

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670038

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞より疾患モデル細胞・動物作製と発症機序及び遺伝子治療評価系構築

研究課題名(英文) Establishment of induced pluripotent stem cells from glycogen storage disease type 1b patient and making disease models

研究代表者

松永 民秀 (Matsunaga, Tamihide)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40209581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： グルコース-6-リン酸トランスポーター遺伝子変異による糖原病1b型患者の好中球減少のメカニズムを明らかにするために、ヒト骨髄性白血病細胞HL-60細胞を用いて研究を行った。その結果、グルコースの濃度依存的に酸化ストレスが高くなるのが原因であることが明らかになった。そこで、糖原病1b患者の線維芽細胞より樹立したiPS細胞を用いて検討した。患者由来iPS細胞より分化した肝細胞のグリコーゲン、ビルビン酸、乳酸、脂質含量は、健常人由来iPS細胞と比較して増加していた。また患者由来iPS細胞より分化した好中球は患者と同じ病態を示した。

研究成果の概要(英文)： Glycogen storage disease type 1b (GSD-1b) is caused by mutations in the glucose-6-phosphate transporter (G6PT) gene, which is involved in glycogen metabolism. Patients with GSD-1b are known to develop neutropenia as a specific symptom, but the causes remain unclear. We examined the mechanism of reactive oxygen species production after differentiation from HL-60 cells, and the collapse of glycogen metabolism because of G6PT deficiency. A high intracellular glucose level leads to an increase in ROS production by PKC induction.

We established induced pluripotent stem cells (iPS cells) from patients with GSD-1b. iPS cells-derived hepatocytes generated from patients with GSD1b metabolic abnormalities recapitulated key pathological features of the diseases affecting the patients from whom they were derived, such as glycogen, lactate, pyruvate and lipid accumulation. Cells that were differentiated into neutrophils also showed the GSD1b pathology.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒト骨髄性白血病細胞 好中球 糖原病1b

1. 研究開始当初の背景

疾患の生物学的研究や治療法・治療薬の開発では、疾患モデル細胞や動物が重要な役割を果たしている。特に、遺伝子疾患モデル細胞・動物の作製は、ノックアウトなど遺伝子操作モデル細胞・動物の手法が開発され飛躍的に発展した。しかし、遺伝子や生理機能に種差が認められることから、ヒト細胞あるいは組織・臓器を持つ疾患モデル動物の作製が強く望まれるが、患者の細胞・組織を用いるのは困難である。

糖原病 Ib 型 (glycogen storage disease type I: GSDIb, MIM232220) は、糖代謝に關与する glucose-6-phosphate transporter (G6PT) 遺伝子 (NM_001467, 11q23) の変異が原因で発症する先天代謝異常症であり、10 万人に 1 人の割合で発症する疾患である。GSDIb は、低血糖発作、肝腫大、低身長等の症候に加え、好中球減少/機能異常症を高率に合併する疾患である。本疾患に伴う好中球減少/機能異常症の機序は疾患モデル動物として作製された G6PT^{-/-} マウスの研究より、酸化ストレスによるアポトーシスが原因であると示唆された (Kim Y et al, *Blood* **111**:5704-5711, 2008)。しかし、G6PT^{-/-} が酸化ストレスを増加させる機序は未だ解明されていない。また、低血糖発作に対し生体肝移植が施行されるが、遺伝子治療が可能となれば患者や家族の負担軽減が期待される。しかし、ヒト細胞あるいは組織・臓器を有する疾患モデル細胞・動物を用いて評価を行った報告はない。

2. 研究の目的

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は再生医療のみならず創薬研究への応用研究が進められており、特に患者由来の iPS 細胞は疾患モデル細胞として発症機序の解明や治療法の開発などへの応用が大いに期待されている (Yoshida Y and Yamanaka S, *Circulation* **122**:80-87, 2010, Marchetto MC et al, *Cell* **143**:527-539, 2010)。申請者らは、近年 GSDIb 患者より 8 株の iPS 細胞 (GSDIb-iPS 細胞) を樹立した。そこで、本研究においては GSDIb-iPS 細胞から疾患モデル細胞に加え、ヒト組織・臓器を持つ疾患モデル動物を作製するためのヒト iPS 細胞由来肝細胞キメラマウスを作出することを目的とした。

