

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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890199

研究課題名（和文）

ダウン症候群患者由来 iPS 細胞を用いた神経細胞における遺伝子発現解析

研究課題名（英文）

Gene expression analysis for neuronal cells differentiated from iPS cells generated from patients with Down syndrome

研究代表者

下島 圭子 (SHIMOJIMA KEIKO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：30578935

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ダウン症候群における神経障害の原因を明らかにするために、疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、遺伝子発現解析を行った。患者から提供を受けた皮膚線維芽細胞にレトロウイルスにより 4 因子を導入して iPS 細胞を樹立した。これらの iPS 細胞を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、いくつかの遺伝子に関して、優位な発現上昇が認められた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we generated disease specific iPS cells from the patients with Down syndrome. Gene expression analysis identified significant increases of some genes. This may be important clue to reveal neuronal impairments in Down syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：iPS 細胞、ダウン症候群、神経細胞機能解析

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は主に 21 番染色体のトリソミーによって生じる最も頻度の高い先天異常症候群であり、出生およそ 700 人に一人の割合で認められる。ダウン症候群児は精神運動発達遅滞を来すほか、先天性心疾患や白血病、視力調節障害、頸椎異常など多彩な合併症を生じることが知られている。また、母体の高齢妊娠において発生頻度が高まることはよく知られており、近年の晩婚化で出生数が増えているという指摘もある。出生早期

からの療育介入が効果的であるとされているが、先天異常であることから根本的な治療法はない。近年の外科手術の進歩で、最も予後を左右する先天性心疾患の治療成績が向上した結果、平均寿命は以前考えられたよりはるかに長くなっている。その結果、成人期以降アルツハイマー様の急激な退行を示す問題がクローズアップされている。実際に早期にアルツハイマー様の退行を示したダウン症候群患者の剖検所見では、アルツハイマー病患者と似た老人斑が認められるほか、大

脳皮質では神経細胞の層構造が乱れており、発生初期にニューロンの遊走障害が起こっていると考えられている。しかし、このような神経症状がなぜ起こるのかは未だにわかっていない。

ダウン症候群は 21 番染色体のゲノムコピー数が増えることが原因であるが、中枢神経障害と関連する遺伝子は 21 番染色体長腕 q21 領域のダウン症候群責任領域 (DSCR) に存在することが非典型的な 21 番部分トリソミー患者の臨床症状の蓄積や、遺伝子改変動物実験によって明らかになってきている。しかし、患者脳を直接解析することは不可能であり、マウスなどの実験動物では、ヒトの大脳皮質の層構造とは解剖学的に異なるため、ヒト神経細胞の遊走障害を直接的に調べることは困難である。

2006 年に京都大学の山中教授らが開発した iPS 細胞技術は、疾患患者由来細胞を用いることで病態解析を行う活路を開いた。つまりダウン症候群などの疾患患者から採取した皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、神経細胞に分化誘導することで、神経細胞の病態を *in vitro* で解析することを可能としたのである。現在、この iPS 細胞技術を用いた疾患解析は猛烈な勢いで行われており、iPS 細胞から各々の中枢神経系細胞への分化誘導方法も次第に確立しつつある。また、ES 細胞を用いた神経発生の研究も進められており、大脳分化のための 3 次元培養法である無血清浮遊培養法 (SFEB 法; serum-free culture of embryoid body-like aggregates) をさらに改良した SFEBq 法 (quick-aggregation SFEB procedure) によって生体に似た立体構造を持つ胎児型大脳皮質組織の産生に成功したとの報告が理化学研究所から発表され、iPS 細胞へ応用することで患者特異的な組織作成へさらに研究が加速することが予想される。

2. 研究の目的

iPS 細胞は、ES 細胞とは異なり、ヒト胚を破壊することなく樹立できるため、皮膚線維芽細胞提供者の承諾があれば、研究に供するための倫理的な問題が比較的少ない。しかも移植される本人の細胞から樹立したものなら拒絶反応がないことから、再生医療研究の切り札として脚光を浴びている。しかし、iPS 細胞を樹立するためには今のところレトロウイルスなどによる遺伝子導入を要することや、移植後に癌化する可能性があることから、臨床場面で実際に再生医療に使われるためにはまだ克服されなければならない課題を抱えている。

