

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07870

研究課題名（和文）疾患iPS細胞によるピルビン酸脱水素酵素欠損症の研究基盤の開発

研究課題名（英文）Establishment of iPS cells derived from patients with pyruvate dehydrogenase deficiency

研究代表者

阿部 朋行（Abe, Tomoyuki）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20610364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ピルビン酸脱水素酵素複合体（PDHC）欠損症は、エネルギー産生障害を軸とした先天性代謝異常をきたす希少指定難病である。本研究では、患者由来の凍結保存細胞からiPS細胞を樹立し、脳神経系へ分化させることで本性に特徴的な病態を再現できるか検証を行った。男女複数名のPDHC欠損症患者に由来する細胞から、未分化マーカーを発現し、多分化能を有するiPS細胞が作製した。一部の患者iPS細胞から得られた神経細胞、大脳オルガノイドは、健康人のものと比べて神経細胞の分化・増殖が不十分で、未熟な構造だった。今後、これらの疾患表現型を改善しうる薬剤や治療法の開発を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDHC欠損症は、軽症例の一部を除いて有効な治療法がない。多くの場合は予後不良であり、成人期に移行するのは稀である。国内外でPDHC欠損症に関する報告のほぼ全てが、早期発見を目指した診断法の確立や症例報告を目的としている。そのため、本疾患のiPS細胞樹立は際立った特色があり、治療法確立のための礎になる。また、iPS細胞技術は世界に先駆けて日本で確立され、1日も早くその実現化を目指すべき課題である。国全体で、難病患者の細胞を用いた疾患・創薬研究に資するiPS細胞バンクの構築も積極的に進められており、こうしたことに本研究が大きく寄与できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) deficiency is a rare and intractable disease that causes inborn errors of metabolism centered on energy production disorders. In this study, we established iPS cells from cryopreserved cells derived from patients with PDHC-deficiency. We examined whether they could reproduce the pathology characteristic of this disease by differentiating into the cerebral neural lineage. We generated iPS cells expressing pluripotency-markers and with multilineage-differentiation potential from iPS cells derived from PDHC-deficient patients of both sexes. Neural cells and cerebral organoids obtained from selected patient iPS cells had immature structures with insufficient neuronal differentiation and proliferation compared to those from healthy controls. In the future, we will develop drugs and therapies that can improve these disease phenotypes.

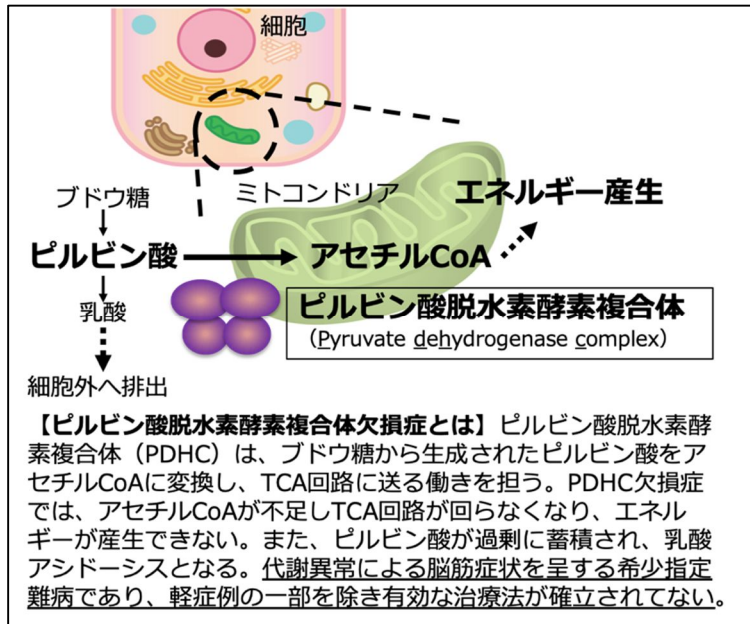
研究分野：再生医学

キーワード：疾患iPS細胞 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

<ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症に有効な治療法がない>

ピルビン酸脱水素酵素複合体 (Pyruvate dehydrogenase complex, PDHC) は、エネルギー産生のために必須の酵素複合体で、ミトコンドリアマトリックスに存在する。これは、解糖系でブドウ糖から生成されたピルビン酸をアセチル CoA に変換し、TCA 回路へ送り込む、という働きを担う。PDHC 欠損症では、アセチル CoA が不足して TCA 回路が回らなくなった結果、エネルギー不足となる。また、解糖系で作られたピルビン酸が過剰に蓄積され、乳酸アシドーシスとなる。軽症例の一部では、ビタミン B1 (PDH の補酵素 TPP の前駆体) やジクロロ酢酸 (PDH キナーゼを阻害して PDH を活性化) の投与



