

# 「iPS 細胞と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書

## －平成28年度終了研究課題－

研究総括 西川 伸一

### 1. 研究領域の概要

本研究領域は、日本発となる iPS 細胞を樹立する技術によって大きなブレークスルーがもたらされと考えられる分野、すなわち、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学などを対象としている。また、これまでにない自由で創意に満ちた発想による基礎研究とともに、医療などに将来貢献できる基礎研究も対象としている。

具体的には、1)リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2)幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3)iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構解析、4)iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5)ヒト疾患モデルの構築などの研究を対象とする。

これら研究の成果は、疾患の原因の解明や新治療薬の開発に寄与するとともに、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現に向けて貢献できるものと信じている。

### 2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 1件(内、大挑戦型0件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

### 3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「iPS 細胞と生命機能」領域に設けた選考委員7名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 選考に当たっては、さがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info754/besshi4.html>)の他、特に下記二点を重視した。

①オリジナリティー： 研究提案が分かりやすく、十分に独創的である。

②実力・可能性： 研究提案書や過去の実績から考えて、テーマ遂行に十分な実力・可能性がある。

### 4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー7名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

| 選 考 | 書類選考 | 面接選考 | 採択数 |        |     |        |
|-----|------|------|-----|--------|-----|--------|
|     |      |      | 9件  | 内<br>訳 | 3年型 | 7件(1件) |
| 対象数 | 73件  | 21件  |     |        | 5年型 | 2件     |

( )内は大挑戦型としての採択数。

備考：

1)平成22年度採択課題のうち、5年型の下島研究者はライフイベントにより、平成29年3月までの延長が認められ、今回の評価対象とした。

### 5. 研究実施期間

平成22年10月～平成29年3月(5年型)

・下島研究者はライフイベントにより、平成29年3月までの延長が認められた。

## 6. 領域の活動状況

領域会議: 13回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究成果報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 28 年 10 月 評価会開催  
平成 29 年 1 月 研究総括による事後評価  
平成 29 年 2 月 被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

## 9. 評価結果

下島研究者については、総じてほぼ当初の期待通りの研究成果が得られたと感じる。今後は更なる研究進展を目指し、さきがけの領域で得られたネットワークも大いに活用して精進していただきたいと考える。

### 1. 下島研究者「疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明」

派手さはないが、最初計画したことを着実に進めている。途中で出産・育児による中断があっても、時間的には遅れたとしても、その影響を感じさせない。

もともと人間の脳研究に iPS は有用であろうと期待されていたが、下島は自分で原因遺伝子を明らかにした2種類の大脳形成不全患者から iPS を樹立し、原因遺伝子は異なっているが、ともに細胞レベルで遊走活性に異常が存在することを突き止めている。この発見を手がかりに、研究をさらに続けており、遺伝学者であるとともに細胞生物学者としての幅が生まれてきていると感じる。

他にも同じ遺伝子座の異なる突然変異についての iPS を用いた研究、あるいはより複雑な神経発達障害にまで iPS 利用の範囲を広げている。最初 iPS 技術を導入するのに苦労したが、おそらく今後もっとも iPS を使った研究を続けていく一人になるのではと期待している。また、iPS と出会うことでもっとも成長した一人と言っていると思われる。

## 10. 評価者

研究総括 西川 伸一 JT 生命誌研究館・顧問

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 29 年 3 月末現在)

|        |                          |
|--------|--------------------------|
| 石野 史敏  | 東京医科歯科大学 難治疾患研究所・教授      |
| 岡野 栄之  | 慶応義塾大学 医学部・教授            |
| 相賀 裕美子 | 情報-システム研究機構 国立遺伝学研究所・教授  |
| 中内 啓光  | 東京大学 医科学研究所/スタンフォード大学・教授 |
| 丹羽 仁史  | 熊本大学 発生医学研究所・教授          |
| 花園 豊   | 自治医科大学 分子病態治療研究センター・教授   |
| 春山 英幸  | 第一三共 RD ノバーレ株式会社・代表取締役社長 |

(参考)

