

令和 6 年 6 月 1 0 日現在

機関番号：8 2 4 0 1

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：2 1 K 0 6 8 3 1

研究課題名（和文）22q11.2症候群特異的iPS細胞由来神経堤の病態モデルでのゲノム編集応用

研究課題名（英文）Genome editing applications in pathological models of 22q11.2 syndrome-specific iPS cell-derived neural crest

研究代表者

高崎 真美（Takasaki, Mami）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発研究員

研究者番号：8 0 3 9 2 0 0 9

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト22番染色体長腕q11.2領域の微細欠失を原因とする22q11.2欠失症候群は、先天性心疾患・胸腺低形成・副甲状腺低形成・特徴的顔貌・口蓋裂など多様な臨床症状を呈し、そのいくつかは発生初期に生じる神経堤細胞の異常に起因する。現時点で根本的治療法は存在しないため患者由来iPS細胞を用いた病態モデルの開発と創薬研究に期待が寄せられている。

本研究では、神経堤症としての22q11.2欠失症候群の病態モデルを確立することを目的とし、患者および健常人由来iPS細胞を材料に、神経堤細胞への分化効率と単離した神経堤細胞の多分化能を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、iPS細胞を利用した研究は国内外に広がりを見せ、創薬開発に不可欠なものとなった。本研究で対象とする22q11.2欠失症候群は染色体異常に起因する先天性疾患であり、その特徴として症状の多様性や重篤度の個人差が挙げられる。一般的に、寄託されたiPS細胞であっても正確な欠失部位や遺伝子変異に関する詳細情報は不明なことが多く、少数の患者由来iPS細胞の解析だけでは、病態モデルの検証や責任遺伝子の同定には不十分と言える。

以上より、複数人の患者由来iPS細胞を用いて神経堤誘導や遺伝子発現解析を行う本研究は、高い精度で責任遺伝子の同定を可能にし、病態の解明に寄与する研究として位置付けられる。

研究成果の概要（英文）：The 22q11.2 deletion syndrome, caused by a microdeletion in the q11.2 region of the long arm of human chromosome 22, presents with diverse clinical manifestations, including congenital heart disease, thymic hypoplasia, parathyroid hypoplasia, characteristic facial features, and cleft palate, some of which are due to neural crest cell abnormalities occurring early in development. Since there is currently no fundamental cure for this disease, there are high expectations for the development of pathological models and drug discovery research using patient-derived iPS cells.

In this study, we aimed to establish a pathological model of 22q11.2 deletion syndrome as a neural crest disorder by evaluating the efficiency of differentiation into neural crest cells and the multipotency of isolated neural crest cells using patient- and healthy human-derived iPS cells as material.

研究分野：再生医療、幹細胞生物学

キーワード：22q11.2欠失症候群 疾患特異的iPS細胞 神経堤細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「神経堤細胞」は胚発生時に一過性に生じる細胞で、高い遊走能と多分化能を有し、胚体内の様々な部位に遊走後、末梢神経細胞や内分泌細胞・平滑筋・顔面の骨など多種多様な細胞へと分化する。神経堤細胞の発生・分化・遊走に異常が生じると、先天性奇形（心奇形、顔面異常、口蓋裂）など様々な疾患の原因となる。

22q11.2 欠失症候群はヒト 22 番染色体長腕 q11.2 領域の微細欠失を原因とする疾患で、先天性心疾患・胸腺低形成による細胞性免疫低下・副甲状腺低形成による低カルシウム血症・特徴的顔貌・口蓋裂・知的障害・統合失調症など多様な臨床症状を呈する。その症状のいくつかは、発生初期に生じる神経堤細胞の異常に起因するため、総称として「神経堤症」に分類され、約 4000 人に 1 人の確率で生じる比較的頻度の高い染色体異常疾患である。1.5～3Mb に及ぶ欠失領域に存在する 30 以上の遺伝子やそのほかの調節配列が、各症状の発症にどのように関与しているかは十分に理解されていない。22q11.2 領域に存在する遺伝子のうち、TBX1 遺伝子の機能欠失型変異を持つ家系が報告されており、心疾患・副甲状腺機能低下症が見られることから、TBX1 の 22q11.2 欠失症候群における一部の症状への寄与が推定される。Tbx1 欠損マウスでも心疾患が再現されることから、Tbx1 の 22q11.2 欠失症候群の心疾患への関与は明らかである。一方で、その他の遺伝子の 22q11.2 欠失症候群における機能はほとんど不明のままである。最近になって、22q11.2 欠失かつ統合失調症を発症する患者由来 iPS 細胞を用いた研究により、患者由来神経幹細胞のニューロンへの分化効率は健常人に比較して減少することが示され、欠失領域に位置する microRNA プロセッシング因子 DGCR8 の関与が報告された (Toyoshima et al., Transl Psychiatry, 6:e934, 2016)。

