

による症候群であるが、症状は異なる。

生後の筋緊張低下、体重増加不良、精神運動発達遅滞(特に言語発達が遅れる)、広汎性発達障害、低身長を主な症状とする。

特異顔貌として、三角形顔貌(頭部とくらべて下顎が小さい)、平坦な人中、高口蓋、前頭部突出、上顎、下顎低形成を認めた。粘膜下口蓋裂や二分口蓋垂の例もあった。今回、1歳男児で診断が確定した。

(12) 22q11.2 欠失症候群

4歳女児で精神運動発達遅滞を認めた。本症候群ではファロー四徴症など先天性心疾患が多いが、本例は認めなかった。なお、一般的な 22q11.2 欠失症候群では約1.5Mb の欠失であるが、本例では3Mb の領域が欠失していた。

(13) Xq21欠失症例

6歳男早産低出生体重児であった。重度精神運動発達遅滞を認めた。感音難聴と診断され、補聴器装着の上、難聴療育訓練開始となった。歩行開始は3歳であるが、有意語はまだない。染色体検査マイクロアレイ法実施した結果、X染色体の欠失領域にコロイデミア遺伝子を含んでいた。しかし、眼底などを眼科で精査した軽度斜視以外に有意な所見を認めなかった。

(14) Xq28重複症候群(MECP2 重複症候群)

重度精神運動発達遅滞、自閉症症状を伴い、有意語を獲得できない例が多い。乳児期は筋緊張低下から、運動発達が遅延する。呼吸器感染を反復し、感染症の重症化、治癒遷延が特徴的である。進行性の瘻性、けいれんが出現する。

MECP2 以外に Xq28にある L1CAMも重

複する例が多い。母親が重複保因者であることがある。

感染症とてんかんが大きな問題である。Xq28 重複症候群は X連鎖性知的障害の中で比較的多く存在するとされておいる。重複領域から過剰に発現する遺伝子の抑制を検討することが治療につながる可能性もあり、今後の研究の発展がまたれる。

今回、いとこ関係にある男児2例で Xq28 重複が証明された。母親は姉妹であり、重複の保因者であった。慎重に遺伝カウンセリングを実施した。

D. 考察

G 分染法などでは異常なく、診断が不明であった症例において、マイクロアレイ染色体検査に変化を見だし、診断に至ることができた。解析結果から、特定の原因遺伝子が示唆され、病態の解明に有用なデータが得られた例が存在した。突然変異の例では、次子の罹患の可能性が非常に低いことが証明され、遺伝カウンセリングにとって重要であった。ただし、最近親が児と同じ欠失や重複を低頻度のモザイクで有する例が報告されており、一応の配慮は必要であると考えられる。

マイクロアレイ染色体検査で異常を認めなかった症例の一部について、次世代シーケンサー解析を行った結果、有意な遺伝子変異を同定した例もあった。次世代シーケンサー解析にあたっては、事前のマイクロアレイ解析で病的 CNVs を把握しておくことは重要と考えられる。

次年度は一部の症例において iPS 細胞作成を行い、さらに病態解明のための研究を進展させる予定である。

E. 結論

マイクロアレイ染色体検査によって、診断不明であった多くの症例で病態解明の端緒が得られた。iPS 細胞作成を通じて、さらに詳細な病態解析をすすめる予定である。

F. 研究発表

論文などは別途記載

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

自閉症・発達障害患者の診断支援

研究代表者 小坂 仁 自治医科大学小児科・教授
研究協力者 大森 司 自治医科大学分子病態研究部
青木志保 自治医科大学小児科

研究要旨

自閉症患者由来の iPS から機能的シナプスを作成し、その電気生理的機能を測定することにより、特徴的な表現型を可視化し、それを指標に治療薬の開発を目指す。本年度は、ヒト iPS から機能的シナプスを安定して作成する系の構築を目指し、シナプス形成のためのマウスグリア調整、神経分化のための Neurogenin-2 を組み込んだ第 3 世代 HIV 型レンチウイルスベクターの作成を行い、安定してウイルスベクターの感染を確認した。今後、神経分化の安定した条件検討を行う。

A. 研究目的

小児難治性疾患の中でも、最も頻度の多い自閉症は、一生に渡り本人と家族の生活に影響を与える重篤な疾患である。パーキンソン病やアルツハイマー病のような、病理学的な変化を欠くため、その原因特定は困難であった。ゲノムワイドな解析により、原因となる遺伝子変異が特定されつつあり、それらの多くはシナプスの構造や機能に関わる分子である。一方 iPS 技術により、患者由来の血液ないし皮膚等の細胞より、初期化した iPS から神経系の細胞への分化、および機能的なシナプスの解析が可能となった。本研究班では、上記背景に基づき、自閉症患者由来の iPS から機能的シナプスを作成し、その電気生理的機能を測定することにより、特徴的な表現型を可視化し、それを指標に治療薬の開発を目指す。本年度は、iPS から機能的シナプスを安定して作成する系の構築を目指した。

