

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19712

研究課題名（和文）死後組織由来iPS細胞を活用した新たな剖検診断スキーム基盤体制の確立

研究課題名（英文）Establishment of induced pluripotent stem cells utilizing postmortem tissue derived following sudden death

研究代表者

山本 琢磨（Yamamoto, Takuma）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50634458

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：現状の死因究明は、死亡した状態から遡って生前に起こったであろう病因を推測することに頼っている。従って、真の死因究明には、死後から生前を再現し、時間軸に準拠した検討が不可欠である。本研究は死体からiPS細胞を樹立することで生前の不整脈・代謝疾患・痙攣などを証明することを目標とした。

原因不明のてんかんの既往があり、死後に遺伝子解析を行ったところSTXBP1遺伝子に変異が検出された小児突然死症例に対し、解剖時に線維芽細胞を培養したのち、iPS細胞を樹立した。予期せぬ突然死症例に対してのiPS細胞樹立は今回が初めてであり、死後に生前を再現するという、これまで法医学領域にはなかった新しい試みと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状の死因究明は、死亡した状態から遡って生前に起こったであろう病因を推測することに頼っている。死亡後の状態を見ているがため、死の「原因」なのか「結果」なのかを判断することが困難である。従って、生前を再現し時間軸に準拠した死因究明が不可欠である。つまり本研究の目的は、死後に生前を再現することである。死後にiPS細胞を樹立した報告はこれまでも複数発表されているが、いずれも神経疾患の病態解明のために、予め計画された段取りによって樹立されたものばかりで、予期せぬ突然死症例に対して、突然死の診断・原因究明目的で行われているものはなく、今回が初めての報告であった。

研究成果の概要（英文）：Recreating the conditions present in life at postmortem examination is the everlasting task in the field of forensic science. Although elucidating the mechanisms of sudden unexpected death requires analysis of living cells, acquisition of viable postmortem samples is generally impractical at autopsy, because of postmortem changes. The aim is to obtain living cells in the postmortem period and to enable in vitro revival of the lifetime conditions through the generation of iPSCs. Here, we report an autopsy case following the sudden unexpected death of an 8-year-old girl with Lennox-Gastaut syndrome, who turned out to have the R551H-mutant STXBP1 gene. We succeeded in generating iPSCs from fibroblasts cultured postmortem. This is the first report on the establishment of iPSCs from a child who died suddenly. Utilizing iPSC technologies in forensic science is expected to be an epoch-making approach and will pave the way for precise identification of the cause of sudden death.

研究分野：法医学

キーワード：Postmortem iPSC Sudden unexpected death forensic autopsy

1. 研究開始当初の背景

近年、「死因不明社会」が問題視され、死因究明の重要性が叫ばれている。本研究の目的は、法医学のみならず医療全体の課題である心肺停止症例・死亡発見症例の死因究明を行うことであり、死後に生前を再現することで、原因不明死の究明・予防を行うことである。

現状の死因究明は、特に突然死の場合、死亡した状態から遡って生前に起こったであろう病因を推測することに頼っている。肉眼解剖や病理検索といった従来の解剖手法に加え、近年は生化学的手法や放射線画像を導入しているものの、いずれも死亡後の状態を見ているがため、死の「原因」なのか「結果」なのかを判断することが困難である。従って、生前を再現することが不可欠である。

2. 研究の目的

これまで形態的变化に依存し、死後の状態でのみ生前を想像するしかなかった原因不明死症例の診断の問題点を改善することが最終目標である。具体的には、死体から iPS 細胞を樹立すること、さらに心臓や肝臓・神経細胞へと分化させることで生前の不整脈・代謝疾患・痙攣などを証明することが目標となる。

「突然死」という表現形で初めて認識された先天性の疾患が、生前にも存在していたことを証明するために、iPS 細胞の技術を用いて生前を再現する試みである。

3. 研究の方法

1) 網羅的遺伝子解析

解剖時に採取した血液より DNA を抽出後、既報に基づいて網羅的遺伝子解析を行った。検出された変異はフィルタリングを行い、原因遺伝子変異を抽出した。検出された変異と家系解析のために、必要に応じてサンガー法で確認を行った。

2) 皮膚線維芽細胞培養

解剖時に採取した皮膚組織より、既報に基づいて皮膚線維芽細胞の培養を行った。

3) iPS 細胞樹立

皮膚線維芽細胞より、既報に基づいて iPS 細胞の樹立を行った。樹立された iPS 細胞は、遺伝子変異の確認、STR 解析での同一性の確認、蛍光染色・フローサイトメトリー・qPCR によって多分化能の確認を行った。

