

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16546

研究課題名（和文）ライソゾーム病における液胞型プロトンATPaseの病態的役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathological role of vacuolar ATPase in lysosomal storage diseases

研究代表者

森原 啓文（Moriyama, Hirofumi）

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：40802674

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）：ライソゾーム病の1つであるファブリー病を模倣したiPS細胞由来心筋細胞において、ライソゾームの酸性化能が低下していた。このような現象から、ライソゾーム膜に局在するプロトンポンプである液胞型プロトンATPase（V-ATPase）という分子に着目した。V-ATPaseの機能阻害によって、心機能の低下や酸性プロテアーゼであるカテプシンの活性が低下していた。本研究は、ライソゾーム病の包括的な治療法の開発を目指していることから、これらの分子を活性化させる化合物の探索を行い、これまでにいくつかの候補化合物を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ライソゾーム病は、国の特定疾患に指定されており、現時点で主な治療法は、それぞれの原因遺伝子に対応した酵素を外から補充する治療（酵素補充療法）となっている。しかし、酵素補充療法は治療が継続的であり、なお且つ薬剤が高額なため、患者の経済的負担が大きく、さらに約60種類にも及ぶライソゾーム病の中で、各疾患に特異的に対応した酵素を補充する対症療法という位置づけにある。このような現状を受け、本研究では、ライソゾーム病を根本的に治療する可能性を秘めた包括的制御分子として、V-ATPase、カテプシンに焦点を当て、そこを標的とした安価で効果的な治療法開発の足掛かりを築いた。

研究成果の概要（英文）：In iPS cell-derived cardiomyocytes mimicking Fabry disease, a type of lysosomal storage diseases, the acidification capacity of lysosomes was decreased. This phenomenon led us to focus on a molecule called vacuolar ATPase (V-ATPase), which is a proton pump localized in the lysosomal membrane. Inhibition of V-ATPase function resulted in impaired cardiac function and decreased activity of cathepsin, an acidic protease. Since this study aims to develop a comprehensive treatment for lysosomal storage diseases, we have searched for compounds that activate these molecules and obtained several candidate compounds so far.

研究分野：難病創薬

キーワード：ライソゾーム病 液胞型プロトンATPase ファブリー病 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は、遺伝的な要因によってライソゾームの加水分解酵素に異常が生じることで起きる疾患である。現時点で主な治療法は、それぞれの原因遺伝子に対応した酵素を、外から補充する治療(酵素補充療法)となっている。しかし、酵素補充療法は治療が継続的であり、なお且つ薬剤が高額なため、患者の経済的負担が大きい。このような現状を受け、安価で効果的な新規治療法の開発が必要になるのではないかと考えた。そこで、本研究課題では、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) というライソゾーム膜に局在するプロトンポンプに着目した。

V-ATPase は、ライソゾーム内の酸性化を通して様々な生理現象を担うことが報告されているが、ライソゾーム病に対する V-ATPase の寄与については未だ詳細に検討されていない。本研究では、ライソゾーム病における V-ATPase の病態的役割を明らかにすることで、V-ATPase を中心としたライソゾーム関連分子を標的に見据えた、従来とは異なる革新的な治療法の創造を目指す。

## 2. 研究の目的

ライソゾーム病における V-ATPase の病態的役割を解明する。

## 3. 研究の方法

本研究では、human induced pluripotent stem cell (ヒト iPS 細胞) を主に使用した。

さらに、ヒト iPS 細胞に対して CRISPR/Cas9 を改変したシステムである CRISPR interference (CRISPRi) を用いてゲノム編集を行った。CRISPRi は、ゲノムを切断するヌクレアーゼである Cas9 に変異を導入することで、ヌクレアーゼ活性を欠損させた dead Cas9 (dCas9) と、転写抑制ドメインである KRAB の融合タンパク質を、標的遺伝子の転写開始領域へ誘導を行う single guided RNA (sgRNA) を用いて局在させ、標的遺伝子の転写発現を特異的に抑制するシステムである。本研究では、この dCas9-KRAB をドキシサイクリン (DOX) 依存的に発現誘導できるヒト iPS 細胞株を作製し、DOX 添加依存的に標的遺伝子の発現を抑制することを可能とした (図 1)。