B. 研究方法

① 初代マウスグリア細胞の調整

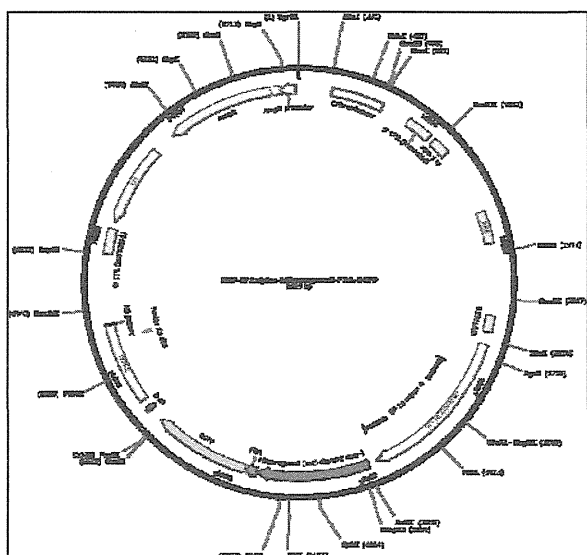
iPS はマウスの glial culture (Ejarque, A., et al. 2007 Glia)。P1-P2 の新生児マウスの 7 匹から大脳皮質と海馬を採取し冷却した PBS に入れ、脳軟膜を除去する。小さなはさみで細切し 50ml tube に入れる。200g で 3 分間遠心し、上清を捨て、12ml の加温した Trypsin-EDTA (GIBCO #25200-072) に加え、inversion により再懸濁させる。恒温槽で 100rpm で振盪しながら 37°C , 10min 間インキュベーション。0.5ml DNase I (Sigma D-5025) を加えた 12ml DFF10 を加えてトリプシンを失活させる。(DFF10 の組成 ; DMEM: F12 1:1 (GIBCO #31330-038; with Gln and HEPES) + 10%FBS + antibiotics (Pen/Strp))(DNase I, 150,000 units/10 ml PBS)。10-12 回 inversion で攪拌し年長な DNA が出現したら、パイペティングを組織片が見えなくなるまで行い(40-60 回)、単一細胞にし、200g で 7 分間遠心する。上清をとり捨て、DFF10 を 20ml 加え、ピペットで攪拌する。105 μ m mesh (Spectrum (1-800-6343300) #146436)) で細胞浮遊液をフィルター濾過し、

細胞をカウントする(通常 4-5x10⁶ cells/pup)。細胞の最終濃度を 300,000 cells/ml with DFF10 とする。96-, 48-, 24- or 6-well plate にそれぞれ、150μl, 300μl, 500μl, 2.5ml per well で播種する。5日後にメディウム交換を行い、以後週一回のペースで行い、8~12日でコンフルエントとなる

② ベクター精製

iPS細胞をニューロンに分化させる能力を持つ分化誘導遺伝子 Neurogenin-2 を第3世代 HIV 型レンチウイルスベクターの遺伝子発現カセットに EF1 プロモーター/F2A/neurogenin/c-Myc/EGFP の順に組み込んだプラスミドベクターを pCR-2.1 TOPO (Invitrogen)にて作成し、第3世代レンチウイルスベクターのパッケージ用発現プラスミドであり、それぞれ CMV プロモーターの下流に gag-pol, rev, VSV-G 遺伝子, ABPC 耐性遺伝子を搭載する pLP-1 (gal-pol; Invitrogen), pLP-2 (Rev; Invitrogen), pVSV-G (Clontech) の3種類のパッケージ用発現プラスミドを大腸菌により調整する(宿主大腸菌は Stbl3 と TOP10

Fig. 1 HIV 型レンチウイルスベクター;EF1 プロモーター



の二種類を用いる;P1)。得られたプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションレンチウイルスベクターを作成する(Fig. 1)。

③ 神経誘導

iPS は、山中らが樹立した、iPS-TIG120-4f1 (JCRB1363)を用いた、Accutase (Innovative Cell Technologies)にて細胞を遊離させ、24 ウェルプレートに播種する (iPS: 1.5X10⁴ cell/well) また、matrigel (BD Biosciences)をコートした、カバーグラスを入れておき、2 mM thiazovivin (BioVision)を含むフィーダーフリーヒト ES/iPS 細胞維持用培地である mTeSR1 (modified Tenneille Serum Replacer 1) (Stem Cell Technologies)を加える。Day -1; polybrene (8 μg/ml, Sigma)を含む mTeSR1 medium に培地交換した後レンチウイルスを24ウェルプレートあたり0.3・l加える。Day 0; 培地を human BDNF (10 mg/l, PeproTech), human NT-3 (10 mg/l, PeproTech), マウス laminin (0.2 mg/l, Invitrogen)を含む N2/DMEM/F12/NEAA (Invitrogen) に変更する。Day 1; glial mixture を加え、培地を Neurobasal medium (Life Technology) +B27/ Glutamax (Invitrogen) containing BDNF and NT3; またアストロサイトの増殖を止めるため Ara-C (2 g/l, Sigma)も添加する。Day 2以降;2日毎 50%メディウムを交換し、10日目以降は FBS (2.5%) を加え day 14 ないし 21 で観察する。

C. 研究結果

① 初代マウスグリア細胞の調整

グリア細胞の形態を持ち、GFAP; Glial fibrillary acidic protein 陽性のグリア細胞を

調整することが可能であった (Fig. 2)。

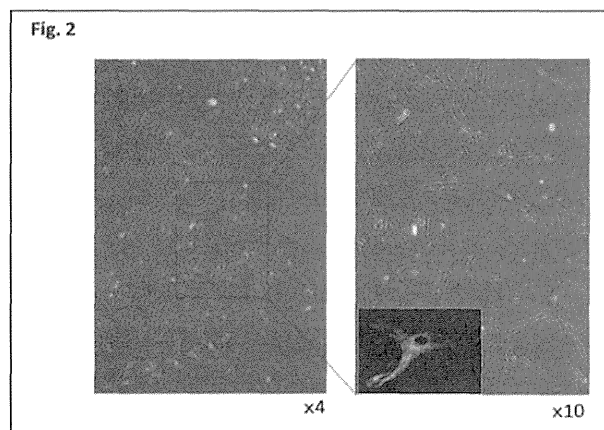


Fig. 2 マウス初代グリア細胞
(左 4 倍、右 10 倍)、左下部; EGFP; Glial fibrillary acidic protein に対する抗体染色

