

令和元年6月24日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19632

研究課題名(和文) 女性ダノン病iPS細胞由来心筋を用いたXISTの役割と遺伝子治療の可能性について

研究課題名(英文) Characteristics of induced pluripotent stem cells from clinically divergent female monozygotic twins with Danon disease.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性心筋疾患であるダノン病の女性患者よりiPS細胞を樹立し、心筋細胞へ分化させた。分化した心筋はダノン病特有の表現型を持つ細胞と持たない細胞に分けることができ、その原因はダノン病の異常分子であるLAMP2が発現しているかしていないかであることを確認した。この2種類のiPS細胞が作成される理由がX染色体の不活性化の際によるものであることを、ヒトアンドロゲンレセプター抗体のCAGリピート数を用いて解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダノン病女性患者から疾患特異的な表現型を持つiPS細胞と持たないiPS細胞を作成し、心筋に分化させることに成功した。本研究の結果は、逆に表現型を持たないが、遺伝子変異を持ついわゆるキャリアから疾患特異的なiPS細胞が作成できる可能性を示唆している。また、本研究結果はその他のX連鎖性の疾患にも応用することができる。加えて常染色体遺伝性の疾患の疾患特異的iPS細胞を作成する際にX染色体の異常にも配慮する必要性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We successfully established two sets of induced pluripotent stem cell(iPSC) lines and iPSC derived cardiomyocyte(iPSC-CMs) subsequently, that expressed either wild-type or mutant LAMP2 allele from female with danon disease, of which only the populations expressing mutant LAMP2 showed autophagic failure. By means of androgen receptor methylation assays, we revealed that the XCI patterns of the iPSCs elucidate the LAMP2 expression and subsequent in vitro phenotype. The in vitro characteristics of generated iPSCs and iPSC-CMs did not rely on the clinical phenotype.

研究分野：循環器内科

キーワード：ダノン病 iPS細胞 オートファジー X染色体不活性化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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 らによってその病因が 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、女性にも発症し 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。本疾患は現時点では対症療法のみしか治療法がなく、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。

当大学、小児科学講座ではダノン病の家系を有している。しかしながら、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兒のみとなっている。患児はヘテロの LAMP2 遺伝子変異を保持しており、表現型は認めているものの現在経過観察のみを行っている。先日 (Stem Cells 2015;33:2343-50) 男性ダノン病患者由来 iPS 細胞を用いて抗酸化薬である N-acetylcysteine が酸化ストレスを軽減し、アポトーシスを軽減したという報告がなされた。しかしながら根本治療とはならず、早期に画期的な治療法の開発が望まれる。

X chromosome inactivation(XCI)は雄と雌の染色体発現を同等にするために片方の X 染色体の転写を不活化する哺乳類の雌に起こる過程であり (Nature 1961;190:372-373)、X 染色体上の *XIST* から転写される Non coding RNA である XistRNA によって引き起こされる。iPS 細胞へのリプログラミングの過程で一度不活化された X 染色体は再活性化する (Stem Cell Reports 2014;15:896-909) と報告されており、この複雑さから女性の X 染色体優性遺伝疾患の iPS 細胞の解析は敬遠されがちであるが、当研究室では女兒のダノン病患者から iPS 細胞を樹立し、心筋細胞への分化に既に成功している (JSPS 科研費課題番号 26860786)。更に作製 iPS 細胞の mRNA の解析で、コロニーによって正常 LAMP2RNA を発現しているクローンと、異常 LAMP2RNA を発現しているクローンがあることを確認した。この、Phenotype を認めている患児からも正常 RNA、正常蛋白を発現する iPS 細胞が作成できることは、*XIST* の操作が治療の対象となる可能性を示唆している。どちらの X 染色体の転写も抑制されていない状態の iPS 細胞は癌原性を持ち、分化能に乏しいという既報 (Cell Stem Cell 21;11:75-90) は認めるが、分化後の細胞であり、もともと分裂能に乏しい心筋細胞の正常 allele の *XIST* の抑制を行うことが出来れば、正常蛋白が作製でき、かつ分化能や癌原性を問題とせず臨床応用につなげていくことができると考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の主な目的は以下の 3 点を明らかにすることである。

女性ダノン病患者由来 iPS 細胞から作製した、正常 X 染色体が抑制されている心筋細胞の表現型を確認する。

正常 X 染色体が抑制されている心筋細胞に対して *XIST* をノックアウトした場合、正常蛋白が発現し、in vitro での表現型が salvage されるかどうかを明らかにする。

正常 X 染色体が抑制されている心筋細胞に対して直接 *LAMP2* の過剰発現することによる salvage と、*XIST* ノックアウトモデルでの salvage で癌化などの差が出ないかを確認する。

