

令和元年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09988

研究課題名(和文) ヒト誘導多能性幹細胞を用いた遺伝性筋疾患の創薬研究のための基盤技術の開発

研究課題名(英文) Drug screening system development for skeletal muscle diseases using human iPSC

研究代表者

粟屋 智就 (Awaya, Tomonari)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：20589593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は適切な培養条件におくことで身体を構成する様々な細胞に変化するが、反面、統制が難しく様々な性質の細胞が混在することで実験のばらつきを生じやすい。本研究では骨格筋疾患に対する創薬事業へのiPS細胞の活用のため、iPS細胞の様々な維持培養条件がその後の骨格筋細胞への分化効率へ与える影響について比較検討した。iPS細胞の維持培養条件、特に細胞接着の足場となる細胞外マトリクスの違いが、その後の骨格筋細胞の形成・維持に大きく関係することがわかった。この研究を進めることでiPS細胞を創薬研究に利用するための基盤を構築することが概ね可能と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性筋疾患は基本的に稀少疾患であり、その病態解析の不十分さや不採算性のため既存の創薬事業には不向きであったが、iPS細胞の登場により研究開発が進められるようになった。一方でiPS細胞研究者の間では培養条件によるばらつきや再現性の困難さが課題となっていた。本研究で行ったiPS細胞の培養条件の最適化は、稀少疾患の創薬研究の推進といった社会的意義の大きいものであり、その過程で得られた細胞-細胞外マトリクスの相互作用に関わる基礎的知見は学術的にも有意義なものである。

研究成果の概要(英文)：iPSCs can differentiate into various types of somatic cells; however, it is usually difficult to obtain homogenous and stable cells reproducibly. In this research, we compared various methods to maintain undifferentiated iPSCs in regard to their potential to give rise to skeletal muscle cells, aiming to develop suitable culture conditions for high throughput drug screening (HTS). Different culture conditions, especially the use of some extracellular matrices during maintenance culture of undifferentiated cells, enhanced/suppressed skeletal muscle differentiation efficiency. By adjusting culture conditions, we also determined the method to culture skeletal muscle cells in multi-well plate system. It can be used as a HTS platform for skeletal muscle diseases.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 骨格筋分化 遺伝性筋疾患 創薬研究

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性筋疾患研究における多能性幹細胞の意義

小児期発症の遺伝性筋疾患の多くは骨格筋の構成蛋白の異常に基づいて起こり、現時点では有効とされる治療法はほとんどない。筋ジストロフィー症の代表的疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、骨格筋細胞膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンの欠損により、筋線維の壊死・再生、進行性の筋力低下をきたす疾患であり、人工呼吸管理を行わない場合、患者は20歳前後で死亡する。筋ジストロフィーの治療アプローチとしては、筋障害に対する新たな薬剤の開発、遺伝子導入やエキソスキッピング療法などの遺伝子や蛋白発現を操作する手法の開発、細胞移植療法などが考えられ、精力的な研究が行われている。

においてはステロイドホルモン投与が若干進行を遅らせることが明らかとなり、においてはいくつかの化合物が臨床試験で用いられているが、全体としての治療効果は現時点では不十分である。また、骨格筋内のエネルギー代謝に関わる酵素の欠損により進行性の筋障害をきたす代謝性筋症の代表的疾患であるポンペ病は酸性 α -グルコシダーゼの異常によりライソゾーム内にグリコーゲンが蓄積する。欠損酵素を経静脈的に投与する酵素補充療法(ERT)が開発され臨床的に用いられているが、効果は限定的であり改変酵素や病態改善をもたらす新規治療薬の出現が待たれている。

遺伝性筋疾患はその全てが稀少疾患に該当し、疾患研究は基本的にはモデルマウスを用いて行われているが、実際の患者の遺伝子変異、臨床症状、治療効果にはかなりのばらつきがある。一方、患者から得られる骨格筋検体は診断用の非常にわずかなものであり経時的に再検することは困難である。従って、患者骨格筋における分子学的病態は依然として多くが未解決であり、患者由来の細胞素材を用いた病態研究が切望されている。患者由来 iPS 細胞はそれらの問題点を解決するものとして期待が持たれているが、本研究開始当初においては、世界的にも ES/iPS 細胞を用いた骨格筋分化誘導法は開発が遅れており、実際に疾患研究に辿り着いたものは非常にわずかであった。

