

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461547

研究課題名(和文)エキソーム解析と患者iPSC由来神経細胞を用いたSSPEの包括的な病態解析

研究課題名(英文) Comprehensive pathological analysis of SSPE using exome analysis and patients iPSC-derived neurons.

研究代表者

石崎 義人 (Ishizaki, Yoshito)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20572944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明で治療法の確立していない指定難病である亜急性硬化性全脳炎の病態解析としてエキソーム解析での責任遺伝子同定と、iPSC細胞から分化させた神経細胞と遺伝子組み換え麻疹ウイルスを用いた機能解析を計画した。エキソーム解析には3家系8症例の親子例での解析を行った。複合ヘテロ変異と想定して解析を行ったが責任遺伝子の同定には至らなかった。亜急性硬化性全脳炎の3名の患者の末梢血単核球からiPSC細胞を樹立することに成功した。神経細胞への分化実験も行ない確立することができた。形態的には健常対照由来のiPSC細胞から分化させた神経細胞と差異を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：As a pathophysiological analysis of the subacute sclerosing panencephalitis, which is intractable disease due to unknown pathophysiology, we planned the genetic analysis for identification of responsible gene and biological analysis for clarifying cellular mechanism using neurons differentiated from iPSC cells and genetically modified measles virus. For the exosome analysis, we analyzed 8 patients of 3 families, which had no consanguineous parentage. We performed analysis assuming the inheritance model as compound heterozygote, but failed to determine the responsible gene. We succeeded in establishing iPSC cells from peripheral blood mononuclear cells of 3 patients with subacute sclerosing panencephalitis. There was no morphological difference between neurons differentiated from iPSC cells derived from subacute sclerosing panencephalitis patients and those of from healthy control.

研究分野：小児神経学

キーワード：SSPE エキソーム解析 iPSC細胞

1. 研究開始当初の背景

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis:以下 SSPE) は麻疹ウイルスによる中枢神経系への遅発性ウイルス感染症である。ウイルス側の要因と宿主側の要因が関連して発症すると考えられているが、その発症機序は解明されていない。SSPE の発症に関わる宿主側因子を解明することを目的として、当研究室では日本人患者 40 例の遺伝子を用いて患者対照研究を行ってきた。これまでに IL4 (interleukin 4) 遺伝子、MxA (MX dynamin like GTPase 1) 遺伝子、TLR3 (Toll-like receptor 3) 遺伝子、PD1 (programmed cell death 1) 遺伝子の遺伝子多型を疾患感受性遺伝子として報告してきたが、SSPE 発症の責任遺伝子変異の同定には至っていない。

近年、頻度の稀な重症感染症では、その病原体に対する特異的な免疫応答の低下が報告されている。代表的な疾患であるヘルペス脳炎を対象とした研究において、遺伝学的因子の研究が進み、UNC93B1 (unc-93 homolog B1) 遺伝子、TLR3 遺伝子、TRAF3 (TNF receptor associated factor 3) 遺伝子の変異がヘルペス脳炎の原因であることが報告された (Casrouge A, et al. Science. 2006, Zhang SY, et al. Science. 2007, Pérez de Diego R, et al. Immunity. 2010)。SSPE においても麻疹ウイルスに対する免疫応答の低下が報告されており、SSPE の発症頻度 (麻疹罹患者の数万人に 1 人) から何らかの遺伝子変異が原因であると推測される。

患者数の少ない疾患の原因遺伝子検索として、世界的に次世代シーケンサーを用いた全エクソームシーケンスが用いられ、責任遺伝子の報告が相次いでいる。我々は現在 SSPE 患者 3 家系 8 名のエクソーム解析をかずさ DNA 研究所で行い候補遺伝子の絞り込みを行っているが、まだ責任遺伝子の同定には至っていない。

ヘルペス脳炎の病態解析においては患者由来 iPSC から分化させた神経細胞が病態解析に有用であると報告された (Lafaille FG, et al, Nature 2012)。末梢血リンパ球を用いた解析ではウイルスの増殖は健常対象と同程度であったが、iPSC 由来神経細胞での解析において、患者由来神経細胞では健常対象由来と比較してウイルスが増殖しやすいことが報告された。SSPE においても麻疹感染時に重症化するわけではなく、末梢血リンパ球を用いた解析よりも iPSC 由来神経細胞での解析が望ましいと思われたため実験を計画した。

2. 研究の目的

エクソーム解析による疾患責任遺伝子の同定と、患者多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell:以下 iPSC) 由来神経細胞を用いた麻疹ウイルス応答の解析を併用して SSPE の病態を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) エクソーム解析による責任遺伝子の同定

エクソーム解析では患者だけの解析では不十分で、両親の解析が必要であるが、倫理委員会の承認を得て 3 家系 8 検体のエクソーム解析 (HiSeq2000, Illumina 社) を行った。具体的には疾患の遺伝モデルを常染色体劣性遺伝形式でのホモ接合変異または複合ヘテロ変異を想定して疾患責任遺伝子の絞り込みを行った。同定できた変異によるアミノ酸置換の影響は、NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) のデータベースによる種を超えた保存性の確認と、アミノ酸置換に伴うタンパク質機能変化予測プログラム (SIFT : <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) を用いて推した。