上記のシステムを用いて、ライソゾーム病の 1 つであるファブリー病の原因遺伝子と言われている GLA と V-ATPase の構成サブユニットの 1 つである ATP6V1B2 (V1B2) の発現を抑制したヒト iPS 細胞を作製した。これらのヒト iPS 細胞は、GSK-3 $\beta$ 、その後 WNT の阻害により、心筋細胞へ分化誘導させ、種々の解析を行った。分化心筋細胞の拍動を評価する際には、セルモーションイメージングシステム SI8000 を用いた。

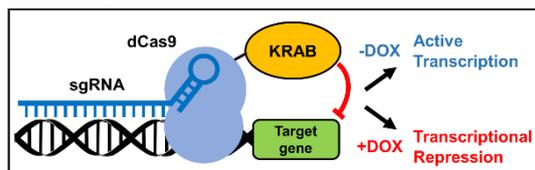


図1 CRISPR interference

## 4. 研究成果

### (1)ヒト iPS 細胞を用いたファブリー病モデルにおいて、ライソゾーム活性が低下した。

ファブリー病は、細胞内ライソゾームの加水分解酵素の 1 つである  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ ( $\alpha$ -GAL) の遺伝的欠損や活性の低下により引き起こされる。 $\alpha$ -GAL は、グロボトリアオシルセラミド (Gb3) という糖脂質を分解するが、酵素活性が不十分だと Gb3 が分解されず、細胞内のライソゾームで異常に蓄積する。実際に CRISPRi を用いて、 $\alpha$ -GAL をコードする遺伝子である GLA の発現を、DOX 誘導性に抑制するヒト iPS 細胞を作製した(図 2)。この細胞を心筋分化させ、心筋拍動を評価した。その結果、 $\alpha$ -GAL の発現が減少した心筋細胞では、心筋収縮速度等の低下が見られた。また、この細胞におけるライソゾームの pH を測定した結果、pH の上昇が確認された。この結果から、ファブリー病モデル iPS 細胞由来心筋細胞では、心筋細胞の機能低下が起こり、同時にライソゾームの酸性化能も低下することが明らかとなった。

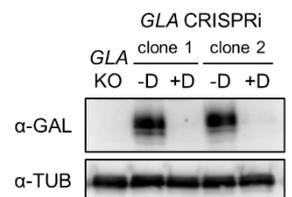


図2 DOX 誘導性に GLA を抑制するヒト iPS 細胞 (D: DOX)

### (2)V-ATPase の発現抑制や阻害により、ライソゾーム活性が低下し、心機能の低下を惹起した。

ファブリー病を模倣したモデル細胞において、ライソゾームの酸性化能が低下する結果を受け、ライソゾーム膜に局在するプロトンポンプである V-ATPase に着目した。CRISPRi を用いて、V-ATPase の構成サブユニットの 1 つである V1B2 の発現を DOX 誘導性に抑制するヒト iPS 細胞

胞を作製した(図 3). この細胞において、ライソゾームの pH を測定した結果、酸性化能の低下が見られた. さらに、V-ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 を、正常なヒト iPS 細胞に処置した場合も同様の現象が確認された. 次に、V-ATPase の機能阻害が、生体の心臓にどのような影響を及ぼすかを検討するために、C57BL/6 マウスに対して、Bafilomycin A1 (1mg/kg) を 3 日間連続で腹腔内投与し、心臓での表現型を評価した. 心エコーの結果、DMSO 投与群と比較して、Bafilomycin A1 投与群では、左室内径短縮率の低下が見られた. この結果から、V-ATPase の阻害により、心機能が低下することが明らかとなった.

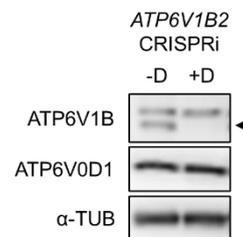


図3 DOX 誘導性に *V1B2* を抑制するヒト iPS 細胞 (D: DOX)

### (3)ファブリー病モデルや V-ATPase の機能が低下した iPS 細胞由来心筋細胞では、カテプシンの活性が低下した.

ファブリー病モデルや V-ATPase の機能が低下した iPS 細胞由来心筋細胞において、ライソゾームの酸性化能低下が見られたが、それ以外に共通した表現型が存在するか検討した. その結果、ライソゾームに局在する酸性プロテアーゼであるカテプシンの活性が低下していた. そこで、このカテプシンの活性を賦活化することで治療法の開発に繋げることができないか検討した. 将来的に、安価な治療法を提供するためには、低分子化合物が最適であると考え、大阪大学薬学研究科 創薬サイエンス研究支援拠点に化合物ライブラリーの提供を依頼し、実際に iPS 細胞を用いたスクリーニングアッセイを行った.

