

# 研究報告書

## 「連鎖解析とiPS/ES細胞技術を用いた遺伝性疾患遺伝子同定法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 伊達 英俊

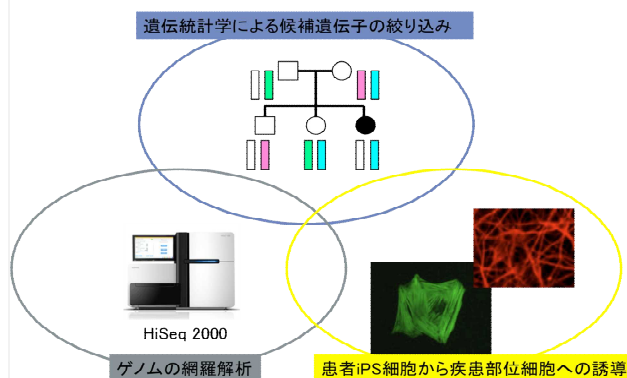
### 1. 研究のねらい

遺伝性疾患の原因遺伝子が存在する候補領域を決定する連鎖解析は、家系の大きさ(家系内に発症者が多く、親、親類のゲノム情報の利用が可能な家系)や同一疾患家系の集積に依存しており、90年代以降、頻度の高い遺伝性疾患の原因遺伝子が連鎖解析により数多く同定されてきた。遺伝性疾患の原因遺伝子が存在する候補領域を決定する連鎖解析は、家系の大きさや同一疾患家系の集積に依存しており、家系情報が多い疾患の原因遺伝子同定には、連鎖解析は強力なツールである。しかし、頻度の低い(家族内の発症者が少ない家系 or 親類のゲノム情報がない単一家系)の遺伝性疾患に対して、連鎖解析での候補遺伝子の絞り込みは、非常に困難である。現在、見いだされる遺伝性疾患家系は1～2家系ほどの稀な疾患が主で、有効な連鎖解析が難しく、新たな解析手法が必要となってきた。

本研究では、患者由来の細胞からiPS細胞を用いて、in vitroで病変部位細胞を再現し、患者特異的な表現形と、連鎖解析や次世代ゲノムなどのゲノムデータによる候補遺伝子から一家系のみで疾患の原因遺伝子を効率よく同定することを目的とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要



本研究課題では、左図のように、家系解析による遺伝情報、大規模なDNA塩基解析情報、および患者iPS細胞から誘導した疾患部位細胞からの細胞情報の3種のデータを合わせて、今まで困難であった一家系からの原因遺伝子同定を試みる。ここでは、長年類似疾患が確認されていない筋疾患である拡張性心筋症を伴うネマリ

ンミオパチーの一家系を対象とした。

本疾患は、

- 筋萎縮症のKugelberg-Wellander病として1966年に報告。以来同一疾患の報告無し
- 優性遺伝形式
- 生検により筋組織にネマリン小体を認める
- 電気生理より筋原性疾患と診断
- 剖検より心筋線維の糸状の萎縮
- 患者iPS細胞から誘導した心筋細胞の構造異常と骨格筋細胞にネマリン蓄積が期待で

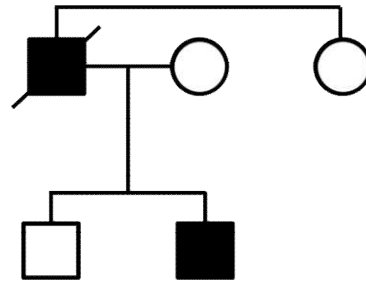
きる

以上、骨格筋細胞と心筋細胞に表現形を呈する優性遺伝形式の一家系の原因遺伝子を同定する目的で解析を行なった。

## (2) 詳細

### ゲノム解析

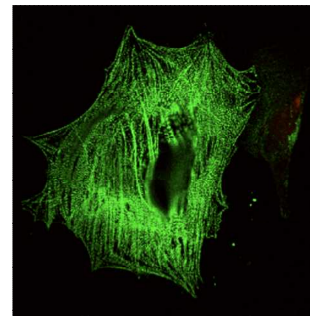
- インフォームドコンセントの元、右図5名のゲノムDNAを末梢血から抽出
- 既同定済みの類症のネマリンミオパチーおよび拡張性心筋症の原因遺伝子に変異が無い事を確認
- SNP タイピングより候補領域を決定。その領域から6691個が候補遺伝子
- 患者ゲノムに対しての全ゲノム解析および健康者1800人のゲノム情報との検索により、候補遺伝子を2個に絞り込んだ
- 一つは、構造タンパク質であり、もう一つは開始コドンから22番目のアミノ酸がストップコドンに変化する塩基置換であり、どちらも候補遺伝子になりうるものであった。
- 骨格筋および心筋細胞で2候補遺伝子すべてが発現していることをRT-PCRで確認



拡張性心筋症を伴うネマリンミオパチーの一家系

### 患者由来 iPS 細胞樹立

インフォームドコンセントの元、患者および母親(非発症者)の末梢血からT細胞を増幅させ、センダイウイルスベクターを用いて山中4因子を導入し、iPS細胞を樹立した。これらの細胞に対して、各種未分化マーカーで免疫染色およびアルカリフォスファターゼ染色を実施し、未分化性を有していることを確認した。また、テラトーマ形成能を有し、三胚葉に分化することを確認した。