3. 研究の方法

1) HL-60 細胞の好中球への分化とアポトーシス機構解析

ヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 細胞をジメチルスルホキシド (DMSO) にて好中球に分化し、好中球の機能を有しているか、細胞内の酸化ストレス上昇について解析を行った。また、G6PT 阻害剤 4,4'-ジイソチオシアナト-2,2'-スチルベンジスルホン酸 (DIDS) を添加することで GSDIb のモデルとなるか、活性酸

素種 (ROS) 及びアポトーシスマーカーである caspase 3 活性を経時的にモニターした。さらに、抗酸化剤やプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤など細胞内酸化ストレスの抑制に關与することが考えられる薬物の酸化ストレス強度に及ぼす抑制効果について検討を行った。

2) GSDIb-iPS 細胞から肝細胞及び好中球への分化

肝細胞への分化: GSDIb-iPS 細胞の肝細胞への分化誘導は申請者が確立した方法 (知的財産権 名称:人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法 出願番号:特願 2012-131240、出願日:2012 年 6 月 8 日 発明者:松永民秀他) に従って行った。すなわち、アクチピン A にて内胚葉、DMSO にて肝芽細胞に分化後、肝細胞増殖因子 HGF、オンコスタチン M、デキサメタゾンを含む培地にて培養し肝細胞に成熟させた。分化の確認は、肝細胞特異的タンパク質の mRNA 発現及びインドシアニングリーンの取り込みや薬物代謝等の機能を解析することで行った。また、申請者らが開発した従来の方法より、より成熟した肝細胞への分化誘導法についても併せて検討を行った。

好中球への分化: Morishima らの方法 (*J Cell Physiol* **226**:1283-12891, 2011) に従って行った。すなわち、GSDIb-iPS 細胞を造血幹・前駆細胞の増殖・分化を支持するストロマ細胞 (OP9 細胞) と血管増殖促進因子 VEGF 存在下共培養することで中胚葉に分化する。その後、新たな OP9 細胞に播き直し、インターロイキン 3 (IL-3)、幹細胞因子 SCF、トロンボポエチン TPO 存在下培養、さらに IL-3 及び G-CSF 存在下培養することで好中球を得た (Fig. 1)。分化の確認は、細胞表面マーカー (CD13、CD16 及び CD45) を細胞免疫染色することで行った。また、好中球の特徴的な機能である病原体貪食は標識された Zymosan 粒子 (Czop JK *Pathol Immunopathol Res* **5**:286-296, 1986) を使用して蛍光顕微鏡観察にて行った。

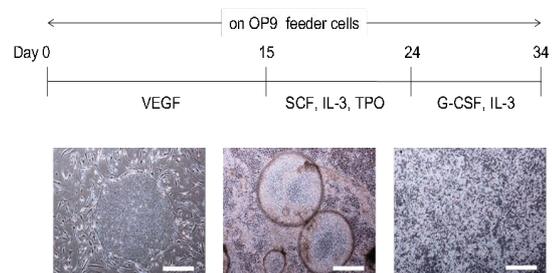


Fig. 1 GSDIb-iPS 細胞の好中球への分化標準プロトコル

写真左: 未分化ヒト iPS 細胞、写真中央: 分化誘導後の形成された iPS-sac、写真右: OP9 細胞上に浮遊細胞 (血球系細胞) 播種後

3) GSDIb-iPS 細胞の疾患モデル細胞としての評価

肝細胞：細胞中のグリコーゲン蓄積を periodic acid-Schiff (PAS) 染色にて評価した。また、グリコーゲン、乳酸、ピルビン酸及び中性脂肪量を市販の測定キットを用いて測定した。

