

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591693

研究課題名(和文) 自閉症者歯髄からの iPS 細胞樹立と解析

研究課題名(英文) Generation of iPS cells from dental pulp of autism patients

研究代表者

中山 敦雄 (Nakayama, Atsuo)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・部長

研究者番号：50227964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症での神経細胞異常を解析するための研究材料を確立する目的で、自閉症者由来の歯髄細胞からiPS細胞を樹立した。歯髄細胞は10名の自閉症者から14系統作製し、これから3名の自閉症者由来6系統の初期化クローンを得た。うち2系統で多分化能を有することを確認した。これらのクローンは神経前駆細胞マーカーの発現と神経細胞突起様の細胞突起を伸ばす細胞への分化誘導が可能であったが、通常発達者由来のiPS細胞から同様に分化誘導した細胞との明らかな差異を期間内に見いだすには至らなかった。しかし、これら自閉症者由来のiPS細胞はより詳細な解析によって神経細胞異常を解明する目的に資するものである。

研究成果の概要(英文)：In order to establish research materials useful for revealing neuronal abnormalities in autistic patient, we have introduced re-programing agents into dental pulp stem cells obtained from 10 autistic patients. During the period, we could established two induced pluripotent stem (iPS) cell clones derived from autistic patients. These iPS cell clones can differentiate into the neuronal lineage expressing several markers for neuronal precursor cells. At this differentiated stage, however, we could not find clear abnormalities in morphology and proliferative potential compared with neuronal precursor cells differentiated from control iPS cells. In spite of the results, we emphasize that these iPS clones derived from autistic patients are useful materials to reveal detailed neuronal abnormalities of autism in future in vitro studies.

研究分野：病理学

キーワード：自閉症 iPS細胞 神経細胞 研究リソース 歯髄細胞

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は遺伝的要因が発症に大きく影響する行動異常症であり、症例の遺伝子解析が精力的に進められてきた。その結果、複数の遺伝子の量的変化 (CNV) が原因と考えられるもの、多種類 (~400 個) の単一遺伝子の de novo 機能喪失変異が原因と考えられるものなど、症例によりその遺伝子変化は非常に多様であり、ASD の大多数に共通する遺伝子変化は見いだされなかった。このため次のステップとして ASD として括られる行動異常の背景にある脳、神経細胞の共通した異常を明らかにすることが、ASD の病態理解と治療戦略を進める上で重要と考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景から、ASD 者に共通する神経細胞異常を明らかにするために、患者神経細胞の詳細な解析が必須である。しかし研究対象として患者由来の神経細胞を得ることは現実的には極めて難しい。代替手段は ASD 者由来の iPS 細胞を樹立し、これを神経系細胞に分化誘導して研究対象とすることが現実的である。本課題ではできるだけ負担を軽減して多くの ASD 者から iPS 細胞を作製し、さらにこれを元に神経細胞機能の解析を行うシステムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

検査や治療としての採血機会が乏しく、しばしば痛覚過敏を有する ASD 者から、iPS 細胞作製のための体細胞を得る手段として、当施設や共同研究施設でしばしば実施される ASD 者を対象とした抜歯治療に着目した。抜歯から得られる歯髄細胞は皮膚線維芽細胞と同等で、末梢血細胞よりも効率的に iPS 細胞が樹立できることも優位性があると考えられた。

4. 研究成果

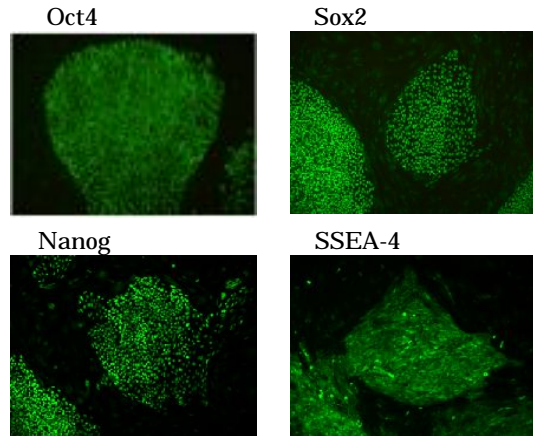
期間中に自閉症者と健常発達者から以下の表に示す系統の歯髄細胞株を樹立した。さらに単一遺伝子異常による知的障害症候群 Cornelia de Lange 患者からの歯髄細胞樹立も行った。

