

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16253

研究課題名(和文) 乳児型Pompe病患者iPS細胞を用いた多系統組織モデルの確立ならびに病態解析

研究課題名(英文) Establishment of a multi-lineage model of infantile Pompe disease using patient-derived iPSCs

研究代表者

吉田 健司 (Yoshida, Takeshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50790557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Pompe病(糖原病II型)は、ライソゾーム酵素の一つである酸性 α -グルコシダーゼの先天的欠損により、筋肉(特に骨格筋)、肝臓、心臓にグリコーゲンが蓄積する遺伝性疾患である。本研究では、重症型である乳児型Pompe病患者3人および健常対象者3人のiPS細胞(iPSC)を作成し、それぞれを骨格筋細胞と肝臓細胞に分化誘導し、病態解析を行った。骨格筋と肝臓という2組織において、患者iPSC由来の細胞ではライソゾーム内のグリコーゲン蓄積を認めた。以上から、乳児型Pompe病患者由来のiPS細胞を用いて、薬剤スクリーニングや病態解析に有用な複数臓器モデルの確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pompe病は筋肉(特に骨格筋)、肝臓、心臓などの臓器にグリコーゲンが蓄積する希少難病である。本研究では、Pompe病患者から作成したiPS細胞を用いて、筋肉と肝臓での病態を実験室レベルで再現することに成功した。このiPS細胞由来病態モデルを利用することで、これまでになかった新しい薬剤の発見や、臓器別の病態解明が期待できる。Pompe病以外の様々な希少難病にも応用可能なアプローチであり、希少難病研究の発展にも寄与することも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Pompe disease (glycogen storage disease type II) is a hereditary disease, caused by a defect of a lysosomal enzyme, acid α -glucosidase, and is characterized by lysosomal glycogen accumulation primarily in the skeletal muscle, liver, and heart. In this study, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from three patients with infantile-onset Pompe disease (IOPD) and three healthy controls, and differentiated them into muscle cells and liver cells. Differentiated cells showed lysosomal glycogen accumulation, the hallmark of Pompe disease. In conclusion, we succeeded in *in vitro* recapitulation of both skeletal muscle and liver phenotypes of IOPD using patient-derived iPSCs. We expect our modeling system will help elucidate more details of disease mechanism or establish an efficient drug-screening platform.

研究分野：小児神経学

キーワード：Pompe病 iPS細胞 疾患モデル 神経筋疾患 骨格筋 肝臓 糖原病

1. 研究開始当初の背景

Pompe 病 (糖原病 II 型) はライソゾーム酵素である酸性 α -グルコシダーゼ (GAA) が先天的に欠損することで、全身の組織にグリコーゲンが蓄積するライソゾーム蓄積病の一つである。発症時期によって乳児型と遅発型に分類される。酵素が完全に欠損している乳児型では、出生直後から全身の筋力低下、心不全、肝腫大を来し、無治療では全例が 2 歳までに死亡する (Kishnani PS et al. *J Pediatr*, 2006)。遅発型は比較的軽症で、筋力低下が緩徐に進行し、歩行困難や人工呼吸器依存状態となる。唯一の治療法であるヒト遺伝子組換え GAA による酵素補充療法により、乳児型の生命予後は劇的に改善したが、心筋や肝臓への効果に比べ、骨格筋症状への効果は不十分である (Kishnani PS et al. *Neurology*, 2007)。これらのことから、臓器によって病態が異なる可能性が示唆される。また、ライソゾーム内へのグリコーゲン蓄積がどのように組織障害を引き起こすかの機序も詳細には判明していない。

2. 研究の目的

本研究では、乳児型 Pompe 病患者 iPS 細胞から、骨格筋、心筋、肝細胞を分化誘導し、同一クローンからの多系統組織モデルを作成する。そのモデルを用いて、乳児型 Pompe 病の組織毎の病態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

非血縁の乳児型 Pompe 病患者 3 名 (Pom1-3) と健常者 3 名 (Ctrl-3) から、それぞれ 2 クローンずつ (a, b) の iPS 細胞を既に樹立済みであり、染色体核型解析、未分化性 (未分化マーカーの発現)、三胚葉分化能についても既に確認済みである。まず、京都大学 iPS 細胞研究所櫻井研究室において既に確立された MyoD1 (筋分化マスター調節因子) の強制発現法での筋細胞分化を行った (Tanaka A et al. *PLoS One*, 2013)。この方法により、約 10 日間という短期間で、十分量の成熟した筋細胞を得ることができる。次に、京都大学 iPS 細胞研究所山中研究室において最適化されたプロトコルを一部修正し、肝細胞分化誘導を行った (Kajiwara M et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012)。

