

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659346

研究課題名(和文) 早老症候群の疾患 iPS 細胞樹立と加齢性変化の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Establishment of disease iPS cells and molecular analysis of age-related changes in progeroid syndrome

研究代表者

横手 幸太郎 (Yokote, Koutaro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20312944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：遺伝性早老症 Werner 症候群(以下、WS)は、思春期以降、全身性に老化徴候を示し、糖尿病や動脈硬化、がんを好発し、40 歳代で死亡する。WS の早老発症メカニズムを解明するために、WS 患者由来 iPS 細胞を樹立を目指す。WS 患者の皮膚由来線維芽細胞に Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc の山中 4 因子を導入し、無限分裂能と三胚葉系細胞への分化能(奇形腫形成)を獲得した細胞の樹立に成功した。リプログラミングにより WS 患者由来 iPS 細胞を得ることができた。さらに、ナンセンス変異を持つ WS 由来線維芽細胞に対し、読み飛ばし活性を持つリードスルー薬の保護効果を調べ、治療薬としての可能性を考察した。

研究成果の概要(英文)：Werner syndrome (WS) is a progeroid disorder caused by mutations in the WRN gene, which encodes a RecQ type DNA helicase. In order to clarify molecular mechanism of pathogenesis of WS, we gene-transferred Yamanaka's four factors, such as Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc, into skin fibroblasts of WS patients. We isolated iPS clone cells and confirmed them with highly proliferative ability as well as pluripotency, indicating establishment of WS iPS cells by reprogramming. Furthermore, we investigated the protective effect of read-through drugs on WS fibroblasts with a nonsense mutation and discussed the therapeutic potentiality of the drugs to WS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：Werner 症候群 iPS 細胞 早老症候群 老化 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

代表的な遺伝的早老症WSは、思春期以降全身性に老化徴候を示し、糖尿病や動脈硬化、がんを好発、40歳台で死亡する。ヒトの老化モデルと捉えられる一方、治療法は未確立である。これまで全世界で1500例と希少だが、うち日本人患者が6割を占め、日本が研究と診療のリーダーシップを取るべき疾患である。1996年に原因遺伝子としてDNAヘリケース(WRN)が同定されたが、個体・細胞レベルで早老をきたすメカニズムの解明は国内外を通じて進んでいない。理由の一つとして、WRN遺伝子のノックアウトマウス(KO)が単独ではno phenotypeであり、テロメラーゼを同時に欠損させた場合のみ早老症候をきたすなど、扱いやすく有用な動物モデルが無い点にある。一方、近年、老化を標的とする研究が動物レベルで進んでいるが、加齢が糖尿病や動脈硬化を増やすメカニズムは「ヒト」では解明されていない。そのような状況の中、iPS技術とトランスクリプトーム解析、次世代シーケンス技術を組み合わせることで、ヒト(WS患者)の細胞を材料に、この領域にブレークスルーをもたらさう。申請者は平成21年度からWSの全国調査を実施、400名の新規WS症例を見出し、詳細な病態解析と臨床検体収集を開始している。また申請者の教室では、既に健常者からのiPS細胞樹立と分化、マイクロアレイ解析やエピゲノム解析をルーチンに実施しており、直ちに本研究課題に取り組むことができる。

2. 研究の目的

1996年にWSの原因遺伝子としてDNAヘリケース(WRN)が同定されたが、個体・細胞レベルで早老をきたすメカニズムの解明は国内外を通じて進んでいない。理由の一つとして、WRN遺伝子のノックアウトマウス(KO)が早老の表現型を示さず、健常に生育するため、有用な動物モデルが無い点に

ある。またWSの皮膚由来線維芽細胞は、通常、数代の継代培養により老化関連ガラクトシダーゼ活性上昇などの細胞老化形質を示し、分裂を停止する。そのため、患者由来細胞を用いた発症メカニズムの解明も容易ではない。本研究では、WSの早老発症メカニズムを解明するために、無限分裂能を有するiPS細胞の技術を用いて、WS患者由来iPS細胞を樹立することを目的とする。

また、WS患者の遺伝子変異の中に、ナンセンス変異が知られている。ナンセンス変異を有する異常mRNAは、NMD(nonsense-mediated mRNA decay)と呼ばれるmRNA分解機構により通常のmRNA分解と異なる経路で即座に分解される。本研究は、異常な終止コドンを読み飛ばす(リードスルー)薬をWS患者細胞に投与し、機能性WRNタンパク質の産生が認められ、細胞表現型が可逆的に改善するかどうか調べ、治療薬としての有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

