

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業

疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム

事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 先天代謝異常症の新規表現型の解析と薬剤開発の拠点研究
(英語) Study of disease mechanism and drug development for inborn errors of metabolism

研究開発実施期間：令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 江良 択実
(英語) Takumi Era

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立大学法人熊本大学・発生医学研究所・教授
(英語) Dept of Cell Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics (IMEG),
Kumamoto University.

II 研究開発の概要

先天代謝異常症とは、生体内の3つの大きな代謝である糖質代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝を司る酵素の異常によって、先天性に起こる組織・臓器障害の総称である。多くは、神経障害を有する。本研究では、特に脂質代謝異常症やアミノ酸代謝異常症での中枢神経障害対象として、研究を行う。本研究では、疾患由来の細胞を使い、異常表現型の解析とそのメカニズムの解明および薬物スクリーニング系の開発に向けたバリデーションデータ取得を目的とする。令和2年度は、主に、疾患解析を可能とする細胞培養系の適正化、異常表現型を明らかにすること、ならびに、一部の疾患でのスクリーニング系のバリデーションと遺伝子修復の準備を行う。

先天代謝異常症患者の iPS 細胞より神経幹細胞と神経細胞を誘導した。神経幹細胞では、代謝異常による中間代謝物質の蓄積、オートファジーマーカーの状態やライゾゾームマーカーの上昇といった生化学的表現型を明らかとした。神経細胞を使った機能解析を行うための誘導系（細胞密度、支持細胞の有無など）を最適化した。この系を使い、シナプスでの機能解析を行い、その異常を明らかとした。この機能異常の分子メカニズムを調べるために発現分子の解析を行った。その結果、この機能に関わるいくつかの分子の発現異常を見出した。次に、細胞死についても検討を行い、一部の疾患で正常に比べて脆弱であるとの結果を得た。一方、これらの細胞と表現型を使った薬物スクリーニング系の構築のための培養液、細胞密度などの条件を検討し、表現型を解析するに適した条件を決定した。また、遺伝子修復に向けて、酵素の改変体の作成、ガイド RNA 鋳型の設計を行った。これらを使い、遺伝子の切断活性を検討し、変異のみを特異的に切断するツールと条件を得ることに成功した。

健常者と患者由来の神経細胞をパッチクランプ法を用いて電気生理学的な表現型を調べた。その結果、健常者の神経細胞に比べ、神経細胞の興奮性に異常があることが示唆された。細胞内での中間代謝物の制御は、重要な創薬ターゲットである。近年、私たちは、ある物質の誘導体の改変や修飾を行うことで、より神経細胞へ効果をあげる製剤へと改良をしてきた。開発した誘導体がヒト iPS 細胞より誘導した神経幹細胞の蓄積物減少に対して効果があるかどうかを検討した。その結果、新たな誘導体が、神経幹細胞において中間代謝物蓄積を改善させる作用を有することを見出した。以上の結果より、令和 2 年度の目標はすべて達成できた。

令和 3 年度は、神経機能異常表現型を明らかにすること、その際に分子レベルでの異常についての解明、ならびに、一部の疾患でのスクリーニング系のバリデーションと遺伝子修復を行った。

令和 2 年度と同様に別の先天代謝異常症患者の iPS 細胞より神経幹細胞を誘導した。神経幹細胞では、代謝異常による中間代謝物質の蓄積やライゾゾームマーカーの上昇といった生化学的表現型を確認した。令和 2 年度に確立した方法を使い iPS 細胞あるいは神経幹細胞からシナプスを形成する成熟神経細胞を誘導した。誘導した成熟神経細胞を使い後シナプスの機能解析を行い、その異常明らかとした。また前シナプス機能異常ではそれに関わる分子群の発現解析等を行い明らかとした。さらに細胞機能に関わる分子についても発現を調べて、その異常を明らかにした。次に、同様に誘導した神経細胞を使い細胞死についても検討した。その結果、一部の疾患で正常に比べてあるストレス下では、疾患由来神経細胞は脆弱である、との結果を得た。一方、これらの神経系細胞と表現型を使った薬物スクリーニング系の構築のための培養液、細胞密度などの条件を検討し、表現型を解析するに適した条件を決定した。また、令和 2 年度に決定した条件を使って、原因遺伝子の修復を一部の疾患特異的 iPS 細胞で行い、遺伝子修復された iPS 細胞を得ることに成功した。

神経生理学的な解析では、健常者と先天代謝異常症患者由来の神経細胞をパッチクランプ法を用いて電気生理学的な表現型を調べた。発火閾値、活動電位の大きさ、発火頻度、発火アダプテーション、細胞入力抵抗などの指標を基に調べた結果、発火閾値と活動電位の大きさに有意差はなかったが、患者由来

細胞が他の細胞に比べ、発火頻度が有意に高い疾患があった。アダプテーションに関しては、患者細胞では有意に強い疾患があった。以上より、健常者の神経細胞に比べ、患者由来の神経細胞の興奮性に異常があることが示された。更に、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルについて調べたところ、 Ca^{2+} チャンネル密度等が正常と異なることが示唆された。

一方、スクリーニング系樹立のバリデーションを行う試薬について私たちが作成してきた試薬を準備した。この試薬は、ある物質の誘導体の改変等を行うことで、患者神経細胞へより有効性を持つ試薬へと改良をできた。開発した誘導体が患者 iPS 細胞由来神経系細胞の代謝中間蓄積物に対して減少効果があることを見出した。さらにモデル動物に対しても有用であることを明らかとした。これらをもとに令和3年度にこの試薬をスクリーニング系のバリデーションに使うことを決定した。

