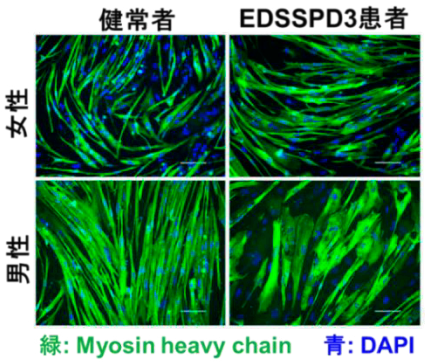
145　iPS細胞を用いた筋疾患の病態解明と治療戦略の構築	庄司　正樹

【目的】亜鉛の恒常性は、亜鉛トランスポーターによって制御されており、亜鉛トランスポーターを介する亜鉛イオンは、細胞内外でシグナル分子（亜鉛シグナル）として機能する。亜鉛トランスポーターSLC39A13/ZIP13（ZIP13）は、ゴルジ体に局在する細胞内亜鉛トランスポーターで、ゴルジ体から細胞質側への亜鉛輸送を担っている。最近、ZIP13の遺伝的点変異（G64D 型）により機能喪失した新しい脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群（EDSSPD3）が発見された。当該患者は、骨・軟骨等の全身的な結合組織の脆弱性を有するだけでなく、骨格筋の筋力低下や反射の鈍化等を示す筋緊張低下を呈することが見出されている。当該疾患は、希少難病に指定されているが、治療方法が現時点で存在していない。これまで、「亜鉛シグナルがどのように骨格筋の形成と機能にかかわるのか」については、明示されていない。したがって、本研究では、当該患者由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から骨格筋細胞への分化誘導法を確立し、EDSSPD3 の骨格筋における病態再現とその機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】EDSSPD3 患者 2 名（女性および男性）の皮膚繊維芽細胞にヒト iPS 細胞誘導用エピソーマルベクターを導入することで、iPS 細胞を作製した。iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導は、Doxycycline（Dox）存在下で発現する骨格筋分化制御因子ヒト Myogenic differentiation 1（hMyoD1）と mCherry 遺伝子が繋がった発現カセット（*hMYOD-mCherry*）を導入する手法を用いた。すなわち、この発現カセットを健常者および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞のゲノムに挿入し、Dox 制御 *hMYOD-mCherry* 安定発現 iPS 細胞株を樹立した。これらの iPS 細胞株から骨格筋への分化誘導は、Dox を添加することで行った。そして、誘導した健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来骨格筋細胞に対し、筋関連因子の蛍光免疫染色とリアルタイム PCR を行うことで、形態および遺伝子発現変化を比較解析した。さらに、筋機能を検討するため、グルコース取り込み能を比較解析した。

【結果】EDSSPD3 患者 2 名の皮膚繊維芽細胞にヒト iPS 細胞誘導用エピソーマルベクターを導入したところ、細胞表面上に未分化幹細胞マーカーが高発現した iPS 細胞コロニーが誘導されたことから、女性および男性 EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞を作製した。これらの iPS 細胞に対し、Dox 制御 h *hMYOD-mCherry* を導入したところ、Dox 添加により mCherry 発現が見られたことから、*hMYOD -mCherry* 安定発現 iPS 細胞株を樹立できた。次に、Dox 添加による骨格筋分化誘導法を適用したところ、骨格筋タンパク質が強力に発現した繊維状の骨格筋細胞を作製することに成功した。EDSSPD3 患者 iPS 由来の骨格筋細胞の形態は、健常者由来と比較したところ、女性では変化は見られなかったが、男性では筋繊維化が減弱していた。次に、筋関連遺伝子の発現を解析したところ、EDSSPD3 患者 iPS 由来骨格筋細胞において女性および男性共に、有意に減少した。さらに、女性 EDSSPD3 患者 iPS 由来骨格筋細胞では、グルコース取り込み能も減少した。以上の結果は、ZIP13-G64D 点変異による EDSSPD3 患者の骨格筋において、筋関連因子発現の減少によりグルコース取り込み能などの筋機能が減弱し、筋疾患を呈することを示唆している。本研究成果により、EDSSPD3 の骨格筋における病態再現できたことで、本疾患への治療法開発に貢献すると考えられる。

