

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870544

研究課題名(和文) ヒト糖原病Ia型iPS細胞における遺伝子修復法の確立と新規の病態解析

研究課題名(英文) Establish of gene repair methods and analysis of pathological conditions using iPS cells derived from patients with glycogen storage disease type Ia

研究代表者

城戸 淳(Kido, Jun)

熊本大学・医学部附属病院・診療助手

研究者番号：70721215

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)：糖原病Ia型とは、endoplasmic reticulum内に存在するGlucose-6-Phosphatase (G6Pase)の欠損によって、肝臓内のグリコーゲンの蓄積と、糖新生ができないことによる低血糖をおこす疾患である。本研究は、G6Pase遺伝子に変異を持った糖原病Ia型患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、健常者および糖原病Ia型患者由来のiPS細胞から成熟肝細胞の分化を確立した。オートファジーは、糖原病Ia型患者由来の肝細胞のほうが健常者の肝細胞よりも亢進しており、低グルコースの培養条件下においては、さらに糖原病Ia型患者由来の肝細胞のほうが顕著に亢進していた。

研究成果の概要(英文)：Glycogen storage disease type Ia (GSD Ia) develop accumulation of glycogen in liver and hypoglycemia by impaired glyconeogenesis because of defect of Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) in endoplasmic reticulum. In this study, we developed each iPS cell line with mutation of G6Pase gene from two patients with GSD Ia. Then, we induced iPS cells derived from normal subject and patients with GSD Ia into differentiated hepatocyte. The autophagy in hepatocyte from patients with GSD Ia more enhanced compared to that of hepatocyte from normal subject. Moreover, the autophagy in hepatocyte from patients with GSD Ia increasingly upregulated under low-glucose culture.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：糖原病Ia型 iPS細胞 肝臓

1. 研究開始当初の背景

糖原病とは、グリコーゲンの新生あるいは分解の過程で働く酵素の異常により引き起こされる疾患である。グリコーゲンは、主に肝臓と筋肉に蓄積されるため、その障害は肝臓、筋肉またはその両方に発生する。糖原病には12を超える病型があり、特に、糖原病 Ia 型は、endoplasmic reticulum (ER) 内に存在する Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) の欠損によって引き起こされ、糖原病の中でも最多である。症状としては、低身長、低血糖、肝種大、高脂血症、高尿酸血症、高乳酸血症、貧血、肝アデノーマ形成、腎障害および肝細胞ガン形成等がある。肝型糖原病の治療は、血糖のコントロールが重要であり、頻回食およびコーンスターチ療法が基本である。また、血糖コントロールだけでは、糖原病 Ia 型でおこる高尿酸血症や高脂血症等の合併症は軽快しないことが多く、合併症に対する治療も重要である。糖原病 Ia 型の根本的治療として、遺伝子治療が有効な手段の一つとして考えられているが、現在実用化されている有効な根治治療は、肝移植のみであり、肝移植に代わる新規の根治治療法の開発が必要である。さらに、脂肪肝、肝アデノーマおよび肝ガン形成のメカニズムも解明されておらず、これらの病態を解析するツールを開発することも重要である。

2. 研究の目的

ヒトの ES/iPS 細胞の多数の遺伝子座において、効率よく遺伝子ターゲティングに成功していたヘルパー依存型アデノウイルスベクターや Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR/Cas9) を利用して、ヒト糖原病 Ia 型 iPS 細胞に対する遺伝子治療ツールの開発を目的とした。さらに、糖原病 Ia 型における高脂血症や脂肪肝のメカニズムは、不明な点が多く、さらに肝アデノーマや肝

細胞ガンの形成されるメカニズムについては全く不明であるため、ヒト糖原病 Ia 型 iPS 細胞、遺伝子修復後のヒト糖原病 Ia 型 iPS 細胞、ヒト健常者 iPS 細胞 から成熟肝細胞に分化誘導し、これらの成熟肝細胞の機能、ER ストレス、オートファジーの活性化等について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

