

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 筋疾患に対する治療薬の創出を目指した研究
(英語) Research for Drug Development of Muscular Diseases

研究開発実施期間: 平成29年8月29日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 櫻井 英俊
(英語) Hidetoshi Sakurai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学・iPS細胞研究所・准教授
(英語) Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application, Associate Professor

II 研究開発の概要

【研究開発の目的と背景】

本研究開発では、疾患特異的 iPS 細胞を活用して病態解析を進めて創薬スクリーニングを実施することで、筋疾患に対する治療薬創出を目指した。対象疾患として、患者数が比較的多くモデル動物でも病態研究がなされているが、依然としてコアな病態が不明で治療薬の創出に至っていないデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)、筋強直性ジストロフィー (DM1)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の3疾患と、患者数が極めて少なく病態研究が進んでいない先天性筋無力症候群 (CMS) と先天性ミオパチーの2疾患、計5疾患を選定し研究期間内にスクリーニング系の構築を通じて企業への導出を目指すとともに、病態研究を進め新規の創薬ターゲットの同定を目指した。

さらに筋疾患の研究拠点として、多くの筋疾患研究が iPS 細胞を用いて進むように、新規培養技術や解析技術の開発も行った。これまでに我々が開発した筋分化誘導法で、分子レベルの変化に基づき病態解析は可能であることは示してきたが、多くの筋疾患で成熟化障害や構造異常、神経筋接合部形成異常など、単一筋細胞では解析不能な病態が存在し、ヒット化合物の有効性まで検証するには不十分であった。本研究開発では iPS 細胞の多分化能を活かし、成熟筋管、神経筋接合部、3D 構造を持つ高次筋組織を構築し、生理学的解析法なども開発することで、これまで困難であった解析を可能とし、多くの筋疾患の病態再現・薬効評価への応用を目指した。また筋疾患はほとんどが希少難病であるが、変異修復細

胞株を作製することで、症例数が少なくても精度の高い解析ができる。

【研究成果の概要】

研究開発の成果は、対象疾患あるいは開発項目ごとに記載する。

研究対象疾患 1. デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)

筋細胞内 Ca²⁺濃度の上昇 (Shoji et al. Scientific Reports, 2015) という細胞表現型を用いて Ca²⁺イメージングによるスクリーニングを実施した。STIM1-Orai1 という Ca チャネルシステムが DMD 病態における高 Ca²⁺状態に寄与していることを明らかにした (Uchimura et al. Biomedicines, 2021)。しかしながら、スクリーニングの結果では病態改善効果を持つような有用な化合物が得られなかった。より臨床病態を反映したモデル作製のため、電気刺激による筋収縮刺激を負荷して筋細胞の成熟化を促進する手法を開発し、さらに持続的な電気刺激を継続して負荷することで、DMD 患者由来筋細胞において、収縮速度が低下するという「易疲労性モデル」を構築した。このモデルを用いて小スケールのスクリーニングを実施し、筋弛緩薬であるダントロレンやいくつかの Ca²⁺チャネル阻害薬が、易疲労性を改善することを明らかにした (Uchimura et al. Cell Reports Medicine, 2021)。また筋小胞体への Ca²⁺の再取り込みを制御する SERCA1 という分子の機能に注目し、SERCA1 の活性化が細胞内 Ca²⁺のハンドリング改善を介して DMD の病態改善効果を持つことを明らかにした (Nogami et al. Human Molecular Genetics, 2021)。

研究対象疾患 2. 筋強直性ジストロフィー 1 型 (DM1)

DM1 の分子病態である CTG リピート伸長について、リピート構造を伸長させるメカニズムの解明を進めた。まず DM1 患者由来 iPS 細胞を継代培養すると CTG リピートが伸長することを明らかにしている (Ueki et al. Scientific Reports, 2017)。このモデルを用いて、未分化 iPS 細胞をサブクローニングし、様々なリピート長を持つ同一患者由来の iPS 細胞を複数樹立した。このサブクローンの中で継代培養によっても CTG リピートが伸長しない表現型を持つクローンを同定し、網羅的遺伝子発現解析を他のクローンと比較して実施した。様々な発現変動遺伝子が同定され、強制発現あるいはノックダウンによる機能評価を実施し、ZNF850 という分子が CTG リピート伸長に関与する分子であることを明らかにした (Kamon et al. in revision)。

研究対象疾患 3. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD)