件数はいずれも、平成29年3月末現在。

(1)外部発表件数

|     | 国 内 | 国 際 | 計  |
|-----|-----|-----|----|
| 論 文 | 3   | 10  | 13 |
| 口 頭 | 3   | 0   | 3  |
| その他 | 0   | 0   | 0  |
| 合 計 | 6   | 10  | 16 |

(2)特許出願件数

| 国 内 | 国 際 | 計 |
|-----|-----|---|
| 0   | 0   | 0 |

(3)受賞等

・下島圭子 研究者

2014 年度「日本先天異常学会奨励賞」:(H26.4)

(4)招待講演

国際 7 件

国内 16 件

別紙

「iPS 細胞と生命機能」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

| 研究者氏名<br>(参加形態) | 研 究 課 題 名<br>(研究実施場所)                                        | 現 職(平成 29 年 3 月末現在)<br>(応募時所属)                      | 研究費<br>(百万円) |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------|
| 下島 圭子<br>(専任)   | 疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造<br>形成メカニズムの解明<br>(東京女子医科大学 統合医科学研究<br>所) | 科学技術振興機構 さきがけ研究<br>者<br>(東京女子医科大学 統合医科学<br>研究所 研究生) | 100          |

# 研究報告書

## 「疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 下島 圭子

### 1. 研究のねらい

ヒトの中樞神経は胎児期における神経細胞の遊走によって形成される。側脳室に面した脳室帯と呼ばれる増殖層において神経前駆細胞から最終分裂で生成された神経細胞が脳表に向かって移動し、あとから遊走してきた細胞がより脳表に到達する inside-out のパターンによって全6層からなる大脳皮質が形成される。この神経細胞の遊走異常により、滑脳症や多小脳回などの脳形成障害を生じ、発達障害やてんかんの原因となる。滑脳症は脳形成障害のうち最も重篤で重度の精神運動発達遅滞をきたし、生涯寝たきりとなることが多い。近年のゲノム解析技術の進歩により、脳形成障害の原因となる遺伝子が次々と明らかにされている。*PAFAH1B1* (*LIS1*)や *RLN*, *FLNA*, *DCX*, *ARX*, *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3* など、細胞の骨格形成や接着に関わる遺伝子が多くを占めている。このうち 17 番染色体短腕末端に位置する *LIS1* は、1992 年にハプロ不全によって滑脳症を生じることが Miller-Dieker 症候群における genotype-phenotype 関連解析によって明らかにされた。モデルマウスも作成され、*LIS1* の細胞遊走における機能もかなり明らかになってきた。しかし、ヒトにおける病態はまだ完全に明らかになったわけではない。何よりげっ歯類の脳表は、ヒトの脳の表面に見られる脳回と呼ばれる皺が形成されておらず、あたかもヒトの滑脳症と同様に滑らかであり、ヒトの脳回形成異常の解析には、真のモデルになり得ない。さらにヒトにおける病態解析が困難な理由として患者の脳組織を採取したり中枢神経細胞を生きたまま採取したりすることができないということが挙げられる。疾患 iPS 細胞の利用はこの状態に風穴を開けることに成功した。患者由来疾患 iPS 細胞を生体外で神経系細胞に分化誘導させることで、胎児期に起こった脳の発生、あるいは形成過程を再現することが可能となったからである。このように脳形成障害は疾患 iPS 細胞を用いた病態解析のモデルとしてふさわしいと考え、ゲノム変異が明らかな脳形成障害患者を対象とした研究に着手した。脳形成障害をモデルとして疾患 iPS 細胞を用いた病態解析の手法を確立させることで、より発症頻度が高く、社会的インパクトの高い自閉症スペクトラムなど、まだ病態が明らかでない小児難治性神経疾患について、神経細胞レベルでの病態解析に応用していきたいと考える。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究の目的は、上に述べたようにヒト疾患患者由来 iPS 細胞を使った小児難治性神経疾患の病態解析系を確立するために、そのモデルとして脳形成障害の病態解析を行うことである。この目的のためには、疾患の原因となるゲノム変異が明らかな脳形成障害患者を対象とすることが何よりも重要となる。胎生期の母体感染症や周産期障害のような外的要因による脳形成障害では、患者由来 iPS 細胞を分化誘導しても病態を再現できないからである。また、

