

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590301

研究課題名（和文） 染色体異常症における精神発達遅滞発症のメカニズム解析

研究課題名（英文） Neural differentiation dysfunction in cells with autosomal imbalance.

研究代表者

平塚 正治（HIRATSUKA MASAHARU）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00362872

研究成果の概要（和文）：ダウン症候群（21トリソミー）に代表されるような染色体異常症では神経系の発達障害が観察される。その機構を解明するために、21番染色体トリソミーをもつ未分化細胞を、ダウン症患者由来の線維芽細胞株及び正常ヒトES細胞株から作製した。作製した未分化細胞を神経系細胞に分化誘導させたところ、神経突起の伸張は観察されたものの一部の神経系タンパク質の発現誘導が正常未分化細胞と異なっていた。これらタンパク質の調節異常が起こることにより神経系発達が障害される可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although particular chromosomal syndromes are phenotypically and clinically distinct, the majority of individuals with autosomal imbalance, such as Down syndrome, manifest mental retardation. To study the developmental stages of complex neuronal diseases, several independent disomic and trisomic human ES (T21-hES) and iPS (DS-iPS) cell lines were generated and subsequently differentiated into neuronal progenitor cells. Whereas T21-ES and DS-iPS cells generated neurons similarly to disomic control cells, expression pattern of neural differentiation markers in these cells was different from that of controls.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：ゲノム医科学

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群（21トリソミー）、13トリソミー症候群、18トリソミー症候群などで代表される染色体異常症候群においては、ほぼ全ての染色体異常症（トリソミー症候群）

に共通して精神発達遅滞が観察されるが、上記以外のトリソミーは障害が重篤で出生にまで至らない例が多いため、また出生例についても症状が複雑で解析が難しいことから、これまでトリソミー症候群として共通のメ

カニズムを探索されることはなかった。一方で、トリソミー症候群の中で最も症状の軽いダウン症候群については、症例数も多く、モデルマウスも作製されていることもあり、数多くの知見が報告されている。臨床症状としては精神発達遅滞、アルツハイマー病の早期発症、心奇形などを初めとして多様な症状を呈するが、精神発達遅滞は全てのダウン症患者者に共通に観察されている。流産胎児患者の脳組織や成人患者の脳組織、あるいはモデルマウス脳組織を材料としてマイクロアレイ等により遺伝子発現解析が複数の研究グループによりなされているが、患者間の遺伝的背景の違いや症状の重篤度の違いなどが障壁となり、明確な遺伝子発現変化はとらえられていない。神経系発達障害の原因がこの中の特定の遺伝子の発現増加によるものなのか、21番染色体上の遺伝子量の増加によって他染色体上の遺伝子の発現制御が攪乱された結果なのかは未だ結論が得られていない。

2. 研究の目的

染色体異常症で観察される精神発達遅滞の発症メカニズムの解明を目指す。ダウン症患者由来線維芽細胞に加えて、正常ヒト細胞に微小核細胞融合法により1本だけ特定の染色体を移入した人工トリソミー細胞それぞれからiPS細胞を作製し、神経分化誘導を行い、神経分化過程に及ぼすトリソミーの作用を明らかにする。同一の遺伝的背景を持った細胞を用いることができる利点があり、遺伝的背景が異なる患者由来組織・細胞を用いた場合の解析の困難さを克服し、より正確な解析を可能とするものである。

3. 研究の方法

(1) 人工トリソミーヒトES細胞株の樹立

特定のヒト染色体を保持するマウスA9細胞を用いて、微小核細胞融合法によりヒトES細胞に特定のヒト染色体を1本だけ導入し、薬剤耐性株の中からトリソミー以外の染色体異常のない細胞株を人工トリソミー細胞株として樹立する。

(2) ダウン症患者由来線維芽細胞からのiPS細胞株(ダウンiPS細胞)の樹立

細胞バンク(Coriell Institute)より購入したダウン症患者由来線維芽細胞4株について、山中4因子または3因子を用いたレトロウイルス法によりiPS細胞株を樹立する。同時に正常線維芽細胞からもiPS細胞を樹立し、対照細胞株(正常iPS細胞)とする。

(3) 未分化性の評価

樹立した人工トリソミーヒトES細胞株、ダウンiPS細胞株、正常iPS細胞株について、未分化性マーカーの発現レベル、*in vivo*及び*in vitro*における3胚葉分化能を評価し、未分化性を検証する。

(4) 神経系分化誘導

ES/iPS細胞から神経系への分化誘導をSDIA法マウス・ストローマ細胞PA6との共培養法(マウス・ストローマ細胞PA6との共培養法)或いはSFEBq法(シングルセルからのスフェア作製法)により実施する。神経分化の評価は定量的PCRおよび免疫染色により行い、細胞死誘導についてもTunel染色により評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト21番染色体を1本だけ保持するマウスA9細胞A9(Hygro21)(JCRB2221)を用いてヒトES細胞株に21番染色体を導入した。薬剤耐性株の中から核型解析により21トリソミーが確認された株をヒト21人工トリソミーES細胞として樹立した。

(2) ダウン症患者由来線維芽細胞4株(男性2株、女性2株、GM02767、AG05397、AG06872、AG08942)及び正常ヒト線維芽細胞株(HDF)より山中法によりiPS細胞を樹立した(図1)。