②ベクター精製

下図の如く、ほぼすべての細胞への感染を EGFP の発現で確認できた (Fig. 3)

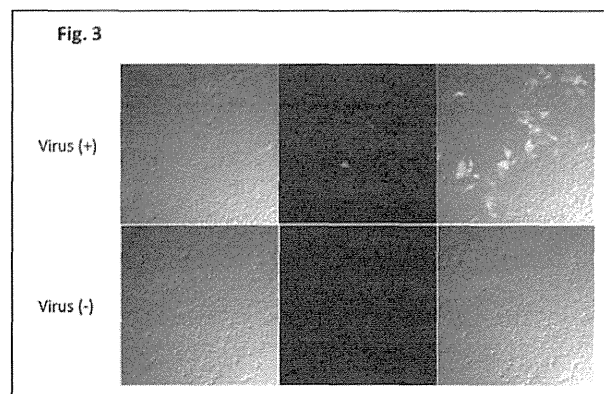


Fig. 2 マウス初代グリア細胞
上段; ウイルス添加あり、下段; ウイルス添加なし。左、明視野、中; GFAP、右; 明視野+蛍光

② 神経分化

現在のところ死細胞が多いため、条件を検討している。

D. 考察

iPS 細胞から、ニューロン分化をへてシナプス形成に至るステップのうち、マウスグリア

調整、神経分化のための Neurogenin-2 の HIV 型レンチウイルスベクターの遺伝子発現カセット作成を行い、安定してウイルスベクターの感染を確認した。

E. 結論

今回検討した iPS からのシナプス形成法のうち、

グリア細胞の調整、ベクター精製までを確立することができた。今後安定した神経分化の調整を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? *Hum Genet* 133; 225-34, 2014.
2. Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol* 53; 448-58, 2014.
3. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endo F, Yoshinaga H. A Japanese adult case of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *JIMD Rep* 12; 65-9, 2014.
4. Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel two-nucleotide deletion in the ATP7A gene associated

- with delayed infantile onset of Menkes disease. *Pediatr Neurol* 50; 417-20, 2014.
5. Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab Report* 1; 133-138, 2014.
 6. Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A three-year-old boy with glucose transporter type 1 deficiency syndrome presenting with episodic ataxia. *Pediatr Neurol* 50; 99-100, 2014.
 7. Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. *J Hum Genet* 59; 471-4, 2014.
 8. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology* 82; 2230-7, 2014.
 9. Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H. Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. *Brain Dev* [in press]
 10. Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology* 82; 1587-96, 2014.
 11. van de Kamp J, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren S, Mancini G, Steinberg S, Salomons G. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. *Clin Genet* [Epub ahead of print]
 12. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol* 261; 752-8, 2014.
 13. Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia* 55; e13-7, 2014.
 14. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M,

- Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. *Stem Cell Reports* 2; 648-61, 2014.
15. Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Brain Dev* [Epub ahead of print]
16. Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. *J Hum Genet* [Epub ahead of print]
17. Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saito H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Creeleukoencephalopathy. *Brain Dev* [Epub ahead of print]
18. Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada T, Saito H, Imai Y. Intracranial hemorrhage and tortuosity of veins detected on susceptibility-weighted imaging of a child with a type IV collagen $\alpha 1$ mutation and schizencephaly. *Magn Reson Med Sci* [Epub ahead of print]
2. 著書
1. 小坂 仁. 大脳萎縮症 編集 水澤秀洋、新領域別症候群シリーズ No.29「神経症候群(第2版)IV、日本臨牀社 p.319-324. 2014
2. 小坂 仁. 小脳萎縮症 編集 水澤秀洋、新領域別症候群シリーズ No.29「神経症候群(第2版)IV、日本臨牀社 p.325-328. 2014(査読無)
3. 学会発表
1. Osaka H, Shimbo H, Murayama K, Ohtake A, Aida N. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mitochondrial Medicine* 2014: Pittsburgh, PA June 4-7, 2014.
2. 高木真理子, 佐藤睦美, 安西里恵, 奥田美津子, 露崎悠, 高野亨子, 井合瑞江, 中村和幸, 才津浩智, 小坂 仁, 山下純正. ガバペンチンが有効であった GNAO1 変異をもつヒョレアアテトーシスの一例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
3. 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子, 奥田美津子, 露崎悠, 高野亨子, 井合瑞江, 中村和幸, 才津浩智, 小坂 仁, 山下純正. 重度精神遅滞, 難治性てんかんの臨床像を示し, PIGO 遺伝子変異が同定された 1 例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
4. Osaka H, Tsuyusaki Y, Iai M, Yamashita S, Shimozawa N, Eto Y, Saito H. Whole exome sequencing