4. 研究成果

STXBP1 遺伝子変異が検出された痙攣既往のある小児突然死症例

解剖時に採取した皮膚組織より皮膚線維芽細胞を培養することができた。さらにこの皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立することができた(図 1)。この iPS 細胞は、オリジナルの線維芽細胞と同じ STXBP1 遺伝子変異を有しており(図 2)、STR 解析によっても同一性が確認された。さらに、蛍光染色で TRA-1-60、TRA-1-813 マーカー陽性、フローサイトメトリーで SSEA4 の発現を確認(図 3)、qPCR で OCT4、NANOG 発現を確認したことで、多分化能を確認した。死後に iPS 細胞を樹立した報告はこれまでも複数発表されているが、いずれもアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患の病態解明のために、予め計画された段取りによって樹立されたものばかりで、予期せぬ突然死症例に対して、突然死の診断・原因究明目的で行われているものはなく、今回の樹立が初めてである。本成果は死後に生前を再現するという、これまで法医学領域にはなかった新しい試みと言える。

SCN5A 遺伝子変異が検出された若年性突然死症例

原因不明の若年性突然死症例を経験し、その原因究明の一環として網羅的遺伝子解析を行ったところ、Brugada 症候群や long QT 症候群の原因遺伝子である SCN5A 遺伝子の変異が検出された。遺伝子変異が検出されただけでは死亡の原因と確定することはできないため、病的意義の判断には機能解析や家族解析などの傍証が必要である。家族解析も行ったところ、家系内に変異を持つ患者の存在も確認されたため、今後は心電図検査等も行い、不整脈の有無を検討する予定である。

解剖時に皮膚線維芽細胞の培養は行っており、不整脈が検出された場合、この変異の病的意義

の有無もあわせて検討する必要があることから、上記同様、皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、心筋への分化を予定している。

<まとめ>

3年間の期間を通して、突然死症例から死後に iPS 細胞を樹立することができた。これは、原因不明のてんかんの既往があり、死後に遺伝子解析を行ったところ STXBP1 遺伝子に変異が検出された小児突然死症例の解剖例に対し、解剖時に線維芽細胞を培養したのち、iPS 細胞を樹立したものである。この試みは、法医学分野においては初の試みである。死後に iPS 細胞を樹立することが可能になったことで、生前の状態を再現することにつながると考えられる。死後から生前を再現し、時間軸に準拠した検討が可能になることで、より真実に近い時間経過での死因究明につながると考えられる。

一方で、一例の樹立に必要な時間・費用・体制は予想以上であり、予定数の症例を実施することができなかった。また、iPS 細胞樹立の先、各種細胞への分化も予定通りには実行できなかった。今後の課題としては、この手法を容易に実行可能なものとすることで実務応用可能なものとし、近い症例にはルーチンワークとなるよう継続して取り組みたい。

図 1

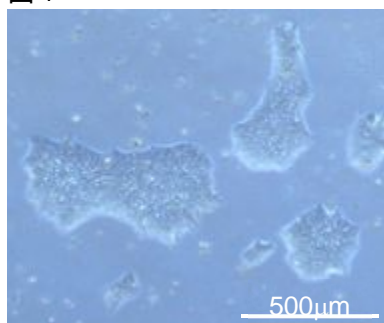


図 2

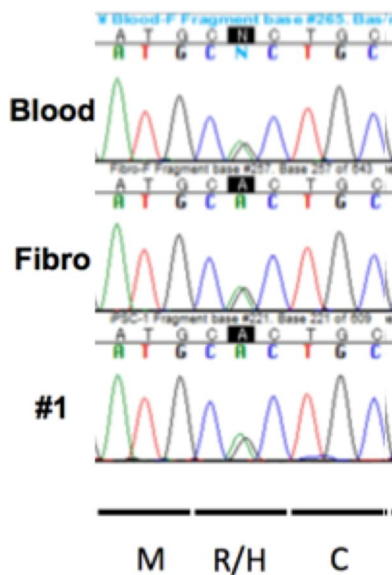
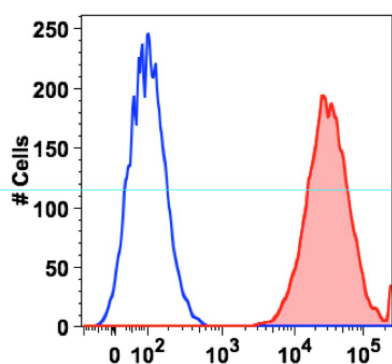


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto T, Otsu M, Okumura T, Horie Y, Ueno Y, Taniguchi H, Ohtaka M, Nakanishi M, Abe Y, Murase T, Umehara T, Ikematsu K	4. 巻 39
2. 論文標題 Generation of three induced pluripotent stem cell lines from postmortem tissue derived following sudden death of a young patient with STXBP1 mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 101485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2019.101485.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大津 真 (Otsu Makoto) (30361330)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	
研究分担者	梅原 敬弘 (Umehara Takahiro) (60617421)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教 (17301)	
研究分担者	池松 和哉 (Ikematsu Kazuya) (80332857)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授 (17301)	
研究分担者	西尾 元 (Nishio Hajime) (90253260)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三浦 綾 (Miura Aya) (90814814)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	
研究分担者	奥村 高志 (Okumura Takashi) (20449234)	東京大学・医科学研究所・特任研究員 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関