

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10054

研究課題名(和文) ゴーシェー病II型患者由来iPS細胞を用いた新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel medicine using iPS cells derived from Gaucher disease type II patients

研究代表者

城戸 淳(Kido, Jun)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70721215

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)：この研究では、ゴーシェー病II型患者由来iPS細胞を樹立し、そのiPS細胞から神経細胞に分化させ、疾患iPS細胞由来の神経細胞が健常者のものとのように違うのかを機能解析した。ゴーシェー病II型の神経幹細胞を利用した薬剤スクリーニングシステムを確立し、薬剤ライブラリー(1392種類の化合物)からGlcSphの蓄積を軽減させる化合物を見つけた。その発見した化合物の治療薬としての有効性を、ゴーシェー病II型神経細胞とモデルマウスを用いて解析し、また作用メカニズムの解明も、現在行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究結果は、プレシナプス機能異常として、SNAREタンパク質の異常が、ポストシナプス機能異常として、種々のCaイオンチャンネルの異常が考えられ、新たなゴーシェー病II型の表現型を提示するとともに新たな治療ターゲットを示唆するものとなった。また、薬剤スクリーニングによって今回見つけた化合物は、この化合物自体の本来の作用機序とは異なる作用機序によってGlcSphを低下させていると考えられ、新たな薬理学的作用機序の提示が期待された。さらに、この化合物は、この疾患の治療薬となる可能性だけでなく、この疾患の神経細胞の新たな治療ターゲットを見出す可能性があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this research, the iPS cells were generated from patients with GD type II, and neurons were differentiated from GD type II iPS cells. We compared the function of neurons from iPS cells with GD type II and those of neurons from iPSCs with healthy control. Moreover, we developed the drug screening system using the neural stem cells (NSCs) with GD type II and found out the compound, which can alleviate accumulation of GlcSph, from compounds library (1392 compounds). We presently have been analyzing effectiveness of the identified compound in the neurons from iPSCs with GD type II and the model mouse for GD type II, and investigating mechanisms of the compound.

研究分野：小児科学

キーワード：先天代謝異常症 ライソーム病 神経幹細胞 IPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゴーシェ病は、ライソソーム酵素の酸性 β -グルコシダーゼの活性欠損によって、グルコシルセラミド(GlcCer)からセラミド(Cer)に分解できないために、GlcCer とグルコシルスフィンゴシン(GlcSph)が蓄積する疾患である。血液学的異常、臓器腫大、骨異常を特徴とする。神経症状の有無および進行によって3つの臨床的サブタイプがある。I型(または成人型)は非神経型であり、II型は乳児型もしくは急性神経型、III型は若年型または亜急性神経型である。欧米諸国では、I型がきわめて多く98%を占めているが、本邦においてはI型、II型、III型の頻度はほぼ同じである。II型は、最重症型であり、広範囲の内臓障害を伴う神経変性が、乳児期に発症して急速に進行し生後数年間で死に至る。現在、ゴーシェの治療としては、酵素補充療法(イミグルセダーゼ、ベラグルセラーゼ)、基質削減療法(エリグルスタット)、シャペロン療法(アンプロキソールが治験中)がある。酵素製剤は血液脳関門を通過することが難しく、基質削減療法とシャペロン療法も酵素活性が比較的保持されている場合に有効であり、I型やIII型のゴーシェ病には有効であっても、最重症型のII型のゴーシェ病に有効な治療法はまだ確立されていない。従って、日本人に多いII型のゴーシェ病に有効な治療法を確立することは、極めて重要である。

2. 研究の目的

ゴーシェ病II型患者由来iPS細胞から樹立した神経幹細胞(NSC)を利用した薬剤スクリーニングシステムによって、既存の薬剤からライソソーム内のGlcCerとGlcSphの蓄積を軽減する化合物を見つけ出す。さらに、発見した化合物からゴーシェ病II型の新規治療薬としての有効性を、ヒト患者iPS細胞由来神経細胞(in vitro)およびモデルマウス(in vivo)を用いて解析し、また作用メカニズムについても探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)ゴーシェ病II型患者由来のリンパ球にセンダイウイルスベクターを用いて、リプログラミング4因子(KLF4, OCT3/4, SOX2, c-MYC)を導入し、ゴーシェ病II型患者由来iPS細胞を作製する。

