

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム事業
(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) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた先天性中枢性低換気症候群における低 CO₂ 感受性の分子機構

(英語) Molecular mechanism of reduced central respiratory chemosensitivity in congenital central hypoventilation syndrome using disease-specific iPS cells

研究開発実施期間: 令和 3 年 5 月 26 日～令和 6 年 3 月 31 日(予定)

研究開発代表者 氏名: (日本語) 藤岡 一路

(英語) Kazumichi Fujioka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人神戸大学・大学院医学研究科 内科系講座小児科学分野・特命教授

(英語) Kobe University Graduate School of Medicine, Department of Pediatrics, Professor

II 研究開発の概要

(和文)

本研究開発の目的は、PHOX2B 遺伝子変異を病因とする希少難治性疾患である先天性中枢性低換気症候群 (Congenital central hypoventilation syndrome; CCHS) の病態解明を目指して、疾患特異的 iPS 細胞を用いて呼吸中枢における化学調節機構 (CO₂ 受容体) の in vitro 再構成を試みることである。

CCHS の本態は、PHOX2B 変異による呼吸中枢レトロトラペゾイド核 (RTN) の障害である。一方、PHOX2B 遺伝子の変異と臨床症状の genotype-phenotype correlation は示されているものの、変異型 PHOX2B 遺伝子が中核症状である中枢性低換気を呈するメカニズムは未だ明らかにはなっていない。CCHS の原因として最も頻度の高い PARM 型変異 PHOX2B は、発現細胞内において野生型 PHOX2B に対してドミナントネガティブに作用すると考えられている。その機序として、転写活性の低下や本来の機能部位である核から細胞質への誤局在が想定されているものの、転写活性が低下し、細胞質に誤局在した PARM 変異型 PHOX2B が、如何にして中枢性低換気をもたらすかの解明は、現在までの細胞株を用いた強制発現系による実験では不可能であっ

た。

本研究では、RTN の CO₂ 感受性の中核を担うグルタミン酸作動性 RTN 神経細胞の細胞自律的制御による CO₂ 感受性機構に着目し、患者由来 iPS 細胞を利用して CCHS の病態解明を行う。また、CCHS において RTN 神経が減少する病態誘導機構およびどの段階で RTN 神経細胞に異常が生ずるのかを明らかにする目的で、新規の PHOX2B 遺伝子改変 CCHS モデルマウスの開発も行う。現在まで、CCHS を誘導する遺伝子変異 (PHOX2B 遺伝子のエクソン 3 に生じるアラニンの伸長変異とフレームシフト変異) を Phox2b 遺伝子の片アレルに持つマウスは生後すぐに呼吸不全で死亡するため、系統維持ができず、病態誘導機構の詳細な解析は困難であった。そこで、長期生存・継体維持可能な conditional knockin マウスの作製を試みることにした。

具体的には、以下の達成目標に取り組んだ。

- (1) iPS 細胞から RTN 神経細胞への新たな分化誘導方法を開発する
- (2) CCHS 患者由来 iPS 細胞の RTN 神経細胞への分化誘導を行う
- (3) iPS 細胞から分化誘導したグルタミン酸作動性 RTN 神経細胞の CO₂ 感受性評価を行う
- (4) PHOX2B 遺伝子改変 CCHS モデルマウスを用いた病態解析を行う

本研究の研究成果の概要は以下の通りである。

(1) ヒト iPS 細胞から、RTN マーカー (VGLUT2, PHOX2B, TACR1) 共陽性の神経細胞の誘導に成功した。また、PHOX2B の発現を蛍光タンパク質 GFP でモニターできるレポーター iPS 細胞を作成し、分化誘導の最適化に用いた。

(2) 我々の研究チームで新たに樹立した CCHS 患者由来の iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞から (1) で最適化した条件で神経分化誘導をおこない、作成した神経細胞の①誘導効率 (量) と②遺伝子発現 (質) を比較した。その結果、①誘導効率は、分化誘導の初期には CCHS 患者由来 iPS 細胞から作成した場合の方が低い傾向にあったが、分化が進むと特に健常者由来 iPS 細胞から作成した場合と違いはみられなくなった。②遺伝子発現に関しては、CCHS 患者由来株から作成した神経細胞ではカルシウム依存性の細胞接着タンパク質や、乳幼児突然死症候群関連遺伝子などいくつかの遺伝子に発現の低下がみられた。

(3) (1) で作成した野生型 PHOX2B-GFP レポーター iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を用いて新たに導入した MEA (微小電極アレイ) システムを用いて CO₂ 感受性の評価を試みた。

(4) 条件的に PHOX2B 変異体を発現させることで繁殖を可能にした CCHS モデルマウスを作製した。具体的には、loxP 配列で挟んだ PHOX2B フレームシフト変異 cDNA とそれに続く IRES-Venus cDNA から成る遺伝子カセットを、ゲノム編集でマウス Phox2b 遺伝子座に挿入した (*Phox2b*^{LSL-Mut} マウス)。*Phox2b*^{LSL-Mut} マウスは正常に成長し繁殖が可能であったが、 β -actin-Cre マウスと交配すると、両アレルを持つマウスは生後すぐに呼吸不全を呈し死亡した。このマウスの組織解析の結果、脳幹の顔面神経核と RTN の消失、さらに腸管神経系や交感神経系の発生異常が認められた。

(英文)

Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) is caused by a PHOX2B gene mutation, which causes dysregulation of the autonomic nervous system, and is characterized by central hypoventilation. PHOX2B is a homeobox transcription factor with a polyalanine chain and plays an

essential role in the differentiation and development of the autonomic nervous system including the respiratory center.

Since children with CCHS show hypoventilation during sleep and awakening, tracheostomy and home mechanical ventilation are indispensable, and the impact on the QOL of the caregiver is large, so the development of a treatment for this disease is an urgent necessity. Despite various treatment methods for CCHS have been proposed so far, they have not yet been put into clinical practice. In this study, we aimed to develop a therapeutic strategy based on the elucidation of the molecular mechanism of reduced central respiratory chemosensitivity in CCHS using disease-specific iPS cells and model mouse.

Specifically, we have worked on the following goals.

- (1) Develop a new method to induce differentiation from iPS cells to RTN neurons
- (2) Induce differentiation of CCHS patient-derived iPS cells into RTN neurons
- (3) Evaluate CO₂ sensitivity of glutamatergic RTN neurons differentiated from iPS cells
- (4) Perform pathological analysis using CCHS model mice

A summary of the research results of this study is as follows.

- (1) We successfully induced neurons co-positive for RTN markers (VGLUT2, PHOX2B, TACR1) from human iPS cells. In addition, we created reporter iPS cells that can monitor the expression of PHOX2B using the fluorescent protein GFP, and used them to optimize differentiation induction.
- (2) We induced neural differentiation from iPS cells derived from CCHS patients and iPS cells derived from healthy individuals, under the conditions optimized in (1), and gene expression (quality and quantity) were compared.
- (3) We attempted to evaluate CO₂ sensitivity using a newly introduced MEA (microelectrode array) system using nerve cells induced from the wild-type PHOX2B-GFP reporter iPS cells created in (1).
- (4) We created a CCHS model mouse that was able to breed by conditionally expressing the PHOX2B mutant.