好中球：ROS の測定およびアポトーシスのマーカーである caspase-3/7 と-9 活性を測定し (Maianski NA et al, *Blood* 99:672-679, 2002) 患者から採取した好中球における酸化ストレスの増加によるアポトーシスの惹起を検証した。また、ビタミン E、ビタミン C、Trolox C、カルシウムチャネルブロッカーなどの各種抗酸化剤やラジカルスカベンジャーを添加し、これら薬剤と好中球アポトーシスの関連を調査した。

4) GSDIb-iPS 細胞の好中球アポトーシスの機構解析

GSDIb-iPS 細胞由来好中球における酸化ストレスの増加によるアポトーシスの惹起を検証するため、酸化ストレスとプロテインキナーゼ C の活性化の関連について評価を行った。

5) iPS 細胞由来肝細胞移植による疾患モデル動物の作製

前記 2) に準拠して分化させた肝芽細胞及び肝細胞を TK-NOG マウスに移植した。移植は、分化誘導した細胞単独並びに血管内皮細胞及び間葉系幹細胞との共培養したものを、麻酔下腹部を切開し、門脈から注入した。ヒト肝細胞への置換率の予測は、マウス血中に含まれるヒトアルブミン量にて行い、定量は ELISA 法にて行った。

6) 疾患モデル細胞に対する G6PT 遺伝子導入効果

アデノウイルスベクターに、CMV あるいは G6PT 遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域を含むヒト G6PT 遺伝子組換えウイルスを構築した。

4. 研究成果

1) HL-60 細胞の好中球への分化とアポトーシス機構解析

ROS 誘発性物質 PMA 刺激による ROS 産生量を測定することで、HL60 細胞の好中球への分化を評価した。その結果、HL60 細胞は、DMSO 添加後から PMA 刺激による ROS 産生が認められ、その産生量は経時的に上昇した。そこで、HL60 細胞の好中球への分化 2 日目に G6PT 阻害剤 DIDS を添加した。その結果、分化 4 日目における DIDS 群の ROS 産生量は、DIDS 濃度依存的な上昇が確認された。また、caspase-3 活性は DIDS 群において control 群と比較し高く、DIDS 濃度依存的な上昇がみられた。さらに、ROS 産生経路阻害薬添加による caspase-3 活性への影響について検討したところ、DIDS 群における caspase-3 活性の上昇は、Trolox C、PKCβ

inhibitor、DPI を共存させることで DIDS 処理による ROS 産生は減少し、酸化ストレス強度はいずれも顕著に抑制された (Fig. 2)。

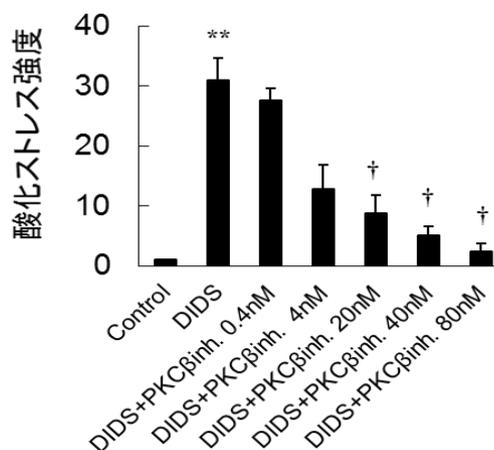


Fig.2 HL-60 細胞を用いた糖原病 Ib 型モデルにおける PKC 阻害剤条件下の ROS 産生 Mean ± S.E. (n = 6), ** p<0.01: vs control, †p<0.05, ‡p<0.01: vs DIDS

2) GSDIb-iPS 細胞から肝細胞及び好中球への分化

三次元培養法によるヒト肝臓を模したモデル形成を行い、ヒト生体での *in vitro* 微小肝臓モデルの構築を目的とした。立体培養可能なプレート (Cell-able) 及び培地を用いて三次元培養を行い、成熟化に対する影響について検討した。その結果、三次元培養法によって肝細胞はスフェロイドを形成し、肝細胞マーカー及び主要な薬物代謝酵素である CYP3A の遺伝子発現は、二次元培養法と比較し顕著に高かった。また、三次元スフェロイド外膜はナトリウムタウロコル酸共輸送ポリペプチド (NTCP) や有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1 (OATP1B1) を高発現し、肝臓血管側極性を示した。