が有益だが、PDHC の欠損部位をこれらの薬剤で補えた場合に限られる。多くの場合は予後不良であり、成人期に移行するのは稀である。また、国内では12例(先天代謝異常症患者登録制度 JaSMIn, 2013年に登録開始)、世界では400例登録(内藤ら、先天代謝異常症候群 2012)されている希少疾患である。特に PDH E1 サブユニットの遺伝子変異はヒト遺伝性疾患データベース OMIM では23種類登録されているなど、遺伝子変異に heterogeneity が存在する。このため、有効な治療法を探索するための研究基盤を構築することが求められている。

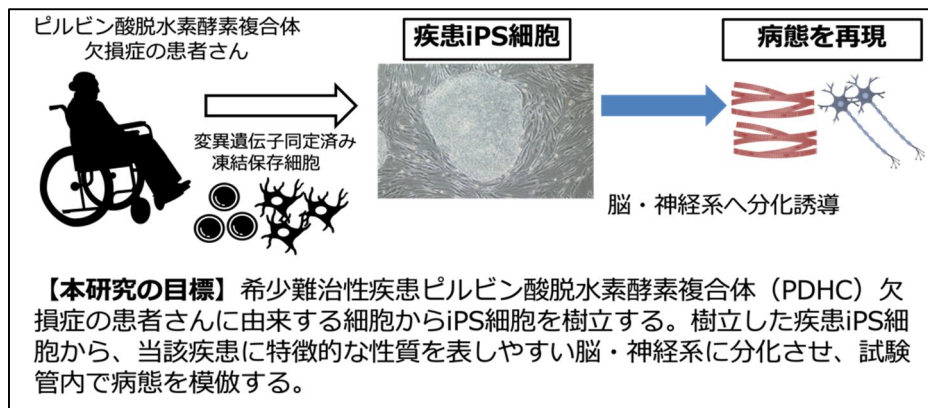
<PDHC 欠損症 iPS 細胞を樹立し、研究基盤を構築する>

患者由来細胞から iPS 細胞を作製できれば、その病態を体外で再現できる貴重なバイオリソースになるため、希少疾患や難治性疾患に対する病態解析、治療薬探索に大きな力を発揮する。しかしながら、多くの疾患では患者由来細胞の入手が難しい。分担研究者の遠藤は、PDHC 欠損症の診断のために患者から細胞を集め、変異遺伝子を同定し、さらに細胞を症状と対応させて凍結保存している。その中には、ビタミン B1 に反応する軽症例 (Endo et al., Am J Hum Genet, 1989) から重篤な代謝異常の重症例 (Endo et al., J Inheret Metab Dis, 1991) まで複数の凍結細胞がある。本研究ではこれらの長期保存細胞を用いて疾患 iPS 細胞を樹立し、PDHC 欠損症の病態を再現できるか否か検証を行った。

2. 研究の目的

<本研究の狙い>

本研究では、希少指定難病である PDHC 欠損症患者に由来する iPS 細胞を樹立し、その病態解析と新規治療法開発のための研究基盤の構築を目指す。まずは、分担研究者の遠藤が保有する PDHC 欠損症患者由来の変異部位が明らかな細胞から、iPS 細胞の作製を試みた。次に、樹立し