FSHD は遺伝性疾患ながら、左右非対称性や患者間のばらつき大きさなどから、遺伝的要因以外の病態修飾因子の存在が示唆されていた。そこで FSHD 患者由来 iPS 細胞 (FSHD-iPSC) を MyoD 強制発現による分化誘導法で筋細胞に分化させ、様々な外的ストレスを加えることで原因遺伝子 *DUX4* の発現が上昇するのかどうかを検証した。その結果、H₂O₂ を添加して酸化ストレスを与えた際に *DUX4* の発現が 2~3 倍に上昇することを見出した。メカニズムとして酸化ストレスにより DNA 損傷応答シグナルの一つである ATM シグナルが活性化し、*DUX4* 発現上昇を誘導することが明らかとなった。またこれらのフェノタイプは遺伝子修復株では見られなくなるため、病態を反映したものであることが明らかとなった (Sasaki-Honda et al. Human Molecular Genetics, 2018)。

次に治療法開発の戦略として、エピゲノム編集による原因遺伝子 *DUX4* の発現抑制をターゲットに研究を進めた。DNA 切断活性のない dCas9 に KRAB や DNMT3A などのメチル化誘導因子を結合したシステムを使って D4Z4 領域に特異的な sgRNA とともに FSHD-iPSC に遺伝子導入し、D4Z4 領域のメチル化誘導に挑戦した。その結果、一過性の遺伝子導入を 3 回繰り返すことで、FSHD-iPSC における D4Z4 領域のメチル化誘導に成功し、*DUX4* 発現の抑制に成功した (Sasaki-Honda et al. bioRxiv に Preprint を公開, 2022)。

研究対象疾患 4. 先天性筋無力症候群 (CMS)

CMS は、様々な原因遺伝子変異により筋無力症を発症する疾患群の総称である。その中でも *DOK7* 変異症例について患者由来 iPS 細胞を樹立し病態解析を進めた。*DOK7*-CMS 患者から樹立した iPS 細胞から筋管を形成し *DOK7* p. G64R バリエントは ER ストレスを惹き起こし perinuclear aggresome を形成することを明らか

にした。加えて近傍の DOK7 p. T77M にも類似の病態機構が存在することを明らかにした (Zhang et al. Human Molecular Genetics, 2023)。

研究対象疾患 5. 先天性ミオパチー

先天性ミオパチーは、様々な原因遺伝子変異により出生時から小児期より筋力低下を来す疾患群の総称である。この研究開発では、MTM1 変異症例と LMNA 変異症例について患者由来 iPS 細胞を樹立し病態研究を進めた。MTM1 変異症例では、mTORC1 シグナルの過剰活性化などの病態再現に成功し、ライソゾームの移動障害という表現型を見出した。また LMNA 変異症例では、筋細胞分化後の核形態異常という病態再現に成功した。

技術開発項目 1. 2D 成熟化誘導

再生医療用途に開発していた骨格筋幹細胞の分化誘導系を用いて骨格筋幹細胞を誘導・分離し、骨格筋幹細胞を起点にマトリゲルを重層する手法により、辺縁核や T 管構造を持つ成熟化した筋線維を 2D で形成することに成功し、特許出願もした (特願 2019-134123)。また技術開発項目 4 と連携し、骨格筋におけるチャネル発現をプロファイリングしたところ、初代培養細胞と同等の成熟度を持つ筋管細胞である事が明らかとなった。さらに長期間の成熟化培養で、三つ組み構造が整列するところまで成熟化が進むことも見えており、現在得られるヒト細胞の *in vitro* 培養系では、最も成熟化したレベルまで誘導できたと考える (Fujiwara et al. Frontiers in Cell and developmental Biology, 2022)。

技術開発項目 2. 神経筋接合部誘導

神経筋接合部 (NMJ) の *in vitro* での誘導のため、iPS 細胞から運動神経細胞と骨格筋細胞を別々に誘導してから共培養する手法を試みた。当初、iPS 細胞から分化誘導した骨格筋細胞の上に運動神経細胞を播種する、あるいは逆に、運動神経細胞の培養上に運動神経細胞を播種したうえで、様々な培養条件での維持を行って NMJ 形成の観察を試みたが、形成効率は極めて低かった。結果的に NMJ 形成を安定的に観察することができる手法として確立することができたのは、区画化培養器具を使用して運動神経細胞と骨格筋細胞をそれぞれの条件で培養し、両区画を隔てるグリースを貫通した神経突起が骨格筋細胞に接触した場合に形成される NMJ を観察する、という方法であった。この区画培養法にて誘導した NMJ の生理学的な機能を検討した結果、神経細胞培養区画に KCl を添加することにより神経細胞を強制的に脱分極させた場合に、一部の筋細胞で細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を認め、機能的な NMJ が形成されていることを明らかにした。

