

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16191

研究課題名（和文）線毛機能不全症患者iPS細胞と気道チップによる線毛病の新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Search for novel biomarkers of primary ciliary dyskinesia (PCD) using a combination of PCD patient iPS cells and airway chips.

研究代表者

曽根 尚之（Sone, Naoyuki）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50940128

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：線毛機能不全症候群(PCD)が疑われるが確定診断ができないProbable PCDの患者から樹立した疾患iPS細胞を気道上皮細胞に分化誘導し線毛機能を評価したところ、線毛機能と構造には大きな異常を認めないことから、線毛協調運動障害によるPCDの可能性を疑った。しかし、In vitroで協調運動を評価する手法が確立されていないため、細胞内線毛協調運動が解析できる方法を構築した。さらに、PCDの新規治療法の候補となるReadthrough化合物を高感度で探索する為に、HiBiT systemを導入した遺伝子改変iPS細胞を樹立し、ハイスループットスクリーニングを行う為の評価系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCDが疑われるが確定診断ができないProbable PCDの患者数は少なく、確定診断ができないため治療の開始が遅れる事が指摘されている。特にIn vitroで線毛協調運動障害を診断する手法は確立されておらず、細胞内線毛協調運動が解析できる方法は新たな診断方法となりうる。また、PCDの治療は限られており、新規治療法の開発が望まれているが、その開発は遅れている。今回樹立した遺伝子改変iPS細胞を用いて、新規治療法の候補となりうるReadthrough化合物をハイスループットスクリーニングで有効な可能性が高い化合物を探索し、その有効性が証明できれば社会的な貢献度は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Evaluated of disease-specific iPS cell-derived airway epithelial cells with probable primary ciliary dyskinesia (PCD) patients with suspected but not definitively diagnosed PCD. The results showed no significant abnormalities in the function and structure of multiciliated cells, suggesting the possibility of PCD due to impaired coordinated ciliary beating. However, we developed a method to analyze intracellular coordinated ciliary beating because there is no established method to evaluate it in vitro. In addition, we have established an evaluation system for high-throughput screening of new treatments for PCD using HiBiT system transduced gene-edited iPS cells.

研究分野：再生医療

キーワード：線毛機能不全症候群 線毛協調運動 Readthrough化合物 ハイスループットスクリーニング

1．研究開始当初の背景

線毛上皮細胞は線毛運動により気道に侵入した病原体や異物を一方向性に除去する機能を担っており、線毛運動の減弱や協調運動の消失が起こると、病原体や異物が適切に排泄されず繰り返す肺炎や気管支拡張症を引き起こす。線毛機能不全症候群（PCD）は主に常染色体劣性遺伝と考えられる線毛の構造異常に基づく線毛機能不全で、約 2 万人に 1 人の頻度とされており、現在少なくとも 50 個以上の原因遺伝子が報告されている。診断は鼻腔 NO 検査や電子顕微鏡検査、高速ビデオ顕微鏡検査、遺伝子検査等を組み合わせて行うが、ゴールドスタンダードとなる検査がなく、未診断の症例が多数あり有効な治療薬がないことが問題となっている。その原因として線毛機能不全症候群が疑われるが確定診断ができない Probable PCD の症例を確定できる検査がないことや、培養細胞での協調運動を評価する事が困難である事が挙げられる。そのため、Probable PCD の症例を確定診断する診断方法や新規治療薬の開発が急務となっている。

2．研究の目的

申請者はこれまでに線毛機能不全症候群患者由来のヒト多能性幹細胞を用いて細胞間の線毛協調運動を含めた疾患の病態を繰り返し再現できる疾患モデルを確立した。その技術を生かし本研究では線毛機能不全症候群が疑われるが確定診断ができない Probable PCD の症例において診断が可能となるような検査方法の確立を目指す。

遺伝子変異により構造遺伝子上に未熟終止コドンが生じると、機能を有するタンパク質の発現が妨げられるが、このような未熟な終止コドンのナンセンス変異において、終止コドンがあるのにもかかわらずそれを読み飛ばし、たんぱく質を合成し続ける現象を「Readthrough」と呼ぶ。この現象を利用して未熟な終止コドンを持つナンセンス変異症例に対して、Readthrough 活性を持つ化合物を使用することで、たんぱく質合成を継続させる治療法が提唱されている。そこで、新規治療薬の候補となる Readthrough 化合物を高感度で探索する為の評価系を作成し、ハイスループットスクリーニングを行い新規治療薬の開発を目指す。