一方、患者由来皮膚線維芽細胞から樹立した疾患特異的 iPS 細胞を利用した疾患病態解析研究においては、外来導入遺伝子やレトロ

ウイルスの問題はほとんど無視できることから、幅広く利用されることが予測される。特に、ヒトの表現型を実験動物で再現できない疾患や、患者から組織を採取することが困難な中枢神経系の難治性疾患研究への応用が非常に期待されている。

これまでダウン症候群は 21 番染色体の過剰によって起こるということがはっきりしているため、全てが明らかになっていると考えられがちであるが、実際には、脳内で何が起きているのか、思春期以降の急激な退行がなぜ起きているのか、ほとんど未だ何もわかっていないと言っても過言ではない。本研究の目的は、ダウン症候群の中枢神経異常を疾患特異的な iPS 細胞を利用して病態を分子細胞学的に、また形態を発生から経時的に *in vitro* で解明しようというものである。本研究による成果が、単にダウン症候群の知見にとどまらず、ダウン症候群で時に認められるアルツハイマー症状など、他の頻度の高い中枢神経疾患にも応用されれば、大変意義であると考えた。

本研究ではダウン症候群患者から提供された皮膚線維芽細胞から独自に iPS 細胞を樹立し、神経細胞に分化誘導し、また大脳皮質組織を形成させることによって病態を明らかにすることを試みた。本研究課題は、学内倫理委員会の承認済みであり、患者家族から書面によるインフォームド・コンセントを得て進められている。

3. 研究の方法

(1) ダウン症候群疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子発現解析

血液中のリンパ球や皮膚線維芽細胞においては、その臓器特異的な遺伝子や ubiquitous に発現する遺伝子など限られた遺伝子しか発現していない。それに対して、iPS 細胞においては、PLP1 遺伝子など、本来中枢神経でのみ発現が認められる遺伝子も発現しており (自験データ、未発表)、中枢神経において重要な働きをする他の遺伝子も発現している可能性が高い。まずこの iPS 細胞における遺伝子発現の状況をマイクロアレイを用いることで網羅的に解析した。

具体的には高密度オリゴアレイを搭載したマイクロアレイシステムを用いてトランスクリプトーム解析を行った。結果は解析ソフトを用いて統計的に有意な発現異常を示す遺伝子を確認した。それら異常な発現を示す遺伝子に関して、染色体領域との関連を明らかにするために、*in-silico* library を用いて解析した。解析にあたっては、発現異常を示す遺伝子の多くは 21 番染色体上にあると予測されたので、遺伝子の染色体での位置を優先的に考慮した。特に、過去の報告ではダウン症候群責任領域 (DSCR) に存在する遺

伝子が重要とされている。

一方、発現異常が認められた遺伝子に関しては、リアルタイム PCR で確認した。

(2) iPS 細胞の神経系への分化誘導

神経細胞に分化誘導させたダウン症候群疾患特異的 iPS 細胞における発現遺伝子を解析するために、iPS 細胞を確実に神経細胞へ分化誘導する効率的な方法を検討した。

多能性幹細胞の神経分化誘導法には多数のプロトコールが考案されているが、浮遊培養により胚様体を形成させ、レチノイン酸を添加した培地を用いて神経幹細胞を増殖させる方法を用い、さらに神経細胞へ分化させた。神経細胞系であるかどうかは、免疫組織染色により、神経細胞特異的な抗体を用いて確認した。

また、SEFBq 法を用いて大脳皮質前駆細胞から浮遊培養で 3 次元培養を続け、立体的な層構造を形成させることを試みた。それぞれの細胞層は免疫染色で確認し、カルシウムイメージング法にて神経ネットワークの存在を確認することとした。

4. 研究成果

本研究において、ダウン症候群患者皮膚線維芽細胞から iPS 細胞の樹立に成功した。マイクロサテライトマーカー解析により、得られた iPS 細胞が遺伝的に元の線維芽細胞と同一であることを確認した。また、多能性因子に関して発現を確認できた。

