

学 位 論 文

Genetic diagnosis of Neurofibromatosis type I
(von Recklinghausen's disease) and establishment of
NF1-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the
study of disease mechanisms.

Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease)の
遺伝子診断および同疾患特異的 induced pluripotent stem cells
(iPSCs)のインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・
無血清培養系での樹立による疾患研究

学位申請者 福谷 多恵子

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

(主指導教員：岡本 哲治 教授)

平成 29 年度

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならび御高閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学 岡本哲治 教授に深厚なる謝意を表します。また、本文作成上御懇切なる御指導を賜りました、本学 歯周病態学 栗原英見教授、ならびに細胞分子薬理学 兼松隆教授に深謝致します。また学位論文作成に際し、御審査および御高閲を頂きました、本学歯科矯正学 谷本幸太郎教授、国際歯科医学・分子腫瘍学 藤井万紀子教授、ならびに分子口腔医学・顎顔面外科学 虎谷茂昭准教授に謝意を表します。

また、本研究を進めるに際し、終始実験の指導、御助言および御支援を賜りました研究室の皆様、特に、山崎佐知子博士、濱田充子博士、中峠洋隆博士、大林史誠博士に厚く感謝申し上げます。

上記以外にも多くの方々から御支援および激励を賜りました。本論文を完成へと導いて下さった全ての方々に厚く御礼申し上げます。

目次

第一章 緒言	1
--------------	---

第二章 NF1 由来疾患特異的人工多能性幹細胞 (NF1-iPSC)の樹立.....	3
--	---

第一節 材料および方法

1. 患者背景

2. 細胞培養法

2-1.細胞培養液

1) 末梢血由来単核球 : PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) の無血清培養

2) iPSC (induced pluripotent stem cell) 用無血清培地

2-2.センダイウイルスベクター

3. NF1 症候群患者由来 iPSC (NF1-iPSC) の樹立

3-1. NF1-iPSC の誘導

1) NF1-PBMC の初代培養

2) センダイウイルスベクターによる初期化

3) NF1-iPSC の樹立・継代

3-2. NF1-iPSC の特性解析

1) 未分化性の検討

①Alkaline phosphatase (ALP) 活性を指標にした未分化性と誘導効率の評価

②蛍光免疫染色法を用いた NF1-iPSC における未分化マーカー蛋白の発現解析

③Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いた未

分化マーカー遺伝子の発現解析

[1.] RNA の抽出法

[2.] RT-PCR 法

2) 分化多能性の検討

- ① 胚様体培養法による三胚葉への分化能の検討
- ② 蛍光免疫染色法を用いた胚様体における三胚葉マーカーの発現解析
- ③ 免疫不全マウスを用いた teratoma (奇形腫) 形成およびその組織学的検討

[1.] 免疫不全マウス背部皮下への NF1-iPSC の移植

[2.] H-E 染色および PAS/Alcian blue 染色

[3.] STR 解析

第二節 結果

1. フィダーフリー・インテグレーションフリー・無血清培養系での NF1-iPSC の誘導および同細胞における誘導効率の検討
2. NF1-iPSC の細胞特性解析
 - 1) 未分化性の検討
 - 2) NF1-iPSC における分化多能性の検討
 - ① 胚様体形成法を用いた分化多能性の検討 (*in vitro*)
 - ② Teratoma 形成能およびその組織学的検討 (*in vivo*)
 - ③ STR 解析

第三章 Neurofibromatosis type I (NF1) と臨床診断された患者の遺伝子診断……15

第一節 材料および方法

1. 遺伝子診断

- 1-1. 患者末梢血からの DNA 抽出
- 1-2. 次世代シーケンサーMiSeq を用いた網羅的遺伝子解析
- 1-3. CEQer による CNA 解析
- 1-4. Droplet Digital PCR (ddPCR) 法を用いた染色体コピー数の解析
- 1-5. NF1-2 におけるサンガーシーケンス法を用いた *NF1* 遺伝子変異の検討

第二節 結果

1. NGS による先天性疾患関連遺伝子の網羅的遺伝子変異解析
2. CEQer による CNA 解析
3. Droplet Digital PCR (ddPCR) 法を用いた染色体コピー数の解析
4. NF1-2 におけるサンガーシーケンス法を用いた変異部位の検討

第四章 NF1-iPSC における *NF1* 遺伝子の mRNA および蛋白発現の比較検討…24

第一節 材料および方法

- 1.未分化 NF1-iPSC の *NF1* mRNA 発現の解析
 - 1) RNA 抽出および cDNA 合成
 - 2) ddPCR 法を用いた未分化 NF1-iPSC における *NF1*mRNA 発現の検討
- 2.胚葉体を介した三胚葉分化誘導後の NF1-iPSC における *NF1* mRNA 発現の解析
 - 1) 胚葉体を介した三胚葉への分化誘導法
 - 2) 分化誘導後 NF1-iPSC の ddPCR 法を用いた *NF1* mRNA 発現の検討
- 3.胚葉体を介した三胚葉分化誘導後の NF1-iPSC における NF 蛋白発現の解析
 - 1) 胚葉体を介した三胚葉分化誘導法
 - 2) 蛋白抽出
 - 3) 分化誘導後 NF1-iPSC における NF 蛋白発現の Western blot 法を用いた検討

第二節 結果

1. 未分化 NF1-iPSC における NF1 mRNA 発現の解析
2. 胚葉体形成法による三胚葉への分化誘導後の NF1-iPSC における NF1 mRNA

発現の解析

3. 胚葉体を介した三胚葉分化誘導後の NF1-iPSC における NF 蛋白解析

第五章 NF1-iPSC における完全無血清培養条件下での神経誘導分化実験の検討…29

第一節 材料および方法

1. 完全無血清培養条件下での iPSC の神経分化誘導法
2. 神経分化 NF1-iPSC における神経分化マーカー発現の蛍光免疫染色法を用い

た解析

3. Western blot 法による神経分化 NF1-iPSC における Ras/MAP シグナルの解析

第二節 結果

1. 完全無血清培養条件下での iPSC の神経分化誘導
2. 蛍光免疫染色法を用いた神経分化 WT および NF1-iPSC の神経分化マーカー

の発現検討

3. 神経分化 WT および NF1-iPSC における Ras/MAP シグナルの検討

第六章 NF1-iPSC における完全無血清培養条件下での軟骨・骨誘導分化実験の検討…

33

第一節 材料および方法

1. 完全無血清培養条件下での iPSC の軟骨・骨分化誘導法

- 1) 軟骨・骨分化誘導法 (*in vitro*)
- 2) フローサイトメトリー法による MSC 誘導効率の検討
2. 免疫不全マウスを用いた軟骨・骨誘導およびその組織学的検討
 - 1) 免疫不全マウス背部皮下への軟骨・骨分化 NF1-iPSC の移植
 - 2) PAS/Alcian blue 染色および SafraninO 染色
 - 3) STR 解析

第二節 結果

1. 完全無血清培養条件下での iPSC から MSC への誘導効率および軟骨・骨分化誘導
2. 免疫不全マウスを用いた軟骨・骨形成およびその組織学的検討
 - 1) 免疫不全マウス背部皮下への軟骨・骨分化 NF1-iPSC の移植
 - 2) PAS/Alcian blue 染色および SafraninO 染色
 - 3) STR 解析

第七章 考察	38
第八章 総括	45
参考文献	46
図表説明	52

略語表

NF1 : Neurofibromatosis type I

CT: Computed Tomography

CNA: Copy number alterations

CEQer: Comparative Exome Quantification analyzer

ATAD5: ATPase Family, AAA Domain Containing 5

iPSC : induced pluripotent stem cell

ESC : Embryonic stem cell

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR : polymerase chain reaction

RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

ALP : Alkaline phosphatase

PFA : paraformaldehyde

CMF-PBS : Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free Dulbecco's phosphate buffered saline

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ddPCR : Droplet Digital PCR

α -SMA : α -smooth muscle actin

AFP : α -fetoprotein

H-E 染色 : Hematoxilin & Eosin 染色

STR : Short Tandem Repeat

MSC: Mesenchymal stem cell

UPL : Universal Probe Libra

第一章 緒言

Neurofibromatosis type I (NF1)、神経線維腫症 I 型は、神経線維腫とカフェ・オレ斑を主徴候とする疾患である。1882 年にドイツの病理学者 Friedrich Daniel von Recklinghausen により初めて報告されたことから、von Recklinghausen's disease として知られている (von Recklinghausen, 1882)。その後、1990 年にいくつかのグループによってその責任遺伝子が 17 番染色体長腕に位置 (17q11.2) する *NF1* 遺伝子であることが同定された (Buchberg et al., 1990; Wallace et al., 1990; Xu et al., 1990)。*NF1* の遺伝子産物ニューロフィブロミン (Neurofibromin: NF) は、健常人では Ras 蛋白の機能を制御して細胞増殖や細胞死を抑制する、癌抑制遺伝子として機能しており、NF1 では NF 蛋白の機能不全が生じるため発症すると考えられているが、その分子機構や発症機構は不明な点が多い。一方、近年このような遺伝性疾患の発症機構を解明するために、疾患特異的 iPSC を用いた研究の有用性が注目されている。

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPSC) は、体細胞に *Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-myc* の 4 遺伝子を導入することで初期化誘導される多能性幹細胞であり (Takahashi and Yamanaka, 2006)、自己複製能と胚体外組織を除く種々の体細胞系列への分化多能性を有し、胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ESC) と類似した特徴を有している。2007 年にはヒト由来の iPSC の樹立が報告された (Takahashi et al., 2007)。一般的に iPSC は不活性化したマウス線維芽細胞をフィーダー細胞とし、ウシ血清あるいは、動物由来成分を含む代替血清を使用し培養されている (Park et al., 2008; Matsumoto et al., 2013; Lee et al., 2015)。このような培養系では血清中に多くの既知あるいは未知の因子が混在していることから、細胞増殖や分化を正確に評価することや、細胞機能を維持することは困難である (Barnes and Sato, 1980)。さらにレトロウイルスを用いた遺伝子導入法による iPSC 誘導では、同ウイルスがゲノム挿入を伴うことか

ら癌化などの問題点がある (Okita et al., 2007)。著者の所属する研究室の先行研究では、宿主 DNA に遺伝子挿入のないセンダイウイルスベクターを初期化遺伝子導入に用い、不活性化マウス線維芽細胞などのフィーダー細胞を用いることなく、血清中の既知や未知の因子、病原性因子などを排除した成分の明らかな完全無血清培養系、つまりフィーダーフリー、インテグレーションフリー、完全無血清培養系でヒト線維芽細胞、歯髓由来細胞、および末梢血単核細胞からヒト iPSC を誘導し、長期培養することに成功し、報告してきた (Yamasaki et al., 2014 ; Kishino et al., 2014 ; Yamasaki et al., 2016)。現在、ヒト iPSC を用いてさまざまな疾患の病態モデルが作成され、その病態解明や新規治療法の開発研究が進んでいる (Park et al., 2008 ; Matsumoto et al., 2013 ; Lee et al., 2015 ; Yedid et al., 2016)。完全無血清培養系を用いることで、iPSC の増殖・分化を正確に評価するとともに、これらに關与する各種因子を明らかにすることが可能となることから、病態モデル樹立およびその解析に大変有用であると考えられる。さらに、本培養系を用いて NF1 に代表される多発性腫瘍疾患由来 iPSC (NF1-iPSC) を樹立することは、ヒト疾患の病態解明や疾患治療や発症予防だけではなく、体細胞変異における発癌機構を解明する上で極めて重要であると考えられる。

本研究では、広島大学病院 顎・口腔外科を受診し臨床的に NF1 と臨床診断されていた 2 名の患者より、広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認を得た研究計画 (第ヒ-58 号、72 号) に基づいて遺伝子診断および iPSC 樹立研究の同意を取得後、得られた患者末梢血単核細胞 Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) から、フィーダーフリー、インテグレーションフリーおよび完全無血清培養系で NF1-iPSC を誘導・樹立し、同細胞を用いて原因遺伝子の発現解析や疾患研究を行うことを目指した。

第二章 NF1 由来疾患特異的人工多能性幹細胞 (NF1-iPSC)の樹立

第1節 材料および方法

1. 患者背景

神経線維腫症 I 型 (NF1)は、症状が多彩で個体差が大きいことが知られている。主徴候である神経線維腫、カフェ・オレ斑の他に、皮膚病変、骨病変、眼病変があり、高血圧などの循環器障害も併発することが多い。また、本疾患の半数では学習障害や注意欠陥多動性障害がみられるとの報告もある (Jett and Friedman, 2010)。遺伝形式は常染色体優性遺伝であるが、半数が発生期の突然変異による孤発例であり、人種差はなく、発症率は 3,000 人に 1 人の、発症率の比較的高い疾患である。本邦には 40,000 人の罹患者がいるとされ、現在の所、根本的な治療法はないが、予後は良好で、悪性化は 4% 以下とされている (Messiaen et al., 1999)。そのため新たな治療法の開発が急務である。

本邦での診断基準は、アメリカ国立衛生研究所の診断基準に基づき、以下のような日本皮膚学会のガイドラインが用いられている。

- ① 6 個以上の最大径 15mm 以上のカフェ・オレ斑 (思春期以前では最大径 5mm 以上)。
- ② 2 個以上の神経線維腫、あるいは 1 個以上のびまん性神経線維腫。
- ③ 腋下や鼠径部の雀卵斑様色素斑。
- ④ 視神経膠腫。
- ⑤ 2 個以上の Liche 結節 (虹彩過誤腫)。
- ⑥ 特徴的骨病変 (四肢骨の変形・病的骨折、脊柱・胸郭の変形、頭蓋骨・顔面骨の骨欠損など)。
- ⑦ 近親者 (両親、同胞、子)に上記の診断基準を満たす NF1 罹患者の存在。

以上の 7 項目のうち、2 項目が該当することが必要としている。なお、本研究で対象とした 2 名の患者では遺伝子診断は行われていなかった。

<患者 1 (NF1-1)>

患者 1 (NF1-1)は 37 歳、男性で、2013 年 9 月、摂食困難を主訴に広島大学病院顎・口腔外科初診となった。15 歳時に NF1 の臨床診断を受けていた。家族歴に特記事項はなかった。初診時、頭顔面、四肢、背面に複数の神経線維腫およびカフェ・オレ斑を認めた (図 1)。また、下顎骨の異常可動性、パノラマ X 線写真および CT 画像で著明な下顎骨吸収および病的骨折を認めた。当科初診 7 年前のパノラマ X 線写真では下顎骨吸収像は認めなかった (図 2)。また、幼少時に先天性脛骨欠損、26 歳時に脊椎側弯症、さらに、40 歳時に右鎖骨の病的骨折および骨髄炎の既往を持っていた (図 3)。

<患者 2 (NF1-2)>

患者 2 (NF1-2)は 48 才、女性で、初診より 8 年前、他院で 54¹ 歯根端切除術施行され、経過観察となっていたが、同部症状が再燃し、2015 年 5 月、広島大学病院顎・口腔外科初診となった。24 歳時に NF1 の臨床診断を受けていた。家族歴に特記事項はなかった。初診時、前腕と背部にそれぞれ単発の神経線維腫およびカフェ・オレ斑を認めた。パノラマ X 線写真では顎骨に異常所見は認めなかった (図 4)。既往歴として、25 歳および 27 歳時に右拍動性眼球突出に対し、眼窩後壁骨欠損再建術、35 歳時に子宮筋腫摘出術、41 歳時に脳梗塞、高血圧、高脂血症、49 歳に小脳肥大、髄膜腫、大脳深部白質変性などの脳病変を有していた (図 5)。

2. 細胞培養

2-1 細胞培養液

1) 末梢血由来単核球 : Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) の無血清培養

RPMI1640 培地 (Sigma-Aldrich, T-1147, MO, USA) (George et.al, 1967) と

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培地 (Dulbecco and Freeman, 1959), (Sigma-Aldrich) を 1:1 で混合し、Ampicillin (90mg/ml) (Meiji, Tokyo, Japan), Kanamycin (90mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ピルビン酸ナトリウム (110mg/ml) (Sigma-Aldrich), 15mM HEPES (Dojindo, Kumamoto, Japan), 重炭酸ナトリウム (2g/L) (Sigma-Aldrich) を添加した RD 培地 (Sato et al., 1987) を基礎栄養培地として用いた。RD 培地に、以下の 6 因子、すなわち insulin (10 μ g/ml) (CSTI 0105, Funakoshi, Tokyo, Japan), transferrin (5 μ g/ml) (T-1147, Sigma-Aldrich), 2-ethanolamine (10 μ M) (E-0135, Sigma-Aldrich), 2-mercaptoethanol (10 μ M) (M-7522, Sigma-Aldrich), sodium selenite (10nM) (S-9133, Sigma-Aldrich), および Oleic acid (4.7 μ g/ml) (O-1383, Sigma-Aldrich) conjugated with human recombinant albumin (500 μ g/ml) (Millipore, Darmstadt, Germany) を加えた無血清培地 RD6F (Sato et al., 1987 ; Myoken et al., 1989) に human recombinant interleukin-2 (IL-2) (300ng/ml) (武田薬品工業株式会社, Osaka, Japan) を添加し 100mm dish (BD Falcon, CA, USA) 上にて培養を行った (Okamoto et al., 1996) (表 1)。

2) iPSC 用無血清培地

hESF9 培地 (Furue et al., 2008) (表 1) を用いて、PBMC より iPSC の樹立および継代培養を行なった。hESF9 培地は、基礎培地 hESF-GRO (Cell Science & Technology Institute, Inc, Sendai, Japan に委託生産) (表 2) に、添加因子として human recombinant insulin (10 μ g/ml) (Funakoshi) human transferrin (5 μ g/ml) (T-1147, Sigma-Aldrich), 2-aminoethanol (10 μ M) (M-7522, Sigma-Aldrich), 2-mercaptoethanol (10 μ M) (M-7522, Sigma-Aldrich), sodium selenite (20nM) (S-9133, Sigma-Aldrich) および Oleic acid (4.7 μ g/ml) (O-1383, Sigma-Aldrich) conjugated with human recombinant albumin (500 μ g/ml) (9301, Millipore) を加えた

hESF6F 培地に、さらに、L-ascorbic acid-2-phosphate (100 μ g/ml) (013-196411, Wako, Osaka, Japan), heparin sodium salt (100ng/ml) (H7640, Sigma-Aldrich) および recombinant human fibroblast growth factor-2 (10ng/ml) (rh-FGF-2: 3718FB, R&D, MN, USA) を添加し、用いた。接着因子として、laminin-E8 (0.5 μ g/cm²) (Nippi, iMatrix, Tokyo, Japan) を用い、これをコートした 35mm dish (BD Falcon) 上で、CO₂ インキュベーター (Astec, APM-30D, Fukuoka, Japan) 内で 37°C、5%CO₂/95%気相下で培養を行った (図 6)。

2-2 センダイウイルスベクター

センダイウイルスのゲノム RNA は 8 つの遺伝子が直列に配置された構造を有する。本研究では、インターフェロン誘導の欠損株である持続感染変異センダイウイルス Clone.151 株をベースとし、ウイルス 2 次粒子の形成に必須の構造蛋白である、フュージョン蛋白、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ、およびマトリックス蛋白をコードする遺伝子をすべて欠損させ、*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, および *c-myc* の 4 初期化遺伝子を同一ベクター内に搭載した、センダイウイルスベクター-SeVdp (KOSM302L) を用いた (産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 中西真人博士より供与) (Yoshida et al., 1982; Nishimura et al., 2011)。遺伝子発現レベルは 3' 末端側が最も高く、5' 末端側に近づくほど減弱する。各遺伝子の前後にはそれぞれ 10 塩基の短い転写開始シグナルと転写終始シグナルを有し、ゲノム RNA を鋳型として転写された mRNA には、Poly-A 配列や Cap 構造が付加されている。

3. NF1 症候群患者由来 iPSC (NF1-iPSC) の樹立

3-1 NF1-iPSC の誘導

1) NF1-PBMC の初代培養

広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認を得た研究計画（第ヒ-58号、72号）に基づき、NF1患者の同意を取得後、末梢血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法 (histopaque®1077 ; 1077-1: Sigma-Aldrich) を用いて単核球分画を分離した。続いて、2-1-1)の方法に準じて IL-2 添加 RD6F を用いて、100mm dish (BD Falcon) 上で、PBMC の初代培養を CO₂ インキュベーター内で 37°C、5%CO₂/95%気相下で行った。

2) センダイウイルスベクターによる初期化

IL-2 添加 RD6F 培地で PBMC を 6 日間初代培養後、初期化 4 遺伝子 (*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*) を搭載したセンダイウイルスベクター SeVdp (KOSM302L) を MOI=6 の条件で感染させた。感染後は 32°C で 2 時間培養後、human recombinant laminin-E8 (0.5µg/cm²) (iMatrix, Nippi) 処理 6 well plate (BD Falcon) 上に 1.0×10⁵ cells/ml の細胞密度で hESF9 培地を用いて培養した。培地交換は 2 日毎に行った。コントロールとして、健常人由来 PBMC を IL-2 添加 RD6F 培地で 6 日間培養後、SeVdp (KOSM302L) を用いて初期化した iPSC (WT-iPSC) を用いた (図 7)。

3) NF1-iPSC の樹立・継代

感染 14 日後に出現したコロニーを、マイクロピペットにて機械的に pick up し、4 well dish (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に播種し、passage 1 とした。未分化性の高い辺縁平滑なコロニーの中央部の iPSC をマイクロピペットで機械的に pick up し、laminin-E8 処理 dish 上で、hESF9 培地に rh-activin A (R&D System, MN, USA) (10ng/ml) を添加した hESF9 培地で継代培養を行った。

3-2 NF1-iPSC の細胞特性の解析

1) 未分化性の検討

① ALP 活性を指標にした未分化性と誘導効率の評価

初期化遺伝子感染後、誘導した dish において、細胞/コロニーを固定液（4.5mM クエン酸、2.25mM クエン酸三ナトリウム、3mM 塩化ナトリウム、65%メタノール、3%ホルムアルデヒド）で細胞固定後、アルカリフォスファターゼ基質キット（ヒストファイン ファーストレッドII 基質キット Nichirei, Tokyo, Japan）にて遮光下、室温で 15 分間反応後、位相差顕微鏡で検鏡下、ALP 陽性コロニー数を計測した。誘導効率は、6 well dish の各 well に播種した 10^5 個の PBMC に対する ALP 陽性コロニー数の割合で算出した。

