

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860786

研究課題名(和文) Danon病iPS細胞由来心筋・骨格筋細胞の解析と治療薬効果の評価

研究課題名(英文) New therapeutic agent for danon disease: reserch from patient specific iPSCs derived cardiomyocytes.

研究代表者

吉田 昌平 (Yoshida, Shohei)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：30623657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：女性Danon病患者からiPS細胞(iPSC)の作製に成功した。しかし、LAMP2蛋白の免疫染色においてDanon病患者全てのiPSCが染色され、LAMP2陽性、陰性のiPSCに対する検討は行えなかった。採取したcDNAに対しLAMP2のPCRを行ったところ、Exon6欠損Line(miPSC)と発現Line(ciPSC)を確認することが出来た。miPSCと、ciPSCにおいてiPSC、iPSC由来心筋様細胞に関して検討を行った。心筋様細胞の透過電子顕微鏡での形態評価では、miPSCでDanon病に特徴的な自己貪食空胞の存在が確認出来た。治療候補薬の投与と評価は行うことができず、期限となった。

研究成果の概要(英文)：We manufactured hiPSCs from female patients of danon disease. Genomic sequencing of iPSCs were performed. We identified a 4-bp deletion in LAMP2 at the intron 6 splice site (IVS6+1_4delGTGA) in all lines of hiPSCs same as their whole blood as previously reported. However, we could not compare the differences between LAMP2 positive and negative iPSCs, because all of the iPSC lines were stained by LAMP2 antibody IF. cDNA sequence of LAMP2 was performed. Exon6 skipping was proved in some of the hiPSC lines (miPSCs) and the other lines (ciPSCs) had normal cDNA sequence of LAMP2. We compared the difference between miPSCs and ciPSCs. The miPSCs derived cardiomyocytes had intracytoplasmic vacuoles which was thought to be autophagosome: the characteristics of danon disease. On the contrary, we could not find any abnormal vacuole in the cytoplasm of ciPSCs. We could not administer and make evaluation of the candidate therapeutic agent because of expiration of the term.

研究分野：循環器内科

キーワード：danon病 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ダノン病は肥大型心筋症、近位筋の筋力低下、知能障害を3主徴とし、lysosomal-associated membrane protein(LAMP)2 の遺伝的欠陥により生じるLysosome 病である。1981 年に Danon ら (Neurology 1981;31:51-57) によって報告され、2000 年に Nishino らによってその病院が Lysozome 膜蛋白質である LAMP2 の異常であることが報告された。LAMP2 は Xp24 上に存在し、X 染色体優性遺伝形式の様相を呈する。典型的には男性患者においては 10 歳代で心症状が出現し、30 歳代までで心不全または不整脈で死亡する。本疾患は希な疾患であるが現時点では対症療法のみしか治療がなく、発症すると進行が早く予後不良な疾患であることが問題である。

(2) 2006 年京都大学山中伸弥らのグループは人工多能性幹細胞 (induced pluripotent cells: iPS cells) が作製できることを報告した。2011 年には皮膚線維芽細胞からではなく、末梢血 T 細胞から iPS 細胞が作製可能であることが報告された。当研究室では末梢静脈血(T 細胞)から誘導した iPS 細胞由来心筋細胞を用いて虚血再灌流障害についての研究を遂行中であった。

(3) 当大学、小児科学講座ではダノン病の家系を有しているが、先日若年にして男児が永眠し、当該家系での保因者は残された女児のみとなっている。進行性の疾患であり現在経過観察のみを行っているが、早期に画期的な治療法の開発が望まれる。小児科学研究室グループでは現在研究中の治療薬候補を検討しており、その効果の確認を先んじて *in Vitro* で行うことが望まれた。

2. 研究の目的

(1) ダノン病のヘテロ接合体患者(保因者)からダノン病の表現系である肥大型心筋症、近位筋の筋力低下を示す病理所見が iPS より作製した心筋細胞・骨格筋細胞から認められるかどうかを健常人 iPS 細胞と由来心筋・骨格筋細胞をコントロールとして明らかにする。

(2) 更に、*In vitro* での表現系が確認された後には培養液中に治療候補薬を投与し、光学顕微鏡・電子顕微鏡での病理所見の改善が認められるかどうかを確認し、治療薬としての可能性を考察する。