- reveals molecular basis of childhood cerebellar atrophy. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
5. Kouga T, Takagi M, Anzai R, Sato M, Okuda M, Takano K, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in cases of Dravet syndrome. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 6. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo E, Yamagata T. Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome. 2014.10.18-22 第 64 回アメリカ人類遺伝学会(サンディエゴ)
 7. 池田尚広, 山崎雅世, 鈴木峻, 門田行史, 小坂仁, 杉江秀夫, 新保裕子, 山形崇倫. ミトコンドリア DNA m.3243A>T 変異を認めた mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes の 1 例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 8. 山本亜矢子, 和田敬仁, 新保裕子, 松本直通, 小坂仁. Infantile Neuroaxonal Dystrophy 様の脳 MRI 所見を示した SLC9A6 変異を有する一例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 9. 露崎悠, 井合瑞江, 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子, 奥田美津子, 高野亨子, 小坂仁, 山下純正, 才津浩智. 治療可能な小脳失調: Cerebral Folate Transport Deficiency の同胞例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 10. 宮内彰彦, 門田行史, 池田尚広, 川原勇太, 長嶋雅子, 小坂仁, 杉江秀夫, 森本哲, 渡辺浩史, 下泉秀夫, 下澤伸行, 山形崇倫. 当院における副腎白質ジストロフィー6例の臨床的検討. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 11. 奥田美津子, 佐藤睦美, 安西里恵, 高木真理子, 露崎悠, 高野亨子, 井合瑞江, 小坂仁, 山下純正. 非造影灌流画像, ASL で最も鋭敏にとらえた MELAS の脳卒中様発作の一例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 12. 佐藤睦美, 高木真理子, 安西里恵, 奥田美津子, 露崎悠, 高野亨子, 小坂仁, 井合瑞江, 山下純正. 頸部動脈解離による脳梗塞. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 13. 吉原尚子, 和田敬仁, 高木真理子, 佐藤睦美, 安西里恵, 奥田美津子, 露崎悠, 小坂仁, 高野亨子, 井合瑞江, 山下純正. くも膜下出血を合併した Reversible cerebral vasoconstriction syndrome の女児例. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松
 14. 池田尚広, 山形崇倫, 谷口祐子, 宮内彰彦, 石井朋之, 長嶋雅子, 門田行史, 小坂仁, 杉江秀夫. 早期ステロイドパルス療法によるけいれん重積型急性脳症発症予防効果の検討. 56 回日本小児神経学会

2014.5.28-2014.5.30. 浜松

15. 宮内彰彦、門田行史、長嶋雅子、杉江秀夫、小黒範子、小坂仁、山形崇倫.
日内変動を伴うジストニアを認める自閉症スペクトラム障害の男児例.
2014.9.20 第61回日本小児神経学会
関東地方会(筑波)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業)

「ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の
疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と治療法開発」

分担研究報告書

「疾患特異的 iPS 細胞の形態・機能評価手法の確立」

研究分担者 永田浩一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 部長

【研究要旨】

研究目的:

本研究班の研究者によって確立された自閉症・発達障害の疾患特異的 iPS 細胞、およびそれらに由来する神経細胞のシナプス形態・ダイナミクスを解析するための実験技術開発とデータ収集を目的とする。特に、*in vitro* および *in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡観察下ライブイメージ法の有効利用に主眼を置く。

研究方法:

実験法開発のためにマウス海馬神経細胞をモデルとして用い、GFP でラベルして共焦点レーザー顕微鏡観察下で培養し、シナプスの動態を *in vitro* ライブイメージする実験条件を決定する。条件決定後は、神経細胞で自閉症・知的障害 (ASD/ID) 原因遺伝子を発現抑制して表現型を観察することで実験系の有効性を確認する。さらに、発達期のマウス大脳で神経細胞を *in vivo* 蛍光ラベルした後スライス培養を行い、共焦点レーザー顕微鏡観察下で経時的にシナプスをライブイメージ観察できる実験条件を決定する。

結果と考察:

in vitro ライブイメージ実験系は当初の計画通りに進み、構築の目処が立った。実際に基礎実験を行なって ASD/ID 原因遺伝子を発現抑制すると、スパイン形態のダイナミクスに変化が生じる様子が観察された。培養条件の均一化や表現型の定量化などに課題が残っており、現在検討中である。一方、*in vivo* ライブイメージ実験系の確立は途上の段階である。培養中に神経細胞死が高頻度で起きたため、酸素分圧などを再調整して実験条件を検討中である。

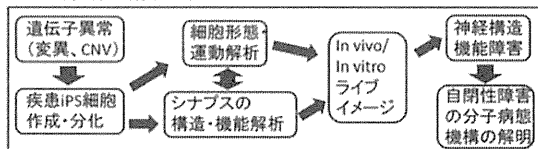
結論:

in vitro ライブイメージ実験系の運用は実用化の目処がついた。実験系の確立に伴って浮上した課題点を解決し、ASD/ID 細胞を用いた解析を遂行したい。一方、*in vivo* ライブイメージ実験系については、効率よく実験条件の決定を行い、早期の稼働に繋げる必要がある。

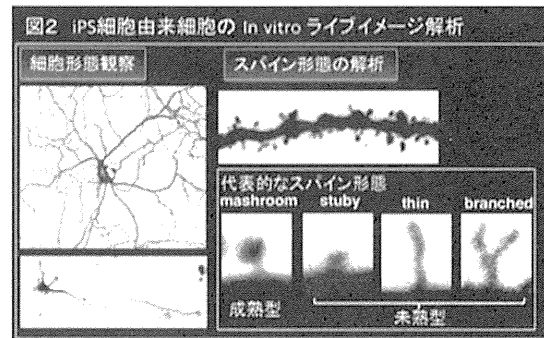
A. 研究目的

自閉性障害(ASD)や知的障害(ID)の病態にはシナプス構造・機能障害が重要な役割を果たす。しかし、シナプス障害の分子メカニズムやダイナミクスは殆ど判っていない。これまでも固定切片を用いた形態解析は多用されてきたが、本研究計画では、共焦点顕微鏡ライブイメージングによる解析を目指す。この手法により、個々の神経細胞の形態・移動・局在が時間的・空間的にビデオ解析可能となり、得られる情報が飛躍的に増大する。固定切片で見逃されていた「動的な異常」も容易に捕捉可能になる。本研究では、ゲノム構造異常によって発症した ASD・発達障害患者由来の iPS 細胞やそれらに由来する神経細胞を、in vitro および in vivo でライブイメージ観察することでシナプス動態の解析を行う (図 1)。