3．研究の方法

線毛機能不全症候群が疑われるが確定診断ができない Probable PCD 患者の末梢血から、研究協力者の後藤らが樹立した疾患 iPS 細胞を気道上皮細胞に分化誘導し線毛機能を評価する。線毛機能の評価は高速ビデオ顕微鏡による振動数・粘液線毛クリアランスの測定と、電子顕微鏡による線毛構造の評価を行う。振動数・粘液線毛クリアランス・線毛構造に異常を認めない場合は、線毛協調運動を評価する方法として、気道上皮細胞シートを剥離させ中間変倍装置を用いて、側方視からの 1 細胞内の線毛協調運動の有無を観察する。

新規治療薬の候補となる Readthrough 化合物を高感度で探索する為の評価系は、気道上皮細胞での感受性を評価できるようするため iPS 細胞を用いる。未熟な終止コドンのナンセンス変異は CCNO と呼ばれる線毛の発生過程が障害される表現型が明瞭な遺伝子変異

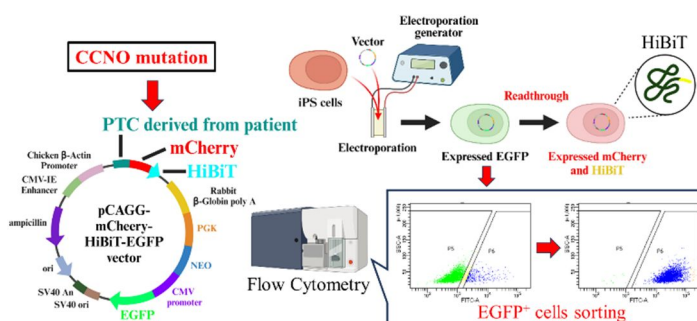


図 1：Readthrough 化合物探索に使用する遺伝子変異 iPS 細胞の樹立法

を有する線毛機能不全症候群患者由来の遺伝子配列を用いる。Readthrough 現象が起こったかどうかの評価には、未熟な終止コドンのナンセンス変異の配列の後に mCherry と HiBiT を導入し、高感度に Readthrough 現象を捉えられるようにする。目的の遺伝子導入ができたかどうかの評価には EGFP を導入し、EGFP 発現細胞株をフローサイトメトリーで単離できるようにする。遺伝子導入にはエレクトロポレーションを使用し、目的の遺伝子改変 iPS 細胞をフローサイトメトリーで単離し、単一細胞由来の細胞株を樹立する(図 1)。ハイスループットスクリーニングを行えるかどうかの評価は、既報のある Readthrough 化合物を用いて Readthrough 現象を定量化し、Positive Control 選定し、CV 値(変動係数 coefficient of variation)、S/B 比 (Signal/Background ratio)、S/N 比 (Signal/Noise ratio)、Z'-factor を算出する(図 2)。