3. 研究の方法

(1) 保因者より iPS 細胞を樹立する。
ダノン病患者から iPS 細胞の作成がなされた報告は今までにない。SendaiVirus を使用していわゆる山中 4 因子をダノン病患者末梢血から分離した T 細胞に導入し、既報(Cell Stem Cell. 2010;7(1):11-4)に準じて iPS 細胞

胞を作製する。

(2) 上記保因者 iPS 細胞由来の心筋細胞・骨格筋細胞に対して種々の評価を行う。
光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いた形態学的評価、LAMP2 を初めとしたダノン病に関係する蛋白の免疫染色、サンガー法でのヌクレオチド変異の確認など健常人から作成された iPS 細胞を対照として検討を行う。

(3) 上記保因者から作製した iPS 細胞由来心筋細胞・骨格筋細胞に対して治療候補薬を使用し、病理所見の改善が認められるかどうかを確認する。

4. 研究成果

(1) 保因者末梢血より分離した T 細胞に健常人同様に Sendai virus を用いて山中 4 因子を導入することで、ダノン病患者由来 iPS 細胞の樹立は容易であった。

免疫染色、PCR で未分化能を確認(図 1)、胚様体を作成した後の免疫染色で三胚葉分化を確認した。

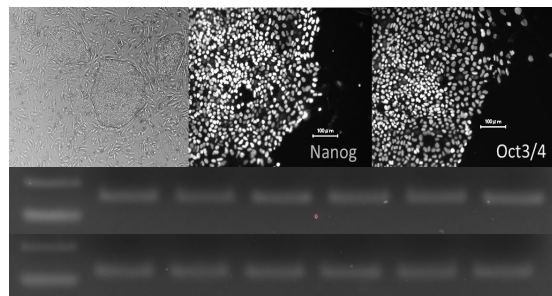


図1 iPS細胞の未分化能の確認。

上：左から明視野・抗 Nanog 抗体・抗 Oct3/4 交代による免疫染色

中：PCR nonog、下：OCT3/4

(2) iPS 細胞由来心筋様細胞の作製。当初胚様体を形成し、心筋分化を行っていたが非常に分化効率が悪く、心筋様細胞の作成に難渋した。最終的には既報(Nat Protoc. 2013;8(1):162-75)における GiWi 法で心筋分化を行うことで、比較的効率よく beating する分化心筋様細胞を採取することが出来た(図 2)。作製心筋様細胞は PCR、Western blot でも TNNT2 の発現を確認した。

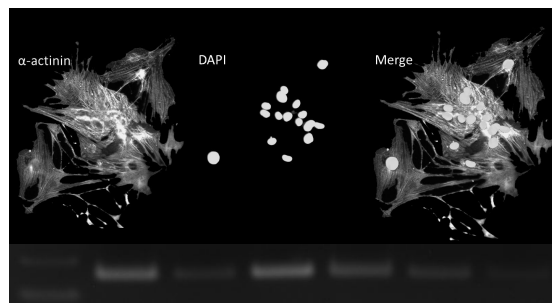


図2 iPS細胞由来心筋様細胞

上：免疫染色

下：PCR TNNT2

(3) LAMP2 免疫染色では全ての line が染色された(図 3)。予想においては iPS 細胞においても染色される line と染色されない line が現れるはずであったが、予想外の結果であった。単離した単核球でも染色を行ったが、同様の結果であった。

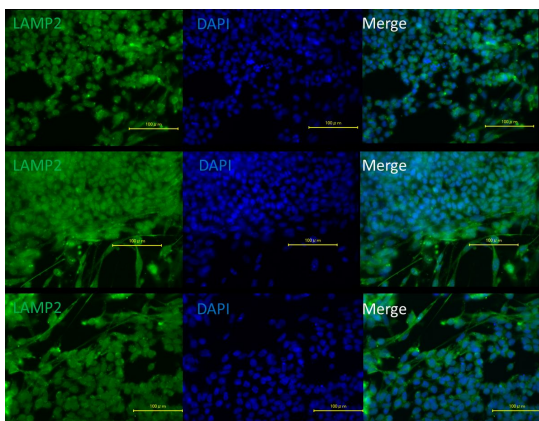


図 3 LAMP2 免疫染色
上段 2 段はダノン病患者由来 iPS 細胞。下段は健常者由来 iPS 細胞。全ての line で LAMP2 が染色された。

(4) 保因者由来 iPS 細胞の全ての line(6 line)のゲノム DNA のシーケンスを行った。全ての line において c.864+1 del GTGA を確認した(図 4)。