GSDIb-iPS 細胞を 25 日間肝細胞へ分化誘導することにより、肝細胞マーカーであるアルブミン及び薬物代謝酵素 CYP3A4 等の発現が認められた。また、肝細胞特異的に取り込まれることが知られているインドシアニグリーン (ICG) の共存下培養することで ICG の取り込みが認められた。また、培地交換後 6 時間の培養で ICG の放出が認められたことから肝細胞特異的な機能が認められた。

好中球の分化誘導は sac 法にて行った。Sac 成熟の指標である造血幹細胞マーカー CD34 発現量及び sac の直径は標準プロトコル群で最も大きく、アクチビン A 添加により濃度依存的に減少した。一方、SB 431542 を添加した場合、CD34 発現量は標準プロトコルと比較して約 40% に、sac の直径は約 25% に低下した。また、標準プロトコル群及びアクチビン A 0.3 ng/mL 群の sac から好中球へ分化誘導した細胞は、ザイモサン貪食能を有したのに対し、アクチビン A 3 ng/mL 群及び 30 ng/mL 群では貪食能を示さなかった (Fig. 3) 以上

のことから、sac 形成及び好中球誘導においてアクチビン A は必要であるが、内因的なアクチビン A 量で十分であり、アクチビン A 添加は好中球への分化をむしろ抑制することが示唆された。そこで、以後アクチビン A を添加しない標準プロトコルで分化誘導した好中球について検討を行った。

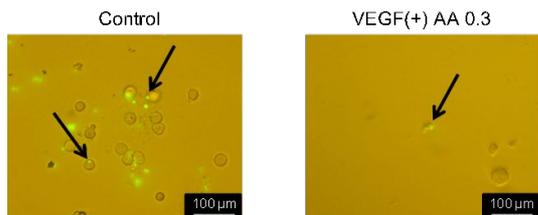


Fig.3 分化開始後 31 日目における好中球様細胞の貪食能
矢印 (↓); Zymosan A の取り込み、Control ; 標準プロトコル群, AA ; activin A , AA 濃度の単位は ng/mL (標準プロトコル (Control) 群、VEGF (+) AA 0.3 群、VEGF (+) AA 3 群、VEGF (+) AA 30 群において貪食能試験を実施したが、Zymosan A の取り込みが認められたのは、control 群及び VEGF (+) AA 0.3 群だけであった。)

3) GSDIb-iPS 細胞の疾患モデル細胞としての評価

GSDIb-iPS 細胞由来肝細胞のグリコーゲン及び脂質蓄積について染色法にて検討したところ、健常人の iPS 細胞由来肝細胞と比較してより強く染色された (Fig. 4, 5)。また、解糖系代謝産物である乳酸、ピルビン酸並びに脂肪含量においても健常人の iPS 細胞由来肝細胞と比較して高かった (Fig. 6)。

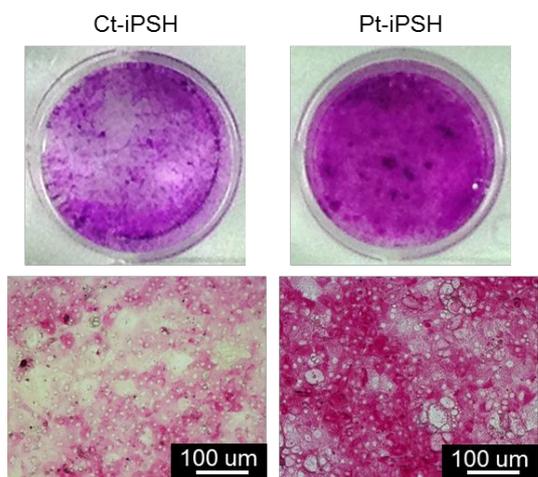


Fig.4 iPS 細胞由来肝細胞のグリコーゲン蓄積 PAS 染色。Ct-iPSH: 健常人の iPS 細胞由来肝細胞、Pt-iPSH: GSDIb-iPS 細胞由来肝細胞

