

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870375

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を用いた遺伝性筋疾患の病態再現・治療開発の基盤技術の確立

研究課題名(英文) Disease modeling of genetic muscular disorders using patient-derived induced pluripotent stem cells

研究代表者

粟屋 智就 (Awaya, Tomonari)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20589593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では遺伝性筋疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)およびポンペ病の患者由来iPS細胞を用い、中枢神経・心筋・および骨格筋系譜の3系統の細胞系譜におけるin vitroでの病態モデルの構築を目的とした。DMD患者9名およびポンペ病患者3名より樹立したiPS細胞を用いてDMD-iPS細胞においては神経分化誘導・心筋分化誘導を、Pompe-iPS細胞においては骨格筋分化誘導・肝細胞分化誘導を行い、健常人由来の対象iPS細胞とのin vitroにおける差異について検討した。そこから得られた知見を基盤とし、その分子病態を改善しうる小分子化合物の探索プラットフォームを開発中である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to provide in vitro disease models of genetic muscular disorders using patient-derived induced pluripotent stem (iPS) cells. We established patient-derived iPS cell lines from 9 Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients and 3 Pompe disease patients. We conducted neuronal, cardiac muscular, and skeletal muscular differentiation of the cells to compare in vitro characteristics to those from wild-type iPS cells. Based on the results, we are now developing drug-screening platforms.

研究分野：iPS細胞, 神経筋疾患, 病態再現

キーワード：iPS細胞 デュシェンヌ型筋ジストロフィー ポンペ病 病態再現 神経分化 心筋分化 骨格筋分化

1. 研究開始当初の背景

小児期発症の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、有効とされる治療法はほとんどない。遺伝性筋疾患研究は基本的にモデルマウスを用いて行われている。しかしながら、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り、かつ、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。iPS 細胞はそれらの問題点を解決しうるものとして期待が持たれているが、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いる。

2. 研究の目的

遺伝性筋疾患はその全てが稀少疾患であり、かつ研究の素材となる筋組織を得ることも困難である。本研究は筋疾患研究の新たな基盤技術を開発し、*in vitro* の研究を推進するためのものである。本研究ではヒト胚性幹 (ES) 細胞および誘導多能性幹 (iPS) 細胞を用いて遺伝性筋疾患の *in vitro* モデルの作成を目的とする。

今回の具体的な研究目標としては、Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) および Pompe 病など、我々が対象としてきた骨格筋疾患の患者由来 iPS 細胞を骨格筋細胞へと *in vitro* での分化誘導を行い、その機能的欠損を改善しうる低分子化合物等の検索を行うプラットフォームの構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、我々が既に樹立してきた筋疾患患者由来 iPS 細胞の、多分化能の検証、導入遺伝子のサイレンシング等の品質管理、*in vitro* での骨格筋分化能、心筋分化能、神経分化能を確認する。誘導した骨格筋細胞、心筋細胞、神経細胞を用い、カルシウム動態解析、光学顕微鏡、電気顕微鏡を用いた異常蓄積物の観察、ミトコンドリア機能障害/オートファジー異常等について DMD あるいは Pompe 病に想定されている病態を再現可能であるか検討する。引き続き、それらの結果を踏まえ、DMD-iPS 細胞においては、アンチセンスモルフォリンによるエキソンスキッピング、低分子化合物を用いたリードスルー、Pompe-iPS 細胞においては、ヒト組換え型酵素製剤の取り込み能や効果についての検証、分子シャペロン等を用いた残存酵素の利用、などの可能性について検討する。

4. 研究成果

《樹立 iPS 細胞の評価》

本研究では DMD 患者 9 名、Pompe 病患者 3

名より樹立した iPS 細胞を用いて研究を行った。樹立した iPS 細胞の多分化能は胚様体形成法による 3 胚葉分化誘導と NOG マウスへの移植による奇形腫形成法のいずれかで行い、いずれの細胞株からも内胚葉・中胚葉・外胚葉の 3 胚葉の成分が得られた。また、導入遺伝子のサイレンシングの確認は定量的 PCR (qPCR) を用いて行い、適切な細胞株を以下の研究に用いた。