② 蛍光免疫染色法を用いた NF1-iPSC における未分化マーカー蛋白の発現解析

NF1-iPSC を 4%paraformaldehyde (PFA) にて固定、ブロッッキング後、未分化マーカー Oct3/4, Nanog, および SSEA-3 に対する各種抗体（表 3）を用いて、4℃下 12 時間反応させた。続いて、1%ウシ血清/PBS (Phosphate buffered saline) にて室温で 5 分間 3 回洗浄後、2 次抗体として Alexa Flour®488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（1/300 希釈: Invitrogen™, Massachusetts, US）あるいは Alexa Flour®488 標識ラビット抗ヤギ IgG 抗体（1/300 希釈: Invitrogen™）にて室温遮光下、30 分間反応させた。次に、1%ウシ血清/PBS にて 10 分間 3 回洗浄後、4', 6-diamidino- 2-phenylindole (DAPI) にて核染色し、洗浄後、0.5%ホルマリンにて固定し、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (Flexible Confocal Microscope LSM 700 Carl Zeiss, GmbH, Germany) を用いて検鏡・観察を行った。

③ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いた未分化マーカー遺伝子の発現解析

1) RNA の抽出法

NF1-iPSC 由来 total RNA の抽出は、TRIZOL[®] (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用い、添付プロトコールに準じて以下のごとく行った。回収した細胞に TRIZOL[®] 1ml およびクロロホルム (Wako, Osaka, Japan) 0.2ml を加え振盪混和後、室温で 2-3 分間インキュベートし、12,000×*g* で 5 分間遠心後、水相を回収した。続いて、0.5ml のイソプロパノール (Wako) を加え、室温で 10 分間インキュベート後 12,000×*g* で 15 分間遠心し、上清を除去した。さらに、75%エタノール (Wako) を 1ml 添加し、4℃、7,500×*g* で 5 分間遠心し、得られたペレットを風乾させ、Nuclease-free water 40μl にて溶解した。RNA の定量は、Nano Drop (Nano Drop Technologies, Inc., USA) を用いた。

2) RT-PCR 法

1) で抽出した total RNA (1μg) をテンプレートとして SuperScript[®]VILO[™] Master Mix (Invitrogen[™]) を用いて cDNA 合成を行った。続いて、OnePCR[™] (GeneDirex, Inc., USA) にて、*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, *Rex1* および *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子の各プライマー (表 4) を用いて、NF1-PBMC 由来 cDNA および NF1-iPSC 由来 cDNA をテンプレートとして、98℃ 10 秒、59℃ 30 秒、72℃ 90 秒を 1 サイクルとした増幅反応を 32 サイクル行い PCR 産物を得た。次に、PCR 産物をアガロースゲル 1.5% にて電気泳動し、SYBR[®]Safe で可視化後、解析した。

3) 分化多能性の検討

① 胚様体培養法を用いた三胚葉への分化能の検討

無血清培養条件にて継代・維持した NF1-iPSC から、胚様体を形成させ、三胚葉への分化能を検討した。96 well 低吸着プレート (SUMILON Prime surface U Plate : 住友ベークライト, Japan) に 1.0×10^5 cells/well/ 100 μ l の細胞密度で hESF6 培地を用いて NF1-iPSC を播種し、浮遊培養を行った。培養 3 日目に、0.1%gelatin コート 35mm dish (BD Falcon) に胚様体 5 個/dish となるように再播種し、21 日間培養を行った。培地交換は 2~3 日毎に行った。

② 蛍光免疫染色法を用いた胚様体における三胚葉マーカーの発現解析

胚様体培養法にて分化誘導 21 日目の NF1-iPSC に対し、各種分化マーカーに対する抗体 (表 3) を用いて蛍光免疫染色を行った。神経線維マーカーとして β III tubulin (Milipore)、平滑筋アクチンマーカー smooth muscle actin (α -SMA) (Dako Cytomation, CA, USA)、初期肝細胞マーカー α -fetoprotein : AFP (R&D) の各抗体を用いた。

細胞を 4%PFA で固定後、5%ヤギ血清でブロッキング後、各抗体で、4 $^{\circ}$ C 12 時間反応させた。1%ウシ血清/PBS にて、室温下 5 分間 3 回洗浄後、2 次抗体として Alexa Flour[®]488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を室温遮光下、30 分間反応させた。続いて、1%ウシ血清/PBS で 5 分間 3 回洗浄後、DAPI にて核染色し、洗浄後 0.5%ホルマリンにて固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, Hannover, Germany) を用いて検鏡・観察を行った。

③ 免疫不全マウスを用いた teratoma (奇形腫) 形成およびその組織学的検討

[1] 免疫不全マウスの背部皮下への NF1-iPSC の移植

NF1-iPSC を免疫不全マウス (CB17/Icr-PrkdNF1cid/CriCrlj, 日本チャールズ・

リバー株式会社, Yokohama, Japan) の背部皮下に移植し teratoma 形成能を検討した。NF1-iPSC 1.0×10^6 cells を type I collagen (0.3mg/ml) を含む PBS 100 μ l に懸濁し、免疫不全マウスの背部皮下に移植した。

[2] H-E 染色および PAS/Alcian blue 染色

形成された NF1-iPSC 由来 teratoma を摘出し、4%PFA にて 4°C 下一晩固定後、脱脂、パラフィン包埋し、5 μ m の連続切片を作成した。続いて、H-E 染色および Alcian-Blue 染色を行い、脱水・封入後、顕微鏡 (Nikon Eclipse E800, Nikon, Tokyo, Japan) にて観察を行なった。H-E 染色は通法に従い、脱パラフィン、水洗、ヘマトキシリン (Wako) およびエオジン (サクラファインティックジャパン株式会社, Tokyo, Japan) で染色、脱水、透徹、封入を行った。PAS/Alcian blue 染色は、通法に従い、脱パラフィン、水洗後、3%酢酸 (Wako) に浸漬し、Alcian blue (Wako)、0.5%過ヨウ素酸溶液 (Wako)、あるいはコールドシッフ液 (Wako) でそれぞれ染色後、亜硫酸水に浸漬し、脱水、透徹、および封入を行った。

[3] STR 解析

NF1-iPSC が由来細胞と同一であることを STR 解析にて検証した。NF1-PBMC 由来 DNA および NF1-iPSC 由来 DNA を QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出後、Powerplex®16 System (Promega, WI, USA) を使用し、ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Thermo Scientific, MA, USA) および Gene Mapper v3.5 (Applied Biosystems®) にて各 DNA の STR 解析を行った。DNA の定量は Nano Drop (Nano Drop Technologies, Inc.) を用いた。

第二節 結果

1. フィダーフリー・インテグレーションフリー・無血清培養系での NF1-iPSC の誘導および同細胞における誘導効率の検討

NF1 患者由来末梢血より単核球 (PBMC) を分離し、RD6F に IL-2 を添加した無血清培地で培養することで細胞障害性活性化リンパ球を誘導した。続いて、同リンパ球を初期化 4 遺伝子 (*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*) を搭載したセンダイウイルスベクター SeVdp (KOSM302L) を用いて初期化した。ウイルス感染 14 日後より、ES 細胞様コロニーが出現した。マイクロピペットにて機械的にコロニー中心部の iPSC を pick up し、laminin-E8 処理した dish 上で hESF9 を用いて継代培養を行った。

ALP 活性陽性コロニー数を計測し、 10^5 個あたりの ALP 陽性コロニー数を誘導効率として算出した (図 8A)。コントロール群である WT-iPSC の誘導効率は約 0.05% であったが、NF1-iPSC の誘導効率は NF1-1 で約 0.124%、NF1-2 で約 0.088% を示し、WT-iPSC の誘導効率と比較して有意に高いことが明らかとなった (図 8B)。

NF1-iPSC は、WT-iPSC と同様の未分化コロニーの形態を示し、継代および長期維持が可能であった。

2 NF1-iPSC の細胞特性解析

1) 未分化性の検討

無血清培地 hESF9 に activin A を加えた hESF9A 培地を用いて、フィーダー細胞を用いずに継代培養した NF1-iPSC の未分化性を、未分化マーカーである Oct3/4, Nanog, および SSEA3 蛋白の発現を指標に、蛍光免疫染色法を用いて検討した結果、NF1-iPSC はこれら未分化マーカーを発現していたことから、未分化性を維持していることが明らかとなった (図 9)。

また、各種未分化マーカー遺伝子 (*Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*) の発現を RT-PCR 法にて解析した結果、誘導前の PBMC ではいずれの未分化遺伝子も発現していなかったが、NF1-iPSC では、*Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2*, および *Rex1* のすべての未分化マーカー遺伝子を発現していた (図 10)。

2) NF1-iPSC における分化多能性の検討

① 胚様体形成法を用いた分化多能性の検討 (*in vitro*)

無血清培地 hESF9A 培地で継代維持した NF1-iPSC を用いて胚様体形成を行い、三胚葉への分化誘導を行うことで、分化多能性を検討した。外胚葉マーカーとして神経細胞マーカーである β III tubulin、中胚葉マーカーとして平滑筋マーカー α SMA、および内胚葉マーカーとして初期肝細胞マーカー α -fetoprotein : AFP 蛋白の発現を蛍光免疫染色にて検討した。その結果、いずれのマーカー蛋白も発現されていたことから、NF1-iPSC は *in vitro* での三胚葉への分化多能性を有していることが明らかとなった (図 11)。

② Teratoma 形成能およびその組織学的検討 (*in vivo*)

NF1-iPSC (NF1-1-iPSC, NF1-2-iPSC) を免疫不全マウス背部皮下に移植することで腫瘍形成を認めた。同腫瘍を摘出後、H-E 染色および PAS/Alcian blue 染色にて組織学的に検討した結果、神経、軟骨、消化管など、外胚葉、中胚葉、内胚葉に由来する組織像を認めたことから、本腫瘍は teratoma であることが明らかになり、いずれの NF1-iPSC も、*in vivo* においても三胚葉への分化多能性を有していることが示された (図 12)。

③ STR 解析

各 NF1-1-iPSC および NF1-2-iPSC がそれぞれ同一患者由来であることを検証する
為に、各 NF1-iPSC および各 NF1-PBMC 由来 DNA の STR 解析を行った結果、16 の
locus がすべて一致したことから、各 NF1-iPSC はそれぞれの NF1-PBMC 由来である
ことが確認された (図 13、14)。

第三章 Neurofibromatosis type I (NF1)と臨床診断された患者の 遺伝子診断

第一節 材料および方法

1. 遺伝子診断

1-1 患者末梢血からの DNA 抽出

広島大学ヒトゲノム倫理審査委員会承認計画研究第ヒ 72 号に基づき、同患者の同意の下、遺伝子解析を行った。まず、末梢血を採取し、QIA Blood mini kit (QIAGEN) を用いて、添付プロトコールに準じて DNA の抽出を行った。DNA の定量は Nano Drop (Nano Drop Technologies), および, Qubit dsDNA HS Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

1-2. 次世代シーケンサーMiSeq を用いた網羅的遺伝子解析

1-1 で調整した DNA の NGS 網羅的遺伝子解析を、次世代シーケンサー (MiSeq, illumina, CA, USA) を用いて行った。添付のプロトコールに準じて以下のごとく、ライブラリーを作成した。

1) Tagmented DNA の調整

患者末梢血由来 DNA 50ng に対して、Tagment buffer (illumina) 25 μ l および Tagment Enzyme 1 (illumina) 5 μ l を添加し、混和したのちヒートブロック (BI-536 ASTEC, Oosaka, Japan) 上で 58 $^{\circ}$ C 10 分間インキュベートした。その後、Stop tagment buffer (illumina) 15 μ l を添加し、よく混和した。

2) Tagmented DNA の精製

サンプル吸着ビーズ (illumina) 65 μ l を添加し、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific, USA) に 2 分間静置し、上清を除去後、沈渣に 80%エタノール 200 μ l を加え Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置・上清除去を 2 回繰り返し、Resuspension Buffer (illumina) 22.5 μ l を添加した。よく混和後、Magnetic stand に静置後、約 20 μ l 上清を次の 1st PCR 反応に用いた。

3) 1st PCR 反応

2)で得た上清に、氷上で Index Primer (illumina) 5 μ l と Library Amplification Buffer (illumina) 20 μ l を添加し、Thermal Cycler (PTC- DNA Engine Dyad, Bio-Rad, California, USA) を使用し、98 $^{\circ}$ C 30 秒間、60 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 30 秒間を 1 サイクルとし 10 サイクル繰り返すことで PCR 反応を行った。

4) PCR 産物の精製

3) で得た PCR 産物にサンプル吸着ビーズ (illumina) 90 μ l を添加し、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に 2 分間静置後、上清を除去した。続いて、80%エタノール 200 μ l を加え混和し Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置後、上清除去を行う操作を 2 回繰り返し、Resuspension Buffer (illumina) 27.5 μ l を添加した。次に、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置したのち、約 25 μ l の上清を採取した。

濃度および精製度の測定には Qubit[®] Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) および Agilent Technologies 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Hachioji, Japan)を用いた。

5) 1st Hybridization

3) で得た上清を、Resuspension Buffer (illumina) に希釈し、Enrichment Hybridization buffer (illumina) 50 μ l および Trusight One Oligos (illumina) を 10 μ l を添加後、Thermal Cycler (PTC- DNA Engine Dyad, Bio-Rad) にて、以下の HRC HYB Program で、95 $^{\circ}$ C 10 分、93 $^{\circ}$ C 1 分、91 $^{\circ}$ C 1 分、89 $^{\circ}$ C 1 分、…… 60 $^{\circ}$ C 1 分、58 $^{\circ}$ C ∞ のごとく、95 $^{\circ}$ C から 60 $^{\circ}$ C まで 2 度ずつ温度を下げながら反応させた。

6) 1st Capture

5) で得た産物に Streptavidin-magnetic beads (illumina) 250 μ l を添加し、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置後、上清除去を行った。続いて、Enrichment Wash Solution (illumina) 200 μ l を添加し、50 $^{\circ}$ C 30 分間インキュベートした。ただちに Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置し、上清を除去した。再度 Enrichment Wash Solution (illumina) 200 μ l を添加し、50 $^{\circ}$ C 30 分間インキュベートし、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置後、上清除去を繰り返す。Enrichment Elution Buffer1 (illumina) 28.5 μ l および 2N の NaOH を 1.5 μ l 添加し、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置し、上清に Elute Target Buffer を添加した。

7) 2nd Hybridization

3) で得た産物に Resuspension buffer (illumina) 15 μ l、Enrichment hybridization Buffer (illumina) 50 μ l および Trusight One Oligos (illumina) 10 μ l を添加し、Thermal Cycler (PTC- DNA Engine Dyad) を用いて、前述の HRC HYB program で反応させた。

8) 2nd Capture

7) で得られた産物を、前述の 6) と同様の方法で処理した。

9) Capture Clean up

サンプル吸着ビーズを 8) の産物に加え、上清を除去した。80%エタノール 200 μ l にて 2 回洗浄後、Resuspension Buffer (illumina) 27.5 μ l を添加し、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置し、その上清を用いて 2nd PCR を行った。

10) 2nd PCR

上清 25 μ l に PCR プライマーカクテル (illumina) 5 μ l を加え、よく混和後、Thermal Cycler (PTC- DNA Engine Dyad) で 98 $^{\circ}$ C 10 秒間、60 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 30 秒間を 1 サイクルとして 10 サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ C 5 分間を行うことで PCR 反応を行った。

11) 2nd PCR Clean up

10) で得られた産物にサンプル吸着ビーズ 90 μ l を添加し、Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置後、上清を除去した。続いて、80%エタノール 200 μ l で 2 回洗浄し、Resuspension Buffer (illumina) を添加した。Magnetic stand (Thermo Fisher Scientific) に静置後、上清を回収し解析に用いた。濃度および精製度の検討には、Qubit[®] Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)および Agilent Technologies 2200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, USA) を用いた。

12) Sequencing on MiSeq

Resuspension Buffer (illumina) で、1.25nM になるように希釈したライブラリー溶液の 10 μ l と 0.1N NaOH 10 μ l を混和し、5 分間インキュベートした後、980 μ l の

HT1 Buffer (illumina) を加えた DNA ライブラリーの 600 μ l を、MiSeq Reagent kit V3 にロードし、シーケンスを行った。得られたデータを Variant Studio ソフトウェア (illumina)にて既知の先天性疾患の表現型に関わる 4813 遺伝子の全 exon にアライメントし、各々の遺伝子における変異の有無を解析した。

1-3. CEQer による CNA (Copy number alterations)解析

NGS より生成されたシーケンス生ファイルを、解析ファイル CEQer にて CNA を検討した。コントロールとして、illumina 社の提供する TrusightOne 疾患パネルにてシーケンスされた健常人解析結果サンプルを用いた。

1-4. Droplet Digital PCR (ddPCR) 法を用いた染色体コピー数の解析

NF1-PBMC および WT-PBMC、NF1-iPSC および WT-iPSC における 17 番染色体上に存在する NF1 遺伝子のコピー数を Droplet Digital PCR (ddPCRTM) にて検討した。コントロールとして、同じく 17 番染色体上に位置し、かつ CEQer 解析の結果、健常人の CNA と有意差がなかった、ATP アーゼファミリーをコードする *ATAD5*(*ATPase Family, AAA Domain Containing 5*) 遺伝子を用いた (図 15)。

ddPCRTM のプロトコールに準じて、DNA (20pmol)、ddPCRTM supermix for Probes (Bio-Rad)、Universal Probe Library (UPL) Probe (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) (5pmol)、および primer を用いてサンプル調整を行った。次に、Droplet Generator (Bio-Rad) を使用しドロップレットを作製した。

各ドロップレットをテンプレートとして、C1000 TouchTM Thermal Cycler (Bio-Rad)を用いて、PCR 反応を行った。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C30 秒、54 $^{\circ}$ C90 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。反応後、QX100 droplet リーダーにてポジティブ droplet とネガティブ droplet 数を計測することで、各遺伝子の DNA のコピー数を定量した。

各遺伝子に対するプライマーおよびプローブは Universal Probe Library Human Gene Assay (Roche) キットを用いた。プライマーは表 5 の①と②を使用した。

また、*ATAD5* DNA コピー数を測定し、*ATAD5* DNA 範囲のコピー数に対する、*NF1* 遺伝子 DNA 範囲の相対的なコピー数を求めた。

1-5. NF1-2 におけるサンガーシーケンス法を用いた変異部位の検討

NF1-2-PBMC および NF1-2-iPSC から total RNA を抽出した。抽出には illustra RNA spin Mini isolation kit (GE Healthcare, UK) を使用し、添付のプロトコールに準じて以下のごとく行った。まず、 β -メルカプトエタノールを含む細胞溶解液に iPSC を溶解させ、付属のカラムにかけた後 11,000 $\times g$ で 1 分間遠心・濾過後、flow-through 画分に 70%エタノールを添加し、よく混和し、シリカメンブレンへ結合させた。続いて、DNase 処理し wash buffer でシリカメンブレンを洗浄後、RNase-free water で RNA の溶出を行った。コントロールとして、健常人 (WT) -iPSC から同様の方法で抽出した RNA を用いた。Total RNA の定量には Nano Drop (Nano Drop Technologies, Inc.) を用いた。各細胞由来 total RNA (1 μ g) から Super Script® VILO™ Master Mix (Invitrogen™) を用い、Thermal Cycler (PTC- DNA Engine Dyad) にて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

NF1-2 において、NGS で検出された *NF1* 遺伝子の変異部位についてサンガーシーケンス法でさらに検討した。NF1-2-PBMC および NF1-2-iPSC 由来の DNA および cDNA をテンプレートに 98°C 10 秒間、60°C 30 秒間、68°C 30 秒間を 1 サイクルとし、35 サイクル PCR 反応を行った。プライマーは表 5 の③と④を使用した。

得られた PCR 産物を精製し、CEQ800™ genetic analyze system (Beckman Coulter, CA, US) にて遺伝子配列を解析した。

第二節 結果

1. NGSによる先天性疾患関連遺伝子の網羅的遺伝子変異解析

末梢血由来 DNA を用いた NGS 解析の結果、NF1-1 および NF1-2 では、神経線維腫 I 型の原因遺伝子である *NF1* 遺伝子に 1 カ所ずつ変異が検出された。

NF1-1 では exon18 に一塩基変異が検出された。これは 2034 番目の塩基 G の A への変異であり(c.2034 G>A)、678 番目のアミノ酸である proline をコードするコドンであったが、同じく proline をコードする silent mutation で (CCG→CCA)、NF1-1 ではアミノ酸を置換する塩基配列の変異を検出できなかった。

一方で、NF1-2 では exon40 に一塩基変異が検出された (NCBI:SNP:rs137854552C>T)。これは、5902 番目の塩基 C の T への変異であり (c.5902C>T)、1968 番目のアミノ酸である arginine をコードするコドンが stop codon にかわる nonsense mutation であることが示唆された (CGA→TGA)。

また、*NF1* 遺伝子と同一の第 17 番染色体上に存在する腫瘍関連遺伝子、*TP53* (17q13.1)、*BRCA1* (17q21.31)、*ERBB2 (HER2)* (17q12.2)、*TOP2A* (17q21.2)、*STAT3* (17q21.2) 遺伝子の変異の有無を検討したが、NF1-1 および NF1-2 とともに、これら遺伝子群にアミノ酸置換を示唆する変異は検出されなかった。

2. CEQerによるCNA解析

NF1-1 においては、NGS 解析の結果アミノ酸置換などを示唆する変異を検出できなかったため、NF1-1 の全染色体の CEQer による CNA 解析を行った。その結果、17 番染色体上の *NF1* 遺伝子領域の CNA が、コントロールのそれと比較して約 60%減少していた (図 16)。

なお、同じく 17 番染色体上にあり重要な腫瘍関連遺伝子である、*TP53* (17q13.1)、

BRCA1(17q21.31)、*ERBB2 (HER2)*(17q12.2)、*TOP2A*(17q21.2)、*STAT3*(17q21.2)の CNA は健常人と比較し有意差はなかった。

しかし、同一染色体上の遺伝子で、*SLC52A1* (17p13.2), *SLC2A4* (17p13.1), *PIK3R5* (17p13.1), *GRN* (17q21.31), *GHI* (17q23.3), *PFAS* (17p13.1), *MYH13* (17p13.1), *LLGL1* (17p11.2), *SLC47*(17p11.2) , *ACLY* (17q21.2), *GIT1* (17q11.2)の 11 遺伝子では、CNA がコントロールと比べて減少している可能性が示された。

3. Droplet Digital PCR (ddPCR) 法を用いた染色体コピー数の解析

CEQer による CNA 解析の結果、NF1-1 においては *NF1* 遺伝子が欠失している可能性が示されたため、ddPCR 法により、PBMC 由来の DNA を用いて NF1 領域の染色体コピー数を解析した。コントロールとして用いた *ATAD5* 遺伝子は健常人、NF1-1、NF1-2 とともに、コピー数に有意差はなかったが、NF1-1 においては *NF1* 遺伝子のコピー数のみが低下していた。また、*ATAD5* と *NF1* 遺伝子におけるコピー数の割合でも、NF1-1 が有意に減少していた。また、NF1-1-iPSC および WT-iPSC 由来 DNA でも同様の結果を得た (図 17)。