(2)ゴーシェ病II型患者由来のiPS細胞をGibco® PSC Neural Induction Mediumを用いて神経幹細胞(NSC)へと分化誘導する。また、NSCから神経細胞へ2か月かけて分化誘導する。

(3)健常者とゴーシェ病II型患者から樹立できたiPS細胞由来の神経細胞を使用して、神経機能を比較検討する。

(4)健常者とゴーシェ病II型患者由来NSCにおけるGlcSphの蓄積量とLAMP1の発現を比較検討する。

(5)ゴーシェ病II型患者由来NSCにおいては、GlcSphの蓄積量とLAMP1の発現が亢進している。この両者をマーカーにして、ゴーシェ病II型患者由来NSCにおいてGlcSphの蓄積量とLAMP1の発現量を減少させる薬剤を、既存の薬剤ライブラリー(プチスクリーニング2014; シグマ アルドリッチ、天然生理活性物質ライブラリー; シグマ アルドリッチ、理化学研究所の橋爪氏らが作成した化合物ライブラリー)から見つけ出す。

(6) 健常者とゴーシェ病 II 型患者から樹立できた iPS 細胞由来の神経細胞に、薬剤ラブラリーから見つけ出した有効化合物を作用させて、有効化合物によって違いのあった神経機能が改善するか検討する。

(7) ゴーシェ病 II 型モデルマウスを獲得または確立し、ゴーシェ病 II 型モデルマウスの脳内に GlcCer または GlcSph 量が蓄積していることを LC/MS を使用して検討する。有効化合物投与により脳内の GlcCer または GlcSph の蓄積量が減少することを確認する。

4. 研究成果

(1) ゴーシェ病 II 型患者由来のリンパ球に 4 因子 (KLF4, OCT3/4, SOX2, c-MYC) を搭載したセンダイウイルスベクターを用いて、ゴーシェ病 II 型患者由来の iPS 細胞を獲得した(図 1)。また、ゴーシェ病 II 型患者 2 名、ゴーシェ病 III 型患者 1 名の計 3 名から樹立した。

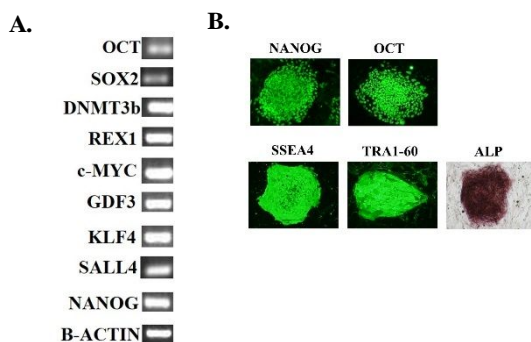


図 1. ゴーシェ病 II 型患者由来の iPS 細胞の樹立
A. ゴーシェ病 II 型患者由来の iPS 細胞の遺伝子発現 (RT-PCR)
B. ゴーシェ病 II 型患者由来の iPS 細胞の pluripotency marker の染色

(2) ゴーシェ病 II 型患者の iPS 細胞を Gibco® PSC Neural Induction Medium を用いて神経幹細胞 (NSC) へと分化誘導した(図 2A)。ゴーシェ病 II 型患者の NSC は、健常者の NSC に比べて病気の責任酵素である酸性 α -グルコシダーゼの活性が顕著に低下していた(図 2B)。また、NSC から神経細胞へ 2 か月かけて分化誘導した(図 2C)。ゴーシェ病 II 型患者の神経細胞では、 α -synuclein が顕著に蓄積していた(図 2C)。

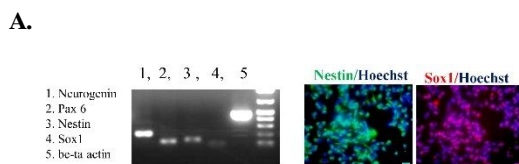
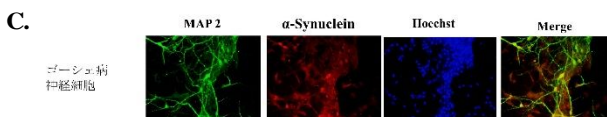


図 2. ゴーシェ病 II 型 iPS 細胞からの神経幹細胞と神経細胞の樹立

B.

