

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 細胞を用いた病態解明・創薬研究課題)
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 細胞を用いた周期性四肢麻痺の病態解明と創薬基盤確立に関する研究開発

(英語) Study of exploring pathological mechanisms and developing drug discovery system for periodic paralysis using disease-specific iPS cells.

研究開発実施期間: 令和 5 年 7 月 6 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 櫻井 英俊

(英語) SAKURAI Hidetoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

(英語) Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University. Associate Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本研究では、電氣的興奮性異常（逆說的脱分極）と機械的耐久性変化（ミオパチー）を併せもつ低カリウム性周期性四肢麻痺（HypoPP）の疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、電氣的興奮性異常が引き起こす細胞内環境変化とそれに続くミオパチー発症メカニズムの解明をめざした。さらに、既報のモデル細胞で培われた創薬開発技術との融合により、逆說的脱分極や Gating pore 電流といった特異的な筋細胞な病態のモデルを構築することで、周期性四肢麻痺治療薬開発の推進をめざした。

疾患特異的 iPS 細胞の樹立については、大阪大学でリクルートされた患者 9 例（HypoPP1 型: 4 名、2 型: 2 名、Andersen-Tawil 症候群: 2 名、健常同胞: 1 名）中、代表機関において 7 例で iPS 細胞樹立を完了し理研 BRC に 3 症例を寄託した。遺伝子修復株（ssODN 法による isogenic control）も作製され、今後の比較解析に貢献が期待される。また疾患特異的 iPS 細胞から骨格筋幹細胞（iMuSC）への分化誘導を実施し、凍結ストックを各分担機関に提供し、アッセイ系構築に活用された。必要量の細胞提供が可能となり、信頼性のある病態解析の基盤を確立した。

分担機関の大阪大学では、提供を受けた疾患特異的 iPS 細胞由来 iMuSC および健常コントロール iPS 細胞由来 iMuSC を用いて遺伝子発現解析を実施した。麻痺を誘導することが知られている T3（甲状腺ホルモン）過剰および低 K 状態で iMuSC を培養し RNA-seq を実施した。HypoPP 株では T3 刺激により Myogenesis 関連遺伝子の発現上昇を確認した。一方、低 K 状態では両群とも炎症・アポトーシス関連遺伝子が上昇し、強い培養ストレスが示唆された。今後、より安定したプロトコールの整備が求められる。

また、病態再現のカギとなる iMuSC の電気生理学的解析も大阪大学で進めた。iMuSC から成熟筋細胞を分化させ、手動パッチクランプにより、gating pore (GP) 電流様の漏洩電流を観察したが、疾患株とコントロール株双方で類似の電流が観測されたため、特異性の立証には至らなかった。細胞サイズや分化度の最適化、isogenic control との比較など、今後の技術的改善が必要である。

分担機関の順天堂大学では、蛍光インジケータによる細胞内環境の可視化を検証した。Ca²⁺インジケータ (G-GEC01.1、R-GEC01 等) は高応答性を示し、RyR1 発現 HEK293 細胞において、定量的な Ca²⁺モニタリングが可能であると確認した。HEK293 細胞ではバキュロウイルスベクターを用いて遺伝子導入していたが、iMuSC に対してはトランスフェクション効率が低いことが判明し、遺伝子導入法も検討した。その結果、mRNA トランスフェクション法を新たに確立し、iMuSC への遺伝子導入効率を大幅に改善した。この mRNA トランスフェクション法を用いた結果、iMuSC 筋管においても Ca²⁺インジケータは有用であったが、膜電位・pH インジケータは感度不足で導入に至らず、さらなる開発が必要であることが分かった。

次に逆説的脱分極の解析法を順天堂大学と大阪大学それぞれで検証を進めた。順天堂大では iMuSC 筋管の Ca²⁺モニタリング系に電気刺激を加えることで、iMuSC 由来筋管において、低 K 状態下で電気刺激応答性の低下を確認し、低カリウム性周期性四肢麻痺の表現型を部分的に再現した。さらに大阪大学では、膜電位感受性色素 (FluoVolt) によるタイムラプス解析により、iMuSC 筋管において「逆説的脱分極」と考えられる蛍光強度上昇を観察した。これは、ヒト疾患由来細胞での病態の核心的現象の可視化であり、創薬スクリーニング系への応用可能性を示唆している。

本研究では、遺伝性周期性四肢麻痺における病態モデルを、患者由来 iPS 細胞からの iMuSC 分化を通じて構築し、電氣的興奮性異常や細胞内環境変化を解析することに成功した。特に Ca²⁺イメージングと膜電位変化の観察は、疾患特異的現象の再現として大きな成果である。今後は isogenic control との比較検証とスクリーニング応用により、創薬基盤の確立が期待される。

また本研究においては、iPS 細胞技術の移転は、分担機関において疾患モデルの解析を自立的に行うための基盤構築として重要な位置づけであり、計画的に実施された。計画 1 では、iPS 細胞由来骨格筋幹細胞 (iMuSC) から成熟筋管への分化誘導技術の移転が目的とされ、まず令和 5 年 7 月にオンライン形式でのプロトコール説明会が実施された。さらに同月、京都大学 iPS 細胞研究所にて第 1 回技術講習会が対面形式で開催され、プロトコールの注意点や手技が詳細に共有された。その後、代表機関から健常者由来の iMuSC が分担機関に提供され、各機関において分化誘導の実践が行われた。結果として、すべての分担機関において成熟筋管の誘導が成功し、技術移転は円滑に完了した。

