

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：81603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07785

研究課題名(和文) ファブリー病患者由来iPS細胞を用いた病態解析と創薬スクリーニング

研究課題名(英文) Pathological analysis and drug screening using iPS cells derived from Fabry disease patients

研究代表者

衛藤 義勝 (ET0, Yoshikatsu)

一般財団法人脳神経疾患研究所・先端医療研究センター・センター長

研究者番号：50056909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ファブリー病の臨床症状は多岐にわたり、一部の患者では中枢神経障害や精神症状を呈する事が報告されているが、詳細は明らかになっていない。この病態機序を明らかにするため、健康人1名、ファブリー病3家系、5名の患者の皮膚線維芽細胞を使用し、RNAリプログラミング法にてiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞を使用し、神経細胞と血管内皮細胞への分化誘導を行い、各種細胞を得た。神経細胞ではGb3の蓄積を認めない事を明らかにし、血管内皮細胞の血管新生あるいは酵素活性を指標とした創薬スクリーニング系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者数の絶対数が少ない希少疾患において、iPS細胞の樹立や各種分化誘導細胞での解析は、病態の解明や治療法の発見に繋がる。ライソゾーム病は国の指定難病であり、患者数は少ないが、国内ではファブリー病患者はそれの中でも比較的多いとされている。しかしながら、遺伝子変異の種類に対して、研究材料は少なく、各種細胞での詳細な病態メカニズムは明らかになっていない。本研究期間で作成したファブリー病3家系5名のiPS細胞や、神経細胞、血管内皮細胞を使用した病態解析や薬剤スクリーニングを実施する事で、ファブリー病のみならず他のライソゾーム病あるいは他疾患への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The clinical manifestations of Fabry disease are diverse, and some patients have been reported to exhibit central nervous system disorders and psychiatric symptoms, but the cause of the disease remains unclear. To elucidate the pathogenesis of Fabry disease, we established iPSCs by RNA reprogramming using skin fibroblasts from one healthy subject and five individuals from three families with Fabry disease. Using the established iPSCs, we induced differentiation into neural cells and vascular endothelial cells. We found no accumulation of Gb3 in neurons, and established a drug screening system using angiogenesis or enzyme activity.

研究分野：小児科学

キーワード：ライソゾーム病 ファブリー病 グロボトリアオシルセラミド (Gb3) iPS細胞 神経細胞 血管内皮細胞 薬剤スクリーニング

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼの酵素活性の低下、欠損に伴いグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が蓄積する X-連鎖性の先天代謝異常症である。各種細胞に蓄積する事により、末梢神経障害や腎不全、心不全など全身の臓器の障害が起きる。ファブリー病の一部の患者では、うつ病や痴呆などの精神神経症状を発症するが、Gb3 が脳血管の蓄積することによって生じると考えられている。また、ファブリー病患者の剖検脳では Gb3 の蓄積は認めないとの報告と、海馬を含む一部の領域の神経細胞には Gb3 の蓄積があるといった、異なった報告があり、ファブリー病患者における神経細胞と Gb3 の関係性は明らかにはなっていない。

一方で、ファブリー病の治療には酵素補充療法 (ERT) や薬理的シャペロン療法が存在するが、遺伝子変異によっては、治療効果が薄い症例も存在し、新たな治療法や有効な対症療法が不可欠であった。そこで、新たな治療法を創出するため、有効な薬剤のスクリーニング方法を確立する必要があった。

### 2. 研究の目的

ファブリー病におけるうつ病や痴呆などの精神神経症状が神経細胞への Gb3 の蓄積によって起こるのか、あるいは定説の通り血管内皮細胞への Gb3 の影響なのかをファブリー病患者より iPS 細胞から病態モデルを作製し、検証する。またファブリー病の新たな治療法として、病態メカニズムに基づいた治療法が必要であり、治療薬の効果を評価するスクリーニング系の構築を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ファブリー病患者由来皮膚線維芽細胞より、RNA リプログラミング法による iPS 細胞の作製を行った。作製した iPS 細胞については、遺伝子発現と免疫染色による未分化マーカーの測定、三胚葉への分化能、核型解析を実施した。

(2) iPS 細胞より神経幹細胞を経て神経細胞へと分化誘導を行い、遺伝子発現と免疫染色で確認を行った。さらに Gb3 の蓄積を免疫染色と電子顕微鏡による検出を行った。

(3) iPS 細胞より血管内皮細胞へ分化誘導を行い、遺伝子発現と免疫染色による同定を行った。

(4) ファブリー病患者由来皮膚線維芽細胞を使用し、他疾患で使われる薬剤のヒートショックプロテインの誘導効果による  $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する薬理的シャペロン効果を検証した。また iPS 細胞より分化誘導させた血管内皮細胞を使用し、Tube formation assay を利用した薬剤スクリーニングが可能か検証した。