分化誘導した組織において、ライソゾーム内グリコーゲンの蓄積を評価した。定性的な評価として多糖類染色である PAS 染色、ライソゾームマーカーである LAMP2 による免疫染色、ライソゾーム構造解析のための電子顕微鏡での評価を行った。定量的な評価として測定キットを用いてグリコーゲン定量を行った。さらに、培地中に遺伝子組み換えヒト GAA を加え、組織毎の治療反応性を比較した。筋細胞においてはライソゾームに関する細胞内病態評価のために、mTORC1 活性、ミトコンドリア機能、オートファジー機能の解析や、トランスクリプトームおよびメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

iPS 細胞から骨格筋および肝臓への分化誘導を行い、組織特異的なマーカーの確認を行った。筋細胞分化では 70~95%の誘導効率、肝細胞分化では 40~80%の誘導効率であり、肝細胞誘導ではクローン間の誘導にややばらつきを認めた。

次に、誘導した細胞において Pompe 病病態の評価を行ったところ、筋細胞 (図 1) および肝細胞 (図 2) いずれにおいても、患者由来細胞ではライソゾーム内のグリコーゲン蓄積を認めた。さらに、酵素補充療法により濃度依存性にグリコーゲン蓄積が改善することを確認できた。これらのことから、患者 iPS 細胞を用いて、骨格筋と肝臓の 2 系統における乳児型 Pompe 病の *in vitro* 病態モデルの確立に成功した。

これらの病態モデルを用いて、創薬スクリーニングや臓器別のさらなる病態解明が進むことが期待される。また、骨格筋モデルの細胞内病態解析の結果、患者 iPS 細胞由来筋細胞において、mTORC1 活性低下、その下流シグナル障害、細胞内エネルギー代謝悪化の所見が得られた。これらの mTORC1 を介したライソゾーム関連シグナルの変化が Pompe 病の病態に関与している可能性が示唆された。

以上の研究成果は論文として英文誌に掲載された (Yoshida T et al. *Sci Rep*, 2017; Yoshida T et al. *Front Cell Dev Biol*, 2019)。