こうした報告は、22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞の利用が、各症状の原因遺伝子の探索と病態メカニズムの解明に有用であることを示す。しかしながら、主症状である神経堤由来細胞の異常に着目した研究はほとんど報告されていない。これまで、多能性幹細胞から神経堤細胞への分化誘導法はいくつか報告されているが、培養条件の煩雑さや細胞株間での分化効率の差が生じるなどの問題があり、これが 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞の神経堤分化研究の遅れの要因の一つと考えられた。そこで研究代表者は、独自に開発した、簡便かつ安定的な神経堤細胞誘導法（未発表）を用いて、健常人及び 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞からの神経堤誘導を計画した。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、神経堤症としての 22q11.2 欠失症候群に焦点を当て、その病態モデルの確立を目指した。その手段として、独自に開発した簡便かつ安定的なヒト iPS 細胞の神経堤細胞分化法を用い、健常者由来 iPS 細胞と患者由来 iPS 細胞間での神経堤細胞への分化効率の比較や、多分化能の検討を行った。

本申請研究で対象とする 22q11.2 欠失症候群は染色体異常に起因する先天性疾患であるが、その症状は多岐に渡り、寄託された iPS 細胞であっても正確な欠失部位や遺伝子変異に関する詳細情報は不明なため、少数の患者由来 iPS 細胞の解析だけでは 22q11.2 欠失症候群病態モデルの検証や責任遺伝子の同定には不十分と考えられる。そこで、22q11.2 欠失症候群 iPS 細胞株を複数揃えるため、22q11.2 欠失症候群患者由来線維芽細胞より、新たに iPS 細胞株を樹立することを計画した。

### 3. 研究の方法

近年、細胞バンクへの疾患由来 iPS 細胞の寄託が増加傾向にあるが、その品質は寄託元によってばらつきがあり、実際の研究には事前の品質チェックが必須である。そこで本研究計画においても、理研細胞バンクより購入した 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞株（女児、男児）に加え、海外公的細胞バンクより購入した 22q11.2 欠失症候群患者由来線維芽細胞（男児、女児）より、所属研究室にて樹立 iPS 細胞を樹立し、特性解析を行った。

具体的には、樹立時に用いたエピソードマルベクターの残存の有無（EBNA1 遺伝子）をゲノム PCR により確認、胚葉体形成による三胚葉分化能の確認 (*in vitro*) 及び免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ形成実験、核型解析による染色体異常の確認を行った。核型解析に用いるアレイシステム（KaryoStat assay 法）は、G-band 核型分析と同様の分解能を有し、高い精度で染色体異常を検出可能なため、同時に 22q11.2 欠失領域の確認が行えると考えた。

続いて、品質チェック済 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞について、神経堤細胞への誘導を試みた。神経堤細胞への分化効率の評価は、RT-qPCR 法による各種の神経堤マーカー遺伝子の発現量解析、神経堤細胞マーカーでの免疫染色（SOX10 を使用）及びフローサイトメトリー（p75 陽性細胞の検出）の手法にて行った。

iPS 細胞より分化誘導した細胞を神経堤細胞として評価するためには、一般的に、その特徴である多分化能を確認することが必須である。そこで、分化誘導した神経堤細胞を、神経堤細胞特有的表面抗原 p75 を指標にフローサイトメトリーにて分取後に、末梢神経、骨、軟骨への *in vitro* 分化実験を行うこととした。それぞれの細胞系統への分化は、末梢神経マーカー（ペリフェリン）での免疫染色、アリザリンレッド染色、トルジンプルー染色にて評価した。

### 4. 研究成果

#### 【新規に作製した 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞および寄託 iPS 細胞の特性解析】

理研細胞バンクより購入した 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞株、海外公的細胞バンクより購入した 22q11.2 欠失症候群患者由来線維芽細胞から、所属研究室にてエピソードマルベクターを用いて樹立した iPS 細胞株の特性解析を行い、その品質を評価した。