得られた iPS 細胞に関して、アレイ CGH 法により、染色体の再構成が起こっていないかどうか検証したところ、いくつかの系統で 21 番染色体の trisomy rescue が生じていることが明らかとなった。Trisomy rescue はモザイク型ダウン症候群の発生メカニズムとしてよく知られている。iPS 細胞では artificial な染色体再構成のみならず、細胞を rescue する働きも生じていることが明らかとなった。

得られた iPS 細胞 3 系列に関して独立に遺伝子発現状態をマイクロアレイで解析したところ、いくつかの遺伝子の発現が亢進していることが明らかとなった。そのうちのひとつはアルツハイマー病との関連が指摘されており、ダウン症候群における何らかの症状と関連している可能性があると考えられた。

得られた iPS 細胞の神経系への分化誘導を行ったが、今のところ神経細胞への分化は確認できていない。疾患 iPS 細胞においては、元々の細胞の性質上、分化誘導が難しい可能性があり、今後検討する必要がある。神経系細胞に分化誘導した状態での遺伝子発現状況は、今後さらに検討していく必要があると考える。

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 29 件)

1. Shimajima K (他 7 名, 1 番目), Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a duplication-inverted triplication-duplication in chromosomal segments including the PLP1 region. *Eur J Med Genet* (in press) 査読有
2. Shimajima K (他 12 名, 5 番目), 8p deletion and 9p duplication in two children with electrical status epilepticus in sleep syndrome. *Seizure* (in press) 査読有
3. Shimajima K (他 24 名, 11 番目), Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology*, 78, 803-810, 2012, 査読有
4. Shimajima K (他 7 名, 1 番目), Spinocerebellar ataxias type 27 derived from a disruption of the fibroblast growth factor 14 gene with mimicking phenotype of paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia. *Brain Dev*, 34, 230-233, 2012, 査読有
5. Shimajima K (他 1 名, 1 番目), Growth profiles of 34 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Pediatr Genet*, 1, 33-37, 2012, 査読有
6. Shimajima K (他 4 名, 4 番目), Jacobsen syndrome due to an unbalanced translocation between 11q23 and 22q11.2 identified at age 40 years. *Am J Med Genet*, 158A, 220-223, 2012, 査読有
7. Shimajima K (他 4 名, 4 番目), Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet*, 155A, 2997-3001, 2011, 査読有
8. Shimajima K (他 3 名, 1 番目), Tandem configurations of variably duplicated segments of 22q11.2 confirmed by fiber-FISH analysis. *J Hum Genet*, 56, 810-812, 2011, 査読有
9. Shimajima K (他 3 名, 3 番目), Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet*, 155A, 1568-1573, 2011, 査読有
10. Shimajima K (他 2 名, 1 番目), Marfanoid