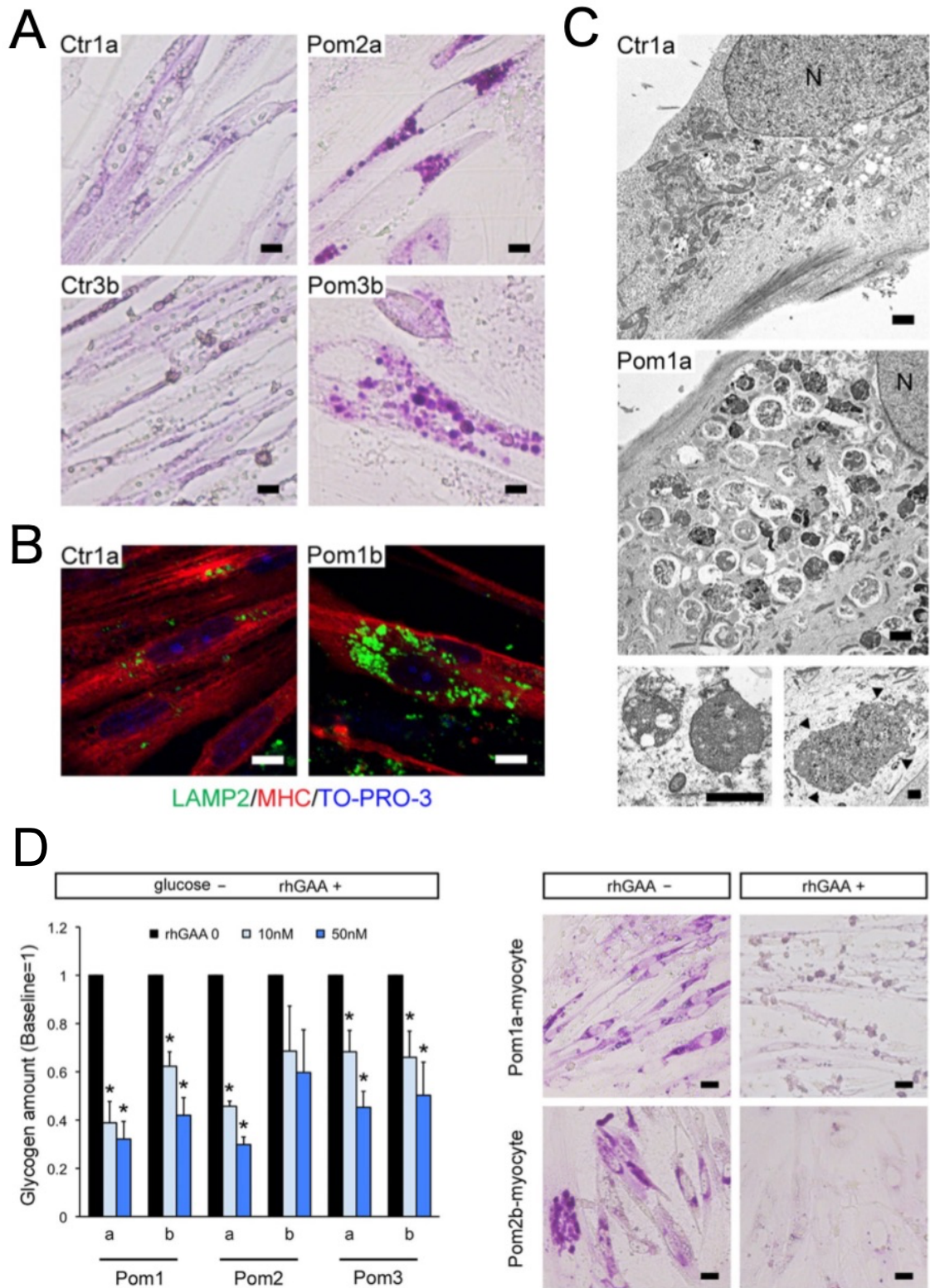


図1：患者 iPS 細胞由来の筋細胞におけるライソゾーム内のグリコーゲン蓄積。A：PAS 染色（スケールバー=10 μ m）、B：免疫染色（スケールバー=10 μ m）、C：電子顕微鏡写真（N：核、矢頭：グリコーゲンが蓄積したライソゾーム、スケールバー=1 μ m）。D：酵素補充療法によるグリコーゲン量変化率（左）と PAS 染色（右、スケールバー=20 μ m）（rhGAA：遺伝子組み換えヒト GAA）。

