

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670473

研究課題名(和文) 自閉症患者のiPS神経分化細胞におけるゲノム配列異常の確認と治療効果の検証

研究課題名(英文) Identification of genomic changes and their therapeutic effects in neuronally-differentiated induced pluripotent stem cells of autistic patients

研究代表者

久保田 健夫 (KUBOTA, Takeo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：70293511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：責任遺伝子(MECP2)が判明している自閉症であるレット症候群の患者から樹立したiPS細胞から神経細胞を作製し、その異常を調べた。その結果、本来神経細胞では発現しないアストロサイト特異的遺伝子の異常な発現が認められた。またMeCP2とタンパク質複合体を形成しているHDACやSin3の標的化合物にレット症候群や自閉症関連遺伝子の発現回復作用があることが判明した。以上より、レット症候群患者iPS神経細胞における異常発現の基盤にMeCP2の機能不全に起因するゲノム配列異常が存在しうることと、MeCP2複合体タンパク質作用化合物が遺伝子の異常発現を是正する治療候補化合物である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated abnormalities in the neuronal cells differentiated from the induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from Rett syndrome patients, a representative autistic disorder caused by MECP2 mutations. As a result, we found abnormal expression of astrocyte-specific genes. Furthermore, we found that the chemicals, target to HDAC and Sin3 which are parts of MeCP2 protein complex, up-regulated Rett syndrome- and autism-associated genes. These findings suggest that malfunction of MeCP2-induced genomic changes may underlie the alteration of astrocyte-specific genes, and indicate that the chemicals examined possibly recover the gene expression which were down-regulated in Rett and autistic patients.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス エピゲノム 治療薬 iPS細胞 レット症候群 自閉症 遺伝子発現制御 バルブ
口酸ナトリウム

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム DNA 上に存在する繰り返し配列 (レトロポゾン) はかつて活性化して自らをコピーし、その結果、ヒトゲノム上に散在したと考えられている。通常はこの活性は DNA 上の化学修飾 (メチル化修飾) によって不活性化されている。しかし、近年、神経細胞分化の段階では例外的に活性化し配列変化が生ずることが示唆され始めた。

一方、代表的な自閉症疾患であるレット症候群の原因が、メチル化修飾された DNA 領域を認識して結合し、遺伝子発現を調節している MeCP2 タンパク質の遺伝子変異であることが明らかにされた。したがって、この患者では神経細胞における MeCP2 の機能不全による異常遺伝子発現とレトロトランスポゾン配列の活性化によるゲノム DNA 配列変化が予測され、前者は証明されたが、後者の詳細は不明であった。

このような背景の下、われわれはレット症候群患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、神経分化細胞を作製した。これまで、海外の研究グループによっても本症候群患者の iPS 由来神経細胞が作製され、レトロポゾン活性の上昇が報告されたが、実際に、ゲノム配列変化が生じているかどうかは明らかでなかった。

2. 研究の目的

レット症候群の原因は *MECP2* 遺伝子変異であり、この遺伝子がコードする MeCP2 タンパク質は遺伝子の発現制御やゲノムの安定化を司る。そこで、本研究では、MeCP2 の機能不全によって生ずる遺伝子の発現制御不全とその背景にあると考えられるゲノム配列の不安定化を明らかにすることであった。

この目的のため、以下の課題を設定の上、実施した。

(1) 患者 iPS 細胞の新手法による再樹立

iPS 細胞は成熟した細胞に 4 種の初期化因子をコードする遺伝子を染色体ゲノムの DNA 上を挿入することで作製される。この際、ゲノム DNA の改変 (配列変化) が生ずる。本研究の目的は、神経細胞におけるゲノムの不安定化による DNA 上の配列変化有無の検証である。したがって、人為的な配列変化を加えない方法を用いることが望ましく、ゲノム DNA 上への初期化因子の挿入のない新手法で iPS 細胞の樹立を行った。

(2) 患者 iPS 細胞から作製した神経細胞における遺伝子の発現制御不全の把握

MeCP2 の機能不全によってさまざまな神経機能に関係する遺伝子の発現が変化することが、培養細胞やモデルマウス脳組織、患者の死後脳組織を材料にした研究で明らかにされてきた。しかしながら、ヒトの患者脳の発達過程でどのような遺伝子の発現不全が生ずるかは明らかでなかった。本研究では、患者由来の iPS 細胞を神経分化させ、その過程での異常発現遺伝子を探索した。