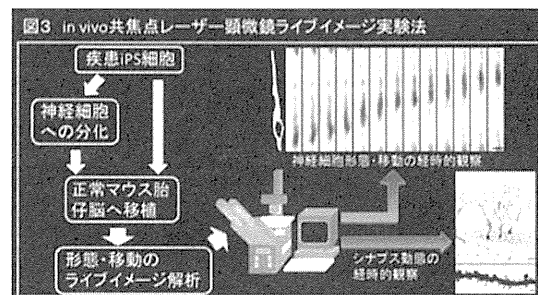
図1 分担者の研究ストラテジー



初年度は実験系の確立を目標とする。最初に、in vitro 共焦点顕微鏡ライブイメージ実験系を確立する。この実験系を用いて、シナプス構造を、1) スパイン初期形成、2) スパインの経時的形態変化、3) スパイン密度変化、の3要素に分け、疾患モデル神経細胞におけるシナプス障害のダイナミックな実態の解明を実現する (図 2)。



さらに、In vivo ライブイメージ実験系の確立を目指す。すなわち、発達期のマウス大脳皮質へ疾患モデル神経細胞や疾患 iPS 細胞そのものを顕微鏡観察下で注入し、正常な脳内環境における疾患由来細胞の形態・シナプス動態を解析する (図 3)。



In vitro と in vivo の2通りの実験法を組み合わせ、ASD 由来神経細胞の包括的形態解析を遂行する。これらの解析を通して、個々の遺伝子異常と臨床症状の間に介在する「中間表現型」としてのシナプス動態の意義付けを試みる。

B. 研究方法

1. 培養海馬神経細胞を用いた共焦点レーザー顕微鏡ライブイメージ法の確立

ASD や ID の病態形成にはシナプスの障害が必須の役割を果たす。疾患特異的 iPS 細胞に由来する神経細胞のシナプス病態を分子・細胞レベルで観察するための有力な手法として、共焦点レーザー顕微鏡を用いたシナプス動態解析が挙げられる。

そこで本項では、*in vitro* ライブイメージ実験系の確立を行う。現有のオリンパス共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 に高性能カメラと培養装置をセットする。モデル細胞としてマウス海馬神経細胞を用いて、シナプス形成のダイナミクスを経時観察できる条件設定を行なう。マウス海馬神経細胞は培養中に細胞極性を獲得してシナプスを形成することから、本項におけるモデル細胞として最も適している。具体的には、胎生 16 日目 (E16) に分離した海馬神経細胞に、既に報告されている ASD・ID 原因遺伝子の RNAi ベクターや病変変異体を導入し、14 日間培養 (14div) した後に樹状突起スパインのライブイメージ解析を行う。スパイン形成が時間・空間的に障害を受ける場合、その遺伝子は、シナプス構造・機能障害に関与していることになる。

2. *in vivo* ライブイメージング法の確立

本項ではマウス大脳皮質における神経細胞形態・シナプス動態の *in vivo* ライブイメージ実験法を開発する (図 3)。項目 1) と同様に、実験系の構築のためには正常マウス神経幹細胞を用いる。すなわち、蛍光ラベルしたマウス神経幹細胞を、E14.5 のマウス胎児大脳皮質に微量移植する。その後、E16.5 から生後 10 日 (P10) まで経時的に大脳皮質スライスを作製し、正常な脳内発育環境が保たれている条件下で移植した細胞を形態学的に解析し、シナプス形成の有無を確認する。シナプスが確認できた場合は、FV-1000 共焦点レーザー顕微鏡観察下で培養・ライブイメージ実験を遂行し、シナプス動態をより生理的な条件 (組織レベル) で観察する。

上記の実験系を構築した後は、疾患特異的 iPS 細胞由来神経細胞や分化前の iPS 細胞そのものを正常マウス胎仔脳内に微量移植し、上記と同様な形態解析を行なう。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱い、所属機関の動物委員会による承認を受けており、“動物実験の適正な実施に向けたガイドライン”に従って行う。組換え DNA 実験についても所属機関の DNA 実験による承認を受けており、法令とガイドラインを遵守して研究を行う。

C. 研究結果

in vitro ライブイメージ実験系の確立は順調に進んだと考えられる。正常のマウス海馬神経細胞を用いたコントロール実験では、スパイン形態の変化を経時的に記録・観察することが出来た。現在の課題としては、細胞培養条件の均一化や定量的観察法の確立などがある。課題を克服して、疾患モデル神経細胞におけるシナプス障害のダイナミックな実態解析を目指す (図 2)。

in vivo ライブイメージング法の確立に関しては、現在、大脳皮質スライスを共焦点顕微鏡下で培養する条件 (観察時間、培地組成、酸素供給方法) を検討中である。週令が進んだマウス大脳のスライス培養では神経細胞死が起こりやすいため、培養条件 (特に酸素の分圧と供給方法) を綿密に検討中である。

D. 考察

実験系の構築に当たり、当初は想定しなかった様々な課題が生じた。特に、実験ごとに細胞の状態が微

妙に異なる場合、コントロール実験を注意深く設定したうえで定量的解析を行なう必要があることが判った。また、多彩な表現型を正しく定量化するための解析方法の設定も重要であると考えられた。

