

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17日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22591144

研究課題名（和文）：iPS 細胞技術によるレット症候群モデル細胞の樹立と治療薬の探索

研究課題名（英文）：Generation of iPS cells derived from an Rett syndrome model mouse and drug screening for Rett syndrome using MeCP2 deficient iPS cells

研究代表者：

高橋 知之 (TAKAHASHI TOMOYUKI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：20332687

研究成果の概要（和文）：

レット症候群は主に女兒で進行性精神発達遅滞を呈する疾患で、X 染色体上の MeCP2 遺伝子 (MeCP2) の変異が主因である。既に、MeCP2 欠損マウスは RTT 様の症状を発症することが示されており、その詳細な解析が進められている。しかし未だ MeCP2 欠損による RTT 病態の発症メカニズムは不明であり、発症メカニズムの解明、治療法の確立が切望されている。本研究は MeCP2 欠損マウス由来の RTT モデル iPS 細胞を樹立し、その神経細胞分化能、更に分化誘導した神経細胞の機能評価を行うことで、MeCP2 欠損による RTT 発症メカニズムを解明し、治療薬探索や再生医療、遺伝子治療技術を応用した治療法の開発を目的としている。

そこで RTT モデル (MeCP2 欠損) マウスの尾部線維芽細胞を単離・培養後、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入して MeCP2 を欠損する iPS 細胞の樹立を試みた。その結果、種々の未分化マーカーを発現する WT と MeCP2 欠損 iPS 細胞クローンを少なくとも 4 クローンずつ得る事に成功した。また、神経系（種々の神経細胞やグリア細胞）の組織分化誘導方法として、Stromal cell-derived inducing activity 法や胚様体の形成、レチノイン酸による分化誘導法を利用し、RTT モデル iPS 細胞における神経細胞の分化誘導に成功した。現在、上記の方法により分化誘導した、RTT モデル iPS 細胞由来神経細胞の電気生理学的な特性や、詳細な分化マーカーの発現を解析し、正常な神経細胞との違いを解析することで、RTT の病態メカニズムの解析を続けている。

研究成果の概要（英文）：

Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder associated with mutations in the methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) gene. MeCP2-deficient mice recapitulate the neurological degeneration observed in RTT patients. The generation of diseased induced pluripotent stem (iPS) cell is a critical step in understanding the pathogenesis of genetics and complex diseases. Here, we generated RTT-model mouse iPS cell lines from MeCP2-deficient mouse by co-expressing four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc) through lentiviral delivery and subsequently differentiated them into neuronal cells for further analyses. RTT-model iPS cells were characterized for the expression of pluripotent markers and for their ability to differentiate into all three germ layers

by forming embryoid bodies in vitro. In addition, SDIA-induced colonies from both WT and RTT-model iPS cell lines generated cells possessing neuronal-like morphologies that expressed neuronal markers microtubule-associated protein 2 (MAP2) and neuron-specific tubulin beta type III. Our RTT-model iPS cell lines provide a powerful tool for both basic neuroscience research and therapeutic applications.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児神経学

キーワード：Rett 症候群

1. 研究開始当初の背景

レット症候群(RTT)は、主に女兒で発症、進行性精神発達障害を起こす疾患で、出生時は正常、しかし数ヶ月後、発達停滞、1-3歳頃より急速な言語や運動機能の退行を示し、失調性歩行、てんかん発作や呼吸を含む自律機能の失調を呈し大多数は若くして死亡する。既に、原因遺伝子としてX染色体上の転写調節遺伝子である MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2)が同定され(Amir-RE, et al., Nat Genet '99)、MeCP2欠損マウスの解析から中枢神経系の MeCP2欠損が RTT 発症の主因とされている。しかし国内外の RTT 患者、又は MeCP2 欠損マウスの詳細な生理、病理学的な解析や MeCP2 標的遺伝子の同定にも関わらず、未だ RTT 病態発症メカニズムは不明で、治療法の開発も急務である。