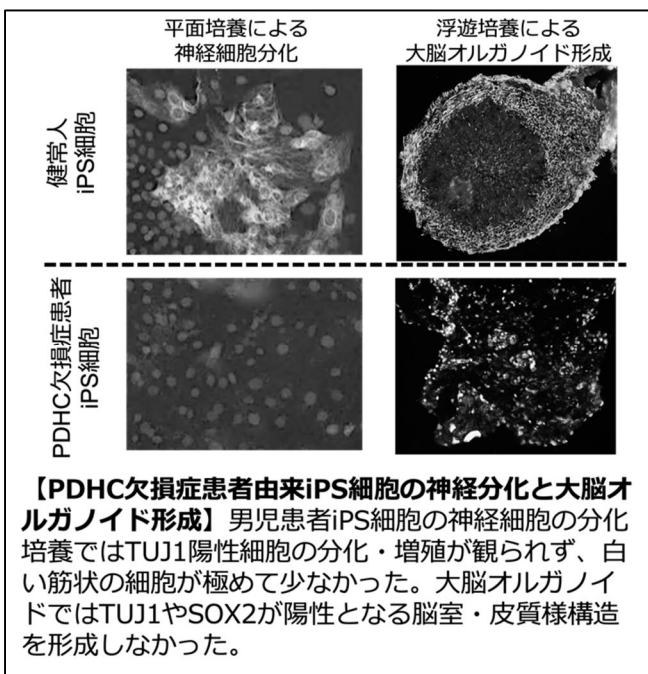
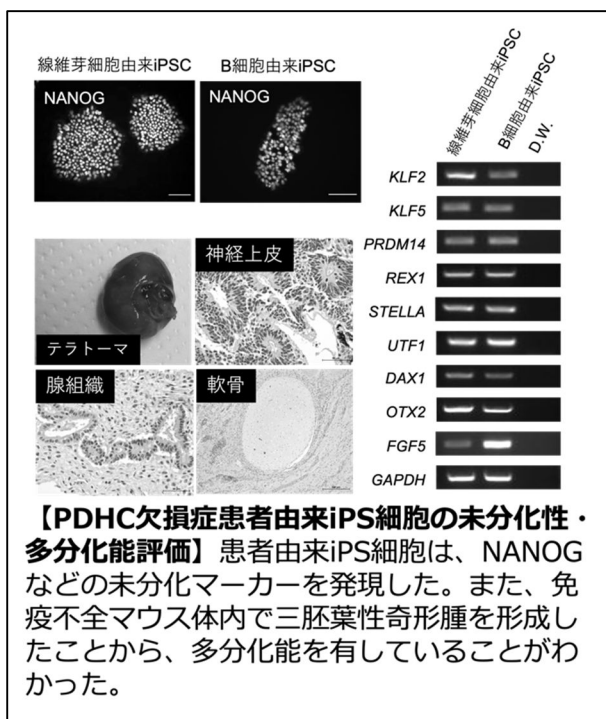
た iPS 細胞を試験管内で脳神経系に分化させることで、PDHC 欠損症を再現したアッセイシステムを構築できるか検証を行った。

3. 研究の方法

iPS 細胞の作製は、阿部らがこれまでに健常人から iPS 細胞を作製した系を応用し (Abe et al., Exp. Hematol. 2021) 患者由来の線維芽細胞または B 細胞から iPS 細胞の樹立を行った。4 例の PDHC 欠損症患者由来の線維芽細胞または B 細胞は、約 30 年の長期凍結保存から融解して増殖させ、iPS 細胞の樹立に供した。線維芽細胞は KSR および EGF などを添加した培地で、B 細胞は B 細胞増殖因子を添加したリンパ球培地で培養した後、Cytotune センダイウイルスベクターを使って初期化因子を導入し、リプログラミング培地 AK02N で iPS 細胞様コロニーを作製した。出現した iPS 細胞様コロニーはピックアップして継代し、増幅培養した後、未分化性に関連する遺伝子や細胞表面抗原の発現を解析した。女兒患者由来 iPS 細胞は、X 染色体を再活性化させるために、CHIR99021 や PD0325901 などを含んだ X 染色体再活性化培地で培養した。PDHA1 遺伝子の変異部位の同定には、患者由来細胞から抽出した DNA を用いて PDHA1 遺伝子の各エクソンを PCR、シーケンス解析した。変異型 PDHA1 遺伝子の発現については、iPS 細胞から抽出した RNA を用いて RT-PCR やシーケンス解析を行った。樹立した iPS 細胞は、神経系誘導培地を用いて神経細胞を分化誘導した。また、胚葉体を作製し、大脳オルガノイドを形成させた。これらの神経細胞やオルガノイドは、TUJ1 などの神経系マーカーを使って免疫染色した。