健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞



145. iPS 細胞を用いた筋疾患の病態解明と治療戦略の構築

庄司　正樹

徳島文理大学 薬学部 薬学科 生化学講座

Key words：脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群，疾患特異的 iPS 細胞，骨格筋，筋関連因子，分化誘導

緒　言

亜鉛の恒常性は、亜鉛トランスポーターによって制御されており、亜鉛トランスポーターを介する亜鉛イオンは、細胞内外でシグナル分子（亜鉛シグナル）として機能する。亜鉛トランスポーターSLC39A13/ZIP13（ZIP13）は、ゴルジ体に局在する細胞内亜鉛トランスポーターで、ゴルジ体から細胞質側への亜鉛輸送を担っている。これまで、ZIP13 遺伝子欠損マウスの解析から、ZIP13 を介する亜鉛シグナルがマウス成長期における骨芽細胞および軟骨細胞の分化と機能に重要であることが明示されている［1］。最近、ZIP13 の 64 番目のアミノ酸であるグリシン（G）をコードする GGT がアスパラギン酸（D）をコードする GAT へと点変異（ZIP13-G64D）したことにより、機能が喪失した疾患（脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群：EDSSPD3）が見出された［1〜3］。当該患者は、骨・軟骨等の全身的な結合組織の脆弱性を有するだけでなく、骨格筋の筋力低下や反射の鈍化等を示す筋緊張低下やミオパシー等を呈することが見出されている［3］。当該疾患は、希少難病に指定されているが、治療方法が現時点で存在していない。

これまで、骨格筋の形成と機能に ZIP13 の亜鉛シグナルが必要であることが示唆されたが、「どのように骨格筋の形成と機能にかかわるのか」「その破綻による筋疾患はどのように治療すればよいのか」については、まだ明示されていない。そこで、我々は、当該患者が筋緊張低下やミオパシーを呈することに着目し、EDSSPD3 患者由来の iPS 細胞を用いて骨格筋細胞への分化と機能を解析することで、それらを亢進する薬剤が治療戦略の中心になり得るのではないかと考えた。したがって、本研究では、当該患者由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から骨格筋細胞への分化誘導法を確立し、EDSSPD3 の骨格筋における病態再現とその機序を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. EDSSPD3 患者の皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞の作製と骨格筋への分化誘導

健常者および EDSSPD3 患者の皮膚線維芽細胞にヒト iPS 細胞誘導用エピソーマルベクター［4］をエレクトロポレーション機器により導入した。ヒト iPS 細胞の培養は、フィーダーフリーの条件にて行った。ヒト iPS 細胞の確認は、細胞表面に発現する未分化幹細胞マーカーである SSEA4 の特異的抗体を用いて免疫染色後、フローサイトメトリー解析を行った。さらに、作製した iPS 細胞の ZIP13-G64D 変異をシークエンス解析した。

ヒト iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導は、iPS 細胞に Doxycycline（Dox）存在下で発現する骨格筋分化制御因子ヒト Myogenic differentiation 1（hMyoD1）と mCherry 遺伝子が繋がった発現カセット（*hMYOD-mCherry*）を導入する手法を用いた［5］。この発現カセットが導入されたプラスミドは、京都大学 iPS 研究所の櫻井博士より供与された。初めに、このプラスミドを健常者および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞にエレクトロポレーション用機器で導入し薬剤セレクション後、限界希釈法によりクローン化することで Dox 制御 *hMYOD-mCherry* 安定発現 iPS 細胞を樹立した。Dox 添加による *hMYOD* 発現は、mCherry 発現を蛍光顕微鏡で観察することにより確認した。次に、樹立した安定発現 iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導は、以下のように行った。すなわち、シングルセル化した iPS 細胞を Matrigel コートしたプレート上に播種し 2 日培養後、DOX 添加したヒト iPS 細胞用培地（Primate ES cell medium）で 1 日および骨格筋細胞分化培地（αMEM、5% KSR、200 μM 2-ME）で 5 日培養することで、骨格筋細胞へと分化