人工誘導多能性幹(iPS)細胞技術は、山中4因子の導入により体細胞から胚性幹(ES)細胞と同等の多能性幹細胞を誘導する技術である(Takahashi-K & Yamanaka-S, Cell

'06,' 07)。近年、この応用により患者と同じ遺伝情報を持つ神経細胞や心筋細胞などを作り出すことが可能であり、病態解明、薬効検査や移植治療などへの応用が期待されている。

本研究は、細胞レベルの病態メカニズム研究に有用な RTT モデル iPS 細胞の樹立、その解析により RTT 発症機構を解明し、治療薬のスクリーニングや将来、RTT 患者に直接応用可能な治療法の確立が目的である。

2. 研究の目的

レット症候群は主に女兒で進行性精神発達遅滞を呈する疾患で、X染色体上の MeCP2 遺伝子(MeCP2)の変異が主因である。既に、MeCP2 欠損マウスは RTT 様の症状を発症することが示されており、その詳細な解析が進められている。しかし未だ MeCP2 欠損による RTT 病態の発症メカニズムは不明であり、発病メカニズムの解明、治療法の確立が切望されている。本研究は MeCP2 欠損マウス由来の RTT モデル iPS 細胞を樹立し、

その神経細胞分化能、更に分化誘導した神経細胞の機能評価を行うことで、MeCP2 欠損による RTT 発症メカニズムを解明し、治療薬探索や再生医療、遺伝子治療技術を応用した治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

本施設では、RTT 病態解明のために、Bird-A らに RTT モデル動物として樹立されたによって樹立された MeCP2 欠損マウスを維持してきた (Guy-J, et al., Nat Genetics '01)。そこで、RTT モデル iPS 細胞を樹立するために、MeCP2 欠損マウス (Mecp2^{-y}) 及びコントロール wild-type (WT) マウスの新生仔の尾部線維芽細胞を初代培養し、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc) をレトロウイルスベクターにて導入後、未分化維持フィーダー細胞上で LIF 存在下、5-10 日間培養による iPS 細胞コロニーの出現を観察した。5-10 日後出現した iPS 細胞コロニーは、顕微鏡下でクローニングし、継代・増幅後、それぞれの iPS 細胞クローンにおいて、RT-PCR による 12 種類の未分化マーカー、免疫染色による Oct3/4、SSEA1、TRA1-60 の発現、アルカリフォスファターゼ染色によって iPS 細胞としての性質を評価した。また、多分化能を評価するために、iPS 細胞を胚様体 (EBs) 形成による分化誘導、SDIA 法による神経分化誘導を行ない、種々の分化マーカーによる RT-PCR、免疫染色を行なった。

4. 研究成果

RTT モデル iPS 細胞を樹立するために、MeCP2 欠損新生仔マウスの尾部線維芽細胞を初代培養し、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc) をレトロウイルスベクターにて導入後、5-10 日間培養し、iPS 細胞コロニーの形

成を認めた。顕微鏡下、形態的にコンパクトで辺縁がスムーズに細胞が密集したコロニーをそれぞれの個体ごとに少なくとも 15 個以上クローニングし、未分化状態の解析を行なった。それぞれの iPS 細胞クローンに対して、RT-PCR による 12 種類の未分化マーカーの発現、アルカリフォスファターゼ染色、SSEA1、TRA1-60、OCT3/4 による免疫組織染色を行なった。その結果、評価した全てのマーカーを発現する iPS 細胞クローンを WT と MeCP2 欠損 iPS 細胞クローンを少なくとも 4 クローンずつ得る事に成功した。得られた RTT モデル iPS 細胞クローンは ES 細胞やコントロール iPS 細胞と同様に、LIF 存在下、未分化維持を補助するフィーダー細胞上で増殖し、EBs を形成し多分化能を有することが明らかとなった。以上の結果から、MeCP2 はそのエピジェネティックな遺伝子発現制御により iPS 細胞の誘導に関わる可能性が指摘されていたが、MeCP2 欠損マウスモデルから iPS 細胞が誘導できることから、MeCP2 が欠損していてもマウス iPS 細胞が誘導できる可能性が示された。

