

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08234

研究課題名(和文) ウェルナー症候群由来iPS細胞を用いた病態解析と治療技術の開発

研究課題名(英文) Pathological analysis and therapeutic development for Werner syndrome by disease-specific iPSCs.

研究代表者

嶋本 顕 (Shimamoto, Akira)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：70432713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルナー症候群(Werner syndrome, WS)は20代から加齢疾患を加速的に発症する遺伝性早老症である。我々は初期化がWS細胞の早期老化に及ぼす影響を明らかにし、WSの病態解明ならびに新たな治療法の確立を目指して、WS患者細胞からiPS細胞を樹立した。WS iPS細胞は正常iPS細胞と同様に未分化性を獲得し分化多能性を示した。一方、WS iPS細胞由来間葉系幹細胞(MSC)は正常MSCと比較して、老化関連遺伝子の発現上昇、テロメアの短縮、DNA損傷応答の増強などを示し、早期細胞老化が示唆された。本成果で得られた基盤的知見により、MSCを標的とした治療法開発のアプローチが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェルナー症候群は種々の加齢疾患を20代より加速的に発症する遺伝的早老症で、症状は全身性で皮膚萎縮・硬化、インスリン耐性糖尿病、骨粗鬆症、動脈硬化、悪性腫瘍など多岐にわたる。病態解明や治療法確立には原因となる細胞種を明らかにすることが必要不可欠であり、本疾患の病態を表現する細胞種をMSCとして同定したことは、学術的にも応用の見地からも大いに意義がある。またウェルナー症候群は世界的には日本での症例報告が圧倒的に多く、老化の病態が間葉系幹細胞の老化であることを明らかにした本研究の社会的意義は非常に大きく、間葉系幹細胞を用いた加齢疾患に対する再生医療の可能性の扉を開くものである。

研究成果の概要(英文)：Werner syndrome (WS) is a genetic disorder characterized by early onset of age-related diseases. In this study, we established WS-iPSCs toward elucidation of an effect of reprogramming on premature senescence of WS cells, and elucidation of pathology of WS and therapeutic development for WS. WS-iPSCs acquired undifferentiated state and showed pluripotency as is the case in normal iPSCs. On the other hand, mesenchymal stem cells (MSCs) derived from WS-iPSCs (WS-MSCs) showed upregulation of senescence-associated genes, telomere shortening, enhancement of DNA damage response, when compared with normal MSCs, which is suggesting premature senescence phenotype in WS-MSCs. These basic findings may provide the possibility of a new approach for therapeutic development based on MSCs for WS.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：早老症 細胞老化 間葉系幹細胞 ウェルナー症候群 多能性幹細胞 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群(WS)は20代から白内障、白髪、皮膚萎縮、糖尿病、骨粗鬆症、動脈硬化、悪性腫瘍など、加齢にともなう疾患を加速的に発症し、50歳前後で死亡する早老症である。治療は対症療法で、現在まで根治に至る療法は開発されておらず、白内障以外は治療に難渋する。WSの原因遺伝子であるWRNヘリカーゼはDNA修復に働き、患者細胞では、テロメアの機能不全により早期細胞老化を引き起こす。WSの種々の症状は、組織細胞の分裂寿命低下による組織の機能破綻が原因と考えられ、皮膚潰瘍や動脈硬化などから、MSCの早期老化による「幹細胞の疾患」である可能性が考えられる。

MSCは全身の間葉系組織に存在し、骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など多くの中胚葉系細胞に分化する能力をもつ。中でも骨髄由来MSCは、神経細胞や肝細胞、血管内皮細胞など外胚葉や内胚葉由来の細胞へ分化することが報告されており、再生医療にも応用されている。さらにMSCが全身性に組織の再生を担っている可能性が示唆されており、ヒトの個体老化には全身的なMSCの老化が関係していると考えられる。ウェルナー症候群患者でも全身性のMSCの早期老化が関係している可能性がある。

2. 研究の目的

患者細胞はテロメア機能不全により早期老化を呈するが、WS-iPSは健常者iPS細胞と同様に分化多能性と無限分裂能を有し、分化誘導とともに早期老化を呈することから、WSの病態は分化によるテロメラーゼ活性の減少と密接に関係している。本研究はウェルナー症候群患者由来iPS細胞を用いてMSCを分化誘導し、その性状を解析することによって、WSの病態発症機序の解明と細胞移植治療に関する基礎的知見の収集を目的とする。

