

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

(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) FCMD 及び類縁疾患の iPSCs 由来三次元培養法による疾患モデルを駆使した病態評価と低分子治療法開発

(英語) Modelling 3D disease models by utilizing patient-derived iPSCs and investigating a proteostatic therapy for FCMD and α DGopathies by regulating sugar metabolism of α DG

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) 池田 真理子
(英語) Mariko Taniguchi-Ikeda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 藤田医科大学病院・臨床遺伝科・准教授
(英語) Department of Clinical Genetics,
Associate Professor Fujita Health University Hospital

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

福山型筋ジストロフィー (FCMD) の病態解明と、先行研究において革新的な薬効機序が示唆されている塩基性環状低分子化合物 Mn007 の創薬開発の実現を目指し、患者由来 iPSCs を駆使して、動物モデルでは再現しえなかった病態を本邦で開発されたヒト三次元培養技術法を応用し再現し、その発生段階での各器官の病態を組織学的・分子生物学的・糖鎖生物学的に評価し、低分子化合物の薬効機序を解明しその効果を評価する。FCMD は本邦に患者の多い重篤な遺伝性難病である。乳幼児時期より発症する重度の筋ジストロフィーに加え、網膜剥離・白内障などの眼症状、胎内発症する滑脳症、てんかん、知的障害など重度な神経症状も併発する。責任遺伝子 FKTN は α ジストログリカンの糖鎖転移酵素であり、標的遺伝子 α DG タンパク質上の糖鎖を付加する。FCMD ではその糖鎖欠損が病態である。モデルマウスでは特に骨格筋や中枢症状が軽く、治療薬の効果の評価ができない。申請者はこれまで FCMD のアンチセンス核酸の治療法開発などにかかわってきた。

申請者はこれまで、FCMD の病態を解明しアンチセンス核酸 (AON) が有効であることを疾患モデルに

より証明し、骨格筋に対する臨床試験が開始予定となっている（2021年より開始）。しかし、FCMDは中枢神経系の治療が重要な課題であるが、本疾患のヒト型変異ノックインモデルマウスでは、骨格筋で僅かに糖鎖が減少する以外ではフェノタイプを呈さず疾患を反映する適切な動物モデルが存在しない。その理由として、ヒトとマウスの大脳構造の違いで最も顕著である放射状グリア細胞の量と増殖の差が関係していると考え、ヒト由来細胞系でのモデル作成が必須であると考えた。

そこで申請者はFCMD及び類縁疾患より疾患由来 iPSCs を樹立し、グリア細胞を豊富に増殖できる改良型の大脳皮質への分化誘導法での疾患モデル化を行い FCMD に対する新規治療薬候補の低分子化合物スクリーニングを独自のツールを用い行った（AMED 難治性実用化研究事業・令和2年度終了）。その中で機能未知の既知化合物、環状塩基性低分子化合物 Mn007 がフクチン遺伝子依存性に α DG 糖鎖を劇的に回復させ、その糖鎖がラミニンとの結合能をもつ機能的 α DG であることを iPSCs 含め様々なモデルで示した。本研究事業では iPSCs 由来三次元培養法を大脳以外の罹患器官（基底核・神経網膜・骨格筋）も評価し、詳細な病態を明らかにし、治療臨界期を解明すること、また低分子化合物の薬効機序の解明と薬効評価により研究を発展・加速させる研究を行った。

