

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790977

研究課題名（和文） 幹細胞を用いたペルオキシソーム病の病因解明・治療法開発システムの確立

研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms of peroxisomal disorders using pluripotent stem cells

研究代表者

長瀬 朋子（NAGASE TOMOKO）

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：20397326

研究成果の概要（和文）：

発生初期におけるペルオキシソームの関与を明らかにし病態解明につなげるべく、マウス胚性幹細胞(mES 細胞)ならびにヒト多能性幹細胞(iPS 細胞)を用いて神経分化実験を行った。mES 細胞から分化させた神経系細胞において、神経前駆細胞および乏突起膠細胞前駆細胞では catalase の顆粒状染色像が乏しかった。正常ヒトならびにペルオキシソーム病患者の皮膚線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を用いて神経分化実験を行ったところ、nestin 陽性の神経幹細胞への分化効率に関して明らかな差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the involvements of peroxisome during early developmental stage and obtain some clues as to the underlying cause of peroxisome biogenesis disorders (PBDs), we performed neural differentiation studies using mouse embryonic stem (mES) cells and human induced pluripotent stem (iPS) cells. Few punctate staining patterns of catalase were observed in neural precursor cells and oligodendrocyte precursor cells differentiated from mES cells. Furthermore, we established iPS cells from fibroblasts derived from PBD patients, and performed neural differentiation studies using SDIA method. There is no obvious difference in efficiency of neural differentiation between a normal healthy individual and PBD patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームはすべての真核細胞に存在する細胞内小器官であり、過酸化水素分解、極長鎖脂肪酸分解、プラスマローゲン合

成、胆汁酸合成などに関与している。

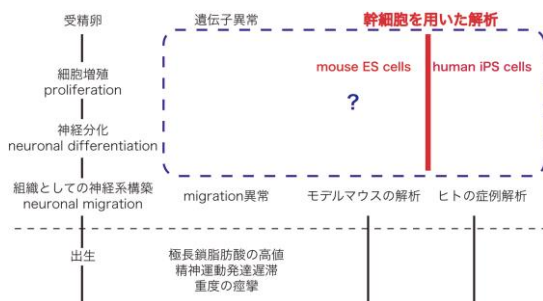
1980年代に Zellweger 症候群（脳肝腎症候群）の患者細胞においてペルオキシソームが欠損していることが発見され、同時に同疾

患ではペルオキシソームの複数の代謝型異常が見られることが証明されてきている。

ペルオキシソーム欠損症は、周知の如く生後早期からけいれんや筋緊張低下など重篤な神経症状を呈する疾患である。ペルオキシソーム病の患者では中枢神経の脱髄性的変化や大脳皮質の層構造異常などの特徴的な病理組織学的病態を示しており、ペルオキシソームが中枢神経の発生・発達機構において非常に重要な役割を果たしていることが予想されている。しかし、現在までに 13 種の病因遺伝子が同定されているものの、その病態に至る機序に関しては未だにほとんど明らかにされていない。

先天性神経疾患の病態形成に至るメカニズムの解析には、生後発達期の解析だけでなく、神経細胞として分化し組織構築が行われる胚発生段階における遺伝子・タンパクレベルでの解析が重要であると考えられる。しかし、これまでのペルオキシソーム病モデルマウス (PEX5: Baes et al. Nat Genet. 1997) (PEX2: Faust et al. J Cell Biol. 1997) を用いた報告を見る限り、組織学的検討においてヒトと同様の組織学的異常が見られたという記載はみられるものの、遺伝子異常が形態異常に及ぼす分子メカニズムに関しては未だに十分な検討が行われていない。この理由として、胚発生段階において *in vivo* で詳細な解析を行うのは、胚自体が小さく取扱困難であり、また十分な数の細胞を確保するのも困難であることが考えられる。

最近、多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) に関する研究が大変注目を集めている。特に再生医療領域においてこれらから分化させた細胞あるいは組織を用いた移植医療や薬剤スクリーニングへの応用が期待されているが、初期発生メカニズムの研究という基礎的な領域においても重要なツールとして認識されている。そこで、初期発生段階におけるペルオキシソームの関与について詳細な検討および機能の解析を可能とするためには、幹細胞を用いた *in vitro* での実験系の構築が重要と考えられた。



2. 研究の目的

本研究において ES 細胞、および iPS 細胞から神経系細胞への分化におけるペルオキシソーム形成遺伝子の発現、およびペルオキシソームタンパクの発現を明らかにする。さらに、神経分化に関わる他の転写因子やタンパク発現との相互作用・関連性を明らかにし、神経系発生機構におけるペルオキシソームの関与を示し、難治性神経疾患の病因解析・治療法開発システムの確立を目指す。

3. 研究の方法

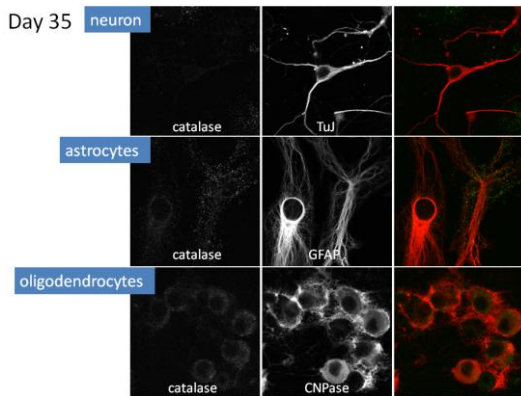
(1) マウス ES 細胞から浮遊培養法にて spheroid を形成させ、その後 spheroid を分散し各種増殖因子を添加し神経系細胞へ分化誘導した。免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。なお、ペルオキシソームのマーカーとして catalase および Pex14p、ニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトそれぞれのマーカーとして TuJ・GFAP・CNPase に対する抗体を使用した。