## 3. 研究の方法

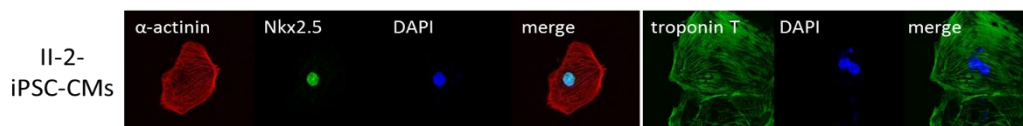
既に作製済みである女性ダノン病患者由来 iPS 細胞を心筋細胞へ分化させ、その表現型について形態学的・生化学的評価を行う。形態学的には光学顕微鏡、電子顕微鏡での自己貪食空胞の有無やグリコーゲン顆粒の蓄積を確認する。また生化学的には免疫染色を行う。

異常 LAMP2RNA が転写されているクローンに対し、CRISPR/Cas システムなどのゲノム編集ツールを用いて *XIST* のノックアウトを行い、正常 RNA、蛋白の発現を確認し、更に表現型の正常化について評価を行う。

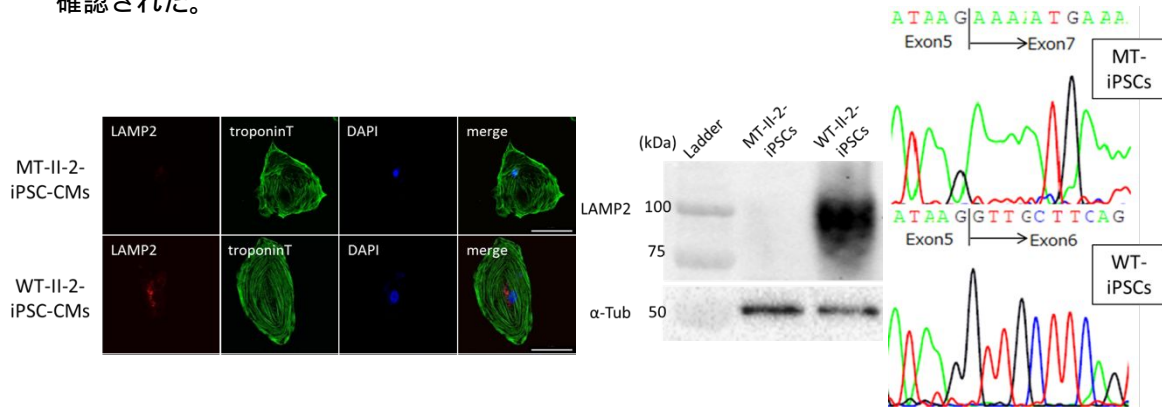
異常 LAMP2RNA が転写されているクローンに対し、直接 *LAMP2* の過剰発現を行ったものと前述の の細胞を比較し、分裂能・分化能の点での差異を検討する。

## 4. 研究成果

既報に則り、ダノン病特異的な iPS 細胞から心筋細胞へ分化させた。また、純化のために乳酸培地を使用した (Lian X et al. Nat Protoc. 2013;8:162-175, Tohyama S et al. Cell Stem Cell. 2013;12:127-37)。心筋細胞であることの確認は、免疫染色と PCR、さらに拍動を確認することで行なった(下図)。

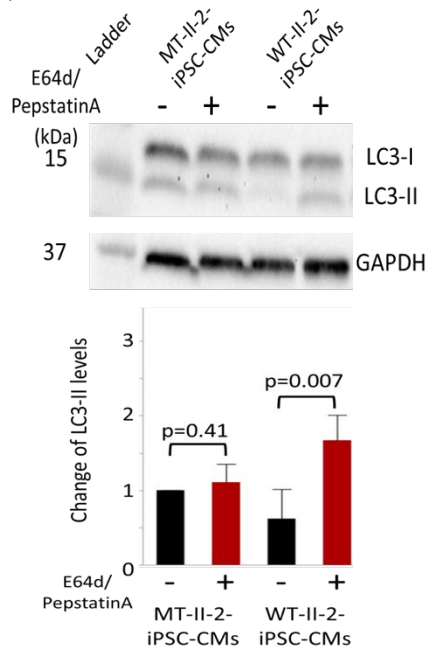


LAMP2 の発現を確認したところ LAMP2 陰性(MT)、陽性(WT)の iPS 細胞由来心筋細胞が作製された(下図)。Western blot で蛋白の発現を確認すると、WT においては 100kDa 周囲に LAMP2 蛋白のバンドが認められたが、MT においては認められなかった。cDNA に対して PCR、サンガー法によるシーケンスを行うと、MT においては Exon6 の skip が認められ、iPS 細胞においては、LAMP2 が発現する line、発現しない line の双方が作成されるということが確認された。

