

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：84414

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591538

研究課題名(和文) 疾患 iPS 細胞を用いた L1 症候群患者神経系細胞の機能障害の解析

研究課題名(英文) Characterization of human iPS Cells with Genetic Abnormality of Nerve Adhesion Molecule L1CAM

研究代表者

正札 智子 (SHOFUDA, Tomoko)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・先進医療研究開発部 幹細胞医療研究室・室長

研究者番号：40450895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、先天性遺伝性神経難病の一つであるL1症候群の原因遺伝子である神経接着因子L1CAM異常を持つ患者由来線維芽細胞から、疾患iPS細胞の作成を行った。このL1CAM異常iPS細胞は多能性幹細胞特性を保持し、神経前駆細胞(iPS-NPCs)の誘導に成功した。生物学的特性解析により、L1CAM異常iPS-NPCsは終末分化能が低く、出現したニューロンとグリア細胞はマトリックスとの接着能が低く脆弱であった。また細胞遊走能も低下していることが明らかとなった。iPS細胞技術を用い、L1CAM異常に起因する神経系細胞の機能障害メカニズムを明らかとするマテリアルを得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Genetic abnormality of nerve adhesion molecule L1CAM causes one of the congenital hereditary nerve intractable disease L1 syndrome. In this study, to reveal molecular mechanism of neurological dysfunction due to L1CAM abnormality, we established iPS cells from patient-derived fibroblast cells. L1CAM abnormal iPS cells maintain pluripotency, and successfully differentiate into neural progenitor cells (iPS-NPCs). The biological characterization revealed L1CAM abnormal iPS-NPCs were decreased in terminal differentiation potential, and emerging neurons and glial cells have vulnerably low adhesion ability to matrices. Also it was found that cell migration ability was also reduced. Using the iPS cell technology, we succeeded in obtaining the materials to elucidate dysfunction mechanisms of the nervous system cells due to L1CAM abnormality.

研究分野：幹細胞学

キーワード：神経接着因子L1CAM 疾患iPS細胞 神経前駆細胞

### 1. 研究開始当初の背景

L1CAM は、免疫グロブリンスーパーファミリー (IgCAM) に属する細胞接着因子で、分子量約 220kDa の膜貫通型高分子糖タンパク質である。細胞外領域には 6 つの免疫グロブリン C2 様ドメインと、5 つのフィブロネクチン typeIII 型様ドメインを持ち、L1CAM 同士のホモフィリック結合や、RGD 配列を介したインテグリンとの結合などに関与する。またこのドメインは、プラスミンと ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) ファミリーのプロテアーゼにより翻訳後修飾を受け、機能が制御される。また細胞内ドメインは、アクチンやアンキリンなどの細胞骨格と結合し、ERK2 (extracellular signal-related kinase 2) などによりリン酸化修飾を受け、細胞内情報伝達やエンドサイトーシスに関与している。以上のように、L1CAM は細胞接着分子としてだけでなく、シグナル伝達や細胞内輸送など生物学的機能は多岐にわたり、細胞接着の他、軸索の進展や神経細胞の移動、ミエリンやシナプスの形成に関与する。

L1CAM の遺伝子異常は、X 連鎖性劣性遺伝性水頭症 (X-linked hydrocephalus: 以下 XLH)、MASA 症候群、伴性劣性痙性麻痺、伴性劣性脳梁欠損症など、L1 症候群と総称される先天性神経症を発症し、臨床症状は、水頭症、精神発達遅滞、下肢の痙性麻痺、拇指の内転屈曲などである。

L1CAM の遺伝子異常は、1) 細胞内ドメインに局限した Class I 変異、2) 細胞外ドメインのアミノ酸置換を Class II 変異、3) ナンセンス変異等により膜貫通ドメイン以下が欠損する Class III 変異の 3 つに分類され、変異による分子機能障害の程度と、表現型の重症度には強い関連がみられることが明らかとなっている (Kanemura Y et al, J Neurosurg 2006)。

### 2. 研究の目的

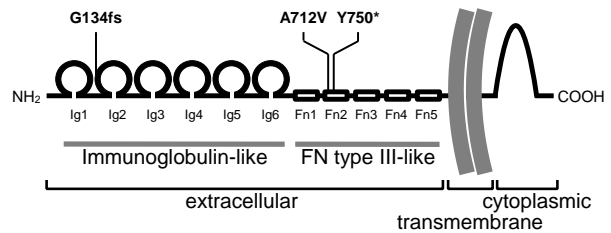
先天性遺伝性神経難病の一つである L1 症候群の発症機序の解明を目指し、疾患の原因遺伝子である神経接着因子 L1CAM 遺伝子異常が同定された初代培養細胞から、疾患 iPS 細胞の作成を行う。疾患 iPS 細胞より神経幹細胞など神経系細胞を誘導し、健康人由来の iPS 細胞より誘導した細胞との生物学的特性の比較解析を行う。L1CAM 遺伝子異常の遺伝子型と、それに起因する神経系細胞の機能障害について解析を行い、分子メカニズムを明らかとする。更には L1 症候群の病態との関連性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) L1CAM 異常を有する疾患ヒト iPS 細胞の作成