WSの皮膚由来線維芽細胞(WSCU01)にOct-4, Sox2, Klf4, c-Mycの山中4因子をレトロウイルスベクターで導入し、無限分裂能を有する細胞株を単離する。また多分化能を示すES細胞で高発現が認められる未分化マーカー遺伝子(Oct-3/4, Sox2, hTert, Nanog)の発現量を調べる。さらに免疫不全マウス(SCIDマウス)精巢に、候補細胞を接種し、2ヶ月後に精巢を解剖し、組織レベルで、奇形種形成を確認することで、三胚葉系細胞への分化能を調べた。また、樹立したWS iPS細胞の可逆的性質を調べるために、WS iPS細胞をES培地で3日間浮遊培養し胚様体を形成させた後、HEF培地とゼラチンコートシャーレ上で培養させた。継代培養を4-5回重ねることで、線維芽細胞に分化させた。元のWS患者由来線維芽細胞の細胞形質を比較した。

次に、ナンセンス変異を持つWS患者(889

残基目の Arg 残基が TGA 終止コドンとなった変異 6 型 (のホモ接合体) 由来線維芽細胞 (WS130131) に対し、mRNA 上の異常な UGA 終止コドン読み飛ばす活性のあるリードスルー薬 (PTC124、Selleck 社) を添加して、ウエスタンブロット方で WRN タンパク質の検出を行った。PTC124 のリードスルー活性を評価する陽性対照として、pGL3 ベクター (Promega 社) の Luciferase 遺伝子の 190 番目の Thr 残基に TGA, TAA, または TAG の 3 種類の終止コドンを変異導入したベクターを別々に遺伝子導入した細胞抽出物の Luciferase 活性を Luciferase Assay キットで (Promega 社) 測定することで評価した。 (倫理面への配慮)

患者由来 iPS 細胞の樹立と治療応用については ヒト幹細胞を用いる臨床研究と遺伝子治療臨床研究に関する指針に基づいてこれを実施する。

4 . 研究成果

WS の皮膚由来線維芽細胞に Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc の山中 4 因子をレトロウイルスベクターで導入し、典型的な iPS 細胞の形態を示した株を樹立した (図 1)。この細胞は、ES 細胞に特徴的な未分化マーカー (Oct-3/4, Sox2, hTert, Nanog) を発現し (図 2)、老化関連 ガラクトシダーゼ活性低下や無限分裂能の獲得を確認した。また免疫不全マウス (SCID マウス) の精巣への移植により三胚葉系細胞への分化 (奇形腫形成) を確認し得た。以上の結果から、リプログラミングにより WS 患者由来 iPS 細胞を得ることができた。

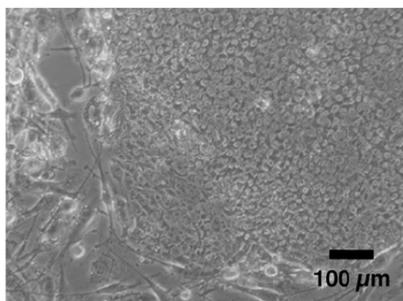


図 1 : WS iPS 細胞 (WSCU iPS02)

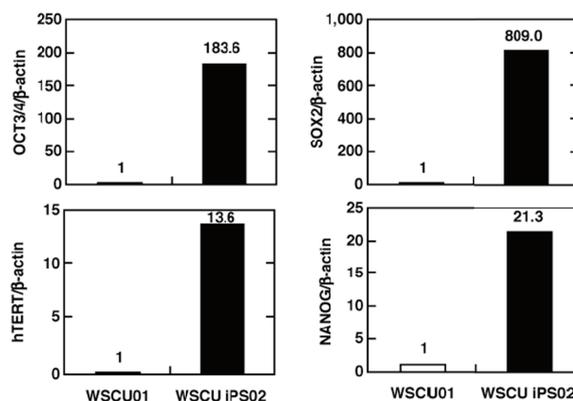


図 2 : WS iPS 細胞 (右 : WSCU iPS02) はもとの WS 由来線維芽細胞 (左 : WSCU01) に比較して、未分化マーカー (Oct-3/4, Sox2, hTert, Nanog) の発現が顕著に亢進していた。

