

患者由来 iPS 細胞を用いた筋疾患モデル

櫻井 英俊

要約：骨格筋疾患には、有効な治療法が確立されていない難病が多くあり、新規治療薬の開発に向け患者由来 iPS 細胞を活用した研究が期待されている。その実現のため我々は高効率で極めて再現性高く iPS 細胞を骨格筋へ分化誘導させる方法を確立した。この方法はテトラサイクリン誘導性に骨格筋分化のマスター遺伝子である MyoD1 を強制発現することで、未分化 iPS 細胞からわずか 10 日程度で成熟骨格筋を分化誘導する方法であり、その筋分化効率は 70~90% 程度と極めて高い。この骨格筋分化誘導法を活用して、三好型ミオパチーの病態再現を行った。三好型ミオパチーの原因遺伝子である Dysferlin は、筋細胞膜に存在する分子で筋損傷時に細胞膜を修復する。三好型ミオパチー患者由来細胞では、レーザー照射による膜損傷後の膜修復が遅延することを明らかにした。さらに Dysferlin の発現を回復することで、この膜修復の遅延は改善することを見出し、病態再現に成功した。次にデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対してはエクソンスキッピング製剤の開発が進んでいるが、この治療法は遺伝子変異特異的であり適応患者が限られているため、共通の初期病態をターゲットにした創薬が渴望されている。我々は DMD に共通の初期病態として、筋収縮時の Ca^{2+} の過剰な細胞質への流入というモデルの確立に成功した。また過剰な Ca^{2+} の流入が細胞障害を引き起こし、培養上清中の CK 活性の上昇という表現型も見出した。これらの表現型は原因遺伝子 Dystrophin の発現回復により改善することから、Dystrophin の欠失が引き起こす細胞障害モデルを確立したと言える。今後、スクリーニングに適した解析システムを構築することで、これらの筋疾患に対する新たな薬剤の開発につながるものと期待できる。

1. はじめに

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) は、胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞) と同等の自己複製能と多分化能を持った多能性幹細胞である (1)。受精卵から作製される ES 細胞とは異なり、iPS 細胞は体細胞にいくつかの遺伝子を導入、発現させることにより作製されるため、患者自身の体細胞から作り出すことができる。当初期待されていた拒絶反応回避による再生医療の進展への期待もさることながら、難治性疾患患者由来の iPS 細胞を特定の細胞種へ分化誘導し、試験管内で病態を再現することで、難病の病態解析や薬剤の開発、スクリーニングへの応用がより現実的に期待されている (2)。

難治性疾患の中においても筋疾患に対しては治療法が乏しく、治療の多くが拘縮予防のためのリハビリテーションや、呼吸機能が低下した際の人工呼吸器の導入など対症療法に限定され、根治的な治療法がほとんど存在しない。また希少疾患が多いため、臨床病態や自然歴の調査もようやく進んできているのが現状である。近年縁取り空砲を伴う遠位型ミオパチー (GNE ミオパチー) の原因がシアル酸合成経路の律速酵素の機能異常によるという病態が明らかとなり (3)、シアル酸補充療法が治療として期待され治験が進んでいる。このように希少な遺伝性疾患であっても、病態を正確に理解することで治療薬のターゲットを同定することは可能であり、他の難治性筋疾患についても病態解析の深化が求められている。これまでの病態解析の主な手法はノックアウトマウスなどのモデルマウスを活用したものであったが、ヒトでの原因遺伝子をノックアウトしても同様な病態が再現されないことも多く、病態モデルをいかに確立するかが課題であった。特に筋

疾患では、マウスの筋再生能力が極めて高いため、ヒトで報告された原因遺伝子のマウスでのホモログをノックアウトしても、ヒトで見られるほど重篤な症状を呈さず、病態解析ができない例が多い。また、仮にモデルマウスにより病態モデルに成功しその治療薬を開発しても、マウスには効果があるがヒトには効果が無いという事例も散見される。それ故に、いかにしてヒトの細胞を用いた病態モデルを構築するかが、今後の治療薬創出にとって鍵となる。難治性筋疾患の多くは遺伝性疾患であり、患者由来 iPS 細胞に遺伝情報が引き継がれ、試験管内モデルによって病態が再現される期待値が高い。また希少疾患であっても iPS 細胞であれば、より多くの研究者に研究ツールとして活用されることが可能である。本稿では、患者由来 iPS 細胞を用いた難治性筋疾患の病態解析に向けた研究の現状を述べる。