L1CAM 遺伝子異常が同定されている患者由来の線維芽細胞 3 株 (ClassIII 変異 2 株、ClassII 変異 1 株: 図 1) より、沖田らの方法に準じ iPS 細胞を樹立した (Okita et al,

Nat Methods 2011)。作成した iPS 細胞は、多能性幹細胞の特性解析を実施し、適切なクローンを選別した。



遺伝子分類	→ 表現型
Class I: Mutations that affect only cytoplasmic domain	→ 軽症型 L1 症候群
Class II: Missense point mutations in extracellular domain	→ アミノ酸の重要度による
Class III: Mutations that produce a premature stop codon in extracellular domain	→ 重症型 L1 症候群

図1: L1CAM遺伝子のprotein domainと、遺伝子変異分類

#### (2) 神経前駆細胞 (NPC) の誘導

SMAD シグナル阻害作用を持つ低分子化合物 Dorsomorphin と SB431542 を添加した培地中で、14 日間無血清凝集浮遊培養 (SFEBq) し、神経分化誘導を行った。その後、増殖因子 FGF2/EGF/LIF を添加した培地で拡大培養し、神経前駆細胞 (iPS-NPCs) を樹立した。iPS-NPCs は、増殖因子非添加培地で 2 週間培養して終末分化を誘導し、TuJ1 (ニューロン) と抗 GFAP (グリア) 抗体で免疫染色解析を行い、神経多分化能を確認した。

#### (3) L1CAM 異常 iPS-NPCs の遺伝子発現解析

誘導後 70 日前後の L1CAM 異常 iPS-NPCs より全 RNA を抽出し、アフィメトリクス社 HG-U133 Plus 2 Array を用いて遺伝子プロファイルを、指示に従い取得した。

#### (4) 細胞遊走能アッセイ

コーニング社 Transwell with culture membrane insert を用い、L1CAM 異常 iPS-NPC と正常 iPS-NPC の細胞遊走能を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) L1 異常 iPS 細胞の樹立と iPS-NPCs の誘導

L1CAM 遺伝子異常が同定されている患者由来の線維芽細胞より、iPS 細胞を樹立した (図 1)。樹立した iPS 細胞は、L1CAM 遺伝子異常の保全されていることを確認するとともに、多能性幹細胞特性を検証して適切なクローンを選別した。各クローンは、SFEBq 改変法による神経分化誘導と、増殖因子 (EGF/FGF/LIF) を添加した培地での拡大培養により、iPS-NPCs を誘導した。L1CAM 異常 iPS-NPCs は、増殖因子フリーの培地でマトリゲル上に 2 週間培養して終末分化を誘導した結果、TuJ1 陽性 (ニューロン) と GFAP (グリア) 陽性細胞が出現し、神経多分化能を保持することが示されたが、マトリックスとの接着能が低く脆弱で、正常コントロールに比

へ、出現率も低かった (図2)。

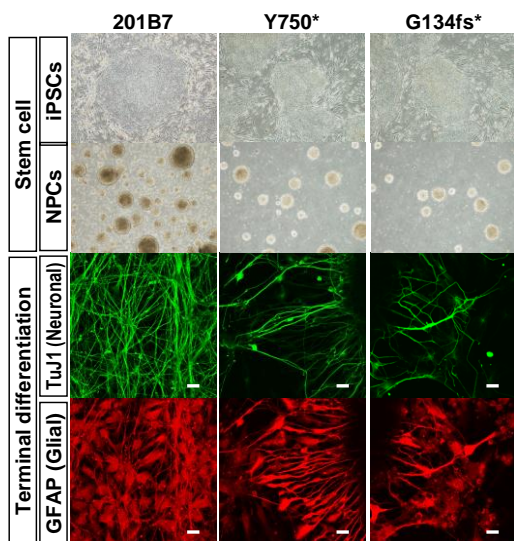


図2: L1CAM異常、及び正常iPS細胞と、その分化誘導像

### (2) 遺伝子発現プロファイルの取得と解析

分化誘導開始より70日前後のiPS-NPCsより全RNAを抽出し、マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。正常コントロールとの比較で、2倍以上の発現量差のある168プローブが抽出され、それらの中に増殖能や分化能に関係する遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は、終末分化能低下の原因となっていることが推察された。

### (3) 細胞遊走能の検討

片面をマトリゲルコートしたトランスウェルを用い、ボイデンチャンバー法で細胞遊走能アッセイを行った。マトリゲルコート側に移動した細胞数を経時的にカウントし、L1CAM異常、及び正常コントロールiPS-NPCsの細胞遊走能を検討した。L1CAM異常iPS-NPCsの遊走能は極度に低下し、コントロールの10-20%程度であることが明らかとなった(図3)。