4. NF1-2 におけるサンガーシーケンス法を用いた *NF1* 遺伝子の変異の検討

NF1-2-PBMC において NGS により明らかとなった、*NF1* 遺伝子の exon 40 における変異を、サンガーシーケンス法でさらに検討した。その結果、NGS で明らかとなった変異と同一の変異が確認された (図 18A、C)。この変異 (c.5902C>T) により、1968 番目の arginine をコードする塩基配列 CCG が CCA に変化することで stop codon が生じ、NF1 蛋白の C 末端部 (1968~2801) が翻訳されずにトランケートされている可能性が示唆された (図 19)。また、mRNA においても同様の結果を得たことから、メッセンジャーレベルでもゲノム上の変異が継承されていることがわかった (図 18B、D)。さ

らに、NF1-2-iPSC の DNA ならびに cDNA においても同様の変異を認めた。

第四章 NF1-iPSC における *NF1* 遺伝子 mRNA および NF1 蛋白発現の検討

第一節 材料および方法

1. 未分化 NF1-iPSC における *NF1* mRNA 発現の解析

1) RNA 抽出および cDNA 合成

NF1-iPSC から、illustra RNA spin Mini isolation kit (GE Healthcare, UK) を用いて total RNA を添付のプロトコールに準じて、以下のごとく抽出した。まず、 β -メルカプトエタノール含有細胞溶解液に iPSC を溶解し、付属カラムにかけた後 $11,000 \times g$ で 1 分間遠心・濾過した。続いて、flow-through 画分に 70%エタノールを添加し、よく混和し、シリカメンブレンへ結合させた。さらに、DNase 処理後、wash buffer でシリカメンブレンを洗浄し RNase-free water で RNA を溶出した。健常人 (WT) -iPSC から同様に抽出した RNA をコントロールとして用いた。Total RNA の定量には Nano Drop (Nano Drop Technologies, Inc.) を用いた。各細胞由来 total RNA (1 μ g) から Super Script® VILO™ Master Mix (Invitrogen™) を使用し、Thermal Cycler (PTC-DNA Engine Dyad Japan) にて逆転写反応を行い、cDNA 合成を行った。

2) Droplet Digital PCR (ddPCR™) 法を用いた未分化 NF1-iPSC における *NF1* mRNA 発現の検討

NF1-iPSC および WT-iPSC における *NF1* mRNA の発現量を、ddPCR™にて検討した。

ddPCR™ のプロトコールに準じて、cDNA (20pmol)、ddPCR™ supermix for Probes (Bio-Rad)、Universal Probe Library (UPL) Probe (Roche) (5pmol)、および primer を

用いてサンプル調整を行った。次に、Droplet Generator (Bio-Lad) を使用しドロップレットを作製した。

各ドロップレットに対して、C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad)を使用し PCR 反応を行った。PCR 反応は、94℃ 30 秒、54℃ 90 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。反応後、QX100 droplet リーダーにてポジティブ droplet とネガティブ droplet 数を計測することで、各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。各遺伝子に対するプライマーおよびプローブは Universal Probe Library Human Gene Assay (Roche) キットを用いた。プライマーは表 5 の⑤と⑥を使用した。

GAPDH mRNA 発現量を測定し、*GAPDH* mRNA の発現量に対する、*NF1*mRNA の相対的な mRNA 発現量を求めた。

2. 胚様体を介した三胚葉分化誘導後の NF1-iPSC における *NF1* mRNA 発現の解析

1) 胚様体を介した三胚葉への分化誘導法

無血清培養条件にて継代・維持した NF1-iPSC および WT-iPSC から、胚様体培養法にて分化誘導を行った。96 well 低吸着プレート (SUMILON)に、NF1-iPSC および WT-iPSC を 1.0×10^5 個 /well/ 100 μ l の細胞密度で hESF6 培地を用いて播種し、胚様体培養を行った。培養 3 日目に、0.1%gelatin コートした 35mm dish (BD Falcon) に胚様体 5 個/dish となるように再播種し、2~3 日毎に培地交換を行い、21 日間培養を行った。

2) 分化誘導後の NF1-iPSC における *NF1* mRNA 発現の ddPCR 法を用いた検討

胚様体培養法にて分化誘導 21 日目の NF1-iPSC および WT-iPSC より RNA を抽出し、ddPCR のプロトコールに準じて *NF1* mRNA 発現を 2-1) の方法に準じて検討した。コントロールとして *GAPDH* 遺伝子を用いた。

3. 胚葉体を介した三胚葉への分化誘導後の NF1-iPSC における NF 蛋白発現の解析

1) 胚葉体を介した三胚葉分化誘導法

2-1)の方法に準じて分化誘導を行った。

2) 蛋白抽出

培養 21 日目の NF1-iPSC を、冷却 1×TBS buffer にて数回洗浄後、protease inhibitor cocktail p8340 (Sigma-Aldrich) および phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich) を 1:100 で添加した RIPA buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1%TritonX-100, pH7.4)を加え、超音波ホモジナイザー (UD-100 TOMY SEIKO, Tokyo, Japan) にて細胞破碎した。続いて、13,000×*g*で 10 分間遠心し、上清を試料とした。コントロールとして、WT-iPSC より同様の方法で抽出した蛋白を用いた。蛋白定量は、Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

3) 分化誘導後の NF1-iPSC における NF 蛋白発現の Western blot 法を用いた検討

蛋白抽出および定量は 2-1) 方法に準じてで行った。各電気泳動レーンに 25μg の抽出蛋白を load し、200V 定電圧下 40 分間 6%SDS-PAGE を行った。続いて、分離した蛋白をゲルから PVDF メンブレン (Bio-Rad) 上に転写 (セミドライ式 Electrotransfer 法)後、メンブレンを 5%スキムミルク (雪印, Gunma, Japan) にて室温下、30 分間ブロッキングし、TBS-T wash buffer (0.1% Tween20) で至適濃度にそれぞれ希釈した一次抗体である抗 NF1 および抗 β-actin 抗体で、室温下 1 時間処理した。続いて、メンブレンを TBS-T wash buffer にて 3 回洗浄後、TBS-T wash buffer で希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (57.5ng/ml) (GTX221666-01 GeneTex) あるいは HRP 標識マウス IgG 抗体 (0.2μg/ml) (GTX221667-01 GeneTex) で室温下 30 分間インキュベートした。続いて、メンブレンを TBS-T wash buffer にて 5 分間 3 回洗浄後、ECL 試薬 (Bio-Rad) を用いて化学発光させ、デジタル検出システム ChemiDoc Imaging System

(Bio-Rad) にて検出・定量した。

第二節 結果

1. 未分化 NF1-iPSC における *NF1* mRNA 発現の解析

未分化 WT-iPSC および未分化 NF1-iPSC の *NF1* 遺伝子発現を、ddPCRTM法を用いて定量解析した結果、未分化 WT-iPSC および未分化 NF1-iPSC のいずれも *NF1* 遺伝子発現は認められなかった (図 20A)。

2. 胚葉体形成法による三胚葉への分化誘導後の NF1-iPSC における NF1 mRNA 発現の解析

分化誘導後の WT-iPSC および NF1-iPSC における *NF1* 遺伝子発現を、ddPCRTM法にて定量した結果、NF1-1-iPSC の *NF1* 遺伝子発現量は WT-iPSC のそれと比較して約 1/2 に低下していた。一方、NF1-2-iPSC の *NF1* 遺伝子発現量は WT-iPSC のそれと同等の発現量を示した (図 20B)。

3. 胚葉体を介した三胚葉分化誘導後の NF1-iPSC における NF 蛋白の発現解析

Western blot 法を用いて解析した結果、NF1-iPSC では NF 蛋白発現は、WT-iPSC のそれらと比較して有意に低下していた (図 21)。

第五章 NF1-iPSC における完全無血清培養条件下での神経分化誘導実験の検討

第 1 節 材料および方法

1. 完全無血清培養条件下での iPSC の神経分化誘導法

完全無血清培養条件下で NF1-iPSC の神経分化誘導法を行い、分化能について検討した。96 well plate (Prime surface)の各 well に 1.0×10^5 cells/100 μ l の細胞密度で播種し、hESF6F 培地に、Wnt3a (10ng/ml)、FGF2 (10ng/ml)、SB431542 (10 μ M)、Noggin (200ng/ml)の各因子 (R&D) を加えて 7 日間培養し、胚様体形成後、Recombinant human laminin-521 (10ng/ml) (Corning[®]) 処理した dish 上で hESF6F 培地に、Wnt3a (10ng/ml)、FGF2 (10ng/ml)、SB431542 (10 μ M)の各因子を加え、さらに 14 日間培養した (図 22)。

2. 神経分化 NF1-iPSC における神経分化マーカー発現の蛍光免疫染色法を用いた解析

神経分化誘導法にて分化誘導 10 日目および 21 日目の NF1-iPSC に対し、各種分化マーカーに対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。神経分化マーカーとして、 β III tubulin (Milipore)、Nestin (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)、S100 (abcam)、Pax6 (abcam, Cambridge, UK)、NF1 (abcam)の各抗体を用いた。

細胞を 4%PFA で固定後、5%ヤギ血清でブロッキングし、上記各抗体で、4 $^{\circ}$ C 12 時間反応させた。1%ウシ血清/PBS にて、室温下 5 分間 3 回洗浄後、2 次抗体として Alexa Flour[®]488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を室温遮光下、30 分間反応させた。

続いて、1%ウシ血清/PBS で 5 分間 3 回洗浄後、DAPI にて核染色し、洗浄後 0.5%ホルマリンにて固定し、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Carl Zeiss)を用いて検鏡・観察を行った。

3. Western blot 法による神経分化 NF1-iPSC の Ras/MAP シグナルの解析

NF1 の責任遺伝子である *NF1* は Ras/MAP シグナル経路において、RasGAP として機能していることが知られていることから、各細胞における Ras/MAP シグナルについて検討した。

FGF2 とインスリンを含まない hESF-5F 培地で 3 日間培養後、FGF2 とインスリンを再添加し、0 分、15 分後、30 分後、60 分後の total ERK とのリン酸化 ERK 蛋白を定量し、ERK のリン酸化レベルを検討した。

蛋白抽出および定量は 2-1) 項と方法に準じて行った。ERK 蛋白 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)、リン酸化 (Cell Signaling Technology) ERK 蛋白の検出には、各レーンに 50 μ g の抽出蛋白を load し、10%SDS-PAGE を 200V 定電圧下 40 分間行った。続いて、分離した蛋白をゲルから PVDF メンブレン(Bio-Rad) 上に、セミドライ式 Electrotransfer 法にて転写した。転写後、メンブレンを 5%スキムミルク (雪印) にて室温下、30 分間ブロッキングし、一次抗体として TBS-T wash buffer (0.1% Tween20) で至適濃度にそれぞれ希釈した、抗 tERK および抗リン酸化 ERK (pERK)抗体で、室温下 1 時間処理した。続いて、メンブレンを TBS-T wash buffer にて 3 回洗浄後、TBS-T wash buffer で希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (57.5ng/ml) (GTX221666-01 GeneTex) あるいは HRP 標識マウス IgG 抗 (0.2 μ g/ml) (GTX221667-01 GeneTex) で室温下 30 分間インキュベートした。さらに、メンブレンを TBS-T wash buffer にて 5 分間 3 回洗浄後、ECL 試薬 (Bio-Rad) を用いて化学発光させ、デジタル検出システム ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) にて検出・

定量した。

第二節 結果

1. 完全無血清培養条件下での WT および NF1-iPSC の神経分化誘導

神経分化誘導後の WT および NF1-iPSC の細胞の細胞形態を位相差顕微鏡を用いて観察した結果、神経突起様の形態を有する細胞がみられた (図 23)。WT および NF1-iPSC 細胞間に明らかな形態的差異は認められなかった。

2. 蛍光免疫染色法を用いた神経分化 WT および NF1-iPSC における神経分化マーカーの発現検討

神経分化誘導 10 日目の WT および NF1-iPSC を NF1 と S100 抗体で染色し、共焦点顕微鏡像を用いて観察した結果、NF1 蛋白発現は、WT および NF1-iPSC のいずれも陽性を示し、両者の間に差異は認めなかった。一方、S100 発現は WT-iPSC では弱陽性であったが、NF1-1 および NF1-2-iPSC では、ともに強陽性を示した (図 24)。

神経分化誘導 21 日目の各細胞では、いずれの細胞においても神経分化マーカーである Nestin を強発現していたが、Pax6 の発現は認めなかった (図 25)。一方、神経分化誘導 21 日目の各細胞における NF1 と S100 の発現を検討すると、誘導 10 日目においては、NF1-iPSC は S100 を強発現していたが、誘導 21 日目では、WT、および NF1-iPSC ともに S100 の発現は低下、NF1 蛋白の発現はいずれも陽性で、差異は認めなかった (図 26)。

3. 神経分化 WT および NF1-iPSC における Ras/MAP シグナルの検討

WT-iPSC では、時間の経過とともに ERK のリン酸化レベルは低下したが、NF1-1、NF1-2-iPSC ともに、1 時間後もリン酸化レベルが維持されていた (図 27)。

第六章 完全無血清培養条件下での NF1-iPSC の軟骨・骨分化誘導

第 1 節 材料および方法

1. 完全無血清培養条件下での WT および NF1-iPSC の軟骨・骨分化誘導法

1) 軟骨・骨分化誘導法 (*in vitro*)

WT および NF1-iPSC を軟骨および骨組織に分化誘導し、その特性について比較検討した。まず、96 well plate (住友ベークライト)に 1×10^5 cells/100 μ l/well の細胞密度で播種し、hESF-GRO 基礎培地に 6 factor を添加した培地で胚様体培養を 1 週行った。2 週目にゼラチンコート (Millipore) した 35mm dish (BD Falcon) に 5-7 胚葉体/dish 播種し、4 週まで hESF-GRO 培地に 6 factor、FGF-2、heparin を添加した培地で培養した。続いて out growth した細胞を回収後、hESF6 培地に FGF2、および heparin を加えた培地で数継代し、間葉系幹細胞 (MSC)に分化誘導した。次に、MSC から軟骨細胞に分化誘導するため、ファイブロネクチンコートした 60mm dish に 1×10^5 MSCcells/ml/well の細胞密度で播種し、hESF6 培地で培養後、4.5 週目より培地を、hESF-GRO 基礎培地に、6 factor、Wnt3a (10ng/ml)、Activin(10ng/ml)を添加した無血清培地に培地交換し、さらに、4.7 週目より、hESF-GRO 基礎培地に 6 factor、BMP2 (50 μ g/ml)、TGF β 1 (10ng/ml)、GDF5 (10ng/ml)、FGF2 (10ng/ml)、LDL (10ng/ml) を添加した無血清培地に変更した。6 週目に軟骨分化細胞をセルスクレーパー (Corning, New York, USA)を用いて機械的に剥離後、これら軟骨細胞をさらに 1.5ml tube 内で、7 \times g で 5min /day 負荷をかけながら同じ無血清培地を用いてペレット培養した 10 週目のペレットを、SCID マウス背部皮下に移植し、骨分化を誘導した (図 28)。

2) フローサイトメトリーによる MSC への誘導効率の検討

フローサイトメトリーを用いて、間葉系幹細胞マーカーである CD73、CD90、CD105

陽性細胞の比率を解析することで、MSC の誘導効率を検討した。各細胞を Trypsin/EDTA (BD Difco™/Dojin, Tokyo, Japan) にて分散後、Trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich) で中和し、単一細胞とし、Running buffer (PBS (-), 0.5% BSA, EDTA 2mM) に懸濁した。続いて、細胞懸濁液を 40 µm 径のフィルターを通過後、抗 CD73 抗体 (BD Bioscience, New Jersey, USA)、抗 CD90 抗体 (BD Bioscience)、抗 CD105 抗体 (e BioScience, CA, USA) を 1:100 の濃度で添加し、1 時間室温でインキュベートした。次に、SH800 セルソーター (SONY, Japan) を用いてフローサイトメトリー解析を行い、これら細胞における CD73、CD90、CD105 の発現を検討した。

2. 免疫不全マウスを用いた軟骨・骨誘導およびその組織学的検討

1) 免疫不全マウス背部皮下への軟骨誘導 WT および NF1-iPSC ペレットの移植

第 6 章 第 1 節-1-1) で誘導した軟骨ペレットを、SCID マウス背部皮下に移植し骨分化誘導を行った。

2) PAS/Alcian blue 染色および SafraninO 染色

SCID マウス背部皮下で誘導された軟骨・骨組織を移植 4 週後に摘出し、EDTA で 1 ヶ月脱灰後、PAS/Alcian blue 染色および SafraninO 染色後、組織学的に比較検討した。

Alcian-Blue 染色は、通法に従い、脱パラフィン、水洗、3%酢酸 (Wako) に浸漬後、Alcian blue (Wako)、0.5%過ヨウ素酸溶液 (Wako)、あるいはコールドシッフ液 (Wako) でそれぞれ染色後、亜硫酸水に浸漬しその後脱水、透徹、および封入を行った。

SafraninO 染色は、脱パラフィン後、Weigert's Iron Hematoxylin Working Solution (1% Hematoxylin) で 10 分間反応させた後、水洗し、0.05% Fast Green (東京化成, Tokyo, Japan) 溶液で、5 分間染色、1%酢酸溶液 (Wako) で洗浄し、0.1% SafraninO 溶液 (Wako) で染色し、脱水・封入後、顕微鏡にて観察を行った。

3) STR 解析

SCID マウス背部皮下で誘導された軟骨・骨組織が、NF1-1,および NF1-2-iPSC 由来細胞と同一であるかを検証するため、各 NF1-iPSC 由来 DNA および各 NF1-iPSC 由来軟骨・骨組織由来 DNA を、前述、第二章、第一節、3-2-3)の方法に準じて、STR 解析を行った。DNA の定量は Nano Drop (Nano Drop Technologies, Inc.) を用いた。

第二節 結果

1. 完全無血清培養条件下での iPSC からの MSC への誘導効率および軟骨・骨分化誘導

WT および NF1-iPSC から誘導した MSC の 80%以上は、フローサイトメトリー解析にて、間葉系幹細胞マーカーである CD73、CD90、および CD105 各種抗体全てに陽性を示したことから、WT および NF1-iPSC 間で MSC への誘導効率に差はないことが明らかとなった (図 29A)。また、ペレット培養で誘導した軟骨組織は PAS/Alcian blue 染色で陽性を示した (図 29B)。

2. 免疫不全マウスを用いた軟骨・骨形成およびその組織学的検討

1) 免疫不全マウス背部皮下への NF1-iPSC 由来軟骨ペレットの移植による骨分化誘導

WT-iPSC 由来軟骨ペレットの大きさ (直径)は、移植前の 4.8mm から 6.3mm に、NF1-1-iPSC 由来軟骨では 2.5mm から 4.8mm に、NF1-2-iPSC 由来軟骨組織では 1.8mm から 2.5mm に、それぞれ増大していた (図 29C)。

2) PAS/Alcian blue 染色および SafraninO 染色

SCID マウス背部皮下で誘導された軟骨・骨組織を、脱灰後、PAS/Alcian blue 染色および SafraninO 染色し、組織学的に比較検討したところ、NF1-1-iPSC 由来軟骨組織では WT-iPSC 由来軟骨組織と同様に骨梁が観察され骨分化が進行していることが明らかとなった。一方、NF1-2-iPSC 由来軟骨組織では大部分の組織は SafraninO 陽性の軟骨組織からなっており、骨への分化は遅延していた (図 30)。

3) STR 解析

各 NF1-iPSC 由来 DNA および各 NF1-iPSC 軟骨・骨組織由来 DNA の STR 解析を

行った結果、16 の locus がすべて一致したことから、SCID マウス背部皮下で誘導された軟骨・骨組織は誘導前の NF1-iPSC 由来であることが確認された (図 13、14)。

第七章 考察

当研究室では、先行研究により、センダイウイルスを用いたインテグレーションフリー・フィーダーフリー・無血清培養系を用いて、鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) およびヌーナン症候群 (NS) 患者歯髄細胞由来 iPSC (CCD-iPSC, NS-iPSC) 、また、Cowden 症候群 (CS) 患者末梢血リンパ球由来 iPSC (CS-iPSC) など、疾患特異的 iPSC の樹立および維持に成功し、同細胞を用いた疾患研究を行ってきた。CCD-iPSC, NS-iPSC では、形成された teratoma 内の軟骨組織において、疾患の特徴を反映した組織像が見られたことから、有用な病態モデルとなった。CS-iPSC は、*Pten* 遺伝子変異が起因で起こる Cowden 症候群における過誤腫形成や発癌機構を解明するためのモデル細胞として有用性があり、*Pten* 遺伝子の新規変異を同定するなど、*Pten* 遺伝子変異に伴う発癌機構の解明や予防に貢献できる研究を進めてきた。

本研究では、Neurofibromatosis type I (NF1) (von Recklinghausen's disease, 神経線維腫 I 型) と臨床診断を受けていた患者 2 名の末梢血リンパ球よりフィーダー細胞フリー、ウイルスインテグレーションフリーおよび完全無血清培養系で、同症候群特異的 iPSC (NF1-iPSC) を樹立し、その細胞特性を検討するとともに、NGS および ddPCR を用いて詳細な遺伝子解析を行い、その病因の一端を明らかにした。

NF1 は、個体差が大きいことが知られており、本研究で対象とした患者においても、NF1-1 では、全身的に多数の神経線維腫とカフェ・オレ斑の主徴候と、下顎骨の異常吸収を認めたが、NF1-2 では、神経線維腫とカフェ・オレ斑は局所的、かつ数箇所しか認めず、下顎骨にも異常所見はなかった。

近年、NGS の機器および解析ソフトの普及により、ランダムに切断された数千万~数億の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に決定できることが可能になったため、ゲノムサイズが大きくかつ反復配列を多く含むヒトゲノムなどの詳細な解析も可能となっ

た (Severin et al., 2014)。NGS は、読み取り深度を深めることで、頻度の少ない変異も検出可能であることから、その応用性に増々期待が高まっている。一方、染色体転座や染色体コピー数異常などのゲノム構造異常の解析には適していない (Francesco et al., 2013)。

NF1-1 においては、NGS 解析の結果アミノ酸置換などを示唆する変異を検出できなかったため、NF1-1 の全染色体の CEQer による CNA 解析を行った。その結果、17 番染色体上の *NF1* 遺伝子領域の CNA が、コントロールのそれと比較して約 60%減少していた。なお、同じく 17 番染色体上にあり重要な腫瘍関連遺伝子である、*TP53* (17q13.1)、*BRCA1* (17q21.31)、*ERBB2 (HER2)* (17q12.2)、*TOP2A* (17q21.2)、*STAT3* (17q21.2) の CNA は健常人と比較し有意差はなかった。

以上より、NF1-1 の染色体上の *NF1* 遺伝子領域が広範囲に欠失している可能性が示唆された。また、PBMC でも iPSC でも同様の結果を得たことから、患者の遺伝子異常が iPSC に反映されることも示された。

