

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15262

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた機能的疾患に対する剖検診断の試み

研究課題名(英文)Apply for induced pluripotent stem cells in forensic practice

研究代表者

中原 綾(NAKAHARA, Aya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：80719005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：法医剖検例における突然死例の法医剖検診断では、有意な所見が少なくないために死因の判断に苦慮することをしばしば経験する。これらの死因には致死性不整脈が含まれるものと考えられているが、病態の本質が機能的なものであるため、剖検診断は除外診断に頼ざるをえず、積極的診断は不可能とされてきた。ところで、人工多能性幹細胞(iPS細胞)は体細胞にリプログラミングを行うことで、最終的に心筋・肝細胞等へと分化を可能とする。今回、レノックス・ガストー症候群症例より、iPS細胞を作成した。今後、この細胞の多能性を確認後、心筋細胞・肝細胞等へ分化誘導を試みたい。

研究成果の概要(英文)：In forensic practice, it is very difficult to diagnose the cause of death such as fatal arrhythmia and metabolic disease. induced pluripotent stem (iPS) cells from fibroblast can differentiate cardiomyo-cell and hepatocyte. This means that forensic pathologist easily diagnose functional disease to check electrogram of cardiocyte and evaluate hepatocyte function. In this study, we made iPS cells from an case of Lennox-Gastaut syndrome. Actually, we collected skin tissue and cultured fibroblast from it. After culturing, iPS cells were developed. In future, we will check pluripotent of the cells and will differentiate cardiomyo-cell and hepatocyte.

研究分野：法医病理学

キーワード：多能性幹細胞 法医剖検症例 レノックス・ガストー症候群

1. 研究開始当初の背景

法医実務において致死性不整脈等の機能的疾患に対して、形態学をベースとする従来の法医診断学が無力であることはしばしば法医実務の場で痛感させられる。

本研究は、死体由来の細胞を iPS 化し、心筋・肝細胞等に分化可能させ、更には分化した細胞の電気生理学的機能や代謝機能を直接的に計測可能とすることを企図する。さらに、その成果によって、いままで不可能であった機能的疾患に基づく死に対して死因診断が可能となる。剖検診断に直接的な機能解析を導入することは今までほとんど試みられたことはない。従って、本研究成果の法医実務での活用は法医診断学においてエポックメイキングとなるものであり、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

法医剖検例における突然死例の法医剖検診断では、有意な所見が少なくないために死因の判断に苦慮することをしばしば経験する。これらの死因には致死性不整脈が含まれるものと考えられているが、病態の本質が機能的なものであるため、剖検診断は除外診断に頼ざるをえず、積極的診断は不可能とされてきた。

また、特に乳幼児例であるが、*Carnitine palmitoyl transferase II* 遺伝子の点突然変異に代表されるような脂肪肝等の特異的な病理所見を呈さない代謝疾患による突然死例の存在が知られている。さらに、向精神薬や覚醒剤等が影響する薬剤性誘発性の不整脈は個人差が存在することも知られている。

繰り返しになるが、これらは全て機能の変異による死亡であるので形態学をベースとする従来の法医剖検法ではその診断は不可能である。

ところで、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は体細胞にリプログラミングを行うことで、最終的に心筋・肝細胞等へと分化を可能とする。

法医剖検が対象とする死後の臓器からはこれら細胞を分離して電気生理学的・代謝機能を直接的に測定することはできない。申請者らは死体由来の線維芽細胞の培養を法医実務にて施行しており、この死体由来の線維芽細胞を iPS 化し心筋・肝細胞に分化可能であれば、電気生理学的・代謝機能等の細胞機能を直接的に計測できる。

このことは、今までの形態学的手法を基礎とした法医剖検診断に対して、機能を考慮した死因診断を可能とするという革命的な手段をもたらすこととなる。

本研究の予備的検討として動物モデルにて死後経過が数日程度経過した死体由来の線維芽細胞を培養し、引き続いて iPS 化を行い、iPS 細胞より心臓・肝臓に分化させたいと考えている。

つまり、死体から生きている心筋・肝細胞の入手が可能となる。

なお、死亡直後に心臓・肝臓を採取し、凍結保存並びに Primary 化を行いたい。

iPS 由来細胞と Primary 細胞の機能的比較、また、凍結保存した臓器との mRNA 発現状態等の分子生物学的比較を行うことによって、iPS 由来細胞が生前の細胞状態を反映していることを明らかにしたい。

さらに、申請期間内に実際の法医剖検例 (ヒト) より iPS 細胞の樹立を考える。

本研究は、死体由来細胞より iPS 由来細胞を確立し機能解析を行うことで、いままで不可能であった機能的疾患に基づく死に対して死因診断が可能となることに最大の特色を有するものである。

申請者らは死後数日の死体からの線維芽細胞樹立を日常的に行っているため、iPS 化を利用する本研究の実現性は極めて高いものと考えた。

剖検診断に直接的な機能解析を導入することは今までにほとんど試みられたことはなく、法医診断学においてエポックメイキングとなるものである。

申請者らは、次世代シーケンサー (NGS) を用いた遺伝子変異検出により、生前の診療情報が綿密な捜査によっても得られない剖検例において、機能的疾患、例えば Long QT syndrome のような致死性不整脈を誘引する疾病が存在し、このために突然死が生じたことと診断しうる症例があることを種々の学会で報告してきた (論文投稿中)。