Cell type	NSC					Fibroblast	
Cell No.	N1	201B7-1	201B7-2	B96-1	B96-2	SF173	SF210
	健常者	健常者	健常者	GD患者	GD患者	健常者	健常者
Activity (nmol/h/mg)	103.0	79.4	45.8	6.9	9.8	284.2	199.5

A. ゴーシェ病 II 型患者神経幹細胞の遺伝子発現 (RT-PCR)
B. ゴーシェ病 II 型患者神経幹細胞 (NSC) における NSC marker の免疫染色
C. ゴーシェ病 II 型患者神経幹細胞 (NSC) における酸性 α -グルコシダーゼ酵素活性レベル
D. ゴーシェ病 II 型患者神経細胞における神経細胞の免疫染色



(3) 健常者とゴーシェ病 II 型患者の神経細胞において、Fluo 4-AM と FM1-43 の蛍光プローブを用いたイメージング機能解析を行った。Fluo 4-AM を用いた細胞内のカルシウムシグナル伝達は、ゴーシェ病 II 型の患者由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞において、カルシウムシグナル伝達が健常者 iPS 細胞由来の神経細胞よりも亢進していることが確認できた(図 3A)。さらにカルシウムシグナル伝達の亢進について、カルシウムイオンチャンネルにフォーカスを充てて qPCR

にて遺伝子発現の解析とウエスタンブロットは行った。NMDA 型グルタミン酸受容体と AMPA 型グルタミン酸受容体の発現が、ゴーシェ病 II 型患者 iPS 細胞由来の神経細胞では、亢進していることが示唆された(図 3B)。また、シナプス前終末の機能や分泌現象の計測に活用されている FM1-43 を使用して、シナプス前終末における開口放出能がゴーシェ病 II 型患者 iPS 細胞由来の神経細胞で顕著に低下していた(図 3C)。さらに、SNAP25 や Syntaxin 1a などのシナプス前終末の機能にかかわる SNARE COMPLEX の遺伝子発現がゴーシェ病 II 型患者 iPS 細胞由来の神経細胞で低下していた(図 3D)。

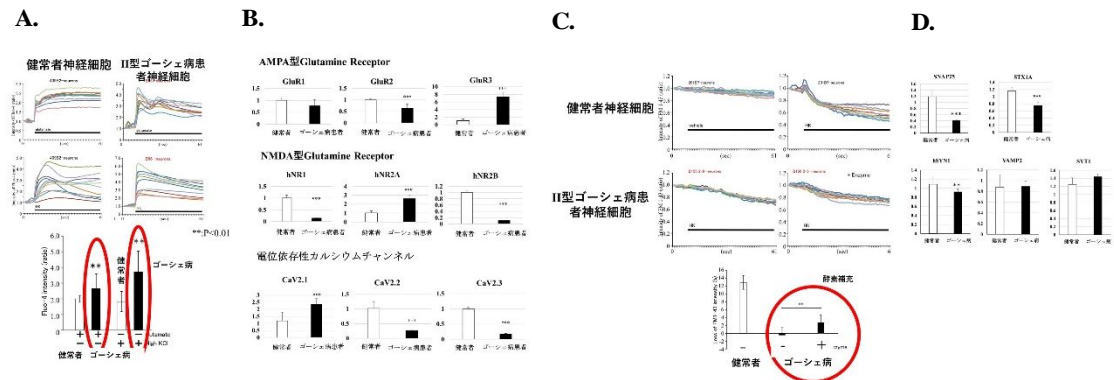


図 3. ゴーシェ病 II 型患者の神経細胞の機能解析

- A. ゴーシェ病 II 型患者の神経細胞の Fluo-4 (Calcium fluorescence probe) イメージング
- B. ゴーシェ病 II 型患者の神経細胞の遺伝子発現 (qRT-PCR)
- C. ゴーシェ病 II 型患者の神経細胞の FM1-43 イメージング
- D. ゴーシェ病 II 型患者の神経細胞の遺伝子発現 (qRT-PCR)