E. 結論

in vitro ライブイメージ実験系は実用化の目処が見ついた。一方、in vivo ライブイメージング法の構築については、さらなるスライス培養条件の検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 山形崇倫、松本歩、永田浩一：自閉性障害の多様な遺伝学的病態とシナプス関連病因遺伝子の解析。脳と発達 Vol. 46 No. 2 125-130, 2014
- ② Ito H, Morishita R, Tabata H, Nagata K: Roles of Rho small GTPases in the tangentially migrating neurons. *Histol. Histopathol.* 29: 871-879, postnatal newborn neurons in the 2014.
- ③ Mizutani Y, Iwamoto I, Kanoh H, Seishima M, Nagata K: Expression of Drebrin, an actin binding protein, in basal cell carcinoma, trichoblastoma and trichoepithelioma. *Histol Histopathol* 29, 757-766, 2014
- ④ Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura VY, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata K: *SILL1*, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol. Med.* 6: 414-429, 2014
- ⑤ Tanabe K, Yamazaki H, Inaguma Y, Asada A, Kimura T, Takahashi J, Taoka M, Ohshima T, Furuichi T, Isobe T, Nagata K, Shirao T, Hisanaga S: Phosphorylation of Drebrin by cyclin-dependent kinase 5 and its role in neuronal migration. *PLOS ONE* 9(3): e92291, 2014.
- ⑥ Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Nozaki Y, Jimbo F E, Momoi Y M, Nagata K, Yamagata T: LIN7A depletion disrupts cerebral cortex development, contributing to intellectual disability in 12q21-deletion syndrome. *PLOS ONE* 9(3) e92695, 2014
- ⑦ Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Nagata K: Establishment of an in vivo electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 24:1449-1457, 2014.
- ⑧ Mizuno M, Matsumoto A, Hamada N, Ito H, Miyauchi A, Jimbo F E, Momoi Y M, Tabata H, Yamagata T, Nagata K: Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. *J. Neurochem.* 132: 61-69, 2015.

- ⑨ Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima Y, Mizutani K, Nagata K, Nakajima K, Kawauchi T: Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development in press*
- ⑩ Inaguma Y, Ito H, Hara A, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, Nagata K: Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development. *Neurosci. Res.* in press
- ⑪ Lee S-A, Kim S-M, Suh B K, Sun H-Y, Park Y-U, Hong J-H, Park C, Nguyen M D, Nagata K, Yoo J-Y, Park S K: *Disrupted-in-schizophrenia 1* (DISC1) regulates dysbindin function by enhancing its stability *J. Biol. Chem.* in press
- ⑫ 浜田奈々子, 稲熊裕, 永田浩一: 発達障害の背景としての大脳皮質構築異常. 生化学 (みにれびゅー) in press

2. 学会発表

シンポジウム

- 1) Tabata H, Sasaki M, Takebayashi H, Ema M, Ikenaka K, Nagata K, Nakajima K: The migration of glial progenitors derived from the cortical ventricular zone. *Cortical Development Conference 2014* (Crete, Greece) 2014.5.25.
- 2) 永田浩一, 浜田奈々子, 松本歩, 山形崇

倫: シンポジウム: 変貌する自閉症スペクトラム障害の医療: 病態に立脚した診断から治療へ. 自閉症スペクトラム障害の病態関連遺伝子の機能解析. 日本小児神経学会学術集会 (浜松) 2014. 5. 31.

3) Hamada N, Ito H, Tabata H, Nagata K: Comprehensive approach with an analytical battery to understand pathophysiological role of RBFOX1/A2BP1, a "hub" gene in the ASD gene transcriptome network. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Pathways of Neurodevelopmental Disorders* (Tahoe) 2015.3.18.

一般演題

- 4) Inaguma Y, Tabata H, Higashi Y, Hattori M, Nagata K: Possible molecular and architectural relationship between brain development and angiogenesis. *International Vascular Biology Meeting 2014* (Kyoto) 2014.4.14.
- 5) Inaguma Y, Hamada N, Mizuno M, Ito H, Tabata H, Nagata K: SIL1-HSPA5 chaperone system plays an important role in the developing cerebral cortex. *Cortical Development Conference 2014* (Crete, Greece) 2014.5.24.
- 6) Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H: Possible role of A2BP1, an autism-related molecule, in developing cerebral cortex. *FENS Forum 2014* (Milan) 2014.7.8.
- 7) Ito H, Morishita R, Iwamoto I,

- Nagata K: Establishment of an *in vivo* electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. American Society for Cell Biology Annual Meeting (Philadelphia) 2014.12.8.
- 8) Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H: Role of A2BP1, a candidate gene for ASD, in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. American Society for Neuroscience Meeting (Washington DC) 2014.12.18.
- 9) Tabata H, Sasaki M, Takebayashi H, Ema M, Ikenaka K, Nagata K, Nakajima, K: Unique migration of glia progenitors during the cortical plate development in mice. International Symposium of Neurovascular Wiring (Kyoto) 2015.1.28.
- 10) 稲熊裕, 浜田奈々子, 田畑秀典, 伊東秀記, 水野誠, 永田浩一: SIL1 欠損神経細胞の移動に関するライブイメージング解析. 日本実験動物学会総会 (札幌) 2014. 5. 14.
- 11) 浜田奈々子, 稲熊裕, 田畑秀典, 水野誠, 西村嘉晃, 伊東秀記, 大野欽司, 永田浩一: SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. 第78回日本生化学会中部支部例会 (名古屋) 2014.5.24.
- 12) 松本歩, 楊志亮, 中山一大, 神保恵理子, 岩本禎彦, 永田浩一, 山形崇倫. 発達障害患者における時計関連遺伝子の変異解析. 第56回日本小児神経学会学術集会 (浜松) 2014.5.30.
- 13) 永田浩一, 浜田奈々子, 松本歩, 山形崇倫: 自閉症スペクトラム障害の病態関連遺伝子の機能解析. 日本小児神経学会学術集会 (浜松) 2014. 5. 31.
- 14) 稲熊裕, 浜田奈々子, 永田浩一: 脳神経系におけるコシヤペロン蛋白質の役割を *in vivo*, *ex vivo* で解析する. 東海実験動物研究会 (名古屋) 2014. 8. 30
- 15) 浜田奈々子, 田畑秀典, 伊東秀記, 永田浩一: Autism risk gene, A2BP1, plays an essential role in cortical development. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014. 9. 12.
- 16) 田畑秀典, 佐々木恵, 竹林浩秀, 依馬正次, 池中一裕, 永田浩一, 仲嶋一範: 皮質脳室帯由来グリア前駆細胞がとる特徴的な移動様式. 日本神経科学大会 (横浜) 2014. 9. 12.
- 17) 浜田奈々子, 伊東秀記, 田畑秀典, 永田浩一: 自閉症原因遺伝子 A2BP1 の大脳皮質形成における機能解析. 第57回日本神経化学会大会, 奈良, 2014. 9. 29
- 18) 水野誠, 永田浩一, 浜田奈々子, 松本歩, 山形崇倫. 自閉症性障害における Lin7B 遺伝子の関与. 神経化学会大会 (奈良) 2014. 9. 30
- 19) 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: エレクトロポレーション法による生後マウス海馬歯状回における神経新生の解析. 日本神経化学会大会 (奈良) 2014. 10. 1.