分化開始後 30 日目において GSDIb-iPS 細胞及び健常人 iPS 細胞由来好中球においてアポトーシスシグナルの下流に位置するカスパーゼ-9 及びさらにその下流に位置し、タンパク質を切断することでアポトーシスを引き起こすカスパーゼ-3/7 の活性を測定した。その結果、GSDIb-iPS 細胞由来好中球のカスパーゼ-9、-3/7 活性は健常人 iPS 細胞由来好中球に対して、それぞれ 2.8 倍、4.4 倍であった (Fig. 7)。分化開始後 30 日目に GSDIb-iPS 細胞及び健常人 iPS 細胞由来好中球の O² 産生量を測定したところ、GSDIb-iPS 細胞由来好中球においてのみ、O² 産生が確認された (Fig. 8)。

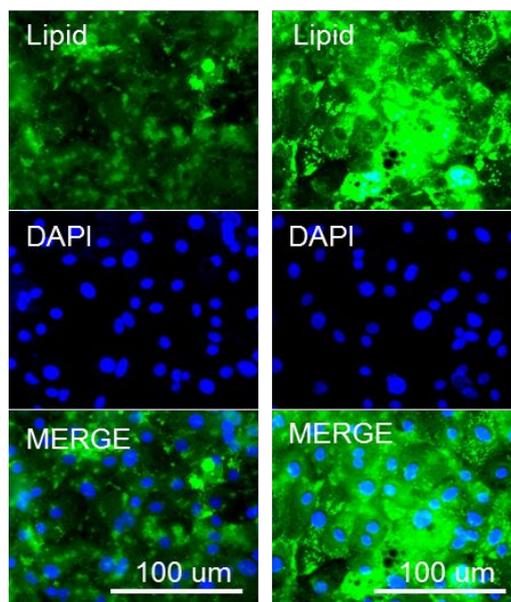


Fig. 5 iPS 細胞由来肝細胞における脂質蓄積 Lipid: ポロンジピロメテン染色、DAPI: 核染色。Ct-iPSH: 健常人の iPS 細胞由来肝細胞、Pt-iPSH: GSDIb-iPS 細胞由来肝細胞

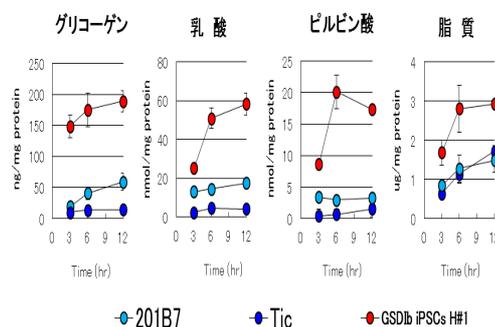


Fig. 6 iPS 細胞由来肝細胞におけるグリコーゲン、乳酸、ピルビン酸、脂質蓄積 201B7, Tic: 健常人 iPS 細胞、GSDIb-iPSCs H#1: GSDIb-iPS 細胞#1 株由来肝細胞

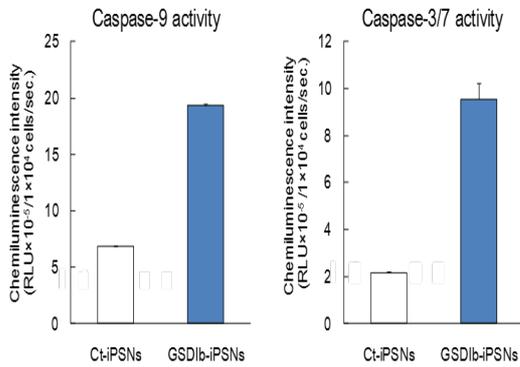


Fig. 7 分化開始後 30 日目における細胞のカパーゼ活性の比較
Mean ± S.E. (n = 6)
Ct-iPSNs ; 健常人 iPS 細胞由来好中球、
GSDIb-iPSNs ; GSDIb-iPS 細胞由来好中球