誘導させた。

2. EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来骨格筋細胞の形態解析

分化誘導させた健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞は、Myosin heavy chain （MHC）の特異的抗体を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察することで、細胞の形態を解析した。

3. EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来骨格筋細胞の遺伝子発現解析

分化誘導 3、6、8 日目の健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞から Total RNA を抽出後、逆転写酵素で cDNA を合成した。筋関連因子 X および Y 遺伝子の特異的プライマーを用いて、SYBR Green による定量的 PCR を行った。

4. EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来骨格筋細胞によるグルコース取り込み能の解析

骨格筋細胞のグルコース取り込み能の解析は、Glucose uptake-Glo assay kit（Promega 社）を用いて行った。すなわち、分化誘導 8 日目の女性健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞を PBS で洗浄後、0.1 mM 2-deoxyglucose（2DG）で処置した。そして、骨格筋細胞内酵素で取り込まれた 2DG を基に生成された 2DG6P をルシフェラーゼ発光（Luminescence：RLU）として検出することで、グルコース取り込み能を比較解析した。

結果および考察

1. EDSSPD3 患者の皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞と Dox 制御 *hMYOD-mCherry* 安定発現 iPS 細胞株の作製

初めに、EDSSPD3 患者 2 名（女性および男性）の皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞を作製するために、ヒト iPS 細胞誘導ベクターを導入し培養したところ、iPS 細胞様コロニーが発生した。このコロニーは、単離・培養後、未分化幹細胞であるか確認するため、SSEA4 抗体を用いてフローサイトメトリー解析した。その結果、EDSSPD3 患者由来のコロニーは、健常者由来と同様に、SSEA4 が高発現していた（図 1a）。さらに、ZIP13-G64D 変異を確認するため、シークエンス解析したところ、健常者由来が GGT であるのに対し、EDSSPD3 患者由来が GAT に 1 塩基変異していた（図 1 b）。以上より、ZIP13-G64D 点変異を有した EDSSPD3 患者 2 名から未分化 iPS 細胞を作製できた。

次に、ヒト iPS 細胞から骨格筋細胞へと分化誘導させるため、Dox 存在下で発現する *hMYOD-mCherry* を導入する手法を適用した［5］。この分化誘導法は、京都大学 iPS 研究所の櫻井博士らの方法に基づいている［5］。EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞に Dox 制御 *hMYOD-mCherry* プラスミドを導入し薬剤セレクション後、クローン化した。これらの iPS 細胞を Dox 存在下で培養したところ、EDSSPD3 患者 2 名由来の iPS 細胞において、健常者由来と同等の *mCherry* 発現が確認された（図 1c、d）。以上より、健常者および EDSSPD3 患者 2 名由来の iPS 細胞から Dox 制御 *hMYOD-mCherry* 安定発現 iPS 細胞を樹立できた。