今回、臨床的に NF1 と診断された 2 名の患者 (NF1-1, NF1-2) に対し、疾患パネルを用いた NGS による変異解析を行ったところ、NF1-1 症例ではアミノ酸置換を示唆する変異は検出されなかったことから、染色体転座や染色体コピー数異常などのゲノム構造異常の可能性を疑い、全染色体の CEQer による CNA (Copy number alterations) 解析を行ったところ、NF1-1 では 17 番染色体の *NF1* 遺伝子領域の CNA が、コントロールのそれと比較して約 60%減少していたことから、NF1-1 では *NF1* 遺伝子領域が欠失している可能性が考えられた。次に、ddPCR を用いて絶対的コピー数を WT と NF1-1 で比較検討をしたところ、*NF1* 遺伝子領域の染色体のコピー数が半減していたことから、先の CNA 解析の結果が裏付けられ、これが NF1-1 の病因に関与することが示唆された。さらに、*NF1* mRNA の発現量および NF 蛋白の発現も、コントロールと比較して半減していたことから、NF1-1 の発症原因は、17 番染色体上の *NF1* 遺伝子領域の

広範な欠失による、*NF1* 遺伝子の haploinsufficiency (ハプロ不全)である可能性が示唆された。

NF1-2 では、NGS の結果、*NF1* 遺伝子の exon 40 にヘテロの一塩基変異が存在することが明らかとなった。NGS で変異が明らかとなった領域をサンガーシーケンス法でさらに解析した結果、mRNA レベルにおいても同一の変異が検出され、変異アレルが転写されていることが示された。同変異により、NF 蛋白の 1968 番目のアミノ酸をコードするのコードが stop codon に変化することが示唆された。この結果から、150kDa のトランケート蛋白が産生されていることが予想されたため、*NF1* 蛋白の N-末端認識抗体および C-末端抗体を用いて法で検討したが、検出できなかった。これは、翻訳された異常蛋白がユビキチンなどの分解機構により急速に分解された可能性や、通常構造の NF 蛋白と蛋白の立体構造が異なるため、これら抗体では認識できなかった可能性が考えられた。

また、ddPCR を用いた遺伝子解析の結果、NF1-2 の *NF1* mRNA の発現量は健常人と比較して差がなかったが、これは NF1-2 に *NF1* 遺伝子の変異は存在するものの、正常 mRNA と変異 mRNA が存在しているため、*NF1* mRNA の総発現量は健常人のそれと差がなかったことが考えられた。しかし、NF1-2 の NF 蛋白の発現量は健常人と比べ半減していたことから、NF1-2 の病因も *NF1* 遺伝子の haploinsufficiency (ハプロ不全) に起因している可能性が強く示唆された。

NGS で、*NF1* と同一の第 17 番染色体上に存在する腫瘍関連遺伝子、*TP53* (17q13.1)、*BRCA1* (17q21.31)、*ERBB2 (HER2)* (17q12.2)、*TOP2A* (17q21.2)、*STAT3* (17q21.2) 遺伝子の変異の有無を検討したが、NF1-1 および NF1-2 とともに、これら遺伝子群にアミノ酸置換を示唆する変異は検出されなかった。また、NF1-1 における、これら遺伝子群の CNA 解析の結果、健常人と差を認めなかった。しかし、同一染色体上の遺伝子で、*SLC52A1* (17p13.2)、*SLC2A4* (17p13.1)、*PIK3R5* (17p13.1)、*GRN*

(17q21.31), *GHI* (17q23.3), *PFAS* (17p13.1), *MYH13* (17p13.1), *LLGL1* (17p11.2), *SLC47*(17p11.2), *ACLY* (17q21.2), *GIT1*(17q11.2)の 11 遺伝子では、CNA がコントロールと比べて減少している可能性が示されたことから、これらの染色体構造異常や遺伝子異常と *NF1* 遺伝子の発現との関連性が考えられた。

NF1-2 で予想された予想サイズ 150kDa のトランケート型 NF 蛋白は、Western blot 法では検出できなかったが、存在するとすれば核移行シグナル領域を欠失していることが予想された。NF 蛋白の核移行機構は未だ不明な点が多いが、NF 蛋白はアクチンと微小管に局在しており (Leondaritis et al., 2009)、染色体の有糸分裂に際して NF 蛋白は重要な役割を果たしていることから、NF 蛋白の核局在化異常が、染色体の不安定化を招くことも報告されている (Xeni et al., 2016)。したがって、NF1-2 にも染色体の不安定化が起こっている可能性が示唆された。

本研究で対象とした 2 症例とも NF1 のハプロ不全に起因しており、さらに、2 症例とも染色体の不安定化も起こっていることが予想された。NF1-2 の病因が一塩基変異に基づく NF 蛋白の蛋白構造の変化であるのに対し、NF1-1 では、第 17 番染色体上に存在する *NF1* 遺伝子領域が欠失することで、遺伝子全体のコピー数の減少が原因であり、NF1-2 と比較すると、NF1-1 は遺伝子全体のコピー数の変化を伴うためその影響は大きいと考えられた。実際、NF1-1 と NF1-2 間の臨床症状の大きな差異は、このような遺伝子構造の違いを反映している可能性が高い。

このように、NF1 の臨床症状の個体間の質的差異が大きい原因は、*NF1* 遺伝子や NF 蛋白のみの解析だけでは解明できないことが多く、染色体レベルでの研究や、同じ染色体上の他の遺伝子発現、その蛋白レベルなどを含む複合的な視点が必要であると考えている。

現在、NF1 は遺伝子診断を原則的に行わず、臨床症状に基づき診断されているが、これは、遺伝子変異と臨床症状の重篤度に必ずしも関連性を認めないとされているから

である。しかし、本研究のように、NF1 特異的 iPSC を用いて研究を行うことで、分子医学と臨床症状との関連性を解明できる可能性があり、その症状の原因に特化した薬剤の開発などにも寄与できるのではないかと考えられる。

神経分化誘導実験において、蛍光免疫染色で神経分化マーカーである S100 蛋白が WT-iPSC が弱陽性であったのに対し、NF1-iPSC は神経分化早期に強陽性で、NF1-iPSC は WT-iPSC と比較して神経分化が早いことが示唆された。

S100B 蛋白は特に脳での発現が高く、中枢神経系では、グリア細胞の一種であるアストロサイトに選択的に発現することが知られている。また、末梢神経系ではグリア細胞のシュワン細胞に発現する。そして、神経突起および軸索成長、メラノーマ細胞増殖、微小管の重合に関与していることが知られており、本疾患の症状である神経線維腫やカフェ・オレ斑、前述した染色体の不安定化などに関連し得ることも示唆された。また、NF1-1 は神経線維腫が多数あり、NF1-2 は脳病変を発症していることから、S100 蛋白が神経分化初期にコントロールと比べて早期に強陽性を示したことは、神経線維腫や脳病変の発症機序の一端を現している可能性もあり、本 iPSC は NF1 の病態モデルになり得る可能性が考えられた。

本研究では、NF1-iPSC からまず MSC を誘導し、さらに MSC から *in vitro* および *in vivo* で、軟骨・骨組織を誘導した。WT および NF1-iPSC から誘導された MSC は、MSC マーカーである CD73、CD90、CD105 陽性細胞がいずれも約 80% を占めたことから、両 iPSC 間で MSC への分化誘導能には差がないことが明らかとなった。このことは、NF1-1 は 15 歳時、NF1-2 は 24 歳時、いずれも身体の急速な成長を示す思春期以降に発症・診断されたことから、*NF1* 遺伝子異常が存在しても、発生時の個体成長や生存を脅かすような異常を起こさないことを裏付けていると考えられた。

軟骨・骨分化誘導により分化した軟骨組織を組織学的に比較検討したところ、NF1-1-iPSC では WT-iPSC と同様に骨梁が観察され、軟骨組織の骨への内軟骨性化骨

が進行していることが分かった。一方、NF1-2-iPSC では大部分の組織は SafraninO 陽性の軟骨組織からなり、軟骨から骨への軟骨性骨化は遅延していた。臨床的に、NF1-1 は先天性脛骨欠損、NF1-2 は眼窩後壁骨欠損と両者ともに骨病変を有しているが、NF1-1 では著明な骨吸収や病的骨折を認めた。このように、軟骨・骨分化誘導により分化した軟骨組織に違いを認めたことから、臨床症状の違いを NF1-iPSC を用いて再現可能であることが示された。したがって、同じ NF1 と臨床診断されながら臨床症状や経過が大きく異なっているのは、NF1 の変異の質的差異を反映している可能性が示唆された。

以上、本研究では、疾患特異的 iPSC は罹患組織へ分化誘導することで、病態モデルとしての可能性を見出した。

本疾患は遺伝子疾患の中では比較的発症率が高く、以前は主徴候である神経線維腫、および、カフェ・オレ斑が主に研究の対象とされていたが、最近では、本疾患の半数で学習障害、注意欠陥多動性障害や脳神経病変が見られることが報告されている (Rietman et al., 2017)。また、骨病変についても、骨欠損だけではなく骨吸収に関する報告も見られ (Rhodes et al., 2015)、本疾患の全面的な病態の解明や根本的な治療薬の開発が大きな課題である。

Larribere らは NF1 患者由来細胞から iPSC を血清添加培地を用いてフィーダー細胞上で樹立しているが (Larribere et al., 2015)、無血清・無フィーダー・ウイルスインテグレーションフリーの培養系での NF1-iPSC の樹立は著者の報告が世界初である。

NF1 遺伝子によって制御される Ras/MAP シグナルは、種々の増殖因子により制御されることが知られていることから、成分や組成が不確定な血清やフィーダー細胞を用いた培養条件では、iPSC における Ras/MAP シグナルの正確な検討は不可能である。完全無血清培養系であればこそ、本疾患のシグナル伝達を始めとする分子機構の正確な検討も可能であると考え、本研究で樹立した本疾患特異的 NF1-iPSC が大きく研究に貢

献できる可能性を示唆した。さらに、本研究では神経と骨・軟骨組織の分化誘導に成功しており、本疾患特異的 NF1-iPSC から特徴的な症状を示す臓器や組織に分化させることで、生体を模倣した本疾患の表現型を再現できており、臨床応用を視野にいれた研究の可能性も考えられた。

また、本研究で樹立した NF1 特異的 iPSC に対して、TALEN (Christian et al., 2010) や CRISPR/Cas9 (Cong et al., 2013) などのゲノム編集を行い、NF1-iPSC の *NF1* 遺伝子変異を修復し、修復前の NF1-iPSC と比較検討することで、NF1 の機能や疾患発症のメカニズムをよりの確に明らかにできる可能性が高い。さらに、この方法を用いれば、異なる患者間のゲノムの差異が疾患感受性や疾患重症度に影響を及ぼすかどうかの比較分析ができる可能性があると考え、診断および予後や治療法などに寄与できると考えられた。

以上、フィーダーフリー、インテグレーションフリー完全無血清培養系で 2 名の NF1 患者から、NF1 特異的 iPSC の樹立に成功した。NF1-iPSC を用いた検討から、その高い神経分化能や軟骨・骨分化異常が明らかとなるとともに、2 症例における遺伝子変異は質的には異なるものの、いずれも *NF1* の haploinsufficiency (ハプロ不全) が生じ、発症していることが強く示唆された。本疾患特異的 NF1-iPSC を用いることで、本疾患の的確な病態解明や治療法の開発研究が可能となると考えられた。

第八章 総括

本研究では、フィーダーフリー、インテグレーションフリー、完全無血清培養系で Neurofibromatosis type I (神経線維腫 I 型)の疾患特異的 NF1-iPSC の樹立に成功した。

また、本疾患特異的 iPSC を用いることで、本疾患の病態生理を細胞レベルおよび分子レベルで解析することによって、新しい薬剤および安全な治療法の開発研究に寄与すると考えられた。

さらに、不定要素を排除し、組成の明らかな既知の因子のみから成る、本無血清培養系では、同一条件下の培養で各種因子に対する細胞応答を正確に解明することができるため、疾患の分子メカニズムを明らかにできると考えられた。

参考文献

Barnes, D., and Sato, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*. 22(3):649-655.

Buchberg, A.M., Cleveland, L.S., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1990). Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway. *Nature*. 347:291-294.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 186(2):757-761.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang W., Marraffini L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339(6121):819-823.

Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*. 8(3):396-397.

Francesco, F., Alessandra, P., Rocco, P. (2013). SAM-Profiler: A Graphical Tool for Qualitative Profiling of Next Generation Sequencing Alignment Data. *Computer Science Systems Biology*. 6(4):188-193.

Furue, M. K., Na, J., Jackson, J. P., Okamoto, T., Jones, M., Baker, D., Andrews, P. W. (2008). Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(36):13409-13414.

George, E., Robert, E., and Gerner, H. Addison Franklin. (1967). Culture of Normal Human Leukocytes. *J Amer Med Assoc*. 199(8):519-524

Jett, K., and Friedman. J.M.(2010). Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med*. 12(1):1-11.

Kishino, Y., Seki, T., Fujita, J., Yuasa, S., Tohyama, S., Kunitomi, A., and Fukuda, K. (2014). Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PLoS One*, 9(5):e97397.

Larribere, L., Wu H., Novak, D., Galach, M., Bernhardt, M., Orouji, E., Weina. K., Knappe, N., Sachpekidis, C., Umansky, L., Beckhove, P., Umansky, V., De Schepper. S., Kaufmann, D., Ballotti, R., Bertolotto, C., and Utikal, J. (2015). NF1 loss induces senescence during human melanocyte differentiation in an iPSC-based model. *Pigment Cell Melanoma Res*. 28(4):407-16.

Lee, D.F., Su, J., Kim, H.S., Chang, B., Papatsenko, D., Zhao, R., Lemischka, I.R. (2015) Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. *Cell*, 161 (2), 240-254.

Leondaritis, G., Petrikkos, L., and Mangoura, D. (2009). Regulation of the Ras-GTPase

activating protein neurofibromin by C-tail phosphorylation: implications for protein kinase C/Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway signaling and neuronal differentiation. *J Neurochem.*109(2):573-583.

Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Schlieve, C. R., Ikeya, M., Kim, H., Nguyen, T. D., Hsiao, E. C. (2013). Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. *Orphanet J Rare Dis*, 8:190.

Messiaen, L.M., Callens, T., Roux, K.J., Mortier, G.R., De Paepe, A., Abramowicz M., Pericak-Vance, M.A., Vance, J.M., and Wallace, M.R. (1999). Exon 10b of the NF1 gene represents a mutational hotspot and harbors a recurrent missense mutation Y489C associated with aberrant splicing. *Genet Med.* 1:248-253.

Myoken, Y., Okamoto, T, Osaki, T., Yabumoto, M., Sato, G.H., Takada, K., and Sato, J.D. (1989). An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 25(5):477-480.

Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., and Nakanishi, M. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem.* 286 (6):4760-4771.

Okamoto, T., Tani, R., Yabumoto, M., Sakamoto, A., Takada, K., Sato, G., and Sato, D. (1996).

Effects of insulin and transferrin on the generation of lymphokine-activated killer cells in serum-free medium. *Journal of Immunological Methods*. 195(1-2):7-14.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448(7151):313-7

Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., and Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 134(5):877-886.

Rhodes, S.D., Yang, H., Dong, R., Menon, K., He, Y., Li, Z., Chen, S., Staser, K.W., Jiang, L., Wu, X., Yang, X., Peng, X., Mohammad, K.S., Guise, T.A., Xu, M., and Yang, F.C. (2015). Nf1 haploinsufficiency alters myeloid lineage commitment and function, leading to deranged skeletal homeostasis. *J Bone Miner Res*. 30(10):1840-1851.

Rietman, A.B., Oostenbrink, R., Bongers, S., Gaukema, E., van Abeelen, S., Hendriksen, J.G., Looman, C.W.N., De Nijs, P.F.A., and De Wit, M.C. (2017). Motor problems in children with neurofibromatosis type 1. *J Neurodev Disord*. 19:9-19.

Sato, J.D., Kawamoto, T., and Okamoto, T. (1987). Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro. *J Exp Med*. 165(6):1761-1766

Severin, J., Lizio, M, Harshbarger, J., Kawaji, H., Daub, C., Hayashizaki, Y., the FANTOM consortium., Bertin, N., Alistair, R.R.F. (2014). Interactive visualization and analysis of large-scale NGS data-sets using ZENBU. *Nature Biotechnology*. 32:217-219.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5):861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-676.

von Recklinghausen, F.D. *Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen*. Festschrift für Rudolf Virchow. Berlin .(1882).

Xeni, K., Constantinos, F., Theodora, K., and Dimitra, M. (2016). Nuclear import mechanism of neurofibromin for localization on the spindle and function in chromosome congression. *Journal of Neurochemistry*. 136(1):78–91.

Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R., and Weiss, R (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*. 62: 599-608.

Yamasaki, S., Hamada, A., Akagi, E., Nakatao, H., Ohtaka, M., Nishimura, K., and Okamoto, T. (2016). Generation of cleidocranial dysplasia-specific human induced pluripotent stem cells in completely serum-, feeder-, and integration-free culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 52(2):252-264.

Yamasaki, S., Taguchi, Y., Shimamoto, A., Mukasa, H., Tahara, H., and Okamoto, T. (2014). Generation of human induced pluripotent stem (Ips) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF-Beta1 regulation of pluripotency. *PLoS One*. 9(1):e87151.

Yedid, N., Kalma, Y., Malcov, M., Amit, A., Kariv, R., Caspi, M., and Ben-Yosef, D. (2016). The effect of a germline mutation in the APC gene on beta-catenin in human embryonic stem cells. *BMC Cancer*. 16(1):952.

Yoshida, T., Hamaguchi, M., Naruse, H., Nagai, Y. (1982). Persistent infection by a temperature-sensitive mutant isolated from a Sendai virus (HVJ) carrier culture: its initiation and maintenance without aid of defective interfering particles. *Virology*. 120(2):329-339.

Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Andersen, L. B., Letcher, R., Odeh, H. M., Saulino, A. M., Fountain, J. W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A. L., Brownstein, B. H., and Collins, F. S (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*. 249:181-186.

図表説明

表 1 RD6F および hESF9 無血清培地

表 2 hiPS hESF-GRO 基礎栄養培地の組成

表 3 蛍光免疫染色で用いた各種抗体

表 4 未分化マーカー、*SeVdp (NP)* および *GAPDH* 遺伝子の primer 配列

表 5 ddPCR およびサンガーシーケンス法に用いた各遺伝子の primer 配列

図 1 NF1 患者 1 (NF1-1) 初診時写真

A : 顔貌写真 (正面) B : 顔貌写真 (側貌)

C : 口腔内写真 D : 前腕部写真 (神経線維腫)

初診時、頭顔面、四肢、背面に複数の神経線維腫およびカフェ・オレ斑を認めた。

図 2 NF1-1 患者のパノラマ X 線写真および CT 画像

A : 初診 7 年前 (30 歳) のパノラマ X 線写真

B : 初診時 (37 歳) のパノラマ X 線写真

C : 初診時 CT 画像

初診時 7 年前 (30 歳) の NF1-1 パノラマ X 線画像では下顎骨に異常所見はなかったが、初診時 (37 歳) には著明な下顎骨吸収像を認め、数年間で異常な骨吸収を認めた。

図 3 NF1-1 病歴患者の病歴の概略

幼少期に先天性脛骨欠損、15 歳で本疾患と診断、26 歳で脊柱側弯症、37 歳で当科初診、38 歳で顔面神経麻痺を発症、40 歳で右側鎖骨病的骨折、骨髄炎を発症した。

図 4 NF1 患者 2 (NF1-2) 初診時写真

A : 頸部写真 (カフェ・オレ斑) B : 前腕部写真 (神経線維腫)

C : パノラマ X 線写真

初診時、カフェ・オレ斑および前腕と背部にそれぞれ単発の神経線維腫を認め、パノラマ X 線写真では顎骨に異常所見は認めなかった。

図 5 NF1-2 患者の病歴の概略

24 歳で本疾患と診断を受け、25 歳と 27 歳の時に右拍動性眼球突出に対し眼窩後壁自家骨再建術、35 歳で子宮筋腫、41 歳で脳梗塞、高血圧、高脂血症、48 歳で亜急性甲状腺炎、49 歳で小脳肥大、髄膜腫、大脳深部白質変性などの脳病変を認めた。

図 6 無血清培養法

図 7 NF1-iPSC 誘導の概要

本患者 PBMC から NF1-iPSC 誘導の概略を示す。

患者末梢血から PBMC を分離し、IL-2 添加 RD6F で初代培養 6 日後に、初期化 4 遺伝子を搭載したセンダイウイルスを PBMC 1.0×10^5 cells に対し MOI=6 で感染させた。得られた NF1-iPSC を用いて、未分化性・多分化能の評価を行った。

図 8 NF1-iPSC と WT-iPSC における ALP 染色による iPSC 誘導効率

A: 健常人 (WT) 由来 iPSC (黒)、NF1-1-iPSC (水色)、NF1-2-iPSC (ピンク)の ALP 染色結果を示す。

B: WT-iPSC (黒)、NF1-1-iPSC (水色)、NF1-2-iPSC (ピンク)の誘導効率の比較。

WT-iPSC の誘導効率と比較し、NF1-iPSC の誘導効率は高値を示した。

図 9 NF1-iPSC における未分化マーカー蛋白の蛍光免疫染色像

継代・維持した NF1-iPSC は *Oct4*、*Nanog* および *SSEA3* のいずれの未分化マーカー抗体に対しても陽性反応を示した。

図 10 NF1-iPSC における未分化マーカー遺伝子およびセンダイウイルス (SeV) 遺伝子の RT-PCR による発現

誘導前の PBMC では、NF1-1 では *Nanog*、NF1-2 ではおよび *Rex1* の未分化マーカー遺伝子の発現を認めたが、誘導後の NF1-iPSC では各種未分化マーカー遺伝子の発現が上昇していた。

図 11 胚様体形成による三胚葉への分化誘導 (*in vitro*)

継代・維持した NF1-iPSC を胚様体形成法にて、三胚葉への分化誘導を行った後、蛍光免疫染色法を用いて分化多能性の検討を行った。

外胚葉: 神経細胞特異的マーカー β III tubulin、中胚葉: 平滑筋アクチンマーカー α -SMA、内胚葉: 肝細胞マーカー AFP に陽性反応を示したことから、*in vitro* において 2 症例とも三胚葉への分化多能性を有していることが明らかになった。

図 12 免疫不全マウスを用いた teratoma 形成能の評価 (*in vivo*)

免疫不全マウスにおける NF1-iPSC 由来 teratoma の病理組織学的評価 (*in vivo*)
NF1-iPSC を SCID マウスの背部皮下に移植し、teratoma (奇形腫) の形成能を評価した。2 症例ともに外胚葉組織：神経組織、内胚葉組織：消化管組織、中胚葉組織：軟骨組織などを認め、三胚葉由来組織の混在した teratoma 像を呈していた。

図 13 NF1-1 の STR (short tandem repeat)解析

誘導した NF1-1-iPSC, teratoma、軟骨誘導組織が由来の PBMC と同一であるかを検討した。それぞれ 16 個の Locus はすべて一致し、誘導前の NF1-1-PBMC 由来であることが示された。