脳形成障害を来した原因となるゲノム変異が明らかでなければ、病態解析で得られた所見との関連を考察することが困難である。そこで本研究においては、これまでの先行研究でゲノム変異を明らかにした 13 人の患者から疾患 iPS 細胞を樹立した。得られた疾患 iPS 細胞のうち 2-4 割において何らかのゲノムコピー数の変化が 2 次的に生じていたため、それらを除外して次の病態解析に供した。iPS 細胞は、浮遊培養を経て接着培養を行う SFEBq 法を用いて神経系細胞に分化誘導した。

研究に先立ち、世界で初めて先天性大脳白質形成不全症患者由来疾患 iPS 細胞を樹立し、遺伝子発現解析を行った。この研究で対象とした 3 名の患者は、典型的な *PLP1* 遺伝子重複例とミスセンス変異例に加え、過去に報告のない極めて稀な *PLP1* の部分的な重複例である。この研究により、部分重複例ではオリゴデンドロサイト細胞特異的な *PLP1* の発現が null になっていることを明らかにした。

次に、*LIS1* のハプロ不全によって脳形成障害を来した患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析を行った。iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導する過程における遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、*CHCHD2* 遺伝子の発現が恒常的に低下していることが明らかになった。免疫組織染色でもタンパク質レベルでの発現低下が確認できた。この結果が神経細胞の遊走障害に普遍的に関連しているものかどうかを検証するために、まったく異なる遺伝子異常 (*TUBA1A* 変異) による滑脳症患者由来 iPS 細胞でも検証したところ、同様に発現が低下していた。*CHCHD2* は在胎 26-28 週の胎児脳における遊走中の神経細胞で特異的に発現が認められたことから、この遺伝子が神経細胞における遊走に関連していることが明らかとなった。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「中枢神経疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と神経系細胞への分化誘導」

本研究の目的は、ヒト疾患患者由来 iPS 細胞を使った小児難治性神経疾患の病態解析を行うことである。特に遺伝的要因により先天的な発達障害を示す疾患の病態解析を行うことを目的としている。この目的のためには、疾患の原因となるゲノム変異が明らかな発達障害患者から疾患 iPS 細胞を樹立することが何よりも重要となる。次に、得られた疾患 iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導する系を確立させ、疾患の病態に迫る解析を行うことが必要となる。

そこで本研究においては、これまでの先行研究において、何らかのゲノム変異により小児難治性神経疾患を来した計 13 人の患者から iPS 細胞の樹立に成功した。細胞の採取においては、家族から研究の趣旨への賛同が得られ、書面によるインフォームド・コンセントが得られた患者を対象とした。なお、本研究は実施施設である東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て行っている。研究に着手した当初の 6 例においてはレンチ・レトロウイルスによる遺伝子導入により iPS 細胞を樹立した。レンチ・レトロウイルスによる樹立法では染色体への integration が起こるため、より natural でより簡便なエピソードベクターによる遺伝子導入法を導入し、以後の例においてはこの方法で iPS 細胞を樹立した。

得られた iPS 細胞に関して、レンチ・レトロウイルスによる樹立法の場合には導入した外来性遺伝子のサイレンシングを RT-PCR で確認し、エピソードベクターによる方法の場合にはベクタープラスミドの残存を genomic PCR で確認した。得られた iPS 細胞の多能性の評価を

アルカリフォスファターゼ染色、qPCR、免疫組織染色にて確認した。2 次的な染色体再構成については、染色体標本を作製して G-band 法で確認し、さらに元の細胞から抽出した DNA をリファレンスサンプルとして利用し、アレイ CGH 法を行うことにより微細な 2 次的ゲノムコピー数変化の発生を検証した。