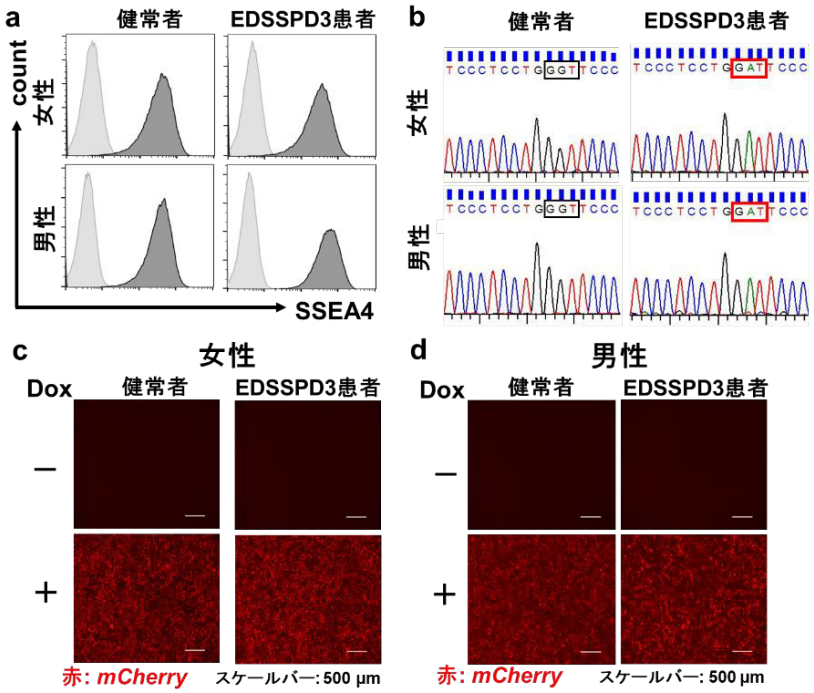


図 1. EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞と Dox 制御 *hMYOD-mCherry* 安定発現 iPS 細胞の作製

a）未分化幹細胞マーカーSSEA4 のフローサイトメトリー解析。

b）ZIP13-G64D 点変異のシークエンス解析。

c）各種 iPS 細胞の Dox 添加培養下における *mCherry* 発現の蛍光顕微鏡像（女性）。

d）各種 iPS 細胞の Dox 添加培養下における *mCherry* 発現の蛍光顕微鏡像（男性）。

2. EDSSPD3 患者 iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導と性状解析

樹立した安定発現 iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導は、図 2a に示す概略図のように行った。具体的には、シングルセル化した iPS 細胞を Matrigel コートプレート上に播種し 2 日前培養後、Dox 添加ヒト iPS 細胞用培地で 1 日および骨格筋細胞分化培地で 5 日培養することで、骨格筋細胞へと分化誘導させた（8 日間）。

各種 iPS 細胞由来の骨格筋細胞は、骨格筋タンパク質である MHC の発現を蛍光顕微鏡で観察することで、細胞の形態を解析した（図 2b）。その結果、EDSSPD3 患者 2 名の iPS 細胞から MHC が強力に発現した繊維状の骨格筋細胞を作製できた。さらに、細胞の形態を健常者由来と比較したところ、女性由来では大きな変化は見られなかったが、男性由来では筋繊維化が減弱していた。これは、EDSSPD3 男性患者由来 iPS 細胞では、女性由来と比較して骨格筋細胞に分化誘導されにくいことを示唆している。

次に、EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来骨格筋細胞の筋関連遺伝子発現を定量的 PCR で検討したところ、筋関連遺伝子 X および Y の発現が分化誘導 6、8 日において、女性および男性共に健常者由来と比較し、有意に減少することを見出した（図 2c、d）。筋関連因子 X および Y 遺伝子は、骨格筋の形成と機能に重要な遺伝子であることから、EDSSPD3 患者の骨格筋細胞ではこれら因子の発現が減少することで、健常者由来と比較し、形成と機能が減弱した骨格筋細胞になると考えられる。

最後に、EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来骨格筋細胞の機能を検討するために、グルコース取り込み能の解析を行った。骨格筋細胞は、グルコーストランスポーターGLUT4 により、グルコースを取り込みエネルギー物質の ATP を生成している［6］。この反応は、骨格筋の収縮運動に重要であることから、EDSSPD3 患者骨格筋の収縮機能を検討するために行った。分化誘導 8 日の女性由来細胞を 2DG で処置し、取り込んだ 2DG が細胞内で 2DG6P に変換される反応を基に、グルコース取り込み能を解析した。その結果、女性 EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞は、健常者由来と比較し、有意に 2DG の取り込みが減少した（図 2e）。これは、女性 EDSSPD3 患者の骨格筋細胞では、グルコース取り込み能が減少し、筋収縮が減弱することが示唆される。