(3) 候補薬剤の治療効果の確認

MeCP2 タンパク質は、単独ではなく、各種酵素タンパク質と複合体を形成して遺伝子の発現制御やゲノムの安定化を司っている。MeCP2 は酵素でないため活性化させることは困難であるが、複合体を形成しているタンパク質を標的とする化合物を活性化させることでその代わりを果たすことが原理的には可能である。そこで、複合体形成タンパク質を標的とする化合物の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) 患者 iPS 細胞の新手法による再樹立

ゲノム DNA への初期化因子遺伝子の挿入によらず、プラスミドのかたちで細胞に導入することで成熟細胞を iPS 細胞化させる方法 (Episomal iPSC Reprogramming Kit, Life Technology 社) を使用した。

(2) 患者 iPS 細胞から作製した神経細胞における遺伝子の発現制御不全の把握

MeCP2 タンパク質発現の検出には蛍光抗体法を、遺伝子発現量の定量には定量 RT-PCR 法を、iPS 細胞とこれを神経分化させたそれぞれの状態における解析対象全遺伝子の発現変化の把握には主成分分析法を用いた。

(3) 候補薬剤の治療効果の確認

遺伝子発現量の定量には定量 RT-PCR 法を用いた。

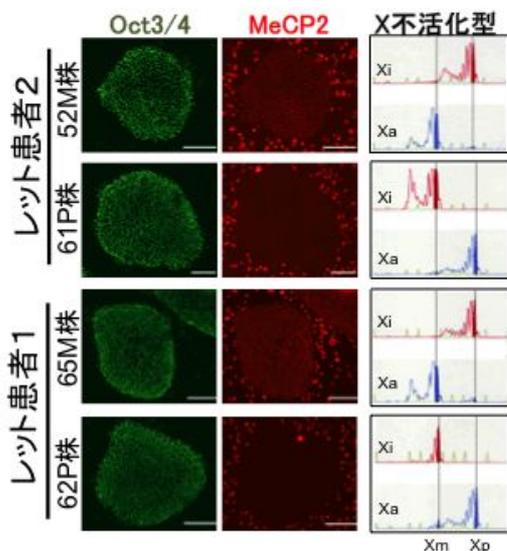
4. 研究成果

(1) 患者 iPS 細胞の新手法による再樹立

正常対照者の皮膚線維芽細胞に対し 4 因子の導入を行ったところ、iPS 細胞が作製できることを確認した(図を提示せず)。しかしながら、既に採取し保管してあったレット症候群患者の皮膚線維芽細胞からの作製を行ったが、2 年間の研究期間内に iPS 細胞株を樹立させることができなかった。

(2) 患者 iPS 細胞から作製した神経細胞における遺伝子の発現制御不全の把握

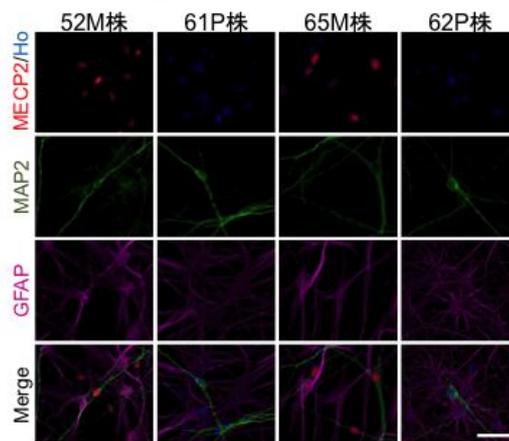
iPS細胞におけるMeCP2発現



(図 1)

2 名の同一遺伝子変異を有するレット症候群患者から作製した iPS 細胞は、X 染色体不活化パターンに従って、母由来の正常 *MECP2* 遺伝子を有する X 染色体が活性化した細胞株 (52M と 65M) と父由来の変異 *MECP2* 遺伝子を有する X 染色体が活性化した細胞株 (61P と 62P) を樹立した(図 1)。正常遺伝子発現株は MeCP2 タンパク質が検出され、変異遺伝子発現株では検出されなかった。これより、前者は内部対照細胞株、後者はレット症候群モデル細胞として使用できると考えられた。