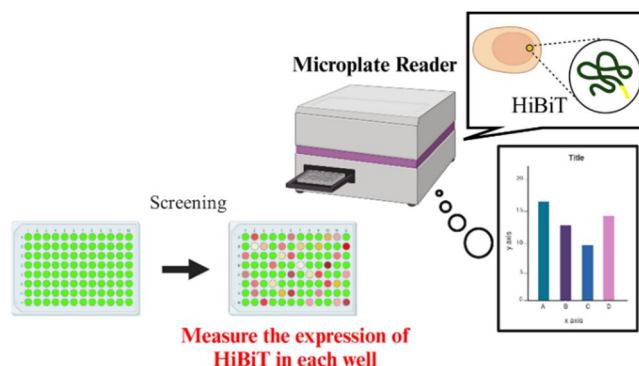


図 2 : Readthrough 化合物探索の定量化法

4 . 研究成果

線毛機能不全症候群が疑われるが確定診断ができない Probable PCD 患者の末梢血から樹立した疾患 iPS 細胞を気道上皮細胞に分化誘導し線毛機能を評価したところ、振動数・粘液線毛クリアランス・線毛構造に異常を認めなかった(図 3)。In Vitro では線毛協調運動を評価する方法は確立されていないので、分化誘導した気道上皮細胞シートを剥離させ中間変倍装置を用いて、側方視からの 1 細胞内の線毛協調運動の有無を観察した。従来法では 1 細胞レベルの線毛運動の評価は困難であったが、中間変倍装置を使用する事で、1 細胞レベルの線毛運動の観察がしやすくなった(図 4)。これにより、1 本ずつの線毛運動を標識し追跡する事で 1 細胞レベルの線毛運動の評価が可能となる可能性を見出した。今後は症例を蓄積し、数学的なモデルを用いて 1 細胞レベルの線毛協調運動の定量化を行う予定である。

新規治療薬の候補となる Readthrough 化合物を高感度で探索する為に、CCNO 患者由来の未熟な終止

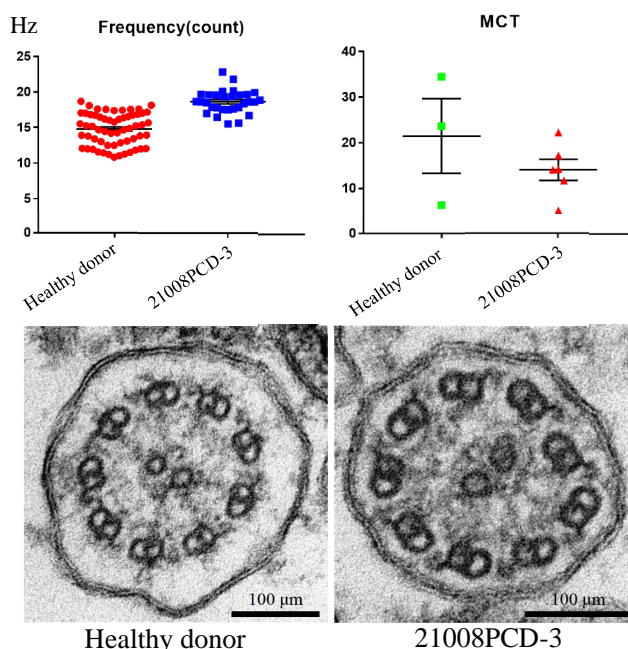


図 3 : Probable PCD 患者由来の気道上皮細胞の線毛機能評価

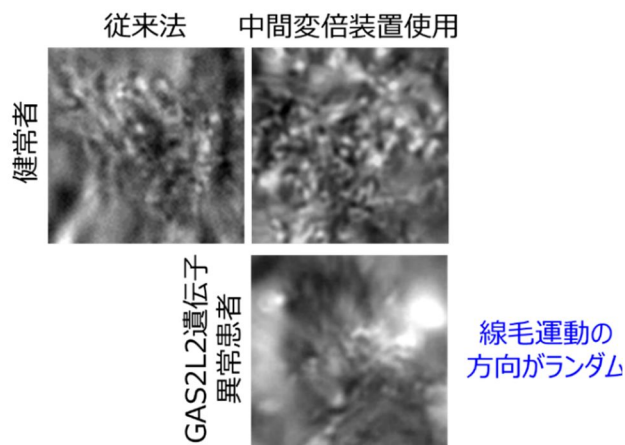


図 4 : Probable PCD 患者由来の気道上皮細胞の協調運動評価

コドンのナンセンス変異の後に mCherry と HiBiT、EGFP を有する Vector を設計し作成後に健常者由来の iPS 細胞に導入した。G418 による薬剤セレクション後に EGFP 発現細胞株をフローサイトメトリーで単離し目的の遺伝子改変 iPS 細胞を樹立した(図 5)。

