

平成 30 年 4 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19654

研究課題名(和文) iPS細胞技術を駆使したGM1ガングリオシドーシス新規治療薬開発

研究課題名(英文) Drug Development for GM1 Gangliosidosis using the patients-derived iPS cells

研究代表者

梶原 隆太郎 (Kajihara, Ryutaro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・助教

研究者番号：00738221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：GM1ガングリオシドーシス患者由来iPS細胞を作成し、神経系細胞へと分化させることによって、in vitroで病態を解析することができる細胞モデル系を確立した。誘導した患者神経系細胞では、健康者に比べてGM1の過剰な蓄積がみられ、また、神経伝達物質の放出能が低下していることを見出した。本疾患の治療薬候補を探索する目的で、患者神経幹細胞とイメージングサイトメトリー法を組み合わせたハイスループット薬剤スクリーニング系を確立し、細胞内のGM1蓄積を抑制する化合物を数個同定した。私たちの構築した疾患モデルは、本疾患の病態解析および治療薬開発に非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：GM1 gangliosidosis is a type of lysosomal storage disease, which is caused by lack of lysosomal β -galactosidase activity, leading to progressive neurodegeneration due to massive accumulation of GM1 ganglioside in the brain. Here, we generated the GM1 gangliosidosis-derived iPSCs to elucidate the pathological mechanisms of neural dysfunction under the disease and to find new drug candidates. Neurons from the patients-derived iPSCs exhibited the GM1 ganglioside accumulation and impaired pre-synaptic function. High throughput drug screening system using the patient-derived neural cells found two compounds as novel drug candidates. These could significantly reduce GM1 ganglioside accumulation in vitro and in vivo, and restored the presynaptic dysfunction in the patient-derived neurons. Our findings demonstrated the potential value of the patients-derived iPSC lines for the cellular model of GM1 gangliosidosis and that two compounds are the potential candidates as drugs in the future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：GM1ガングリオシドーシス

1. 研究開始当初の背景

GM1 ガングリオシドーシスはライソソーム病の1つであり、**GM1** ガングリオシドの加水分解に関与するライソソーム酵素である β -ガラクトシダーゼ(β -gal)の欠損・異常によって、**GM1** ガングリオシドが特に神経系(脳)に蓄積してしまう先天性代謝異常症である。発症頻度は1/10万~20万人とされており、発症時期と臨床経過により、乳児型、若年型、成人型に分類される。特に乳児型は生後3~6ヶ月までに発達の遅れが見られ、生後1年を過ぎるまでにほとんどの患児が、除脳硬直など重度の神経障害を示すようになり、通常3~4歳までに死亡する。治療として骨髄移植も試みられているが、効果は乏しい。脳の構造上、患者の病変部に外部からアクセスし病態を解析することが非常に困難であるため、本疾患の病態解析および薬剤開発が遅れており、現在のところ有効な治療薬がなく特定疾患として難病指定されている。したがって、本疾患の病態解明および治療薬の開発が必要不可欠であり、iPS細胞の特性を利用した研究・薬剤開発により、患者の延命・QOLの向上に貢献できる。

GM1 ガングリオシドは主に神経系に存在・蓄積するため、本疾患の病態解析・薬剤開発には神経系細胞を用いる必要がある。しかし、患者の病変部から神経細胞を採取し、病態を解析することは非常に困難である。また、マウスなどの既存の疾患モデルやモデル細胞株を用いた薬剤スクリーニングにおいて高い有効性を示した薬剤であっても、種の違い、原因遺伝子の過剰発現・欠失による人工的な表現型などの理由により、実際の臨床治験の際には、効果が不十分な場合や強い副作用などがみられることがある。申請者らはヒト患者からiPS細胞を樹立し神経系細胞へと分化させることによって、いままで困難であったヒト患者神経系細胞を*in vitro*で解析でき、種の違い・人工的な表現型等の問題を起こしにくいスクリーニング系を構築しようと考えた。

まず、**GM1** ガングリオシドーシス患者由来の皮膚線維芽細胞にセンダイウイルスベクターを用いてリプログラミング因子(KLF4, OCT3/4, SOX2, c-MYC)を導入し、患者由来iPS細胞を作製した。このiPS細胞をGibco® PSC Neural Induction Mediumを用いて神経幹細胞(NSC)へと分化誘導した。NSCはニューロンに比較し、①細胞質部分が広いため、ライソソームに蓄積した**GM1** ガングリオシドが顕微鏡下で観察しやすい。②細胞分裂・細胞増殖を活発に行うため、多くの細胞数を確保でき、ハイスループットに多くの薬剤プレートに細胞を播種できる。③物理的・酸化的ダメージに強く、培養時や染色時にウェルのコート面から細胞が剥がれにくい。④一度iPS細胞から誘導したNSCは凍結保存することができるため、分化誘導時間を短縮することができる。これらの理由に