各項目について、成果と意義を述べる。

I：疾患モデル構築

1. 三次元中枢培養モデル構築 表現型の再現と細胞移動異常の可視化を目標に代表者が樹立した iPS 細胞を用いて大脳皮質に分化誘導する三次元培養（SFEBq 法、kadoshima PNAS 2012）を行った。長期間の培養により表層の層構造が破綻するため、約 90 日目までの大脳皮質オルガノイドでは免疫染色法により表層構造の変化を観察した。一方で長期培養法では、single cell RNA sequence 法を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、標的遺伝子の候補を検討した。また神経網膜や大脳基底核の三次元誘導法培養や海馬組織作成のための三次元培養法からの分散培養を行いそのフェノタイプの検討を行った。神経網膜や大脳皮質では、130 日以降の長期培養にて、グリア細胞の増殖に疾患と健常で差があることがあきらかになった。また、大脳オルガノイドより海馬組織を作成し、二次元分散培養を用いて CA1、CA3 細胞を作成した。基底核オルガノイドでは視覚的な差は確認できなかったが、神経網膜オルガノイドでは長期培養においてミューラー細胞の形成異常を再現できた。表現型の再現と標的細胞の同定では骨格筋作成・神経筋接合部（neuromuscular junction ; NMJ）作成において、分担研究者櫻井は iPS 細胞から分化する骨格筋の純度を非常に高く長期培養持続可能な筋衛生細胞からの誘導法を作成した。

2. 骨格筋三次元培養モデル構築 表現型の再現と標的細胞の同定を目標に疾患由来 iPS 細胞からの骨格筋の分化誘導を行った。また疾患由来 iPS 細胞から同様に motoneuron の作成を行い、共培養を行い神経筋接合部異常の再現を試みる検討を行った。しかし骨格筋作成のための現時点での誘導方法では、筋管の成熟度が未熟なため、NMJ 作成が困難であった。引き続き、筋幹細胞を FACS により回収し、分化誘導する、あるいは筋管への電気刺激などを通じて、成熟筋の作成を試みる予定である。

II：病態メカニズム解明

1. 糖代謝アッセイ系構築では、FCMD の標的分子である α DG 糖タンパク質の低分子化合物 Mn007 の驚異的な O マンノース型の伸長作用について、その作用機序をあきらかにすることで実用化を目指すことを目的とした。本研究では、Mn007 が伸長するマトリグリカンの伸長アッセイ系を HPLC で再現する二単糖の基質添加によるアッセイ系により、Mn007 の濃度依存性にマトリグリカンが伸長することが再現された。

2. 化合物検出系構築/結合タンパク質同定 また、Mn007 の誘導体作成や、ビオチン化を行い、Mn007 の糖鎖伸長への作用点を検討した。またビオチン化 Mn007 を用いてプロテインアレイを行い、

近傍に存在するタンパク質の同定を行ったところ候補遺伝子が数個得られた。発現系やノックダウン系でその標的遺伝子による糖鎖伸長を今後確認する予定である。

3. トランスクリプトーム解析 HEK 細胞に Mn007 を投与し、なんらかの遺伝子とその伸長に関与していないかを RNA シークエンスによる発現解析で行った。その結果プロテインアレイで標的となった遺伝子群とのオーバーラップがみられた。その関連を今後検討する。

4. α DG を増強する低分子化合物の作用機序解明 また、研究協力者青井・丸山の研究により Mn007 は凝集することで活性をもち、凝集が起きる濃度は、1 の糖代謝アッセイ系構築で確認した糖鎖伸長を促すのと同様の濃度が必要であることが示されている。また、Mn007 の凝集により、DNase を阻害していることを本研究で発見した。この DNase 阻害活性は、劇症型の人食いバクテリアと呼ばれる溶連菌が、細胞に感染する際に DNase を用いて侵入することより、劇症型人食いバクテリアの感染を制御できると考え、ヒトリンパ球を用いたアッセイを行ったところ、Mn007 は同様の凝集を起こす濃度において溶連菌の増殖を制御することが示された (Morita et al accepted 2024) 。DNase 阻害と糖鎖伸長の関連について、現在検討を進めている。

本研究により、FCMD の病態がグリア細胞の異常が関与することや、Mn007 は凝集することで作用するなど新しい知見が得られており、標的タンパク質の同定にもかなり近づいている。これらにより、Mn007 の実用化を目指したいと考えている。