図 14 NF1-2 の STR (short tandem repeat)解析

誘導した NF1-2-iPSC、teratoma、軟骨誘導組織が由来の PBMC と同一であるかを検討した。それぞれ 16 個の locus はすべて一致し、誘導前の NF1-2-PBMC 由来であることが示された。

図 15 *ATAD5* (*ATPase Family, AAA Domain Containing 5*) 遺伝子の第 17 番染色体上の locus

図 16 NF1-1 における CNA (Copy number alterations)解析

A: NF1-1 の全染色体の解析結果を示す。染色体順に色分けされており、濃いブルー色が 17 番染色体を表す。

B: 17 番染色体の範囲を拡大した図を示す。横軸は染色体上の遺伝子の位置を表しており、縦軸はコピー数を log₂ 変換した数値。

図 17 ddPCR 法による *ATAD5* 及び *NF1* 遺伝子の染色体コピー数の解析

A: WT および NF1-PBMC 由来の DNA

B: WT および NF1-iPSC 由来の DNA からの *ATAD5* および *NF1* 遺伝子の染色体コピー数解析結果。*ATAD5* 遺伝子は WT、NF1-1、NF1-2 とともに、コピー数に有意差がないのに対し、*NF1* 遺伝子では、NF1-1 のみがコピー数が低下していた。

C: WT および NF1-PBMC 由来の DNA および WT および NF1-iPSC 由来の DNA の *ATAD5* と *NF1* 遺伝子のコピー数の割合を示す。NF1-1 のみ低下している。

図 18 NF1-2 における *NF1* 遺伝子のサンガーシーケンス法による解析

A : NF1-2 の DNA 塩基配列 C : WT の DNA 塩基配列

B : NF1-2 の mRNA 塩基配列 D : WT の mRNA 塩基配列

NF1-2 における NGS 明らかになった *NF1* 遺伝子の変異部位のサンガーシーケンス法解析結果を示す。NF1-2-PBMC 由来の DNA と NF1-2-iPSC 由来の DNA のシーケンス結果は NGS で認められた変異と同一の変異が認められた。また、mRNA レベルでも同一の変異が認められた。

図 19 NF1-2 における *NF1* 遺伝子の変異の direct sequencing とそれから予想される NF 蛋白

NF1-2 で予想される NF 蛋白構造。局在化シグナル領域が欠失しているトランケート型の NF 蛋白が生成されている可能性が示唆された。

図 20 未分化および分化誘導後の *NF1*mRNA 発現

ddPCR 法による *NF1*mRNA 発現量の検討。未分化 iPSC では *NF1* 遺伝子はほとんど発現していなかったが、胚様体形成法で分化させた iPSC では、*NF1*mRNA の発現を

認めた。NF1-1 での *NF1*mRNA 発現量は低下していたのに対し、NF1-2 では、健常人と差がなかった。

図 21 三胚葉組織への分化誘導後の iPSC における NF 蛋白の発現

A : Western blot

B : NF 蛋白発現量 / β -actin 蛋白発現量 (A の WB データをスキャンすることで得られた値を棒グラフ化した)。

蛋白レベルでは、NF 蛋白は健常人と比べて、NF1 患者 2 症例とも発現量は約 1/2 に低下していた。

図 22 完全無血清培養条件下での iPSC の神経分化誘導法

図 23 神経分化誘導過程の iPSC の位相差顕微鏡像

左から順に、WT、NF1-1、NF1-2 の位相差顕微鏡像を示す

A: 誘導前の iPSC

B: 神経分化誘導 10 日目

C: 神経分化誘導 21 日目

いずれも明らかな形態的差異は認めなかった。

図 24 NF1 と S100 抗体による共焦点位相差免疫顕微鏡像 (10 日目)

神経分化誘導 10 日目の共焦点顕微鏡像

左から順に、WT、NF1-1、NF1-2 の神経分化誘導 10 日目の共焦点顕微鏡像

A: NF1

B: S100

C: NF1、S100、DAPI のマージ像

NF1 は WT および NF1-iPSC も陽性で、差を認めなかった。

S100 は WT では弱陽性であったのに対し、NF1-iPSC は強陽性を示した。

図 25 Nestin と Pax6 抗体による共焦点位相差免疫染色顕微鏡像 (21 日目)

左から順に、WT、NF1-1、NF1-2 の神経分化誘導 21 日目の共焦点顕微鏡像

A: Nestin

B: Pax6

C: Nestin、Pax6、DAPI のマージ像

いずれの細胞も Nestin 強陽性、Pax6 は陰性だった。

図 26 NF1 と S100 抗体による共焦点位相差免疫染色顕微鏡像 (21 日目)

左から順に、WT、NF1-1、NF1-2 の神経分化誘導 21 日目の共焦点顕微鏡像

A: NF1

B: S100

C: NF1、S100、DAPI のマージ像

誘導 10 日目 (図 24)では、NF1-iPSC では S100 が強陽性を示したが、誘導 21 日目では WT、NF1 ともに S100 の発現は弱陽性を示した。

図 27 各 iPSC における Ras/MAP シグナル

FGF2 とインスリンを含まない hESF-5F 培地で 3 日間培養後、FGF2 とインスリンを再添加し、0 分後、15 分後、30 分後、60 分後の ERK のリン酸化レベルを検討した。

A : WT, NF1-1, NF1-2 iPSC における pERK, tERK の Western blot

B : WT, NF1-1, NF1-2 iPSC における pERK 発現量の時間的変化 (A の WB データを

スキャンすることで得られた値を棒グラフ化した) WT-iPSC では添加後時間とともに低下したが、NF1-iPSC は 1 時間後もリン酸化レベルを維持されていた。

図 28 完全無血清培養条件下での NF1-iPSC からの軟骨・骨分化誘導法の概略

図 29 軟骨・骨分化誘導

A : iPSC から誘導した MSC の誘導効率を示す。フローサイトメトリー分析より 80% 以上の細胞が間葉系幹細胞マーカーである CD73、90、105 の陽性を示した。WT および NF1-iPSC 間で比較し、MSC への誘導効率に差は認めなかった

B : MSC の PAS/Alcian blue 染色。

C : 軟骨・骨誘導実験における経時的軟骨・骨分化誘導組織像

図 30 軟骨・骨誘導組織の組織像

A,B: SCID マウス背部皮下で誘導された軟骨・骨組織の PAS/Alcian blue 染色

C,D: SCID マウス背部皮下で誘導された軟骨・骨組織の SafraninO 染色

NF1-1 は健常人と同様に骨梁が観察され、NF1-2 では大部分の組織は SafraninO 陽性だった。

	RD6F	hESF9
Basal medium	RD	hESF-GRO
HEPES (3574.5 mg/L)	+	-
6 factors		
Insulin (10ug/ml)	+	+
Transferrin (5ug/ml)	+	+
2-Mercaptoethanol (10uM)	+	+
2-Aminoethanol (10uM)	+	+
Sodium selenite (20nM)	+	+
Oleic acid conjugated with fatty acid-free human recombinant albumin (4.7ug/ml)	+	+
FGF-2 (10 ng/ml)	-	+
L-Ascorbic acid 2-phosphate (0.1 mg/ml)	-	+
Heparin sulfate sodium salt (100 ng/ml)	-	+

表 1 RD6F および hESF9 無血清培地

Composition of hESF medium modified from ESF basal medium (pH 7.2)

Component	Conc.(mg/liter)	Component	Conc.(mg/liter)	Component	Conc.(mg/liter)
L-Alanine	2.225	Glutathione	0.25	Na ₂ HPO ₄	235.51
L-Arginine	50	D-Biotin	0.05185	MgSO ₄	61.055
L-Arginine HCl	94.75	D-Pantothenic acid	2.1825	Phenol red	6.56
L-Asparatic acid	8.325	Choline chloride	6.24	Ferrous sulfate	0.2085
L-AsparagineH ₂ O	16.2525	Folic acid	2.575	Fe(NO ₃) ₃	0.005
L-CysteineHCl	7.88	i-Inositol	16.85	CuSO ₄	0.000625
L-Cystene2HCl	47.5725	Niacinamide	2.25925	ZnSO ₄	0.216
L-Glutamic acid	8.675	PyridoxalHCl	2	Sodium pyruvate	110
L-Glutamine	549.65	PyridoxineHCl	0.2655	Glucose	2500
Glycine	19.375	Riboflavin (B2)	0.2595	Kanamycin sulfate	100
L-Histidine	23.165	ThiaminHCl (B1)	2.335	Putrescine2HCl	0.04025
L-Hydroxyproline	5	Vitamin B12	0.34125	p-Aminobenzoic acid	0.25
L-Isoleucine	65.935	Lipoic acid	0.0525	Linoleic acid	0.021
L-Leucine	68.225	NaCl	6,599.75	Hypoxanthine	1.02
L-LysineHCl	92.175	KCl	355.9	Thymidine	0.1825
L-Methionine	19.87	MgCl ₂	30.515	L-Ascorbic acid	0.0
L-Phenylalanine	37.99	NaH ₂ PO ₄	62.5		
L-Proline	13.625	NaHCO ₃	2000		
L-Serine	31.125	Calcium nitrate	25		
L-Threonine	55.525				
L-Tryptophan	9.76				
L-Tyrosine	42.36				
L-Valine	54.825				

表 2 hiPS hESF-GRO 基礎栄養培地の組成

一次抗体		希釈濃度	会社名
anti-Oct3/4	未分化マーカー	1:200	Millipore
anti-Nanog	未分化マーカー	1:500	R&D
anti-SSEA4	未分化マーカー	1:100	Stemgent
anti-Tra-1-81	未分化マーカー	1:200	Stemgent
anti-Nestin	分化マーカー (外胚葉)	1:200	Millipore
anti-MAP-2	分化マーカー (外胚葉)	1:100	Millipore
anti- α -SMA	分化マーカー (中胚葉)	1:1	Dako Cytomation
anti-AFP	分化マーカー (内胚葉)	1:100	R&D

表 3 蛍光免疫染色で用いた各種抗体

Gene Name	Primer sequence	Product size(bp)	reference
Oct3/4	5'-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG-3' 5'-CTTCCCTCCAACCAAGTTGCCCAAAC-3'	144	Yamanaka S. et al.
Nanog	5'-CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC-3' 5'-CGGAAGATTCCAGTCGGGTTCAAC-3'	366	Yamanaka S. et al.
Sox2	5'-GGGAAATGGGAGGGTGCAAAGAGG-3' 5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGT-3'	151	Yamanaka S. et al.
Rex1	5'-CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT-3' 5'-GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA-3'	306	Yamanaka S. et al.
SeVdp(NP)	5'-AGACCCTAAGAGGACGAAGA-3' 5'-ACTCCCATGGCGTAACTCCATAGTG-3'	700	Nakanishi K. et al.
GAPDH	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGCCAT-3'	240	Furue M.K. et al.

表 4 未分化マーカー、*SeVdp (NP)*および *GAPDH* 遺伝子の primer 配列

Gene name		Primer sequence
① NF1	ddPCR (DNA)	5'-AGACACAACCTGCAAGGCAGA-3' 5'-TGAACAGCTTGGCAAAAAGAA-3'
② ATAD5	ddPCR (DNA)	5'-CGGCTGCTAATTATTGTTAAATGA-3 5'-CAGCTCATGTTGAAAGTTTATGTC-3'
③ NF1	サンガー法(DNA)	5'-TGTTGATGTGATTTTCATTGACCA-3' 5'-CTTTGCCCAATGTGGCAGC -3'
④ NF1	サンガー法(cDNA)	5'- AATGAGCCACACCTCACGTT -3' 5'- AATGAGCCACACCTCACGTT -3'
⑤ NF1	ddPCR (cDNA)	5'-ACCGAGTGACAATACACAGCA-3' 5'-CATCGAATCACCAATTCC-3'
⑥ GAPDH	ddPCR (cDNA)	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGCCAT-3'

表 5 ddPCR およびサンガーシーケンス法に用いた各遺伝子の primer 配列



図1 NF1患者1(NF1-1)初診時写真

A : 顔貌写真 (正面) B : 顔貌写真 (側貌)

C : 口腔内写真 D : 前腕部写真 (神経線維腫)

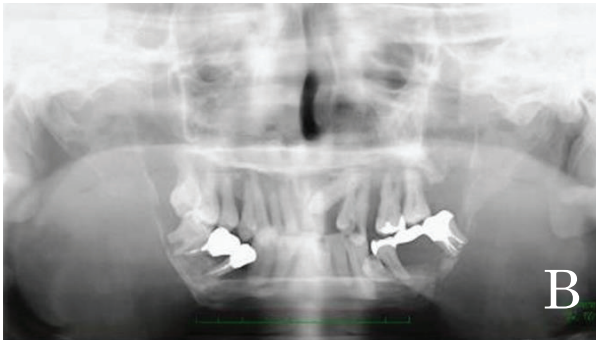


図2 NF1-1 患者のパノラマ X 線写真および CT 画像

A : 初診 7 年前 (30 歳) のパノラマ X 線写真

B : 初診時 (37 歳) のパノラマ X 線写真

C : 初診時 CT 画像

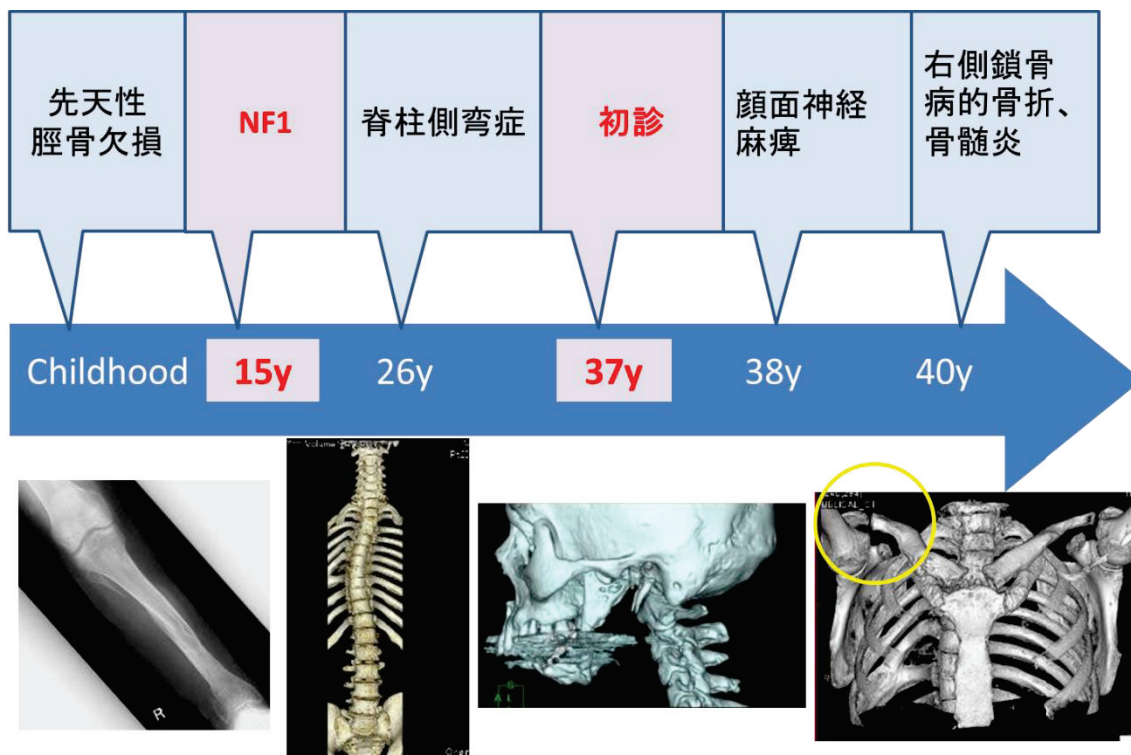


図3 NF1-1 患者の病歴の概略

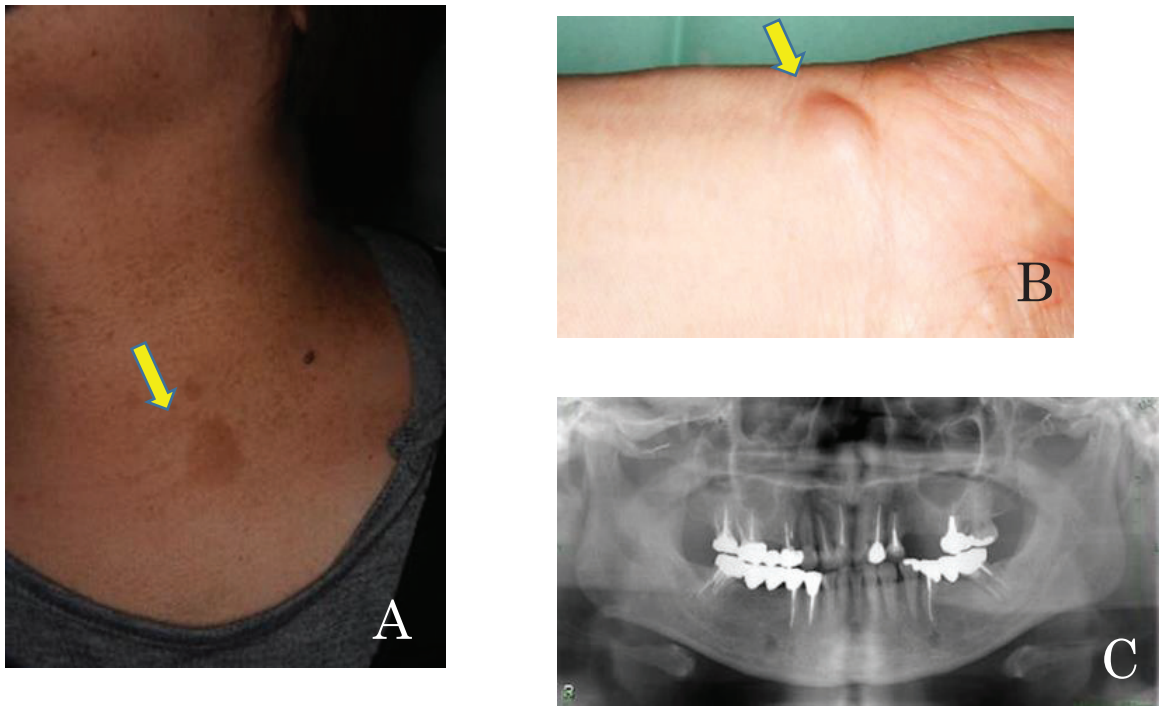


図4 NF1患者2(NF1-2)初診時写真

A : 頸部写真 (カフェ・オレ斑) B : 前腕部写真 (神経線維腫)