続く計画 2 では、iPS 細胞から iMuSC への分化誘導および純化技術の移転が目指された。令和 6 年 1 月からは、代表機関より分化誘導用の培地や試薬が各分担機関に提供され、技術導入が本格的に開始された。2 月には京都大学にて第 2 回技術講習会が開催され、FACS を用いた iMuSC の純化手順を含む実地指導が行われた。分化誘導の過程で細胞剥離などのトラブルも発生したが、代表機関の研究担当者が現地に赴き、インキュベーター環境の改善などを含むトラブルシュートを実施したことで、最終的には全ての分担機関で安定した iMuSC の誘導に成功した。得られた細胞は iMuSC のマーカーである CDH13 の陽性率が 30%以上であり、再播種後には高効率で成熟筋管への分化が確認された。

以上のように、本計画における 2 段階の技術移転は、いずれも計画通りに達成され、今後の病態解析および創薬研究において分担機関が主体的に研究を遂行できる体制が確立された。

本研究の意義としては、遺伝性周期性四肢麻痺患者由来 iPS 細胞を用いて病態表現型を模倣できたことは、病態解明モデルとしての有用性を示唆するものである。また筋系細胞は一般的に遺伝子導入が困難であるが、mRNA を用いて iMuSC に蛍光インジケータを導入できたことは、他の疾患解析にも応用可能な知見である。RNAseq では T3 負荷に対する反応の違いを遺伝子レベルで見出し、今後のメカニズム解明の糸口になると期待される。

今回の病態再現データは全て患者由来 iMuSC を用いた解析によるものであるが、共同研究により細胞ハンドリングや評価系といった部分まで、詳しいプロトコールと対面でのインストラクションを行って技術移転できたため、移転後の解析がスムーズに行えたことは共同研究のメリットであり、筋疾患の病態解明研究を加速させる力を証明できたと考える。

This study aimed to elucidate the mechanisms underlying periodic paralysis by establishing disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) from affected patients. Using these iPSCs, we investigated intracellular changes caused by electrical abnormalities and their downstream contribution to myopathy. We also integrated existing drug discovery technologies to construct in vitro models of muscle-specific phenomena, such as gating pore currents and paradoxical depolarization, to facilitate therapeutic development.

iPSCs were established from 7 of 9 recruited subjects, including patients with HypoPP type 1 and 2, Andersen-Tawil syndrome, and a healthy sibling. Three of these lines were deposited in the RIKEN BRC, and an isogenic control line was generated through ssODN-mediated gene correction. Differentiation from iPSCs into skeletal muscle stem cells (iMuSCs) was successfully conducted, and cryopreserved stocks were provided to partner institutions for further assays, creating a stable foundation for reliable disease modeling.

At The University of Osaka, gene expression analysis was conducted using iMuSCs derived from both patient and control iPSCs. Under thyroxine (T3)-excess and low-potassium conditions, RNA-sequencing revealed upregulation of myogenesis-related genes. Electrophysiological analyses by whole cell patch clamp technique were also performed at The University of Osaka using myotubes differentiated from iMuSCs. Although leak currents suggestive of gating pore activity were detected, similar currents in control cells precluded conclusive evidence of pathological specificity, highlighting the need for isogenic comparisons and further technical refinement.

Juntendo University focused on visualizing intracellular changes using fluorescent indicators. Calcium indicators (e.g., G-GECO1.1, R-GECO1) showed high sensitivity in RyR1-expressing HEK293 cells. However, traditional viral transduction was ineffective in iMuSCs, prompting the development of an mRNA transfection method, which significantly improved gene delivery. This allowed successful Ca^{2+} imaging in patient-derived myotubes, although indicators for membrane potential and pH lacked sufficient sensitivity.

Both Juntendo University and The university of Osaka explored methods to analyze paradoxical depolarization. Juntendo demonstrated reduced calcium responses under low-K conditions with electrical stimulation, partially replicating the HypoPP phenotype. Meanwhile, The university of Osaka applied the voltage-sensitive dye FluoVolt in time-lapse imaging and successfully observed abnormal membrane depolarization in patient-derived myotubes, indicating successful reproduction of this disease hallmark in vitro.

To support these research activities, technical transfer was conducted. All methods for iPSC-to-iMuSC differentiation were transferred from Kyoto university to Osaka and Juntendo university, including FACS-based purification. Although initial challenges such as cell detachment occurred, troubleshooting efforts enabled successful induction at all institutions, with CDH13-positive cells exceeding 30% and efficient myotube differentiation achieved.

This research represents a significant step forward in modeling hereditary periodic paralysis using patient-derived iPSCs. The ability to simulate disease phenotypes, especially through Ca^{2+} imaging and membrane potential analysis, validates the utility of this platform. Furthermore, the successful implementation of mRNA-based gene delivery in muscle cells provides a valuable tool for future studies. Through meticulous protocol sharing and on-site support, the collaborative nature of this study ensured a smooth technology transfer, laying a foundation for autonomous disease modeling and therapeutic screening by partner institutions.