(4) ゴーシェ病 II 型患者由来 NSC の LAMP1 の発現は、健康者由来 NSC に比べて遺伝子とタンパクの両者において発現が亢進していた(図 4)。さらに、GlcSph の蓄積量も健康者由来 NSC よりもゴーシェ病 II 型患者由来 NSC において増加していた。

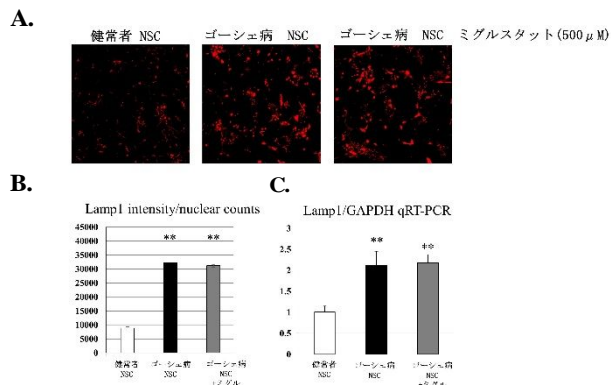


図 4. ゴーシェ病 II 型患者の神経幹細胞における LAMP1 の発現

- (NSC) における LAMP1 の免疫染色
- B. ゴーシェ病 II 型患者神経幹細胞 (NSC) における亢進した LAMP1 のタンパク発現
- C. ゴーシェ病 II 型患者神経幹細胞 (NSC) における亢進した LAMP1 の遺伝子発現 (qRT-PCR)

(5) ゴーシェ病 II 型患者由来 NSC において、プチスクリーニング 2014; シグマ アルドリッチおよび理化学研究所の橋爪氏らから提供していただいた化合物ライブラリーの化合物 合計 1392 種類の化合物で薬剤スクリーニングを行ない、その中から LAMP1 の発現が低下した化合物は、約 120 種類ほどあった。さらに、二次スクリーニングとして、スクリーニングの検体数を増やすことで、最終的に 8 種類の化合物まで絞りこむことができた。これらの 8 種類の化合物のうち、複数の薬剤で薬理的に影響を与えている経路 (KEGG) としては Calcium signaling pathway、Neuroactive ligand-receptor interaction、Vascular smooth muscle contraction が関与して

いた。さらに、LC/MS でゴーシェ病 II 型患者由来 NSC の GlcSph の含有量を低下させる 1 つの化合物を同定できた (図 5)。

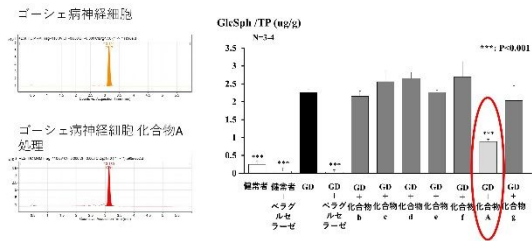


図 5 .ゴーシェ病 II 型患者の神経幹細胞において GlcSph の蓄積を低下させた薬剤の同定

(6)健常者とゴーシェ病 II 型患者から樹立できた NSC から神経細胞への分化誘導の過程で、薬剤ライブラリーから見つけ出した有効化合物を作用させた。rhGBA(酵素補充)により、低下していたプレシナプス機能と亢進していたポストシナプス機能は、改善するが、化合物添加によるゴーシェ病 II 型患者神経細胞のプレシナプス機能とポストシナプス機能の評価は現在行っている。

(6)ゴーシェ病 II 型モデルマウス (B6 マウス (Gba flox/flox と Gba flox/+ -Nestin Cre/+との交配マウス)) をイスラエルの Weizmann Institute of Science の Prof. Tony Futerman から入手した。生後 10 日から 14 日後に発症する。発症の状態は、ふらつき、全身性の間代性けいれんまたは強直間代性けいれんを呈し、進行性で、最終的に飲食できずに、生後 3 週で死亡した (図 7)。ゴーシェ病 II 型モデルマウスの脳内の GlcCer または GlcSph 量は、まだ測定できておらず、有効化合物投与により脳内の GlcCer または GlcSph の蓄積量が減少するかどうかの検討も、今後行わなければいけない。