《DMD-iPS 細胞を用いた研究》

患者由来 iPS 細胞として、主にエクソン 44 欠失患者から樹立した 110A2, 110A10 の 2 細胞株を、健常コントロールとして、同患者父由来 110F5 および母由来 M4F4 の 2 細胞株をそれぞれ用いて検討した。樹立 iPS 細胞のうち、患者由来細胞ではエクソン 44 の欠失を確認した。

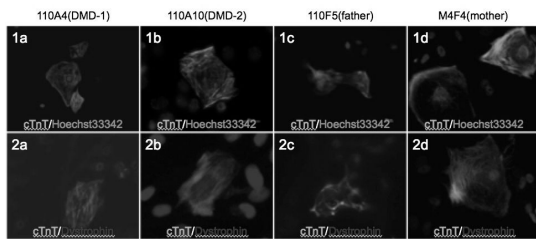
DMD-iPS 細胞における病態再現モデルとしての骨格筋分化誘導は、他の研究プロジェクトとして行ったため本報告書からは除外する。また、初期の段階で心筋分化誘導系を用いた病態解析プラットフォームの構築が有望視されたことから、今回の研究期間においては神経分化誘導は基本的な分化誘導系の確立にとどめた。

DMD-iPS 細胞の神経分化誘導：DMD-iPS 細胞から SFEBq 法および平面培養法により神経幹細胞を分化誘導する分化誘導系を確立した。

DMD-iPS 細胞の心筋分化誘導：心筋分化誘導法は Uosaki らが報告した方法 (Uosaki et al., PLoS One, 2011) を改変して行い、VCAM1 で純化した心筋細胞を、免疫染色、細胞外電位計測およびカルシウムイメージング等のその後の評価に用いた。細胞外電位測定には MED64 システム (MED サイエンス社) を、カルシウム代謝については Fluo-4 による蛍光測定 (BZ9000, Keyence 社) および Indo-1 による蛍光測定 (Aquacosmos/Ratio, 浜松ホトニクス社) を用いた。また伸展負荷に対する易感受性の検討にはストレッチシリコンチャンバーによる自動化細胞伸展培養装置 (STB-140, STREX 社) を用いた。

DMD-iPS 細胞、および健常コントロール iPS 細胞のいずれの細胞株からも心筋系譜細胞の分化誘導が可能であり、分化 30 日前後で自発収縮活動を観察可能なシート状心筋構造を認めた。これらの細胞は VCAM1 で純化した後に再培養が可能であり、cTnT および心室筋マーカー MLC2v、心房筋マーカー MLC2s 陽性の心筋細胞が誘導できた。またこれらの心筋細胞は患者 iPS 細胞由来心筋細胞ではジストロフィン陰性、対照 iPS 細胞由来心筋細胞ではジストロフィン陽性であった。

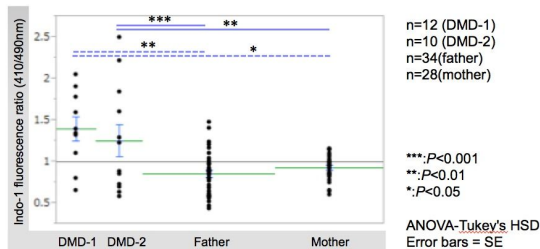
下図：心筋分化誘導後の単離細胞



1. 汎心筋マーカーの免疫染色 2. DYSとの多重染色
(1a-d) cTnI (-FITC) (2a-d) cTnI (-FITC)/Dystrophin (-Cy3)
Nuclei counterstained by Hoechst33342

また、これらの細胞は再培養後も電気生理学的に自発収縮電位の計測が可能であった。Fluo-4 による定性的細胞内カルシウム測定では、iPS 細胞由来心筋細胞は isoproterenol による薬剤負荷に反応して収縮頻度の増加とベースライン上昇を認めた。Indo-1 による細胞内カルシウム濃度は R_0 (安静時電位)、 R (頂値)、および $R-R_0$ (振幅) のいずれも患者 iPS 細胞由来心筋細胞で、対照 iPS 細胞由来心筋細胞と比較して有意なカルシウム濃度の上昇を認めた。また、伸展負荷により対照 iPS 細胞由来心筋細胞では有意な変化を認めなかったが、患者 iPS 細胞由来心筋細胞では有意なカルシウム濃度の上昇を認めた。