C : パノラマ X 線写真

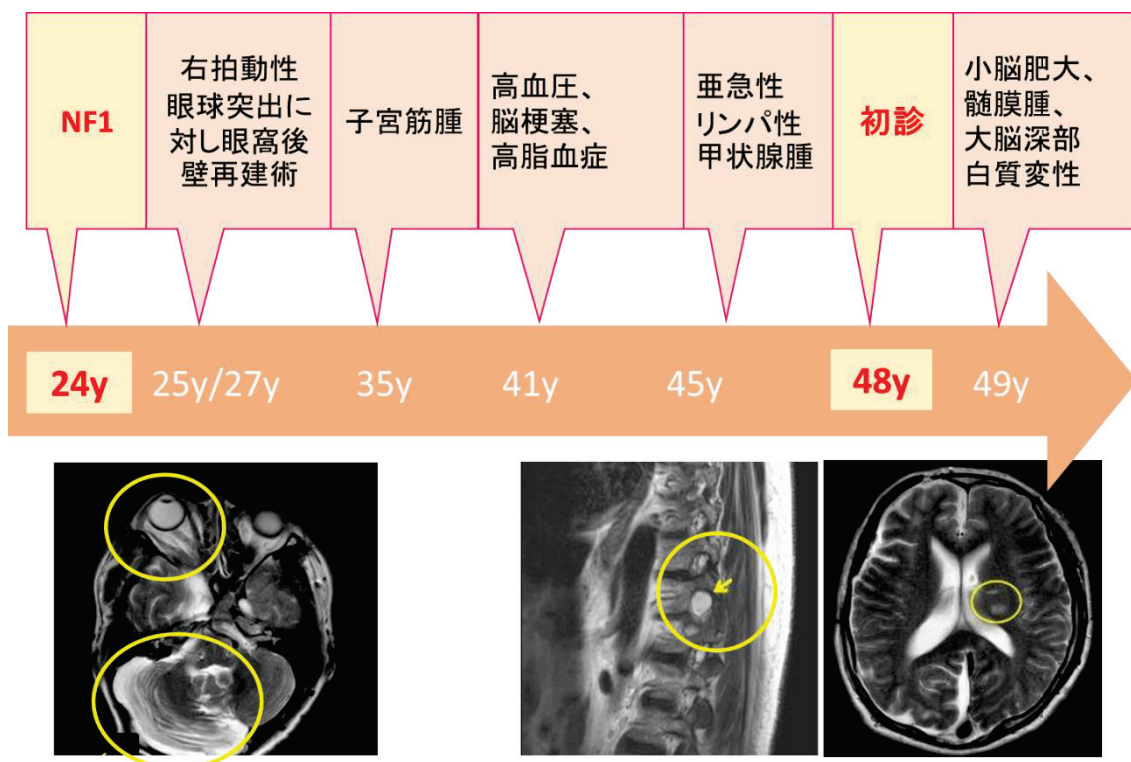


図5 NF1-2 患者の病歴の概略

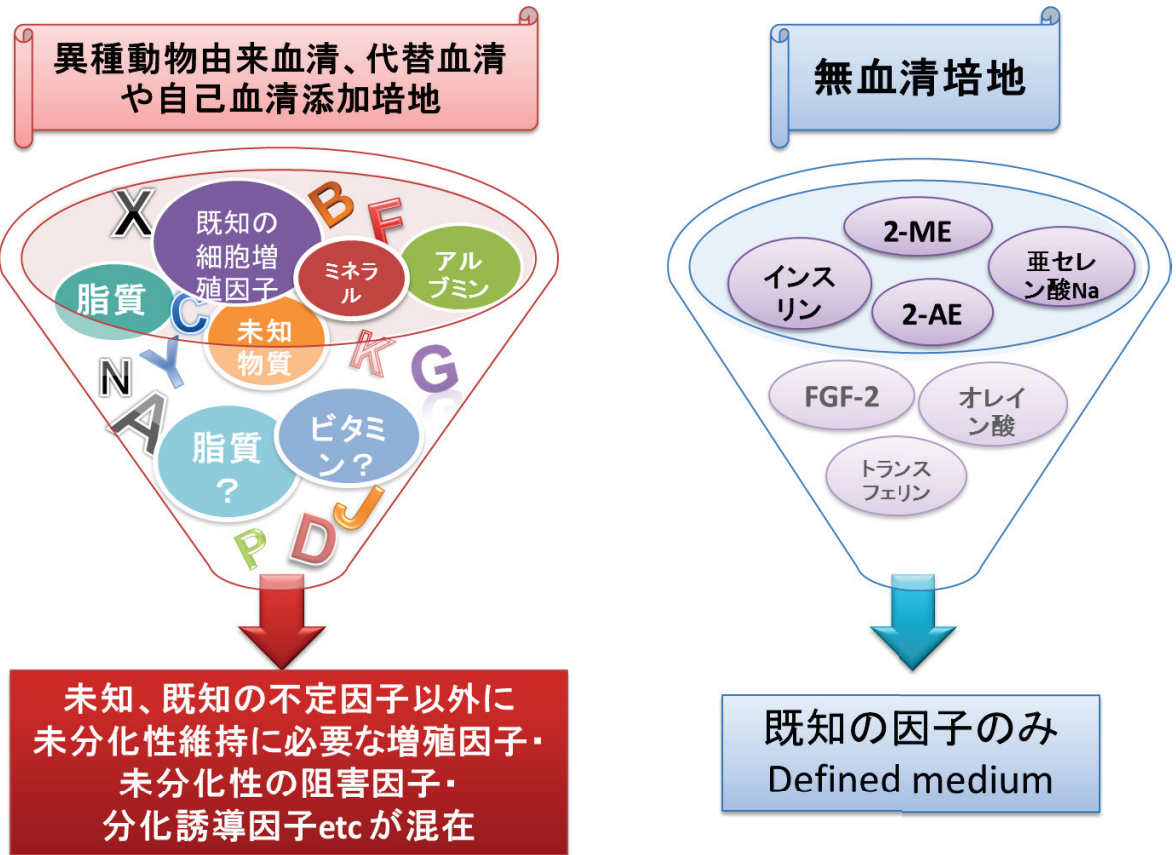


図 6 無血清培養法

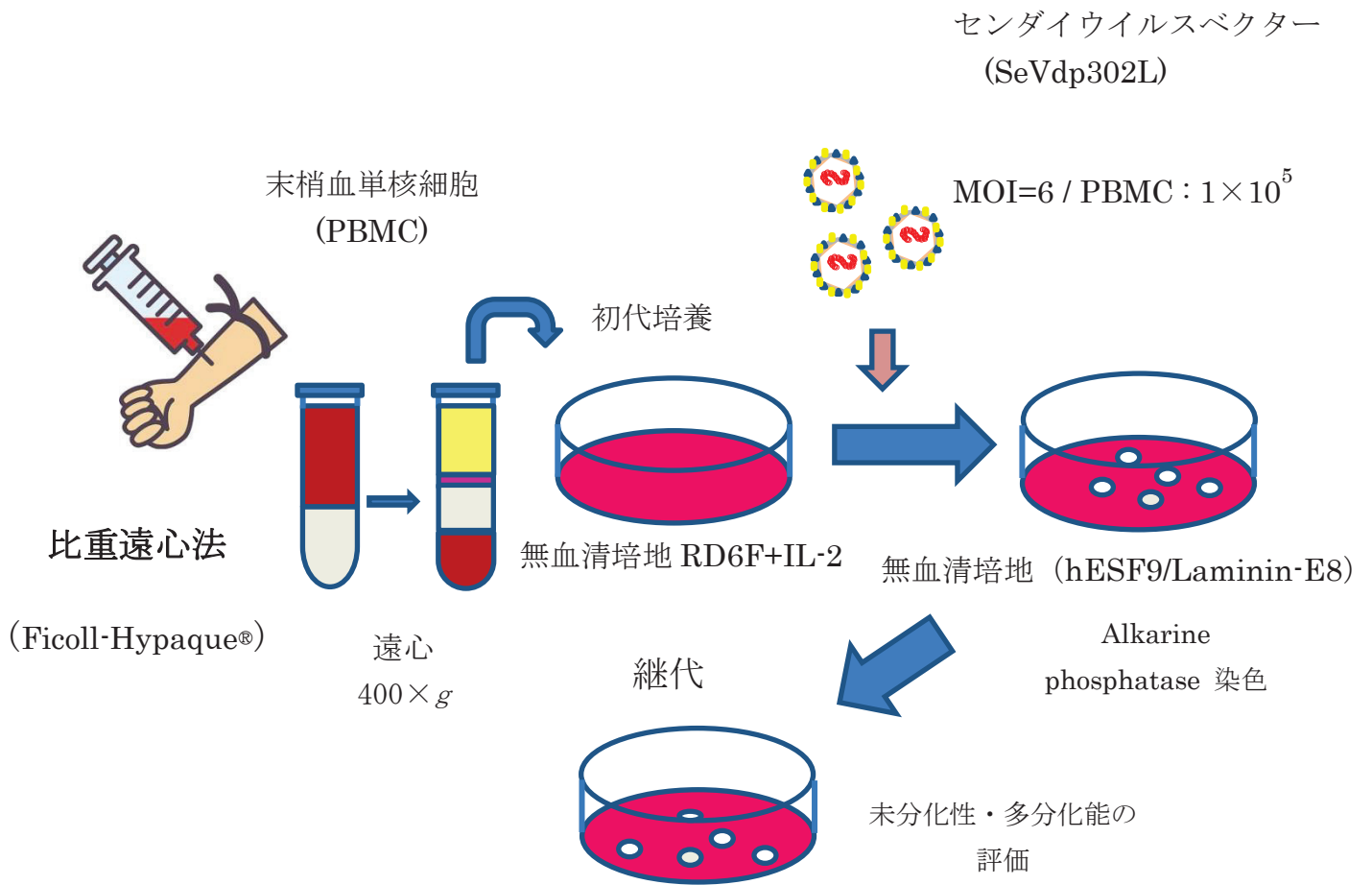
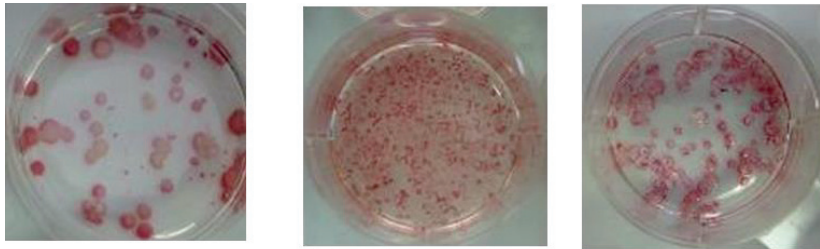


図 7 NF1-iPSC 誘導の概要

A



WT-iPSC

NF1-1-iPSC

NF1-2-iPSC

B

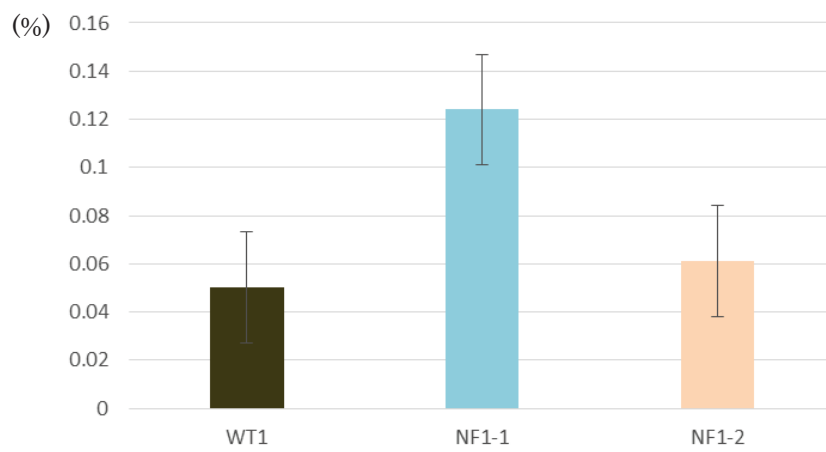


図8 NF1-iPSC と WT-iPSC における ALP 染色による iPSC 誘導効率

A : ALP 染色結果 B : 誘導効率の比較

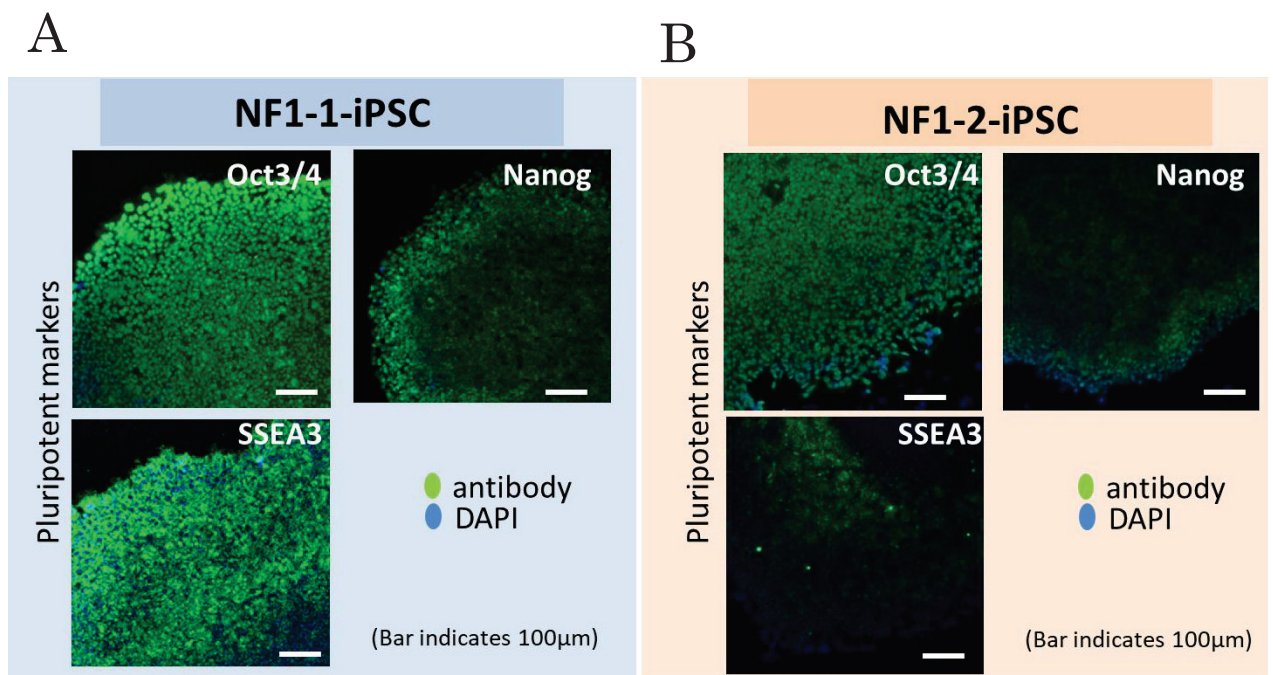


図9 NF1-iPSCにおける未分化マーカー蛋白の蛍光免疫染色像

A : NF1-1-iPSCにおける *Oct4*、*Nanog*、*SSEA3*の発現

B : NF1-2-iPSCにおける *Oct4*、*Nanog*、*SSEA3*の発現

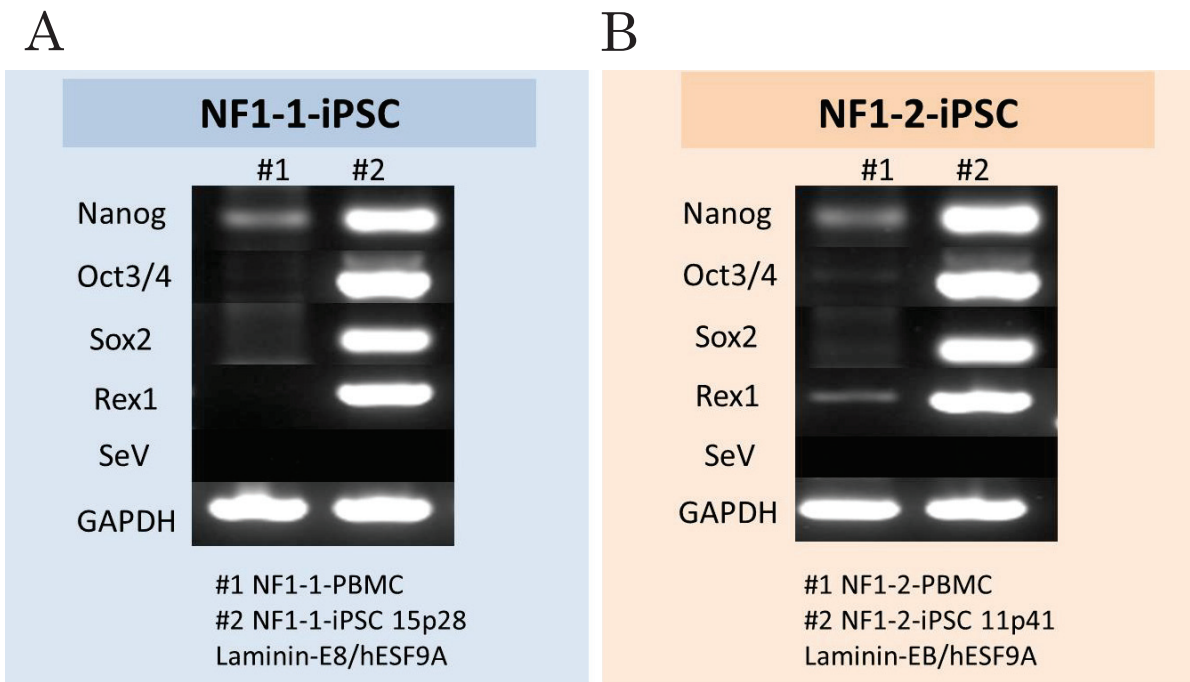


図 10 NF1-iPSC における未分化マーカー遺伝子およびセンダイウイルス (SeV) 遺伝子の RT-PCR による発現

A : NF1-1-iPSC における *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Rex1* および *SeV* の発現

B : NF1-2-iPSC における *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Rex1* および *SeV* の発現

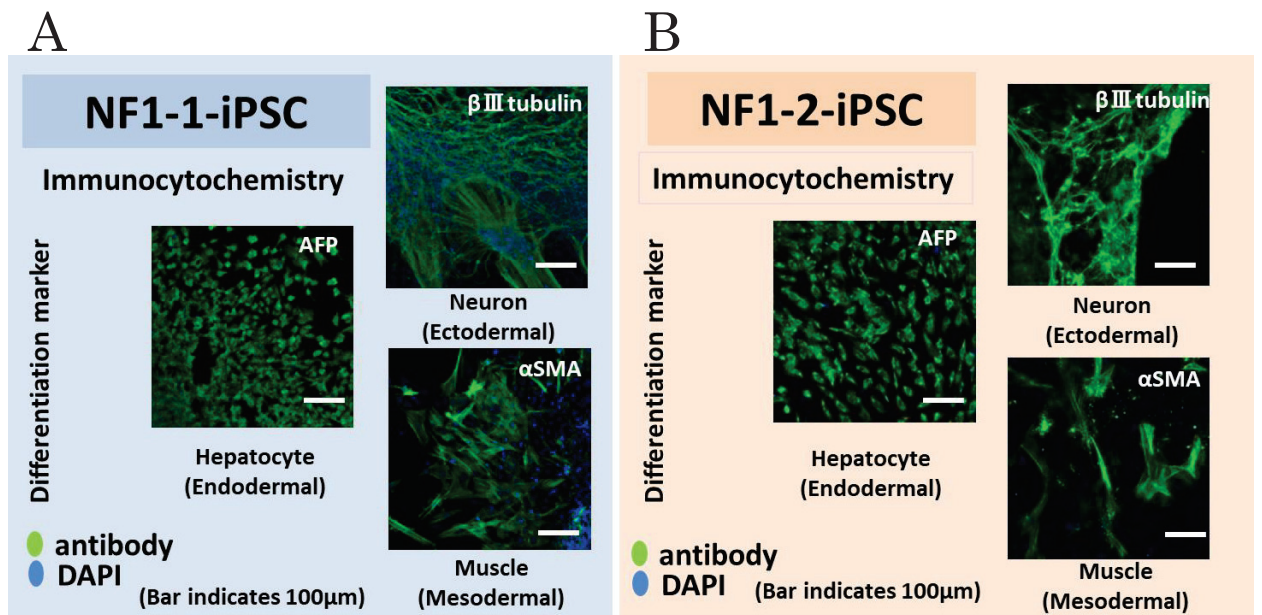


図 11 胚様体形成による三胚葉への分化誘導 (*in vitro*)

外胚葉：神経細胞特異的マーカー β III tubulin

中胚葉：平滑筋アクチンマーカー α -SMA

内胚葉：肝細胞マーカーAFP

A：NF1-1-iPSC における β III tubulin、 α -SMA、AFP の発現

B：NF1-2-iPSC における β III tubulin、 α -SMA、AFP の発現

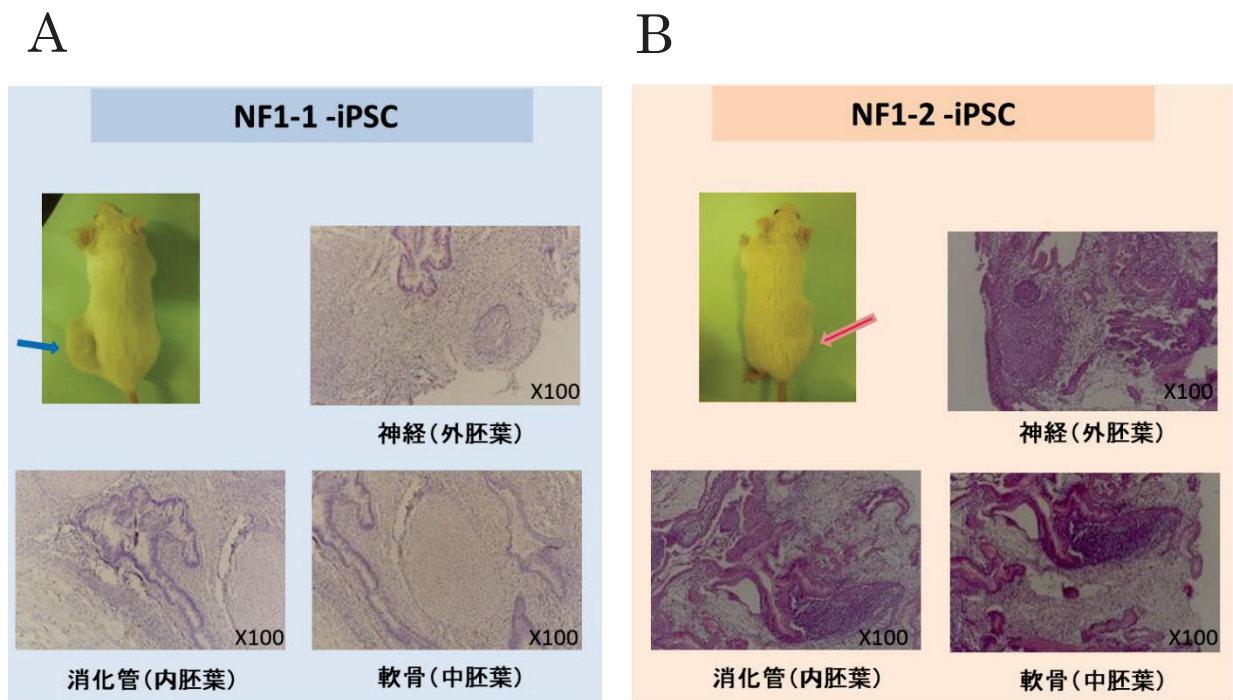


図 12 免疫不全マウスを用いた teratoma 形成能の評価 (*in vivo*)

免疫不全マウスにおける NF1-iPSC 由来 teratoma の組織学的評価 (*in vivo*)

A : NF1-1-iPSC 由来 teratoma の SCID マウス背部皮下での腫瘍形成と三胚葉組織の H-E 染色像

B : NF1-2-iPSC 由来 teratoma の SCID マウス背部皮下での腫瘍形成と三胚葉組織の H-E 染色像

Locus	PBMC (NF1-1)		iPS (NF1-1)		Teratoma (NF1-1)		軟骨組織 (NF1-1)	
D3S1358	15	17	15	17	15	17	15	17
TH01	7		7		7		7	
D21S11	31	31.2	31	31.2	31	31.2	31	31.2
D18S51	17		17		17		17	
Penta_E	5	13	5	13	5	13	5	13
D5S818	9	14	9	14	9	14	9	14
D13S317	12		12		12		12	
D7S820	11	12	11	12	11	12	11	12
D16S539	10		10		10		10	
CSF1PO	13	14	13	14	13	14	13	14
Penta_D	9	11	9	11	9	11	9	11
AMEL	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
vWA	17	18	17	18	17	18	17	18
D8S1179	10	14	10	14	10	14	10	14
TPOX	8	11	8	11	8	11	8	11
FGA	20	22	20	23	20	23	20	23

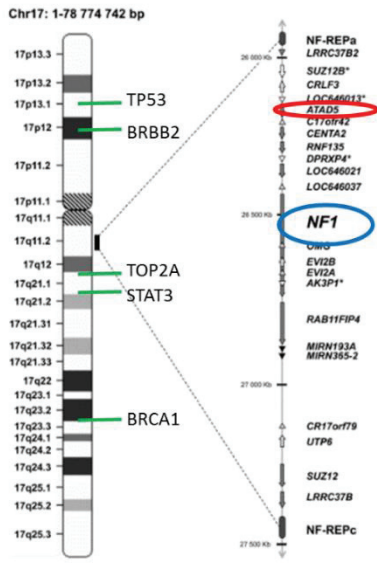
16のLocusがすべて一致

図 13 NF1-1 の STR (short tandem repeat) 解析

Locus	PBMC (NF1-2)		iPS (NF1-2)		Teratoma (NF1-2)		軟骨組織 (NF1-2)	
D3S1358	15	17	15	17	15	17	15	17
TH01	6	9	6	9	6	9	6	9
D21S11	29	30	29	30	29	30	29	30
D18S51	13		13		13		13	
Penta_E	12	15	12	15	12	15	12	15
D5S818	11	12	11	12	11	12	11	12
D13S317	9	14	9	14	9	14	9	14
D7S820	11.3	12	11.3	12	12		12	
D16S539	9	12	9	12	9	12	9	12
CSF1PO	11	13	11	13	11	13	11	13
Penta_D	10	12	10	12	10	12	10	12
AMEL	X		X		X		X	
vWA	16	17	16	17	16	17	16	17
D8S1179	10	16	10	16	10	16	10	16
TPOX	8	12	8	12	8	12	8	12
FGA	19	22	19	22	19	22	19	22

16のLocusがすべて一致

図 14 NF1-2 の STR (short tandem repeat) 解析



<https://onecs-live.azureedge.net/api/upx/ja-JP/html/index>

図 15 *ATAD5* (*ATPase Family, AAA Domain Containing 5*)

