

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670269

研究課題名(和文) 中枢神経症状を伴うリソソーム病患者由来iN細胞の誘導と神経変性制御機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of induced neurons (iN cells) derived from lysosomal disease patients involving neurological symptoms and elucidation of regulatory mechanism of neurodegeneration

研究代表者

伊藤 孝司 (ITO, Kohji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：00184656

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)：中枢神経症状を伴う  $\alpha$ -Hexosaminidase (Hex) 鎖欠損症(Tay-Sachs病, TSD)及びCathepsin A欠損症(Galactosialidosis)を対象とし、ダイレクトリプログラミング法による患者皮膚線維芽細胞からの induced Neuron (iN細胞)の誘導、また患者iPS細胞からの神経細胞の分化誘導を目的として研究を進め、iPS細胞からの大脳皮質ニューロン(CN)の誘導に成功した。GM2蓄積と栄養因子非存在下での細胞死亢進を伴うTSD-CNへのHex補充により、蓄積GM2の減少と生存率が回復し、本誘導系は神経病態の解明及び治療効果の評価に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to establish induced Neurons (iN cells) by direct reprogramming from patient fibroblasts and/or induce neurons from the iPS cells derived from the patient with lysosomal diseases involving neurological symptoms. We succeeded in inducing cortical neurons (CN) from the patient iPS cells with Tay-Sachs disease (TSD, Hex deficiency) and cathepsin A (CTSA) deficiency, in which their substrate accumulation was observed. The TSD-CN showed lower cell viability in the absence of neurotrophic factors, that was restored by normal recombinant Hex enzyme replacement. The CN culture system induced from the iPS cells with neurodegenerative lysosomal diseases was considered to be useful for studying the neuropathogenesis and evaluating therapeutic approaches.

研究分野：分子病理学・分子治療学

 キーワード：ダイレクトリプログラミング 疾患iPS細胞 induced Neuron (iN細胞) リソソーム病 蛍光イメージング  
 ング トラフィッキング

### 1. 研究開始当初の背景

リソソーム酵素の単一遺伝子変異に基づくリソソーム蓄積症 (Lysosomal storage disease, LSD) の多くは、神経系での基質の過剰蓄積が原因で中枢神経症状を発症する。しかし発症機構は不明の部分が多く、有効な治療法も無いのが現状である。

これまで代表者の伊藤は、リソソーム性  $\beta$ -Hexosaminidase (Hex) の遺伝的欠損により脳内 GM2 ganglioside (GM2) 等の脳内過剰蓄積と中枢神経症状を伴う Tay-Sachs 病 (TSD) や Sandhoff 病 (SD) および日本人種に多い CathepsinA (CTSA) の劣性変異により、二次的に Neuraminidase-1 (NEU1) が同時欠損し、末端シアル酸含有糖鎖の脳内蓄積と中枢神経障害を伴う Galactosialidosis (GS) を対象に、これらの疾患の神経病態の解明や治療用シーズを開発してきた。本研究では、通常、生検試料として利用できない患者由来神経系細胞の代替として、ダイレクトリプログラミング法により、患者線維芽細胞株から直接神経系細胞を誘導する技術、または患者体細胞から樹立した iPS 細胞から神経系細胞を分化誘導する方法の確立を目的として研究を実施した。また、連携研究者の浦野らが開発した酸性 pH 活性化蛍光プローブまたは新規人工蛍光基質を用い、患者由来培養細胞に対し補充する酵素の in vivo イメージング法の開発を検討した。

### 2. 研究の目的

近年、神経症状を伴う LSD (ムコ多糖症 I 型や II 型など) に対し、組換え酵素製剤を患者の脳脊髄液内に投与する、酵素補充療法 (Enzyme replacement therapy, ERT) の臨床試験が実施されている。我々は、これまで Hex 欠損に基づく SD モデルマウスに対し、末端マンノース 6-リン酸 (M6P) 含有糖鎖が付加された改変型ヒト Hex を開発し、脳室 (脊髄液) 内への同酵素の補充により、神経系細胞表面の M6P レセプターを介した細胞内取り込みと蓄積 GM2 の分解、運動機能の改善と寿命を延長させることに成功してきた (Tsuji, D. et al. *Ann. Neurol.*, 2011; Matsuoka, K. et al. *Mol. Ther.*, 2011, Kitakaze, K. et al. *J. Clin. Invest.*, 2016)。連携研究者の浦野らは、酸性 pH 条件下で初めて蛍光を示す酸性 pH 活性化蛍光プローブの開発に成功しており (Urano, Y. et al. *Nat. Med.*, 2009) 組換えリソソーム酵素とのコンジュゲートを用いることにより、脳実質神経系細胞内の酸性 pH オルガネラであるリソソームへの輸送イメージングに応用可能と考えられる。