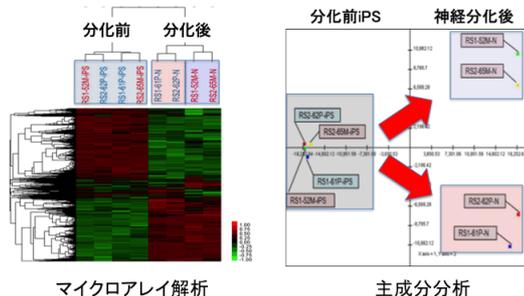
レット症候群患者iPS由来の神経細胞



(図 2)

樹立した iPS 株を常法に従い神経分化させた。その結果、正常 *MECP2* 発現株 (52M と 65M) と変異 *MECP2* 発現株 (61P と 62P) のいずれも神経細胞の形態には違いが認められなかった(図 2)。すなわち、予測された MeCP2 発現不全による神経突起形成異常は認められなかった。

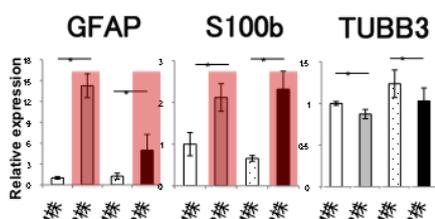
神経分化後に遺伝子発現パターンの異常が顕在化



(図 3)

発現マイクロアレイ解析で正常 *MECP2* 発現株 (52M と 65M) と変異 *MECP2* 発現株 (61P と 62P) の遺伝子発現差異を主成分分析法で調べた。その結果、神経分化前の iPS 細胞の段階では両者にほとんど差は認められなかったが、神経分化後は両者間に遺伝子発現差異が顕在化した (図 3)。

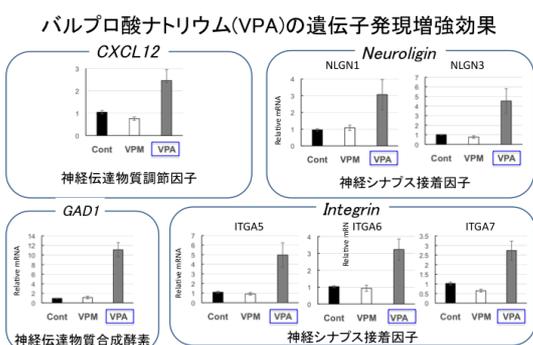
神経分化後に顕在化した遺伝子はアストロサイト特異的発現遺伝子



(図 4)

神経分化後に発現差異が顕在化した遺伝子は本来神経細胞では発現しない、アストロサイト特異的発現遺伝子 (*GFAP*, *S100*) であった (図 4)。すなわち *MeCP2* 不全下でアストロサイトで発現している遺伝子が異常発現してくることが判明した。

(3) 候補薬剤の治療効果の確認



(図 5)

バルプロ酸ナトリウム (VPA) はてんかんや精神疾患の治療薬である。MeCP2 タンパク質複合体を形成するヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を有する。この薬物を神経培養細胞 (SH-SY5Y) に投与したところ、自閉症や関連疾患で低下が予測されている遺伝

子の発現を増強する作用があることが判明した (図 5 の灰色のバー。黒のバーは無投与対照)。

以上の研究成果は、MeCP2 不全下で神経細胞が成熟すると本来、神経分化過程で発現が抑制されるはずのアストロサイト特異的遺伝子が MeCP2 による発現抑制を免れて発現してしまうことを示していると考えられた。この知見は、神経培養細胞、モデルマウス脳、患者の死後脳研究、ならびに最近の国外で行われたレット症候群患者 iPS 細胞研究でも見いだせなかった、世界に先駆けての本症の神経細胞病態の重要な知見となった。

なお、本研究で見いだされたアストロサイト特異的発現遺伝子は、MeCP2 の直接的な発現抑制効果の異常と解釈されるとともに、遺伝子領域あるいはその近傍領域のレトロトランスポゾンの挿入による発現変化とも考えられる。したがって、今後、新手法で樹立される本症候群患者の iPS 細胞によってこれを明らかにすることが必要と考えられた。また、本研究で見いだされた VPA を含む既存の薬剤あるいは新規化合物を用いて、MeCP2 機能不全に基づく発現調節不全やゲノム配列異常を改善させることが可能か、今後、検証することが必要と思われた。