- 20) 永田浩一，浜田奈々子，伊東秀記，田畑秀典：自閉症原因遺伝子 A2BP1 の大脳皮質形成における機能解析．日本神経化学会大会（奈良）2014. 10. 1.
- 21) 浜田奈々子，伊東秀記，田畑秀典，永田浩一：自閉症・知的障害原因遺伝子 A2BP1 の大脳皮質形成における機能解析．第 87 回日本生化学会大会、京都、2014. 10. 16.
- 22) 永田浩一，伊東秀記，森下理香，岩本郁子：発達期におけるマウス海馬神経細胞のイメージング技術開発．日本臨床分子形態学会学術集会（東京）

2014. 10. 17.

8 知的所有権の取得状況

(ア) 特許取得

該当無し

(イ) 実用新案特許

該当無し

(ウ) その他

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/hsc/>

平成 26 年厚生労働科学研究費委託費
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業）

分担研究報告書

ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的 iPS 細胞樹立

研究分担者 齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

研究要旨：ゲノム構造異常により発症する自閉症・発達障害の患者さんよりの iPS 細胞樹立と性状評価に必要な基盤構築を行った。本研究に関する研究計画書・同意書及び説明文書は東京女子医大の倫理委員会によって承認され、これを受けて京都大学医の倫理委員会で審議中である。医療機関で採取され、輸送された血液から iPS 細胞が樹立可能かどうか、検討を行った。ドナーより同意を得てバキュテナ採血管に血液を採取し、遠心した後、翌日に回収した単核球から iPS 細胞が樹立可能であることを確認した。理研 CDB の笹井らによって確立された、SFEBq 法を用いて、iPS 細胞から神経細胞の分化を行った。この方法により、201B7 及び 409B2 細胞が高効率で VGLUT1 または GAD 陽性の中枢神経細胞へ分化することを確認した。30-40%の効率で運動ニューロンに分化させることもできた。本年度の成果を踏まえ、次年度以降、iPS 細胞の樹立を進める予定である。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞(Inducible pluripotent stem cells: iPS 細胞)とは、京都大学の山中らによって樹立された幹細胞の一種である。その特徴は、1)すべての細胞・組織に分化できる多能性(pluripotency)を有する、2)体細胞より誘導できる、という点にある。2006年にマウス iPS 細胞、2007年にヒト iPS 細胞²⁾が樹立された。ヒトの初期胚から作られる ES 細胞(embryonic stem cells)は、個体のすべての組織へ分化することができるとされているが、iPS 細胞も同等の万能性を持つ。しかし、大きく異なるのは、ES 細胞はヒトの受精卵を滅失して作成する必要があるのに対し、iPS 細胞は線維芽細胞や血球など、ある個体の体細胞から人工的に樹立することができる点である。疾患を持つ患者から血液や皮膚線維芽細胞などの体細胞を採取し、これらから iPS 細胞を樹立すると(疾患特異的 iPS 細胞)、この iPS 細胞を患者の罹患細胞へ分化させることにより、患者由来の様々な分化細胞を得ることができる。

特に神経疾患や心筋疾患などでは、従来得ることが極めて困難であった神経細胞や心筋細胞を iPS 細胞を経て大量に培養し、解析に用いることが可能となりうる。このように、疾患特異的 iPS 細胞は、患者の病態を反映し、臨床へと結びつけるツールとして、疾患の病態解析や創薬などへの応用が可能なることから、医学・生物学分野への幅広い貢献が期待されている。本研究班では、分担研究者は、ゲノム構造異常により発症する自閉症・発達障害の患者さんよりの iPS 細胞樹立と性状評価を担当する。

(倫理面への配慮)

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この2点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施

申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれをを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の 2 申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成 20 年 6 月 4 日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。また、組み替え遺伝子指針、ヒト ES 指針に則って実験計画を提出し、それを遵守して研究を行っている。

