

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659433

研究課題名(和文) iPS細胞から分化誘導したアストロサイトを用いたアレキサンダー病の病態解明

研究課題名(英文) Research for investigating Alexander disease using astrocytes differentiated from iPS cells

研究代表者

中川 正法 (Nakagawa, Masanori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50198040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレキサンダー病は、アストロサイト特異的に発現するGFAPをコードする遺伝子の変異を認める神経変性疾患である。本病患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、さらにアストロサイトに分化誘導することを目的としたが、最近の技術進歩を受けて、まずは予備実験として非アレキサンダー病患者の末梢血リンパ球からのiPS細胞樹立を試みた。今後、iPS細胞からアストロサイトへの分化誘導を試みる予定である。また、細胞モデルにおけるGFAP異常凝集体の同定法が確立されていないことから、種々の免疫染色法を試して有用性を検討した。結果、従来からのGFAP染色が最も凝集体の同定に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Alexander disease is a neurodegenerative disorder, in which the genetic mutation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is specifically expressed in astrocytes, is observed. Initial purpose was to establish iPS cells derived from skin fibroblast obtained by patients with Alexander disease and to induce to differentiate astrocytes. However, with recent technology advancement, we established iPS cells derived from peripheral lymphocyte obtained by a non-Alexander disease patient as preliminary experiment. We intend to differentiate astrocytes using the iPS cells.

To evaluate appropriate method to detect GFAP aggregates, which may be crucial for investigation using cell model, we compared some kinds of immunostaining methods. As a result, conventional GFAP immunostaining was found to be most useful.

研究分野：臨床神経学

キーワード：アレキサンダー病 GFAP iPS細胞 末梢血リンパ球

1. 研究開始当初の背景

アレキサンダー病はアストロサイト細胞質内の glial fibrillary acidic protein (GFAP) を主成分とする凝集体の蓄積を病理学的特徴とする稀な難治性神経変性疾患で、その 97% で GFAP 遺伝子変異を認める。臨床的には乳児期発症で大脳白質病変を主体とする重症な型から成人期発症で延髄・頸髄病変を主体とする比較的緩徐な進行を示す型まで多様な臨床病型を示す。細胞モデルやマウスモデル研究により、本病は変異 GFAP を主体とする異常凝集体がアストロサイトの機能、さらにはニューロン-アストロサイトの相互作用に影響を及ぼすアストロサイト病であることが明らかにされつつあるが、多様な臨床病態を説明しうる研究はなされていない。

2. 研究の目的

これまでに報告された変異 GFAP 遺伝子導入マウスモデルは凝集体の性質を解析するツールとしては役立つが、十分な臨床表現型を示すものはまだ開発されておらず、ましてや本病の多様な臨床病態を反映するには至っていない。申請者らは変異 GFAP 遺伝子を導入したショウジョウバエ疾患モデルを確立し、治療の確立に取り組んでいるが、ショウジョウバエに GFAP ホモログが存在しないことが欠点である。さらにヒトアストロサイトはげっ歯類その他の動物種のそれと比較してより複雑な機能を保有するという指摘もあり、多様な臨床病態を反映するためにはヒトアストロサイトを用いたモデルが必要と考える。本研究ではアレキサンダー病患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、さらにアストロサイトに分化誘導することにより、臨床病型に応じたアストロサイトとアストロサイト-ニューロン相互作用を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 申請者らの施設および関連施設に通院しているアレキサンダー病患者から同意を得られた場合に皮膚生検を施行し、線維芽細胞を樹立する(1型から3型まで各病型の患者からの最終を目標とした)。独立行政法人医薬基盤研究所「難病研究資源バンク」と連携して iPS 細胞を樹立する。Krencik らの方法に従って、樹立した iPS 細胞を neuroepithelial cells(NE)に誘導したのちに、fibroblast growth factor 8 (FGF8)、retinoic acid (RA)および sonic hedgehog(SHH)の各モルフォゲンを組み合わせて progenitors を誘導し、epidermal growth factor (EGF)および FGF2 にてタイプの異なるアストロサイトに分化誘導する。

