

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461643

研究課題名(和文) ダウン症における成長障害の発症機序 iPS細胞を用いた検討

研究課題名(英文) Analysis of disease mechanism of growth impairment in Down syndrome using human iPS cells

## 研究代表者

荒堀 仁美 (ARAHORI, HITOMI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40379186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群では成長障害を高頻度に合併するが、その機序は不明である。本研究ではダウン症候群児の疾患特異的ヒトiPS細胞を樹立し、軟骨細胞系へと分化誘導を行いその解析を行うことによって、成長障害の原因を明らかにする。出生前に診断されたダウン症新生児の臍帯血をもとにセンダイウイルスを感染させダウン症iPS細胞を作成、さらに軟骨細胞へと分化誘導することができた。一方で、トリソミー症候群の患者から得た皮膚線維芽細胞ではいずれも酸化ストレスの増大と細胞早期老化現象が認められ、染色体トリソミーがもたらすRNA/タンパク合成亢進により酸化ストレスが増大していることが引き金となっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome (DS) is the most common chromosomal aneuploidy, which is caused by the trisomy of chromosome 21. Among their various medical symptom, DS patients show impairment in the growth. To analyze the mechanism of this growth impairment in DS, we generated DS-specific human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from the cord blood using Sendaivirus vector, and differentiated them to chondrocyte. Although chondrocyte was successfully differentiated from human iPSC, its percentage was not sufficient yet. On the other hand, fibroblasts derived from not only DS patients but also 13, 18 trisomy patients showed low proliferation rate and premature senescence. The premature senescence was accompanied by accelerated RNA / protein synthesis, followed by increased oxidative stress. This trisomy-induced stress can be a major cause of growth impairment in DS.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：成長障害 軟骨細胞 ダウン症候群

### 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は700人に1人という小児遺伝性疾患において最も高い頻度で発症し、精神発達障害に加えて心臓・消化管などの内臓奇形、血液系・内分泌系の異常など多彩な合併症を呈する。とくに成長障害を高頻度に合併し、妊娠の早期から胎児発育不全 (fetal growth restriction; FGR) を認め、出生後も平均身長は健常児の約 - 2.0SD を推移し、最終身長は-3.0 SD 程度にとどまる。‘成長’すなわち‘身長増加’の本態は、骨幹端に存在する成長軟骨帯における「軟骨細胞の増殖・分化」と「骨組織への置換」によって説明される。ダウン症児では成長ホルモン (growth hormone; GH) の分泌低下は見られず、GH 補充療法による最終身長の改善は見られないことなどから、同症候群における成長障害は GH 産生・応答性の異常による者ではなく、なんらかの細胞機能低下が関与していると考えられている。しかしながらその詳細なメカニズムについては、これまでトリソミーの状態を正確に表す実験モデルがなかったこと、また本症に高率で合併する先天性心疾患や内分泌疾患などによる影響を切り離して解析することのできる実験系がなかったため、よく分かっていない。

### 2. 研究の目的

染色体異常と複雑な遺伝子変化がもたらす病態について詳細な解析を行うためには、正確な病態モデルを得ることが大切である。しかしながら 330 個以上の遺伝子数が同時に変化する染色体異常の変化を同時に解析できる実験モデルを得るのは容易でない。

近年ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立により、患者由来の体細胞をもとにヒト幹細胞を作成することが可能となった。この iPS 細胞はドナーとまったく同じゲノム構築を持ち、しかもさまざまな体細胞への分化誘導が可能であるため、ヒト難治性疾患の病態解析において強力なツールとなる。申請者はこのヒト iPS 細胞作成技術と iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導系を組み合わせることにより、ダウン症候群における成長障害のメカニズムを明らかにすることを目指している。

一方、ダウン症における種々の合併症の原因については、一般的にトリソミーによる 21 番染色体上の遺伝子数およびその発現量の増加が原因と考えられている。しかしながら成長障害については 13, 18 トリソミーなど他の染色体異常症においても同様の症状が見られることから、トリソミーに伴うなんらかの非特異的作用が存在すると考えられる。ヒト染色体を (染色体の長さでなく) コードしている遺伝子の数で並べ直してみると、 $21 < 18 < 13$  番という順番になり、最も数の少ないこの3つのトリソミーだけが出生可能であり、その他のトリソミーは例外なく胎生致死である。すなわち染色体上の遺伝子数と臨