C. 研究結果

研究計画書の承認

本研究に関する研究計画書・同意書及び説明文書は東京女子医大の倫理委員会によって承認され、これを受けて京都大学医の倫理委員会にて審議中である。

iPS 細胞の樹立

医療機関で採取され、輸送された血液から iPS 細胞が樹立可能かどうか、検討を行った。ドナーより同意を得てバキューティナ採血管に血液を採取し、遠心した後、翌日に単核球を回収した。その後、エピソーマル 6 因子 (OCT3/4, SOX2, LIN28, KLF4, LMYC, shp53) を用いて iPS 細胞の樹立を行った。結果、0.03-0.1%程度の効率で iPS 細胞の樹立が可能であった。樹立した iPS 細胞の OCT3/4、NANOG の発現はコントロールと同程度であり、未分化多能性幹細胞としての形質を備えているものと考えられた。

神経分化法の確立

理研 CDB の笹井らによって確立された、SFEBq 法を用いて、iPS 細胞から神経細胞の分化を行った。Y27632 存在下で DFK5%培地に iPS 細胞を単一細胞で懸濁し、96 穴プレート 1 穴あたり 9000 個を播種して凝集させた。分化開始 20 日後に細胞塊を PLL-ラミニンコートディッシュに接着させ、神経培養培地で更に培養した。

この方法により、201B7 及び 409B2 細胞が高効率で VGLUT1 または GAD 陽性の中枢神経細胞へ分化することを確認した。さらに、培地に Sonic hedgehog (100 ng/ml) と retinoic acid (1 μ M) を加えることにより、30-40%の効率で運動ニューロンに分化させることもできた。

D. 考察

分担研究者らの検討により、各医療機関で採取された血液を搬送し、iPS 細胞を樹立するパイプラインが構築された。今後、iPS 細胞の樹立後の性状評価の項目や分化方法などの検討が必要である。分化方法に関しては、汎用されている胚葉体形成法による神経細胞分化に成功したが、解析内容によっては平面培養や NGN2 などの転写因子を用いた直接運命転換法を考慮する必要があるかもしれない。引き続き共同研究者と連携をとりつつ、分化系の最適化を進めたい。

E. 結論

疾患特異的 iPS 細胞樹立・解析のための基盤構築に成功した。次年度以降、iPS 細胞の樹立を進める予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291. eCollection 2014.

2. Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Oct 9. doi: 10.1002/art.38912.
3. Yoshida M, Kitaoka S, Egawa N, Yamane M, Ikeda R, Tsukita K, Amano N, Watanabe A, Morimoto M, Takahashi J, Hosoi H, Nakahata T, Inoue H, Saito MK*, Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem Cell Reports.* In press
4. 齋藤潤 明日の診療に役立つ細胞分子生物学再生医療-iPS細胞の応用. *日本呼吸器学会雑誌* 3(5) 625-629, 2014
5. 齋藤潤 患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル作成研究: 血液免疫疾患. *医学のあゆみ.* 252 899-903, 2015
1. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の解析について 大阪リウマチカンファレンス 2014/4/19 大阪
2. 齋藤潤 疾患 i P S 細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析 第5回小児炎症研究会 2014/6/21 東京
3. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 第6回炎症性腸疾患と免疫を語る会 2014/6/26 横浜
4. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 横浜小児先端セミナー 2014/9/12 横浜
5. 齋藤潤 再生医療用 iPS 細胞ストックのドナーリクルートについて 日本臓器保存生物医学会 2014/11/28 大阪
6. 齋藤潤 疾患 i P S 細胞を用いた血液疾患の病態解析 京大病院 iPS 細胞・再生医療研究会 2015/1/30 京都
7. 齋藤潤 iPS 細胞研究の現状について 徳洲会グループ平成 27 年 1 月度医療経営戦略セミナー 2015/1/31 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

学会発表

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費 難治性疾患実用化研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業)

「ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の
疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と治療法開発」

分担研究報告書

「ヒト iPS 細胞におけるゲノム編集および神経分化誘導技術の確立による
発達障害モデルの作製と創薬スクリーニング系の確立」

研究分担者 北島 康司 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教室 助教

【研究要旨】

発達障害は多様な遺伝子要因に環境要因が加わって発症する複雑なスペクトラム障害として考えられており、その原因遺伝子およびメカニズムについても一定した答えは得られていない。しかしながら最新の大規模ゲノム研究から分かってきたことは、大部分の自閉症では両アリの片側だけに入った突然変異が発症の引き金になるという事実であり、このことは「自閉症とは遺伝子機能の質ではなく量によって規定される病気である」ことを示唆する。

我々は自閉症の発症確率を著しく高める *de novo* 突然変異の候補遺伝子である *DYRK1a* に注目し、この変異が入った疾患 iPS 細胞を作成することによってその表現型を確認するとともに、21 番染色体上にコードされるこの *DYRK1a* の発現過剰が、ダウン症候群における中枢神経症状の主要なファクターであると考えられていることに注目し、発現減少・過剰・欠損それぞれにおける影響を詳細に観察していきたいと考えている。そのためにヒト iPS 細胞におけるゲノム編集技術を確立し、*DYRK1a* 発現量を厳密に制御することによって正確な疾患モデル系を作り、メカニズムの解明とさらに創薬スクリーニング系の確立を目指す。本年度では、ヒト iPS 細胞におけるゲノム編集の技術基盤を立ち上げ、単一遺伝子の改変ならびに染色体除去などの染色体工学の導入、神経分化誘導技術の確立を行った。

A. 研究背景と目的

発達障害は、社会性・コミュニケーション能力の欠如（社会性の障害）と興味の対象の限局（常同性）を特徴とする疾患である。2013 年にアメリカ精神医学界により新しい診断基準 DSM-5 が公表され、これまで小児自

閉症や小児期崩壊性障害などのサブカテゴリを含む「広汎性発達障害」とよばれていたものが「自閉症スペクトラム障害」というひとつの診断名に統合され、同時に *MeCP2* 異常によるレット障害が診断から除外されるとともに、アスペルガー障害のカテゴリ