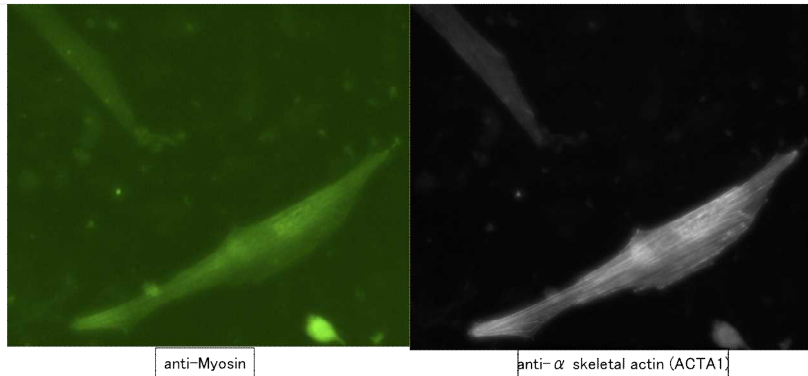
α-actininで免疫染色

### 心筋細胞への誘導

iPS細胞をDMEM(20%FBS)下でEB(胚様体)形成し約1ヶ月で拍動する細胞体を単離し、心筋細胞特異的マーカーを用いた免疫染色を行い、心筋細胞分化を確認した。心筋細胞に負荷を与えるため、10μMのノルアドレナリン刺激を1週間与えたが、患者細胞のみに期待されるようなα-アクチニンの局在変化は見られず、コントロール細胞にも局在変化がみられた。

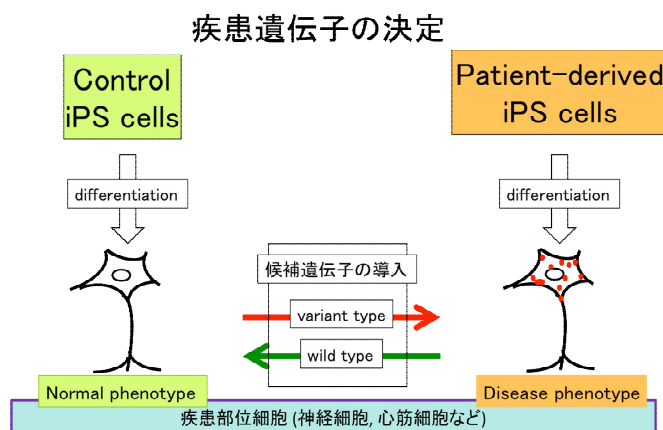
### 骨格筋細胞への誘導

Dox 誘導型 MyoD 発現 piggy ベクター(京都大学 iPS 細胞研究所 櫻井英俊博士から供与)を iPS 細胞に導入し、各種骨格筋細胞マーカーを用いた免疫染色を行い、骨格筋細胞分化を確認した。



一ヶ月以上長期培養を試みたが、期待されるようなネマリン小体は骨格筋細胞には認められなかった。

### 候補遺伝子から原因遺伝子への決定



ゲノム解析から候補遺伝子が2つに絞り込まれた。一つは2遺伝子とも骨格筋細胞および心筋細胞で発現していることは確認できた。どちらの塩基置換も疾患原因となりうるし、希少変異ともない。左図に示すように、コントロール iPS 細胞に候補変異遺伝子を導入・疾患部位細胞に誘導し、患者由来細胞と同様な表現形を示すかどうか。また患者 iPS 細胞の

ゲノムを正常型に編集して、表現形が消失するか否かで疾患遺伝子決定する。現在までのところ、残念ながら顕微鏡下での患者特異的な表現形は得られていない。現在は mRNA、タンパク質レベルでの患者特異的な表現形を探索している。

### 3. 今後の展開

原因遺伝子決定後は、その遺伝子変異によりどうして骨格筋細胞にネマリン小体が蓄積されるのか、および拡張性心筋症になってしまうのかという病態解明を実施する。本疾患は母親由来のアリルは正常型である。樹立した患者 iPS 細胞を用いて、この正常型の発現を上げると筋機能が回復されるのか？または父親由来の異常型アリルの発現を抑制すれば筋機能回復がみられるかどうかを中心に、治療法を探る。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

研究の狙いは、①iPS 細胞を樹立し、②疾患部位細胞へ分化誘導を行い、③患者特異的な表現形を得る事である。

これに関して、

- ・ 患者由来 iPS 細胞樹立の手技習得
- ・ 疾患部位細胞への分化誘導の手技習得

以上の2点は研究期間内に得られ、今後の研究に大きく貢献できると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

ゲノム研究と iPS を組み合わせる疾患メカニズムの例として採択された。当初の予定通り、ネマリンミオパシーの患者及び母親から iPS を作製し、神経分化誘導を行い、全ゲノム配列の決定も行い、候補となる遺伝子まで到達したと評価している。病態の解析については時間がかかると思うが、必ずやり遂げて欲しいと期待する。ただ、病気の名前の由来になったネマリン小体にこだわらず、病態を明らかにする事が重要だと感じた。さきがけ研究に直接関わる成果ではないが、共著論文は発表している。あとは出来るだけ早く、ネマリンミオパシーに関する論文を作成するよう期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Multiple-System Atrophy Research Collaboration: Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med*. 2013, 369, 233-244,
2. Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S.: ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet* 2013. 900-9005

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Date H, Ichikawa Y, Ahsan B, Tsuji S. Development for cloning method for the hereditary unknown disease gene using patient-derived iPS cells. International Society for Stem Cell Research 2012, June 14 10<sup>th</sup> Annual Meeting Yokohama.