(2) 当大学医学部倫理審査委員会の承認を経て、患者皮膚線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を行った。京都大学山中らの報告 (Takahashi et al. Nature 2001) に基づき、皮膚線維芽細胞 Oct3, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 遺伝子を導入し、SNL 細胞上で培養した。樹立した細胞は SNL feeder 上で維持培養した。2 種の相補性群、B 群と E 群の細胞から 7 クローンずつ iPS 細胞を樹立、各種未分化マーカー発現確認および分化実験を行い、iPS 細胞としての評価を行った。

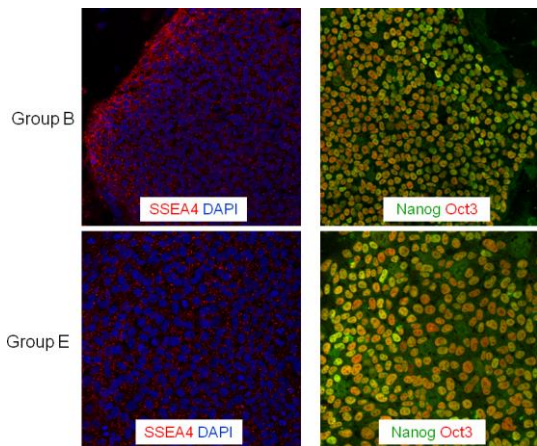
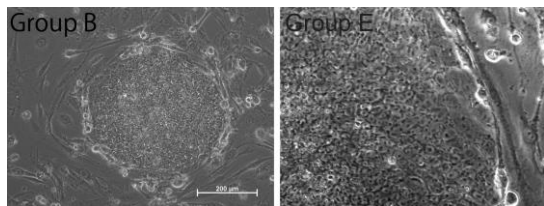
(3) 樹立した iPS 細胞を用いて、神経分化実験を PA6 と共培養を行う SDIA 法にて行った。Day21 に 4%PFA にて固定し、蛍光抗体染色にて神経幹細胞マーカーである nestin およびニューロンマーカーである TuJ の発現を検出した。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞をニューロン、グリア、オリゴデンドロサイトが混在した population として分化誘導することができた。ES 細胞および初期神経マーカーである nestin 陽性の細胞では鮮明な catalase 陽性顆粒の染色像が認められた。しかし分化が進んだ状態であるニューロンおよびオリゴデンドロサイトでは不明瞭、アストロサイトでは、catalase 陽性顆粒は認められるもののその染色像に多様性が認められた。



(2) 患者細胞由来 iPS 細胞においても正常細胞由来 iPS 細胞と同様に各種未分化マーカーの発現が確認でき、3 胚葉系への分化能を in vitro で確認できた。しかし疾患群によって iPS 細胞の維持培養の容易さに差が認められた。B 群では正常細胞由来 iPS 細胞よりも増殖が遅い傾向があった。また、E 群ではコンフルエントに近くなると死滅しやすく非常に維持培養が困難であった。

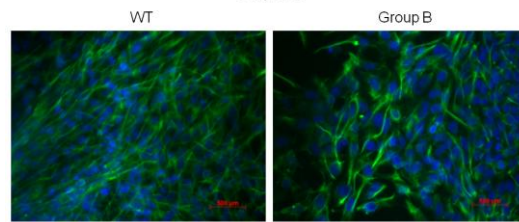


(3) 神経分化条件での培養開始後、正常ヒト細胞由来、患者皮膚細胞由来ともに、nestin positive の細胞が認められたが、Tuj positive の細胞はどちらにおいても認められなかった。今回実験に使用したクローンにおいては、神経幹細胞への分化効率に明らかな差は認められなかった。

Neural differentiation on PA6 cells

(SDIA method)

Day 21



nestin (early neural marker) positive cells

今後の課題として、同一相補性群の他のクローンにおける実態もふまえた検証を重ねるとともに、今回樹立を行った相補性群とは異なる相補性群からも iPS 細胞を樹立し、さらなる解析を進めることによって分子メカニズムと多様な病態との関連を明らかにしていくことが望まれる。神経分化法に関しては様々な実施例が報告されているが、細胞内のペルオキシソームタンパクの局在や遺伝子発現、さらにはニューロンやグリアなどのより分化の進んだ細胞について検討していくためには、より各々の解析に使いやすい神経分化方法を選択・検証していくことが重要である。

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 3 件)

① 長瀬朋子、玉置也剛、梶原尚美、本田綾子、小澤祥、柴田敏之、國貞隆弘、下澤伸行、ES 細胞からの分化系を用いたペルオキシソーム病の病態解明の試み、第 51 回日本先天代謝異常学会総会、2009 年 11 月 7 日、京王プラザホテル(東京都)

② 長瀬朋子、玉置也剛、梶原尚美、本田綾子、小澤祥、柴田敏之、國貞隆弘、下澤伸行、ペルオキシソーム病患者皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞樹立、第 52 回日本先天代謝異常学会総会、2010 年 10 月 21 日、大阪国際会議場(大阪府)

③ 長瀬朋子、玉置也剛、柴田敏之、國貞隆弘、鈴木康之、下澤伸行、iPS 細胞を用いたペルオキシソーム病神経系モデル構築の試み、第 53 回日本先天代謝異常学会総会、2011 年 11 月 25 日、ホテルニューオータニ幕張(東京都)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長瀬 朋子 (NAGASE TOMOKO)
岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教
研究者番号：20397326

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし