

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Hirschsprung病類縁疾患： 「疾患特異的iPS細胞を用いた疾患解析と新規治療法開発の可能性」 に関する研究

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学iPS細胞研究所 副所長・特定拠点教授

【研究要旨】

Hirschsprung病やHirschsprung病類縁疾患は、小児期からの消化器系の希少難治性疾患群であり、その原因については不明な点が多い。本分担研究においては、疾患の原因解明を目的として、疾患特異的iPS細胞を樹立し、疾患解析を行った。

今回我々は、Hirschsprung病患者末梢血より疾患特異的iPS細胞を樹立し、iPS細胞を神経堤細胞・さらには末梢神経およびグリア細胞へと分化誘導する分化系を確立した。

本研究によりHirschsprung病やHirschsprung病類縁疾患の病態像が明らかになり、新規治療法の開発につながれば、患者や家族に福音をもたらすのみならず、医学研究領域に本邦発の大きなインパクトを与えることが期待される。

研究協力者

桐野 浩輔

（京都大学iPS細胞研究所

大学院特別研究学生）

Hirschsprung病類縁疾患は、その希少性により原因を含めた疾患概念に関するコンセンサスが十分に得られていないが、一部ではHirschsprung病と類似した腸管神経系発生異常が原因として考えられている。

A．研究目的

Hirschsprung病およびHirschsprung病類縁疾患は、ともに小児期より腸管蠕動不全をきたす疾患である。

Hirschsprung病は、胎生期における腸管神経系の発生異常によって生じ、腸管神経系細胞の前駆細胞である神経堤細胞の機能異常が主な疾患原因と考えられている。モデルマウスにおける表現型がヒトでの表現型と異なること・胎生期にのみ存在するヒト神経堤細胞を実験材料として手に入れることが困難であることなどから、ヒトにおける疾患解析は進んでいない。

近年、疾患特異的iPS細胞を用いることで、多くの疾患で発生段階における細胞機能異常を再現することが可能となった。本分担研究は、京都大学iPS細胞研究所・臨床応用研究部門を中心として、Hirschsprung病およびHirschsprung病類縁疾患の疾患特異的iPS細胞を用いた疾患解析を行い、腸管神経系細胞の発生異常であるHirschsprung病の疾患モデルを作成し、病態や遺伝型と表現型の相関などに関する新たな知見を得ることを目的とする。

B．研究方法

- 1) Hirschsprung病家族例（父・娘、娘の方がより重症）と非罹患家族（母）よりインフォームドコンセントを得て採取した末梢血（平成24年度に採取）より、ゲノムDNAを抽出した。原因遺伝子の抽出を目的とし、エキソーム解析を行った。解析用ツールとして、参照配列へのマッピングにはBWA(Burrows-Wheeler Aligner)を、一塩基変異および欠失/挿入変異のコールにはGATK(The Genome Analysis Toolkit)を用いた。
- 2) ヒトiPS細胞を神経堤細胞へと分化誘導し、CD271およびCD49d陽性の神経堤細胞をFACSにより分離・濃縮した。このヒトiPS細胞由来神経堤細胞を用いてsphereを作成、培養することで神経細胞・グリア細胞へ分化することを確認した。
- 3) 神経堤細胞をレチノイン酸で刺激することでRETを発現誘導し、RETのリガンドであるGDNFを添加した培地で培養し遊走能を比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は、九州大学病院および京都大学の臨床研究・遺伝子解析に関する倫理委員会の承認を得て開始された。

また、すべての試料は書面にてインフォームドコンセントを得て収集された。

C . 研究結果

- 1) ゲノムDNAを抽出し、エキソーム解析を行った。過去に論文での報告のあるRET遺伝子のヘテロ接合ナンセンス変異(c.C538T;p.R180X)が罹患患者である父・娘に同定された。同定された変異を、ゲノムDNAをPCRで増幅後に直接シーケンス法にて再解析した(図1)。

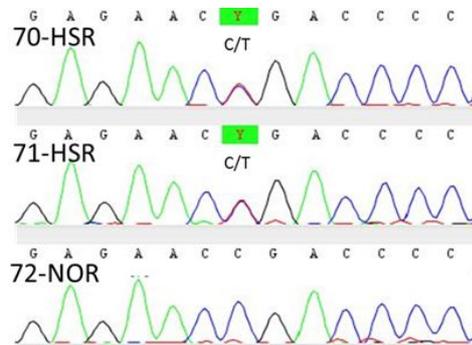


図1 . 同定されたRET遺伝子の変異

- 2) iPS細胞をTGF- 阻害剤(SB431542)を含む無血清培地を用いて7日間分化誘導した。神経堤細胞を含む細胞集団をフローサイトメトリーを用いて解析し、神経堤細胞マーカーであるCD271陽性、CD49d陽性の細胞を認め、この細胞をFACSにより分離することができた。
この神経堤細胞を、神経栄養因子(GDNF, BDNF, NGF)を添加した無血清培地で培養し、末梢神経およびグリア細胞を誘導した。免疫染色により末梢神経マーカーであるPeripherinおよびTuj1、グリア細胞マーカーであるGFAPの発現を確認した(図2)。

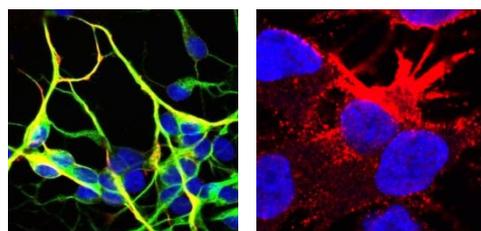


図2 . 末梢神経細胞およびグリア細胞

左:末梢神経細胞 Tuj1:緑,Peripherin:赤,DAPI:青
右:グリア細胞 GFPA:赤,DAPI:青

- 3) 神経堤細胞をレチノイン酸(all-trans型)で48時間刺激し、RETの発現誘導を行った(図3)。このRET陽性神経堤細胞を用いて遊走能解析を行った。RETのリガンドであるGDNFを添加することにより、神経堤細胞の遊走が促進された(図4)。

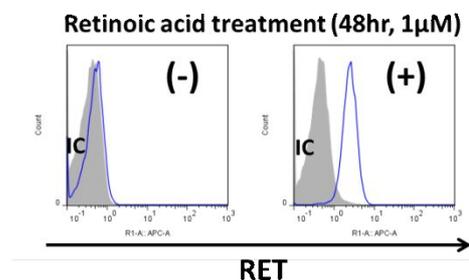


図3. 神経堤細胞のRET発現誘導

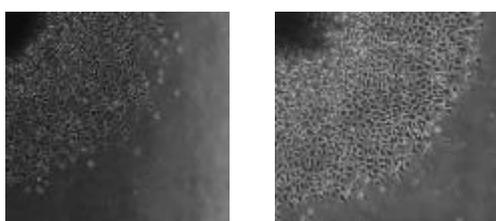
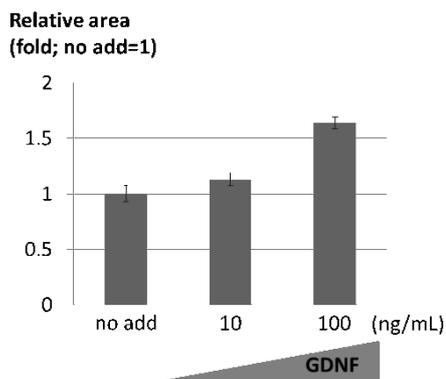


図4. RET陽性神経堤細胞の遊走能解析

D. 考察

平成24年度に引き続き、疾患特異的iPS細胞を用いたHirschsprung病の解析を行った。本年は以下の成果が得られた。

樹立したHirschsprung病家族例のエキソーム解析を行い、疾患に関与すると思われるRET遺伝子のヘテロ接合ナンセンス変異を同定した。ヒトiPS細胞由来神経堤細胞が神経細胞・グリア細胞に分化することを確認した。ヒトiPS細胞由来神経堤細胞では、レチノイン酸刺激によりRETが発現誘導された。またRET陽性神経堤細胞はそのリガンドであるGDNFの存在により遊走が促進された。

今後、解析系をより洗練することで、Hirschsprung病モデルを確立することが期待できる。

E. 結論

疾患特異的iPS細胞を用いることにより、これまで困難であったヒト神経堤細胞の機能異常を解析することが可能となった。神経堤細胞に由来する腸管神経系の発生、および腸管神経系の発生異常に起因するHirschsprung病やHirschsprung病類縁疾患といった疾患の病態については不明な点が多い。本研究はこれらの疾患原因を解明する糸口になると考えた。

F. 研究発表

論文発表

1. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. PLoS ONE. 4/3/2013; 8(4): e59243.
2. Kondo T., Asai M., Tsukita K., Kutoku Y., Ohsawa Y., Sunada Y., Imamura K., Egawa N., Yahata N., Okita K., Takahashi K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Watanabe K., Kadoya C., Nakano R., Watanabe D., Maruyama K., Hori O., Hibino S., Choshi T., Nakahata T. Hioki H., Kaneko T., Naitoh M., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Hata R., Ueno S., Seki T., Kobayashi K., Toda T., Murakami K., Irie K., Klein W.K., Mori H., Asada T., Takahashi R., Iwata N., Yamanaka S., Inoue H.: Modeling Alzheimer's disease using iPSCs

- reveals stress phenotypes associated with intracellular A and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12(4):487-496. 2013.
3. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 2013 Aug.23.98: doi 10.3324/haematol. 2013. 083873
 4. Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., Naitoh M., Takahashi K., Yamamoto T., Adachi F., Kondo T., Okita K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Yamada Y., Morizane A., Takahashi J., Ayaki T., Ito H., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Watanabe D., Hioki H., Kaneko T., Makioka K., Okamoto K., Takuma H., Tamaoka A., Hasegawa K., Nonaka T., Hasegawa M., Kawata A., Yoshida M., Nakahata T., Takahashi R., Marchetto M.C., Gage F.H., Yamanaka S., Inoue H.: Response to Comment on "Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells". *Science Transl. Med.* 06/2013; 5(188):188r2. DOI:10.1126/scitranslmed. 3005697
 5. 齋藤潤, 中畑龍俊: 疾患特異的iPS細胞. *再生医療*12(1):19-29,2013.
 6. 中畑龍俊: 総論疾患iPS細胞の樹立と臨床病態解析への応用. *Medical Science Digest (MSD)* 39 (11) : 4(504)-6(506) 2013.
1. 中畑龍俊: 特別講演、iPS細胞研究が切り開く未来の医療. 日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」 2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂
 2. 中畑龍俊: 特別講演、iPS細胞の小児医療への応用. 第38回東日本小児科学会 2013年11月23日 大宮ソニックシティ(さいたま市)
 3. 中畑龍俊: 教育講演、iPS細胞の臨床応用. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013年11月29日-12月1日(30日) ヒルトン福岡シーホーク
 4. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
 5. Yoshida M., Kitaoka S., Yamane M., Tsukita K., Inoue H., Saito M., Nakahata T.: Spinal moter neurons generated from induced pluripotent stem cells derived from spinal muscular atrophy patients failed to cluster acetylcholine receptors at the neuromuscular junctions. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

学会発表