本領域における研究開始当初までの申請者らの業績

申請者らは、特に細胞移植治療を念頭に置き、マウスおよびヒト ES/iPS 細胞を用いた骨格筋分化誘導法の開発を行ってきた。マウス ES/iPS 細胞から *in vitro* で質のよい骨格筋線維を産生し、*in vivo* で有効に生着する前駆細胞を抽出する系を既に確立し(Mizuno Y et al. FASEB J 2010)、平成23~24年度の科学研究費補助金によりヒト ES/iPS 細胞の分化誘導系を構築した(Awaya T et al. PLoS One 2012)。また、申請者らはヒト iPS 細胞を用いた骨格筋疾患研究のための基盤作りとして、本研究開始時までに10疾患24名の患者から神経筋疾患特異的 iPS 細胞の樹立実績があり、それらの患者由来 iPS 細胞を用いて DMD およびポンペ病患者由来 iPS 細胞から疾患再現モデルを開発してきた。

これらの研究では DMD 遺伝子のエクソン 44 欠失と 46-47 欠失をもつ患者由来 iPS 細胞から骨格筋細胞を分化誘導し、その Ca 代謝異常を同定するとともに、アンチセンスモルフォリンを用いてジストロフィン蛋白を発現させることでその代謝異常が改善することを証明した(本研究開始時点では論文投稿中、その後 Shoji E et al. Sci Rep 2015 として受理)。またポンペ病患者 iPS 細胞から誘導した骨格筋細胞内でグリコーゲン蓄積を観察し、ERT により細胞内のグリコーゲン蓄積が解消すること、乳児型ポンペ病患者についてはそのクリアランスが不十分であることなどを *in vitro* で再現した(その後、それらの細胞モデルを用いて mTORC1 経路の異常が乳児型ポンペ病の病態に関与していることを示し、Yoshida T et al. Sci Rep 2017 として受理された)。

研究開始当初みられていた技術的な課題

しかしながら、その過程で iPS 細胞の骨格筋分化誘導技術が、その基質となる細胞外マトリクスや維持培養条件により大きく左右されること、そのためマイクロプレート等の培養容器での均一性が得られにくい等の問題が生じており、本研究開始時点での分化誘導技術がハイスループットでの薬剤スクリーニング系には不十分であることがわかってきた。そのため、本研究により、骨格筋分化誘導前の維持培養条件から、骨格筋分化誘導時の細胞外基質等の培養条件の最適化を目指し、ハイスループットの薬剤スクリーニングに移行するための培養・化合物同定技術の最適化を目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒト誘導多能性幹(iPS)細胞を用いて遺伝性筋疾患の分子病態を改善する低分子化合物等の検索を実現するための基盤技術の開発である。遺伝性筋疾患は全てが稀少疾患で、研究素材となる骨格筋組織の取得も困難である。そのため、iPS 細胞から再現性の高い骨格筋分子病態モデルを構築することは、これまで困難であった治療薬開発の実現に有用である。申請者らは既に iPS 細胞を用いた *in vitro* での遺伝性筋疾患の分子病態の再現法について報告してきた。しかしながら現在の方法は、特定の培養条件下においてもなお存在する分化

度や分化効率の違いにより、多数の候補化合物を同時に評価するような方法への適用が困難である。本研究では様々な細胞外環境が iPS 細胞から骨格筋への分化に与える影響を遺伝子発現、発現制御の観点から解析し、骨格筋分化を促進/阻害する因子を同定し、ハイスループットな薬剤開発を実現するための諸条件を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

未分化維持培養条件がその後の分化誘導効率を変化させるという仮説に対して、本研究では、研究開始年度より(1) MyoD-iPS 細胞の種々の未分化維持培養・継代条件における馴化培養を行い(2) 未分化状態での遺伝子発現、遺伝子発現制御の解析を行った。中間年度は、それらの実験を完遂するとともに、並行してその後の骨格筋分化誘導を行い、実際の骨格筋分化効率について免疫染色で解析するとともに、(3) 分化過程における遺伝子発現解析により骨格筋分化を促進/阻害する因子を抽出した。最終年度には、実際に選択した未分化維持培養系を元に、(4) 培養容器の小スケール化とハイスループットスクリーニング分析に必要な培養条件を検討した。

(1) 未分化維持培養

既に共同研究者らが樹立済みの、正常ヒト iPS 細胞に MyoD ベクターを導入した MyoD-iPS 細胞を、原法であるマウス胎仔由来線維芽細胞あるいは SNL 細胞上での未分化培養と、mTeSR1 (STEMCELL Technologies 社) /Matrigel (Corning 社) システム、StemFitAK02N (Ajinomoto 社) /iMatrix-511 (nippi 社) システム、その他の維持培養系で培養した。馴化のためには原法の SNL 細胞上での未分化培養から CTX 溶液を用いて iPS 細胞をフィーダー細胞と共に細胞凝集塊として剥離し、0.1%ゼラチンコートした培養容器中で 3 時間培養してフィーダー細胞を除去した後、Y-27632 10 μ M 存在下で規定のフィーダーフリー培養系へ移植した。生着を確認出来た細胞コロニーは規定の方法で 3 回継代し、後の解析に用いた。