### 4. 研究成果

(1) ファブリー病 3 家系 5 名の患者の皮膚線維芽細胞から RNA リプログラミング法により iPS 細胞を作製した。作製した iPS 細胞は未分化マーカーの発現、分化能を有し、核型も正常であった。また、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ酵素活性も健常人と比較し優位に低下していることを確認した (図 1)。ファブリー病は国内では比較的多いライソゾーム病であるが、原因である GLA 遺伝子変異は 1000 種類以上報告されており、遺伝子変異に対してモデル細胞の数が圧倒的に少ない。その中で、ファブリー病の iPS 細胞を同一家系あるいは複数株樹立した事は、今後のファブリー病研究に繋がる事が期待される。

(2) 樹立した 5 名の内 1 名のファブリー病患者由来 iPS 細胞を使用し、神経細胞に Gb3 が蓄積するかを検証した。神経幹細胞へ分化誘導を行い、遺伝子発現と免疫染色にて確認を行った後、液性因子による神経細胞への分化誘導を行った。一カ月程度培養を行い、遺伝子発現と Gb3 の免疫染色に

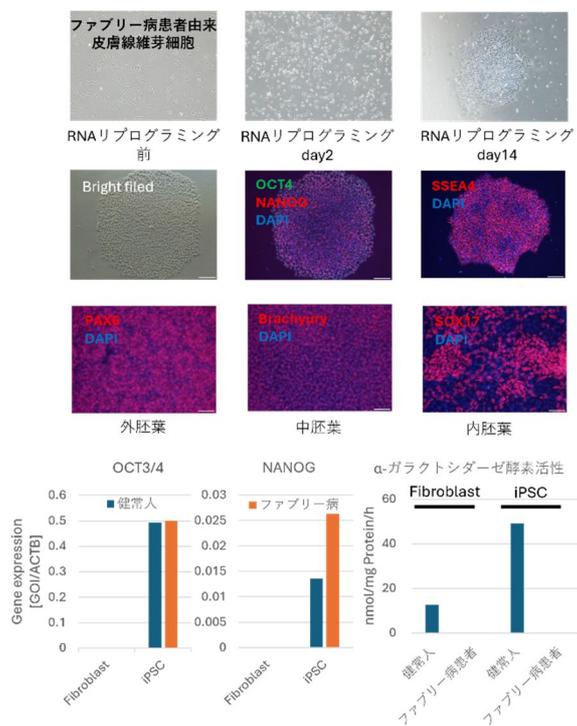


図 1. ファブリー病患者由来 iPS 細胞の作製

より神経細胞へのGb3の蓄積の確認を行った。また、透過型電子顕微鏡によりゼブラボディの確認を行ったものの、免疫染色共に神経細胞にGb3の蓄積を示すような結果は得られなかった。また、Gb3合成酵素であるA4GALT遺伝子の発現を神経幹細胞と神経細胞で確認したところ、iPS細胞と比較して遺伝子発現がほとんど認められなかった(図2)。この結果より、神経細胞ではGb3合成酵素が発現していないと考えられ、神経細胞単独の培養ではGb3の蓄積が認められなかったと推察される。ファブリー病患者由来iPS細胞を用いた中枢神経系についての解析は先行研究で報告されていない知見であり、ファブリー病の中枢神経症状の解明に役立てられると考える。