Research and development results and their significance

I: Disease Model Construction

1. Construction of a 3D Central Nervous System Culture Model: Using iPS cells established by the representative, we conducted 3D culture (SFEBq method, kadoshima PNAS 2012) to induce differentiation into cerebral cortex with the aim of reproducing the phenotype and visualizing abnormal cell migration. Since the layered structure of the surface layer is disrupted by long-term culture, changes in the surface structure were observed using immunostaining in cerebral organoids up to about day 90. On the other hand, in the long-term culture method, we performed comprehensive gene expression analysis using single cell RNA sequencing to investigate candidate target genes. We also examined the phenotype of the neural retina and basal ganglia by three-dimensional induction method culture and dispersion culture from three-dimensional culture method for creating hippocampal tissue. In the neural retina and cerebral cortex, it was found that there was a difference in the proliferation of glial cells between diseased and healthy individuals in long-term culture after 130 days. In addition, hippocampal tissue was created from cerebral organoids, and CA1 and CA3 cells were created using two-dimensional dispersed culture. Although no visual differences were observed in basal ganglia organoids, the formation of Müller cells was reproduced in retinal organoids during long-term culture. In terms of reproducing phenotypes and identifying target cells, in the creation of skeletal muscle and neuromuscular junctions, co-investigator Sakurai created a method for inducing skeletal muscle differentiated from iPS cells with very high purity and long-term culture sustainability.
2. Construction of a 3D skeletal muscle culture model: We induced the differentiation of skeletal muscle from disease-derived iPS cells with the aim of reproducing phenotypes and identifying target cells. We also created motoneurons from disease-derived iPS cells in the same way, and examined whether co-culture would reproduce NMJ abnormalities. However, the current

method for inducing skeletal muscle formation is difficult to use for NMJ formation because the maturity of the myotubes is immature. We plan to continue to try to create mature muscle by collecting myogenic stem cells by FACS and inducing differentiation, or by electrical stimulation of myotubes, etc.

II: Elucidation of Pathological Mechanisms

1. In the construction of a sugar metabolism assay system, the aim was to clarify the mechanism of action of Mn007, a small molecule compound that has an astonishing elongation effect on the O-mannose type of α DG glycoprotein, a target molecule of FCMD, with the aim of achieving practical application. In this study, we reproduced the assay system for the elongation of matriglcan by adding a disaccharide substrate that can be reproduced by HPLC, and it was reproduced that the concentration dependence of Mn007 elongation was reproduced.
2. Construction of compound detection system/identification of binding proteins. We also created derivatives of Mn007 and biotinylated it to investigate the point of action of Mn007 on glycan elongation. We also conducted a protein array using biotinylated Mn007 to identify proteins in the vicinity, and obtained several candidate genes. We plan to confirm the elongation of sugar chains by the target gene in the expression system and knockdown system in the future.
3. Transcriptome analysis: We administered Mn007 to HEK cells and conducted an expression analysis using RNA sequencing to see if any genes were involved in the elongation process. As a result, we found an overlap with the group of genes targeted by the protein array. We will investigate this relationship in the future. In addition, research by our collaborators Aoi and Maruyama has shown that Mn007 exerts its activity by aggregating, and that the same concentration is required for this action during the elongation of sugar chains. We thought that this DNase inhibitory activity could be used to control infections with the severe form of the so-called flesh-eating bacteria, which use DNase to invade cells when infecting them, so we conducted an assay using human lymphocytes assay, it was shown that Mn007 controls the growth of *Streptococcus pyogenes* at concentrations that cause similar aggregation (Morita et al. accepted 2024). We are currently investigating the relationship between DNase inhibition and glycan elongation.

This research has led to new findings, such as the involvement of abnormal glial cells in the pathology of FCMD and the fact that Mn007 exerts its effects by aggregating, and we are now very close to identifying the target protein. We hope to put Mn007 to practical use based on these findings.