2. iPS 細胞からの骨格筋細胞への分化誘導

患者由来 iPS 細胞を活用し新規創薬研究を進めるためには、とりもなおさず目的組織への効率の良い再現性の高い分化誘導法が必須である。しかしながら骨格筋分野の研究を進めるにあたり、これまでのヒト ES/iPS 細胞からの骨格筋細胞分化誘導に関する報告は、再現性に乏しいものや、分化効率の低いものがほとんどであった。とくにヒト ES/iPS 細胞においては、同一ドナーから作製されたクローンであっても、分化効率が全く異なるなどクローン間の差が大きく、再現性の担保が最も重要な課題であった。我々は、骨格筋分化を開始させるためのマスター転写遺伝子である *myogenic differentiation 1* (*MYOD1*) をヒト iPS 細胞に強制的に発現させることで約 90% 近くの高い効率で骨格筋を誘導した(4)。*MYOD1* の発現制御はテトラサイクリン応答性ベクターを用いており、テトラサイクリン系抗生薬であるドキシサイクリンを培養液中に添加するだけの、極めて簡便な方法である。この方法は極めて再現性が高く、コントロール iPS 細胞のみならず患者由来 iPS 細胞を含めた様々な iPS 細胞株を使用した実験でも、同様に高い分化率を示すことが確認された(4)。得られた筋管細胞は、細胞同士の融合能や電気刺激による収縮能も示し、十分に成熟した筋管細胞の性質も保持している。網羅的遺伝子発現解析や電子顕微鏡による構造解析によって、これらの iPS 細胞由来筋管細胞が、ヒト生検サンプルから得られた骨格筋の初代培養細胞と同等の性状を呈していることが示された(4)。我々は、以上の結果を活用し、患者由来 iPS 細胞からの分化筋管細胞を用いての病態再現研究を行っている。

3. 三好型ミオパチー患者由来 iPS 細胞を用いた病態モデル

三好型ミオパチーは、1986 年に三好らにより報告された常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性の遠位型ミオパチーである(5)。10 歳代で歩きにくさ、つま先立ちができないなどで発症し、徐々に四肢の筋力低下が進行する進行性の疾患で、原因遺伝子の *Dysferlin* が 1998 年に青木らにより同定された(6)。*Dysferlin* の機能は筋細胞膜の修復であることが 2003 年に証明され(7)、現在は膜修復が遅延することにより筋細胞が障害を受け、ミオパチーが発症すると考えられている。しかしながら膜修復遅延が筋細胞の変性・壊死を起こす機序はいまだ正確には分かっていない。我々は三好型ミオパチー患者由来 iPS 細胞を用いて、この筋細胞膜の修復異常という病態の再現を目指した。前項に記載した *MYOD1* を強制発現させる手法を応用し、三好型ミオパチー患者由来 iPS 細胞から、成熟した筋細胞を高効率で誘導した。筋細胞の誘導効率、分化の速度、得られた筋細胞の筋マーカー分子の発現には、健常コントロール細胞と比較して差はなかった。次に膜修復の病態を再現するため、2 光子レーザー共焦点顕微鏡を用いてレーザーで分化誘導された筋細胞膜を照射し穿孔するという、膜損傷実験を行った(図 1)。膜修復にかかる時間は、培養液中に添加された蛍光物質が細胞内に取り込まれる時間を測定することで計測した。その結果、健常コントロール iPS 細胞由来の筋細胞では、膜損傷後数秒程度で筋細胞膜の修復が起こるため、蛍光物質の細胞内への取り込みが 1 分後以降ほとんど増加しないのに対し、三好型ミオパチー患者 iPS 細胞由来の筋細胞では、膜損傷後の細胞内への蛍光物質の取り込みが 5 分経過しても継続しており、著明な膜修復遅延を認めた。またヒト iPS 細胞においては、クローン間で性質にばらつきがあることも広く知られている。健常コントロール細胞と患者由来細胞の差異がクローン間のばらつきではないことを証明するため、患者細胞に *Dysferlin* を強制発現させることにより、遺伝子修復を行った患者由来 iPS 細胞を作製した。この細胞を骨格筋細胞に分化させ、同様の膜損傷実験を行ったところ、遺伝子修復前には遷延していた蛍光物質の取り込みが、比較的早期に取り込まれなくなることを確認した。つまり、この膜修復時間の遅延という病態は、確かに *Dysferlin* の欠損によるものであることが明らかとなり、我々は病態再現に成功したと報告した(4)。