- a. 糖原病 Ia 型患者の皮膚線維芽細胞に 4 因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, C-Myc) を搭載したセンダイウイルスベクターを感染させることによりヒト糖原病 Ia 型 iPS 細胞を作製する。
- b. ヒト G6PC 遺伝子座 (糖原病 Ia 型の原因遺伝子) のイントロンヘネオマイシン耐性遺伝子発現カセット (PGK-neo) を挿入した HDAd-hG6PC ベクターを作成する。この HDAd-hG6PC ベクター GSDIa-iPS に感染し、ネオマイシンガンシクロビル二重耐性コロニーより、変異 G6PC 遺伝子座が修復された iPS 細胞クローンを同定する。または、CRISPR を発現するプラスミド (pX330 または pX335) にヒト G6PC の標的部位にあたるオリゴヌクレオチドを組み込むことにより、pX330-G6PC または pX335-G6PC を作成する。また、FRT-PGK-neomycin-FRT donor template (G6PC) を作成し、これを pX330-G6PC または pX335-G6PC とともに GSDIa-iPSC に transfect し、生じる薬剤耐性コロニーを解析することで、変異 G6PC 遺伝子座が修復されたかを確認する。
- c. Soga M et al. 2015 で行われた肝細胞分化のプロトコルを使用して、ヒト糖原病 Ia 型 iPS 細胞とヒト健常者 iPS 細胞から成熟肝細胞の樹立を行う。この方法で得られた成熟肝細胞について、アルブミン産性能、グリコーゲンの蓄積、インドシアニンググリーン の取り込みおよび放出能、ATP 産性

謝酵素の遺伝子発現があった (図4)。

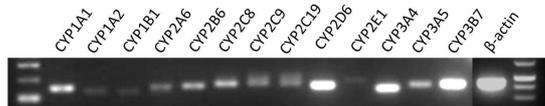


図4. 糖原病 Ia 型患者由来の肝細胞の CYP の発現

d. Song Z et al. 2009, Si-Tayeb K et al. 2010 および Chen YF et al. 2012; 55:が行っていた肝臓分化誘導プロトコールを参考にして、シングルセルの iPS 細胞(DEF-CS™ Culture System) から肝臓分化誘導を行ったが、健常者由来の iPS 細胞 (N1) のみ肝細胞作製が可能であり、201B7 の cell line では不可能であった。また、糖原病 Ia 型患者由来の iPS 細胞においても安定した成熟肝細胞の作製はできなかった。

e. ヒト糖原病 Ia 型 iPS 細胞 (2 個体) とヒト健常者 iPS 細胞 (1 個体) から得られた成熟肝細胞は、プロトコール上、18 日で得られる。これをさらに 25 日まで培養したが、通常の培養条件では、ER ストレスマーカーである ELF-2, CHOP, BIP および XBP-1 splice の遺伝子発現は、糖原病 Ia 型肝細胞と健常者肝細胞の両者間では、明らかな差が認められなかった (図5)。

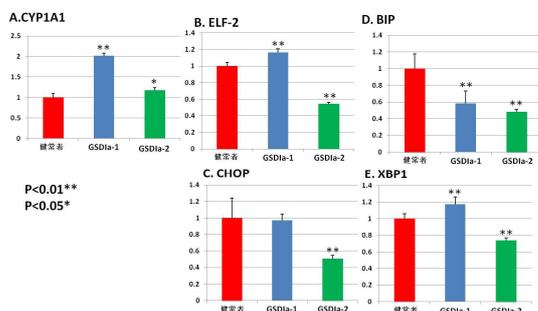


図5. ELF-2, CHOP, BIP および XBP-1 splice の遺伝子発現 (qRT-PCR)
GSDIa-2 の肝細胞は、健常者に比べて ELF-2, CHOP, BIP および XBP-1 splice の遺伝子発現は低い傾向にあったが、GSDIa-1 の肝細胞でのこれらの遺伝子発現は、健常者に比べて明らかな変化はなかった。

また、オートファジーのマーカーである LC3 の発現は、Day22 の通常の肝細胞分化培養下において、糖原病 Ia 型患者由来の肝細胞のほうが健常者の肝細胞よりも亢進しており、さらにと 12 時間の低グルコースの培養条件下(グルコースフリーの DMEM + 10%FBS) では、LC3 の発現亢進が顕著であった(図6)。

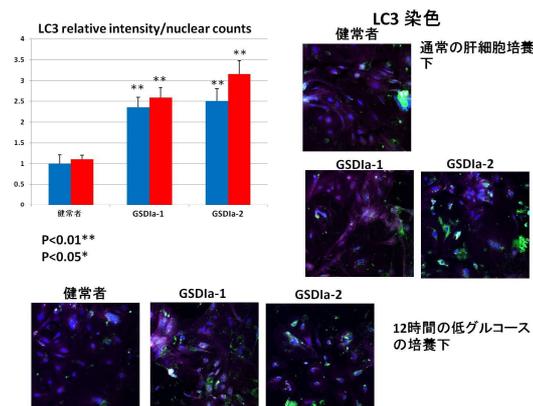


図6. 糖原病 Ia 型患者の肝細胞の LC3 染色

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 13 件)

1. Hyperammonemia crisis following parturition in a female patient with ornithine transcarbamylase deficiency.

Kido J, Kawasaki T, Mitsubuchi H, Kamohara H, Ohba T, Matsumoto S, Endo F, Nakamura K.