4. 研究成果

4 例 (男児 2 名、女兒 2 名) の PDHC 欠損症患者由来細胞から、NANOG などの未分化マーカーを発現し、多分化能を有する iPS 細胞が作製できた (右図)。変異部位は 4 例いずれも既知の同定済みのもので、変異型 PDHA1 を発現するかどうか解析した結果、男児由来 iPS 細胞では変異型 PDHA1 のみを発現したが、女兒患者由来 iPS 細胞では変異型 PDHA1 の発現が検出できず、片方の X 染色体で不活化マーカー H3K27me3 が陽性だった。そこで、女兒患者 iPS 細胞に X 染色体再活性化培養を行い、未分化状態のまま X 染色体を再活性化させると、2 例いずれも H3K27me3 が陰性となり、変異型 PDHA1 を数%発現した。一部で変異型を発現する女兒患者由来 iPS 細胞から変異型のみを発現するクローンを分離培養することを試みたが、細胞が死んでしまい分離できなかった。この結果から、神経細胞や大脳オルガノイドの分化誘導には、男児患者由来 iPS 細胞を用いることにした。この iPS 細胞を用いた神経細胞の分化培養では TUJ1 陽性神経細胞の分化・増殖が観られず、大脳オルガノイドでは TUJ1 や SOX2 が陽性となる脳室・皮質様構造を形成しなかった (左図)。



一部で変異型を発現する女兒患者由来 iPS 細胞から変異型のみを発現するクローンを分離培養することを試みたが、細胞が死んでしまい分離できなかった。この結果から、神経細胞や大脳オルガノイドの分化誘導には、男児患者由来 iPS 細胞を用いることにした。この iPS 細胞を用いた神経細胞の分化培養では TUJ1 陽性神経細胞の分化・増殖が観られず、大脳オルガノイドでは TUJ1 や SOX2 が陽性となる脳室・皮質様構造を形成しなかった (左図)。

本研究で、変異部位や性別が異なる 4 例の患者由来細胞から iPS 細胞を樹立することができた。同定された変異部位は 4 例全て既知だったが、部位が異なり重症度も様々である。本症の原因遺伝子である変異型 PDHA1 は、X 染色体上にある。性染色体構成が XY の男児患者由来 iPS 細胞においては、もともと変異型 PDHA1 しか持たないこと

からリプログラミング後でも変異型 PDHA1 を発現していた。しかしながら、ヘテロで変異型 PDHA1 を有する女児患者由来 iPS 細胞では未分化な形質を示したものの、変異型 PDHA1 は検出されず、片方の X 染色体が不活化されていた。これは、従来のリプログラミング方法では X 染色体を両側とも活性化した状態までは初期化されないためと考えられる。変異型を発現する女児患者 iPS 細胞の作製に X 染色体再活性化培養が有効だったが、変異型 PDHA1 のみを発現した際の iPS 細胞の生存性・増殖性が極めて低いことからサブクロニングが困難だった。今後、生存性や増殖性を高める培養方法や変異型発現率を改善する低分子化合物の添加などを検討し、変異型のみを発現する iPS 細胞の純化を目指す。

男児患者 iPS 細胞から得られた神経細胞、大脳オルガノイドは、健常人のものとは比べて神経細胞の分化・増殖が不十分で、未熟な構造だった。iPS 細胞の由来である線維芽細胞および B 細胞には、SV40LT または EB ウイルス感染により不死化処理が施されている。現在、これらが神経細胞の分化・増殖やオルガノイド形成に及ぼす影響について解析しており、男児患者由来 iPS 細胞から得られたデータと疾患の関連性について今後明らかになっていくと考えている。その上で、本研究で樹立した iPS 細胞に由来する神経細胞やオルガノイドを用いて、疾患表現型を改善しうる薬剤や治療法の開発を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	遠藤 仁司 (Endo Hotoshi) (50221817)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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