具体的にはMSCの早期老化が、皮膚潰瘍や動脈硬化などのWSの臨床症状の原因であるという仮説のもとに、患者iPS細胞から間葉系幹細胞(WS-MSC)を分化誘導し、分裂寿命・テロメア維持及びエピゲノム・遺伝子発現プロファイリングについて検証し、ウェルナー症候群の分子病態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の評価に耐えうる患者細胞由来iPS細胞(WS-iPS細胞)を複数株樹立し、性状解析を通じて正常iPS細胞と比較した。患者細胞として提供を受けた末梢血単核球を用い、iPS細胞の樹立にはセンダイウイルスベクターを用いた。MSCの誘導にはコラーゲン基質をベースとした分化誘導法を検討し、最終的にはコラーゲンフィブリルを基質とした方法を一部改変し、培養液には血清含有DMEMを用いた。分化誘導の過程でとくにアポトーシスを激しく誘導するiPS細胞においては、ROCKインヒビターを用いるなど若干の変更を加えて対応した。WS-iPS細胞からMSC(WS-MSC)を誘導し、WS-MSCの細胞分裂能力、テロメア長、DNA損傷応答や種々の細胞老化関連遺伝子の発現及びエピゲノム・遺伝子プロファイルを調べ、正常iPS細胞由来MSCと比較した。

4. 研究成果

コラーゲンフィブリルを基質とした方法を一部改変して、WS-iPS細胞と正常iPS細胞からMSCを分化誘導した。そして得られたMSC様細胞において、MSC特異的マーカーであるCD73、CD90、CD105については細胞集団の90%以上が陽性であり、さらに血球系幹細胞マーカーであるCD34、CD45が陰性であることをFACSにて確認した。さらに、間葉系幹細胞の分化能の指標である骨、軟骨、脂肪細胞への分化能について検討したところ、得られた全てのMSC様細胞から骨、軟骨、脂肪細胞を誘導することができた。以上の結果から、WS-iPS細胞は正常iPS細胞と同様にMSCへの分化能を保持しており、WS-MSCは正常iPS細胞由来MSCと同等のMSCへの分化能を有することが明らかとなった。

さらに分裂加齢がWS-MSCに及ぼす影響について検討した。その結果、MSCへの分化とその後の継代により、WS-MSCは正常MSCと比較して分裂寿命が短く、老化関連遺伝子やSenescence-associated secretory phenotype(SASP)遺伝子の発現上昇、テロメアの短縮、および老化関連ガラクトシダーゼ(SA-β-gal)染色陽性細胞の増加、DNA損傷応答の増強、エピゲノムの変化などを示し、早期細胞老化が示唆された。WS-MSCと正常MSCのRNAシークエンスを行い比較したところ、WS-MSCで2倍以上の高発現となった遺伝子が53個で、2分の1以下の低発現となった遺伝子が50個見いだされた。GO解析の結果から、WSの病態に関わると思われる、細胞外マトリックスやコラーゲン代謝、骨分化や老化に関わる経路が明らかとなり、WSの病態とこれらの生物学的経路との関連が示唆された。

また、ゲノム編集により正常iPS細胞からWRN遺伝子をノックアウトしたWRN-KO iPS細胞を樹立することに成功し、WRN-KO iPS細胞から分化誘導したMSCは、WS-MSCと同様に、分裂寿命の短縮や老化関連遺伝子の発現上昇などの早期老化の表現型を示した。

本研究結果からウェルナー症候群由来iPS細胞を用いた分化誘導により、間葉系幹細胞において疾患の病態を明らかにすることができた。さらにゲノム編集等の技術を用いて、病態の根源とされる間葉系幹細胞の変異遺伝子の修復により移植治療が有効である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Tsuge K, Inazumi T, Shimamoto A, Sugimoto Y (2019) Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. International Immunology 査読有 10.1093/intimm/dxz021.
2. Abd El-Hafeez AA, Hosoi T, Nakatsu K, Thon M, Shimamoto A, Tahara H, Ozawa K (2018) TERT enhances the survival rate of human fibroblasts under endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and lysosomal stresses. Biotechnology Letters 40. 915-922 査読有 10.1007/s10529-018-2544-1.
3. Kotaka Shinji, Wakitani Shigeyuki, Shimamoto Akira, Kamei Naosuke, Sawa Mikiya, Adachi Nobuo, Ochi Mituo (2017) Magnetic Targeted Delivery of Induced Pluripotent Stem Cells Promotes Articular Cartilage Repair. Stem Cells Int. 査読有 10.1155/2017/9514719
4. Hosoi T, Nakatsu K, Shimamoto A, Tahara H, Ozawa K. (2016) Inhibition of telomerase causes vulnerability to endoplasmic reticulum stress- induced neuronal cell death. Neurosci Lett. 629. 241-244. 査読有 10.1016/j.neulet.2016.07.027

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 嶋本 顕, 矢野公義, 木根原匡希, 田原栄俊 (2017) ドキシサイクリン誘導性リプログラミングシステムを用いたがん幹細胞の休眠・再発モデル . 日本がん分子標的治療学会第 21 回学術集会
2. 嶋本 顕, 田原栄俊 (2017) Dox 誘導性がん幹細胞モデルによって誘導されるがん休眠状態は BMP シグナル経路によって維持される . 第 76 回日本癌学会学術総会
3. 嶋本 顕, 矢野公義, 香川晴信, 木根原匡希, 濱田充子, 岡本哲治, 田原栄俊 (2018) テトラサイクリン誘導性リプログラミングシステムを用いたがん幹細胞の休眠・再発モデル . 日本組織培養学会第 90 回大会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横手 幸太郎

ローマ字氏名：Koutaro Yokote

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。