しかしこれまでヒト神経系細胞に対するこれらの治療用シーズや蛍光プローブの効果や有用性は検討できていない。最近、分担研

究者の辻は、TSD および GS 患者由来 iPS 細胞株の樹立に成功しており、同細胞株からのヒト神経系培養細胞の分化誘導系を構築できれば、患者由来ヒト神経系細胞における病態や治療用シーズの有効性を検討することができると考えられる。また近年、皮膚線維芽細胞などの組織体細胞に、複数の転写制御遺伝子を導入することにより、直接目的の他の組織細胞へと分化転換できることが報告されている (Young & Lee, *Cell* 152, 2013)。本研究では、GS 患者由来皮膚線維芽細胞株に、転写因子 NGN2 および SOX11 遺伝子を導入することにより神経細胞への分化転換を図る、ダイレクトリプログラミング法を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) ダイレクトリプログラミング法による GS 患者皮膚線維芽細胞株の神経細胞への分化転換の試み

ヒト CTSA の遺伝的欠損に基づき、糖鎖分解酵素の NEU1 と GLB1 ( $\beta$ -Galactosidase) の同時低下と、末端シアル酸含有糖鎖の脳内過剰蓄積および中枢神経症状を伴う GS 患者由来皮膚線維芽細胞株に、レンチウイルスベクターを用い、ヒト Neurogenin2 (NGN2) および SOX11 を同時導入し、神経細胞 (運動ニューロンを含む) へのダイレクトリプログラミングを試みた。細胞形態は、線維芽細胞の紡錘形から、神経突起様構造を含む変動が観察された。しかし、成熟神経細胞マーカーである  $\beta$ -Tubulin III や Neurofilament-L などを安定発現する神経細胞への分化転換には至らなかった。

(2) 中枢神経症状を伴うリソソーム病患者皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞株の樹立と大脳皮質ニューロンへの分化誘導

既に、徳島大倫理委員会の承認を得て、TSD 患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞株の樹立に成功している。本研究では、早期乳児型 GS 患者由来皮膚線維芽細胞に、センダイウイルスベクターを用いて、山中因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4 および c-MYC) を導入し、未分化能と 3 胚葉への多分化能を併せもつ GS 患者 iPS 細胞株を樹立した。また京都大 iPS 研の井上治久教授らが開発した大脳皮質ニューロン (CN) への分化誘導法 (Kondoh, T. et al. *Cell Stem Cell*, 2013) により、神経細胞への分化誘導を試みた。誘導開始 56 日後には、TSD および GS 患者 iPS 由来細胞集団は、 $\beta$ -Tubulin III や Neurofilament-L などの神経細胞マーカーおよび CTIP2, TBR1 および STAR2 などの大脳皮質特異的な転写因子を発現していた (図 1)。

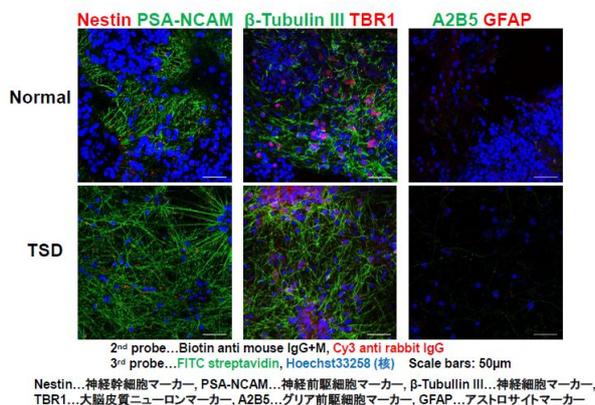


図1 健康者及びTSD患者iPS細胞からの大脳皮質ニューロンの分化誘導

またGS-CNでは、Cathepsin A および NEU1 活性の同時低下と、末端 $\alpha 2,3$ 結合シアル酸の認識抗体 (Anti- $\alpha 2,3$ Sial) との免疫反応性を示し、末端シアル酸含有糖鎖の蓄積が観察された。

さらに同様の培養条件で、TSD 患者 iPS 細胞からの大脳皮質ニューロンへの分化誘導にも成功した。同培養系に CHO 細胞由来改変型 HexB (mod2B) 及び組換え CTSA を投与したところ、カチオン非依存性 M6P レセプターとの結合を介して取り込まれ、欠損酵素活性を回復させるとともに、神経栄養因子非存在下での TSD-CN の神経細胞死を有意に抑制させることが明らかになった (図2)。

