

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791002

研究課題名（和文） iPS細胞を用いたPelizaeus-Merzbacher病の病態解明研究

研究課題名（英文） Pathological analysis of Pelizaeus-Merzbacher Disease using human iPSCs derived oligodendrocytes.

研究代表者

沼澤 佑子 (NUMASAWA YUKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00571978

研究成果の概要（和文）：

Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD)は PLP1 遺伝子異常により生じる先天性大脳白質形成不全症。ミスセンス変異を有する PMD 患者 2 例より iPS 細胞を樹立しオリゴデンドロサイトを分化誘導させ病態解析を行った。変異 PLP1 タンパクの局在変化、アポトーシス細胞の増加、ストレス感受性の増大、髄鞘低形成を認め PMD の病態に小胞体ストレスの関与が示唆された。この疾患 iPS 細胞由来オリゴデンドロサイトを用いた解析方法は髄鞘形成不全モデルとして有用であることを初めて示した。

研究成果の概要（英文）：

Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) is an X-linked leukodystrophy caused by mutations of *Proteolipid protein 1 (PLP1)* gene. We established patient specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) from two PMD patients with missense point mutation, and differentiated them into oligodendrocytes. We confirmed abnormal mislocalization of mutant PLP1 proteins and increase in ER stress and apoptotic cells and immature myelin formation. We showed the usefulness of iPSC-derived mature oligodendrocytes for the analysis of pathogenic process of dysmyelinating neurological disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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

Pelizaesus-Merzbacher 病 (PMD) がある。PMD とは X 染色体劣性遺伝形式を示し、proteolipid protein1 (PLP1) 遺伝子の異常により発症する先天性髄鞘形成不全である。変異型により臨床症状に幅があるが基本的には幼少時より重度な発達遅滞・四肢痙性麻痺・失調・難聴などを呈し10-20代で死亡の転帰となる予後不良な疾患であり特異的治療法は存在しない。(Hudson LD et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989)。最重症の表現型を示すミスセンス変異の病態として、セルラインやモデルマウスを用いた研究より小胞体ストレス反応の関与が示唆されている。しかしこの点について患者自身の細胞で研究されたものはなく、これらの現象が実際にヒトの細胞でも生じているのかは議論の余地がある。

2007年に京都大学の山中らが発表したiPS細胞は、胚性幹 (ES) 細胞と同様にほぼ無限に増殖する自己複製能と多分化能をもつ。患者自身の体細胞から樹立するため、ES細胞で問題となっていた倫理的問題や拒絶反応がなく幹細胞移植などの治療応用としても期待されている。神経変性疾患の場合、感受性細胞が存在する脳組織を患者より直接採取することは困難であり研究が発展しづらい要因のひとつであった。このiPS細胞を用いることで理論的にはヒト疾患患者自身の神経系細胞を用いた研究が可能となった。

2. 研究の目的

本研究ではヒト疾患特異的iPS細胞を用いて実際のヒト患者の細胞での病態解明を行う。ヒトiPS細胞由来のオリゴデンドロサイトが髄鞘形成不全症のモデルとして適切であるかを検討し、将来的に薬剤検討へ使用できる可能性について論じることを目標とする。

3. 研究の方法

Pelizaesus-Merzbacher病患者からiPS細胞を樹立し、疾患感受性細胞であるオリゴデンドロサイトを分化誘導させ、分化誘導効率、細胞形態、変異タンパクの局在、アポトーシス細胞数評価、髄鞘形態、また近年関与が示唆されている小胞体ストレスに関して表現型解析を行う。

4. 研究成果

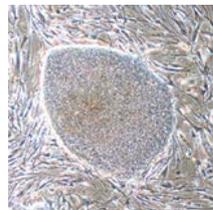
(1) iPS細胞の樹立

- ① iPS細胞の樹立 (2008年5月26日当施設の倫理委員会でiPS細胞作成は承認済)
iPS細胞の樹立は山中研究室の原法 (Takahashi et al, *Cell*, 2007) を用いた。皮膚線維芽細胞にレトロウイルスを用いて転写因子 (Sox2, Klf4, Oct3/4, c-myc) を

遺伝子導入し、これまでに疾患3症例 (ミスセンス変異2症例、重複型1症例) のiPS細胞樹立した。

② iPS細胞クローンの選別

樹立されたiPS細胞はクローン毎に性質が異なるため、以下の指標を用いて解析に用いるクローンの選択を行った。iPS細胞形態、導入遺伝子の低発現のクローンを選択後、当研究室で確立されている胚様体 (以下 EB) を介した神経幹細胞への分化誘導法を用いて、EB形成効率・EB誘導時の導入遺伝子の低発現、神経幹細胞マーカー (SOX1) 高発現、neurosphere形成高効率を参考に各3クローンを選択した。また、選択したクローンについては品質確認 (未分化マーカーの発現、テラトーマ形成能、染色体解析など) を行った。

