

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07821

研究課題名(和文) 小児後天性脱髄性疾患に対するオーダーメイド治療の遺伝学的基盤の確立

研究課題名(英文) Establishing the genetic basis for tailor-made treatment of pediatric acquired demyelinating syndrome

研究代表者

石崎 義人 (Ishizaki, Yoshito)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：20572944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児の急性脳炎・脳症は、発症まで健康に過ごしていた児に重篤な後遺症を残すことが多く、患児のみならず家族への心理的社会的影響も大きい。疫学調査は行われているが病態解明が不十分であり、特異的な治療法も開発されていない。本研究では急性散在性脳脊髄炎、多発性硬化症、および視神経脊髄炎を中心とした後天性脱髄性症候群に焦点を絞り、臨床情報とエキソーム解析による遺伝的情報を組み合わせ、小児ADSの最適なオーダーメイド治療のための情報基盤の作成と、多能性幹細胞由来神経細胞およびグリア細胞を用いて病態解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後天的な中枢神経系の炎症性脱髄を特徴とする神経疾患の総称であり、急性散在性脳脊髄炎、多発性硬化症、視神経脊髄炎を含む概念である。疫学調査の情報によると我が国の小児ADEMの推定罹患率は小児10万人当たり年間0.40人、小児MSの発症頻度は小児10万人当たり0.69人、NMOの発症頻度は小児10万人当たり0.06人であり、その発症には遺伝的因子が関与する。iPSCから神経細胞への分化し培養することができた。

研究成果の概要(英文)：Acute encephalitis / encephalopathy in children often leaves serious sequelae in children who have been healthy until the onset, and has a great psychological and social impact not only on the affected children but also on their families. Epidemiological studies have been conducted, but the pathophysiology has not been elucidated, and no specific treatment has been developed. This study focuses on acquired demyelinating syndromes centered on acute disseminated encephalomyelitis, multiple sclerosis, and neuromyelitis optica, and combines clinical information with genetic information from exome analysis to optimize pediatric ADS. We created an information infrastructure for custom-made treatment and elucidated the pathophysiology using pluripotent stem cell-derived neurons and glial cells.

研究分野：小児神経

キーワード：後天性脱髄症候群 エキソーム解析 iPSC細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児の急性脳炎・脳症は、発症まで健康に過ごしていた児に重篤な後遺症を残すことが多く、患児のみならず家族への心理的社会的影響も大きい。疫学調査は行われているが病態解明が不十分であり、特異的な治療法も開発されていない。本研究では急性脳炎・脳症の中で二次性脳炎である急性散在性脳脊髄炎 (Acute disseminated Encephalomyelitis: ADEM)、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) および視神経脊髄炎 (Neuromyelitis Optica: NMO) を中心とした後天性脱髄性症候群 (Acquired Demyelinating Syndrome: ADS) に焦点を絞り、臨床情報とエキソーム解析による遺伝的情報を組み合わせ、小児 ADS の最適なオーダーメイド治療のための情報基盤の作成と、多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: 以下 iPSC) 由来神経細胞およびグリア細胞を用いて病態解明を行う。

小児急性脳炎・脳症は感染症を契機に急性の脳障害 (発熱、けいれん、意識障害) を呈する症候群で日本では年間 400 - 700 例の発症と推測されている (水口ら、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業報告書 2010)。病態は均一ではなく治療法も確立していないため、一部の症例では死亡および重篤な後遺症を残す一方、後遺症なく退院したと思われる場合でも、成長後に軽度の知的障害が明らかになることがあり、後遺症を軽減させる治療法の確立が望まれている。