床的重症度とのあいだにはなんらかの相関関係があるのではないだろうか (図 1)。そこで本研究では、これらの知見をもとに染色体トリソミーを引き起こす非特異的なストレス作用に注目し、それが成長障害に結びついている可能性について研究を進めることを目的とした。

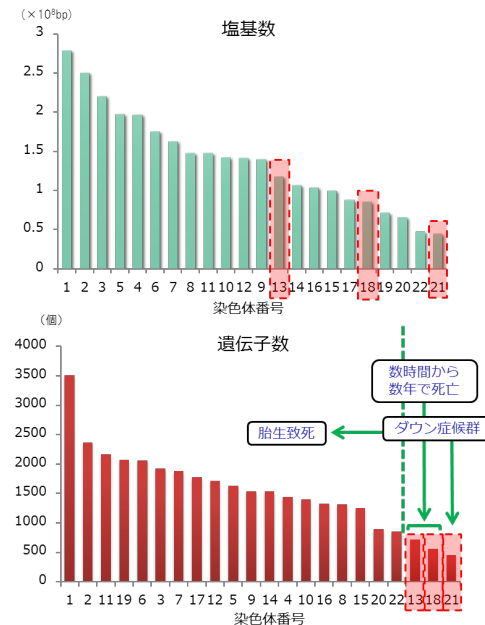


図 1. ヒト染色体を、染色体の長さ (上) ではなく、コードされた遺伝子の数 (下) により並べ替えた。染色体トリソミーでは遺伝子数と臨床的重症度とのあいだに相関性があるように見える。

### 3. 研究の方法

本研究では、ダウン症候群患者から得られたヒト iPS 細胞を軟骨細胞系へと分化誘導することにより、その分化増殖過程に異常はあるのか、もしあるとすればどの段階に異常があるのかを明らかにする。

#### 臍帯血からの疾患特異的ヒト iPS 細胞の樹立

本研究に用いる疾患特異的ヒト iPS 細胞は、臍帯血へのセンダイウイルスの感染により樹立する。

このセンダイウイルスベクターは産総研の中西真人らによって作成されたものであり、C1.15 株という持続感染型変異株である (図 2)。この株ではセンダイウイルス遺伝子上の P, M 遺伝子に変異を入れて細胞障害性を低下させる改変を加えてある。また iPS 細胞樹立後にこのウイルスを除去させる必要があるが、SeV の L 遺伝子 (ウイルスポリメラーゼ遺伝子でありウイルス発現に必須) に対する siRNA を加えることで L 遺伝子発現を抑制させている。さらに L 遺伝子の末端に miR302a target sequence を 4 つならべたものを付加してあり、感染させた細胞が iPS 細胞の状態になると未分化細胞特異的 microRNA である miR302a によって L 遺伝子の発現が抑制されることになる。

このセンダイウイルスと臍帯血をもちいて、以下のように iPS 細胞を樹立した。

- ✓ 胎児超音波検査と羊水検査により染色体異常の診断を受けた胎児について、あらかじめ承諾書を得た上で、分娩時に臍帯血を採取する。
- ✓ 臍帯血の単核球分画に、山中 4 因子を搭載した持続発現型センダイウイルスベクターを感染させることで遺伝子導入を行う
- ✓ 感染 7~10 日後に iPS 細胞様コロニーをピックアップ
- ✓ センダイウイルスに対する shRNA を投与することによりベクターを除去
- ✓ QRT-PCR により多能性の確認を行う

Sendaivirus C1.15株 (産総研 中西ラボ作成)  
SeV-KOSM302L vector



図2. iPS 細胞樹立のために使用する持続発現型センダイウイルスベクター (産総研中西ラボ作成) 細胞傷害性と持続性に関する変異・欠失を導入し持続感染型としてある。

- ・ 4 つの初期化転写因子を同一ベクターに包含
- ・ iPS 細胞樹立後のウイルス除去；  
L 遺伝子の末端に miR302a 標的配列を付加  
L 遺伝子に対する siRNA を投与

### ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導法については、京都大学 iPS 細胞研究所で確立されたプロトコルを用いた。すなわち Wnt3a + ActivinA をもちいて mesendoderm への誘導を促し、BMP2+FGF2 により medoderm へ、さらに GDF5+BMP2+Ascorbic acid+TGF 1 によって軟骨細胞誘導を促す (図 3)。

