

令和元年6月17日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16711

研究課題名(和文) DM1疾患特異的iPS細胞とスプライシングレポーターを用いた治療薬スクリーニング

研究課題名(英文) Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPS cells and splicing reporter for drug screening

研究代表者

加門 正義 (Kamon, Masayoshi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第五部・流動研究員

研究者番号：90557224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：I型筋強直性ジストロフィー(DM1)では、DMPK遺伝子の非翻訳領域に存在するCTGトリプレット配列が異常に伸長することでスプライシングに異常が生じ、骨格筋などに障害が起こる。本研究では、DM1患者由来iPS細胞を樹立し、tet-on-MYODを導入してDoxycycline添加で骨格筋細胞へと分化を可能とした。さらに、それらの細胞にスプライシング異常をモニタリングするレポーターを導入し、イメージングサイトメーターでのハイスループットな解析を行えるようにして、DM1におけるスプライシング異常を回復する薬剤をスクリーニングできる系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでもDM1の治療薬を開発するために薬剤スクリーニングが行われてきたが、未だ有効な治療薬が見つかっていないのが現状である。本研究では、DM1患者由来のiPS細胞から分化誘導した骨格筋細胞がスプライシング異常という病態を再現していることを示し、治療薬のスクリーニングにヒトiPS細胞が有用であることを明らかにした。さらに、新たにスプライシングの状態をモニタリングするレポーターを開発し、ハイスループットな治療薬のスクリーニングができる系を確立したことで、これまでのスクリーニングで得られなかった新たな治療薬を開発できる道筋を開いた。

研究成果の概要(英文)：Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is triplet repeat disease caused by expanded CTG triplet repeat in the 3' untranslated region of the DMPK gene. And, abnormal splicing is caused by expanded CTG triplet repeat. In this study, DM1 patient-derived iPS cells (DM1-iPSCs) was established. DM1-iPSCs was differentiated into skeletal muscle cells by tetracycline-inducible MYOD overexpression. The reporter construct which detects changes in splicing was generated and introduced into DM1-iPSCs. DM1 disease model for drug screening was established.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DM1 Splicing iPS細胞

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

1. 研究開始当初の背景

DM1 (I型筋強直性ジストロフィー) は、筋萎縮・筋強直などの骨格筋障害をはじめ、不整脈 (心筋障害) 認知障害 (中枢神経機能障害) など多系統の臓器障害を示す全身性疾患である。特に、筋萎縮による筋力低下と筋肉の収縮が過度に持続して弛緩できなくなる筋強直など骨格筋での障害が特徴的で、症状の進行に伴って起こる呼吸筋の低下による呼吸不全や不整脈により死に至るケースが多い。生活の質の指標とされる QOL の低下が著しい疾患であるが、未だ有効な治療薬は見つかっておらず、病態全貌の解明と治療薬の開発が強く望まれている。

これまでの研究により、DMPK 遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在する CTG リピート配列が異常伸長していることが DM1 の原因として特定された。この異常に長くなった CTG リピート配列を含んで転写された RNA は、リピート部分がヘアピン構造をつくることから核内で凝集し、蓄積する。核内に蓄積した RNA の凝集体により、RNA に結合する能力の持つスプライシング因子が影響を受けて正常なスプライシングが障害され、スプライシング異常を引き起こす。DMPK は、骨格筋や心筋等で強く発現するため、これらの細胞でスプライシング異常が起こり、骨格筋障害などが引き起こされることが明らかとなった。

しかし、これまでも DM1 の治療薬を開発するために薬剤スクリーニングが行われてきたが、未だ有効な治療薬が見つかっていなかった。その原因として、これまでの研究では CTG リピートを強制発現した株細胞や、DM1 患者由来の線維芽細胞など、本来の病変部位である骨格筋細胞以外の細胞を使っていたことが原因であると考えられる。しかし、DM1 患者から直接採取した骨格筋細胞は非常に弱く増殖能も低いいため、スクリーニングに耐えうる量を確保できなかった。

2. 研究の目的

本研究では、DM1 患者由来 iPS 細胞 (DM1-iPS 細胞) を樹立し、骨格筋細胞への分化誘導することで、DM1 疾患の骨格筋細胞を容易かつ大量に用意できるようにする。さらに、これらの iPS 細胞にスプライシング異常をモニタリングできるレポーターを導入することで、スプライシング異常を定量的に解析できるようにし、治療薬のスクリーニングを可能にすることを目的とする。

3. 研究の方法

健常者由来 iPS 細胞 (Normal-iPS 細胞) と DM1-iPS 細胞を骨格筋細胞へと分化させるため、骨格筋分化を強力に誘導する MYOD 遺伝子を tet-on システムで誘導できるベクターを導入する。導入した細胞はベクターに搭載されている薬剤耐性ピューロマイシンでセクションし、安定発現株をクローニングする。樹立した細胞はドキシサイクリンで MYOD を誘導して培養し、骨格筋細胞へと分化誘導する。