- hypermobility caused by an 862 kb deletion of Xq22.3 in a patient with Sotos syndrome. *Am J Med Genet*, 155A, 2293-2297, 2011, 査読有
11. Shimajima K (他 6 名, 3 番目), Refractory neonatal epilepsy with a de novo duplication of chromosome 2q24.2q24.3. *Epilepsia*, 52, e66-69, 2011, 査読有
 12. Shimajima K (他 5 名, 4 番目), SCN1B is Not Related to Benign Partial Epilepsy in Infancy or Convulsions with Gastroenteritis. *Neuropediatrics*, 42, 135-137, 2011, 査読有
 13. Shimajima K (他 9 名, 7 番目), 9q22 Deletion—first familial case. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 45, 2011, 査読有
 14. Shimajima K (他 6 名, 1 番目), Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J Hum Genet*, 56, 561-556, 2011, 査読有
 15. Shimajima K (他 17 名, 2 番目), CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 52: 1835-1842, 2011, 査読有
 16. Shimajima K (他 6 名, 1 番目), A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. *Am J Med Genet*, 155A, 732-736, 2011, 査読有
 17. Shimajima K (他 9 名, 2 番目), Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. *J Med Genet*, 48, 117-122, 2011, 査読有
 18. Shimajima K (他 5 名, 4 番目), Two concurrent chromosomal aberrations involving interstitial deletion in 1q24.2q25.2 and inverted duplication and deletion in 10q26 in a patient with stroke associated with antithrombin deficiency and a patent foramen ovale. *Am J Med Genet*, 155A, 215-220, 2011, 査読有
 19. Shimajima K (他 5 名, 2 番目), Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including DYRK1A and KCNJ6. *Am J Med Genet*, 155A, 113-119, 2011, 査読有
 20. Shimajima K (他 5 名, 5 番目), Co-occurrence of Prader-Willi and Sotos syndromes. *Am J Med Genet*, 152A, 2103-2109, 2010, 査読有
 21. Shimajima K (他 10 名, 9 番目), STXBP1 mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome—Result of Japanese cohort study. *Epilepsia*, 51, 2449-2452, 2010, 査読有
 22. Shimajima K (他 8 名, 8 番目), Altered gene expression in umbilical cord mononuclear cells in preterm infants with periventricular leukomalacia. *Early Hum Dev*, 86, 665-667, 2010, 査読有
 23. Shimajima K (他 2 名, 1 番目), A de novo 22q11.22q11.23 interchromosomal tandem duplication in a boy with developmental delay, hyperactivity, and epilepsy. *Am J Med Genet*, 152A, 2820-2826, 2010, 査読有
 24. Shimajima K (他 8 名, 1 番目), Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res*, 89, 303-309, 2010, 査読有
 25. Shimajima K (他 9 名, 8 番目), Phenotypic overlapping of trisomy 12p and Pallister-Killian syndrome. *Eur J Med Genet*, 53, 159-161, 2010, 査読有
 26. Shimajima K (他 7 名, 6 番目), Severe pulmonary emphysema in a girl with interstitial deletion of 2q24.2q24.3 including ITGB6. *Am J Med Genet*, 152A, 1020-1025, 2010, 査読有
 27. Shimajima K (他 8 名, 2 番目), A functional analysis of GABARAP on 17p13.1 by knockdown zebrafish. *J Hum Genet*, 55, 155-162, 2010, 査読有
 28. Shimajima K (他 16 名, 6 番目), Zebrafish gene knockdowns imply roles for human YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly. *Genesis*, 48, 233-243, 2010, 査読有
 29. Shimajima K (他 16 名, 1 番目), Comprehensive genetic analyses of PLP1 in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications. *Brain Dev*, 32, 171-179, 2010, 査読有
- [学会発表] (計 33 件)
1. 下島圭子 (他 8 名, 2 番目), トリオサンプルを用いた先天性疾患のエクソーム解析. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
 2. 下島圭子 (他 6 名, 1 番目), 新規微細欠失症候群の確立: 5q31.3 deletion