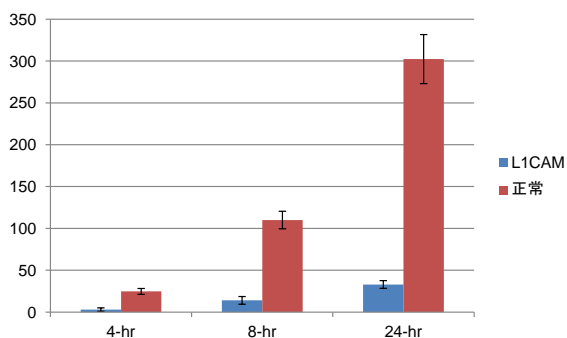


図3: L1CAM異常、及び正常iPS-NPCsの遊走能

## 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5件)

① Yamada S, Okita Y, Shofuda T, Yoshioka E, Nonaka M, Mori K, Nakajima S, Kanemura Y: Ipsilateral hemiparesis caused by putaminal hemorrhage in a patient with horizontal gaze palsy with progressive scoliosis: a case report. BMC Neurology 15:25, 2015 査読有  
DOI : 10.1186/s12883-015-0286-4

② Bamba Y, Shofuda T, Kanematsu D, Nonaka M, Yamasaki M, Okano H, Kanemura Y: Differentiation, polarization, and migration of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells co-cultured with a human glial cell line with radial glial-like characteristics. Biochem Biophys Res Commun 447:683-688, 2014 査読有  
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.04.070

③ Shofuda T, Kanematsu D, Fukusumi H, Yamamoto A, Bamba Y, Yoshitatsu S, Suemizu H, Nakamura M, Sugimoto Y, Furue MK, Kohara A, Akamatsu W, Okada Y, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y: Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells are a Promising Source for the Generation and Cell Banking of Human Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Med 4:125-147, 2013 査読有  
<http://dx.doi.org/10.3727/215517912X658918>

④ Shofuda T, Fukusumi H, Kanematsu D, Yamamoto A, Yamasaki M, Arita N, Kanemura Y: A method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. Neuroreport 24:84-90, 2013 査読有  
DOI : 10.1097/WNR.0b013e32835cb677

⑤ Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Ohgushi M, Sasai Y, Kanemura Y: Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using Pericellular Matrix of Decidua derived Mesenchymal cells. PLoS ONE 8:e55226, 2013 査読有  
DOI : 10.1371/journal.pone.0055226

[学会発表] (計9件)

① 正札智子, 半田有佳子, 稲澤佑衣, 山本篤世、兼松大介, 吉岡絵麻, 福角勇人, 隅

田美穂, 馬場庸平, 金村米博: ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた神経毒性評価系の構築. 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 20 日; 横浜市西区

②福角勇人, 正札智子, 兼松大介, 山本篤世, 山崎麻美, 金村米博: 神経分化指向性の劣るヒト iPS 細胞を用いた神経前駆細胞誘導法の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 20 日; 横浜市西区

③Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Kanemura Y, Shofuda T, Fukusumi H, Okada Y, Okano H, Shirao T, Sekino Y: An attempt to establish non-clinical experiments for nervous system using human iPSC-driven neurons. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience iPS Cells for Regenerative Medicine. 2015 年 1 月 15-17 日; Suita, Osaka

④金村米博, 市村幸一, 正札智子, 西川 亮, 山崎麻美, 新井 一, 渋井壮一郎: 小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築. I. 髄芽腫、上衣腫. 第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2013 年 12 月 8 日; 宮崎市

⑤ Nonaka M, Nakajima S, Shofuda T, Kanemura Y: Relation between methionine uptake and molecular markers in glioma. 2013 SNO 18th Annual Scientific Meeting, 2013 年 11 月 23 日; San Francisco, USA

⑥ Yamasaki M, Shofuda T, Harada A, Yamanaka T, Bamba Y, Nonaka M, Kanemura Y: Molecular Basis of Csf Space Anomaly. 15th World Congress of Neurosurgery, 2013 年 9 月 12 日; Seoul, Korea

⑦Yamasaki M, Shofuda T, Bamba Y, Kanemura Y: Research using NSCs and iPS cells derived from patients with intractable brain malformation. 2013 East Asia Symposium: Rare Diseases of Childhood Nervous System, 2013 年 5 月 22 日; Seoul, Korea

⑧ Shofuda T, Fukusumi H, Kanematsu D, Yamamoto A, Yamasaki M, Arita N, Kanemura Y: A method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. CiRA International Symposium 2013, 2013 年 3 月 11-12 日; Kyoto, Japan

⑨ Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Fukusumi H, Mizutani M, Bamba Y, Suemizu H, Nakamura M, Okano H, Yamasaki M,

Kanemura Y: Comprehensive analysis on stability of human induced pluripotent stem cells from decidua-derived mesenchymal cells. ISSCR 10th Annual Meeting, 2012 年 6 月 15 日; Yokohama, Japan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

正札 智子 (SHOFUDA, Tomoko)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター (臨床研究センター)・先進医療研究開発部 幹細胞医療研究室・室長

研究者番号: 40450895

### (2) 研究分担者

金村 米博 (KANEMURA, Yonehiro)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター (臨床研究センター)・先進医療研究開発部 再生医療研究室・室長

研究者番号: 80344175