	提供者数	歯髄細胞 系統数
健常者	19	23
自閉症者	10	14
コルネリア・デ・ランゲ症候群	2	5

(1) 自閉症者由来 iPS 細胞作製

これらの歯髄細胞を材料として、初期化因子の導入を行った結果、自閉症者 3 名から 6 系統の初期化クローンを得た。これらの初期化クローンでは以下の様に各種の幹細胞マーカーの発現を確認した。

自閉症者由来初期化クローン Aut7-1



さらにこれらのクローンに関しては免疫不全マウスへの接種でテラトーマ形成を認め、多分化能を有する iPS 細胞であることを確認した。

(2) 自閉症者由来 iPS 細胞の分化誘導と解析

引き続き自閉症者由来 iPS 細胞とコントロール iPS 細胞を神経幹細胞、神経前駆細胞へと分化誘導し、主に形態学的な解析を行ったが、自閉症者由来細胞とコントロール細胞との間に明らかな差異を見いだすことは出来なかった。

当初の研究目的は自閉症者由来細胞とコントロール細胞との比較により、自閉症者の神経細胞機能異常を見いだすことまでを目指したが、期間内で行い得た神経前駆細胞までの分化誘導の系での形態学的解析では結果は得られなかった。既に自閉症者由来 iPS 細胞の解析では浮遊培養による microbrain 作製の系で、抑制性神経細胞産生が障害される傾向が示されている。これらの知見を参考に適切な分化誘導系を検討し、さらなる解析を進める予定である。

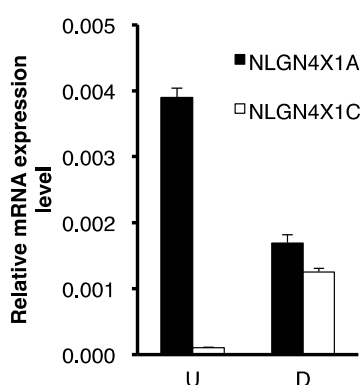
(3) Cornelia de Lange 患者由来 iPS 細胞作製

一方で自閉症はその多様性から解析の困難さが予測されたため、単一遺伝子異常を原因とする Cornelia de Lange 症候群も研究対象に加え、iPS 細胞の作製を試みた。しかし本疾患は染色体形成に関与する遺伝子変異が原因となっており、歯髄細胞に細胞増殖能の軽度障害が観察された。恐らくこのことが原因で、これまで初期化クローンを得ることは出来ていない。現在企業との共同研究により、なお iPS 細胞作製を試みている。

(4) iPS 細胞を利用した神経系細胞分化と遺伝子発現制御の解析

患者由来 iPS 細胞作製と分化誘導技術を確立する過程で、標準となる iPS 細胞株 201B7 (京都大学 iPS 細胞研究所より分与) を神経前駆細胞まで分化誘導する系を利用した自閉症原因遺伝子の発現解析を行った。

具体的には稀な家族性自閉症原因遺伝子ニューロリギン(NLGN)4X は、神経細胞系への分化に伴い活性化するプロモーターが変化することが明らかになった。下図に示すように多能性幹細胞(U)では CpG island の外側の CpG island shore に存在するプロモーターが主に活性化状態にあり、エクソン 1A からの転写産物(NLGN4X1A)が大部分であった。同じ細胞株を神経前駆細胞(D)まで分化誘導すると CpG island 内部のプロモーター活性が上昇して、エクソン 1C からの転写産物(NLGN4X1C)が増加し NLGN4X1A と同等レベルまでの発現上昇を認めた。



