

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591521

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた小児神経伝達物質病モデルの創出

研究課題名(英文) Modelling childhood neurotransmitter diseases using iPSCs

研究代表者

濱崎 考史 (Hamazaki, Takashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40619798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児神経伝達物質病は、シナプスでの神経伝達物質の異常によって起こる遺伝性疾患群である。当教室が中心として行ってきた全国疫学調査により、臨床症状および臨床検査所見が明らかとなってきた。従来の血液検査、髄液検査等では、神経症状の病態を説明できない症例も存在している。また、個々に希少疾患であるため、体系的な治療法の開発手段は存在しない。今回、小児神経伝達物質病患者由来iPS細胞を樹立し、神経系細胞へ分化することで、細胞レベルでの病態の解明を目指した。患者由来iPS細胞からの神経分化誘導を行い、細胞レベルでの機能解析、増殖能、神経突起をリアルタイムで解析し病態を解明する系を確立できた。

研究成果の概要(英文)：Childhood neurotransmitter diseases are genetic syndromes caused by dysfunctional synapsis. Based on our national survey for these diseases, clinical phenotype and laboratory profiles have been illustrated. Conventional laboratory testing for blood and cerebrospinal fluid, however, could not explain pathogenesis of neurological symptoms. Because each of the disease is extremely rare, there is no systematic approach to develop novel treatment. Here we aimed to establish model system by using patient derived iPSCs to elucidate molecular mechanisms for this devastating neurological phenotypes. As the results, we were able to established disease-specific iPSCs and successfully differentiated into neurons. Furthermore, we examined pathogenesis of the disease at cellular and molecular level.

研究分野：小児科学

キーワード：iPS細胞 神経疾患 代謝性疾患 希少疾患

### 1. 研究開始当初の背景

小児神経伝達物質病はシナプスでの情報伝達を担う神経伝達物質の異常によって起こる遺伝性疾患群である。小児神経伝達物質病には、瀬川病、チロシン水酸化酵素(TH)欠損症、セピアプテリン還元酵素(SR)欠損症、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症などのドーパミン/セロトニン代謝系の疾患とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素(SSADH)欠損症、GABA トランスポーター欠損症などの GABA 代謝系疾患などが含まれる。いずれも中枢神経系に症状があり小児神経疾患として取り扱われているが、病因は神経伝達物質の代謝異常症であり早期に適切な診断と治療が必要である。しかし個々に希少疾患であるため、適切に診断されず、有効な治療を受けられない状況にあった。

### 2. 研究の目的

小児神経伝達物質病は、シナプスでの神経伝達物質の異常によって起こる遺伝性疾患群である。当教室が中心として行ってきた全国疫学調査により、臨床症状および臨床検査所見が明らかとなってきた。従来の血液検査、髄液検査等では、神経症状の病態を説明できない症例も存在している。また、個々に希少疾患であるため、体系的な治療法の開発手段は存在しない。今回、小児神経伝達物質病患者由来 iPS 細胞を樹立し、神経系細胞へ分化することで、細胞レベルでの病態の解明を目指す。また、希少疾患に対するファーストトラックの治療薬を開発するシステムの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 健常者 iPS 細胞を神経細胞に分化誘導し、神経伝達物質代謝活性を測定する。

(2) 小児神経伝達物質病患者由来の細胞から疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。

iPS 細胞の樹立は、皮膚生検より得られる線維芽細胞に対して、Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc の遺伝子をレトロウィルスベクターを用いて導入した。

iPS 細胞クローン間で、分化能などのバラツキが予想されるため、少なくとも 1 患者につき 3 クローンを樹立する。iPS 細胞の特異的なマーカー遺伝子の発現、外来遺伝子の不活化、染色体異常の有無も確認を行った。

### 4. 研究成果

(1) 健常者由来の iPS 細胞からの分化誘導を行い、神経伝達物質合成経路で必須な補酵素のプテリジンの生成過程を HPLC を用いて測定する系を確立し、病態解明に必要なモデルを構築した。

(2) 全国から、希少な難治性疾患の検体の提

供を受け、iPS 細胞を樹立、バンキングを行った。

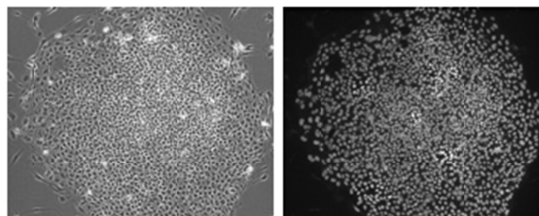


図1 代表研究者が患者から樹立したiPS細胞。位相差顕微鏡画像(左)、免疫蛍光組織染色法にてNanog蛋白発現を確認している(右)倍率:100倍

(3) 患者由来 iPS 細胞を樹立し、神経系細胞へ分化することで、細胞レベルでの病態の解明を目指す。今年度は、iPS 細胞からの神経分化誘導を行い、細胞レベルでの機能解析、増殖能、神経突起をリアルタイムで解析し病態を解明する系を確立できた。