品質評価の項目として、iPS 細胞樹立に使用したエピソードマルベクター残存の有無（EBNA1 遺伝子）、多能性マーカーの発現解析（免疫染色:OCT4 および NANOG、フローサイトメトリー: TRA1-60 および SSEA-4）、胚葉体形成による三胚葉分化能の確認と免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ形成実験、核型解析による染色体異常の確認、等を行った。

一連の特性解析の結果、細胞バンク由来の 2 株、所属研究室にて樹立した 3 株の iPS 細胞株は、その品質に問題ないことが確認された。

また、今回用いた KaryoStat assay 法によるアレイ解析より、これまで不明であった、患者それぞれの 22q11.2 領域での染色体欠損領域が同定された。これらは、欠損遺伝子と病態との関連性を考える上で、重要な成果と言える。一方、所属研究室にて樹立した 3 株のうち 1 株は、22q11.2 領域での欠失が確認されなかったことから、病態モデル用の iPS 細胞としては不適切と判断し、本研究では使用しないこととした。

本特性解析の結果は、論文として国際学術誌（Shimizu et al., Stem Cell Res, 61:102744, 2022）に掲載された。

#### 【iPS 細胞の神経堤細胞分化と多分化能の評価】

病態モデルの第一歩として、健常人由来 iPS 細胞株と上述の 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞株から神経堤への分化誘導を行った。この分化誘導の方法は、研究代表者が独自に開発した条件にて行った（未発表）。

本条件にて健常人由来 iPS 細胞株より誘導した細胞をフローサイトメトリー法で解析すると、神経堤細胞の細胞表面マーカーである p75(CD271,NGFR)の陽性細胞率は非常に高く、免疫染色法で特異的な転写因子である SOX10 タンパク質が高効率に発現しており、RT-qPCR 法、RNA-seq 法で各種の神経堤マーカー遺伝子の発現量を解析したところ、軒並み高い発現量が得られた。

さらに、この方法で分化した p75 陽性細胞の、骨分化、軟骨分化、末梢神経分化を評価した。フローサイトメトリー法にて分取した p75 陽性細胞を、各細胞への至適分化条件にて培養したところ、アリザリンレッド（骨芽細胞）、アルシアンブルー（軟骨）、ペリフェリンの発現（末梢神経）（図 1）で、それぞれ陽性の結果を得た。

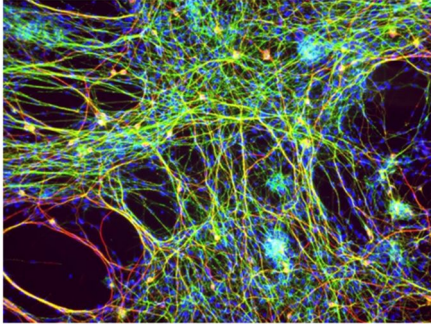


図 1：末梢神経への分化（Peripherin/TuJ1/Dapi）

これらの結果より、本方法にて誘導された p75 陽性細胞は神経堤細胞の特徴である多能性を有することが示された。

また、上述の 22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞株の神経堤細胞への分化を同条件にて行い、p75 陽性細胞率をフローサイトメトリー法で評価したところ、疾患株間でも分化効率の違いが認められた。現在、これらの細胞株間での分化効率の違いが何に起因するかを調べるため、網羅的遺伝子発現解析および分子機構の解析を行なっている。

今後、22q11.2 欠失症候群患者由来 iPS 細胞より誘導した神経堤細胞の骨分化、軟骨分化、末梢神経分化を評価し、病態モデル確立を進めていく予定である。

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 Shimizu Tomoya, Matsuo-Takasaki Mami, Luijkx Dorian, Takami Miho, Arai Yutaka, Noguchi Michiya, Nakamura Yukio, Hayata Tadayoshi, Saito Megumu K., Hayashi Yohei	4 . 巻 61
2 . 論文標題 Generation of human induced pluripotent stem cell lines derived from four DiGeorge syndrome patients with 22q11.2 deletion	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 Stem Cell Research	6 . 最初と最後の頁 102744 ~ 102744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2022.102744	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
研究 分 担 者	林 洋平  (Hayashi Yohei)  (90780130)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー   (82401)	

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