(2) 骨格筋分化誘導

iPS 細胞からの骨格筋分化誘導は、共同研究者らが開発したドキシサイクリン (Dox) 誘導法により MyoD 遺伝子を強制発現させることで行った (Tanaka A et al. PLoS One 2013)。細胞播種密度を至適化した未分化 iPS 細胞を Matrigel 上に播種し、翌日以降 Dox 1 μ g/mL を添加することで MyoD 発現を誘導した。分化 8 日目頃の筋管形成を確認して以降の実験に用いた。

(3) mRNA 発現解析

未分化維持培養条件への馴化を行った未分化 iPS 細胞、および骨格筋分化誘導開始後 7 日目の iPS 細胞を溶解し、RNeasy Mini kit (Qiagen 社) を用いて全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA より逆転写酵素を用いて cDNA を作成した後、RT-PCR を行った。また、RNA の一部は TapeStation RNA Screen Tape (Agilent Biotechnologies 社) を用いて品質評価を行った後、TruSeq Standard mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina 社) を用いて作成したライブラリを Novaseq 6000 (Illumina 社) を用いて塩基配列を解析した。データ解析には Skewer (version 0.2.2) を用いて下処理をした後、RSEM (version 1.3.1) 内で STAR を用いてゲノム配列上へマッピングし、同じく RSEM 内部の EBSeq を用いて発現変動遺伝子を抽出した。また RSEM でマッピングしたリードから計算した TPM (transcripts per million) を用いて粗解析を行った。

(4) 培養容器の小スケール化のための培養条件の検討

iPS 細胞から分化誘導した骨格筋を酵素処理により分離し、96-ウェル細胞培養プレートあるいは 384-ウェル細胞培養プレートへ再播種してその生着性や均一性について検討した。細胞培養容器のコーティングには Matrigel (Corning 社)、VTN-N (Invitrogen 社)、iMatrix-511 (nippi 社)、種々のラミニン (BioLamina 社) の各種細胞外マトリクスを推奨される濃度で用いた。

4. 研究成果

異なる未分化維持培養条件への iPS 細胞の馴化

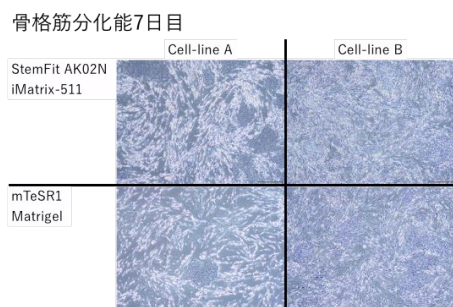
未分化維持培養法の検討では、SNL フィーダー細胞上で 20%KSR を含有する培地で維持培養を行う原法を基本とし、mTeSR1 (STEMCELL Technologies 社)、StemFitAK02N (Ajinomoto 社)、PluriSTEM (Merck 社)、E8 (Invitrogen 社)、DEF-CS 500 (TaKaRa Bio 社) の各種培地を用いて、Matrigel (Corning 社)、VTN-N (Invitrogen 社)、Geltrex (Invitrogen 社)、iMatrix-511 (nippi 社)、種々のラミニン (BioLamina 社) の各種細胞外マトリクス上での維持培養を試みた。組み合わせにより細胞の接着状況や増殖状況がかなり異なり、例えば、iPS 細胞の培養に推奨される細胞外マトリクスのひとつである Geltrex が他社製培地との組み合わせで有効な培養系が確立出来ないなど、市販の培地が推奨する細胞外基質の組み合わせにおいても宣伝されている程の安定性が見られない条件が複数見られた。当初は全ての条件において発現解析等を実施する予定であったが、3 継代の馴化培養中に未分化状態を維持出来ない条件もみられたため、細胞の形態や未分化マーカー等の染色により、安定して未分化状態が維持出来ていると考えられた mTeSR1/Matrigel および StemFitAK02N/iMatrix-511 の維持培養系を採用した。