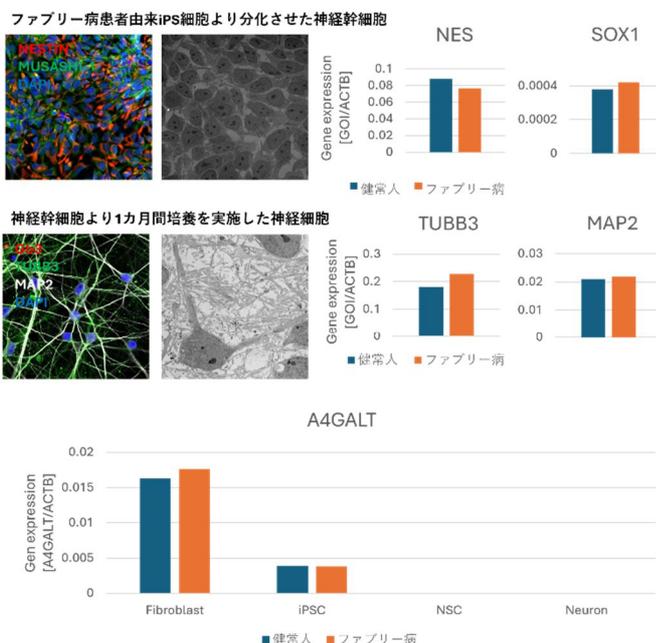


図2. ファブリー病 iPS 細胞を用いた神経幹細胞および神経細胞

(3) 3名のファブリー病患者由来皮膚線維芽細胞より樹立したiPS細胞を用いて、血管内皮細胞へ分化誘導を行った後、VE-カドヘリンによる免疫染色や血管内皮特異的なマーカーの発現を確認する事ができた。短期間で効率良く血管内皮細胞を得ることができた(図3)。また作成した全ての細胞でGb3の確認は出来ていないものの、一部の株ではGb3の蓄積を認めた。血管内皮細胞を維持していく過程で、健康人と比較してファブリー病患者では、細胞の成長スピードが遅くなり、細胞死も増加していた。この点については、培養条件を整え、再度検証していく必要がある。

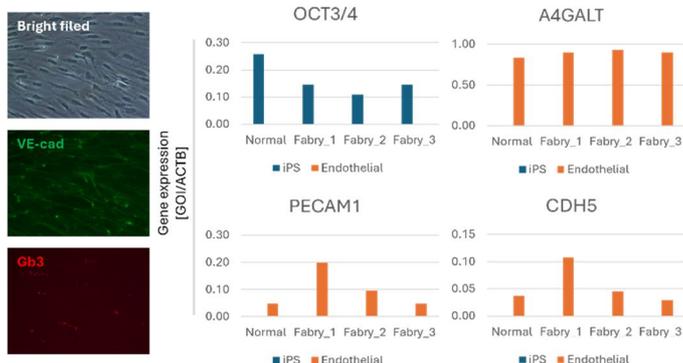


図3. ファブリー病 iPS 細胞を用いた血管内皮細胞の作成

(4) 今回用いたヒートショックプロテインを誘導する薬剤では、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する薬理的シャペロン効果は得られなかった。しかしながら、酵素活性を指標とした評価系を構築し、この方法を用いて $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する有効な薬剤スクリーニングを実施する事が可能となった。また、ファブリー病患者由来iPS細胞より分化誘導させた血管内皮細胞を使用し、血管内皮細胞の特徴であるTube formation assayを用いた薬剤スクリーニング系の構築はできた(図4)。既に報告されているファブリー病iPS細胞から分化誘導を行った血管内皮細胞ではトロンボスポンジン1の亢進やSMADシグナルの活性化といった病態が報告されており、本研究では確認できていない。再度培養条件などを検討して病態を再現し、これらの分子を標的とした治療薬の検討を今後進めていく。あるいは血管平滑筋細胞や本研究期間で作成した、神経細胞との共培養を行い、より疾患モデルとして患者の病態を反映した状態で解析を進めていく。



図4. ファブリー病血管内皮細胞を用いたTube formation assay

今後、作成した疾患iPS細胞や分化細胞を用いて病態メカニズムの解明や新たな治療法の開発に繋がる事が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyajima Takashi, Saito Ryo, Yanagisawa Hiroko, Igarashi Miki, Wu Chen, Iwamoto Takeo, Eto Yoshikatsu	4. 巻 46
2. 論文標題 Characterization of cellular phenotypes in neurons derived from induced pluripotent stem cells of male patients with Fabry disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease	6. 最初と最後の頁 143 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jimd.12567	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 -
1. 著者名 Tsurumi Mina, Ozaki Asuka, Eto Yoshikatsu	4. 巻 33
2. 論文標題 A survey on the patient journey in Fabry disease in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100909 ~ 100909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2022.100909	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 -
1. 著者名 Miyabayashi Takuya, Sato Ryo, Okubo Yukimune, Endo Wakaba, Inui Takehiko, Togashi Noriko, Yanagisawa Hiroko, Eto Yoshikatsu, Haginoya Kazuhiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Water intoxication: A clue to the presence of classical Fabry disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 592 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2022.07.001	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 -
1. 著者名 Morimoto Satoshi, Nojiri Ayumi, Fukuro Eiko, Anan Ikuko, Kawai Makoto, Sakurai Ken, Kobayashi Masahisa, Kobayashi Hiroshi, Ida Hiroyuki, Ohashi Toya, Shibata Takahiro, Yoshimura Michihiro, Eto Yoshikatsu, Hongo Kenichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Characteristics of the Electrocardiogram in Japanese Fabry Patients Under Long-Term Enzyme Replacement Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2020.614129	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 -