さらに、WS iPS 細胞を胚様態形成と線維芽細胞分化培地で培養することで、逆に線維芽細胞に分化させた。その結果、線維芽細胞様の細胞分化に成功した。また本細胞は、増殖速度が速まり、細胞老化表現型の軽減が明らかとなった (図 3)



図 3 : 線維芽細胞に分化誘導した WS iPS 細胞。継代 5 回で典型的な線維芽細胞様の形態を示した。

次に、ナンセンス変異を有する WS 患者に対するリードスルー薬の治療応用を検討するために、TGA コドンを読み飛ばす活性を持つ PTC124 に着目し、*in vitro* の添加実験を行った (図 4)。

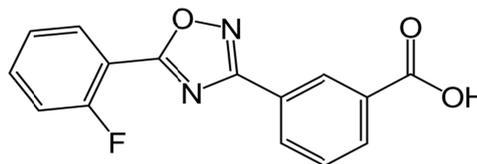


図 4 : PTC124 の化学構造。

HEK293細胞に3種類の終止コドンを変異導入したLuciferase遺伝子を持つレポーターベクター-pGL3を別々に遺伝子導入し、PTC124添加24時間後のLuciferase活性を測定した。その結果、TGA終止コドンを持つ遺伝子導入株のみ有意なLuciferase活性を示した。本薬剤のリードスルー活性を確認した（データは示さない）。さらに、TGA終止コドン変異を持つ変異6型のホモ接合体WS患者由来線維芽細胞（WS130131）に5 μ M PTC124を添加し、10日間培養した。細胞抽出物を抗ヒトWRN抗体によるWB法で解析した。その結果、正常ヒト線維芽細胞抽出物には、WRNタンパク質が検出されたが、WS細胞には認められなかった（図5）。

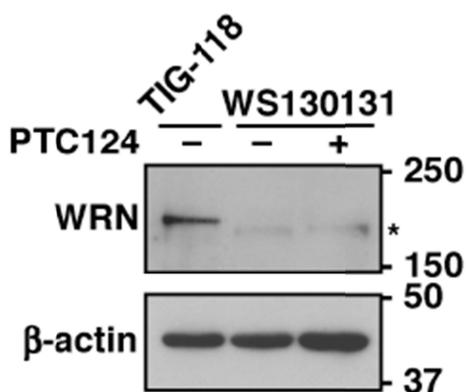


図5: 変異6型のホモ接合体WS患者由来線維芽細胞 (WS130131) に5 μ M PTC124を添加し、10日後のWB。WRNタンパク質は認められない。TIG-118はヒト正常皮膚線維芽細胞、印は非特異的バンド。

次に、ナンセンス変異はNMDを惹起し、WRN mRNAの顕著な低下をもたらすことが考えられた。変異4型と6型の複合ヘテロ接合体を持つWS由来線維芽細胞 (WSCU01) のWRN mRNA量をRT-PCRで調べたところ、16%に減少していることが明らかとなった。一方、WS iPS細胞は増殖能が回復し、細胞老化表現型が改善していることが明らかとなっている（図1）。そこで、WS iPS細胞 (WSCU iPS02) のWRN mRNA量をRT-PCRで調べたところ、7.5倍増加していることが明らかとなった（図6）。

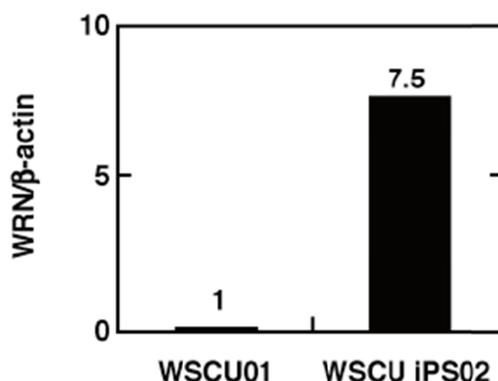


図6: WS iPS細胞 (右: WSCU iPS02) はもとのWS由来線維芽細胞 (左: WSCU01) に比較して、WRNの発現が7.5倍増加していた。

次に、本WS iPS細胞 (WSCU iPS02) に5 μ M PTC124を添加し、10日間培養した。細胞抽出物を抗ヒトWRN抗体によるWB法でWRNタンパク質を検出した。その結果、正常ヒト線維芽細胞抽出物に認められるWRNタンパク質はWS iPS細胞 (WSCU iPS02) には認められなかった（図7）。