急性脳炎脳症は病態から一次性と二次性に分類され、二次性脳炎の代表が後天性脱髄症候群 (Acquired Demyelination Syndrome: ADS) である。後天的な中枢神経系の炎症性脱髄を特徴とする神経疾患の総称であり、急性散在性脳脊髄炎 (ADEM)、多発性硬化症 (MS)、視神経脊髄炎 (NMO) を含む概念である。我々は、我が国の小児 ADS の実態を明らかにするために日本小児免疫性脳炎研究グループ (事務局: 石崎義人) の協力のもとに全国調査を実施し臨床像を報告した (Yamaguchi et al, Neurology 2016)。我が国の小児 ADEM の推定罹患率は小児 10 万人当たり年間 0.40 人、小児 MS の発症頻度は小児 10 万人当たり 0.69 人、NMO の発症頻度は小児 10 万人当たり 0.06 人であり、その発症には遺伝的因子が関与する。単相性の経過である ADEM と、慢性の経過をたどり後遺症を残す MS および NMO を鑑別することは治療に際して重要であるが、我々は小児初回脱髄事象診断アルゴリズムを作成して報告した (石崎ら、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業報告書 2015)。MS、NMO の診断後の治療については、成人領域のガイドラインを参考にインターフェロンや副腎皮質ステロイドを使用するが、小児であり副作用の点からシクロフォスファミドやメトトレキサートは使用が制限され、成人領域で報告のあるグラチラマー酢酸塩、フィンゴリモド、ナタリズマブについて症例ごとに検討し使用しているのが実情である。小児 ADS の発症および治療反応性を規定する因子について、遺伝的因子も含めて明らかにすることが求められている。

小児炎症性腸疾患では発症が低年齢の場合には、免疫異常を引き起こす遺伝子変異が認められると報告されているが、小児 ADS については数例の症例報告がみられるだけであり、多数例の遺伝子解析の報告はない。また、末梢神経での髄鞘化を iPSC 由来の神経細胞およびラットシユワン細胞を共培養し相互作用を確認した実験結果が近年報告された (Clark AJ, Brain 2017) が、中枢神経系の脱髄について、iPSC 由来神経細胞とグリア細胞を共培養して解析した報告はない。以上のことから、学術的独自性および創造性はあると考える。

2. 研究の目的

本研究では日本人 ADS の症例の後方視的な臨床情報とエキソーム情報を組み合わせ、発症および治療反応性に関与する遺伝的因子を同定し、症例ごとに最適なオーダーメイド治療に向けての情報基盤を作成すること、および同定された遺伝的因子について、患者 iPSC 由来グリア細胞と免疫細胞を共培養する実験系において、中枢神経系での脱髄のメカニズムを明らかにすること、を目的に研究計画を立案した。

3. 研究の方法

神経細胞のニューロンへの分化

下記の論文で確立された方法を用いて、Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) より購入した健康成人由来の線維芽細胞を用いて *in vitro* での分化を行った。線維芽細胞をからニューロンへの分化には 3 種の転写因子 (ASCL1, MYT1L および POU3F2) を用いた。3 日毎に培地の交換を行い、適切な抗生剤を用いてプラスミド感染細胞を同定した。14 日目のニューロンを実験に使用した。

Sagata, N., Kato, T. A., Kano, S. I., Ohgidani, M., Shimokawa, N., Sato-Kasai, M., Hayakawa, K. Kuwano, N., Wilson, A. M., Ishizuka, K., Kato, S., Nakahara, T., Nakahara-Kido, M., Setoyama, D., Sakai, Y., Ohga, S., Furue, M., Sawa, A., and Kanba, S. (2017) Dysregulated gene expressions of MEX3D, FOS and BCL2 in human induced-neuronal (iN) cells from NF1 patients: a pilot study.

Sci Rep 7, 13905

間葉系細胞の神経細胞への分化

下記の論文で確立された方法を用いて、脱落乳歯歯髓由来幹細胞 (SHEDs) を用いてドパミン作動性ニューロンに分化を行った。2% B27 supplement (Life Technologies)、1 mM dibutyryladenine 3,5-cyclic monophosphate (Sigma-Aldrich)、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich)、200 μM ascorbic acid (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) および 50 ng/mL BDNF を含む neurobasal medium (Life Technologies) を用いて 5 日間で誘導できた

Nguyen Nguyen, H. T., Kato, H., Sato, H., Yamaza, H., Sakai, Y., Ohga, S., Nonaka, K., and Masuda, K. (2019)

Positive effect of exogenous brain-derived neurotrophic factor on impaired neurite development and mitochondrial function in dopaminergic neurons derived from dental pulp stem cells from children with attention deficit hyperactivity disorder.