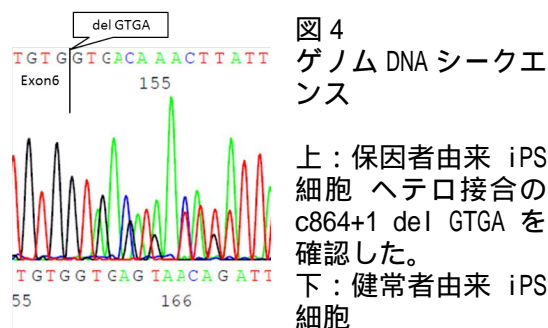


図 4
ゲノム DNA シーケンス

上：保因者由来 iPS 細胞 ヘテロ接合の c864+1 del GTGA を確認した。
下：健常者由来 iPS 細胞

(5) cDNA のシーケンス。mRNA から cDNA を作製、LAMP2 の PCR を行ったところ、2 通りの PCR 産物が泳動された。シーケンスを行ったところ、LAMP2 の Exon6 が欠損している mRNA を産生する line(miPSC)と健常人と同様の mRNA を産生する line(ciPSC)があることが確認された。(図 5、図 6)



図 5
LAMP2 cDNA の PCR 左から 4 検体が保因者由来 iPS 細胞、右 2 検体は健常者由来 iPS 細胞

から採取した cDNA。保因者由来 iPS 細胞からは 2 種類の塩基量を持つ PCR 産物が産生された。

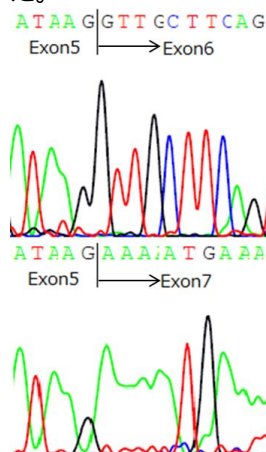


図 6
2 種類の PCR 産物のシーケンス。保因者から健常人と同様の cDNA を産生する iPS 細胞の line と、Exon6 を欠損する iPS 細胞の line が同定された。

(6) Western blot での LAMP2 蛋白産生の確認。上記 ciPSC、miPSC の蛋白に対して LAMP2 蛋白の Western blot を行った(図 6)。miPSC においては異常な分子量を持つ LAMP2 蛋白が産生されており、蛍光免疫染色で染色されることには矛盾がないと考えられた。

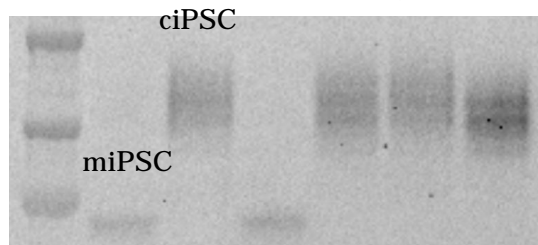


図 7 LAMP2 Western blot
miPSC においては異常な分子量の抗 LAMP2 抗体で染色されるバンドが認められた。

(7) 電子顕微鏡観察
心筋様細胞に分化させた miPSC(miPSC-CM)、ciPSC(ciPSC-CM)をそれぞれ透過電子顕微鏡で観察を行った。透過電子顕微鏡において miPSC-CM では自己貪食空胞と思われる空胞がサルコメアを含有する細胞に散見された。

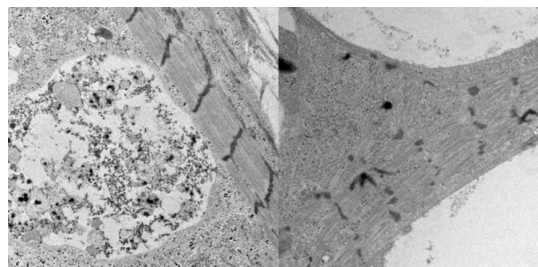


図 8 電子顕微鏡(x2000)での観察所見。
左：miPSC-CM。サルコメア構造を持つ細胞内に自己貪食空胞と思われる空胞様の構造物を散見する。
右：ciPSC-CM

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6．研究組織

(1)研究代表者

吉田 昌平 (YOSHIDA, Shohei)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30623657