次に RTT モデル動物から樹立した iPS 細胞の多分化能を評価するために、EBs 形成法による iPS 細胞の分化誘導を行なった。その結果、EBs 形成後 10 日目には自動収縮する細胞が認められ、sarcomea MHC の染色において心筋細胞の分化が認められた。また、RT-PCR によって外、内、中胚葉の三葉の形成を示す分化マーカー遺伝子が検出されたことから、本研究により得られた iPS 細胞が多分化能を保持することが示された。更に、SDIA 法による神経分化誘導を行なった結果、Neuron-specific tubulin beta type3 (TuJ)、GFAP 抗体で染色される分化コロニーが検出できることから、ES 細胞同様の方法で、神経分化することが示された。

現在、上記の方法により分化誘導した、RTT モデル iPS 細胞由来神経細胞の電気生理学的特性や、詳細な分化マーカーの発現を解析し、正常な神経細胞との違いを解析することで、RTT の病態メカニズムの解析、治療薬の探索を続けている。

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 9 件)

1. Seki, Y., Mizuochi, T., Kimura, A., Takahashi T., Ohtake, A., Hayashi, S., Morimura, T., Ohno, Y., Hoshina, T., Ihara, K., Takei, H., Nittono H., Kurosawa T., Homma K., Hasegawa T., Matsuishi T.
Two neonatal cholestasis patients with mutations in the *SRD5B1 (AKR1D1)* gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. 査読有
J Inherit Metab Dis 36(3):565-573 (2013)
doi:10.1007/s10545-012-9526-6.
2. Mizuochi T., Kimura A., Tanaka A., Muto A., Nittono H., Seki Y., Takahashi T., Kurosawa T., Kage M., Takikawa H., Matsuishi T.
Characterization of urinary bile acids in a pediatric BRIC-1 patient: Effect of rifampicin treatment. 査読有
Clin Chim Acta 413(15-16):1301-1304 (2012)
doi: 10.1016/j.cca.2012.04.011.
3. Okabe Y., *Takahashi T., Mitsumasu C., Kosai K., Tanaka E., Matsuishi T.

Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome. (*

Corresponding author)

PloS ONE 7(4):e35354 (2012), 査読有り

doi:10.1371/journal.pone.0035354.

4. Kishimoto S., Suda K., Teramachi Y., Nishino H., Kudo Y., Ishii H., Iemura M., Takahashi T., Okamura H., Matsuishi T.
Increased Plasma Type B Natriuretic Peptide in The Acute Phase of Kawasaki Disease. 査読有
Pediatr Int 53(5):736-741 (2011)
doi:10.1111/j.1442-200X.2011.03351.x.
5. Matsuishi T., Yamashita Y., Takahashi T., Nagamitsu S.
Rett syndrome: The state of clinical basic research, and future perspectives. 査読有
Brain Dev 33(8):627-631 (2011)
doi:10.1016/j.braindev.2010.12.007.
6. *Okabe Y., *Kusaga A., *Takahashi T., Mitsumasu C., Murai Y., Tanaka E., Higashi H., Matsuishi T., Kosai K.
(* These authors were equally contributed to this work.)
Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. 査読有