現在は得られた成果より、再現された病態をより明確に可視化できる方法と、創薬スクリーニングへと応

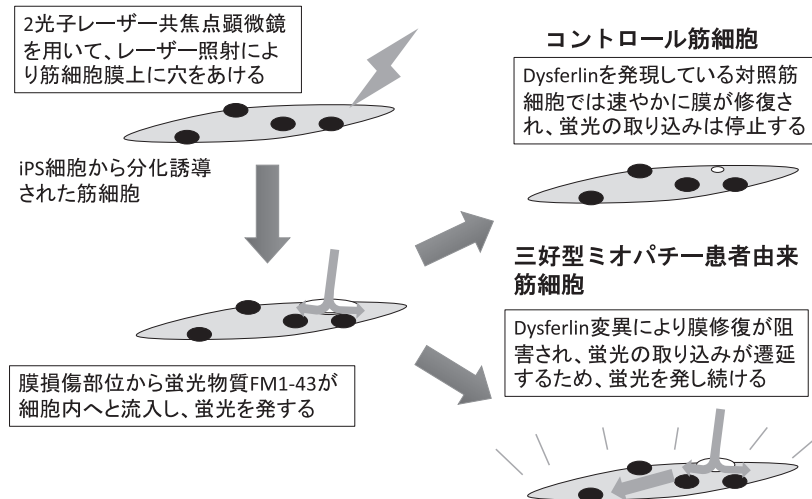


図1 三好型ミオパチーの in vitro 病態再現

用可能な膜損傷システムを開発している。近い将来、患者由来 iPS 細胞からの筋細胞を活用して、筋細胞膜修復改善薬といったタイプの創薬スクリーニングへと進行し、新たな治療薬開発に向けた研究が進展するであろう。

4. デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞を用いた病態モデル

重症度の高いデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) は、出生男児 3,500 人に一人の割合で発症する、比較的頻度の高い難病である (8)。その病因は X 染色体上の *Dystrophin* 遺伝子の欠損・変異によるものであり (9)、進行性の骨格筋の炎症・壊死により筋の退行変性を来し、20 歳代で人工呼吸器管理、40 歳代までには死亡する極めて予後不良な難治性筋疾患である。現在でも有効な治療法は無く、ステロイド剤が唯一、進行を遅らせる薬として用いられている (10)。一方、DMD に対するアンチセンスオリゴを用いたエクソンスキッピングの世界共同治験が進んでいるが (11)、限られたエクソンを対象に開発が進められており、対象患者は限定されている。*Dystrophin* 変異部位によらず、すべての DMD 患者に共通して効果のある治療薬の開発が望まれているが、*Dystrophin* が同定されて四半世紀経った現在でも、なぜ *Dystrophin* の欠損が骨格筋の重篤な慢性炎症状態を引き起こすのかはいまだ明らかではない。

DMD モデルマウスである mdx マウスを用いた研究が続けられており、現在の仮説の有力候補として細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の過剰流入が原因であるという説が支持されている (12)。細胞内の高 Ca^{2+} 濃度状態が続くとミトコンドリアが障害され酸化ストレ

