iPSC、神経細胞のARの発現量を検討したところ、ARはiPSCでは発現していなかったが、神経細胞に分化させると再び発現していた。更にDHTの添加により、ARの発現量は上昇した。対象として、他の神経疾患 ( $\alpha$ -シヌクレイノパチー) である孤発性パーキンソン病 (PD) 由来iPSC及び神経細胞でも同様の所見を認めた。

フィルターリターデーションアッセイを用いて、SBMA-iPSC由来神経細胞のDHTに対する凝集ARの増加率を、PD-iPSC由来神経細胞と比較したところ、SBMA-iPSC由来神経細胞はPD-iPSC由来神経細胞と比較して、総ARに対する凝集ARの増加率が有意に高かった。更に、HSP-90阻害薬である17-AAGをSBMA-iPSC由来神経細胞に添加し、ARの発現量をウェスタンブロットアッセイおよびフィルターリターデーションアッセイで確認したところ、17-AAGはDHTの有無に関わらず17-AAGの発現量を減少させた。皮膚線維芽細胞でも同様にDHTの添加でARの発現量は増加したが、凝集ARはほとんど認められなかった。

以上の結果より、SBMA-iPSCはSBMAの病態の中核である凝集ARの増加を再現することが可能であり、薬剤スクリーニングツールとしても有用であることが示された。また、SBMA-iPSCにおけるDHTによる凝集ARの増加は神経組織で優位に見られる現象 (neuron-dominant phenotype) であることが示唆された。