

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 6 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2016

課題番号：24791090

研究課題名(和文)ゲノムコピー数異常が発達障害を来たすメカニズムの解明

研究課題名(英文)elucidation of a mechanism of developmental disorder caused genome copy number aberration

研究代表者

下島 圭子(Shimajima, Keiko)

東京女子医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30578935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アレイCGH解析によりゲノムコピー数異常が原因と同定された発達障害患者から疾患 iPS細胞を樹立し、神経系細胞へ分化誘導させて解析を行った。時間的経過に沿って網羅的な遺伝発現解析を行い、疾患特異的な遺伝子発現を同定した。また、マウスアストロサイトとの共培養により、成熟したニューロンまで分化させることに成功し、正常と疾患での差異を比較した。疾患ではスパインの形成不全と活動電流の減弱を認めた。さらに、発達障害を来した患者を新たに次世代シーケンサーを用いて解析し、原因遺伝子を同定して報告した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with developmental disorder whose genetic causes were identified, and we established neuronal differentiation model. We showed that disease-specific iPSCs showed abnormal neurite extension, loss of density of spine number, reduced neuronal action potential. Furthermore, we newly identified genomic causes of patients with developmental disorder by next generation sequencing.

研究分野：小児科

キーワード：iPS細胞 発達障害 神経細胞遊走障害 ニューロン シナプス

1. 研究開始当初の背景

2003年にヒトゲノムプロジェクトが終了したことにより、ヒトゲノムの多様性も明らかとなってきた。繰り返し配列や一塩基置換だけでなく、数百 kb 以上のゲノム領域が増減するゲノムコピー数多型 (copy number variation; CNV) も存在する。解析法である比較ゲノムハイブリダイゼーション法 (array-based comparative genomic hybridization: aCGH) が普及したことで、旧来の G-band 法では検出できなかった多くの新しい染色体微細欠失症候群が次々と報告された。申請者は、この方法により過去に報告がない新たな 5q31.1 欠失症候群を明らかにした。染色体微細欠失症候群の多くは精神発達遅滞を示す。それ以外にも自閉症や ADHD といった精神科関連疾患の原因になっていることも明らかになってきた。しかし、領域内の遺伝子がどのように臨床症状に関わっているのかについてはよくわかっていないことが多かった。

研究代表者は既に疾患患者由来 iPS 細胞を利用した研究を行っており、iPS 細胞の樹立や神経系細胞への分化誘導についての実験を開始していたため、この技術を稀少な中枢神経疾患の病態解析へ応用すべきと考えた。

2. 研究の目的

aCGH 解析によりゲノムコピー数異常が発症原因と同定された発達障害患者から疾患 iPS 細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導させて分化の過程毎に神経細胞の遺伝子発現や細胞形態の差異を比較することにより発症機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と検疫

採取した線維芽細胞に対してエピソードベクターにより山中 4 因子を導入し、iPS 細胞を樹立した。多能性の確認、分化能の確認、核型確認、の検疫を行い、解析に耐えうるコロニーを選択した。

(2) 遺伝子発現の網羅的解析

皮膚線維芽細胞と樹立した iPS 細胞、また神経分化途中の細胞も対象に、マイクロアレイ解析で網羅的な遺伝子発現解析を行った。差異を認められた遺伝子については、リアルタイム PCR や免疫染色法を用いて再確認を行った。

(3) iPS 細胞の神経系への分化誘導

樹立した iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導した。手法は、8 日間低吸着 Dish で浮遊培養させ、以降は接着培養に切り替えて培養を継続する無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法) と、PiggyBac ベクターを用いた迅速神経分化法の 2 通りを実施した。