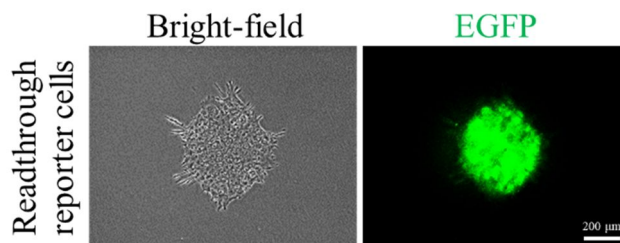


図 5：遺伝子改変 iPS 細胞の樹立

既報のある Readthrough 化合物を用いて Readthrough 現象を確認したところ、Tobramycin と 5-Azacytidine は Readthrough 現象を認めた(図 6)。特に 5-Azacytidine は容量依存性に Readthrough 現象の発現が認められ、Positive Control として使用できる事が判明した。ハイスループットスクリーニングを行えるかどうかの評価目的に 5-Azacytidine を用いてプロトコルを作成し、予備検討をしたところ、CV 値(変動係数 coefficient of variation) = 0.070、S/B 比(Signal/Background ratio) = 6.37、S/N 比(Signal/Noise ratio) = 49.65、Z'-factor = 0.688 であり、ハイスループットスクリーニングを行う事が可能な系である事が証明できた(図 7)。

Expression of HiBiT

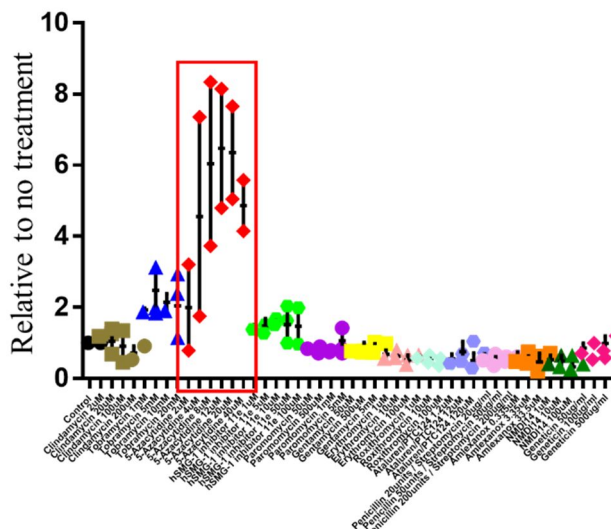


図 6：既報のある化合物を用いた Readthrough 現象の評価

今後は大学内にある 3456 化合物ライブラリ のハイスループットスクリーニングを行い、必要に応じて機能未知の化合物ライブラリ まで行う予定である。HiT 化合物を同定できれば、樹立した遺伝子改変 iPS 細胞を気道上皮前駆細胞にまで分化誘導し、HiT 化合物の Readthrough 現象が未分化の時と比較して感受性がどのように変わるか、適切な投与のタイミング・濃度・投与期間を検討する。最終的には CCNO 患者由来 iPS 細胞をを気道上皮前駆細胞にまで分化誘導し、検討したプロトコルを用いて HiT 化合物の効果の有無を検討する予定としている。

Expression of HiBiT

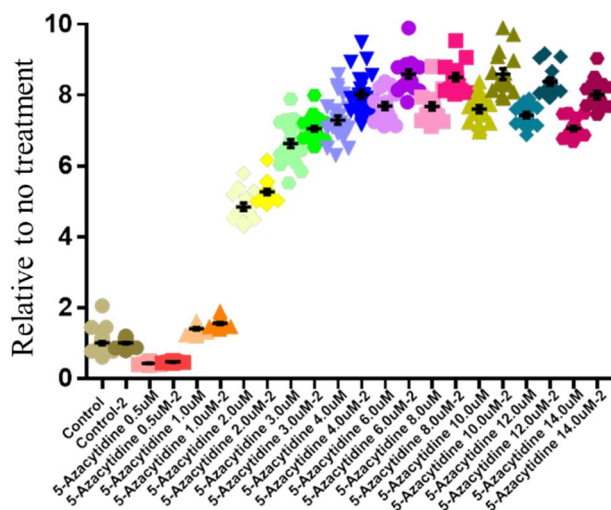


図 7：5-Azacytidine を用いた Readthrough 現象の評価

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1．発表者名 曽根 尚之
2．発表標題 iPS細胞とマイクロ流体気道チップ技術を組み合わせた多細胞での線毛病モデルの構築
3．学会等名 第48回佐島シンポジウム
4．発表年 2022年

1．発表者名 Naoyuki Sone
2．発表標題 Regulation of planar cell polarity in airway epithelial cell sheets combining airway chips and human pluripotent stem cells
3．学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2023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
研究協力者	後藤 慎平 (Gotoh Shimpei) (50747219)	京都大学・iPS細胞研究所・教授 (14301)	

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
---------	---------