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 9 件)

- Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Matsumoto T, Yamaguchi R, Sanosaka T, Okada Y, Kobayashi T, Ohya M, Nakashima K, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Differentiation of multipotent neural stem cells derived from Rett syndrome patients is biased toward the astrocytic lineage. *Mol Brain* 8:31, 2015. doi: 10.1186/s13041-015-0121-2 (査読有)。

- (2) Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD. *J Dev Orig Health Dis* 6:96-104, 2015. doi: 10.1017/S2040174415000057 (査読有) .
- (3) Kubota T, Miyake K, Hariya M, Mochizuki K. Epigenetics as a basis for diagnosis of neurodevelopmental disorders: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn* 14:685-697, 2014. doi: 10.1586/14737159.2014.925805 (査読有) .
- (4) Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Akamatsu W, Oyama M, Okano H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome. *PLoS ONE* 9: e94737, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0094737 (査読有) .
- (5) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. The role of epigenetics in Rett syndrome. *Epigenomics* 5: 583-592, 2013. doi: 10.2217/epi.13.54 (査読有) .
- (6) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetics in neurodevelopmental and mental disorders. *Med Epigenet* 1: 52-59, 2013. doi:10.1159/000354718 (査読有) .
- (7) Kubota T, Hata K. Epigenomics comes of age with expanding roles in biological understanding and clinical application. *J Hum Genet* 58:395, 2013 (査読有) . doi:10.1038/jhg.2013.70.
- (8) Nitta H, Unoki M, Ichianagi K, Kosho T, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Franscastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. *J Hum Genet* 58:455-460, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.56 (査読有) .
- (9) Li Y, Miyanari Y, Shirane K, Nitta H, Kubota T, Ohashi H, Okamoto A, Sasaki H. Sequence-specific microscopic visualization of DNA methylation status at satellite repeats in individual cell nuclei and chromosomes. *Nucleic Acids Res* 41:e186, 2013. doi: 10.1093/nar/gkt766 (査読有) .

【学会発表】(計17件)

- (1) 久保田健夫. 特別講演 I 「エピジェネティクスに基づく健康戦略」第 5 回 岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会. 岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜県・岐阜市)、2014.12.6.
- (2) 久保田健夫. Epigenomics in Chronic Diseases. シンポジウム 2S17 At the Molecular Crossroad of Metabolism and Epigenetics(代謝とエピジェネティクスの分子交差点). 第 37 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2014.11.25-27 (11.26).
- (3) 久保田健夫. 臨床エピジェネティクス研究～今、どこにむかっているのか～. 千葉県がんセンター研究所集談会. 千葉県がんセンター(千葉県・千葉市)、2014.11.20.
- (4) 三宅邦夫・久保田健夫. シンポジウム エピジェネティクス研究が拓くストレス科学の世界「発達障害とエピジェネティクス」. 第 30 回日本ストレス学会. 日本大学文理学部百周年記念館(東京都・世田谷区)、2014.11.7.
- (5) Miyake K, Yamada Y, Yotani T, Kubota T. Clinical application of an anion exchange HPLC column that distinguishes DNA methylation status. The American society of Human Genetics 64nd Annual Meeting. San Diego (USA), 2014.10.20 .
- (6) Kubota T. Epigenetics as a basis for diagnosis and treatment of Neurodevelopmental Disorders. Epigenomics & Metabolomics Symposia-2014. Boston (USA), 2014.8.25.
- (7) 久保田健夫. 発達障害にかかわる要因について: オーバービュー. シンポジウム 4 発達障害はいつ形成されるか? 先天性? 後天性? あるは両方か? ~発症および病態修飾メカニズムについて~. 第 56 回日本小児神経学会総会. アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)、2014.5.30.
- (8) 久保田健夫. シンポジウム 1 iPS 細胞を用いた小児神経疾患の病態解明とその問題点「自閉症疾患(Rett 症候群)の病態解明とその問題点」. 第 56 回日本小児神経学会総会. アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)、2014.5.29.
- (9) 久保田健夫. 発達障害とエピジェネティクス. 発達障害医学セミナー. 京都教育大学(京都府・京都市)、2014.3.16.
- (10) 久保田健夫, 三宅邦夫, 水口洋平, 伊藤雅之, 後藤雄一, 豊田敦. 重症度の差異を認めたレット症候群の一卵性双生児のゲノム・エピゲノム比較解析. 日本人類遺伝学会第 58 回大会. 江陽グラウンド