技術開発項目 3. 3D 筋線維形成

株式会社 Nippi の協力により、骨格筋組織を効率よく脱細胞化するプロトコールを選定した。さらにそのプロトコールを用いて細胞培養に利用できる、食肉を利用した脱細胞骨格筋シートを考案し、それを用いた細胞培養手法を開発した。その手法を用いて、マウス筋芽細胞株 C2C12 を播種し、筋管形成を行ったところ、配向性をもって成熟化していることを確認した (Nakada et al. Bioengineering, 2022)。

この脱細胞化プロトコールと細胞培養手法を応用して、ヒト iPS 細胞から誘導した骨格筋細胞を脱細胞骨格筋シート上で培養する手法を開発した。ヒト iPS 細胞由来筋細胞は Native な脱細胞骨格筋シートでは細胞の定着効率が悪かったため、ヒト組み換えラミニン/エンタクチン (Lam/En) によって脱細胞骨格筋シートの修飾を行った。Lam/En 修飾脱細胞骨格筋シートはヒト iPS 細胞由来筋細胞の良好な定着性を示した。Lam/En 修飾脱細胞骨格筋シート上で形成されたヒト iPS 細胞由来筋細胞は良好な分化を示し、成熟した筋管細胞まで分化していることが示された。この成果は特願 2022-023837 「ヒト筋疾患モデル筋組織」として特許出願を行った。

技術開発項目 4. 生理学的機能解析

MyoD 強制発現系など、従来の iPS 由来筋細胞のイオンチャネル遺伝子の発現解析を行い、これらの細胞には骨格筋型電位依存性 Na⁺チャネル (Nav1.4) をコードする *SCN4A* 遺伝子は発現が低く、心筋型電位依存性 Na⁺チャネル (Nav1.5) をコードする *SCN5A* 遺伝子の発現が高いことがわかり、胎児期の骨格筋に近いプロ

ファイルを持つことが示唆された。このことから、従来の iPS 由来筋細胞は、電気興奮性という観点では成熟度が低い可能性が示唆された。一方、iPS 由来骨格筋幹細胞 (iMuSC) におけるイオンチャネル遺伝子発現解析を行い、*SCN4A* 遺伝子の発現が高いことを確認した。次に、iMuSC を用いてホールセルパッチクランプ法について、①実施に可能な分化時期、②培養条件、③ホールセルパッチクランプ測定に必要な溶液・電極条件を確立した。iMuSC に発現する Nav1.4 の電流測定を行い、テトロドトキシンによるチャネル阻害を用いた評価も合わせて行い、筋疾患研究に必要な電気興奮性を同細胞が有することを証明した。また、iMuSC に発現する電位依存性 K⁺チャネル電流についても測定に成功し、iMuSC の電氣的興奮性を担う主要な電流成分についての測定法は確立できた。

【研究成果の意義】

医療分野の進展に与える影響として、治療の直接的なターゲットと考えられる成果が複数得られた。FSHD における病態悪化因子として酸化ストレスを同定できたが、抗酸化剤による進行抑制は実はすでに欧州での臨床研究で成果が報告されており、複数の抗酸化サプリメントの内服で、FSHD 患者の運動機能の改善が報告されている (Free Radical Biology and Medicine, 2015)。今後、FSHD に特化した抗酸化治療薬の臨床研究への発展が期待される。エピゲノム編集による D4Z4 へのメチル化誘導についても、細胞レベルでの POC は取得でき、現在はプラスミドではなく mRNA を用いて LNP での導入を検証している、LNP で mRNA を筋注で投与することについては COVID-19 ワクチンで広く有用性が示されており、局所投与であれば臨床応用も視野に入る。またこの方法は、他のドミナントネガティブ変異疾患に対する転写抑制治療として展開できる可能性がある。