スが増大し、ひいては慢性炎症状態へと進展するという仮説である (12)。確かに mdx マウスにストレッチ感受性陽イオンチャネルである transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) の働きを抑える遺伝子改変を加えると、筋組織での炎症が軽減すると報告され (13)、逆に *Dystrophin* を発現している健常マウスに、同じくストレッチ感受性陽イオンチャネルである transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) を過剰発現させると、筋ジストロフィーの病態が再現されると報告されている (14)。

我々は、この Ca^{2+} の細胞内への過剰流入が病態の引き金ではないかと考え、病態再現研究を進めた。DMD 患者由来 iPS 細胞に先述の *MYOD1* 強制発現ベクターを導入し、筋細胞へと分化させた。筋分化効率、成熟度は健常コントロール細胞と同等であった。また分化 9 日目の細胞内 Ca^{2+} 濃度を蛍光プローブで可視化し定量したところ、これも健常コントロール由来筋細胞と明らかな差はなかった。そこで分化させた骨格筋細胞に電気刺激を与えて収縮させ、 Ca^{2+} イメージングにより筋細胞収縮時の Ca^{2+} 濃度を測定したところ、健常コントロール由来筋細胞と比較し有意に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇していた (15)。この Ca^{2+} の過剰流入が、*Dystrophin* の欠損によって惹起されているのかを確認するため、我々は DMD 患者 iPS 細胞由来筋細胞にエクソンスキッピング製剤を作用させ、*Dystrophin* の発現を回復させた患者由来筋細胞を用いて電気刺激実験を行った。すると確かに *Dystrophin* 発現回復型 DMD 患者由来筋細胞においては筋収縮時の細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下した (図 2) (15)。また筋細胞内 Ca^{2+} 濃度をイオノフォアを用いて強制的に上昇させると、培養上清中のクレアチンキナーゼ (CK) 活性が上昇すること

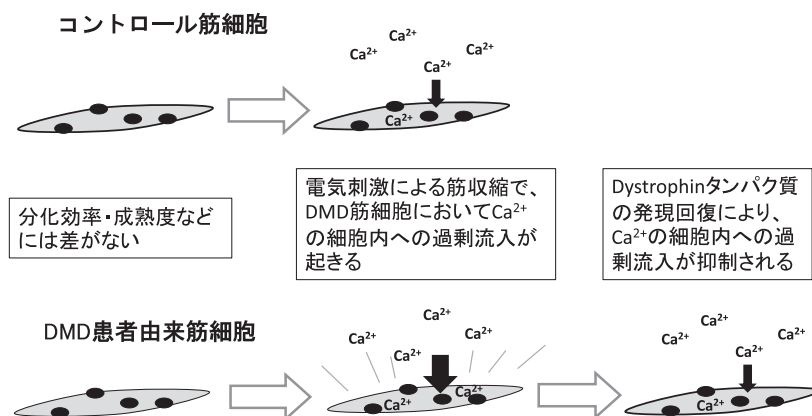


図2 デュシェンヌ型筋ジストロフィーの in vitro 病態再現

を見出した(15). これは細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により筋細胞が障害を受け、筋細胞からの CK の漏出が生じるためと考えられる. 分化9日目の筋細胞においては健常コントロールと DMD 患者由来筋細胞を比較しても、培養上清中の CK 活性に差はなかった. 次にイオノフォアを作用させる試験を、健常コントロール由来と DMD 患者由来の筋細胞において比較すると、DMD 患者由来筋細胞において有意に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇しており、培養上清中の CK 活性上昇が高度に認められた(15). DMD 患者由来筋細胞にエクソンスキッピング製剤を作用させた Dystrophin 発現回復型の筋細胞では、この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および CK 活性の高度上昇が抑えられることを見出し、確かに Dystrophin の発現が細胞内 Ca^{2+} 濃度に関与し、その濃度上昇が筋細胞の障害を引き起こしていることが確認された(15). 以上の結果より、我々は DMD の初期病態として収縮時の過剰な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が重要であることを見出した. 同時に、このイオノフォア負荷による CK 活性の上昇が、TRP チャンネル阻害薬である Retinium Red の添加により、DMD 筋細胞においてのみ抑制されることも見出しており、DMD 筋細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に何らかの TRP チャンネルが関与する可能性を示唆している. 現在、この筋収縮時の過剰な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をターゲットとした創薬スクリーニング系の開発を行っており、初期病態を抑えることで Dystrophin 変異のタイプに依存しない汎用性のある治療薬開発を行いたいと考えている.