レンチ・レトロウイルスによる樹立法の場合には導入した外来性遺伝子がサイレンシングされていない株が 2-3 割存在した。エピソードベクターによる方法の場合には約 1 割でベクタープラスミドの残存が認められた。多能性の評価ではほぼ全ての株がクリアできた。染色体再構成に関しては、G-band 法で明らかになる変化は認められなかったが、2-4 割の株において何らかの 2 次的ゲノムコピー数変化が生じていた。正常対象とされた細胞にもゲノムコピー数の変化が認められるものがあった。これらの全ての評価をクリアし、真に解析に供することができる iPS 細胞を 1 例につき複数株選定することができた。

iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導は、理化学研究所が開発した SFEBq 法を modify して用いた。具体的には iPS 細胞コロニーを単細胞レベルに分散させて細胞数を正確にカウントし、低吸着 dish 上で浮遊培養を行い、8 日後にマトリゲルコートした dish 上で接着培養を行うことで成功した。神経系細胞への分化誘導の成否は、qPCR による遺伝子発現定量や免疫組織学的解析によって行った。正常コントロールの iPS 細胞では 56 日まで培養することができ、Tuj や Maps の発現を確認できた。

#### 研究テーマ B「疾患 iPS 細胞による先天性大脳皮質形成障害における病態解析」

研究テーマ A で確立した iPS 細胞から神経系細胞に分化誘導する系を用いて、疾患患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析を行った。大脳皮質形成障害患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞においては、分化誘導の比較的初期から何らかの形態的な変化を示すことが予測される。したがって病態解析モデルとしてふさわしいと考え、まず大脳皮質形成障害患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析に着手した。

ヒトの大脳新皮質はモデル動物に比して非常に発達しており、そのことがヒトの知能が他の動物と比べて著しく発達している要因となっている。ヒトの脳が進化し得た理由として、ヒト固有であって、モデル動物にはホモログが存在しない分子がヒト特有の脳回形成に関連していると考えられる。その中で、*LIS1* は種を超えて細胞遊走の重要な役割を果たしており、モデル動物を用いた細胞レベルでの解析も進んでいる。*LIS1* は細胞内微小管結合蛋白であり、微小管の重合と安定性に関わっている。*LIS1* 機能障害があると、核-中心体連結に障害が生じ、細胞遊走障害を来すことで脳形成障害を生じると考えられている。大脳皮質形成障害は非常に稀な疾患である上に、原因となる遺伝子は多岐に亘ることが明らかになっており、疾患 iPS 細胞研究を用いた病態解析を行うためには、その患者のゲノム異常が特定できていることが何よりも重要である。今回、先行研究により、滑脳症患者において *LIS1* のハプロ不全を明らかにすることができた。この貴重な症例を対象として、疾患 iPS 細胞による病態解析を行うこととした。

患者由来 iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導し、分化の過程における遺伝子発現状況をマイクロアレイによる網羅的解析により解析し、正常対象と比較検討した。この解析により、*CHCHD2* の発現が低下していることが明らかになった。*CHCHD2* は細胞遊走障害を示す遺伝

子のスクリーニングで明らかになった遺伝子であるが、その機能の詳細は明らかでなかった。次に *CHCHD2* の発現低下が単に *LIS1* のハプロ不全によるものか、神経細胞の遊走障害に普遍的に関連しているものかどうかを検証することとした。この目的のために、*LIS1* 以外の遺伝子異常で生じた滑脳症患者由来 iPS 細胞を利用することとした。並行して行っていた滑脳症患者のゲノム解析で、*TUBA1A* の de novo 変異を同定することができた。この患者からも iPS 細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導して qPCR による発現定量を行ったところ、*CHCHD2* は *TUBA1A* 変異を有する細胞においても発現低下を示していた。このことは *CHCHD2* の発現が、単に *LIS1* のハプロ不全を直接的に反映しているのではなく、細胞遊走異常の結果を反映していることを示唆している。次に *CHCHD2* が脳内で時間的・空間的にどのように発現しているかを検証した。この目的のため、ヒト胎児剖検脳における免疫組織染色を行った。その結果、*CHCHD2* は、神経細胞が遊走する在胎 26-28 週の胎児脳において発現が確認され、特に遊走中の神経細胞で発現が認められた。このことから、*CHCHD2* はまさに神経細胞における遊走に関連している遺伝子であることが明らかとなり、論文報告した。論文発表と相前後して *CHCHD2* 変異が Parkinson 病患者で認められたとの報告や、我々の報告同様、細胞遊走との関連を示す報告が相次いでおり、*CHCHD2* が細胞遊走、しかも神経系の細胞と関わっていることは明らかである。