遺伝子の第 17 番染色体上の locus

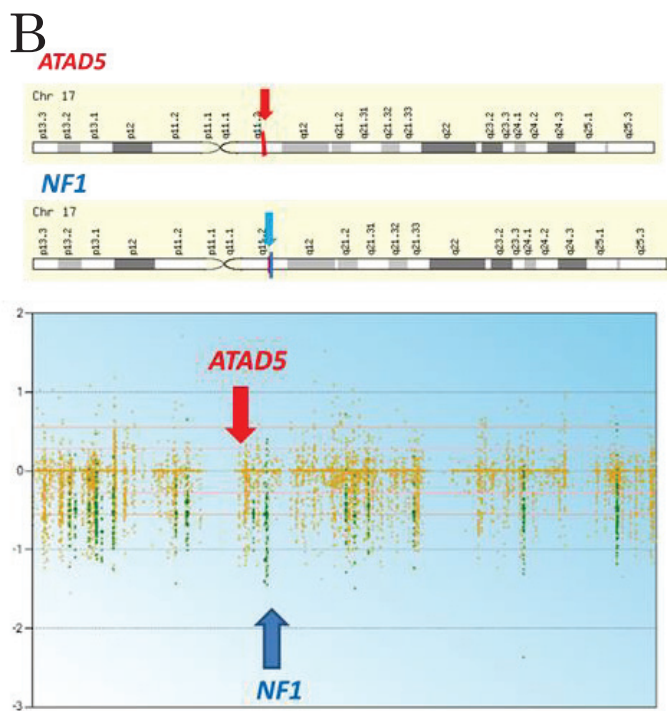
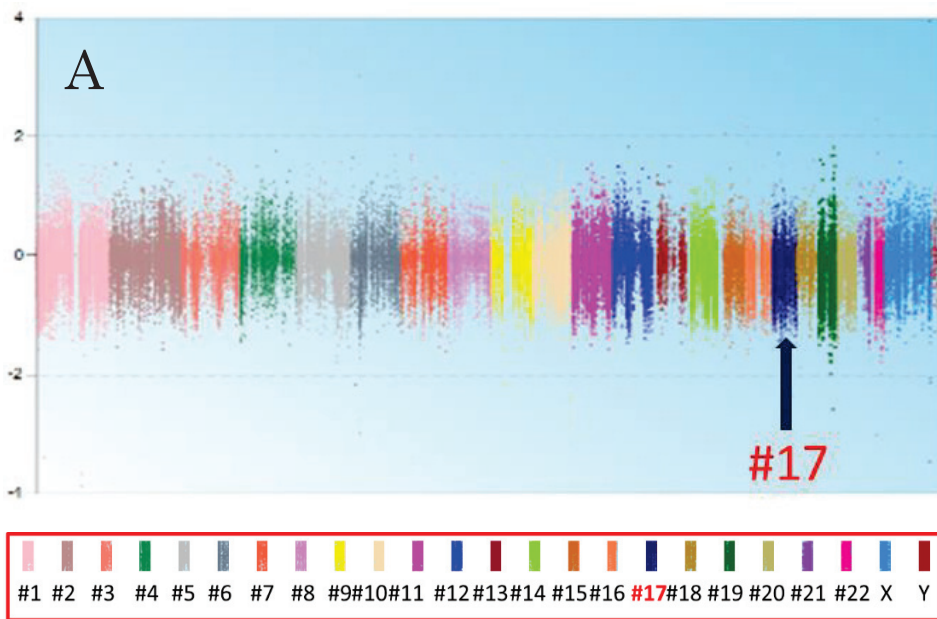


図 16 NF1-1 における CNA (Copy number alterations) 解析

A: NF1-1 全染色体 B: 17 番染色体

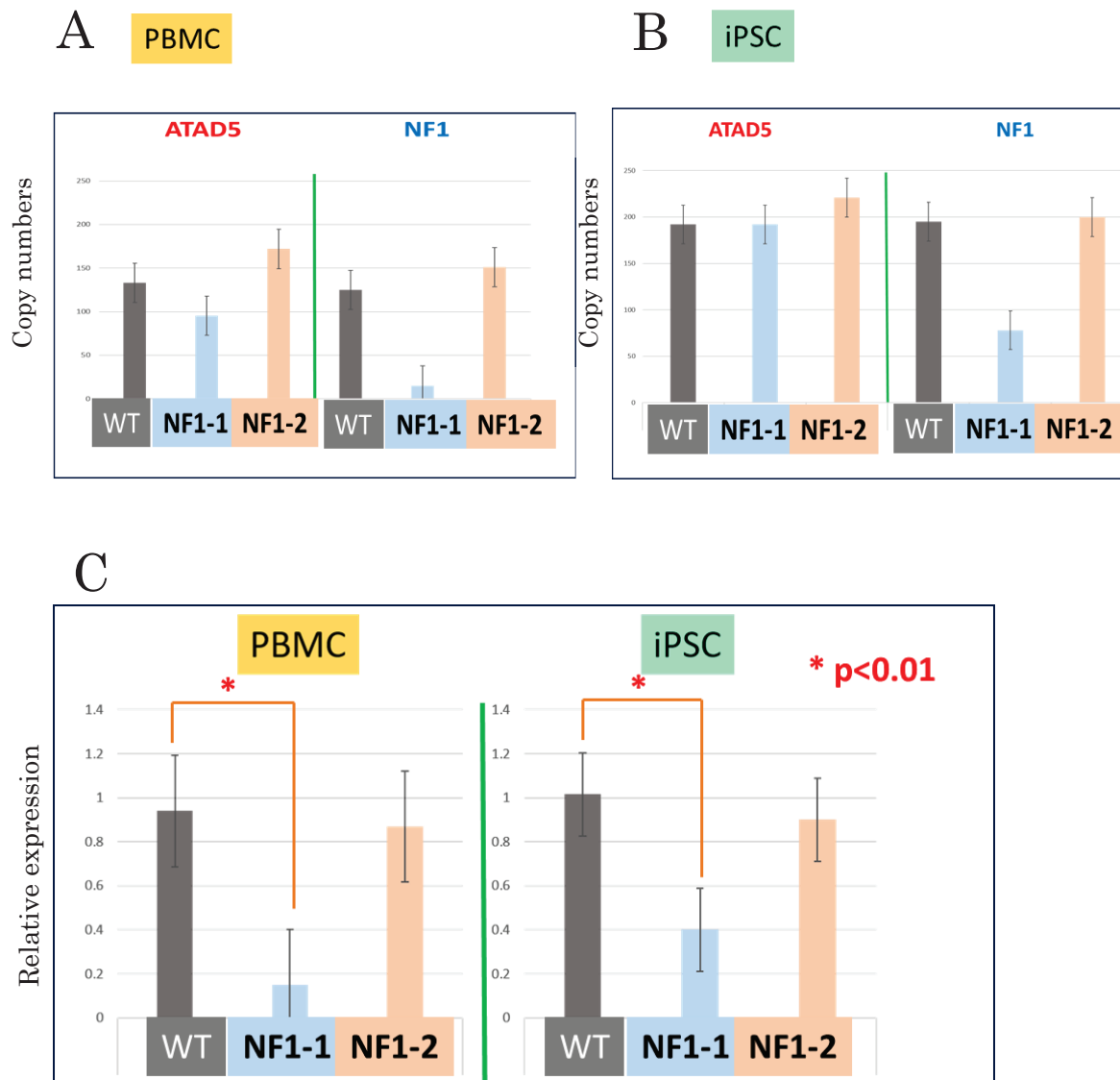


図 17 ddPCR 法による *ATAD5* 及び *NF1* 遺伝子の染色体コピー数の解析

A : WT および NF1-PBMC

B : WT および NF1-iPSC

C : *ATAD5* と *NF1* 遺伝子のコピー数の割合

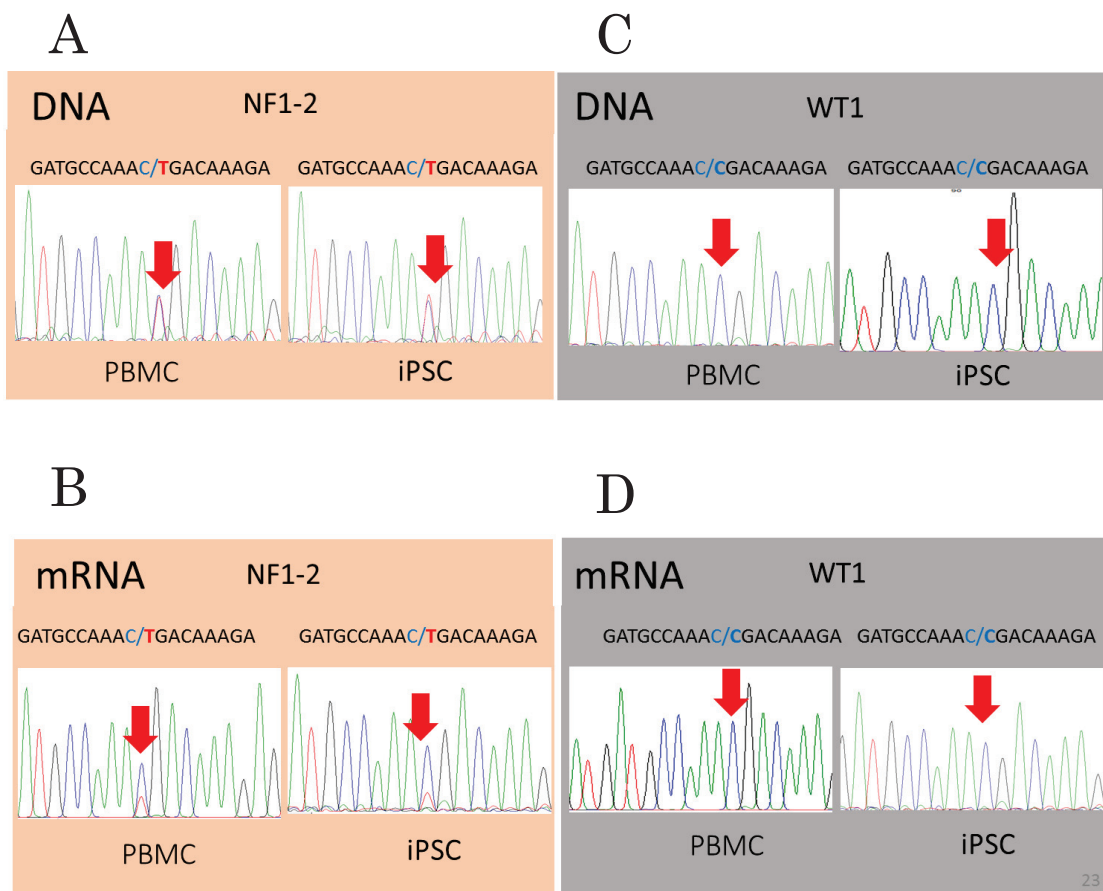


図 18 NF1-2 における *NF1* 遺伝子のサンガーシーケンス法による解析

A : NF1-2 の DNA 塩基配列 C : WT の DNA 塩基配列

B : NF1-2 の mRNA 塩基配列 D : WT の mRNA 塩基配列

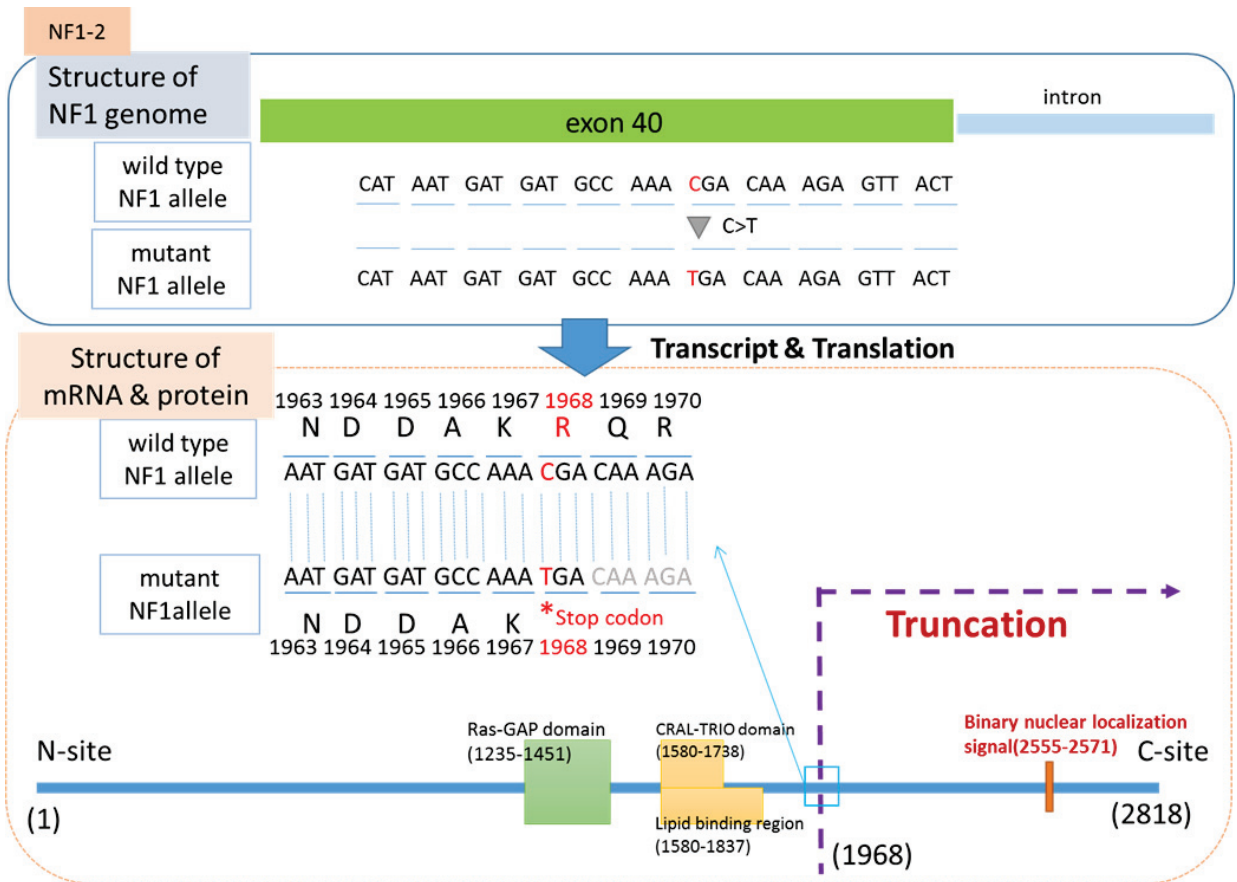


図 19 NF1-2 における NF1 遺伝子の変異の direct sequencing とそれから予想される NF 蛋白

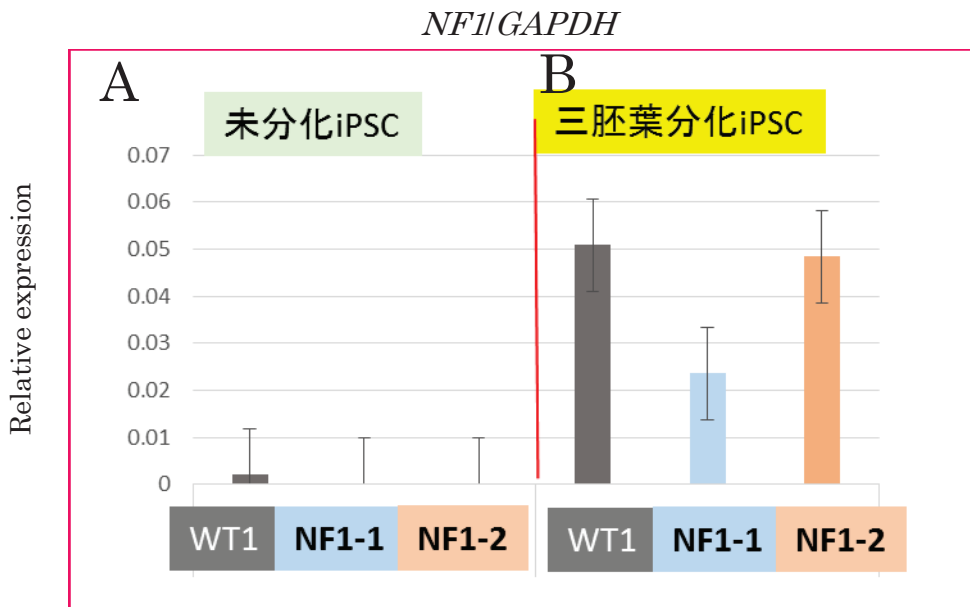


図 20 未分化および分化誘導後の *NF1*mRNA 発現

A: 未分化 iPSC における *NF1*mRNA 発現

B: 三胚葉への分化後 iPSC における *NF1*mRNA 発現

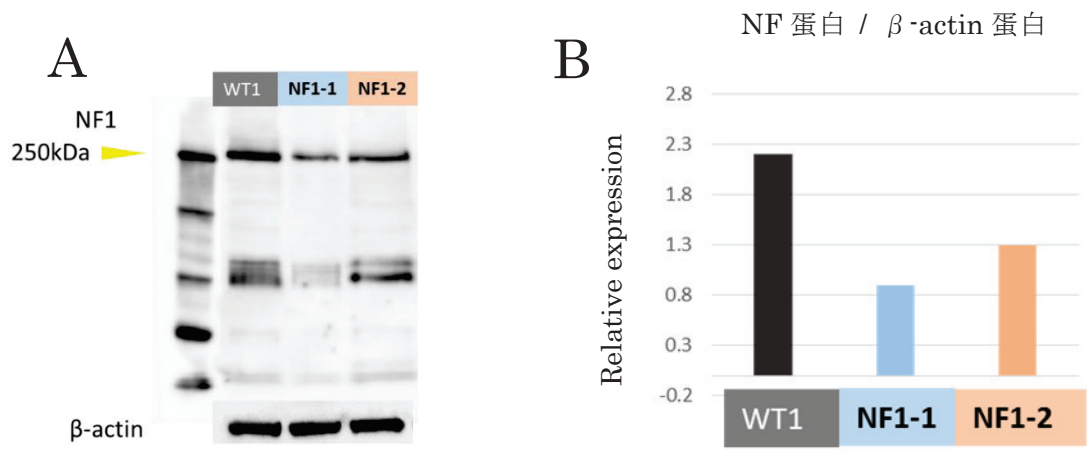


図 21 三胚葉組織への分化誘導後の iPSC における NF 蛋白の発現

A : Western blot

B : NF 蛋白発現量 / β -actin 蛋白発現量 (A の WB データをスキャンすることで得られた値を棒グラフ化した)

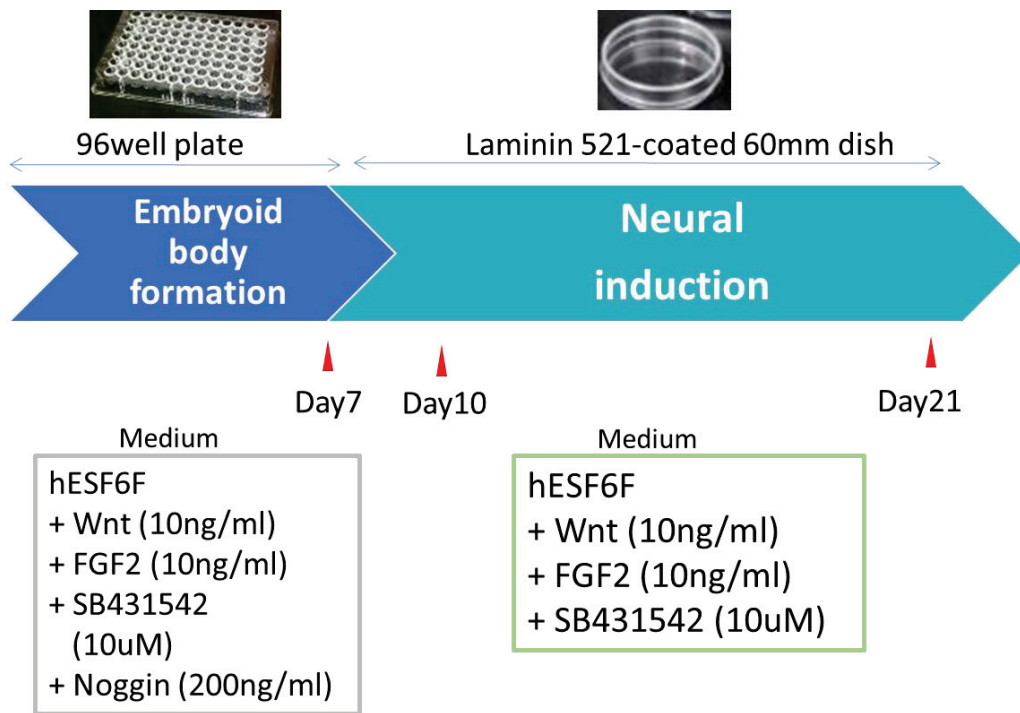


図 22 完全無血清培養条件下での iPSC の神経分化誘導法

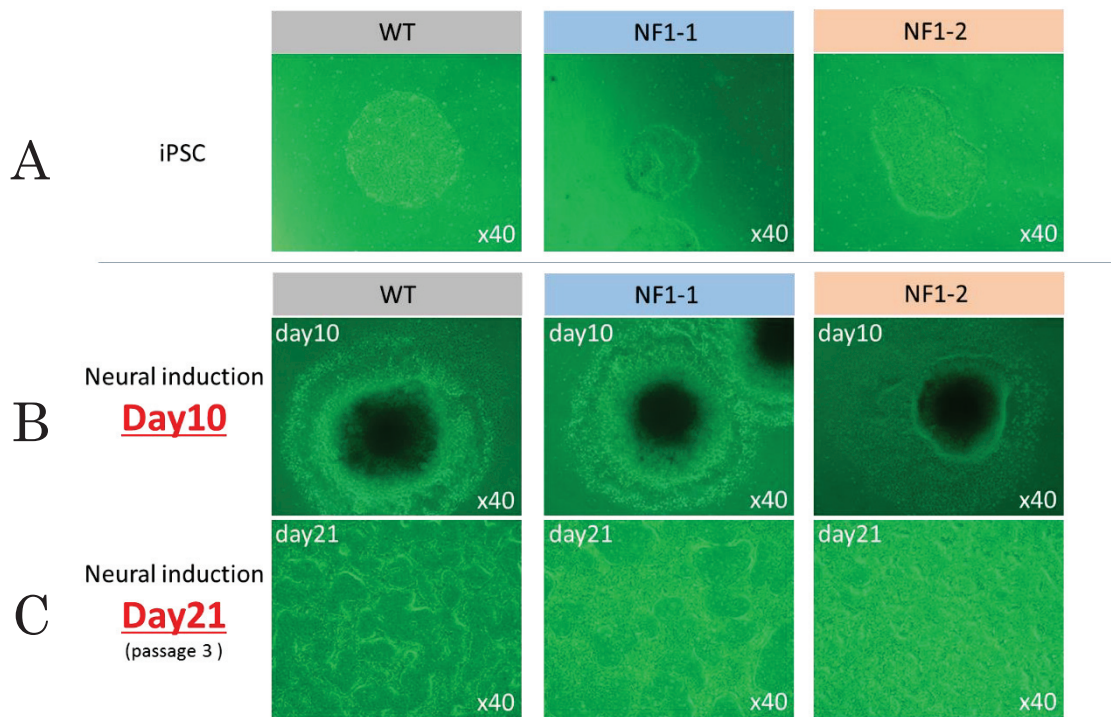
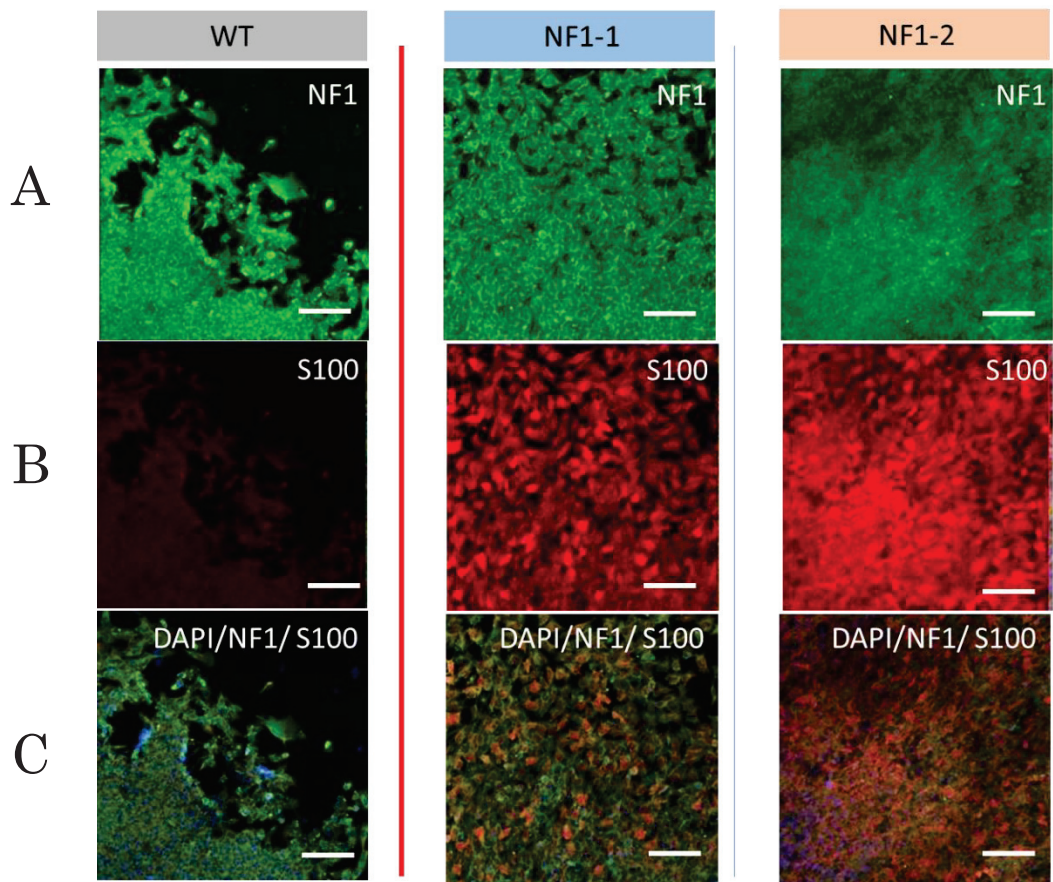