5. おわりに

ヒト iPS 細胞は細胞移植治療のみならず、病態モデルによる新治療法確立に向けた有益なツールとして期待されている. 我々は筋ジストロフィー患者の体細胞から作製された iPS 細胞を、高効率で確実に骨格筋へ

分化させる方法を確認した. さらに、その患者由来 iPS 細胞を骨格筋に分化され、病態に即したストレスを与えることで病態を再現することにも成功している. この細胞は、筋ジストロフィーの病態モデルとして詳細な病態解析に応用されることはもちろん、スクリーニングによる薬剤開発を目指した役割も多いに期待されている. すなわち、病態モデルが確立されれば、その時点では詳細なメカニズムが分からなかったとしても、病態を可視化することで化合物のスクリーニングを行うことは可能である(図3). 例えば健常者の細胞では蛍光を発しないのに、患者の細胞では蛍光を発するという病態モデルができたとすると、添加により患者細胞で蛍光を発しなくなるような化合物を探すことで、治療薬のリード化合物を探索することが可能であり、さらにその化合物の機能を解析することで、病態のメカニズムにも迫ることが可能である.

またスクリーニングへの応用以外にも、研究のツールとして iPS 細胞を用いるメリットが二つあると考える. 一つは患者由来の筋細胞をインタクトな状態で使用できる点である. 筋疾患分野では、これまで筋生検時に入手できる患者由来の筋芽細胞を用いて病態研究を実施してきた. DMD 患者由来筋芽細胞においては、増殖能の低下や筋管分化能の低下などの表現型が報告されてきた(16, 17). しかしながら、これらの表現型は Dystrophin の欠損に直接起因しているのか、骨格筋での慢性炎症状態により修飾されたものであるのか不明である. また骨格筋の壊死・再生が繰り返されることにより、DMD 患者の筋芽細胞では活発な細胞分裂が続くことによってテロメアが短くなり、増殖能が低下するという報告もあり(18, 19), Dystrophin 欠損の直接的な影響ではなく、壊死・再生の進行による二次的な表現型であると考えられる. 一方、患者由来の線維芽細胞を iPS 細胞化することにより、上記のよ