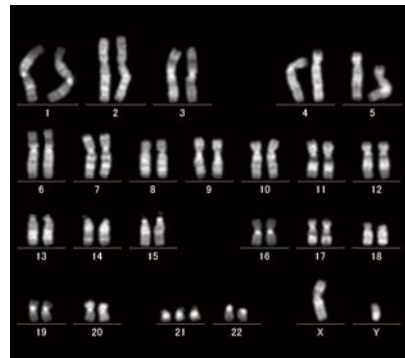


図1 線維芽細胞AG08942から作製したダウンiPS細胞の核型

(3) 作製したヒト21人工トリソミーES細胞株、ダウンiPS及び正常iPS細胞株について未分化性を検証した。未分化性マーカーNANOG、TERT、REX1、DNMT3B、DPP4の発現はヒトES細胞株KhES-2とほぼ同レベルであった。免疫染色においてもNANOG、OCT4、SSEA-3の発現が確認された(図2)。3胚葉分化能も*in vitro*及び*in vivo*で確認された(図3)。以上のことから、樹立した細胞株の未分化性はES細胞とほぼ同レベルであると判断された。

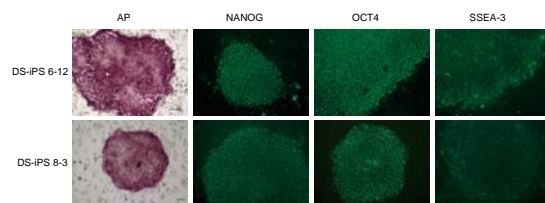


図2 ダウンiPS細胞における未分化マーカーの発現

(4) ダウンiPS細胞、正常iPS細胞、人工トリソミーES細胞、正常ES細胞を用いてSDIA法による神経分化誘導を行った。PA6細胞との共培養開始後30日で神経細胞特異的チューブリン陽性の神経突起が全ての細胞株に

において観察された（図4）。一方、神経細胞特異的マーカーの発現誘導については、一部のマーカーについて、クローナルバリエーションが認められるものの、ダウン iPS 細胞及び人工トリソミーES 細胞で低下していた。神経分化誘導時における細胞死の頻度を Tunel 染色により検出したところ、ダウン iPS 細胞株で高い傾向が見られた（図5）。

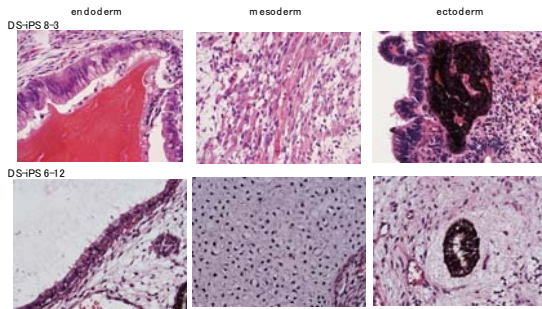


図3 ダウン iPS 細胞の in vivo 3 胚葉分化

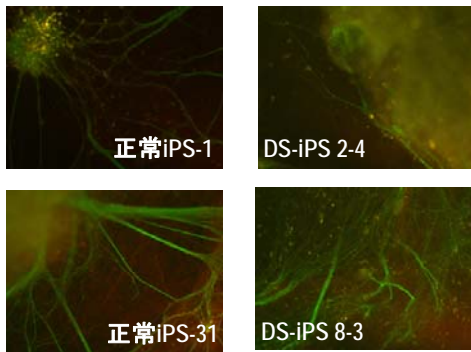


図4 神経細胞特異的チューブリンの発現（緑色）

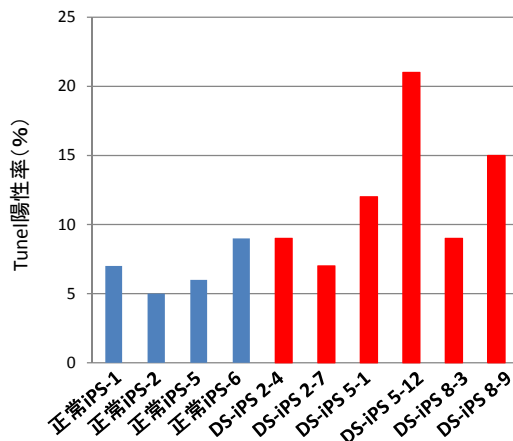


図5 神経分化誘導時の細胞死の頻度

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計8件）

- ① Imaoka N, Hiratsuka M, Osaki M, Kamitani H, Kambe A, Fukuoka J, Kurimoto M, Nagai S, Okada F, Watanabe T, Ohama E, Kato S, Oshimura M. Prognostic significance of sirtuin 2 protein nuclear localization in glioma: an immunohistochemical study. *Oncol. Rep.* 28: 923-930, 2012. 査読有、DOI: 10.3892/or.2012.1872.
- ② Hiratsuka M, Uno N, Ueda K, Kurosaki H, Imaoka N, Kazuki K, Ueno E, Akakura Y, Katoh M, Osaki M, Kazuki Y, Nakagawa M, Yamanaka S, Oshimura M. Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors. *PLoS One.* 6(10): e25961, 2011. 査読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0025961.
- ③ Kazuki K, Hoshiya H, Takiguchi M, Abe S, Iida Y, Osaki M, Katoh M, Hiratsuka M, Shirayoshi Y, Hiramatsu K, Ueno E, Kajitani N, Yoshino T, Kazuki K, Ishihara C, Takehara S, Tsuji S, Ejima F, Toyoda A, Sakaki Y, Larionov V, Kouprina N, Oshimura M. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. *Gene Ther.* 18: 384-93, 2011. 査読有、DOI: 10.1038/gt.2010.147.

〔学会発表〕（計8件）

- ① 香月康宏、染色体導入技術を用いた同一遺伝的背景を持つトリソミーヒト ES 細胞の作製、日本人類遺伝学会第57回大会、2012年10月24～27日、東京
- ② 平塚正治、ヒト人工染色体ベクターを用いたiPS細胞の作製、第10回日本再生医療学会総会、2011年3月1、2日、東京

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 正治 (HIRATSUKA MASAHARU)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00362872

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：