

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790383

研究課題名(和文)患者iPS細胞を用いた筋ジストロフィー症の病態再現

研究課題名(英文) Modeling Duchenne muscular dystrophy using patient-derived iPS cells

研究代表者

櫻井 英俊 (Sakurai, Hidetoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：80528745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、DMD患者由来iPS細胞を用いて病態再現を目指した。DMD患者由来iPS細胞を筋細胞に分化誘導したところ、対照iPS細胞と比較して筋細胞の成熟度、分化速度、遺伝子発現に変化はなかった。また電気刺激を加えるとDMD患者由来筋細胞でCa²⁺の過剰流入を認めた。そしてCa²⁺の過剰流入を起こすと、DMD患者由来筋細胞では細胞障害が促進された。これらの表現型はエクソンスキップによるジストロフィン遺伝子回復により改善したことから、DMDにおいて筋病態の発症にはCa²⁺の過剰流入が関与していることが強く示唆された。今後Ca²⁺過剰流入を標的とした新規治療法の確立へとつなげてゆく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy (DMD) using patient-derived iPS cells. DMD-muscles differentiated from DMD-iPSCs exhibited similar gene expression profile and similar maturity as control iPSC-derived muscles, and no differentiation delay was observed in DMD-muscles. When DMD-muscles were exposed to electric stimulation, higher intracellular Ca²⁺ influx was observed in DMD-muscles than control-muscles. Larger cell damage was observed in DMD-muscles than control-muscles through overloading Ca²⁺ by ionomycin. Since these phenotype could be ameliorated by restored dystrophin expression by exon skip technics, we conclude that excessive Ca²⁺ influx is the trigger for the early pathogenesis of DMD caused by absence of dystrophin. According to our findings, we are going to develop new drugs targeting excessive Ca²⁺ influx by analyzing the mechanism which is caused by absence of dystrophin.

研究分野：疾患再現学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：iPS細胞 疾患再現 筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対する治療法として、エクソン・スキッピングについては世界共同治験の施行という大きな成果を上げた。しかしながら、エクソン・スキッピングは Dystrophin 遺伝子の変異部位によってスキップすべきエクソンが異なり、一つの薬剤で全ての患者に適応できるわけではない。今後も様々な遺伝子変異を持つ患者に対し、何種類ものエクソン・スキッピング剤が開発されると考えられるが、その有効性を検証するために患者由来の骨格筋細胞を活用できることが求められている。これまでは患者由来の筋生検サンプルから得られた筋芽細胞や、線維芽細胞に MyoD を導入して誘導した筋細胞が用いられてきた。しかしそれらは増殖能が低いことや、数回の継代で増殖が停止してしまうなど、繰り返して実験を行うには困難があった。

一方我々は、前年度までに、骨格筋分化決定因子である MyoD1 を強制発現させることで、ヒト iPS 細胞から 60%以上の高い効率で、しかも再現性高く骨格筋細胞を分化させる技術を開発していた。

2. 研究の目的

本研究は筋ジストロフィー患者由来、および対照健康人由来の iPS 細胞を用いて、*In vitro* で筋ジストロフィーの病態再現モデルを構築し、さらに病態を可視化することで、将来有望な治療法と期待されるジストロフィン遺伝子のエクソン・スキッピングに有用な化合物をスクリーニングできるシステムの構築を目的とする。将来的に様々な欠損を持つ患者由来の細胞を用いてスクリーニングできれば、様々なタイプの患者それぞれに適合した化合物を発見することが可能になり、ヒット化合物のいち早い臨床応用に繋がると考える。

3. 研究の方法

京大病院小児科学講座の協力の元、様々な変異を持つ DMD 患者から iPS 細胞を樹立する。我々が開発した PB-Tet-MyoD ベクターを導入し、効率の良い筋分化を起こすクローンを選別する。患者由来骨格筋細胞と健康人由来骨

格筋細胞を比較し、まず分化能や筋細胞の成熟化の程度を比較検討する。次に病態再現実験として、NF- κ B の活性化やミトコンドリア機能異常、培養上清の CK 値や細胞内の酸化ストレスの程度、Ca²⁺濃度などを定量的に評価し病態再現を行う。

4. 研究成果

京大小児科にて樹立された 2 例の DMD 患者由来 iPS 細胞を用いて実験を行った。また 1 例については父親の細胞を健常コントロールとして用いた。iPS 細胞であることの検証は、未分化遺伝子発現、表面マーカー発現、アルカリフォスファターゼ活性測定および、免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ形成能を解析し、すべてのクライテリアを満たすクローンを選別して実験に使用した。

