

## 論文内容要旨

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

主指導教員：岡本 哲治 教授  
(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：栗原 英見 教授  
(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

副指導教員：兼松 隆 教授  
(医歯薬保健学研究科 細胞分子薬理学)

福谷 多恵子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】 Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease) (NF1)は神経線維腫、カフェオレ斑などの皮膚病変を主症状とし、骨、眼、神経系などに様々な病変を生じる常染色体性優性の遺伝性疾患である。NF1の病原変異遺伝子は17番染色体長腕に位置し、その遺伝子産物 Neurofibromin (NF)は、癌抑制遺伝子として機能していると考えられているが、その発症機構は不明な点が多い。一方、このような遺伝性疾患の発症機構を解明するため、疾患特異的 iPSC を用いた研究の有用性が注目されている。

本研究では、NF1と臨床診断された2例に対して Next Generation Sequencing (NGS)法などを用いて遺伝子解析を行うとともに、センダイウイルスベクター (SeVdp)、完全無血清及びフィーダー細胞フリーの培養系で、NF1由来末梢血リンパ球 (PBMC)から NF1 特異的 iPSC (NF1-iPSC)の樹立・長期維持を試みた。さらに、各 iPSCs の分化に伴う NF1 遺伝子及び蛋白発現を検討し、疾患病態モデルとしての可能性を検討した。本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究承認研究 (第ヒ 58,72 号) に基づいて行った。

【患者概要】患者 1 (NF1-1) : 37 歳男性。2013 年 9 月当科初診。15 歳時に NF1 の臨床診断を受けていた。初診時、顔面、背面等に神経線維腫及びカフェ・オレ斑、著明な下顎骨吸収及び病的骨折を認めた。先天性脛骨欠損、脊椎側弯症があったが、家族歴はなかった。

患者 2 (NF1-2) : 48 歳女性。2015 年 5 月当科初診。24 歳時に NF1 と臨床診断を受けていた。初診時、前腕・背部に神経線維腫及びカフェオレ斑を認めた。顎骨異常はなかった。右拍動性眼球突出に対し眼窩上壁骨欠損部再建術の既往があったが、家族歴はなかった。

【方法】 NGS には、次世代シーケンサー-MiSeq を使用し、TrusightOne 疾患パネル (illumina 社)を用いて、患者 PBMC 及び NF1-iPSCs 由来 DNA の 4813 遺伝子の全 exon の塩基配列を網羅的に解析した。また、NF1 の染色体上でのコピー数を Comparative Exome Quantification analyzer (CEQer)にて解析し、さらに標的遺伝子の絶対発現量を droplet digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) 法で検討した。

各 PBMC を RD6F+IL-2 無血清培地で 6 日間培養後、laminin 処理 6well-dish に  $1 \times 10^5$ /well で播種し、SeVdp (KOSM) 302L を MOI=6 で 2 時間感染させた。iPSC 誘導効率は alkaline phosphatase 陽性コロニー数で評価した。各 NF1-iPSCs の *in vitro* での未分化性及び分化多能性は、未分化遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox-2*, *Rex1*)及び蛋白 (*Oct3/4*, *Nanog*, *SSEA-3*, *SSEA-4*, *Tra-1-60*, *Tra-1-81*)発現を Revers Transcription-PCR (RT-PCR)法及び蛍光免疫染色法で検討した。分化多能性は、胚様体形成法及び免疫不全 (SCID)マウス背部皮下での teratoma 形成能にて検討した。さらに、各 iPSCs の未分化及び三胚葉への分化誘導時の NF1 遺伝子・蛋白発現を ddPCR 及び western blotting 法で検討した。また、神経分化過程での各種分化マーカー発現、Ras/MAP シグナル分子 ERK のリン酸化、さらにペレット培養法での軟骨分化後、SCID マウス背部皮下移植による軟骨・骨分化能についても比較検討した。

【結果】 NF1-2 では NF1 の exon 40 に C から T への一塩基変異 (rs137854552 C>T)を認め、同変異は arginine の stop codon への置換を示唆した。NF1-1 では NF1 に明らかな変異を認めなかったが、CEQer の結果 17 番染色体長腕 NF1 領域の read coverage が広範囲にわたり半減し、さらに ddPCR 解析で NF1 のコピー数も半減していた。NF1-1-hiPSC 及び NF1-2-hiPSC の誘導効率はそれぞれ 0.124%及び 0.088%であった。いずれの

NF1-iPSCs も未分化遺伝子・蛋白を発現し、さらに *in vitro* 及び *in vivo* で三胚葉への分化多能性を有していた。両 NF1-iPSCs とも未分化状態では、NF1 遺伝子・蛋白発現は著しく低値を示したが、分化に伴い上昇した。分化 NF1-1-iPSCs における *NF1* mRNA 発現は WT-iPSC のそれと比較し半減していたが、NF1-2-iPSC では差を認めなかった。一方、両 NF1-iPSCs の NF1 蛋白発現は WT-iPSCs の約 1/2 に減少していた。また、神経分化に伴い、WT-iPSC と比較して両 NF1-iPSCs では早期に S-100 陽性細胞が出現し、さらに ERK リン酸化も維持あるいは上昇傾向を示した。さらに、*in vitro* 及び *in vivo* での軟骨・骨分化誘導の結果、NF1-1-iPSC は WT-iPSCs に類似した骨分化を示したが、NF1-2-iPSCs では骨分化が遅延していた。

【結論】無血清及び無フィーダー培養系を用いて NF1-iPSCs の樹立及び長期維持に成功した。2 症例の NF1 間で臨床症状や経過が大きく異なるのは、*NF1* 変異の質的差異を反映している可能性が示唆された。また、各 NF1-iPSCs においても *NF1* の欠失や変異は維持されており、さらに神経分化や軟骨・骨分化能にも差を示したことから、NF1 の分子・細胞レベルでの病態解明や、疾患モデルとして創薬スクリーニングへの応用や治療法の開発研究に有用であると考えられた。