先に述べた目的、疾患由来の細胞を使い、異常表現型の解析とそのメカニズムの解明および薬物スクリーニング系の開発に向けたバリデーションデータ取得を達成するために、令和4年度は、主に、他の神経細胞誘導系の樹立、異常表現型と中間代謝物の蓄積との関係の解明、ならびに、薬剤スクリーニング系のバリデーションと遺伝子修復クローンの作成とその表現型解析を行った。

先天代謝異常症患者の iPS 細胞より神経幹細胞とこれまで誘導してきた神経細胞とは異なる種類の神経細胞を誘導する方法を樹立した。この系を用いると疾患では誘導効率が低い結果を得た。また、令和3年度に明らかにした細胞機能に関わる分子について中間代謝物との蓄積を調べるために正常神経細胞に外部から中間代謝物を添加し、細胞内での蓄積を確認後、いくつかの分子の発現量を測定した。その結果、ある分子の発現が有意に変化していることが判明した。これは、細胞機能に関わる分子の発現異常が中間代謝物の蓄積によって引き起こされることを示唆している。一方、シナプス機能に関わる分子についても中間代謝物との蓄積により異常な発現が誘導される分子があることが明らかとなった。しかしながら、対象としているシグナルに関わる分子は調べた限り中間代謝物との蓄積では変化が見られなかった。次に、細胞死についても検討を行い、一部の疾患で正常に比べて脆弱であるとの結果を得た。また一部の疾患で予定通りスクリーニング系を確立した。遺伝子修復をした疾患 iPS 細胞から誘導した神経細胞ではこれまでに調べてきた異常表現型が回復することを確認した。さらに新たな疾患にて遺伝子修復 iPS 細胞を作成することに成功した。

計画にあった疾患 iPS 細胞より分化・成熟させた大脳皮質ニューロンの興奮性についてパッチクランプ法による解析を行った。ホールセル記録法を用いて、細胞内注入電流の大きさと活動電位頻度の関係より評価した結果、疾患由来の細胞の興奮性が対照細胞に比べて、有意に高かった。スクリーニング系開発では、ある対象疾患に対して、ある誘導体がヒト iPS 細胞より誘導した神経幹細胞の蓄積物減少に対して効果があるかどうかを検討し、スクリーニング系のバリデーションを行った。その結果、神経幹細胞において中間代謝物蓄積を改善させる作用を有することを見出し、スクリーニング系が有効であることを確認した。

Inborn errors of metabolism is a general term for tissue and organ disorders caused congenitally by abnormalities in the enzymes that control the three major metabolisms in the body: carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and amino acid metabolism. Most of disorders included in it have neurological disturbance in the central nervous system. In this study, we will focus on central nervous system disorders, especially in disorders of lipid and amino acid metabolism. The objective of this research is to analyze the abnormal phenotype and elucidate its mechanism using disease-derived cells that are generated from disease-derived iPS cells, and to obtain validation data for the development of a drug screening system. We will mainly focus on optimizing cell culture systems for disease analysis, clarifying abnormal phenotypes, and preparing for validation of screening systems and gene repair in some diseases.

Neural stem cells and neurons were induced from iPS cells of patients with Inborn errors of metabolism. In neural stem cells, we clarified biochemical phenotypes such as the accumulation of intermediate metabolites due to metabolic abnormalities, the state of autophagy markers, and the elevation of lysosome markers. We optimized the induction system (cell density, presence or absence of supporting cells, etc.) for functional analysis using neurons. Using this system, we performed functional analysis at synapses and clarified its abnormalities. In order to investigate the molecular mechanism of this dysfunction, we analyzed the expressed molecules. As a result, we found abnormal expression of several molecules involved in this function. Next, we also examined cell death, and obtained the result that it is more fragile than normal in some diseases. On the other hand, conditions such as culture medium and cell density for constructing a drug screening system using these cells and phenotypes were examined, and conditions suitable for phenotype analysis were determined. In addition, for gene repair, we created modified enzymes and designed guide RNA templates. Using these, we investigated the cleavage activity of genes and succeeded in obtaining tools and conditions for specifically cleaving only mutations. Gene-repaired clones were established and their phenotypic analysis was performed. We confirmed that the abnormal phenotypes we have investigated were restored in neurons derived from gene-repaired iPS cells.

A method was also established to induce neural stem cells from iPS cells from patients with congenital metabolic disorders and a different type of nerve cells from those that had been previously induced. Using this system, the induction efficiency was low for the disease. We added intermediate metabolites externally to normal neurons, confirmed their accumulation in the cells, and then measured the expression levels of some molecules. As a result, it was found that the expression of one molecule was significantly altered. This suggests that the abnormal expression of molecules involved in cellular functions is caused by the accumulation of intermediate metabolites. On the other hand, it was also found that some molecules involved in synaptic function are induced to be abnormally

expressed by accumulation of intermediate metabolites.

The excitability of cerebral cortical neurons differentiated and matured from diseased iPS cells, which was planned, was analyzed by the patch clamp method. Using the whole-cell recording method, the excitability of the disease-derived cells was significantly higher than that of the control cells, as a result of evaluating the relationship between the magnitude of the intracellular injection current and the action potential frequency.