2) アストロサイトに分化した際に有用となる培養細胞レベルにおける変異 GFAP の異常凝集体を同定評価する染色法を検討した。野生型ヒト GFAP, ヒト変異 GFAP(R239C)遺伝子をそれぞれ導入した副腎皮質細胞腫瘍由来の細胞に対して、もっとも一般的な染色法である GFAP と in vivo で報告のある Fluoro Jade B, 本病の凝集体での報告はないが凝集体を染色する thioflavin, congo red を比較した。

4. 研究成果

1) 当初は 1-3 型すべての型において線維芽細胞を樹立することを目標としたが、実際に同意が得られたのは中間型アレキサンダー病患者 1 名のみであった。また、研究の推進については当初連携を予定していた独立行政法人医薬基盤研究所「難病研究資源バンク」が iPS 細胞関連から撤退せざるを得なくなったこと、単独施設での研究の推進は困難で本年度設定された再生医療実現拠点ネットワークプログラム「iPS 細胞研究中核拠点」との連携が望ましいことから試料収集や iPS 細胞樹立に対して新たな連携を模索する必要が生じ、研究開始に遅れが生じた。近年の iPS 細胞技術の向上により末梢血リンパ球か

らの iPS 細胞樹立が可能になり、侵襲性の面も考慮して、アレキサンダー病患者においても末梢血から樹立した iPS 細胞を用いてアストロサイトへの分化誘導を目指すことにした。今年度は予備実験として、非アレキサンダー病患者から得た末梢血リンパ球 (CD34 陽性細胞) に Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、LIN28、mp53DD, と EBNA1 を episomal vector を用いてエレクトロポレーション法で遺伝子導入して、iPS 細胞を樹立した。報告書作成時点では iPS 細胞からアストロサイトへの分化誘導には至っていないが、今後、形態学的・生理学的に多様性をもつ種々のサブタイプについての検討も行いながらアストロサイトへの分化を試みる予定である。

2) GFAP免疫染色により、野生型では細胞質にfilament構造を主体とするGFAP の発現が観察され、p.R239Cの変異では多数の細胞にfilament構造を伴わない凝集体形成が認められた。Fluoro-JadeあるいはThioflavinを用いた場合、細胞質は染色されたがGFAP filament構造と変異GFAP凝集体はいずれも染色陰性であった。congo red、DFSではGFAP構造物を含めて細胞内における染色性は観察されなかった。結果、従来からのGFAP染色が最も凝集体の同定に有用であることが示された。

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1件)

1. Yoshida T, Mizuta I, Saito K, Kimura Y, Park K, Ito Y, Haji S, Nakagawa M, Mizuno T. Characteristic abnormal signals in medulla oblongata-‘eye spot’ sign: four cases of elderly-onset Alexander disease. Neurology clinical practice. 2015 online published.

[学会発表](計3件)

1. 吉田誠克, 水田依久子, 斉藤光象, 中川正法, 木村康義, 朴貴瑛, 伊藤康男, 椎裕章, 高橋義秋, 井手俊宏, 土師正太郎, 水野敏樹. 延髄前部の MRI 異常信号は成人期発症アレキサンダー病の特徴的な所見である. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014 年 5 月 22 日; 福岡.
2. 斉藤光象, 吉田誠克, 建部陽嗣, 水田依久子, 中川正法, 水野敏樹. 変異 GFAP 凝集体を同定評価するための各染色法の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014 年 5 月 23 日; 福岡.
3. 吉田誠克, 水田依久子, 斉藤光象, 中川正法. アレキサンダー病の臨床診断指針に対する有用性の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013 年 5 月 31 日; 東京.

[図書](計2件)

1. 吉田誠克. アレキサンダー病. 別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.26 神経症候群(第2版) III. 859-863, 2014.
2. 吉田誠克. アレキサンダー病と類縁疾患. 別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.26 神経症候群(第2版) IV. 154-158, 2014.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 正法 (NAKAGAWA, Masanori)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 50198040

(2)研究分担者

吉田 誠克 (YOSHIDA, Tomokatsu)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・神
経内科・講師

研究者番号：90457987