(2) SSPE 患者 iPSC 由来神経細胞を用いた麻疹ウイルス応答の検討

SSPE 患者由来 iPSC 細胞の樹立
SSPE 患者 3 例の線維芽細胞および末梢血単核球から当科で行っている iPSC 作成法と同様に、4 遺伝子 (Sox2, KLF4, Oct4, Myc) をセンダイウイルスベクターで導入した方法により患者由来 iPSC 細胞を樹立する。対照群となる健常者由来 iPSC は既に作成済みである。

iPSC の神経細胞およびグリア細胞への分化
iPSC の神経細胞への分化誘導は STEMdiff Neural Induction Medium (STEMCELL Technology®) を用いて、nestin および Sox1 陽性の神経前駆細胞の豊富な Neural rosette clusters を経て、FGF2 および EGF を添加した培養条件下で TUJ1 陽性の神経細胞を分離する。

4. 研究成果

(1) エキソーム解析による責任遺伝子の同定

3 家系 8 検体のエキソーム解析(HiSeq2000, Illumina 社)を行い、3 家系に共通する責任遺伝子の同定は困難であった。2 家系に共通する責任遺伝子としては、500 以上の候補遺伝子が想定された。それぞれの遺伝子変異について変異情報からアミノ酸置換に伴うタンパク質機能変化予測プログラム(SIFT: <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>)を用いて病態に関連する変異かどうか検討した。遺伝子機能の情報について、遺伝子オンロジーのデータベースから免疫応答に関連する用語に該当する遺伝子を候補遺伝子として日本人 SSPE40 症例で追試を行ったが再現性は得られなかった。

(2) SSPE 患者 iPSC 由来神経細胞を用いた麻疹ウイルス応答の検討

SSPE 患者由来 iPSC 細胞の樹立
SSPE 患者 3 人(および健常人)の同意取得後、末梢血のみ採取した。得られた検体は密度勾配遠心法により単核球分画を濃縮し、T リンパ球を拡大培養した後に実験に使用した。

得られた T リンパ球に、センダイウイルスベクター(CytoTune-iPS 2.0、DNAVEC)を用いて SOX2 (SRY-related HMG box 2) 遺伝子, KLF4 (Kruppel-like factor 4) 遺伝子, Oct4 (octamer-binding transcription factor 4) 遺伝子, Myc 遺伝子を electroporation のシステムで遺伝子導入し iPSC 細胞を樹立した。各患者ごとに 3-6 株の iPSC 細胞を樹立し、凍結保存した。得られた細胞の品質評価のため、形態学的観察と t 多能性幹細胞のマーカー NANOG、OCT3/4、SSEA (stage specific embryonic antigen) 4、TRA1-60 の免疫蛍光染色を行い、未分化性維持に異常がないことを確認した。細胞分化マーカーを用いて三胚葉への分化は確認したが、マウスを用いた奇形腫確認は実施していない。

疾患特異的 iPSC の神経細胞およびグリア細胞への分化

維持している iPSC 細胞を細胞解離液で剥がし、シングルセルになるようピペティングして回収し、細胞数をカウントし、必要な細胞数で分化開始培地で懸濁後、Lipidure-coat U96well (Nunc)で 4 日ごとに培地交換した。用いる培養液は DMEM に代替血清である KnockOut Serum Replacement (KSR) と非必須アミノ酸 (NEAA) と、L-グルタミンのジペプチド代替品である L-アラニル-L-グルタミンと還元剤 (2-Mercaptoethanol Solution)

を添加し使用した。分化誘導に使用されることのある ALK4, ALK5, ALK7 (anaplastic lymphoma kinase) 阻害剤である SB431542, AMPK (AMP-activated protein kinase) 及び BMP (bone morphogenetic protein) シグナルの阻害剤である Dorsomorphin, ROCK (Rho-associated protein kinase) 阻害剤である Y-27632 は使用していない。12 日目に Nestin および PAX6 (Paired Box Protein 6) 陽性の神経前駆細胞が確認できた。14 日目に Neurobasal medium に移し Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with quick reaggregation 法を用いて培養したところ口ゼツタ形成が確認でき、幹細胞マーカーである Sox2 (sry-related HMG box transcription factor 2) の発現を確認した。

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)

楠原 浩一、石崎 義人、原 寿郎 SSPE 患者由来人工多能性幹細胞 (iPSC) からの神経幹細胞の作成
平成 28 年度 (2016 年度) プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班研究成果報告書

〔学会発表〕(計 1 件)

楠原 浩一、石崎 義人、原 寿郎 SSPE 患者由来人工多能性幹細胞 (iPSC) からの神経幹細胞の作成
平成 29 年 1 月 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学医学部小児科 HP

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/pediatr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 義人 (ISHIZAKI YOSHITO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 20572944

(2) 研究分担者

酒井 康成 (SAKAI YASUNARI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：10380396