- Brain Res** 1360:17-27 (2010)
doi:10.1016/j.brainres.2010.08.090
7. Mizuochi T., Kimura A., Ueki I., Takahashi T., Hashimoto T., Takao A., Seki Y., Takei H., Nittono H., Kurosawa T., Matsuishi T.
Molecular genetics and bile acid profiles of 3beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase/isomerase deficiency in 2 Japanese patients. 査読有
Pediatr Res 68(3):258-263 (2010)
doi:10.1203/00006450-201011001-00505.
8. Miyata S., Takemura G., Kosai K., Takahashi T., Esaki M., Li L., Kanamori H., Maruyama R., Goto K., Tsujimoto A., Takeyama T., Kawaguchi T., Ohno T., Nishigaki K., Fujiwara T., Fujiwara H., Minatoguchi S.
Anti-Fas Gene Therapy Prevents Doxorubicin-induced Cardiotoxicity through Mechanisms Independent of Apoptosis. 査読有
Am J Pathol 176(2):687-698 (2010)
doi: 10.2353/ajpath.2010.090222.
9. 山下裕史朗・原宗嗣・高橋知之・松石豊次郎
“6. Rett 症候群の病態に関する神経生化学的研究”
特集 2：自閉症スペクトラム障害の脳機能病態、査読無
日本生物学的精神医学会誌 (3 月号) Vol.22 No.1 p45-49 (2011)
- [学会発表] (計 6 件)
- 2012 年**
- 1) 小賤健一郎、三井薫、王宇清、高橋知之
ヒトES/iPS細胞での再生医療の課題を克服する独自のアデノウイルスベクターと発現技術の開発
第 11 回日本再生医療学会総会 (横浜)
平成 24 年 6 月 12-14 日 パシフィコ横浜
- 2011 年**
- 2) 高橋知之
再生医療技術によるモデル細胞の樹立と神経分化 (シンポジウム)
第 53 回日本小児神経学会総会 (横浜)
平成 23 年 5 月 26 日 パシフィコ横浜
- 3) 岡部恭典、久佐賀晃、高橋知之、光益千秋、村井恵良、東英穂、松石豊次郎、小賤健一郎、田中永一郎
RTT モデル ES 細胞由来神経細胞の電気生理学的解析
第 88 回日本生理学会大会 (横浜)
平成 23 年 3 月 28 日 パシフィコ横浜
- 4) 小賤健一郎、岡部恭典、久佐賀晃、高橋知之、光益千秋、村井恵良、松石豊次郎、田中永一郎
MeCP2 遺伝子欠損 ES 細胞の in vitro 分化誘導法による Rett 症候群/神経発生の研究システム
第 10 回日本再生医療学会総会 (横浜)
平成 23 年 3 月 2 日 パシフィコ横浜
- 2010 年**
- 5) 須田憲治、岸本慎太郎、高橋知之、岡村

尚昌、横山隆人、寺町陽三、工藤嘉公、家村素史、松石豊次郎

川崎病急性期における末梢血樹状細胞数に
関与するサイトカイン、ケモカイン

“Change in Chemokines associated with the
number of circulating dendritic cells in
acute phase of Kawasaki disease”

第 30 回 日本川崎病学会学術集会（京都）

平成 22 年 10 月 10-11 日 国立京都国際会館

6) Suda K, Kishimoto S, Takahashi T,
Okamura H, Yasukawa H, Nishino H,
Teramachi Y, Itoh S, Yokoyama T, Iemura M,
Imaizumi T, Matsushi T.

Involvement of myeloid dendritic cell in
the pathogenesis of acute phase of
Kawasaki disease.

The 74th annual scientific meeting of the
Japanese Circulation Society.

2010.3.5-7 (Kyoto, Japan)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ヒト E S / i P S 細胞における遺
伝子発現方法

発明者：小賤健一郎、三井薫、高橋知之

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-117128

出願年月日：2012 年 5 月 23 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 知之 (TAKAHASHI TOMOYUKI)

研究者番号：20332687

(2) 連携研究者

松石 豊次郎 (MATSUISHI TOYOJIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60157237

田中 永一郎 (TANAKA EIICHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：80188284

村井 恵良 (MURAI YOSHINAKA)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40322820

西 芳寛 (NISHI YOSHIHIRO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20352122

岡部 恭典 (OKABE YASUNORI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：00446098