(4) 神経系分化誘導過程における遊走能解析 神経細胞の遊走能を視覚的に比較測定する

ため、iPS 細胞を蛍光ラベル化し、神経分化誘導過程をタイムラプス撮影し、細胞の移動距離と移動方向を測定した。

(5) iPS 細胞から分化誘導したニューロンにおけるスパインの評価

発達障害をきたす患者の脳におけるミクロレベルでの差を評価するため、シナプスにおけるスパインの存在を免疫染色で確認した。免疫染色の前シナプスマーカーである Synapsin1・後シナプスのマーカーである PSD95 を用いて多重染色を行い、共に染色される Dot 数をカウントし、その密度を比較した。

(6) 同一 Dish 内での正常 iPS 細胞と疾患 iPS 細胞の神経分化誘導

正常 iPS 細胞と疾患 iPS 細胞をそれぞれシングルセル培養へ切り替えた後、レンチウイルスベクターを用いてそれぞれ異なる蛍光色素 (DsRed, EGFP) でラベル化を行った。ラベル化できた iPS 細胞をそれぞれ同じ細胞数カウントし、同一 Dish 内で神経分化誘導し、その電気生理学的評価を行った。

(7) 新たな発達障害患者に対して、遺伝学的解析を行い、原因を同定した。

4. 研究成果

(1) 迅速神経分化法に関しては、Day6 からマウスアストロサイトとの共培養を行うことで、正常 iPS 細胞においては成熟ニューロンまで分化させることに成功した。免疫染色と電気生理学的評価によって確認できた。

(2) 現在までに、異なる原因遺伝子によって神経細胞遊走障害を来した発達障害を示す患者 2 例において、終脳への分化誘導過程において共通する遺伝子の発現低下を見出した。具体的には、神経細胞遊走障害による発達障害を来した患者において、正常対象と比べて著明に発現が変化している遺伝子のうち、機能未知であるが、先行研究によって細胞遊走との関連が示唆されている遺伝子に注目した。そこで別の神経細胞遊走障害を示す患者からも iPS 細胞を樹立し、神経系細胞への分化誘導過程における当該遺伝子の変化を解析したところ、同様の結果が得られた。この遺伝子は神経系への分化誘導の過程で発現が高くなること、病理解析で、神経細胞の遊走過程にある胎児脳で発現していることから、神経細胞の遊走に深く関わる遺伝子であると考えられた。2015年に論文発表した。

(3) SFEBq 法による神経分化誘導の過程における遊走能を視覚的に観察するためタイムラプス撮影に取り組み、正常コントロールと疾患での差異を見出した。さらに解析数を増やして測定中である。

(4)発達障害をきたす患者の脳におけるミクロレベルでの差を評価するため、iPS細胞から分化誘導したニューロンにおけるスパインを評価する手法の確立を目指した。現在までにスパインの存在を免疫染色で確認することに成功した。正常と疾患では、疾患患者由来ニューロンではスパインの密度が正常の約半分にまで減少している結果を得ており、現在解析数を増やして集計している。近く論文投稿する予定である。この評価法を確立することで、今までは視覚的に確認できなかった生きたままのヒト神経細胞におけるミクロレベルの病態解析が可能となり、さらに今後は幅広く中枢神経系疾患を対象とした病態解析にも応用が可能と考えている。

(5)蛍光ベクターをもちいた標識と同一条件での培養については、蛍光ラベル化のiPS細胞を得るのに時間がかかってしまったため、現在も進行中である。ようやく同一Dish内での培養を開始したところであり、ひきつづき実験を続ける予定である。

(6)神経分化誘導実験と平行して、発達障害を来した患者に遺伝学的解析を行い、次世代シーケンサー解析によって新たな遺伝子変異を見出し、論文報告した。

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 70 件)

Shimojima K, Maruyama K, Kikuchi M, Imai A, Inoue K, Yamamoto T. Novel SLC16A2 mutations in patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Intractable Rare Dis Res*, 査読有, 5(3), 214-217, 2016.
DOI:10.5582/iridr.2016.01051.

