

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791200

研究課題名(和文)先天性横紋筋融解症特異的 i P S 細胞を用いた新規疾患モデルの作製と治療法の開発

研究課題名(英文)Functional Analysis of iPSC-derived Myocytes from a Patient with Carnitine Palmitoyl transferase II Deficiency

研究代表者

安野 哲彦 (YASUNO, Tetsuhiko)

福岡大学・医学部・助手

研究者番号：80551994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：患者由来の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立した。未分化マーカーの発現、三胚葉への分化能を確認した。この患者由来のiPS細胞は、患者の遺伝子変異を保因していた。MyoDを遺伝子導入して、骨格筋へ分化誘導した。マイクロアレイ、電顕およびリアルタイムPCRにて、成熟した骨格筋に分化していることを確認した。38度の熱刺激を加え、培養液をタンデム質量分析で解析した。健常者と比較して、CPT 欠損症に特徴的なC16が増加しており、治療薬として期待されているベザフィブラートにて代謝が改善することが分かった。これらの結果は、先天性代謝疾患において、ヒトiPS細胞は有用であることを示している。

研究成果の概要(英文)：We induced differentiation of CPT II-deficient hiPSCs into mature myocytes in a highly efficient and reproducible manner and recapitulated some aspects of the disease phenotypes of CPT II deficiency in the myocyte disease models. This approach addresses the challenges of modeling the abnormality of FAO in CPT II deficiency using iPSC technology and has the potential to revolutionize translational research in this field.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：CPT 欠損症 iPS細胞 先天代謝異常症

1. 研究開始当初の背景

Carnitine palmitoyltransferase (CPT) は、長鎖脂肪酸の酸化に關与するミトコンドリア内膜にある酵素である。常染色体劣性遺伝形式をとり先天性横紋筋融解症をきたす CPT 欠損症は、激しい運動、重症感染症などが誘因となり繰り返し発症する。本欠損症は、致死的な転帰ともなる新生児・幼児型と、横紋筋融解症から急性および慢性腎不全へと進展する成人型に分けられる。横紋筋融解をきたす遺伝性疾患として、酸化異常症の中では、CPT II 欠損症の頻度が最も高い。また、インフルエンザや水痘といった急性熱性疾患に引き続く後天的な脳症である Reye 症候群の中にも、CPT II 欠損症患者が存在すると報告されている (Kelly, KJ, 1989)。これらの症例の中に、温度依存性で活性が変わる CPT II 酵素の変異型があることが証明されている。(Chen, Y, 2005)。また、高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン類)を投与中にクレアチニンキナーゼが上昇した症例の中に、103 人の CPT 欠損症が報告された (Isackson, P, 2006)。このことから、日本国内には数百人の患者がいると推測される。これまで欧米人患者では多くの症例報告があるが、国内における報告は少なく、さらに病因病態の解明と治療方法の開発には至っていない。我々は、感染症が誘因となり血液透析が必要となった急性腎不全の患者が、精査の結果 CPT II 欠損症と確定した症例を経験し、遺伝子解析を中心とした研究を行い国内の 7 症例を含めて、日本人患者における遺伝学的特徴を明らかにした (Yasuno, T, 2009; Kaneoka, H, 2005)。これまで国内外の研究者からの依頼を含めて本症の遺伝子解析を多数の症例にて行い、

国際誌に報告している。経験した症例における家系の遺伝子解析を行ったところ、未発症の末弟に CPT 欠損症患者と同一のコンパウンドヘテロの遺伝子変異が存在した。

2. 研究の目的

本症の病態形成を解明することを目的に、成人型 CPT 欠損症の患者とその家族(未発症で同一の遺伝子変異をもつ弟、ヘテロ保因者の両親)の皮膚組織から iPS 細胞を作製し、骨格筋へ分化誘導を行っている。分化誘導された骨格筋に *in vitro* で横紋筋融解を再現させることで、発症要因の特定、要因間の関連と相互作用、病態形成過程の解析、さらに治療方法の検討を行う。