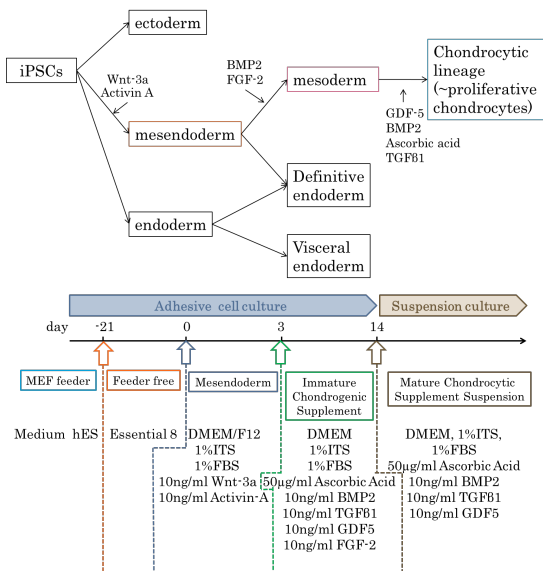


図3 ヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導のストラテジー (上) および具体的なプロトコル

### 4. 研究成果

ダウン症候群と診断を受けた新生児の臍帯血から単核球分画の細胞  $7.0 \times 10^5$  個を得ることができた。これに SeV-KOSM302L ウイルスを MOI=3 で 2h 感染したところ、感染 5 日目前後と非常に早くからコロニーが出現し、そのコロニー数も多くみられた。感染後 7 日~12 日でピックアップ可能となり、各 10-20 個のコロニーをピックアップした (図 4)。これらの iPS 細胞クローンに対してセンダイウイルスを除去するために siRNA 処理を行った。siRNA 処理および miR302a target sequence を加えない状態では半年経っても SeV は消失していなかったのに対し、1 回の siRNA 処理によって 30% の SeV が消失し、さらに miR302a 配列の付加によって 50% の SeV が消失した (図 5)。

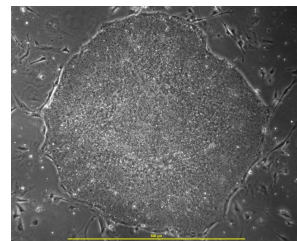


図4. 臍帯血より樹立した 21 トリソミー iPS 細胞

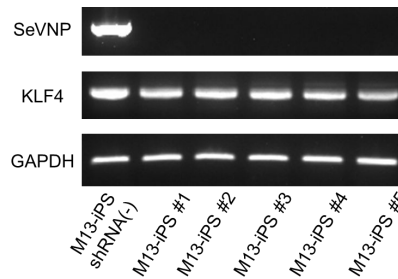


図5. siRNA 処理後の SeV 除去の確認

次に樹立したヒト iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導を行った。健康児由来 iPS 細胞をもちいて分化誘導を行ったところ、以下のような軟骨細胞を含む塊が得られた (図 6)。

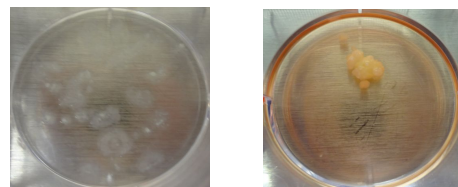


図6. 健康児ヒト iPS 細胞から分化誘導した軟骨細胞。(左; 分化開始 3 日目、右; 4 週間目)

しかしながら、このように分化誘導した軟骨細胞を含む塊について、サフラニン O・ファストグリーン・鉄ヘマトキシリン重染色を行ってみると、50% 程度にしか陽性とならず、分化誘導効率が不十分であることが分かっ

た(図7)。現在、この分化誘導効率をさらに上げるために、軟骨細胞特異的マーカーである COL11A2 のプロモーター下に EGFP-IRES-Puro がつながったレンチウイルスベクターを感染させることを目指している。これにより Puromycin 選択が可能となり、純度の高い軟骨細胞を得ることができると思われる。

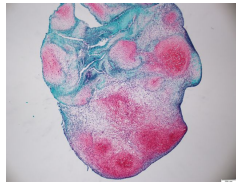


図7. 健常児iPS細胞から分化誘導した軟骨細胞を含む塊を、サフラニンO・ファストグリーン・鉄ヘマトキシリン重染色したもの(分化誘導開始後6週)