Shimojima K, Ondo Y, Matsufuji M, Seto N, Tsuru H, Oyoshi T, Higa N, Tokimura H, Arita K, Yamamoto T. Concurrent occurrence of an inherited 16p13.11 microduplication and a de novo 19p13.3 microdeletion involving MAP2K2 in a patient with developmental delay, distinctive facial features, and lambdoid synostosis. *Eur J Med Genet*, 査読有, 59(11), 559-563, 2016. DOI:10.1016/j.ejmg.2016.10.006.

Shimojima K, Narai S, Togawa M, Doumoto T, Sangu N, Vanakker OM, de Paepe A, Edwards M, Whitehall J, Brescianini S, Petit F, Andrieux J, Yamamoto T. 7p22.1 microdeletions involving ACTB associated with developmental delay, short stature, and microcephaly. *Eur J Med Genet*, 査読有, 59(10), 502-506,

2016. DOI: 10.1016/j.ejmg.2016.09.008.
j.ejmg.2016.10.006.

Shimojima K, Okumura A, Hayashi M, Kondo T, Inoue H, Yamamoto T. CHCHD2 is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly. *Genomics*, 査読有, 106, 196-203, 2015.
DOI:10.1016/j.ygeno.2015.07.001.

Shimojima K, Okumura A, Ikeno M, Nishimura A, Saito A, Saito H, Matsumoto N, Yamamoto T. A de novo TUBB4A mutation in a patient with hypomyelination mimicking Pelizaeus-Melzbacher disease. *Brain Dev*, 査読有, 37, 281-285, 2015.
DOI: 10.1016/j.braindev.2014.05.004.

Shimojima K, Inoue T, Imai Y, Arai Y, Komoike Y, Sugawara M, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Kanno H, Hirose S, Yamamoto T. Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication. *J Hum Genet*, 査読有, 57(9), 580-586, 2012.
DOI: 10.1038/jhg.2012.71.

[学会発表](計 39 件)

下島 圭子, 山本 俊至, 島川 修, 岡本伸彦. 多彩な合併症を示したMED13Lハプロ不全症候群の3例. 第39回日本小児遺伝学会学術集会, 2016年12月9日~12月10日, 慶應義塾大学三田キャンパス, 東京都港区.

下島 圭子, 岡本 伸彦, 山本 俊至. 非対称性大脳皮質異形成症例に認められた新規TUBB3変異. 第58回日本小児神経学会学術集会, 2016年6月3日~6月5日, 京王プラザホテル, 東京都新宿区.

Shimojima K, Okumura A, Hayashi M, Kondo T, Inoue H, Yamamoto T. CHCHD2 is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly. *The 13th International Congress of Human Genetics*, 2016年4月3日~4月7日, 国立京都国際会館, 京都府左京区.

下島 圭子, 岡本 伸彦, 三宮 範子, 山本 俊至. 2p15-p16.1微細欠失の2例-既知報告例18例との比較-. 第55回日本先天異常学会学術集会, 2015年7月25日~7月26日, パシフィコ横浜会議センター, 神奈川県横浜市.

山本 俊至、下島 圭子 . [シンポジウム
疾患 iPS 細胞] 小児難病研究における疾患
iPS 細胞利用 . 第 87 回日本生化学学会大
会、2014 年 10 月 15 日 ~ 10 月 18 日、京都
国際会議場、京都府京都市 .

下島圭子、菅原みどり、島田姿野、三宮
範子、山本俊至 . iPS 細胞における二次的
な染色体再構成についての検討 . 日本人類
遺伝学会第 57 回大会、2012 年 10 月 25 日
~ 10 月 27 日、京王プラザホテル、東京都
新宿区 .

[図書] (計 2 件)

下島 圭子、山本 俊至 . ゲノム解析と
iPS 細胞を用いた病態 . 技術情報協会 . iPS
細胞の安全・高品質な作成技術 . 2016 ,
158-164 .

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

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・特任助教
研究者番号 : 3 0 5 7 8 9 3 5

(2) 研究分担者

なし