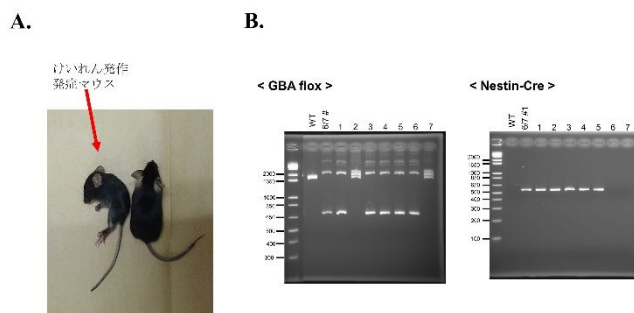


図 6 . 神経型 (II 型) ゴーシェ病モデルマウス
A. けいれん発作発症中の神経型 (II 型) ゴーシェ病モデルマウス
B. 神経型 (II 型) ゴーシェ病モデルマウスのジェノタイプ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jun Kido, Shirou Matsumoto, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo, Kimitoshi Nakamura	4. 巻 33
2. 論文標題 Early Liver Transplantation in Neonatal-Onset and Moderate Urea Cycle Disorders May Lead to Normal Neurodevelopment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metab Brain Dis.	6. 最初と最後の頁 1517-1523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s11011-018-0259-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Jun Kido, Hironobu Inoue, Yosuke Suzuki, Motoko Tanaka, Hiroshi Mitsubuchi, Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo, Shirou Matsumoto	4. 巻 64
2. 論文標題 A Significant Difference in the Blood Carnitine Values Obtained by the Enzymatic Cycling and Tandem Mass Spectrometry Methods	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Lab.	6. 最初と最後の頁 211-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170805.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sawada T, Kido J, Yoshida S, Sugawara K, Momosaki K, Inoue T, Tajima G, Sawada H, Mastumoto S,	4. 巻 22
2. 論文標題 Newborn screening for Fabry disease in the western region of Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep.	6. 最初と最後の頁 100562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2019.100562.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kido J, Matsumoto S, Sawada T, Endo F, Nakamura K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Rhabdomyolysis in organic acidemia patients manifesting with metabolic decompensation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hemodial Int.	6. 最初と最後の頁 E115-E119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hdi.12778.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Y, Kido J, Matsumoto S, Shimizu K, Nakamura K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Associations among amino acid, lipid, and glucose metabolic profiles in childhood obesity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pediatr.	6. 最初と最後の頁 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12887-019-1647-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Momosaki K, Kido J, Matsumoto S, Yoshida S, Takei A, Miyabayashi T, Sugawara K, Endo F, Nakamura K.	4. 巻 63
2. 論文標題 High-risk screening for Gaucher disease in patients with neurological symptoms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 717-721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s10038-018-0438-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Jun Kido, Tadahiro Numakawa, Shirou Matsumoto, Haruki Odaka, Minami Soga, Ryutarou Kajihara, Fumio Endo, Kimitoshi Nakamura,
2. 発表標題 Development of drug screening system using neural stem cells derived from a patient with Type II Gaucher Disease.
3. 学会等名 SSIEM annual symposium 2019 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Jun Kido, Tadahiro Numakawa, Shirou Matsumoto, Hiroki Odaka, Minami Soga, Ryutarou Kajihara, Fumio Endo, Kimitoshi Nakamura, Takumi Era.
2. 発表標題 Development of drug screening system using iPS cells derived from a patient with Gaucher Disease Type II
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 公俊 (Kimitoshi Nakamura) (30336234)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	沼川 忠広 (Numakawa Tadahiro) (40425690)	熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員 (17401)	
研究分担者	松本 志郎 (Matsumoto Shirou) (70467992)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	曽我 美南 (Soga Minami) (80768002)	熊本大学・発生医学研究所・助教 (17401)	