3. 研究の方法

CPT 欠損症の患者とその家族から iPS 細胞を樹立し、骨格筋へ分化誘導を行う。本研究は、CPT 欠損症の未だ解明されていない病態および治療方法の確立を目指す。マウスの筋芽細胞、健常人由来の iPS 筋細胞を用いることにより、電気刺激方法の確立は終了しており、CPT 欠損症患者由来の筋細胞に同様の解析を行う。

iPS 細胞由来骨格筋細胞(以下、iPS 筋細胞)の横紋筋融解条件の決定

CPT 欠損症の患者と未発症で同一の遺伝子変異をもつ弟、ヘテロ保因者の両親の皮膚から iPS 細胞樹立した。現在、iPS 筋細胞の分化誘導が可能である。この骨格筋細胞に刺激を加え収縮弛緩の条件を決定し、更に刺激を強めて横紋筋融解現象を確認する。

病態学的検討と治療法の検討

患者およびその家族の iPS 骨格筋細胞における遺伝子発現の網羅的解析を行う。リアルタイム PCR にて病態形成に關与する遺伝子の確定と、その遺伝子産物の生物学的・病理学的な機能解析を行う。

iPS 筋細胞の横紋筋融解を阻止できる薬剤やその条件を検討することにより、治療法の開発を目指す。

4 . 研究成果

患者由来の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した。未分化マーカーの発現、三胚葉への分化能を確認した。この患者由来の iPS 細胞は、患者の遺伝子変異を保因していた。MyoD を遺伝子導入して、骨格筋へ分化誘導した。マイクロアレイ、電顕およびリアルタイム PCR にて、成熟した骨格筋に分化していることを確認した。38 度の熱刺激を加え、培養液をタンデム質量分析で解析した。健常者と比較して、CPT 欠損症に特徴的な C16 が増加しており、治療薬として期待されているベザフィブラートにて代謝が改善することが分かった。これらの結果は、先天性代謝疾患において、ヒト iPS 細胞は有用であることを示している。

これまで申請者の研究室では、CPT II 欠損症の遺伝学的な解析をもとに病態解明を行い、国内の患者の特徴を明らかにした。**本症例を積極的に研究している国内では数少ない施設**である。iPS 筋細胞の実験が、誘発試験と同様の効果が得られたものと考えられる。

この研究により、病態を *in vitro* において再現する疾患モデルを構築することができ、iPS 細胞の特徴を活用できる。**CPT 欠損症の発症および慢性腎臓病(CKD)の原因となるスタチンなどによる薬剤誘発性の横紋筋融解症の病態解明にも発展可能である。**また、**ヒト iPS 細胞由来の骨格筋は、横紋筋融解症をきたす薬剤のスクリーニングに使用可能**

であり、安全な薬剤の開発につながるものと考えられる。

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 3件)

Tetsuhiko Yasuno, Kenji Osafune, Hidetoshi Sakurai, Isao Asaka, Akihito Tanaka, Seiji Yamaguchi, Kenji Yamada, Hirofumi Hitomi, Sayaka Arai, Yuko Kurose, Yasuki Higaki, Mizuki Sudo, Souichi Ando, Hitoshi Nakashima, Takao Saito, Hidetoshi Kaneoka. Functional Analysis of iPSC-derived Myocytes from a Patient with Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2014, 査読あり, in press

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.084

Renya Watanabe, Tetsuhiko Yasuno, Satoshi Hisano, Yoshie Sasatomi, Nakashima. Distinct cytokine mRNA expression pattern in immunoglobulin G4-related kidney disease associated with renal cell carcinoma, *Clin Kidney J*, 2014, 査読あり, in press

DOI: 10.1093/ckj/sfu024

Shinichi Mae, Akemi Shono, Fumihiko Shiota, Tetsuhiko Yasuno, Kenji Osafune. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nature Communications* 4, 2013, 査読あり

DOI: 10.1038/ncomms2378.

[学会発表](計 2件)

安野 哲彦、患者由来 iPS 細胞から病的筋細胞への分化誘導、第 4 回 日本腎臓

リハビリテーション学会、2014年3月30日、福岡

(2)研究分担者
()

安野 哲彦、Carnitine palmitoyltransferase 欠損症の病態解明、第2回 日本腎臓リハビリテーション学会、2012年1月21日、仙台

研究者番号：
(3)連携研究者
()

〔図書〕(計0件)

研究者番号：

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安野 哲彦(YASUNO Tetsuhiko)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：80551994