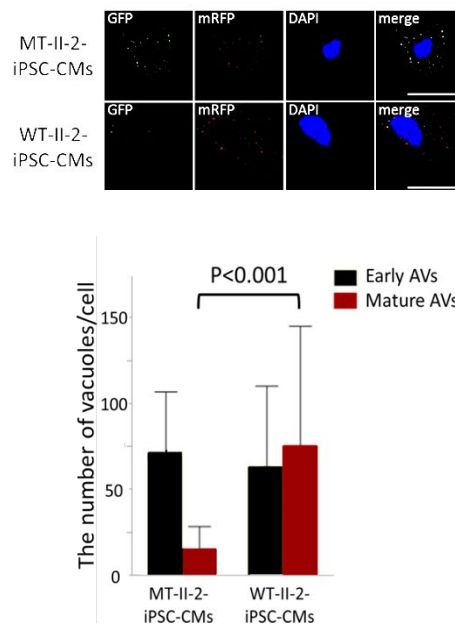


さらに表現型の確認のためにダノン病の本態であるオートファジーに関する実験を行なった。LC3 のウエスタンブロットでは WT の心筋細胞においては Protease inhibitor を入れることで、LC3-II の増加が認められたが、MT の細胞においてはその変化は認められなかった(下図(1))。mRFP-GFP tandem-fluorescence tagged LC3 を用いたオートファジーの流れについての検討も行なった。WT においては赤色の Mature なオートライソソームが多く認められるのに比して、MT ではほぼ全てが黄色の発色点で Mature な空胞がほとんど認められず、オートファゴソームとライソソームの fusion が阻害されていることが示唆された(下図(2))

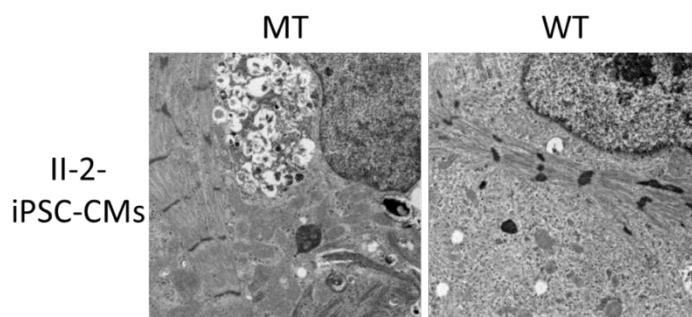
図(1)



図(2)

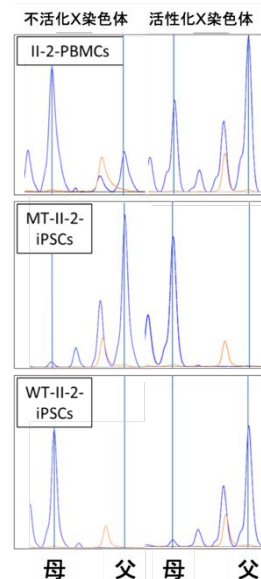


電子顕微鏡でも同様に心筋細胞を確認し、サルコメアを含む心筋様細胞を認め、MT-iPSC-CMs においてはミトコンドリアなどの小器官片を含んだ自己貪食空胞と思われる空胞を認めた(下図)。



X染色体の不活化に着目して上記の原因を検討した。末梢血ではX染色体が偏り無く発現していましたが、iPS細胞においてMTで母方のX染色体が活性化しており、WTでは父方のX染色体が活性化している現象を認め、X染色体の不活性化でiPS細胞の表現系を説明できる可能性が示唆された(右図)。

当研究室で行っていたCRISPR/Cas9でのXISTのノックアウトを検討したが、iPS細胞の段階でノックアウトに成功せず。siRNAでのノックダウンも心筋細胞では不可能であった。



## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

1. Characteristics of induced pluripotent stem cells from clinically divergent female monozygotic twins with Danon disease.  
Yoshida S, Nakanishi C, Okada H, Mori M, Yokawa J, Yoshimuta T, Ohta K, Konno T, Fujino N, Kawashiri MA, Yachie A, Yamagishi M, Hayashi K  
 Journal of molecular and cellular cardiology 114 234-242 2018年1月  
 査読あり doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.11.019.

### 〔学会発表〕(計2件)

1. Generation of disease specific iPSC-derived cardiomyocyte and investigation of their characteristics: study with clinically divergent female monozygotic twins with Danon disease.  
吉田 昌平  
 ESC Congress 2018 2018年8月
2. Female iPSC Cells Which Well Modeled "X-linked" Danon Disease Lose Their Characteristics in Association with Culture Periods  
吉田 昌平  
 第81回日本循環器学会総会学術集会 2017年3月

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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、研究者個人に帰属されます。