より、終末分化させたニューロンよりもNSCの方がハイスループットスクリーニングに適している。

健康者および患者由来NSCを96ウェルプレートに播種し、化合物ライブラリーを各ウェルに添加し72時間培養した。その後、細胞固定・膜透過処理を行い、FITC標識CTB(CTB:コレラ毒素Bサブユニット;**GM1** ガングリオシドと特異的に結合する)を用いて細胞内**GM1** ガングリオシドを蛍光染色した。各ウェルの蛍光強度をイメージングサイトメーター(IN Cell Analyzer 6000)を用いて画像取得し、IN Cell Developer Toolboxプロトコルを用いて自動解析・定量を行った。計2070種類の化合物スクリーニングによって**GM1**蓄積を軽減する作用を持つ2つの化合物(化合物Xおよび化合物Y)を発見した。

2. 研究の目的

本研究では、発見した候補化合物の**GM1** ガングリオシドーシス新規治療薬としての有効性およびメカニズムを探るために、次の3つの実験系を用いて評価を行う。①患者NSCから分化させたニューロンを用いた*in vitro*での評価系において、化合物処理時における**GM1** ガングリオシド蓄積および細胞機能を評価する。②**GM1** ガングリオシドーシスモデルマウス(β -gal^{-/-})を用いた*in vivo*での評価系において、候補化合物の有効性を解析する。③化合物処理した患者由来ニューロンおよびマウス脳組織における遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、候補化合物の作用メカニズムについても探る。

3. 研究の方法

本研究は、大きく分けて次の3点からなる。①治療薬候補のニューロンに対する有効性を確認するために、患者NSCから分化させたニューロンを候補薬剤で処理して同様に**GM1** ガングリオシドの蓄積が減少するか、また、FM1-43を用いてニューロンの細胞機能が改善するかを*in vitro*で調べる。②候補薬剤の*in vivo*での効果について明らかにするため、モデルマウス(β -gal^{-/-})に候補薬剤を投与後、脳内**GM1** ガングリオシド量を定量し、*in vivo*でも**GM1** ガングリオシド蓄積を軽減する作用があるかを調べる。③患者由来ニューロンおよびモデルマウス脳組織の化合物処理時の遺伝子発現を網羅的に解析し、薬剤がどのような経路に影響しているかを調べる。

【① 治療薬候補の患者ニューロンに対する*in vitro*での有効性の評価】

健康者および患者由来iPS細胞から誘導したNSCを、Neuronal Differentiation Medium (Neurobasal® medium with B-27® Serum-Free Supplement and GlutaMAX™-I Supplement)を用いてニューロンへと分化させる。

(1) LC-MSを用いた**GM1**量の測

定
前述の通り、ニューロンは細胞質部分が狭く、CTB 染色にてライソソームに蓄積した GM1 を定量することが困難である。そこで、ニューロンの GM1 ガングリオシド測定においては LC-MS を用いる。ニューロンを候補薬剤で処理後、細胞を回収し、Svennerholm and Fredman の抽出法に基づいてスフィンゴ脂質を分画・精製し、試料とする。この試料を Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS にて定量し、ニューロンにおいても、候補薬剤が GM1 ガングリオシド蓄積を抑制する効果があることを確認する。

(2) FM1-43 を用いたニューロン機能の評価

FM1-43 は、脂質二重膜を可逆的に染める蛍光色素で、シナプス前終末の機能や分泌現象の計測に活用されている。これを用いて、化合物処理時の開口放出能(神経伝達物質放出能)を測定する。この系を用いて健常者および患者由来ニューロンを比較したところ、患者由来ニューロンでは、開口放出能が低下していることを見出している。そこで、化合物処理によって、この開口放出能の低下を是正することができるかを調べる。

(3) オートファジーマーカーによる細胞機能の評価本疾患のみならず、多くのライソソーム病にてオートファジーの異常が報告されている。健常者に比較し、本疾患患者由来ニューロンではオートファジーマーカーである LC3 が過剰に発現していることを確認している。そこで、化合物処理によって、このオートファジーの異常を是正することができるかを調べる。

【②モデルマウス(β -gal^{-/-})を用いた in vivo での治療薬候補の有効性の評価】

LC-MS を用いた脳内ガングリオシド量の測定モデルマウスに治療薬候補を投与後、脳内ガングリオシド量を前述の LC-MS を用いて定量し、in vivo でも GM1 ガングリオシド蓄積を軽減する作用があるかを調べる。

【③候補化合物の作用点についての探索】

化合物処理後の遺伝子発現変化の網羅的解析

候補化合物で処理あり・なし後の患者由来ニューロン、およびモデルマウスに投与あり・なし後の脳組織を採取し、トータル RNA を抽出する。この RNA を、RT-qPCR を用いて、化合物処理あり・なしで、発現量に差ある遺伝子群を解析し、候補化合物がどのような遺伝子群に影響しているのかを探索する。

4. 研究成果

まず in vivo 系においては、BKOマウスに新規治療薬候補化合物を7日間腹腔内投与後、脳をサンプリングし、ガングリオシドを抽出、LC-MS を用いて定量した。投与したマウス群は、コントロールのマウス群に比べ、