異なる未分化維持培養条件が骨格筋分化能へ与える影響

上記の通り、培養条件によっては未分化 iPS 細胞の培養容器への接着率や未分化維持がうまくゆかない例がみられた。特に単一細胞への解離操作を伴う継代操作の場合、培養容器への細胞接着が著しく不良であったり、通常 24 時間程度で不要となる iPS 細胞継代時の細胞死を抑制する ROCK 阻害剤、Y-27632 を除去すると細胞が維持出来なかつたり例がみられた。最終的に国内でもよく用いられている mTeSR1/Matrigel および StemFitAK02N/iMatrix-511 の維持培養系を採用したが、その中でも StemFitAK02N/iMatrix-511 での馴化培養を経たものは、Matrigel をはじめとする他の細胞外マトリクスへの接着能が著しく低下する印象があった。

細胞株毎にも細胞の増殖速度や分化状況に差が見られたが、常に mTeSR1/Matrigel で維持したもののほうが StemFitAK02N/iMatrix-511 で維持したものよりも最終的な未分化細胞の混入が少なかった(図 1)。一方で、未分化細胞の混入や筋管形成の効率には、分化開始直前の細胞播種密度の与える影響が最も大きく、細胞播種から 1~2 日までの細胞増殖速度が最終的な未分化細胞の混入を規定していると考えられた。iPS 細胞はコロニー状に増殖するが、コロニー周辺部の細胞がより分化しやすい傾向にあり、細胞同士の接着や傍分泌等による細胞相互の関係が、未分化維持/分化抵抗性に強く働いていると考えられた。

図 1 : 骨格筋分化誘導の結果



異なる未分化維持培養条件における遺伝子発現の変化

異なる 2 種類の細胞株を mTeSR1/Matrigel と StemFitAK02N/iMatrix-511 の 2 種類の維持培養条件で馴化培養し、網羅的遺伝子発現解析による比較を行ったところ、クラスタリング分析による遺伝子発現の類似度の推定では、維持培養条件の差異よりも細胞株の差異の方が大きいと考えられた(図 2)。一方、維持培養条件で群分けした二群間比較 (n=2) を行うと、95%の事後変動確率 (PPDE) を持つ発現変動遺伝子が 925 遺伝子得られた(図 2)。遺伝子オントロジー (GO) 解析では、生物学的プロセスでは RNA 結合、mRNA 結合、RNA ポリメラーゼ II 転写制御に関する遺伝子群が、細胞の構成要素としては細胞質および核内のプロテアソーム複合体に関する遺伝子群が、分子機能としてはプロテアソーム活性化 ATP 加水分解酵素活性に関わる遺伝子群が多く含まれた。同一細胞株で異なる未分化維持培養条件で馴化した後に骨格筋分化誘導を行った中間分化段階 (分化 7 日目) の細胞集団を用いて同様の網羅的遺伝子発現解析を行うと (二群間比較、3 試行による n=3)、95% PPDE を持つ発現変動遺伝子が 818 遺伝子得られた(図 3)。GO 解析による生物学的プロセスでは腎発生や耳形態形成に関わる遺伝子群が抽出されており、骨格筋発生に関わる遺伝子群は抽出されなかった。このことは、骨格筋分化に関わる遺伝子セットは MyoD 強制発現により相当程度誘導されており、未分化維持培養条件の差による分化への影響は、寧ろこの誘導条件における他の系列の細胞系譜への分化選好性が影響しているのではないかと考えられた。これらの遺伝子群の未分化状態に与える生物学的意義については現在追加解析を行っている。

図 2 : 未分化 iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析

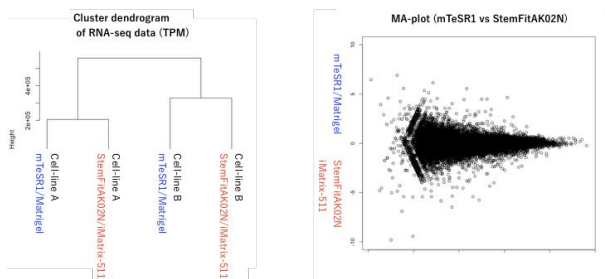
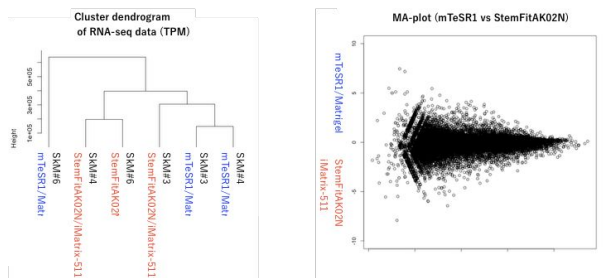