下図： R_0 における細胞内 Ca^{++} 濃度計測



《Pompe-iPS 細胞の骨格筋分化誘導》

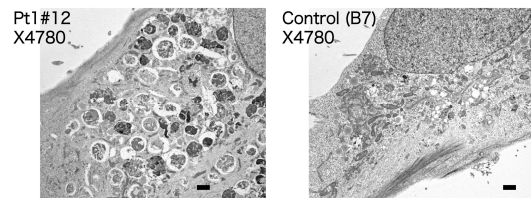
患者由来 iPS 細胞として、乳児型 Pompe 病患者 3 名より樹立した iPS 細胞と健常コントロールとして健常被験者 2 名より樹立した iPS 細胞を用いて行った。骨格筋分化誘導は Tanaka らが報告した PiggyBac ベクターを用いた doxycycline 誘導性 MyoD の強制発現による方法 (Tanaka et al., PLoS One, 2013) を改変して行った。

Pompe-iPS 細胞および健常コントロール iPS 細胞いずれの細胞株からも doxycycline 誘導性に骨格筋細胞を分化誘導することが可能であった。以下の研究は分化効率の比較的同程度のサブクローンを選別して行った。

Pompe-iPS 細胞由来の骨格筋細胞において、骨格筋線維内に PAS 染色で陽性の異常蓄積物を認め、電子顕微鏡で核周囲に異常グリコーゲンの蓄積した膨化ライソゾームを確認した。健常コントロール iPS 細胞由来の骨格筋ではそれらの特徴はみられなかった。また、これらの誘導骨格筋細胞はグリコーゲン定

量により、Pompe-iPS 細胞に由来するものと健常コントロール iPS 細胞に由来するもので有意な差を認めた。

下図：電子顕微鏡でのグリコーゲン蓄積



またこれらの骨格筋細胞への異常グリコーゲンの蓄積に対する ERT の効果を検証するため、遺伝子組み換え型ヒト酸性 α -グルコシダーゼ (Myozyme®, Genzyme 社) を培地中に添加したところ、濃度依存的にグリコーゲンの低下を認めた。

《研究成果のまとめ》

DMD 心筋細胞におけるカルシウム代謝異常や Pompe 病骨格筋細胞におけるグリコーゲン蓄積は既にマウスモデル等で報告がある。本研究では DMD-iPS 細胞由来心筋におけるカルシウム代謝異常、および Pompe-iPS 細胞由来骨格筋細胞における異常グリコーゲン蓄積を再現しており、患者由来のヒト細胞を用いて、部分的に *in vitro* で病態を再現する評価系を確立出来たと考えられる。これにより、疾患モデル動物では実現困難な、様々な臨床病型や遺伝子変異、遺伝学的背景の異なるそれぞれの患者に対し、テーラーメイドの薬効評価や薬剤スクリーニングを行うプラットフォームの構築が可能であると考えられる。

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)

[学会発表](計 5 件)

- (1) 粟屋智就, 馬場志郎, 平田拓也, 鶴見文俊, 加藤竹雄, 平家俊男 「多能性幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療基盤開発」 精神・神経疾患研究開発費「臨床試験の開発を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」研究班会議 2013 年 12 月 9 日～10 日(東京)
- (2) 粟屋智就, 吉田健司, 加藤竹雄, 櫻井英俊, 平家俊男 「当院における遺伝性筋疾患の疾患 iPS 細胞の樹立状況の報告」 第 56 回日本小児神経学会総会 2014 年 5 月 29 日～31 日(静岡)
- (3) 粟屋智就, 吉田健司, 加藤竹雄, 櫻井英俊, 平家俊男 「当院における遺伝性筋疾患の疾患 iPS 細胞の樹立状況の報告」 第 31 回小児神経筋疾患懇話会 2014 年 8 月 30 日(東京)

- (4) 粟屋智就, 馬場志郎, 平田拓也, 鶴見文俊, 吉田健司, 加藤竹雄, 平家俊男
「多能性幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する新規治療開発」 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発」
研究班会議 2014年12月3日～4日(東京)
- (5) 吉田健司, 粟屋智就, 平家俊男, 櫻井英俊
「Pompe病患者由来 iPS 細胞を用いた骨格筋病態モデリング」 第14回
日本再生医療学会総会 2015年3月19日～21日(神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粟屋智就 (AWAYA, Tomonari)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 20589593