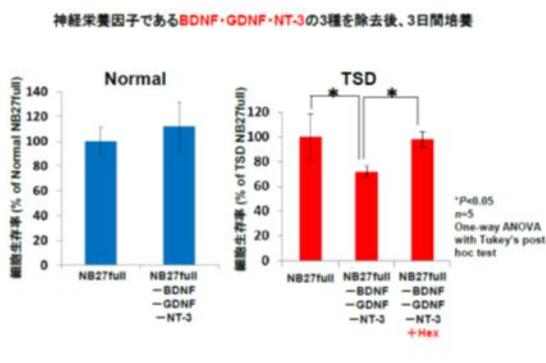


図2 神経栄養因子非存在下でのTSD iPS細胞由来神経細胞死の亢進と組換えヒトHex補充による回復

従って、GS および TSD 患者由来 iPS 細胞から分化誘導された培養ヒト大脳皮質ニューロンは、各リソソーム病患者由来の培養神経細胞モデル系として、神経病態解析や治療用シーズの有効性評価に利用可能と考えられる。

(3) 改変型ヒト Hex $\beta$ 鎖遺伝子導入 CHO 細胞株由来高機能型ヒト HexB の細胞内局在のイメージング

代表者の伊藤は、ヒト HexA ( $\alpha\beta$ ヘテロ二量体) 及び HexB ( $\beta\beta$ ホモ二量体) の結晶構造を基に、 $\beta$ 鎖活性ポケットの触媒部位アミノ鎖残基 DL ( $\beta 452-453$ ) を、酸性基質認識・GM2 分解に関わる $\alpha$ 鎖型 NR ( $\alpha 423-424$ ) に、また $\beta$ 鎖 RQNL ( $\beta 312-315$ ) 配列を GSEP ( $\alpha 280-283$ ) に、さらに隣接する LDS ( $\beta 316-318$ ) 配列

を SGT ( $\alpha 284-286$ ) に置換する改変型ヒト $\beta$ 鎖遺伝子を構築して CHO 細胞に導入し高発現株を樹立している。また培養上清から発現産物 (改変型 HexB, mod2B) の精製に成功し、in vitro 及び in vivo で GM2 分解能および細胞内でプロテアーゼ耐性を示すことを明らかにしている。

(4) 新規人工蛍光 Hex 基質及び酸性 pH 活性化蛍光プローブを用いる改変型ヒト HexB の蛍光イメージング

CHO 細胞で発現した改変型ヒト HexB (mod2B) には末端 M6P 含有 N 型糖鎖が複数付加されており、標的細胞表面の M6P レセプターと結合後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソームへと輸送される。本研究では、東京大院 (医学系) の浦野、浅沼、神谷らが合成に成功した、 $\beta$ -Hex 活性に対する新規人工蛍光基質 HMDER- $\beta$ GlcNAc (細胞膜透過性 Rhodol 誘導体) を使い、SD 患者由来培養皮膚線維芽細胞に取り込まれリソソーム内に輸送された mod2B による分解活性を培養系で可視化することに成功した。

また浦野らが開発した、酸性 pH 活性化蛍光プローブ (AcidFluor<sup>TM</sup> ORANGE, AFO) と精製 mod2B とのコンジュゲートを作製し、SD 患者由来線維芽細胞の培養系に添加したところ、細胞内に取り込まれた後、酸性 pH のリソソーム内まで輸送され、顆粒状の蛍光を示すことが明らかになった。従って、本蛍光プローブ標識された組換えリソソーム酵素の、細胞外からリソソーム内への輸送イメージングが可能になった。

#### 4. 研究成果

リソソーム酵素の遺伝的欠損に基づき、脳内基質の過剰蓄積と中枢神経症状を発症する神経難病のモデル構築と治療法開発・評価への応用を目的とし、Hex 欠損に基づく GM2 gangliosidosis の一種である Tay-Sachs 病および CTSA 欠損症 Galactosialidosis 患者由来 iPS 細胞株から、大脳皮質ニューロン (CN) の分化誘導系を構築した。両神経細胞では酵素欠損に基づく基質蓄積とともに、正常組換え酵素の投与による酵素活性回復と蓄積脂質の減少を評価でき、中枢神経症状を伴うリソソーム病患者由来培養神経細胞のモデルシステムとして利用できると考えられた。また酸性 pH 活性化蛍光プローブを用いて、細胞外から細胞内リソソームへの輸送イメージングを可能にする培養システムを構築できた。今後、リソソーム蓄積に基づく神経変性機構やシナプス病態解明および治療法の有効性評価への応用が期待される。

## 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8件)

K. Kitakaze, Y. Mizutani, E. Sugiyama, C. Tasaki, D. Tsuji, N. Maita, T. Hirokawa, D. Asanuma, M. Kamiya, K. Sato, M. Setou, Y. Urano, T. Togawa, A. Otaka, H. Sakuraba and K. Itoh. Protease-resistant modified human -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model. *J. Clin. Invest.* (査読有) vol.126(5), pp.1691-1703, 2016. DOI: 10.1172/JCI185300.

