

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
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



I 基本情報

研究開発課題名：（日本語） 早老症疾患特異的 iPS 細胞を用いた老化促進メカニズムの解明を目指す研究
（英 語） Research project to decipher the mechanisms that promote aging by use of disease-specific iPS cells derived from patients with progeroid syndrome

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） 横手 幸太郎
（英 語） Koutaro Yokote

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語） 国立大学法人千葉大学・大学院医学研究院・教授
（英 語） Graduate School of Medicine, Chiba University, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

iPS 細胞由来間葉系幹細胞の解析を通じた老化病態の解明と、これを用いた老化スクリーニング系の開発：

（1）Werner 症候群（WS）患者 iPS 細胞（WS-iPSC）から、間葉系幹細胞（WS-MSC）の分化誘導を実施した。WS-iPSC は老化表現型を示さないが、MSC への分化誘導により老化が進行することから、このメカニズム解明を行った。WS-MSC の長期継代に伴う経時的な遺伝子発現解析を実施し、対象として遺伝子修復 iPSC 由来の WS-MSC と比較したところ、WS-MSC では早期老化、炎症性変化とエピゲノム関連遺伝子の変化が顕著であった。加えて WRN 蛋白の ChIP-seq を用いて DNA 上の結合部位を検討したところ、テロメア領域など染色体上の特定の領域に集積が見られ、WS の症状発への関与が示唆された。

（2）京都大学齋藤博英博士との共同研究により新規の miRNA 定量法 AQ 法を実施し、WS-MSC 細胞において有意に増加、あるいは抑制される microRNA を新規に明らかにした。

（3）WS-MSC において上昇する microRNA のプロモータを用いて、老化関連分泌現象

(SASP, senescence associated secretary phenotype) を反映して GFP を発現するシステムを作成した。この老化リポーターシステムを WS-MSC に導入し、FDA において認可されている候補化合物を用いて、老化を減弱させる化合物のスクリーニングを実施した。

(4) 難治性皮膚潰瘍は WS 患者の生活の質の低下に最も影響する。この病態解明と治療法の検証のため、WS-MSC をマウス皮膚潰瘍モデルに局所投与し、野生型 MSC 投与との比較を実施した。この結果、WS-MSC では各種増殖因子の遺伝子発現低下から、創傷治癒効果が野生型よりも低下していた。そのメカニズムには、血管内皮増殖因子 Vegf とその細胞シグナルの異常が関与していること、さらにこれを制御する新たな老化メカニズムについても発見した。

iPS 細胞由来細胞を用いた動脈硬化モデルの確立:

(5) WS では動脈硬化の促進が見られ、特に心筋梗塞が主要な死因の一つとして報告されてきた。この進展メカニズムを明らかにするため WS-iPS 細胞からマクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の個別分化誘導培養システムを確立し、その共培養に伴う病態再現に成功した。WS-iPAC から分化誘導した細胞では強い細胞老化と、老化に関連する細胞機能の異常が再現性よく観察された。

(6) WS での動脈硬化促進の背景にマクロファージ等での内因性インファーマーフェロンシグナルの活性化が大きく寄与し、その下流分子機構も一部明らかになった。

WS 患者由来線維芽細胞を用いた新規老化機構の解明:

(7) WS 患者線維芽細胞ではミトコンドリア機能への関連が想定される特定代謝産物の異常な増加が認められた。一方、この代謝産物経路を抑制する培地は、線維芽細胞の細胞老化を抑制することも判明した。また、本代謝産物は、ヒト生体検体の高齢者、WS 患者で有意に若年者より増加していることも確認され、WS のみならず一般老化のマーカーとしても有用である可能性が示唆された。

(8) WS 患者線維芽細胞ならびに血球、皮膚組織では、小胞体ストレスの亢進が認められた。この小胞体ストレスへの抑制効果介入が継代老化を抑制したことから、小胞体ストレスが WS 患者の老化進展に寄与していることが強く示唆された。

(9) WS 患者の血球のゲノム解析を行い正常の患者においては明らかな異常は認められなかったが、一方で AML, MDS, MDS/AML を発症した患者の血球においては TP53 に変異を認めたが、MDS や AML に高頻度に見られる他の変異は観察されなかった。以上より、WRN 変異と TP53 の機能不全の関連が示唆された。

iPS 細胞由来細胞を用いた治療法の開発:

(10) 本邦における WS 患者の 70%以上は WRN 遺伝子 Exon26 の skipping により発症する。アンチセンス核酸を用いた Exon skipping 法を高効率で成功させ、機能性 WRN タンパク質の発現の誘導による細胞老化抑制できる戦略を確立した。

Analysis of WS-iPS cell-derived mesenchymal stem cells and development of a screening system for aging

(1) Mesenchymal stem cells (WS-MSCs) were induced from iPSCs derived from Werner syndrome (WS) patients (WS-iPSCs) was performed to elucidate its aging mechanism. We performed gene expression analysis of WS-MSCs and compared them to gene-repair iPSC-derived WS-MSCs. Premature senescence, inflammatory changes and epigenome-related gene changes were prominent in WS-MSCs.

(2) In collaboration with Kyoto University, microRNAs that are significantly increased or suppressed in WS-MSC cells were identified.

(3) Using the promoters of microRNAs upregulated in WS-MSCs, we created a system that expresses GFP in response to senescence-associated secretory phenotype (SASP). This senescence reporter system was introduced into WS-MSCs.

(4) Refractory skin ulcers have the greatest impact on the quality of life of WS patients. To elucidate the pathogenesis of this condition and to validate a therapeutic approach, WS-MSCs were administered to a mouse skin ulcer model and compared with wild-type MSCs. The results showed that WS-MSCs had a lower wound-healing effect than wild-type MSCs due to decreased gene expression of various growth factors.

Establishment of an atherosclerosis model using WS-iPS cell-derived cells

(5) To elucidate the mechanism of atherosclerosis in WS, we established a culture system to induce individual differentiation of macrophages, vascular endothelial cells, and vascular smooth muscle cells from WS-iPS cells, and successfully reproduced its pathological conditions.

(6) Activation of endogenous interferon signaling in macrophages contributes significantly to the promotion of atherosclerosis in WS, and the downstream molecular mechanisms were partially clarified.

Elucidation of novel aging mechanisms using fibroblasts derived from WS patients

(7) In fibroblasts from WS patients, an abnormal increase in a specific metabolite, which is assumed to be related to mitochondrial function, was observed. It was also found that a culture medium that suppressed this metabolite pathway inhibited cellular senescence of fibroblasts. This metabolite may be useful not only as a marker of WS but also as a marker of general aging.

(8) Increased endoplasmic reticulum stress was observed in fibroblasts, blood cells, and skin tissues of WS patients. Intervention to suppress ER stress inhibited successive aging, strongly suggesting that ER stress contributes to the progression of aging in WS patients.

(9) Genome analysis of blood cells from WS patients revealed that blood cells from patients with AML, MDS, or MDS/AML showed TP53 mutations.