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) 革新的遺伝子量補正法による性特異的 X 連鎖難治疾患 iPS 細胞を用いた脳神経病態モデリングに関する研究開発
(英語) Research on neuronal disease modeling in X-linked sex-specific neuronal disorders using iPSCs with a novel dosage correction method.

研究開発実施期間: 令和3年5月26日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 福田 篤
(英語) Atsushi Fukuda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 学校法人東海大学医学部医学科基礎医学系 講師
(英語) Department of Molecular Life Science, Division of Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine, Junior Associate Professor

II 研究開発の概要

(和文)

疾患 iPS 細胞を用いた試験管病態モデリングでは、Genotype-Phenotype に基づく疾患発症の分子メカニズム解明や薬効解析が実施可能である。しかし、女性 (XX 型) のヒト多能性幹細胞では、エピゲノム修飾により制御される X 染色体不活化の不可逆的な破綻が必発する。その結果、異常な X 染色体遺伝子群の発現異常を引き起こし、その影響は、常染色体遺伝子における機能解析にも影響することが示されてきた。従って、多くのヒト多能性幹細胞研究では、男性の株が優先的に使用されることで、性差を含む genotype-phenotype 研究が滞っているのが現状である。これまでに、X 染色体不活化破綻が及ぼす ex vivo モデリングにおける偽陽性や偽陰性の結果が多々示唆されている。したがって、X 連鎖疾患などでは正確な病態モデリングが再現出来ないことが報告されており、抜本的な解決法が求められている。近年、我々は、女性多能性幹細胞における不可逆的な X 染色体不活化破綻の分子機構とその再活性化に成功した。

本研究開発では、女性特異的な X 連鎖疾患である、PCDH19 関連症候群およびレット症候群における疾患 iPS 細胞を対象に、正常な X 染色体不活化状態を維持した疾患 iPS 細胞を作製し、脳神経系病態モデリングを実施し、新たな X 連鎖疾患の病態解明を行った。以下にその成果概要を示す。

(1) PCDH19 関連症候群

PCDH19 関連症候群はてんかんが生じる難病であり、その根本的な病態発症機序が不明である。近年、モデル生物を用いた研究から、同一 PCDH ファミリー間での細胞接着が優先的に生じる結果が示された。しかし、これらのモデルの殆どは、PCDH19 欠損タイプであり、多くの患者が有するミスセンス変異とは、たんぱく質の構造が大きく変化していると考えられる。本研究では、ミスセンス変異を有する PCDH19 患者 iPS 細胞を用いることで、病態をより忠実に再現していると考えられる。数理モデリングを用いた結果、PCDH19 ヘテロタイプック状態は有意に細胞近接を誘導することが明らかとなった。これらの結果は、既報とは異なり、ミスセンス変異によるヘテロタイプック状態が有意に細胞接着に影響する可能性を示しており、新たな知見となった。

これらのヘテロタイプック状態が、どのように神経発生に影響するかを検証すべく、大脳皮質神経系への発生試験を実施した。解析の結果、ヘテロタイプック状態では、有意に成熟神経発生が阻害されることが明らかとなった。興味深いことに、この神経発生阻害は、ヘテロタイプック状態にある正常 PCDH19 を発現する細胞においても観察され、PCDH19 ミスセンス変異のヘテロタイプック状態では、細胞間相互作用による神経発生分子への影響があることが示唆された。

次に、ヘテロタイプック状態が神経発生のどのフェーズで影響するかを検証すべく、経時的な発生解析を実施した。その結果、神経幹細胞フェーズは、通過するものの、未成熟神経状態では、神経細胞骨格因子である DCX タンパクの局在が著しく異なることが明らかとなった。

以上の結果から、PCDH19 ミスセンス変異では、ヘテロタイプック状態が細胞近接に影響し、未成熟神経フェーズにおいて細胞骨格タンパクの異常局在を伴う、成熟化が阻害されることが明らかとなった。これらの結果は、PCDH19 関連症候群では、なぜ、ヘテロ変異がてんかんを引き起こすのか、その病態メカニズム解明の一部となった (Motosugi et al. PNAS Nexus. 2024)。

(2) レット症候群

X連鎖女性特異的な難病指定されている精神神経疾患の1つとしてレット症候群は、モデルマウスをはじめとして広く研究されている。しかし、未だに病態メカニズム解明が進んでおらず、根本治療法の確立には至っていない。本研究では、X染色体上に位置するMECP2遺伝子のミスセンス変異をもつ患者由来のiPS細胞(RTT-iPSC)を用いて、X染色体不活化を維持した状態での正確な疾患iPS病態モデリングを実施した。

まず初めに、ミスセンス変異(R306H)を有するRTT-iPSCでの脳神経発生モデリングを実施した。R306HはMECP2遺伝子内におけるNuRD complexと相互作用する領域に変異を有しており、転写抑制複合体との相互作用阻害が示唆されている。しかし、この変異を有した疾患iPSCを用いた病態モデリングでの報告はなく、その病態メカニズムは不明である。R306H RTT-iPSCにおけるX染色体不活化状態を調べて結果、多くの細胞でX染色体不活化が消失しており、X染色体不活化の正常化を実施した。その後、R306H片アレル発現が確認されたクローンから大脳皮質神経分化を実施した。解析の結果、R306H RTT-iPSCでは、大脳皮質系神経への発生が著しく阻害されたものの、X染色体不活化を再獲得することで正常に神経分化することが明らかとなった。これらの結果は、これまで多くの疾患iPSCで見過ごされてきた、X染色体不活化状態が著しく神経分化に影響を及ぼすことを実証し、レット症候群においてもX染色体不活化状態が神経発生に重要であることを報告した(Motosugi et al. *Cell Reports Methods*. 2022)。