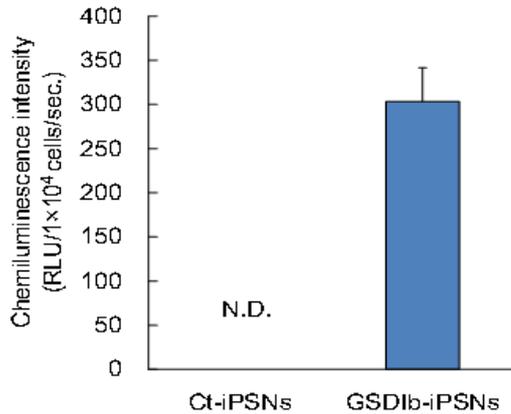


Fig. 8 分化開始後 30 日目における細胞の O²⁻ 産生の比較
Mean ± S.E. (n = 5-6)
Ct-iPSNs ; 健常人 iPS 細胞由来好中球、
GSDIb-iPSNs ; GSDIb-iPS 細胞由来好中球

4) GSDIb-iPS 細胞の好中球アポトーシスの機構解析

分化開始後 30 日目において GSDIb-iPS 細胞でスーパーオキシドアニオン (O²⁻) 産生が確認された。O²⁻ 産生は、抗酸化作用を持つビタミン E アナログである Trolox C、NAD(P)H oxidase 2 (NOX2) 阻害剤である DPI、電子伝達系の複合体 I 阻害剤である rotenone、protein kinase C (PKC) β 特異的阻害剤である IYIAP、非特異的 PKC 阻害剤である chelerythrine 添加により濃度依存的に減少し、特に 100 μM の IYIAP 添加では O²⁻ 産生が完全に抑制された (Fig. 9)。以上のことから、GSDIb では PKC の活性化により過剰に O²⁻ が産生され、その結果として好中球の減少が起こることが示唆された。

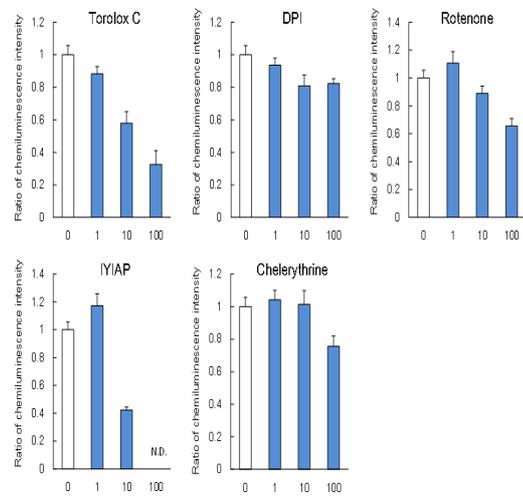


Fig. 9 各種阻害剤添加時における O²⁻ 産生
Mean ± S.E. (n = 4)、阻害剤 0 μM=1、DPI ;
diphenyleneiodonium、IYIAP ; 3-(1-(3-
Imidazol-1-yl propyl)-1H-indol-3-yl)-4-
anilino-1H-pyrrole-2,5-dione、各種阻害剤濃度
の単位は μM

5) iPS 細胞由来肝細胞移植による疾患モデル動物の作製

疾患モデル動物作製の予備的検討として、ヒト肝細胞キメラマウス作製について検討を行った。肝障害超免疫不全マウスの TK-NOG マウス門脈よりヒト iPS 細胞由来肝細胞単独及びマウス由来不死化血管内皮細胞、マウス間葉系幹細胞、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を混合した細胞塊を門脈経由で移植した。移植 12 週後に肝臓を確認したところ、肝細胞のみを移植した群では外見上の変化は特に観察されなかったが、混合細胞塊を移植したマウスにおいて腫瘍と思われる塊が観察された。また、移植 1 週間後は両群ともヒトアルブミンの分泌を確認できたが、徐々に低下し、移植 12 週後は全く検出不可能であった。