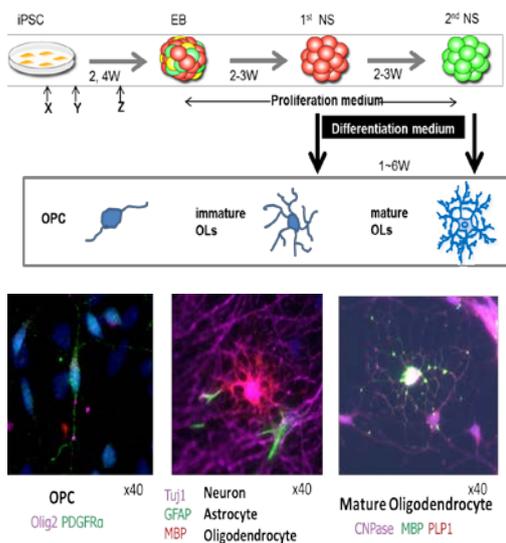


③ 選別したクローンの遺伝子型の確認

選別したiPS細胞クローンの遺伝子型が線維芽細胞と同様の遺伝子型を有することを確認した。

左図：患者iPS細胞

(2) オリゴデンドロサイトへの分化誘導
Pelizaesus-Merzbacher病はオリゴデンドロサイト・髄鞘に異常を認めることが特徴であるため、解析にはiPS細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導法の確立が前提となる。哺乳類中枢神経に存在する神経幹細胞は時系列に沿って初期には神経細胞のみを生み出し、中期以降になるとグリア細胞を生み出すようになるため (Temple S, *Nature*, 2001)、in vitroでのオリゴデンドロサイト誘導には約3か月程度の長時間を要するとされている。本研究ではヒトES細胞 (H9) からOligodendrocyte progenitor cells (OPCs) を分化させた分化誘導法 (Bao-Yang Hu et al, *Development*, 2009) をもとに誘導を行っていたがOPCへの分化は極わずかでありオリゴデンドロサイトへの誘導は不可能であった。ES細胞やiPS細胞ではクローンにより分化指向性が異なるため (Kim DS et al., *Stem cell rev*, 2010) どのラインでもあるオリゴデンドロサイトを分化させる誘導系の確立が必要であった。そこで各種培養条件の検討を重ねた結果、多くのラインより一定の数のオリゴデンドロサイトの誘導法の確立に成功した (下図)。



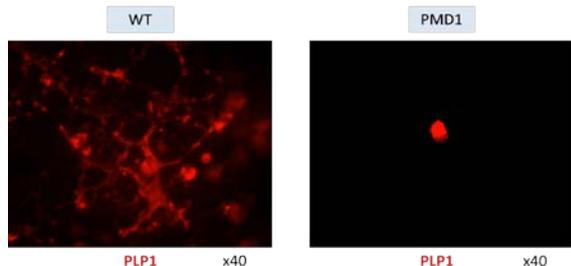
(3) 表現型解析

①オリゴデンドロサイト分化誘導

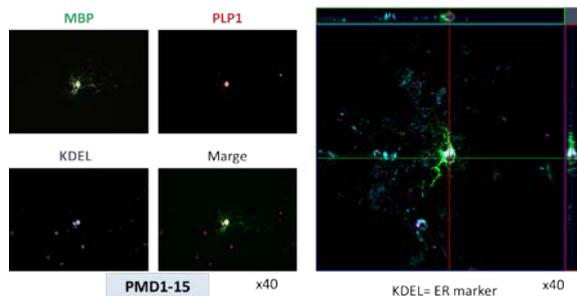
コントロール、PMD 由来の iPS 細胞全てのラインから 3 系統のオリゴデンドロサイト、つまり Oligodendrocyte progenitor cell (OPC) , immature oligodendrocyte (im-OL), mature oligodendrocyte (mat-OL) へ分化した。

②PLP1 タンパクの局在の検討

コントロール由来の細胞とミスセンス変異患者由来の mature oligodendrocyte にて、PLP1 染色を行ったところ、患者由来のオリゴデンドロサイトでは PLP1 変異タンパクの局在変化が認められた (下図)。