新技術の創出に対する影響としては、成熟化誘導に関する技術である。脱細胞化シート使った成熟化誘導法は iPS 細胞のみならず Primary myoblast にも応用可能で力学的な刺激の負荷に優れており、特許出願も済んでおり、骨格筋細胞を用いたモデル作製の新たなスタンダードとなる可能性もある。電気刺激による成熟誘導と表現型解析も特許出願済みであり、筋収縮を指標とした解析に有用である。iMuSC からの成熟筋管誘導法も特許出願済みであり、凍結ストックさえ作っておけば iPS 細胞を培養する必要もないため、iPS 細胞培養経験のない研究室や製薬企業への提供例が増加している。簡便にある程度成熟化した筋管が得られるため、Primary myoblast と同じような感覚で使用できる研究ツールとして広がり期待される。

社会的ニーズとの対応としては、筋疾患は治療薬の極めて乏しい分野であり、治療薬創出への大きなアンメットニーズが存在する。マウスモデルでの研究からヒト細胞・患者細胞を使った研究へのシフトの必要性が叫ばれるなかで、疾患特異的 iPS 細胞を多数樹立・寄託し、解析に適した成熟化培養法も複数開発し、土台作りは達成できた。また製薬企業とのディスカッションも定期的を実施し、最新の知見やプロトコールも共有するなど、秘密保持契約で守られた限られた数の企業であったとはいえ、ソフト面でも治療薬創出に向けた土台作りは進められた。

Our research proposal aims to develop long-awaited therapeutic approaches for muscular diseases by clarifying pathogenesis and conducting drug screening using patient-derived iPSCs. Muscular diseases are mostly monogenic, therefore suitable for the disease modeling approach employing patient-derived iPSCs. Our research group is composed of investigators specialized in muscular diseases with well-experienced technique in the use of iPSCs, together with skeletal muscle disease clinical doctors and an administrator of national registry for muscular dystrophy, to combat against the intractable diseases.

Targeted diseases the following. Duchenne muscular dystrophy (DMD), Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) and Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD), Congenital myasthenic syndrome (CMS) and Congenital myopathy.

For understanding the precise pathological conditions of the target diseases and recapitulating the pathogenesis of other muscular diseases, we will establish advanced culture techniques, including maturation of myotubes, formation of neuromuscular junctions, and reconstitution of 3D muscle fibers with decellularized ECM, and will develop new methods for physiological and biophysical analysis. Research achievements are indicated by the target diseases.

Target disease 1. DMD

Since DMD myocytes show hyper influx of Ca²⁺, we conducted a phenotypic screening by Ca²⁺ imaging. However no useful compounds were obtained. Therefore, we built fatiguability models with continuous electrical stimulation that reflect clinical pathology and identified several targets. In addition, we clarified that activation of SERCA1 has a pathological improvement effect through improvement of handling of intracellular Ca²⁺.

Target disease 2. DM1

We have elucidated the mechanism of CTG repeat expansion, which is a molecular pathogenesis of DM1. Previously, we reported that CTG repeat expansion is recapitulated during DM1-iPSC maintenance culture. Using this model, we subcloned undifferentiated iPS cells and established multiple iPS cells with various repeat lengths derived from the same patient. Among these subclones, we identified a clone with a phenotype in which CTG repeats were not expanded. Then we performed comprehensive gene expression analysis in comparison with other clones, and we identified ZNF850 as a candidate molecule involved in CTG repeat expansion in DM1.

Target disease 3. FSHD

We identified oxidative stress as a pathological modifier and clarified that DNA damage response ATM signaling is involved. We also demonstrated that DNA methylation induction in D4Z4 region by epigenome editing has a therapeutic effect to repress the *DUX4* expression.

Target disease 4. CMS

We clarified the pathology that DOK7 mutations cause ER stress in myocytes by the formation of perinuclear aggresome.

Target disease 5. Congenital myopathy

We succeeded in reproducing pathological conditions of *MTM1*-mutated patient derived myocytes such as overactivation of mTORC1 signal and found a phenotype of impaired lysosomal movement. In addition, we succeeded in reproducing the pathological condition of *LMNA*-mutated patient derived myocytes such as abnormal nuclear morphology.

During all pathological analyses, we proceeded the creation of gene repair strains by genome

editing for each disease and proceeded with the deposition of newly established iPS cells to RIKEN BRC. Moreover, we established a maturation induction method for myocytes using iPS cell-derived skeletal muscle stem cells and decellularized sheets, and demonstrated that mature myocytes are useful for pathological models including physiological analysis.