6) 疾患モデル細胞に対する G6PT 遺伝子導入効果

GSDIb-iPS 細胞由来肝細胞を Cell-able に播種し、正常 G6PT 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを感染させた。感染後のグリコーゲン蓄積及びグルコース代謝物あるいはトリグリセリド含量について解析を行った。その結果、正常 G6PT 遺伝子導入によりいずれの含量も低下した (Fig. 10)。以上の結果より、正常 G6PT 遺伝子導入が治療に有効であることが示唆された。また、長期培養により差が無くなったが、アデノウイルスベクターによる発現が一時的な発現によることが推察された。

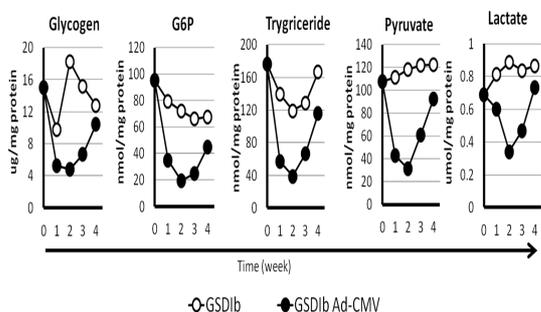


Fig. 10 GSDIb-iPS 細胞由来肝細胞への正常 G6PT 遺伝子導入の効果
 GSDIb: GSDIb-iPS 細胞由来肝細胞、GSDIb Ad-CMV: Ad-G6PT 遺伝子導入 GSDIb-iPS 細胞由来肝細胞

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 3 件)

- 1 岩尾岳洋、松永民秀: 個別化(オーダーメイド)医療を志向した薬物動態研究及び毒性試験へのヒト iPS 細胞の利用. *Organ Biology* 22(1):39-48, 2015. 査読無, DOI: 無
- 2 岩尾岳洋、松永民秀: ヒト iPS 細胞の分化誘導の現状と創薬研究への応用. *HAB Newsletter* 22:6-7, 2015. 査読無, DOI: 無
- 3 Satoh D, Ohte M, Maeda T, Nakamura K, Matsunaga T. G6PT Inhibition Model Using HL-60 Cells and Induction of ROS Production through PKC/NOX2 Activation: Clinical Condition for Elucidation of Glycogen Storage Disease Type Ib. *Biol Pharm Bull* 37: 534-540, 2014. 査読有, DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00708>

[学会発表](計 5 件)

- 1 松永民秀, 栗木駿輔, 坂本 栄, 岩尾岳洋: ヒト iPS 細胞から肝細胞への低分子化合物を用いた分化誘導. 細胞アッセイ研究会シンポジウム, 静岡, 2016 年 1 月 19 日.
- 2 阿武志保, 岩尾岳洋, 金森達朗, 松永民秀: 新規三次元培養培地を用いた浮遊培養法でのヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2015 年 11 月 1-4 日.
- 3 松永民秀: ヒト iPS 細胞の創薬研究への応用: 肝細胞及び腸管上皮細胞への誘導と機能. 医療薬学フォーラム 2015/第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム(招待講演), 名古屋, 2015 年 7 月 4-5 日.

4 Matsunaga T: Utility of iPS cells for study of drug metabolism and pharmacokinetics: Differentiation of human iPS cells into hepatocytes and enterocytes. The 19th International Conference of Cytochrome P450. Tokyo, June 12-15, 2015. (招待講演) (国際学会)

5 宮野百合香, 大手万理子, 佐藤大介, 前田徹, 中村克徳, 松永民秀. 糖原病 Ib 型患者 iPS 細胞を用いた好中球モデルの作成. 医療薬学フォーラム 2014/第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 東京, 2014 年 06 月 28 日 ~ 2014 年 06 月 29 日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ryc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 民秀 (MATSUNAGA, Tamihide)
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号: 40209581

(2) 研究分担者

伊藤 哲哉 (ITO, Tetsuya)
 藤田保健衛生大学・医学部・教授
 研究者番号: 80336677

(3) 連携研究者

前田 徹 (MAEDA, Tohru)
 金城学院大学・薬学部・准教授
 研究者番号: 90381855