しかし、現在報告されている致死的不整脈に関連する遺伝子は多種多様であり、法医剖検の特殊性、つまり、確かで詳細な病歴がほとんど得られないことを考えると、これら遺伝子を全て解析必須となり莫大な Sequence 量が必要となる。代謝疾患でも同様であり、例えば表現形として脂肪肝が認められたとしてもエネルギー産生に関わる膨大な数の遺伝子が対象となりうる。

従って、到底 NGS を使用して Target Sequence 法を用いたとしても、Sequence 精度の問題まで考慮すると遺伝性不整脈・代謝疾患を同時に網羅することはできない。

申請者らは法医実務に NGS を用いた網羅的遺伝子解析を施行しているが、Sequence を決定したとしても、検出される変異の殆どは病態と関連が不明な、つまり機能不明な SNP であり、そのデータ解釈に苦心している。つまり、生前の病態 (機能) を再現した何らかのより直接的な証明法が切望される。

復讐になるが、本研究は、死体からの iPS 由来細胞を確立することで、いままで不可能であった機能的疾患に基づく死に対して死因診断を可能とするものである。

現在までに死因診断に関して iPS 細胞を活用するという報告は全くなく、このアイディアは極めて斬新なものと自負している。さらに、心筋細胞での電気生理学的検討、肝細胞

を用いた代謝機能の測定といった死後であるにもかかわらず、死体由来の分化した生細胞の機能測定について主眼においた死因診断法の開発は殊の外チャレンジ性を有しているものと考えられる。

剖検例において致死性不整脈等の機能的疾患に対して形態学を基礎とする従来の法医診断学が無効であることをしばしば痛感する。本研究から得られる結果は、細胞機能について主眼を置くことで死者の生前の病態を明らかにすることで、突然死、特に不整脈発症や代謝性疾患の法医学的診断を容易にするものである。為に、本研究成果の応用は法医実務へ直接的に貢献可能である。

iPS 由来細胞によって分化した細胞、例えば心筋細胞は前記するように、電気生理学的な検討が可能となり、不整脈の診断が可能となる。更には、薬剤誘発性不整脈の診断も確信を持つことができる。このことは、薬剤誘導性不整脈の発症予防や治療に応用可能であり、法医剖検診断ばかりでなく、不整脈の臨床研究・医学にも貴重な研究になるものと考えられる。

また、現在行われている遺伝子解析は、エクソン領域を解析するために、エクソン両端のイントロン領域にプライマー設定が必要となり、イントロン領域も必然的に解析していることになり、非効率の極みであることを否定出来ない。しかし、iPS 由来細胞の樹立によって mRNA のみの配列、つまり、エクソン領域のみを対象とできることで迅速な解析が可能となり、この一点のみでも卓越した成果として期待できる。

3. 研究の方法

死後経過が数日程度経過したマウス死体由来の線維芽細胞を培養する。

引き続き iPS 化を行い、さらに、iPS 細胞より心臓・肝臓に分化させる。分化の確認は分子生物学的手法による mRNA 発現状態、免疫組織学的手法を用いる。

なお、死亡直後に心臓・肝臓を採取し、凍結保存並びに Primary 化を行う。

iPS 由来細胞と Primary 細胞との機能的比較（電気生理学的手法・薬理学的手法・代謝学的検討）また、iPS 由来細胞と凍結保存した臓器との mRNA 発現状態等の分子生物学的な比較を行う。

申請期間中に少なくとも実際の法医剖検例より iPS 細胞を樹立する。

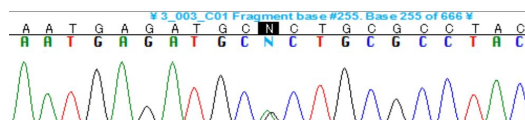
4. 研究成果

マウスモデルを用いて、死後に皮膚組織を採取し、線維芽細胞を培養したところ、死後 6 時間までは線維芽細胞の培養は可能であったが、この時間以降は培養することはできなかった。ヒト剖検例では、死後 3 日程度まで培養可能である。一般的に小動物では死体現象がヒトよりも極めて早期に出現すること

が知られており、この現象が細胞レベルでも生じており、線維芽細胞でも生じていることが疑われる。

ヒト資料では、主に乳幼児突然死症候群を対象に 28 例より線維芽細胞を培養・分離した。同時に、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子変異の有無をそれぞれの症例について検索した。

この中で、レノックス・ガストー症候群 or その類似タイプと診断された症例より、syntaxin binding protein 1 (STXBP1) に R551H をヘテロで検出し、サンガー法にて同変異を確認した（下図）。



この症例を対象に線維芽細胞より iPS 細胞を作成した。

現在、iPS 細胞は Oct3/4, Nanog, TRA1-60, TRA1-81 などの「未分化マーカー」と呼ばれるタンパク質を発現することから、培養した iPS 細胞が多能性を持っていることを確認するため、上記のような未分化マーカーの発現を qPCR 法や免疫染色法により、また Tra-60, Tra1-81 などの表面抗原を FACS 解析により確認しているところである。

今後、多能性を確認後、肝臓・心臓に分化させ、機能を確認したい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 綾 (NAKAHARA, Aya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
客員研究員
研究者番号：80719005

(2) 研究分担者

山本 琢磨 (YAMAMOTO, Takuma)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
講師
研究者番号：50634458

梅原 敬弘 (UMEHARA, Takahiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
講師
研究者番号：60617421

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
教授
研究者番号：80332857

坪井 貴司 (TSUBOI, Takashi)
東京大学・大学院総合研究科・准教授
研究者番号：80415231

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし