

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15574

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた悪性高熱症の発症機構の解明と新規診断法・治療法の開発

研究課題名(英文) In vitro disease modeling of malignant hyperthermia using patient-derived iPS cells

研究代表者

森崎 浩 (MORISAKI, HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：60182226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性高熱症(MH)は、全身麻酔時の重篤な合併症のひとつで全身麻酔に伴い発熱・筋硬直・不整脈・代謝性アシドーシスが生じる。原因は骨格筋小胞体からのCa²⁺放出亢進と考えられている。本研究ではMH既往患者のうち特にI型リアノジン受容体遺伝子(RYR1)に変異を有する患者からiPS細胞を作出し、骨格筋への選択的な分化誘導を行った。その結果、一部の疾患株で筋収縮様の変態が確認できた。さらに培養上清の乳酸値も高く細胞の異常代謝が示唆された。また、抗RYR1抗体を用いて免疫染色したところ、顆粒状のシグナルが細胞内に散見された。本研究により、MHの新規細胞モデルを提唱できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Malignant hyperthermia (MH), is a type of severe reaction that occurs to particular medications used during anesthesia. Symptoms include muscle rigidity, high fever, a fast heart rate, and mixed acidosis. In a large proportion of cases, the propensity for MH is due to a mutation of the type I ryanodine receptor (RYR1), located on the sarcoplasmic reticulum. RYR1 opens in response to increases in intracellular Ca²⁺ level mediated by L-type calcium channels, thereby resulting in a drastic increase in intracellular calcium levels and muscle contraction. Here, we generated MH iPS cells from blood cells of the patients who have RYR1 gene mutation. MH iPS cells were successfully differentiated into skeletal muscle cells. Several patient cells exhibited muscle rigidity-like alteration and high concentration of lactate in the culture supernatant. Also accumulated RYR1 puncta were detected in the patient muscle cells. These findings can propose a new cellular model of MH.

研究分野：医歯薬学

キーワード：悪性高熱症 iPS細胞 興奮性神経細胞 Neurogenin2 麻酔薬 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性高熱症の臨床における課題

悪性高熱症(Malignant Hyperthermia : MH)は全身麻酔の重篤な合併症のひとつである。MHの素因を有する患者においては、揮発性吸入麻酔薬(ハロタン、セボフルランなど)、筋弛緩薬(スキサメトニウムなど)などの全身麻酔を受けると、MHの症状を発する。特徴的な症状は筋硬直で、原因不明の頻脈、不整脈、代謝性アシドーシスなどが出現する。血圧は不安定となり、呼気炭酸ガス分圧上昇・低酸素血症が出現し、その後急激な体温上昇が始まる。横紋筋融解によりミオグロビン尿を呈し、血清カリウム値が上昇する。診断はこれらの経過・臨床所見からおこなわれている。本症の原因として、誘因薬物の投与により、骨格筋内のカルシウム貯蔵庫である筋小胞体からのカルシウム放出速度が異常亢進していることが指摘されている(カルシウム誘発性カルシウム放出(CICR: Ca-induced-Ca-release)の亢進)。

近年の報告では全身麻酔の2,000例に1例はその素因があると指摘されている。MH発症リスクの評価は、麻酔科学の発展はもとより、全身麻酔を受ける患者の安全向上に極めて重要である。唯一の確定診断法とされる筋生検はその侵襲の大きさや時間的制約から困難な現状がある。MHの原因のひとつリアノジン受容体(RyR1)遺伝子異常は、MHと確定診断された発症患者のうち約60%に認められる程度で、その変異部位は200カ所以上に及ぶため、確定診断にはなりえず、非侵襲的な新たな確定診断法の開発が望まれている。また、MHを発症しにくいと考えられているプロポフォールなどの静脈麻酔薬の安全性に関する科学的証拠はなく、脳や心臓にも発現するRyR1やサブタイプが痙攣や頻脈等の症状に関与する可能性についての検討は行われていない。

(2) 悪性高熱症モデル iPS 細胞の必要性

悪性高熱症のモデル動物については、RyR1変異のノックインマウスを含め、複数の報告がなされており、MH様症状が現れることはこれまで知られていた。しかしながら、麻酔薬に対する応答性の動物種差の違いは大きい。これに加え、*de novo*のRyR1変異を有する患者に対する適用範囲拡大と迅速な診断要因がもてめられていた。しかしながら、MHのヒトにおける解析は基本的には患者の筋生検を行い初代培養下でなされていた。そのため、継続的な実験ができないことと、ドナーに対する侵襲性が非常に高い点が問題であった。そこで近年、ヒト iPS 細胞を用いた MH の解析系を確立することが必要とされていた。特に、これまでヒト皮膚線維芽細胞からの iPS

細胞樹立が主流であったが、血球細胞から簡便に iPS 細胞を作出することができるようになり、患者に対する負担が大きく低減された。以上のことより患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析を本研究で行う意義が高まった。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく以下の3点に分けられる。

(1) 悪性高熱症(MH)患者 iPS 細胞を用いた疾患のモデル化とその活用

MHは、麻酔を契機として発症する致死性疾患であり、手術に際し最も注意を要する合併症の一つであるにもかかわらず、研究はほとんど進んでいない。そこで以下の4つの問題点に留意しつつ、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析を行う。

非侵襲的な確定診断法がない点

MH 発症の機序が不明である点

MH 患者に使用する麻酔薬の安全性の科学的根拠が不十分である点

MH や合併病変治療の科学的根拠に乏しい点

(2) iPS 細胞レベルでの疾患評価

MH 患者由来 iPS 細胞そのものが健常人 iPS 細胞と異なる点はないかどうかの検討を行う。特に、MH 患者由来の iPS 細胞の樹立報告は極めて少ない。そこで、骨格筋等の分化細胞の病態解析に先立ち、まず患者末梢血由来 iPS 細胞レベルで何らかの病的変態が認められるかどうかを検討する。

(3) ヒト ES/iPS 細胞からの骨格筋細胞への分化誘導法開発

ヒト ES/iPS 細胞からの効率的な骨格筋への分化誘導法は十分には確立されていない。本研究では一過性の転写因子発現システムを導入して、効率的な骨格筋の分化誘導方法を構築する。

3. 研究の方法

(1) MH 患者由来 iPS 細胞の樹立と品質管理

iPS 細胞については、以下の手順で樹立・拡大培養・品質管理・解析に有用なクローン選別を行った。

患者リクルートと末梢血単核球あるいは皮膚線維芽細胞の採取

エレクトロポレーション法によるエピソードマーカーの導入と初期化

産出された iPS 細胞のクローン化と拡大

培養・凍結保存

iPS 細胞の品質管理 (PCR 法によるエピソーマルベクター残存否定試験)

未分化マーカー発現確認と三胚葉分化能試験

(2) ヒト骨格筋芽細胞株 Hu5E18 細胞を用いた成熟骨格筋への分化誘導技術開発とヒト iPS 細胞からの骨格筋分化誘導法開発

分化誘導の開発は下記のように、まず不死化細胞株を利用して有用な培養液等の検証をした後に iPS 細胞で実際に適用実験を行った。

Hu5E18 細胞は代表的な骨格筋芽細胞株のひとつである。これは筋幹細胞ともいえ、継代培養が可能であるが、条件次第で、それ以上の分裂増殖が行われなくなり、細胞融合が進み、成熟した多核性の筋肉細胞となる。本研究では、iPS 細胞から骨格筋分化誘導に先立ち、筋幹細胞からの効率的な骨格筋分化誘導システムの構築を行った。

Tet-On システムを用いた MyoD1 遺伝子発現システムを用いた、骨格筋 (筋幹) 細胞への迅速な分化誘導法を検証した。誘導に用いた Tet-On システムのプラスミドベクターは京都大学 CiRA (櫻井英俊博士) より恵与いただいた PiggyBac ベクターである。(Tanaka A. et al, 2013, PLoS One)

MyoD1 遺伝子 mRNA、shOct3/4 導入法を用いた骨格筋への成熟化を検討する。mRNA の構築や遺伝子導入方法については、慶應義塾大学医学部システム医学教室において開発された方法を本研究において最適化した。(Akiyama T. et al, 2016, Development)

(3) MH 患者由来 iPS 細胞からの骨格筋への分化誘導と RYR1 発現検討

研究方法 (2) で行った分化誘導法をもとに、患者由来細胞でも実際に分化誘導が可能かどうか、および RYR1 遺伝子発現の検討を行った。

MyoD1 遺伝子導入による分化細胞の骨格筋マーカー遺伝子発現検討

RYR1 抗体を用いた免疫染色

(4) MH 患者特異的 iPS 細胞および誘導分化骨格筋の表現型探索

MH の病態に則した表現型が in vitro においても認められるかどうかを以下の項目で検討した。

iPS 細胞における代謝解析

分化誘導細胞における培養上清に含まれる小分子濃度解析を用いた代謝解析

Ca²⁺イメージングによる細胞質カルシウム濃度の可視化と細胞形態の観察

4. 研究成果

(1) MH 患者由来 iPS 細胞の樹立と健常人由来 iPS 細胞との比較

慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センターで同定された RYR1 変異を有する患者について、iPS 細胞の樹立を行った。方法は末梢血単核球を調製し T リンパ球を拡大培養した後に、下記のエピソーマルベクターをエレクトロポレーションで導入して作出した。

樹立に使用した使用したエピソーマルベクター: pCE-hOct3/4 (Oct3/4 遺伝子)、pCE-hSK (Sox2 遺伝子、Klf4 遺伝子)、pCE-hUL (Lin28 遺伝子、L-Myc 遺伝子)、pCE-mp53DD (マウス p53 遺伝子ドミナントネガティブ変異体)、pCXB-EBNA1 (EBNA1 遺伝子)

樹立に成功した iPS 細胞は以下である。

MH01 (RYR1 遺伝子変異、MH 発症歴あり、高 CK 値、コアミオパチー(+)) (図 1)

MH02 (RYR1 遺伝子変異、高 CK 値、筋生検確定診断あり)

MH04 (RYR1 遺伝子変異、MH 発症歴あり、筋生検確定診断あり)

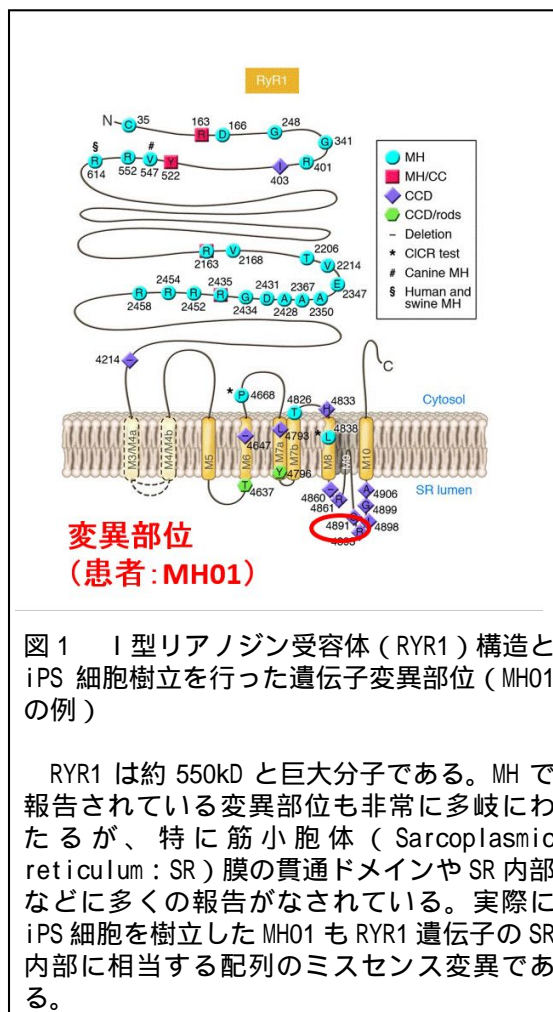


図 1 I 型リアノジン受容体 (RYR1) 構造と iPS 細胞樹立を行った遺伝子変異部位 (MH01 の例)

RYR1 は約 550kD と巨大分子である。MH で報告されている変異部位も非常に多岐にわたるが、特に筋小胞体 (Sarcoplasmic reticulum: SR) 膜の貫通ドメインや SR 内部などに多くの報告がなされている。実際に iPS 細胞を樹立した MH01 も RYR1 遺伝子の SR 内部に相当する配列のミスセンス変異である。

これらについては、樹立に用いたエピソーマルベクターの残存 (ゲノム挿入) はないことを確認し、未分化マーカーの発現が正常に

なされていること、iPS 細胞の樹立に伴う明らかな核型変異は生じていないことを確認した。

また樹立準備段階である末梢血単核球の調製については以下について完了している。

MH03 (遺伝子変異不明、MH 発症歴あり)

MH05 (MH04 親族)

MH06 (MH04 親族)

MH07 (RYR1 遺伝子変異、MH 発症歴あり)

MH08 (遺伝子変異不明、MH 発症歴あり、筋生検確定診断)

なお、樹立された MH 由来-iPS 細胞と健常人 iPS 細胞とを比較したところ、形状、細胞増殖性、三胚葉分化能については大きな差異は認められなかった。(図2)

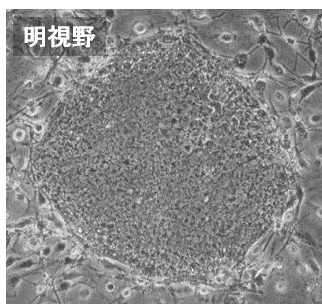


図2 悪性高熱症患者由来 iPS 細胞 (RYR1 遺伝子変異) の明視野像

MH 患者由来 iPS 細胞については健常対照群 iPS 細胞と同様に樹立・維持培養することが可能であった。図はマウス由来フィーダー細胞 (MST0) 上に培養されている RYR1 変異 iPS 細胞である。

(2) 骨髄移植歴のあるドナーからの線維芽細胞 iPS 細胞の樹立と品質管理

当初、血液検体からの iPS 細胞の樹立のみを想定していたが、骨髄移植経歴のある MH 患者にも適用拡大した。すなわち、この場合、MH を発症するゲノム上の変異は血液細胞からは検出されない可能性が高い。そのため、当該 MH 患者からは皮膚線維芽細胞の生検を行い iPS 細胞の樹立を行うことにした。実際に iPS 細胞を樹立し拡大培養・凍結保存を行った。

(3) ヒト骨格筋芽細胞株 Hu5E18 からの効率的な骨格筋分化誘導法

ヒト iPS 細胞からの効率的な骨格筋分化誘導法は当初ほとんど確立されていなかった。このため、まず、不死化骨格筋芽細胞を用いることで、*in vitro* での成熟した骨格筋の分化誘導法を検討した。

その結果、培地における血清成分を除外し、IGF を添加することで筋芽状態から脱し、融合を始めることが分かった。この方法を実際に iPS 細胞からの分化誘導法のひとつとして

取り入れることにした。

(4) PiggyBac ベクターを用いたヒト iPS 細胞からの効率的な骨格筋分化誘導技術の開発・最適化

iPS 細胞からの骨格筋分化誘導は、化合物やリコンビナントタンパク質といった化学的処置のみでは分化誘導は難しかった。そこで、最初に骨格筋への分化マスター遺伝子といわれている MyoD1 遺伝子の強制発現系を導入した。実際に京都大学 CiRA で用いられていた PiggyBac ベクターを恵与いただき、Tet-0n 駆動性の MyoD1 遺伝子過剰発現により、骨格筋前駆細胞が出現した。これは、iPS 細胞レベルで G418 薬剤耐性株をリクルートしてくることで、遺伝子導入された細胞株のみを選択的に培養することができる。これによって、分化誘導効率は飛躍的に向上した。しかしながら、未分化な細胞集団が依然として残存する結果となり、成熟培養や生化学的解析が困難な状態が続いた。

(図3)

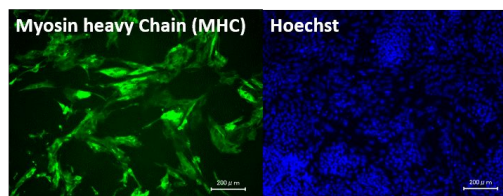


図3 MH 患者 iPS 細胞から分化誘導 9 日目の免疫染色像 (MHC : 骨格筋マーカー)

PiggyBac ベクターで Tet-0n-MyoD1 遺伝子を導入。薬剤 (G418) セレクションにより、Tet0-MyoD1 発現細胞株をクローン化した。その後、Doxycycline 処理で一過性の MyoD1 遺伝子発現を促し、骨格筋へと分化誘導させた。ただし、骨格筋マーカーである MHC 陽性の細胞は作出できたものの、一部の細胞は iPS 細胞様のコロニーを形成したままであった。

(5) mRNA トランスフェクションによる骨格筋分化誘導技術の向上

研究結果 (4) までの PiggyBac ベクター トランスフェクションでは薬剤選択性や Tet-0n システムなどにより、ある程度効率的な分化誘導は可能であったが、より強力に分化誘導を促す方法として mRNA トランスフェクションに移行した。MyoD1 に加え、shOct3/4 の導入を行うことで分化耐性を解除し、骨格筋分化を効率化させた。これによって、非常に効率的に骨格筋分化誘導が行えるようになった。(図4)

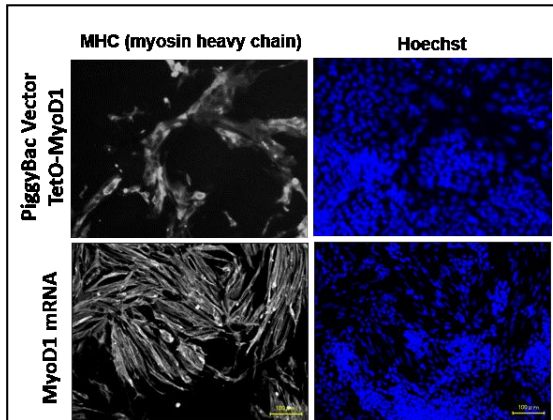


図4 Tet-On-MyoD1 誘導型と MyoD1 mRNA 誘導型の分化レベル比較

Tet-On-MyoD1 による骨格筋誘導では、実際に分化する細胞はまばらで、かつ成熟した融合細胞が少なかった。一方、MyoD1 mRNA および Oct3/4 shRNA の導入によって未分化細胞の減少と成熟化が進み繊維状の構造がみられるようになった。図は iPS 細胞からの分化誘導 9 日目の免疫染色像である。

(6) MH 骨格筋の形態異常と、RYR1 タンパク質の局在異常の可能性

MH の病態は基本的にカルシウム誘発性 CICR によって引き起こされる細胞質内の過剰 $[Ca^{2+}]$ による異常筋収縮が原因とされている。実際に骨格筋分化誘導を行い、カフェイン処理を施すと、筋収縮量が健常コントロール株に比べて大きい傾向にあった。またカルシウムイメージングにおいても、細胞内輝度の上昇傾向があった。

一方で、リアノジン受容体そのものの発現レベルは健常人と同レベルなのかを検討した。ウェスタンブロッティングは RYR1 タンパク質が非常に高分子 (550kDa) であるため、同定が困難であった。そのため、免疫染色で局在や存在量を解析した。その結果、MH 骨格筋においては、RYR1 の免疫染色シグナルが斑点状になっており、ところどころ集積している傾向が捉えられた (図5)。このような表現型はこれまでの MH 研究では報告されていないことであった。

本免疫染色像の考察としては、チャネル機能異常に伴う病態発症 (いわゆるチャネルopathy) とは異なる側面の病態が示唆される。例えば、多くの神経変性疾患などでは、異常タンパク質の細胞内外の蓄積が毒性を発揮して機能異常や細胞死を招くことが知られてきた。一方、チャネル異常症として考えられていた疾患も、実は異常タンパク質の蓄積による変性疾患であることが明らかになるケースも報告されている (Hosoya et al, 2017,

Cell Reports)。RYR1 遺伝子変異によるこのような、免疫染色シグナルの変化は、細胞内外の異常タンパク質蓄積、そしてそれに伴う機能異常を示唆しているのかもしれない。

タンパク質の定量的解析は今回の実験ではなされなかったため、サイトメーターやキャピラリー免疫アッセイなどで解析する必要がある。

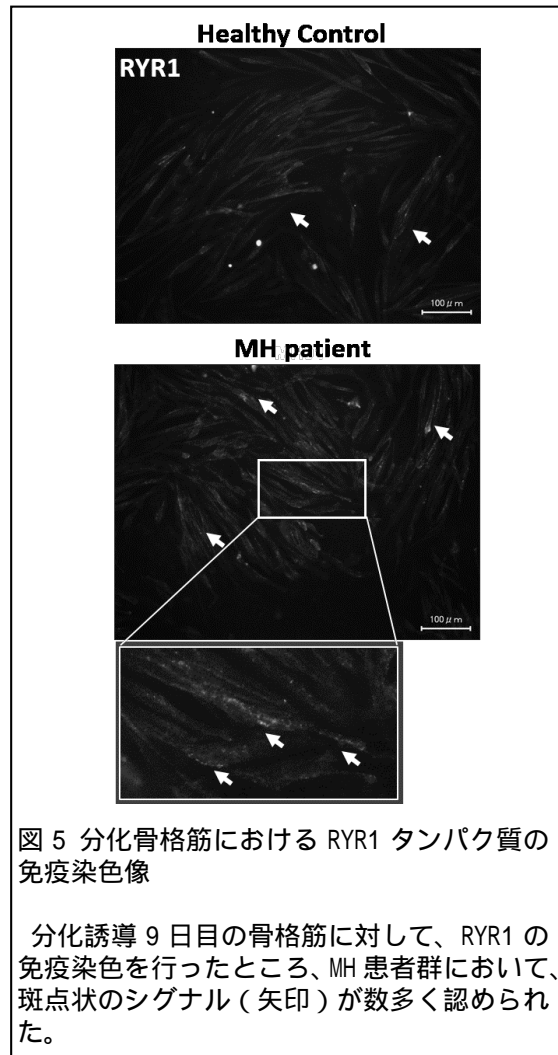


図5 分化骨格筋における RYR1 タンパク質の免疫染色像

分化誘導 9 日目の骨格筋に対して、RYR1 の免疫染色を行ったところ、MH 患者群において、斑点状のシグナル (矢印) が数多く認められた。

(7) MH 骨格筋培養上清における異常代謝産物の検出

MH 患者では血中の CK 値が高いことが知られている。一方 *in vitro* において、筋細胞の破壊に伴う表現型に先んじて細胞の代謝系が変化している可能性がある。そのため、骨格筋の培養上清を抽出して種々の低分子化合物等の濃度を簡便に定量した。その結果、pH の低下、 $[HCO_3^-]$ の低下、乳酸濃度の増加が認められた (図6)。これは骨格筋収縮活動の亢進がもたらす代謝応答と考えられる。極端な筋肉収縮や骨格筋破壊に先立ちこのような代謝亢進が現れるのが MH の病態なのではないかと予想される。一方で、iPS 細胞レベルでも MH における若干の代謝異常傾向があったが、正確な定量は行っていない。

将来的には阻害剤等を用いてミトコンドリアの代謝機能を実際に測定する必要があると考えられる。

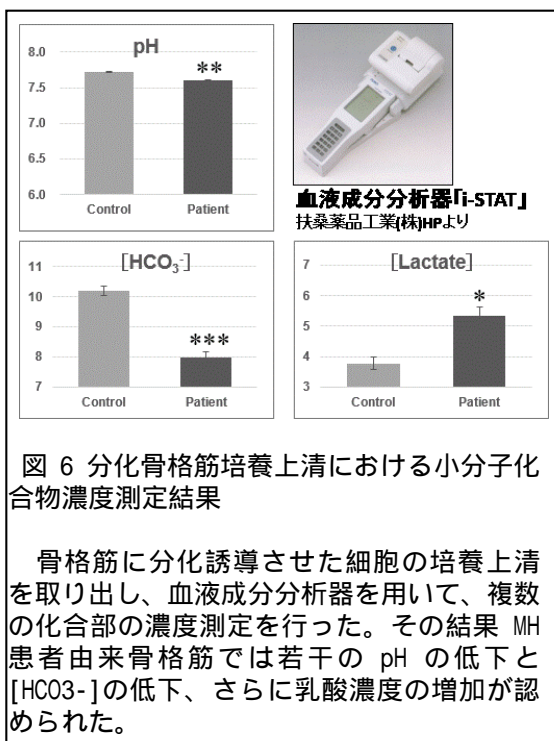


図 6 分化骨格筋培養上清における小分子化合物濃度測定結果

骨格筋に分化誘導させた細胞の培養上清を取り出し、血液成分分析器を用いて、複数の化合物の濃度測定を行った。その結果 MH 患者由来骨格筋では若干の pH の低下と [HCO₃⁻] の低下、さらに乳酸濃度の増加が認められた。

なし

(3) 連携研究者

岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授
研究者番号: 60160694

(4) 研究協力者

なし

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 浩 (MORISAKI, Hiroshi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授
研究者番号: 60182226

(2) 研究分担者