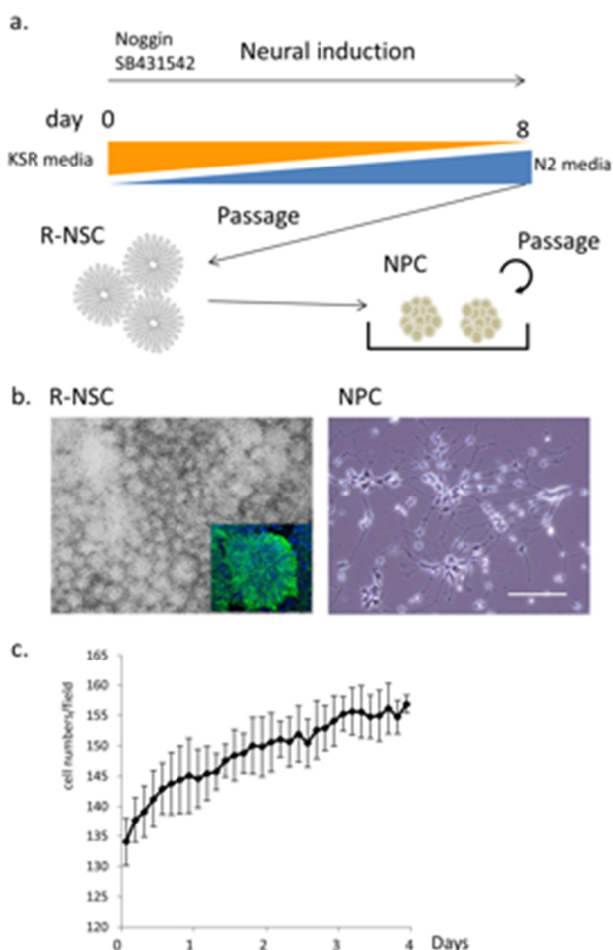


図2 患者iPS細胞から神経機能解析をおこなった分化プロトコール(a)。10日以内に効率的にロゼッタ形成神経幹細胞へ誘導(R-NSC)し、さらにニューロン(NPC)へと分化させた。神経突起をタイムラップ顕微鏡で自動で計測した(c)。

(4) 変異による影響を細胞レベルで解析するため、さまざまな培養条件下での細胞増殖能、代謝産物の解析を行った。ガスクロマトグラフィー・質量分析法を用いたメタボローム解析を行ったところ、未分化 iPS 細胞において、ピルビン酸、リンゴ酸、パルミチン酸、ステアリン酸、乳酸の上昇が認められた。さらにこれらの iPS 細胞から神経細胞へ分化誘導し、異常を詳細に検討したところ、ドーパミン神経への分化誘導の障害が起こることを突き止め現在報告中である。さらなる解析により病態に即した治療法の開発を目指している。

## 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5件)

Hattori T, Hamazaki T, Kudo S, Shintaku H. Metabolic signature of MELAS/Leigh overlap syndrome in patient-specific induced pluripotent stem cells model. Osaka City University Journal in press. 査読有

Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. Lab Invest. 2015 Jan;95(1):4-13. DOI10.1038/labinvest.2014.104 査読有

Ninomiya E, Hattori T, Toyoda M, Umezawa A, Hamazaki T, Shintaku H. Glucocorticoids promote neural progenitor cell proliferation derived from human induced pluripotent stem cells. Springerplus 2014 3(527) DOI 10.1186/2193-1801-3-527 査読有

Shintaku H, Ohura T. Sapropterin is safe and effective in patients less than 4-years-old with BH4-responsive phenylalanine hydrolase deficiency. J Pediatr. 2014 Dec;165(6):1241-4. DOI 10.1016/j.jpeds.2014.08.003 査読有

濱崎考史、寺田直弘  
患者から学び患者に還元する、疾患 iPS 細胞研究の新展開  
実験医学 Vol. 30 No. 10(増刊) 2012 p1683-1687  
査読無

〔図書〕(計9件)

濱崎考史、新宅治夫

セピアプテリン還元酵素欠損症：別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ 先天代謝異常症候群 No19.  
P312-315、2012 日本臨牀社 総ページ 691

新宅治夫：高フェニルアラニン血症、遠藤文夫(編) 先天代謝異常症ハンドブック、中山書店、東京、(440) 22-23、2013

新宅治夫：テトラヒドロピオプテリン(BH4) 欠乏症、遠藤文夫(編) 先天代謝異常症ハンドブック、中山書店、東京、(440) 24-27、2013

新宅治夫：瀬川病(GTP シクロヒドロラーゼI 欠損症)、遠藤文夫(編) 先天代謝異常症ハンドブック、中山書店、東京、(440) 350-351、2013

新宅治夫：チロシン水酸化酵素欠損症、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素欠損症、遠藤文夫(編) 先天代謝異常症ハンドブック、中山書店、東京、(440) 352-353、2013

新宅治夫：モノアミン酸化酵素(MAO) 欠損症、遠藤文夫(編) 先天代謝異常症ハンドブック、中山書店、東京、(440) 354-355、2013

新宅治夫：ドーパミン 水酸化酵素(DBH) 欠損症、遠藤文夫(編) 先天代謝異常症ハンドブック、中山書店、東京、(440) 356-357、2013

新宅治夫：SSADH 欠損症、GABAT 欠損症、遠藤文夫(編) 先天代謝異常症ハンドブック、中山書店、東京、(440) 358-359、2013

濱崎考史：新生児マススクリーニング対象疾患診療ガイドライン 2015 日本先天代謝異常学会(編)、東京医学社 232(8-16) 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱崎 考史 (HAMAZAKI, Takashi)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：40619798

### (2) 研究分担者

新宅 治夫 (SHINTAKU, Haruo)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：00206319

### (3) 連携研究者

梅澤 明弘(UMEZAWA, Akihiro)  
独立行政法人国立成育医療センター・細胞医

療研究部・再生医療センター長

研究者番号： 70213486

(4)連携研究者

豊田 雅士 (TOYODA, Masashi)

東京都健康長寿医療センター研究所・老年病

態研究チーム・副部長

研究者番号： 50392486