上記の研究で用いた疾患 iPS 細胞を用いて、細胞の遊走障害を直接的に解析した。実際、患者由来細胞では接着培養後からの遊走が視覚的にも遅いことが見受けられた。この事象を統計的に検証するため、まず、細胞における pericentrin と細胞核との位置を計測し、polarization (極性) が整然と行われているかどうか検討した。Pericentrin は *LIS1* 分子が接着し、細胞を遊走させるためのアンカーとなる分子である。細胞が直線的に遊走していれば、Pericentrin と細胞核の位置関係は常に一定のはずである。しかし、この手法で得られた結果では、*LIS1* 欠失患者由来細胞では not-polarized が優位に上昇していた。この現象をさらに検証するため、遊走中の細胞を経時的に撮像し、タイムラプス解析した。その結果、大脳皮質形成不全患者由来細胞では細胞の遊走が直線的ではなく、迷走している状態が観察された(論文作成中)。

#### 研究テーマ C「疾患 iPS 細胞による先天性大脳白質形成不全の病態解析」

先天性大脳白質形成不全症は、出生直後から筋緊張低下、眼振、喉頭喘鳴などを示し、次第に運動発達の遅れや四肢の痙性麻痺を来す希少神経難病である。大脳白質を構成する神経細胞の軸策を取り囲む髄鞘の先天的な形成不全が疾患の本質である。そのため MRI による頭部画像診断で大脳白質における特徴的なシグナルパターンから診断されることが多い。原因遺伝子が複数明らかになっているが、最も頻度が高く認められるのが X 染色体に位置する proteolipid protein 1 (*PLP1*) 遺伝子の変異ないし重複である。この場合 X 連鎖劣性遺伝形式をとるため基本的に患者は男性であり、女性は保因者となる。*PLP1* は中枢神経のオリゴデンドロサイト(髄鞘形成細胞)で高発現しており、ミスセンス変異のために高次構造に変化を来した *PLP1* タンパクがオリゴデンドロサイトの小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを誘発してアポトーシスを来すことが発症原因であると理解されている。*PLP1* の重複も *PLP1* 発現の over dose からアポトーシスを誘発すると考えられている。これまでに多くの先天性大

脳白質形成不全症患者のゲノム解析に関わり、さまざまなミスセンス変異や多彩なサイズのゲノム重複を明らかにしてきたが、その中で過去に報告の無い *PLP1* の部分重複を同定した。しかし、この部分重複がミスセンス変異例や重複例のような発症メカニズムで説明できるかどうか明らかでなかったため、*PLP1* の発現状況を解析することを考えた。

ここで問題になるのが *PLP1* の発現解析のためのサンプル収集である。*PLP1* は中枢神経のオリゴデンドロサイトで高発現しているものの、他の臓器・組織ではほとんど発現していない。iPS 細胞における発現状態は知られていなかったため、in-silico library から遺伝子発現データをダウンロードして皮膚線維芽細胞と比較検討したところ、iPS 細胞では皮膚線維芽細胞に比べ、30 倍以上高い発現を示していることが明らかとなった。そこで、*PLP1* の部分重複例に全 *PLP1* 領域の重複例、ミスセンス変異例、さらに正常男性コントロールを加え、全 4 例の iPS 細胞を樹立し、各 3 株ずつ選定した。そして、ノーザンブロットングで *PLP1* の発現を解析したところ、部分重複例だけは *PLP1* の発現が null になっていることを明らかにし、論文報告した。

この研究においては iPS 細胞の分化誘導を行わなかった。それは神経系細胞に分化誘導すると、*PLP1* 重複例やミスセンス変異例においては *PLP1* がストレスを引き起こし、結果的にアポトーシス誘発を来して一見 *PLP1* 発現が低下した状態を再現してしまう恐れがあると考えられたからである。今回樹立した疾患 iPS 細胞のオリゴデンドロサイトにおける病態の解析は、今後共同研究者と連携して行っていく予定である。