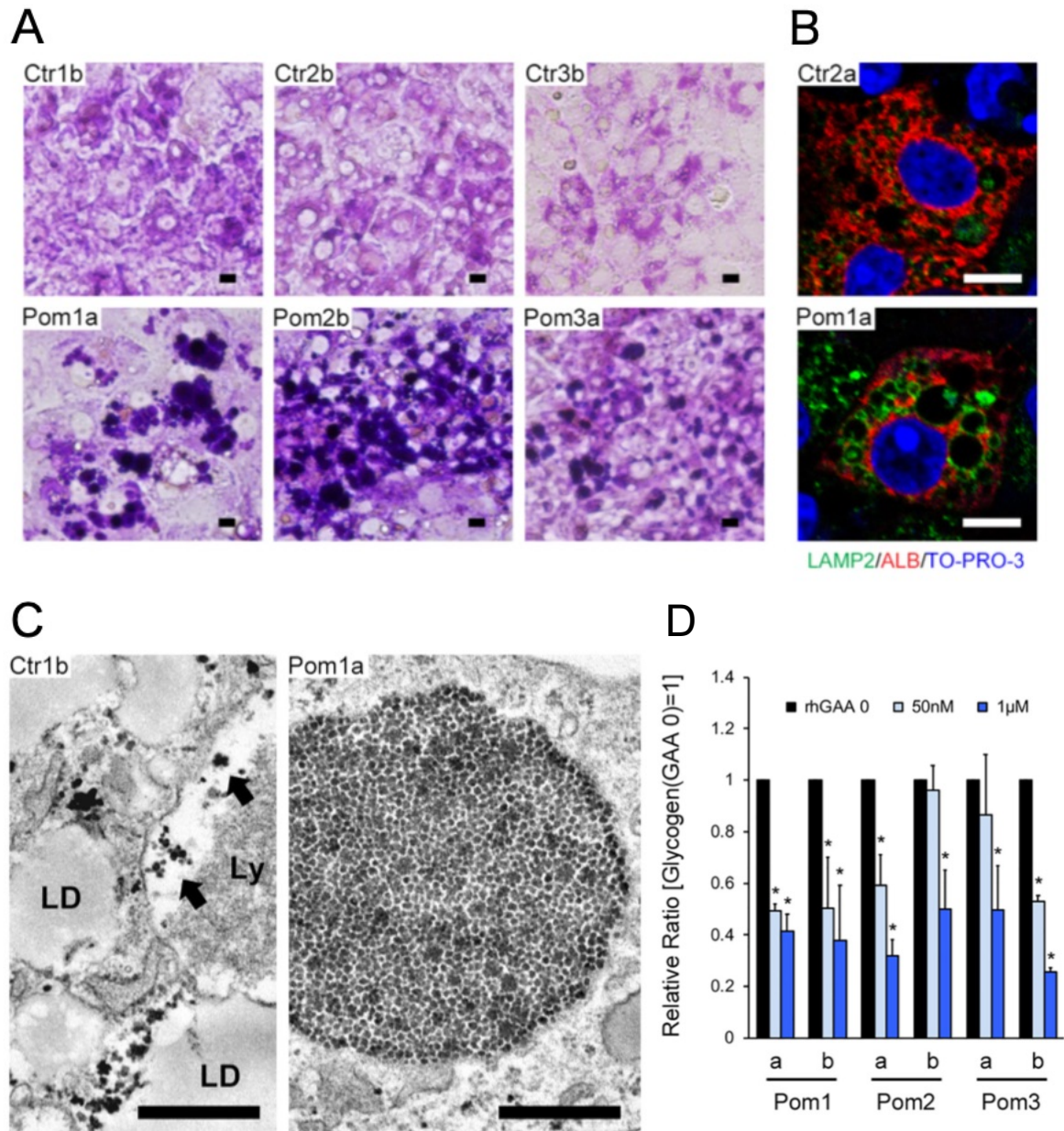


図2：患者 iPS 細胞由来の肝細胞におけるライソゾーム内のグリコーゲン蓄積。A：PAS 染色（スケールバー=10 μ m）、B：免疫染色（スケールバー=10 μ m）、C：電子顕微鏡写真（LD：脂肪滴、Ly：ライソゾーム、矢印：グリコーゲン顆粒、スケールバー=500nm）、D：酵素補充療法によるグリコーゲン量変化率（rhGAA：遺伝子組み換えヒト GAA）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeshi Yoshida, Tatsuya Jonouchi, Kenji Osafune, Junko Takita & Hidetoshi Sakurai	4. 巻 7
2. 論文標題 A Liver Model of Infantile-Onset Pompe Disease Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2019.00316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Yoshida, Tomonari Awaya, Tatsuya Jonouchi, Ryo Kimura, Shigemi Kimura, Takumi Era, Toshio Heike & Hidetoshi Sakurai	4. 巻 7
2. 論文標題 A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset Pompe Disease with Patient-specific iPS Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-14063-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiro Baba, Daisuke Yoshinaga, Kentaro Akagi, Koichi Matsuda, Atsushi Yokoyama, Takeshi Yoshida, Takuya Hirata	4. 巻 82
2. 論文標題 Enzyme Replacement Therapy Provides Effective, Long-Term Treatment of Cardiomyopathy in Pompe Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 3100-3101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-0449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi YOSHIDA, Tomonari AWAYA, Tatsuya JONOUCHI, Ryo KIMURA, Shigemi KIMURA, Takumi ERA, Kanako MAIZURU, Masatoshi NAKATA, Atsushi YOKOYAMA, Hidetoshi SAKURAI, Toshio HEIKE
2. 発表標題 A skeletal muscle model of infantile-onset Pompe disease using patient-specific iPS cells
3. 学会等名 第60回日本小児神経学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi YOSHIDA, Tomonari AWAYA, Tatsuya JONOUCHI, Ryo KIMURA, Shigemi KIMURA, Takumi ERA, Hidetoshi SAKURAI, Toshio HEIKE
2. 発表標題 Modeling Infantile-onset Pompe Disease with Patient iPSCs Reveals Disturbed mTORC1 Signaling as an Early Pathogenesis of the Skeletal Muscle Damage
3. 学会等名 The 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考