PB-Tet-MyoD ベクターを導入後、G418 による薬剤選択にて選別されたポリクローナルな細胞群にて、テトラサイクリン添加による筋分化誘導を行った。その結果、筋分化時の遺伝子発現変化や筋マーカー分子の発現効率には健常コントロールと DMD 患者由来の間で、有意な差は認められなかった。

次に分化 9 日目でのジストロフィンの発現を比較すると、mRNA レベルでは同等であったが、タンパクレベルでは DMD 患者由来細胞において全くジストロフィンの発現を検出できなかった。これは患者の変異を模倣できていると考えられる。

そこで引き続いて筋分化良好な iPS 細胞クローン選別の後、筋収縮時の細胞内 Ca²⁺濃度を測定した。筋収縮は培地中に電極を挿入し、電気刺激を行う事で再現した。Ca²⁺濃度は蛍光指示試薬である Fluo-8 を用いた。結果は健常コントロールに比べ DMD 患者由来細胞で収縮時の Ca²⁺が高かった。さらに、より精密な比較を行うため、同一の患者細胞を用いてエクソンス・スキッピングによりジストロフィンの発現回復を行った。1 例目はエクソン 44 欠損であったため神戸学院大・松尾教授との共同研究によりエクソン 45 をスキップするアンチセンスオリゴ A088 を用いた。結果は A088 を用いたジストロフィンの発現回復により、同一の DMD 患者由来筋細胞において、筋収縮時の Ca²⁺濃度が低下した。

また遺伝子変異部位による差がないかどうかを確認するため、2例目の患者としてエクソン46-47欠損の患者由来iPS細胞を用い、同様の手法で筋細胞へと分化良好なクローンを得たのち、同じく電気刺激時のCa²⁺濃度を解析した。Dystrophin遺伝子回復については、同じくエクソン45スキッピングが有効であったので、A088を用いて遺伝子発現回復型筋細胞も誘導した。電気刺激時の細胞内Ca²⁺濃度を測定すると、やはり無治療のDMD患者由来細胞でCa²⁺濃度が上昇しており、A088による遺伝子発現回復によりCa²⁺濃度は低下した。これらの結果により、DMD患者由来筋細胞における細胞内Ca²⁺の上昇は、Dystrophinの発現がないことに起因することが証明された。

最後に細胞内Ca²⁺の過剰な上昇が筋細胞の障害を来すのかどうか、イオノフォアを用いたCa²⁺負荷実験で培養上清中のCK活性を測定する事により検証した。結果はCa²⁺濃度の上昇はDMD患者由来細胞で強く起き、同時にCK値も高くなることが分かった。またこの病態再現系では、やはりアンチセンスオリゴを用いたDystrophin発現回復型の患者由来筋細胞において、CK値の上昇が抑えられることも明らかにした。さらに、健常由来とDMD患者由来のどちらにおいても、Ca²⁺の流入に関与するカチオンチャネルであるTRPファミリーの阻害剤であるRetinium Redを培地中に添加することによって、CK値の上昇が抑えられることを発見した。この結果から、Dystrophin発現の有無はCa²⁺流入に極めて重要な働きをしており、過剰なCa²⁺流入は細胞障害を引き起こすこと、またその機序の一端としてTRPファミリーのカチオンチャネルの関与が示唆された。

これまで患者由来細胞を用いた病態研究は、筋芽細胞の初代培養を用いて行われてきた。しかしDMD患者由来筋芽細胞は、増殖が遅い・分化効率が落ちるなど、そもそも患者体内の炎症性変化を受けて性質が変化しているため、「ジストロフィンが発現しないことで何が起きるのか？」を正確に反映するモデルとは言えない一面があった。今回DMD患者由来iPS細胞からの分化誘導では、ジスト

ロフィン発現の有無以外には健常細胞との差はなかった。その環境下で患者由来細胞において筋収縮時に細胞内Ca²⁺濃度が上昇する事を捉えたことは、DMDの初期病態を反映していると考えられる。今後、この疾患再現系を用いての創薬スクリーニングへと移行可能であり、新規創薬が期待される結果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 2件)

Modeling Duchenne muscular dystrophy by patient-derived iPS cells.
Emi Shoji, Sakurai Hidetoshi.
The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. 2014/01/16-01/18, 大阪市

疾患特異的iPS細胞を活用した筋疾患研究

櫻井英俊第13回日本再生医療学会総会(招待講演)2014/03/05, 京都市

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井英俊 (SAKURAI, Hidetoshi)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号: 80528745

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

松尾雅文 (MATSUO, Masafumi)

神戸学院大学大学院・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号： 10157266

粟屋智就 (AWAYA, Tomonari)

京都大学大学院医学研究科・発達小児科学・助教

研究者番号： 20589593