Biochem Biophys Res Commun 513, 1048-1054

ヒト多能性幹細胞 (iPSC) の確立

ヒト末梢血単核球を KBM502 培地 (Kohjin Bio Co., Saitama, Japan) で Dynabeads human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 6 日間活性化した。活性化した T 細胞 (2.5×10^5 個) を CytoTune-iPS 2.0 (DNAVEC, Tokyo, Japan) を MOI 6 で含む KBM502 培地で 72 時間培養した後、recombinant laminin-511 E8 fragments (iMatrix-511; Nippi Inc., Tokyo, Japan) でコートした 6 well プレートで StemFit AK03 (Ajinomoto, Tokyo, Japan) 培地を用いて培養し、20-30 日後に iPS のコロニーを得た。得られた iPS 細胞の幹細胞マーカー (TRA-1-60, NANOG, SSEA4, OCT4, and ALP) の発現は ES/iPS Cell, Human, Characterization Kit; SAB-KIT-1 (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を用いて免疫蛍光的または免疫組織化学的に確認した。胚様体形成から 21 日後に 3-Germ Layer Immunocytochemistry Kit (ThermoFisher Scientific) を用いて AFP (内胚葉)、SMA (中胚葉)、TUJ1 (外胚葉) のマーカーの発現を確認し、分化を確認した。Sendai ウイルス DNA については iPS Transgene/SeV detection primer kit; IDT-DV0301 (MBL) を用いて確認した。G 分染法による染色体核型も確認した。確立した iPS 細胞は EmTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada) を用いて Matrigel (Corning Inc., Corning, NY, USA) で培養し、TrypLE Select (ThermoFisher Scientific) および Rho-kinase inhibitor Y27632 (Wako) を用いて継代した。

iPSC の神経細胞への分化

下記論文の quick reaggregation (SFEBq) method を用いて胚様体を血清 free の浮遊培地から神経細胞への分化を行った。TrypLE Express (ThermoFisher Scientific) に 50 μM Y27632 (FUJIFILM Wako) を溶解し 3 時間前処理した後に、DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham, containing Knockout Serum Replacement (ThermoFisher Scientific) と MEM non-essential amino acids solution, L-glutamine, 2-mercaptoethanol (Nacalai Tesque, Inc.) を用いた分化培地で cell-adhesion 96-well culture plates (10000 cells/well, 150 μl) で培養した。4 日ごとに上記培地に Rho-kinase, ALK5 tyrosine kinase, and AMP-kinase inhibitors (Y27632 [50 μM], SB431542 [10 μM, Sigma] および dorsomorphin dihydrochloride [2 μM, Tocris Bioscience, Abingdon, UK) を加えた培地を交換した。18 日目に非接着 dish に移し B27 と L-glutamine を添加した Neurobasal Medium で培養した。単一のニューロンおよびオルガノイドは iMatrix 511-pretreated 35-mm cover glasses (Matsunami Glass Ind. Ltd., Kishiwada, Japan) で形態を観察した。

4. 研究成果

健常対象由来ならびに患者由来の iPSC を確立することができた。

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 0件）

1. 著者名 Kinoshita Keishiro, Ishizaki Yoshito, Yamamoto Hiroyuki, Sonoda Motoshi, Yonemoto Kousuke, Kira Ryutaro, Sanefuji Masafumi, Ueda Akihiko, Matsui Hiroataka, Ando Yukio, Sakai Yasunari, Ohga Shouichi	4. 巻 63
2. 論文標題 De novo p.G696S mutation in COL4A1 causes intracranial calcification and late-onset cerebral hemorrhage: A case report and review of the literature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 103825 ~ 103825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejmg.2019.103825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------