#### 研究テーマ D「疾患 iPS 細胞による中枢神経発達障害の病態解析」

本研究においては、脳形成障害を病態解析のモデルとして選定し、患者からの iPS 細胞の樹立方法と評価法、そして神経系への分化誘導法や細胞遊走の解析方法などを確立してきた。この方法をさらに発展させ、モデル動物では解析できないヒト固有の疾患解析に応用することを目指した。

小児の知的障害や自閉症スペクトラムにおいては、診断の決め手になるバイオマーカーがなく、画像検査でも鑑別の手掛かりとなる所見が認められないことがほとんどである。ただ、近年の網羅的なゲノム解析の進歩により、これまで原因がよくわからなかった小児の知的障害や自閉症スペクトラムの患者においては、多くの例でゲノム変異が発症に関連していることが明らかになってきた。その変異の多くは神経細胞のシナプス機能に関連していることから、小児の知的障害や自閉症スペクトラムはシナプス機能の障害によって生じていることが示唆されている。シナプス機能は複雑で、ヒトのシナプス機能を解析するためにはヒトの細胞を用いて解析することが求められる。患者由来 iPS 細胞から神経細胞に分化誘導させることが可能となったことにより、実現することが可能となった。

本研究に先立ち樹立していた発達障害関連疾患 iPS 細胞を用いて、神経細胞レベルでの病態解析を行った。全て原因となったゲノム変異が明らかな患者由来である。iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導において、浮遊培養から接着培養に移行したあと、細胞の遊走をタイムラプス観察すると、直線的に遊走できないものや、遊走速度が遅い疾患があることが明らかになった（論文準備中）。さらに成熟させたあと、シナプス関連タンパクの免疫組織学的観察を行うと、正常対象では認められた発現が、疾患では認められない場合があり、神経細胞

の成熟にも問題があることが明らかになってきた(personal data)。シナプスを形成するまで成熟させるにはマウス由来アストロサイト初代細胞との共培養を行うことにより実現できたが、疾患細胞ではそもそもシナプス形成が不良である可能性があり、今後はこのメカニズムを解明するため、レスキュー実験を行うことなどを検討中である。

### 3. 今後の展開

本研究に取り組むことで疾患 iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導させ、網羅的遺伝子発現解析や免疫組織染色による遺伝子の動態解析、神経細胞のタイムラプス観察、電気生理学的解析の系を確立させることができ、疾患 iPS 細胞の病態解析への応用には多くの可能性があることを示すことができた。今後はこれまでの経験と培った実験系を活用し、まだ病態が明らかでない小児難治性神経疾患の病態解析を行い、将来の治療研究に繋がるシーズを明らかにしたいと考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究においては、臨床医として診断に関わる立場から、患者由来疾患 iPS 細胞を小児神経難病の病態解析に、そして治療研究に結び付けたいという思いで取り組んできた。先天性大脳白質形成不全症に関しては、以前から継続して遺伝子診断に関わってきており、過去に報告の無い *PLP1* 部分重複例を同定できた。そして、世界で初めて先天性大脳白質形成不全症患者由来 iPS 細胞を樹立して遺伝子発現状態を解析し、論文発表することができた。この疾患の研究に携わる医師として、1つの礎を築くことができたものとする。先天性大脳白質形成不全症に関しては、病巣組織を構成するオリゴデンドロサイトへの分化誘導法が他施設から報告されるまでは確立していない状態であったため、共同研究者との共同研究として継続して進めている。

本研究課題のテーマとした大脳皮質形成異常については、神経細胞の遊走に関わる遺伝子として *CHCHD2* が *LIS1* 欠失や *TUBA1A* 変異による大脳形成障害に関与していることを iPS 細胞から分化誘導させた神経細胞で明らかにすることができた。この論文発表と相前後して *CHCHD2* 変異が Parkinson 病患者で認められたとの報告や、我々の報告同様、細胞遊走との関連を示す報告が相次いでおり、*CHCHD2* が細胞遊走、しかも神経系の細胞と関わっていることは明らかである。この研究成果は単に *CHCHD2* の神経細胞遊走との関わりを明らかにしただけでなく、疾患 iPS 細胞による病態解析が有用であることを示したものとする。本研究で構築した iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導技術や病態解析技術を応用し、さらに多くの神経難病の病態解析に取り組んでいきたい。