図 3 : 中間分化段階の網羅的遺伝子発現解析



細胞培養容器の小スケール化の試み

創薬プラットフォームへの iPS 細胞の応用を目指し、96-ウェル細胞培養プレートあるいは 384-ウェル細胞培養プレートでの薬剤スクリーニング系の構築へ向けた小スケール化に取り組んだ。分化 7~10 日目の中間分化段階の iPS 細胞由来の骨格筋を酵素処理により解離し、96-ウェル細胞培養プレートあるいは 384-ウェル細胞培養プレートへ再播種してその生着性や均一性について検討した。細胞培養容器のコーティングは原法の Matrigel の他、VTN-N、iMatrix-511、種々のラミニンを推奨される濃度で用いた。Matrigel の接着性と比較して、VTN-N では細胞が維持出来ず、iMatrix-511 および各種ラミニンにおいては、接着性および非骨格筋細胞の接着や、その後の増殖に大きな差が見られた。特にある特定のラミニン基質は、接着性や細胞の維持は Matrigel にやや劣るものの、未分化細胞を含む非骨格筋系譜の細胞集団の増殖が著しく抑制され、骨格筋細胞そのものが比較的純化された状態で培養が可能であった。

Matrigel 基質を用いた場合においても、分化開始時の細胞播種密度、細胞を解離・再播種する時期、再播種時の細胞数については、やはり細胞株毎の最適化が必要であったが、全体の均一性や再現性については一定の安定性が得られた。これらの調整によりばらつきを低減を行うことで 96-ウェル細胞培養プレート内では比較的均一な培養状況が得られ、384-ウェル細胞培養プレート等への大規模化も概ね可能との結果を得た。一方で、長期培養を行った際には、筋管形成が良好な場合に、細胞外マトリクスから細胞が剥離しやすい傾向にあり、細胞成熟を含めた疾患モデルの追求には、細胞外マトリクスによるサンドイッチ法など、より安定して解析が可能となる骨格筋細胞の維持培養系が必要との課題も出てきた。今後はこれらの問題点を抽出し、生体内での環境を培養系に応用することで、より生理的な骨格筋 *in vitro* モデルを検討することも必要であろうと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Ichisima J, Suzuki N, Samata B, Awaya T, Woltjen K, Takahashi J, Hagiwara M, Nakahata T, Saito MK. Verification and rectification of cell type-specific splicing of a Seckel syndrome-associated ATR mutation using iPS cell model. *J Hum Genet.* 2019 May;64(5):445-458. doi: 10.1038/s10038-019-0574-8.
- (2) Yoshida T, Awaya T, Jonouchi T, Kimura R, Kimura S, Era T, Heike T, Sakurai H. A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset Pompe Disease with Patient-specific iPS Cells. *Sci Rep.* 2017 Oct 18;7(1):13473. doi: 10.1038/s41598-017-14063-y. PMID: 29044175; PMCID: PMC5647434.
- (3) Ar Rochmah M, Awano H, Awaya T, Harahap NIF, Morisada N, Bouike Y, Saito T, Kubo Y, Saito K, Lai PS, Morioka I, Iijima K, Nishio H, Shinohara M. Spinal muscular atrophy carriers with two SMN1 copies. *Brain Dev.* 2017 Nov;39(10):851-860. doi: 10.1016/j.braindev.2017.06.002. PMID: 28676237.
- (4) 粟屋智就, ほか. 「学童期から横紋筋融解症と思われるエピソードを反復していた筋型 CPT-2 欠損症の成人男性例」 *特殊ミルク情報誌.* 2016;52:44-7.
- (5) 粟屋智就. 「神経筋疾患の研究に関する iPS 細胞の応用」 *小児内科『特集 小児の筋疾患 update』* 東京医学社. 2016;48(12):1986-9.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 「第 8 回 (2013 年) 2 教育講演 I 乳児期発症ポンペ病の国内調査 -希少疾患の情報蓄積の重要性・ポンペ病レジストリーの紹介-」 粟屋智就. 『日本ポンペ病研究会記録集 2008-2015 第 3 回-第 10 回』日本ポンペ病研究会編. 診断と治療社. 2016;95-9.
- (2) 「第 6 回 (2011 年) 1 症例報告 III 就学を迎えた乳児期発症 Pompe 病の 1 例」 粟屋智就, ほか. 『日本ポンペ病研究会記録集 2008-2015 第 3 回-第 10 回』日本ポンペ病研究会編. 診断と治療社. 2016;54-5.

〔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

6．研究組織

（1）研究分担者 なし

（2）研究協力者

研究協力者氏名：櫻井英俊

ローマ字氏名：Sakurai, Hidetoshi

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究協力者氏名：萩原正敏

ローマ字氏名：Hagiwara, Masatoshi

京都大学・医学研究科・教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。