World J Hepatol. 2017 Feb

28;9(6):343-348.doi:10.4254/wjh.v9.i6.343.

2. Evaluation of the skin-prick test for predicting the outgrowth of cow's milk allergy.

Kido J, Hirata M, Ueno H, Nishi N, Mochinaga M, Ueno Y, Yanai M, Johno M, Matsumoto T.

Allergy Rhinol (Providence). 2016 Jan

1;7(3):139-143.

doi: 10.2500/ar.2016.7.0175.

3. Advanced Endometrial Cancer in Phenylketonuria.
Jun Kido, Hiroshi Mitsubuchi, Fumiko Itoh, Takanobu Yoshida, Shirou Matsumoto, Rieko Sakamoto, Fumio Endo, Kimitoshi Nakamura.
Med Sci Case Rep 2016; 3:108-111:
DOI: 10.12659/MSCR.901499
4. Pulmonary artery hypertension in methylmalonic acidemia.
Kido J, Mitsubuchi H, Sakanashi M, Matsubara J, Matsumoto S, Sakamoto R, Endo F, Nakamura K.
Hemodial Int. 2017 Apr;21(2):E25-E29. doi: 10.1111/hdi.12506. Epub 2016 Nov 1.
5. Prenatal diagnosis of Gaucher disease using next-generation sequencing.
Yoshida S, **Kido J**, Matsumoto S, Momosaki K, Mitsubuchi H, Shimazu T, Sugawara K, Endo F, Nakamura K.
Pediatr Int. 2016 Sep;58(9):946-9. doi: 10.1111/ped.13069.
6. Plasma exchange and chelator therapy rescues acute liver failure in Wilson disease without liver transplantation.
Kido J, Matsumoto S, Momosaki K, Sakamoto R, Mitsubuchi H, Inomata Y, Endo F, Nakamura K.
Hepatol Res. 2016 Mar 23. doi: 10.1111/hepr.12711. [Epub ahead of print]
7. Neural Stem and Progenitor Cells with High Proliferation Potential in Injured Areas in a Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. **Kido J**, Matsumoto T.
J Neurol Neurophysiol 2016, 7:348
8. A new strategy for mitigation of the allergenic activity of ovomucoid in hen eggs and beta-lactoglobulin in cow milk.
Kido J, Nishi N, Misumi S, Matsumoto T.
Integr Mol Med, 2016 Volume 3(1): 496-500
9. Importance of ultrasonographic findings in infants with the incidence of urinary tract infection for the first time.
Kido J, Ushijima Y, Sakaguchi K, Ueno Y, Yanai M. Pathogen & Infectious Disease 2015; 1: e1011.
10. Attenuated Allergenic Activity of Ovomucoid After Electrolysis.
Kido J, Matsumoto T.
Allergy Asthma Immunol Res. 2015 Nov;7(6):599-604.
11. Most cases of cow's milk allergy are able to ingest a partially hydrolyzed formula.
Kido J, Nishi N, Sakaguchi M, Matsumoto T.
Ann Allergy Asthma Immunol. 2015 Oct;115(4):330-331.
12. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection in three infants.
Kido J, Mizukami T, Ohara O, Takada H, Yanai M.
Pediatr Int. 2015 Aug;57(4):750-3.
13. Ultrasonography and C-reactive protein can predict the outcomes of voiding cystography after the first urinary tract infection.
Kido J, Yoshida F, Sakaguchi K, Ueno Y, Yanai M.
ActaPaediatr. 2015 May;104(5):e216-21.

〔学会発表〕(計 2件)

1. **Jun Kido** et al. Improved neurodevelopmental outcomes in patients with urea cycle disorders after liver transplantation. Society for the study of inborn errors of metabolism. 2016/09/06-2016/09/09. Rome.

2. **Jun Kido** et al. Plasma exchange and chelator therapy rescues acute liver failure in Wilson disease without liver transplantation. 第 58 回日本先天代謝異常学会. 2016/10/27-2016/10/29. Tokyo.

〔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

城戸 淳 (Jun Kido)

熊本大学・医学部附属病院・診療助手

研究者番号：70721215

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()