(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)。

(研究総括)

派手さはないが、最初計画したことを着実に進めている。途中で出産・育児による中断があっても、時間的には遅れたとしても、その影響を感じさせない。

もともと人間の脳研究に iPS は有用であろうと期待されていたが、下島は自分で原因遺伝子を明らかにした2種類の大脳形成不全患者からiPSを樹立し、原因遺伝子は異なっている、ともに細胞レベルで遊走活性に異常が存在することを突き止めている。この発見を手がかりに、研究をさらに続けており、遺伝学者であるとともに細胞生物学者としての幅が生まれてきていると感じる。

他にも同じ遺伝子座の異なる突然変異についての iPS を用いた研究、あるいはより複雑な神経発達障害にまで iPS 利用の範囲を広げている。最初 iPS 技術を導入するのに苦労したが、おそらく今後もっとも iPS を使った研究を続けていく一人になるのではと期待している。また、iPS と出会うことでもっとも成長した一人と言っていると思う。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Shimojima K, Inoue T, Imai Y, Arai Y, Komoike Y, Sugawara M, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Kanno H, Hirose S, Yamamoto T. Reduced *PLP1* expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus–Merzbacher disease patient with a partial *PLP1* duplication. *J Hum Genet* 57: 580–586, 2012.
2. Shimojima K, Narita A, Maegaki Y, Saito A, Furukawa T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing identifies a de novo *TUBA1A* mutation in a patient with sporadic malformations of cortical development: a case report. *BMC Res Notes* 7: 465, 2014.
3. Shimojima K, Okumura A, Ikeno M, Nishimura A, Saito A, Saitsu H, Matsumoto N, Yamamoto T. A de novo *TUBB4A* mutation in a patient with hypomyelination mimicking Pelizaeus–Merzbacher disease. *Brain Dev* 37: 281–285, 2015.
4. Shimojima K, Okumura A, Hayashi M, Kondo T, Inoue H, Yamamoto T. *CHCHD2* is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly. *Genomics* 106: 196–203, 2015.
5. Shimojima K, Okumura A, Yamamoto T. A de novo microdeletion involving *PAFAH1B* (*LIS1*) related to lissencephaly phenotype. *Data in Brief* 118: 488–91, 2015.
6. Shimojima K, Okamoto N, Tamasaki A, Sangu N, Shimada S, Yamamoto T. An association of 19p13.2 microdeletions with Malan syndrome and Chiari malformation. *Am J Med Genet A* 167A: 724–730, 2015.

### (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)

#### 主要な学会発表

1. Shimojima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, Ohno K, Yamamoto T. A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. International Congress of Human

Genetics 2011, Oct, 2011, Montreal, Canada.

2. 下島圭子, 山本俊至. 【シンポジウム3: 先天性大脳白質形成不全症-疾患概念の確立から、病態解析・治療展望まで-】疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析への応用. 第 54 回日本小児神経学会総会 2012 年 5 月, 札幌.

#### 著作物

1. 下島圭子, 山本俊至. iPS 細胞の小児神経疾患の病態解析への応用. 脳 21 14: 218-223, 2011.
2. 下島圭子, 山本俊至. 疾患患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析: 中枢神経障害への応用. 脳と発達 45; 137-142, 2013.
3. 山本俊至, 下島圭子. iPS 細胞(幹細胞)を用いる医療の近未来. 遺伝子医学 MOOK 別冊 いまさら聞けない「遺伝医学」 173-181, 2014.

#### 受賞

1. 2014 年度「日本先天異常学会奨励賞」: “De novo microdeletion of 5q14.3 excluding MEF2C in a patient with infantile spasms, microcephaly, and agenesis of the