本研究では、別のミスセンス変異をもつRTT-iPSCでも病態モデリングを実施した。驚いたことに、ミスセンス変異A(仮名)を有するRTT-iPSCでは、特定の遺伝子制御領域においてエピゲノム異常が確認された。

より詳細な分子病態メカニズム解明を目指し、R306Hとミスセンス変異AをもつRTT-iPSC由来の大脳皮質分化細胞集団において、シングルセルトランスクリプトーム解析

(scRNA-seq)を実施した。scRNA-seq解析から、どちらの集団でも神経幹細胞への分化が大きな障害となっていることが明らかとなった。しかし、そのフェノタイプは、ミスセンス変異Aを有するRTT-iPSC由来の神経集団では顕著に強いことが分かった。特に、特定の細胞系譜への分化が顕著に観察され、正常な発生プロセスにおいて、MECP2のミスセンス変異が及ぼす発生異常への影響が明らかとなった。

ミスセンス変異Aを有するRTT-iPSCは、顕著な発生阻害に加え、特定のエピゲノム異常が確認されていることから、ゲノムワイドなエピゲノム解析を実施した。この解析においては、正常なMECP2を誘導可能なシステムを導入することで、ミスセンス変異Aのコントロール株も作製した。scRNA-seqとのマルチオミクス解析の結果、特定の神経集団において、顕著なエピゲノム異常が集積することが明らかとなった。これらの結果は、ミスセンス変異Aを有する患者では、正常な神経発生阻害が生じるとともに、発生した神経においてもエピゲノム異常が蓄積していることを示唆している。さらに、経時的な発生過程を分子レベルで捉えるべく、様々なタイムポイントで蛍光免疫染色やscRNA-seqを実施した。その結果、ミスセンス変異Aを有するRTT-iPSCでは通常の発生軌道から逸脱するような分化状態を示すことが明らかとなった。

次に、ミスセンス変異Aを有する患者では、既報には無いユニークな表現型がiPSCモデリングから得られていることから、iPSドナーの主治医との共同研究体制を構築した。臨床症状から、ミスセンス変異Aを有する患者では、典型的なレット症候群に加え、症状が重症である

ことが報告されている。これらの結果から、MECP2 ミスセンス変異を有する患者では、発生初期の段階での分化系譜に異常が生じることが、iPSC モデリングにより示され、その傾向は、ミスセンス変異 A を有する場合、著しいことが明らかとなった。現在、試験管モデリングデータと患者情報を統合した基礎・臨床解析結果に関する論文を投稿準備中である (Motosugi et al. In prep.)。

(英文)

Disease modeling using patient iPSC cells is useful to elucidate molecular mechanisms of pathogenesis and drug efficacy analysis based on genotype-Phenotype. However, in female (type XX) human pluripotent stem cells (hPSCs), irreversible erosion of X chromosome inactivation controlled by epigenomic modifications is inevitable. This results in aberrant expression of X-linked genes and obstacle for proper disease modeling using female hPSCs. Thus, in many hPSC studies, male lines are preferentially used, which has stalled genotype-phenotype studies that include sex differences. There have been many indications of false positive and false negative results in ex vivo modeling of the effects of X chromosome inactivation disruption. Therefore, it has been reported that accurate disease modeling cannot be reproduced in X-linked diseases, and a drastic solution is needed.

Recently, we have succeeded in understanding the molecular mechanism of irreversible X chromosome inactivation disruption and its reactivation in female pluripotent stem cells.

In this study, we generated patient-iPSC cells with normal X chromosome inactivation in female-specific X-linked diseases, PCDH19-related and Rett syndrome. Using these patient-specific iPSC cells with normal dosage compensation of X-linked genes, we conducted proper disease modeling to elucidate molecular mechanisms of pathogenesis.

(1) PCDH19-related syndrome

Using a mathematical approach and iPSC cells retaining proper X-chromosome inactivation derived from patients with PCDH19-missense mutation, we found that the heterotypic conditions, which are composed of wild-type and missense PCDH19, led to significant cell-to-cell proximity and impaired neuronal differentiation accompanied by the aberrant accumulation of Doublecortin, a microtubule-associated protein. Our findings suggest that ease of adhesion between cells expressing either wild-type or missense PCDH19 might form aberrant cell aggregation in early embryonic phases, causing poor neuronal development.

(2) Rett syndrome

In this study, we used two different patient-specific iPSC cells with mutation of MECP2 gene (RTT-iPSCs). First, we performed neurodevelopmental modeling in RTT-iPSCs with a missense mutation (R306H); The analysis revealed that R306H RTT-iPSC clones were significantly impaired in development into cortical neurons, but were able to differentiate normally by reacquisition of X-chromosome inactivation. These results demonstrate that the X chromosome inactivation state significantly affects neuronal differentiation, which has been overlooked in many disease iPSCs, and report that the X chromosome inactivation state is also important for neurogenesis in Rett syndrome (Motosugi et al. Cell Reports Methods. 2022).

Regarding another RTT-iPSCs with missense mutation (hereafter called as type A), Surprisingly, epigenomic abnormalities were identified in specific gene regulatory regions in RTT-iPSCs (type A).

The single cell RNA-sequencing analysis revealed that differentiation into neural stem cells was markedly impaired in both populations. In particular, the phenotype was found to be significantly stronger in the RTT-iPSC-derived neural population (type A). These results with clinical information of the patient are now preparation for paper.