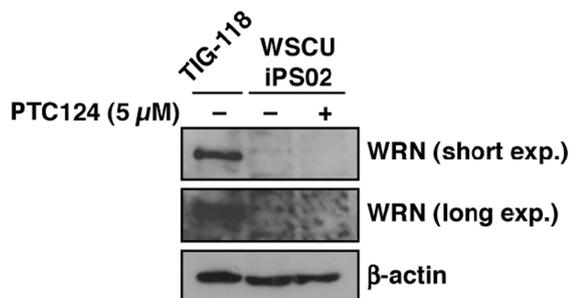


図7: 変異4型/6型の複合ヘテロ接合体WS iPS細胞 (WSCU iPS02) に5 μ M PTC124を添加し、10日後のWB。TIG-118ヒト正常皮膚線維芽細胞 (TIG-118) で認められるWRNタンパク質がWS iPS細胞では認められない。

WS由来iPS細胞は、正常人由来iPS細胞を細胞レベルでの特性に差異が認められないことから、iPS細胞レベルでは、WRN遺伝子の欠損が多分化能や細胞増殖能に大きな影響を示さないことが示唆された。また、細胞老化マーカーである老化関連ガラクトシダーゼ活性も顕著に低下することから、iPS化は細胞老化を抑制し、細胞増殖能を可逆的に回復したことが示された。また、WS由来iPS細胞から線維芽細胞への細胞分化実験を行ったところ、形態

的に線維芽細胞に酷似した細胞が得られた(図1-3)。詳細な細胞表現型の解析が待たれるが、本WS iPS細胞は多分化能を有するiPS細胞で有ることが強く示唆された。今後、複数のWS患者由来のiPS細胞の樹立や、clonal variationの差異の検討が必要ではあるが、皮膚線維芽細胞に加えて、血管内皮細胞や脂肪細胞等への分化実験時に、遺伝子発現やプロテオミクス解析を行い、健常者由来iPS細胞との比較により、早発性老化に関わる新規候補遺伝子の同定が期待される。

遺伝性疾患の中で、ナンセンス変異による遺伝子欠失(タンパク質欠損)は、遺伝子治療による遺伝子補充や組換えタンパク質の補充による治療法の開発が進められている。しかし、個々の遺伝子やタンパク質の特性の問題、遺伝子導入の臨床的課題等が開発の障害となっている。一方で、ナンセンス変異をリードスルーする活性で、翻訳時に終止コドンを読み飛ばし、機能性タンパク質を回復させる薬剤は、有望は治療薬として期待される。PTC124(Ataluren)は、TGA終止コドン選択的リードスルー薬ではあるが、基礎研究レベルで多くの改善例が報告され、臨床試験に供されている。本研究では、TGA変異となる6型変異ホモ接合体WS患者線維芽細胞に対し、PTC124添加試験を行ったが、タンパク質の検出には至らなかった(図5)。WS患者細胞ではNMD亢進によるWRN mRNAの減少が想定され、実際に16%まで減少している例を明らかにした。リードスルー薬は十分なmRNAが細胞内に存在しなければ、タンパク質として翻訳できないため、WRN mRNA量を高めることが同時に必要かもしれない。そのため、WRN mRNAが有意に増加したWS iPS細胞に対する添加実験を行ったが、WRNタンパク質は検出できなかった(図6-7)。この結果は、WRN mRNAの2次構造やWRN遺伝子特有な問題、本研究に用いたWS患者細胞の特有な問題などが影響

した可能性がある。今後、TGAナンセンス変異を有する別のWS患者細胞を複数系統調べることや、WRN遺伝子の遺伝子発現を高める薬剤との併用などの検討が必要と考えられる。

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 36 件)

Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med*. 2013 Nov 18;210(12): 2627-39. 査読有

doi: 10.1084/jem.20131144

Watanabe K, Shibuya S, Koyama H, Ozawa Y, Toda T, Yokote K, Shimizu T. (2013) Sod1 loss induces intrinsic superoxide accumulation leading to p53-mediated growth arrest and apoptosis. *Int J Mol Sci*, 14(6): 10998-11010. 査読有

Watanabe K, Kobayashi K, Takemoto M, Ishibashi R, Yamaga M, Kawamura H, Fujimoto M, Ishikawa T, Ohnishi S, Okabe E, Peng He, Yokote K. (2013) Sitagliptin Improves Postprandial Hyperglycemia by Inhibiting Glucagon Secretion in Werner Syndrom With Diabetes. *Diabetes Care*, 36: e119. 査読有

doi: 10.2337/dc13-0709

Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama c, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K. (2013) Executive summary of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan- 2012 version. *J Atheroscler Thromb* 20 (6):517-523. 査読有