図 23 神経分化誘導過程の iPSC の位相差顕微鏡像

A : 誘導前 iPSC (WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

B : 神経分化誘導(WT, NF1-1, NF1-2 iPSC) 10 日目

C : 神経分化誘導(WT, NF1-1, NF1-2 iPSC) 21 日目



(Bar indicates 100 μ m)

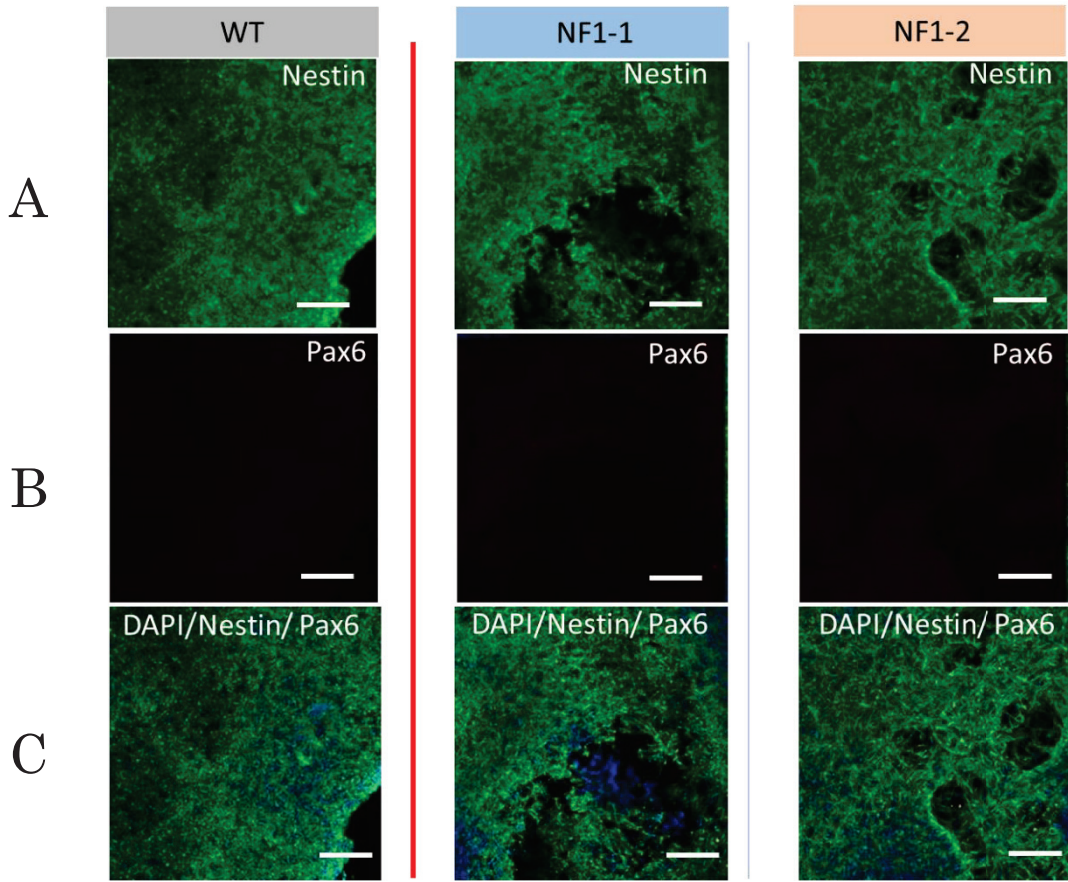
図 24 NF1 と S100 抗体による共焦点位相差免疫顕微鏡像

(10 日目)

A : NF1 (WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

B : S100 (WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

C : マージ像 (WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)



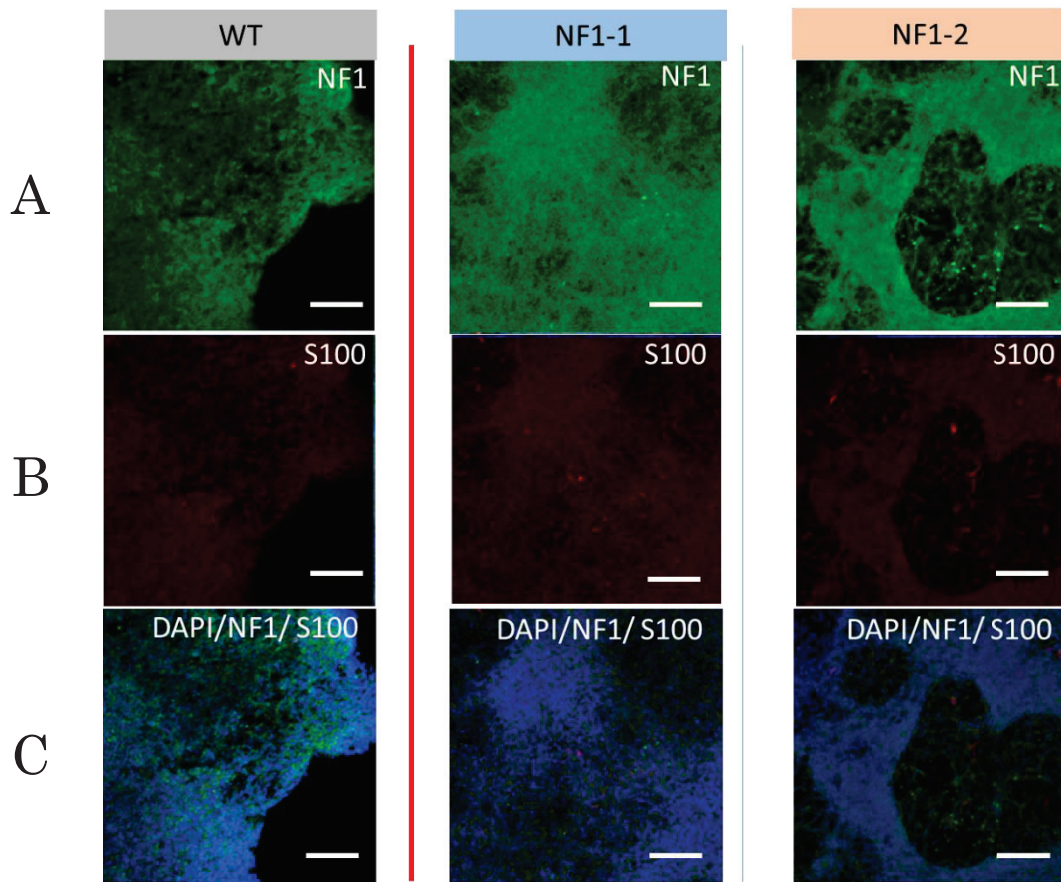
(Bar indicates 100 μ m)

図 25 Nestin と Pax6 抗体による共焦点位相差免疫染色顕微鏡像
(21 日目)

A : Nestin (WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

B : Pax6 (WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

C : マージ像 (WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)



(Bar indicates 100μm)

図 26 NF1 と S100 抗体による共焦点位相差免疫染色顕微鏡像
(21 日目)

A : NF1(WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

B : S100(WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

C : マージ像(WT, NF1-1, NF1-2 iPSC)

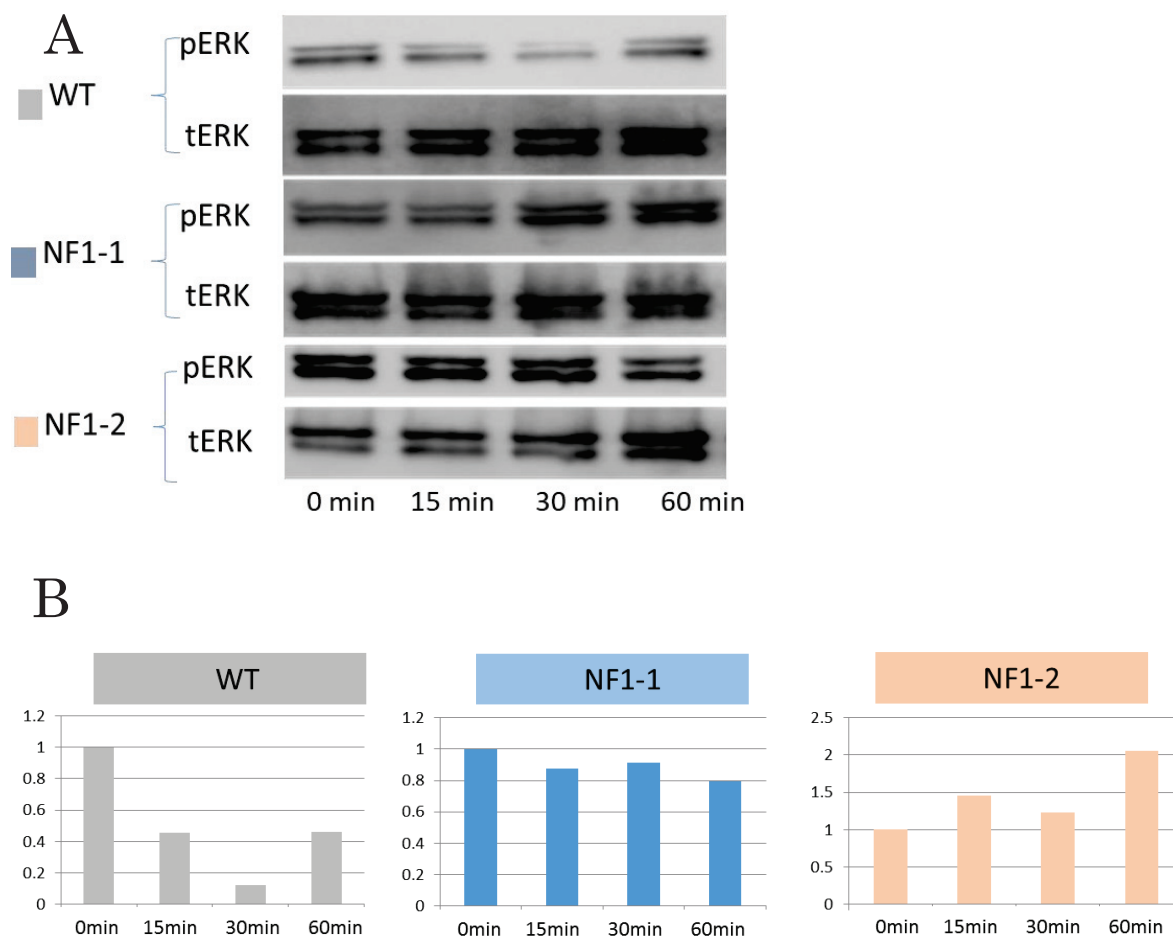


図 27 各 iPSC における Ras/MAP シグナル

A : WT, NF1-1, NF1-2 iPSC における pERK, tERK の Western blot

B : WT, NF1-1, NF1-2 iPSC における pERK 発現量の時間的变化 (A の WB データをスキャンすることで得られた値を棒グラフ化した)

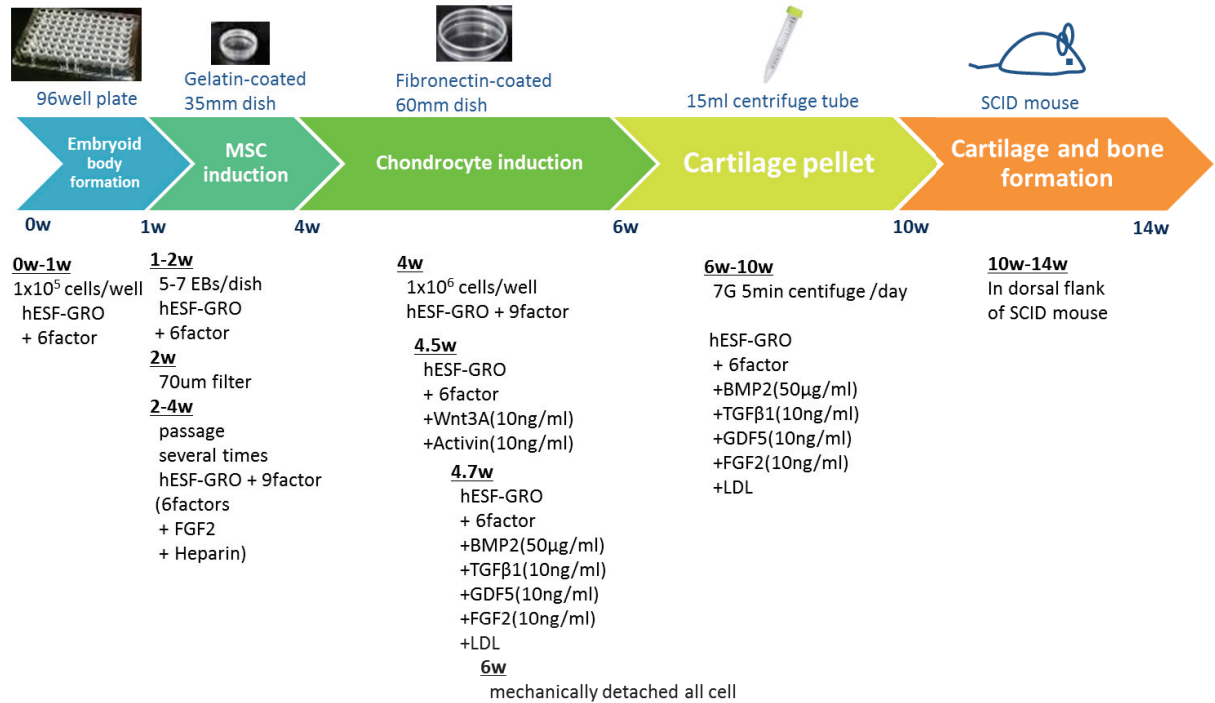


図 28 完全無血清培養条件下での NF1-iPSC からの軟骨・骨分化誘導法の概略

A

	WT-MSC	NF1-1-MSC	NF1-2-MSC
CD73 (+)(%)	99.8	96.2	99.5
CD90 (+)(%)	98.0	86.5	81.4
CD105 (+) (%)	99.8	90.9	96.1

B



C

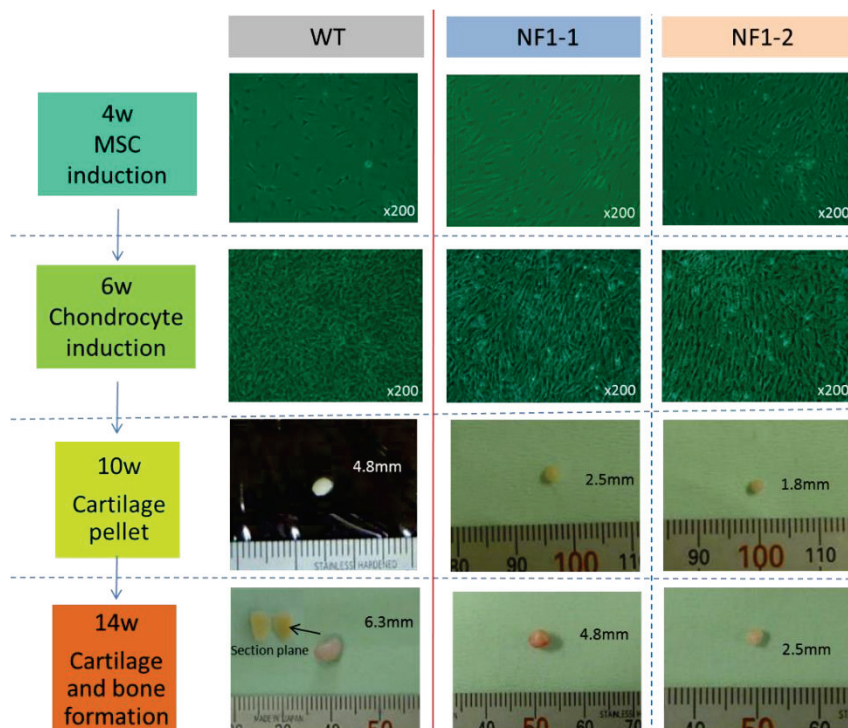


図 29 軟骨・骨分化誘導

A : WT, NF1-1, NF1-2 iPSC からの MSC 誘導効率

B : WT, NF1-1, NF1-2 iPSC からペレット培養で誘導された軟骨組織の PAS/Alcian blue 染色

C : 軟骨・骨誘導実験における経時的軟骨・骨分化誘導組織像

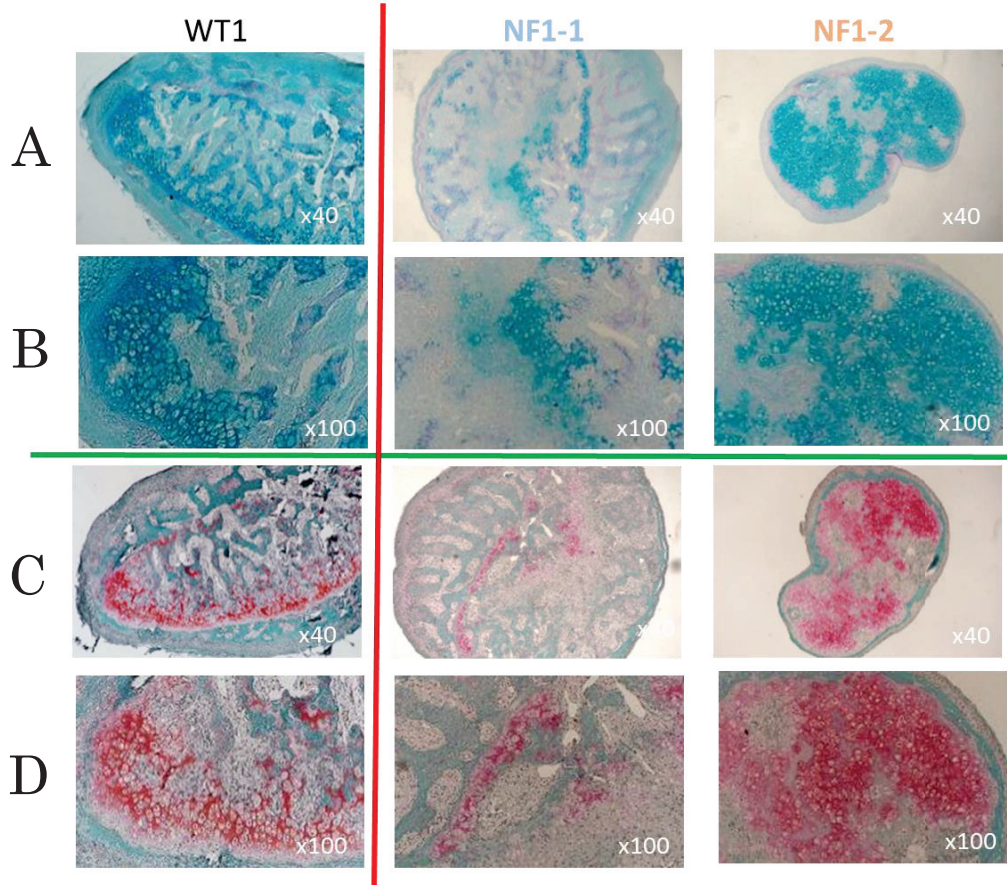


図 30 軟骨・骨誘導組織の組織像

A : WT, NF1-1, NF1-2-iPSC から誘導された軟骨ペレットの PAS/Alcian blue 染色 弱拡大像

B : WT, NF1-1, NF1-2-iPSC から誘導された軟骨ペレットの PAS/Alcian blue 染色 強拡大像

C : WT, NF1-1, NF1-2-iPSC 由来軟骨ペレットの SCID マウス背部 皮下移植組織の Safranin-O 染色 弱拡大像

D : WT, NF1-1, NF1-2-iPSC 由来軟骨ペレットの SCID マウス背部 皮下移植組織の Safranin-O 染色 強拡大像