1. 著者名 Koto Yuta, Sakai Norio, Lee Yoko, Kakee Naoko, Matsuda Junko, Tsuboi Kazuya, Shimozawa Nobuyuki, Okuyama Torayuki, Nakamura Kimitoshi, Narita Aya, Kobayashi Hiroshi, Uehara Ritei, Nakamura Yoshikazu, Kato Koji, Eto Yoshikatsu	4. 巻 133
2. 論文標題 Prevalence of patients with lysosomal storage disorders and peroxisomal disorders: A nationwide survey in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 277 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2021.05.004	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 -

1. 著者名 Okuyama Torayuki, Eto Yoshikatsu, Sakai Norio, Nakamura Kimitoshi, Yamamoto Tatsuyoshi, Yamaoka Mariko, Ikeda Toshiaki, So Sairei, Tanizawa Kazunori, Sonoda Hiroyuki, Sato Yuji	4. 巻 29
2. 論文標題 A Phase 2/3 Trial of Pabinafusp Alfa, IDS Fused with Anti-Human Transferrin Receptor Antibody, Targeting Neurodegeneration in MPS-II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 671 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.09.039	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 -

1. 著者名 Saito Ryo, Miyajima Takashi, Iwamoto Takeo, Wu Chen, Suzuki Ken, Hossain Mohammad Arif, Munakata Miyo, Era Takumi, Eto Yoshikatsu	4. 巻 28
2. 論文標題 A neuropathological cell model derived from Niemann-Pick disease type C patient-specific iPSCs shows disruption of the p62/SQSTM1/KEAP1/NRF2 Axis and impaired formation of neuronal networks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100784 ~ 100784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2021.100784	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 -

1. 著者名 Hossain Mohammad Arif, Hasegawa-Ogawa Minami, Manome Yoko, Igarashi Miki, Wu Chen, Suzuki Ken, Igarashi Junko, Iwamoto Takeo, Okano Hirota James, Eto Yoshikatsu	4. 巻 31
2. 論文標題 Generation and characterization of motor neuron progenitors and motor neurons using metachromatic leukodystrophy-induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100852 ~ 100852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2022.100852	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮島 任司, Chen Wu, 鈴木 健, 五十嵐 美樹, 宗形 ミヨ, 岩本武夫, 衛藤 義勝
2. 発表標題 10年間のFabry病ハイリスクスクリーニング1543例の解析
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chen Wu, Takeo Iwamoto, Miki Igarashi, Takashi Miyajima, Ken Suzuki, Miyo Munakata, Yoshikatsu Eto
2. 発表標題 Comparative proteomics of Fabry and NPC diseases by skin fibroblasts and iPS cells derived neurons
3. 学会等名 The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石毛 信之, 渡辺 和宏, 長谷川 智美, 小林 正久, 加藤 環, 齋藤 加代子, 阿部 祐一, 森岡 一郎, 衛藤 義勝, 石毛 美夏, 大石 公彦
2. 発表標題 東京都における拡大新生児スクリーニングの試験研究（第2報）
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 衛藤 義勝, 宮島 任司, ホセイン モハンマド アリフ, ウー チェン, 鈴木 健, 五十嵐 美樹, 宗形 ミヨ, 五十嵐 純子, 岩本 武夫
2. 発表標題 ファブリ病同一遺伝子家系に対するMigalastatの反応性並びに治療効果に関する研究
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮島 任司, 齋藤 僚, 柳澤 比呂子, Chen Wu, 五十嵐 美樹, Mohammad Arif Hossain, 岩本武夫, 衛藤 義勝
2. 発表標題 ファブリー病患者由来iPS細胞から分化した神経細胞の病態解析に関する研究
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Miyajima, Ryo Saito, Takeo Iwamoto, Chen Wu, Miki Igarashi, Mohammad Arif Hossain, Miyo Munakata, Ken Suzuki, Takumi Era, Yoshikatsu Eto
2. 発表標題 Molecular pathogenesis of Neurons differentiated from iPS cells derived from NPC patients
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Yotsumoto, Mina Tsurumi, Asuka Ozaki, Yoshikatsu Eto
2. 発表標題 A survey on the Patient Journey of Fabry disease patients of Japan
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chen Wu, Takeo Iwamoto, Takashi Miyajima, Miki Igarashi, Mohammad Arif Hossain, Junko Igarashi, Miyo Munakata, Ken Suzuki, Yoshikatsu Eto
2. 発表標題 Preliminary results of characterization on passages of cells from lysosomal diseases by proteomics
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Koto, Norio Sakai, Yoko Lee, Torayuki Okuyama, Yoshikatsu Eto
2. 発表標題 Prevalence of patients with lysosomal storage disorders and peroxisomal disorders in Japan
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2021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	宮島 任司  (Miyajima Takashi)  (50791042)	一般財団法人脳神経疾患研究所・先端医療研究センター・研究員    (81603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------