有意な GM1 ガングリオシド量の減少がみられた。

このことから、我々が発見した候補化合物は、マウスの血液脳関門を通過し、脳内に過剰に蓄積した GM1 ガングリオシド量を低下させることが分かった。

次に、FM1-43 を用いた患者ニューロンのシナプス前終末の機能に候補化合物が影響するかを調べた。患者 iPS 細胞から神経幹細胞まで分化させ、さらにこれらの細胞をニューロンまで誘導させる。ニューロンまで分化させる際、候補化合物を添加しながら分化誘導させるものと、添加せずに誘導するものと分け、60日間培養した。その後、FM1-43 で処理し、シナプス前終末の機能を解析した。その結果、化合物未処理の患者ニューロンは健常者ニューロンに比べ開口放出能が低下しているが、化合物処理を行った者ニューロンは健常者ニューロンと同程度までシナプス前終末の機能が回復していた。このことから、我々が発見した候補化合物は、患者ニューロンの機能までも回復させることが分かった。

次に、候補化合物の処理あり・なしで GM1 ガングリオシドの生合成・分解にかかわる酵素群を網羅的に mRNA レベルで発現量を調べたところ、NEU1 および β -GLU とよばれる分解酵素の発現が候補化合物の処理によって増加することが分かった。さらに NEU1 および β -GLU の酵素活性を測定したところ、候補化合物の処理によって増加することが分かった。このことから、候補化合物の作用メカニズムのひとつとして、ガングリオシド系の分解経路の酵素である NEU1 および β -GLU を増加させることによって、GM1 ガングリオシドを減少させていることが分かった。

さらに、GM1 ガングリオシドシスを含む多くのライソソーム病で報告のあるオートファジーの異常について、候補化合物の処理あり・なしによって調べたところ、候補化合物の処理によってオートファジーが促進されていることも分かった。

これらのことから、有効性を見出した候補化合物は、ガングリオシド系の分解経路の酵素の発現上昇およびオートファジーの促進という2つのメカニズムを介して作用をしているということが示唆された。

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)

[学会発表] (計7件)

①梶原隆太郎, 江良沢実

GM1 ガングリオシドシス患者由来 iPS 細胞を用いた薬剤開発

第59回日本先天代謝異常学会総会・併催:

第15回アジア先天代謝異常症シンポジウム

2017年10月12日 埼玉

②城戸淳, 沼川忠広, 松本志郎, 小高陽樹, 曾我美南, 梶原隆太郎, 遠藤文夫, 中村公俊, 江良択実

ゴーシェー病 II 型患者由来の iPS 細胞を使用した薬剤スクリーニングシステムの開発
第 59 回日本先天代謝異常学会総会・併催:
第 15 回アジア先天代謝異常症シンポジウム
2017年10月12日 埼玉

③小高陽樹, 沼川忠広, 曾我美南, 城戸淳, 梶原隆太郎, 奥宮敏可, 古谷博和, 井上貴文, 江良択実

シアリドーシス患者 iPS 細胞を用いた神経障害の病理学的解析
第 59 回日本先天代謝異常学会総会・併催:
第 15 回アジア先天代謝異常症シンポジウム
2017年10月12日 埼玉

④Ryutaro Kajihara, Takumi Era

Drug screening for GM1 gangliosidosis using the patient-derived iPS cells
第 15 回幹細胞シンポジウム 2017年5月26日 東京

⑤梶原隆太郎, 江良択実

GM1 ガングリオシドーシス患者 iPS 細胞を用いた疾患モデルおよび薬剤スクリーニング
第 16 回日本再生医療学会総会 2017年3月7日 仙台

⑥梶原隆太郎, 江良択実

ガングリオシドーシス患者由来 iPS 細胞を用いたハイスループット 薬剤スクリーニング系の構築
第 89 回日本生化学会大会 2016年9月25日 仙台

⑦前田茜, 梶原隆太郎, 乾誠治

B 細胞レセプター刺激による細胞のアポトーシスシグナル伝達機構 の解析
第 89 回日本生化学会大会 2016年9月25日 仙台

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

①名称: GM1 ガングリオシドーシス予防剤又は治療剤、及び GM1 ガングリオシドーシス予防用又は治療用組成物

発明者: 梶原隆太郎、江良択実

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2017-254888

出願年月日: 平成 29 年 1 2 月 2 8 日

国内外の別: 国外

②名称: アルツハイマー病予防剤又は治療剤、そのスクリーニング方法、アルツハイマー予防用又は治療用組成物、及びアルツハイマー

病モデル動物

発明者: 梶原隆太郎、江良択実

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2017-254887

出願年月日: 平成 29 年 1 2 月 2 8 日

国内外の別: 国外

③名称: 先天代謝異常症由来 iPS 細胞を使った神経変性疾患の新規薬剤スクリーニング法

発明者: 梶原隆太郎、江良択実

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2016-166377

出願年月日: 平成 28 年 8 月 2 9 日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 隆太郎 (KAJIHARA, Ryutaro)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 00738221

(2) 研究協力者

江良 択実 (ERA, Takumi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号: 00273706

沼川 忠広 (NUMAKAWA, Tadahiro)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号: 40425690

遠藤 文夫 (ENDO, Fumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 00176801

松本 志郎 (MASTUMOTO, Shirou)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70467992