- syndrome. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
3. 下島圭子 (他 6 名, 2 番目), Collybistin の機能喪失はてんかんを伴う症候性 X 連鎖精神発達遅滞の原因となる. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
 4. 下島圭子 (他 8 名, 1 番目), Pelizaeus-Merzbacher 病患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
 5. 下島圭子 (他 7 名, 7 番目), 14q24.3 微細欠失による EIF2B2 の unmasked mutation で発症した Vanishing White Matter disease. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
 6. 下島圭子 (他 6 名, 2 番目), MECP2 領域微細重複の 4 例. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
 7. 下島圭子 (他 5 名, 5 番目), 新規変異を認めた Simpson-Golabi-Behmel Syndrome の一例. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
 8. 下島圭子 (他 17 名, 3 番目), CDKL5 変異は男児における難治性てんかん脳症にも関連している. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011. 11. 10-12, 千葉
 9. Shimajima K (他 6 名, 2 番目), Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. 12th ICHG. 2011. 10. 11-15, Montreal
 10. Shimajima K (他 2 名, 2 番目), Skeletal anomalies and severe language disorder with submicroscopic deletion in 12q13 including HOXC cluster. 12th ICHG. 2011. 10. 11-15, Montreal
 11. Shimajima K (他 6 名, 1 番目), A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. 12th ICHG. 2011. 10. 11-15, Montreal
 12. 下島圭子 (他 9 名, 2 番目), 小児てんかん脳症における CDKL5 の包括的解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011. 8. 12-14, 東京
 13. 下島圭子 (他 3 名, 2 番目), Xq11.1 に位置する ARHGEF9 遺伝子の nullisomy は精神遅滞・てんかんの原因となる. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011. 8. 12-14, 東京
 14. 下島圭子 (他 8 名, 6 番目), CDKL5 微小欠損に肺炎球菌感染症を反復した IgG2 サブクラス欠損症の 1 例. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011. 8. 12-14, 東京
 15. 下島圭子 (他 1 名, 1 番目), 中枢神経病態解析を目指したダウン症候群患者由来 iPS 細胞の樹立. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011. 8. 12-14, 東京
 16. 下島圭子 (他 6 名, 1 番目), 5q31.3 新規微細欠失症候群. 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会, 2011. 8. 11, 横浜
 17. 下島圭子 (他 8 名, 1 番目), Pelizaeus-Merzbacher 病患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011. 5. 26-28, 横浜
 18. 下島圭子 (他 11 名, 10 番目), CDKL5 遺伝子異常に伴うてんかんの早期診断の手がかり. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011. 5. 26-28, 横浜
 19. 下島圭子 (他 2 名, 2 番目), Schinzel-Giedion 症候群の原因遺伝子 SETBP1 のハプロ不全は非特異的な精神発達遅滞の原因となる. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011. 5. 26-28, 横浜
 20. 下島圭子 (他 3 名, 2 番目), 1p36 欠失症候群の本邦における実態と欠失範囲の同定. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011. 5. 26-28, 横浜
 21. 下島圭子 (他 4 名, 4 番目), Prader-Willi 症候群とソトス症候群の合併例. 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010. 11. 25-27, 大宮
 22. 下島圭子 (他 3 名, 2 番目), 複数の de novo ゲノムコピー数異常が同時に生じることが稀ではない? 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010. 11. 25-27, 大宮
 23. 下島圭子 (他 12 名, 1 番目), TULIP1 のハプロ不全は、発達遅滞と難治性てんかんの原因となる. 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010. 11. 25-27, 大宮
 24. 下島圭子 (他 8 名, 2 番目), 17 番染色体 p13.1 領域の微細欠失とゼブラフィッシュによる GABARAP 機能解析. 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010. 11. 25-27, 大宮
 25. 下島圭子 (他 9 名, 2 番目), Williams 症候群責任領域近傍の YWHAG は点頭てんかんと心肥大の原因となり得る. 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010. 11. 25-27, 大宮
 26. Shimajima K (他 8 名, 3 番目), A functional analysis of GABARAP on 17p13.1 by knockdown zebrafish. The 60th Annual Meeting ASHG, Nov 2-6, 2010, Washington DC, USA
 27. Shimajima K (他 12 名, 1 番目), TULIP1 haploinsufficiency with brain development delay. The 60th Annual Meeting ASHG, Nov 2-6, 2010, Washington DC, USA
 28. 下島圭子 (他 3 名, 1 番目), 染色体検査

における事前説明の重要性に関する考察：娘の染色体検査結果の受容が困難であった母親の事例より．第34回日本遺伝カウンセリング学会学術集会，2010. 5. 28，東京

29. 下島圭子 (他3名, 2番目), ダウン症候群責任領域のハプロ不全による臨床症状. 第52回日本小児神経学会大会, 2010. 5. 20-22, 福岡
30. 下島圭子 (他8名, 1番目), TULIP1のハプロ不全は、発達遅滞と難治性てんかんの原因となる. 第52回日本小児神経学会大会, 2010. 5. 20-22, 福岡
31. 下島圭子 (他12名, 5番目), Atypical benign partial epilepsy 様のてんかんを呈した8p欠失/9p重複の2例: てんかん責任領域の検討. 第52回日本小児神経学会大会, 2010. 5. 20-22, 福岡
32. 下島圭子 (他2名, 3番目), 9q34欠失症候群5例の臨床研究. 第52回日本小児神経学会大会, 2010. 5. 20-22, 福岡
33. 下島圭子 (他8名, 3番目), 點頭てんかんを発症したWilliams症候群の2症例. 第52回日本小児神経学会大会, 2010. 5. 20-22, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下島 圭子 (SHIMOJIMA KEIKO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30578935