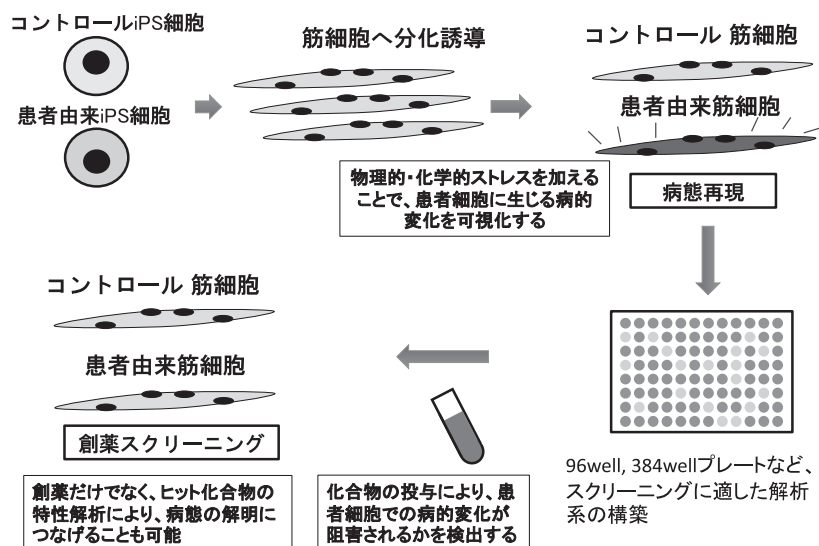


図3 iPS細胞技術を活用した筋疾患に対する創薬研究

うな二次的な影響はキャンセルされ、テロメア長も修復される。その患者由来 iPS 細胞から分化誘導した筋細胞を使用することで、Dystrophin を欠損した筋細胞が初めて収縮するときの変化を捉えることが可能になり、DMD の初期病態を解析することが可能になった。初期病態をターゲットに創薬研究することで、より効果的な治療薬創出が期待できる。二つ目は、iPS 細胞は遺伝子修復が容易であるため、信頼できるコントロール細胞を作製することが可能となった点があげられる。近年の遺伝子編集技術の進歩は目覚ましく、我々も遺伝子編集技術を用いて Dystrophin の発現を回復させた DMD 患者由来 iPS 細胞を作製することに成功している(20)。遺伝子背景が同一なコントロール細胞を用いることで、より信頼できる病態再現モデルの構築が可能になり、治療薬創出のための解析系の精度が高まることが期待される。

このように今後発展が期待されるヒト細胞を用いた創薬スクリーニングの分野であることから、我々は樹立した細胞を理研バイオリソースセンターに順次寄託し、広く研究者に活用していただきたいと考えている。我々が構築した骨格筋分化誘導法は比較的簡便であり、再現性も極めて高いため、多くの研究者に使っていただけるものと確信している。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Takahashi K, et al. Cell. 2007;131:861-872.
- 2) Inoue H, et al. Clin Pharmacol Ther. 2011;89:655-661.
- 3) Malicdan MC, et al. Nat Med. 2009;15:690-695.

- 4) Tanaka A, et al. PLoS One. 2013;8:e61540.
- 5) Miyoshi K, et al. Brain. 1986;109(Pt 1):31-54.
- 6) Liu J, et al. Nat Genet. 1998;20:31-36.
- 7) Bansal D, et al. Nature. 2003;423:168-172.
- 8) Hoffman EP, et al. Nature. 1987;330:754-758.
- 9) Hoffman EP, et al. Cell. 1987;51:919-928.
- 10) Nowak KJ, et al. EMBO Rep. 2004;5:872-876.
- 11) Cirak S, et al. Lancet. 2011;378:595-605.
- 12) Constantin B, et al. J Muscle Res Cell Motil. 2006;27:375-386.
- 13) Iwata Y, et al. Hum Mol Genet. 2009;18:824-834.
- 14) Millay DP, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:19023-19028.
- 15) Shoji E, et al. Sci Rep. 2015;5:12831.
- 16) Blau HM, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80:4856-4860.
- 17) Delaporte C, et al. J Neurol Sci. 1990;95:77-88.
- 18) Webster C, et al. Somat Cell Mol Genet. 1990;16:557-565.
- 19) Decary S, et al. Neuromuscul Disord. 2000;10:113-120.
- 20) Li HL, et al. Stem Cell Reports. 2015;4:143-154.

著者プロフィール

櫻井 英俊 (さくらい ひでとし)

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門、准教授、博士 (医学)。

◇ 1998 年名古屋大学医学部卒業後、名古屋掖済会病院 腎臓内科医員として勤務。'01 年から神戸理化学研究所・発生再生科学総合研究センターにて学外研究。ES 細胞からの沿軸中胚葉分化を研究する。その後名古屋大学医学部・免疫学講座、京都大学再生医科学研究所・再生増殖制御学講座で研究員として研究。'10 年より京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 特定拠点講師。iPS 細胞技術を活用し、難治性筋疾患に対する新規治療法を開発すべく研究に励んでいる。'15 年より現職。◇研究テーマ：iPS 細胞技術を用いた、筋疾患に対する新規治療法開発。◇骨格筋幹細胞移植による再生医療研究と、患者由来 iPS 細胞を用いた治療薬開発研究の二つのテーマを行っている。◇趣味：プロ野球観戦。