スクリーニングアッセイに関しては、iPS 細胞を用いたスクリーニング系を自ら構築し、1 次スクリーニングの段階で、2414 個の化合物からカテプシンの活性を上昇させる化合物を 10 個同定した. この 10 個の化合物に関しては、ファブリー病態を模倣したヒト iPS 細胞由来心筋細胞に処置し、心筋拍動の変化を観察した. その結果、心筋収縮速度を回復させる傾向を示す化合物を得ることができ、現在さらなる検討を進めている.

ライソゾーム病の 1 つであるファブリー病を模倣した病態モデル細胞において、ライソゾームでの酸性化能の低下が見られたことから、V-ATPase の関与を想起した訳だが、他のライソゾーム病モデルでもこのような現象が起きるのか、期間内に検討すべきであった. 他のモデルに関しては、疾患の原因遺伝子をノックアウトしたヒト iPS 細胞の作製に既に着手しており、樹立できれば随時検討を始める予定である.

また、ファブリー病モデルや V-ATPase の機能が低下した iPS 細胞由来心筋細胞において、AKT (Ser473) のリン酸化が低下した結果を受け、AKT のリン酸化を制御する mTOR 複合体 2 (mTORC2) と V-ATPase との関係性についても検討してきた. 具体的には、V1B に FLAG tag を付加させた iPS 細胞を作製し、免疫沈降を行った. しかし、①V-ATPase が mTORC1 を制御する過程で関与する既知の因子が、mTORC2 に対しても影響を与える. ②V-ATPase と相互作用する新規制御因子が存在する. ③V-ATPase の機能が異常になることにより間接的に mTORC2 が影響を受ける. といった当初想定した 3 つの可能性については、明確な結論に至らなかった.

## 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 0件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Tsuruoka Kenjiro, Wakabayashi Shigeo, Morihara Hirofumi, Matsunaga Ninso, Fujisaka Yasuhito, Goto Isao, Imagawa Akihisa, Asahi Michio | 4. 巻<br>313         |
| 2. 論文標題<br>Exacerbation of autoimmune myocarditis by an immune checkpoint inhibitor is dependent on its time of administration in mice          | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Cardiology   | 6. 最初と最後の頁<br>67-75 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ijcard.2020.04.033  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Daimon Atsushi, Morihara Hirofumi, Tomoda Kiichiro, Morita Natsuko, Koishi Yoshinori, Kanki Kazuyoshi, Ohmichi Masahide, Asahi Michio | 4. 巻<br>29      |
| 2. 論文標題<br>Intravenously Injected Pluripotent Stem Cell-derived Cells Form Fetomaternal Vasculature and Prevent Miscarriage in Mouse            | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Cell Transplantation  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/0963689720970456  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Shigeo Wakabayashi, Hirofumi Morihara, Shunichi Yokoe, Takatoshi Nakagawa, Kazumasa Moriwaki, Kiichiro Tomoda, Michio Asahi                                       | 4. 巻<br>294               |
| 2. 論文標題<br>Overexpression of Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger 1 specifically induces cell death in human iPS cells via sustained activation of the Rho kinase ROCK | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>19577-19588 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1074/jbc.RA119.010329  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岡部 康教, 森原 啓文, 友田 紀一郎, 朝日 通雄         |
| 2. 発表標題<br>ライソソームの正常機能を保証する V-ATPase の分子生物学的解析 |
| 3. 学会等名<br>第136回 日本薬理学会近畿部会                    |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>森原 啓文, 友田 紀一郎, 朝日 通雄   |
| 2. 発表標題<br>Lysosomal Regulation of mTOR-AKT Signaling via the Vacuolar-type H <sup>+</sup> - ATPase |
| 3. 学会等名<br>第93回 日本薬理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>若林 繁夫, 友田 紀一郎, 横江 俊一, 森原 啓文, 朝日 通雄   |
| 2. 発表標題<br>Overexpression of the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger NHE1 induces selective cell death of human iPS cells via sustained activation of rho kinase ROCK |
| 3. 学会等名<br>第92回 日本生化学会大会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|