<http://dx.doi.org/10.5551/jat.15792>

Okabe E, Takemoto M, Onishi S, Ishikawa T, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. (2012) Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular

complications in individuals with Werner syndrome in Japan. J Am Geriatr Soc 60(5):997-998. 査読有

doi: 10.1111/j.1532-5415.2012.03944.x

Onishi S, Takemoto M, Ishikawa T, Okabe E, Ishibashi R, He P, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Yokote K. (2012) Japanese diabetic patients with Werner syndrome exhibit high incidence of cancer. Acta Diabetol 49:259-260. 査読有
doi: 10.1007/s00592-012-0424-z.

Kitamoto T, Takemoto M, Fujimoto M, Ishikawa T, Onishi S, Okabe E, Ishibashi R, Kobayashi K, Kawamura H, Yokote K. (2012) Sitagliptin successfully ameliorates glycemic control in werner syndrome with diabetes. Diabetes Care 35 (12):e83 査読有
doi: 10.2337/dc12-1179

Takada-Watanabe A, Yokote K., Takemoto M, Fujimoto M, Irisuna H, Honjo S, Futami K, Furuichi Y, Saito Y. (2012) A case of Werner syndrome without metabolic abnormality: Implications for the early pathophysiology. Geriatr Gerontol Int. 12(1):140-146. 査読有
doi: 10.1111/j.1447-0594.2011.00743.x.

〔学会発表〕(計 53 件)

Yokote, K. (2013) (招待講演) Achievement of Healthy Aging: from a Japanese Medical Point of View. China Medical University, Nov 5, Shenyang, China.

Yokote, K. (2013) (招待講演) Multidisciplinary approach for the treatment of diabetes in the elderly. 4th International Association of Gerontology and Geriatrics Master Class on Ageing-Kyoto, Oct 30, Kyoto.

Yokote, K. (2013) (シンポジスト) New diagnostic criteria and treatment guideline for werner syndrome. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, June 25, Seoul Korea.

Shimizu, T., Koyama, H., Shibuya, S., Shimamoto, A., Takemoto, M., Yokote, K. Oxidative stress, aging and progeric syndrome. Recent progress in basic and clinical research on progeroid syndrome. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG 2013), Seoul Korea, June 23-27 (2013).

Onishi, S., Takemoto, M., Ishikawa, T., Okabe, E., Ishibashi, R., He, P., Kobayashi, K., Fujimoto, M., Kawamura, H., Yokote, K. Japanese diabetic patients with Werner syndrome exhibit high incidence of cancer 20th World Congress of the International Association of Gerontology and Geriatrics (IAGG2013) 2013.6.23-27, Seoul, Korea

Okabe, E., Onishi, S., Takemoto, M., Ishikawa, T., Ishibashi, R., He, P., Kobayashi, K., Fujimoto, M., Kawamura, H., Yokote, K. Incidence and characteristics of metabolic disorders and vascular complications in Werner syndrome patients in Japan. 20th World Congress of the International Association of Gerontology and Geriatrics (IAGG2013) 2013.6.23-27, Seoul, Korea.

Yokote, K. (2013) Achievement of healthy aging: from a Japanese medical point of view. The 1st meeting for JST-VINNOVA Scoping Group for university-industry collaboration program, May 21-22, Tokyo.

Yokote, K. (2012) (特別招待講演) Mission of medical research in aging society. May 3, Kaohsiung Medical University (高雄医学大学), Taiwan.

〔図書〕(計 3 件)

横手幸太郎, 他 (2013) 老年医学系統講義テキスト 編集 日本老年医学会。西村書店、東京。 <編集委員> 328

横手幸太郎 (2013) NHK きょうの健康 本気で動脈硬化予防! コレステロール対策。NHK 出版、東京。 4-28

桑島巖, 横手幸太郎 (2012) コレステロール治療の常識と非常識。角川マガジンスズ、東京。 43-168, 188-189

〔その他〕

ガイドライン

ウエルナー症候群の診療ガイドライン 2012

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/cell-biol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横手 幸太郎 (YOKOTE, Koutaro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 20312944

(2) 研究分担者

清水 孝彦 (SHIMIZU, Takahiko)
千葉大学・大学院医学研究院・
寄附講座教員
研究者番号: 40301791