E. Kawashita, D. Tsuji, Y. Kanno, K. Tsuchida, K. Itoh. Potentiation of uridine diphosphate-induced production of macrophage inflammatory protein-1 alpha in microglia derived from Sandhoff disease model mice. *J. Inher. Metab. Dis. Rep.* (査読有) Open (11), pp.1-9, 2015. DOI: 10.1007/8904\_2015\_496.

M.M. Rahman, T. Hirokawa, D. Tsuji, J. Tsukimoto, S. Hitaoka, H. Chuman, K. Itoh. Novel pH-dependent regulation of human cytosolic sialidase 2 (NEU2) activities by siastatin B and structural prediction of NEU2/siastatin B complex. *Biochem. Biophys. Rep.* (査読有) vol.4(12), pp.234-242, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrep.2015.09.017.

F.X. Gallat, N. Matsugaki, N.P. Coussens, K.J. Yagi, M. Boudes, T. Higashi, D. Tsuji, Y. Tatano, M. Suzuki, E. Mizohata, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, J. Park, C. Song, T. Hatsui, M. Yabashi, E. Nango, K. Itoh, F. Coulibaly, S. Tobe, S. Ramaswamy, B. Stay, S. Iwata, \*L.M. Chavas. In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (査読有) vol.369(1647), pp.20130497, 2014. DOI: 10.1098/rstb.2013.0497.

N. Fukuishi, S. Murakami, A. Ohno, N. Yamanaka, N. Matsui, K. Fukutsuji, S. Yamada, K. Itoh, M. Akagi. Does -hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of -hexosaminidase

in mast cell granules. *J. Immunol.* vol.193(4), pp1886-1894, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1302520.

### [学会発表](計54件)

辻大輔, 山口沙恵香, 本窪田絢香, 水谷安通, 伊藤孝司. GM2 ガングリオシド-ドーシス患者由来 iPS 細胞を用いた神経系病態モデルの構築及び病態シグナル解析. 日本薬学会第136年会. パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市. 2016.3.27. (国内・口頭)

伊藤孝司, 西岡宗一郎, 辻大輔, 東哲也, 真板宣夫, 小林功, 瀬筒秀樹, 湯本史明, 原園景, 石井明子, 川崎ナナ. 第15回蛋白質科学会年会. あわぎんホール, 徳島県徳島市. 2015.6.27. (国内・シンポジウム・口頭)

K. Miyoshi, T. Horiguchi, A. Tanimura, H. Hiroko, Y. Touda, S. Kagami, K. Mori, D. Tsuji, K. Itoh, T. Noma. Gaucher disease caused by possible atypical mechanism. Gordon Research Conference. Hotel Galvez, Galveston, TX, USA. 2015.3.17. (国際・ポスター)

K. Kitakaze, C. Tasaki, M. MizutaMni, E. Sugiyama, M. Ikuo, M. Kamiya, M. Setou, Y. Urano, K. Itoh. Development of protease-resistant modified human beta-hexosaminidase B and evaluation of intracerebroventricular replacement effects on GM2 gangliosidosis model mice. The 11th Annual World Symposium 2015. Hotel Hyatt Regency, Orlando, FL, USA. 2015.2.10. (国際・口頭)

K. Sato, K. Kitakaze, K. Sakamoto, A. Shigenaga, D. Tsuji, K. Itoh, A. Otaka. Synthetic study of GM2 activator protein using N-sulfanylethylanilide peptide. The 33rd European Peptide Symposium. National Palace of Culture Sofia, Sofia, Bulgaria. 2014.8.31. (国際・ポスター)

### [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.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab/btc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 孝司 ( ITOH, Kohji )  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：00184656

(2) 研究分担者

辻 大輔 ( TSUJI, Daisuke )  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号：00423400

幾尾 真理子 ( IKUO, Mariko )  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教  
研究者番号：60713401

(3) 連携研究者

浦野 泰照 ( URANO, Yasuteru )  
東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：20292956