- ホテル(宮城県・仙台市)、2013.11.21.
- (11) Kubota T. Environment, Epigenetics and Neurodevelopment. Pre-Congress Workshop 2: Epigenetic Analysis/ EWAS. 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease. Singapore (Singapore), 2013.11.16.
- (12) Ando T, Akamatsu W, Matusmoto, Mikake K, Yamaguchi R, Okada Y, Imaizumi Y, Ohyama M, Kurosawa H, Amagai M, Kubota T., Okano H. Astrocytes are increased in neural cells derived from Rett syndrome iPS cells. 第36回日本神経科学大会. 国立京都国際会館(京都府・京都市)、2013.6.21.
- (13) Miyake K, Kubota T. Epigenomic difference associated with neurodevelopmental discordance of the monozygotic twins with Rett syndrome. 第35回日本神経科学大会. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)、2013.9.21.
- (14) Kubota T. Epigenetics in Neurodevelopmental Disorders. Epigenomics & Metabolomics Symposia-2013. Boston (USA), 2013.7.10.
- (15) Kubota T., Miyake K, Hirasawa T. Epigenetic dysfunctions in children manifesting with autistic features. Symposium: What are the effects of environment and epigenetics in cognitive development of children? 11th World Congress of Biological Psychiatry. 国立京都国際会館(京都府・京都市)、2013.6.25.
- (16) 久保田健夫. エピゲノム: Rett 症候群から判ったこと. シンポジウム S(4)-12「孤発性疾患における遺伝子異常の探索法」. 第54回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)、2013.6.1.
- (17) 久保田健夫. 自閉症のエピジェネティックな理解. シンポジウム1「自閉症の神経科学的研究」. 第55回日本小児神経学会総会. Iichiko 総合文化センター(大分県・大分市)、2013.5.30.

【図書】(計7件)

- (1) Kubota T., Miyake K, Hirasawa T. Chapter: Current Understanding of Epigenomics and Epigenetics in Neurodevelopmental Disorders. In " Epigenomics and Epigenetics ". Intech (Open Access Publisher), 2014, ISBN 978-953-51-1363-8, edited by Christopher J. Payne.
- (2) Kubota T., Hirasawa T, Miyake K. Chapter 24: Mental disorders and Transgenerational Epigenetic

Inheritance. In " Transgenerational Epigenetics: Evidence and Debate ". Elsevier (Academic Press), pp. 343-354, 2014, ISBN 978-0-12-455944-3, edited by Trygve Tollefsbol.

- (3) 三宅邦夫、久保田健夫: レット症候群、脳科学辞典、理化学研究所脳科学総合研究センター、埼玉 (doi:10.14931/bsd.1320) (<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/レット症候群>).
- (4) 久保田健夫. 発達障害とエピジェネティクス-環境と遺伝子をつなぐ新しい見方. Year Book No.26 発達障害の進歩. 発達障害の幼児期からの支援(編集: 郷間英世), 診断と治療社, pp61-67, 2014
- (5) 久保田健夫. 三宅邦夫、平澤孝枝. エピジェネティクス、基本を教える. 遺伝子医学MOOK 別冊「いまさら聞けない遺伝子医学」(編集: 斎藤加代子、近藤恵里)、メディカルドウ(大阪)、pp91-98, 2014.
- (6) 久保田健夫. 三宅邦夫、平澤孝枝: 3. 精神神経疾患 エピジェネティクスと脳機能、メディカルドウ、大阪、pp164-170、2013
- (7) 久保田健夫. 第3部 疾患とエピジェネティクス. 9 先天性疾患、イラストで徹底理解するエピジェネティクスキーワード事典(編集: 牛島俊和、眞貝洋一)、羊土社、pp228-234、2013

【産業財産権】

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

【その他】

ホームページ

<http://www.epigenetmed.com/>

(研究代表者の所属機関の環境遺伝医学講座ホームページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 健夫 (KUBOTA, Takeo)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 70293511

(2) 研究分担者

豊田 敦 (TOYODA, Atsushi)

国立遺伝学研究所・生物遺伝資源情報総合センター・特任准教授

研究者番号: 10267495