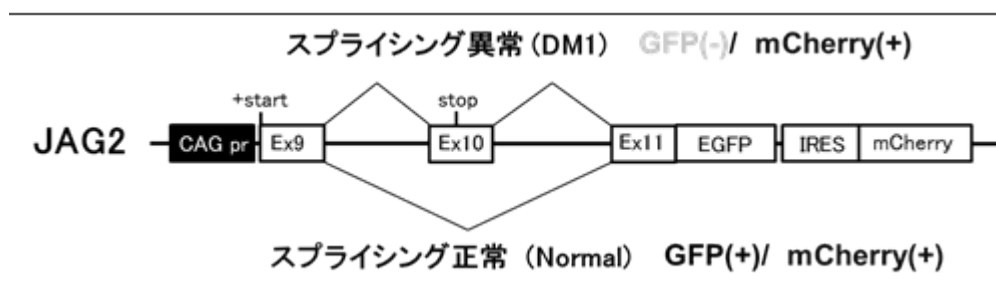
スプライシング異常をモニタリングするレポーターは、ヒト iPS 細胞でも十分なプロモーター活性を発揮する CAG プロモーター下流に、スプライシングを受けるミニジーンと融合 EGFP、さらに下流に IRES-mCherry を設計する。レポーターミニジーンは、骨格筋でスプライシング異常が報告されている遺伝子のうち、DM1 モデルマウスでもスプライシング異常が認められるもの、かつ、スプライシング異常が起きるエクソン-イントロン領域が 1kb 以下のものを候補として選ぶ。

レポーターと tet-on MYOD を導入した iPS 細胞を骨格筋細胞へ分化させ、報告されているスプライシング異常を緩和する薬剤を添加し、スプライシングパターンをモニタリングする。

4. 研究成果

DM1 患者の血液から DM1-iPS 細胞を樹立した。健常者由来 iPS 細胞と樹立した DM1-iPS 細胞には tet-on-MyoD を導入して骨格筋細胞への分化を可能とした。DM1-iPS 細胞とそこから分化させた骨格筋細胞はスプライシング異常を起こしていることを明らかにした。

スプライシングレポーターとしての条件を満たす候補として CLCN1, JAG2, ATP2A1 の 3 遺伝子が残り、それぞれの配列をクローニングしてレポーターベクターを作製した。例として JAG2 レポーターの構造を示す。(図 1)



JAG2 では DM1 でスプライシング異常を起こし、stop コドンがある Ex10 が含まれてしまうので、EGFP の翻訳が途中でとまってしまい、EGFP/mCherry 比が小さくなる。もし、スプライシングが正常に回復すれば Ex10 は含まれないので最後まで EGFP が翻訳され、EGFP/mCherry 比が大きくなる。

tet-on-MyoD を導入した Normal-iPS 細胞と DM1-iPS 細胞にレポーターを導入した。骨格筋細胞に分化させてのレポーター解析では、スプライシング異常を緩和させることが報告されているエリスロマイシンの添加で、JAG2 レポーターの EGFP/mCherry 比の増加、即ちスプライシング異常の改善傾向がみられた。さらに、96-well plate で骨格筋細胞への分化誘導を行い、イメージングサイトメーターでのハイスループットなスプライシング解析も可能とした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ueki Junko, Nakamori Masayuki, Nakamura Masahiro, Nishikawa Misato, Yoshida Yoshinori, Tanaka Azusa, Morizane Asuka, Kamon Masayoshi, Araki Toshiyuki, Takahashi Masanori P., Watanabe Akira, Inagaki Nobuya, Sakurai Hidetoshi, Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability, Scientific Reports, 査読あり, 7: 42522, 2017, DOI: 10.1038/srep42522

〔学会発表〕(計 3 件)

加門正義、若月修二、荒木敏之、DM1 疾患特異的 iPS 細胞における CTG リピート伸長メカニズムの解明、分子生物学会、2018 年

加門正義、若月修二、荒木敏之、DM1 疾患特異的 iPS 細胞における CTG リピート伸長メカニズムの解明、再生医療学会、2018 年

加門正義、若月修二、荒木敏之、DM1 疾患特異的 iPS 細胞における CTG リピート伸長メカニズムの解明、分子生物学会、2017 年

〔図書〕(計 1 件)

Toshiyuki Araki, Masayoshi Kamon, Hidetoshi Sakurai, Myotonic Dystrophy: Disease Modeling and Drug Development with DM1, Springer, 2018, 214

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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：

ローマ字氏名：

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。