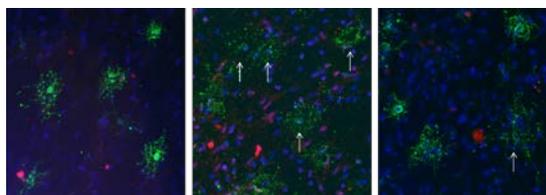


また、全ての変異 PLP1 タンパクはオリゴデンドロサイトの小胞体内 (KDEL マーカー) に留まっていることを確認した。これは既存のセルライン (Gow A et al., J Neurosci. 1997) やモデルマウス (Gow A et al., J Cell Biol. 1998) での報告と一致する結果であった。

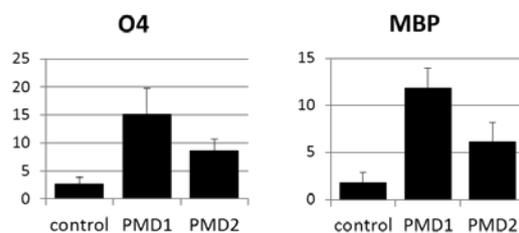


③アポトーシス細胞数の検討

コントロール由来のオリゴデンドロサイトの突起は一様に途切れることなく伸びているが、患者由来のものでは途切れた突起が多く認められ、アポトーシスなどによる突起の断片化が示唆された。

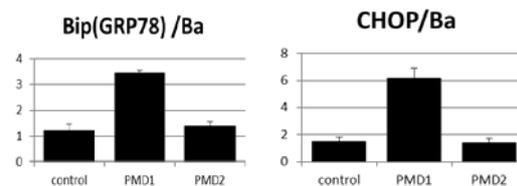


アポトーシスマーカー Cleaved caspase3 を用いてアポトーシス細胞数を検討したところ、患者由来の immature OL と mature OL では有意な増加を認めた。

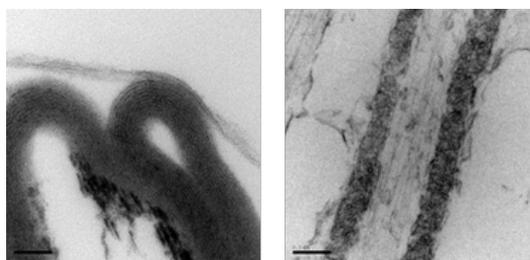


④小胞体ストレスの検討

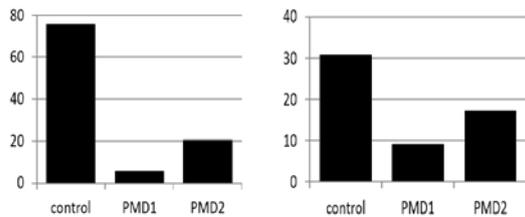
小胞体ストレスの関与を検討する目的で小胞体ストレス誘導薬である tunicamycin を負荷した群/負荷なし群で比較したところ、PMD1 においてストレスへの高い感受性を認めた。



⑤髄鞘形成の検討



今回確立した誘導法を用いて分化させたオリゴデンドロサイトは vitro で髄鞘を形成することのできる細胞である (上図)。電子顕微鏡解析より、PMD 由来の細胞においては、髄鞘形成効率の低下 (左下)、ミエリンラメラの数の減少 (右下) が認められた。



この研究により、ヒト患者由来の細胞で初めてミスセンス変異型 PMD の病態の一部（オリゴデンドロサイトへ一旦分化するものの ER ストレスに惹起されるアポトーシスにより髄鞘形成不全へ至る）を示すことができた。ヒト iPS 細胞から誘導したオリゴデンドロサイトの疾患モデルは、先天性髄鞘形成不全のモデルとなりうることを示したと同時に、改善を要する点はあるものの、将来的には疾患感受性細胞の表現型を軽減するような薬剤探索に用いることが可能な手法といえる。

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 2 件）

1. Yuko Kuroiwa-Numasawa, Yohei Okada, Shinsuke Shibata, Hideyuki Okano
Neuro2013(第 36 回日本神経科学大会)
先天性髄鞘形成不全症 iPS 細胞由来オリゴデンドロサイトを用いた病態解析
6/21/2013
京都
2. Yuko Kuroiwa, Yohei Okada, Shinsuke Shibata, Hideyuki Okano
Modeling of dysmyelinating neurological disorders using human iPSC-derived nature oligodendrocytes
CiRA symposium 2013
3/11/2013
Kyoto, Japan
→Excellent poster award 受賞

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（計 0 件）

〔その他〕 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒岩 佑子 (KUROIWA YUKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00571978