すでにヒト死後脳での発現解析から NLGN4X1A は胎児型、NLGN4X1C は成人型転写産物であることを明らかにしていたが、iPS 細胞を用いた本研究によりこのような転写産物の変化は実際に細胞の分化状態を反映したものであることが明らかになった。

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7件)

- (1) Shibata A., Machida J., Yamaguchi S., Kimura M., Tatematsu T., Miyachi H., Matsushita M., Kitoh H., Ishiguro N., Nakayama A., Higashi Y., Shimozato K., Tokita Y. Characterisation of novel RUNX2 mutation with alanine tract expansion from Japanese cleidocranial dysplasia patient. *Mutagenesis* 2016, 31(1), 61-7, doi: 10.1093/mutage/gev-57
- (2) Tatematsu T., Kimura M., Nakashima M., Machida J., Yamaguchi S., Shibata A., Goto

H., Nakayama A., Higashi Y., Miyachi H., Shimozato K., Matsumoto N., Tokita Y. An aberrant splice acceptor site due to a novel intronic nucleotide substitution in MSX1 gene is the cause of congenital tooth agenesis in a Japanese family. *PLoS One* 2015, 10(6):e0128227, doi:10.1371/journal.pone.0128227

- (3) Yamaguchi S., Machida J., Kamamoto M., Kimura M., Shibata A., Tatematsu T., Miyachi H., Higashi Y., Jezewski P., Nakayama A., Shimozato K., Tokita Y. Characterization of novel MSX1 mutations identified in Japanese patients with nonsyndromic tooth agenesis. *PLoS One* 2014 9(8):e102944. doi: 10.1371/journal.pone.0102944
- (4) Kimura M., Machida J., Yamaguchi S., Shibata A., Tatematsu T., Miyachi H., Jezewski PA., Nakayama A., Higashi Y., Shimozato K., Tokita Y. Novel nonsense mutation in MSX1 in familial nonsyndromic oligodontia: subcellular localization and role of homeodomain/MH4. *Eur J Oral Sci* 2014, 122(1), 15-20, doi: 10.1111/eos.12105
- (5) Suzuki MM., Yoshinari A., Obara M., Takuno S., Shigenobu S., Sasakura Y., Kerr AR., Webb S., Bird A., Nakayama A. Identical sets of methylated and nonmethylated genes in *Ciona intestinalis* sperm and muscle cells. *Epigenetics Chromatin* 2013, 6(1), 38, doi: 10.1186/1756-8935-6-38
- (6) Iio A., Takagi T., Miki K., Naoe T., Nakayama A., and Akao Y. DDX6 post-transcriptionally down-regulates miR-143/145 expression through host gene NCR143/145 in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1829(10), 1102-10, doi:

10.1016

- (7) Fukada M., Hanai A., Nakayama A., Suzuki T., Miyata N., Rodringuiz RM., Westel WC., YaoTP., and Kawaguchi Y. Loss of deacetylation activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice. Plos One 2012, 7(2), e30924. doi: 10.1371

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 中山敦雄、自閉症の生物学的研究の潮流と限界、胎児・新生児神経研究会(招待講演) 2015年12月6日、浜松市
(2) 松木亨、発達障害研究のための歯髄幹細胞バンクの構築、日本組織培養学会、2015年5月26日、広島市
(3) 中山敦雄、自閉症感受性遺伝子 NLGN4Xの発現解析とその制御機構、日本病理学会総会、2015年5月2日、名古屋市
(4) 飯尾明生、An investigation for epigenetic regulation of the expression of the autism-susceptibility gene, Neuroligin 4X、日本分子生物学会、2013年12月4日、神戸市

〔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

中山 敦雄 (NAKAYAMA, Atsuo)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究

所・発生障害学部・部長

研究者番号：50227964

(2) 研究分担者

深田 斉秀 (FUKADA, Masahide)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・研究員
研究者番号：80414019

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

飯尾 明生 (IIO, Akio)
松木 亨 (MATSUKI, Tohru)