次に、トリソミーに共通のストレス作用があるのかどうかを調べるために、13、18、21トリソミーの児から得た皮膚線維芽細胞をもちいて解析を行った。その結果、トリソミー皮膚線維芽細胞では、共通して増殖速度が遅く、さらにβ-Gal染色によって示される細胞早期老化の亢進がその原因であること、β-Gal陽性細胞数が21<18<13番の順に多いことが分かった(図8)。

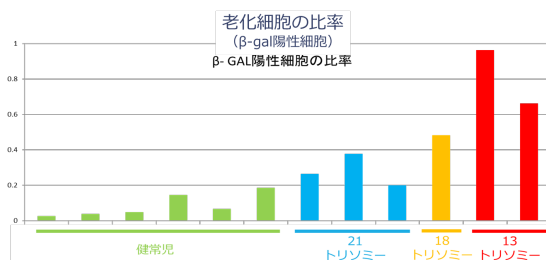


図8. 21、18、13トリソミーでは、細胞早期老化現象が亢進している

ダウン症候群に細胞早期老化が見られることはすでに報告されていたが、これまで21番染色体上にコードされた遺伝子の量効果によるものと考えられていた。同じ現象がすべてのトリソミーに共通で認められ、しかもその強さと、臨床所見および染色体上の遺伝子数とのあいだに正の相関が見られることから、トリソミー症候群では遺伝子発現量が引き起こす共通のストレス作用があることが示唆された。

次に細胞早期老化現象を引き起こす原因について解析を加えた。そしてトリソミーには共通して酸化ストレスの増大が見られることが分かってきた。さらに5-EUおよび標識メチオニン取り込み率についても、同じく共通して増大が認められ、トリソミーではRNA合成・タンパク合成の亢進が起こっており、これが引き金となって酸化ストレスが増大し、皮膚線維芽細胞における細胞早期老

化現象につながるということが分かった。

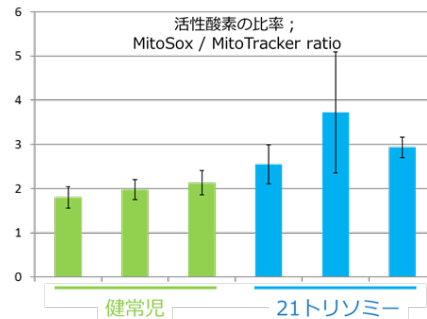


図9. MitoSoxおよびMito Trackerをもちいた解析により、トリソミーでは活性酸素の増大が認められる

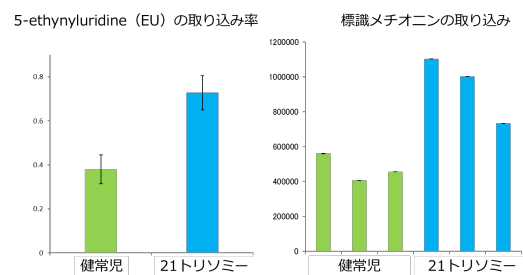


図10. 5-ethynyluridine (EU) および標識メチオニンの取り込み率の解析により、トリソミーではRNA/タンパク合成が増大していることが分かる

今後さらにiPS細胞から分化誘導して得た軟骨細胞について酸化ストレスおよび細胞早期老化現象について解析を行い、トリソミーによって引き起こされるストレス作用についての解析を進めるとともに、そのメカニズムはなにか、治療法の開発とともに研究を進める予定である。

## 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 1 件)

1. Systematic cellular disease models reveal synergistic interactions of trisomy 21 and GATA1 mutations in hematopoietic abnormalities  
Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto Y, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Araori H, Wada K, Kitabatake Y, and Ozono K  
**Cell Reports** (2016) 15: 1228–1241 (査読あり)  
(DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.031>)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 第37回日本小児遺伝学会学術集会：14.04.10 名古屋  
「疾患特異的ヒトiPS細胞をもちいたダ



ウン症候群の病態解析」

北畠 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、那波 伸敏、和田 和子、荒堀 仁美、谷口 英俊、大園 恵一

2. 第 117 回日本小児科学会学術集会：  
14.04.11 名古屋  
「ダウン症候群における病態発症メカニズムの解明」  
北畠 康司、坂野 公彦、平田 克弥、大森 早也佳、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、大園 恵一

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒堀 仁美 (ARAHORI HITOMI)  
大阪大学医学系研究科・助教  
研究者番号：40379186

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：