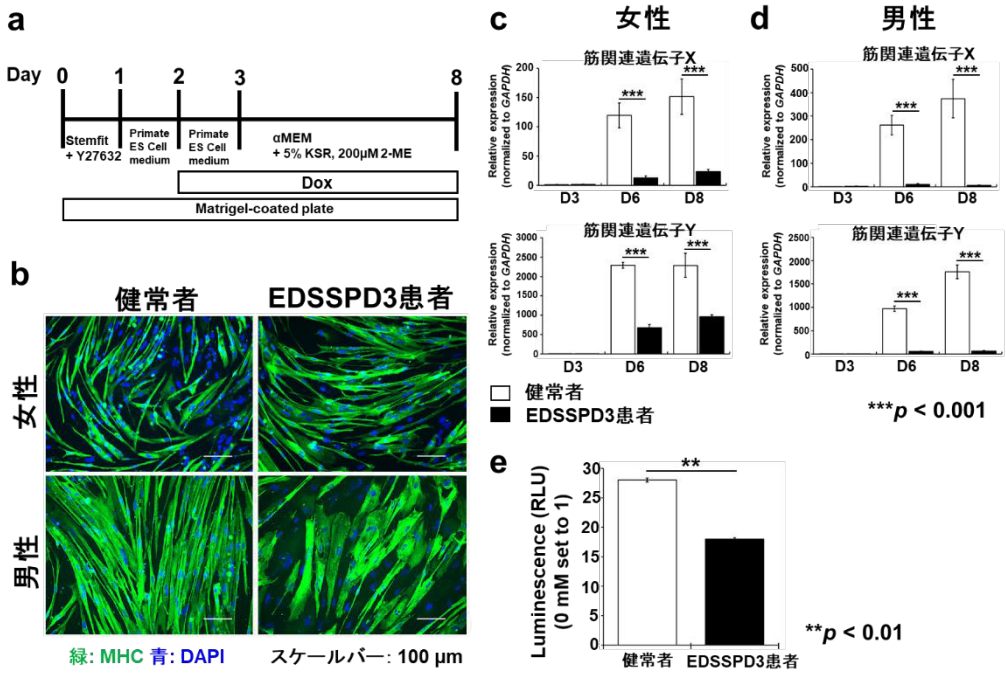


図 2. EDSSPD3 患者 iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導と性状解析

a) ヒト iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導法の概略図。

b) 各種 iPS 細胞由来の骨格筋細胞における MHC の蛍光免疫染色像。

c) 分化誘導 3、6、8 日の各種 iPS 細胞由来骨格筋細胞における筋関連因子 X および Y 遺伝子の発現量（女性）（ANOVA 解析）。

d) 分化誘導 3、6、8 日の各種 iPS 細胞由来骨格筋細胞における筋関連因子 X および Y 遺伝子の発現量（男性）（ANOVA 解析）。

e) 女性各種 iPS 細胞由来骨格筋細胞におけるグルコース取り込み量（student's *t*-test 解析）。

以上より、EDSSPD3 患者の女性および男性から iPS 細胞を作製でき、骨格筋細胞への分化誘導法を確立できた。当該患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞は、MHC が強力に発現した繊維状の骨格筋細胞であったが、形態には、男女差が存在した。さらに、当該患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞では、骨格筋の形成と機能に重要な筋関連因子 X および Y 遺伝子発現が減少し、グルコース取り込み能も減弱していた。これらの結果は、EDSSPD3 患者が呈する筋緊張低下やミオパシー等の病態が *in vitro* で再現でき、その機序が ZIP13-G64D 変異による骨格筋細胞の筋関連因子発現と機能の減弱であることを示唆していると考えられる。本研究成果により、EDSSPD3 の骨格筋における病態再現できたことで、本疾患への治療法開発に貢献すると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島文理大学薬学部病態分子薬理学講座教授の深田俊之博士、同大学薬学部生化学講座教授の葛原隆博士である。本研究を遂行するにあたり、研究材料と手法を御提供して頂いた京都大学 iPS 研究所臨床応用研究部門准教授の櫻井英俊博士に心より感謝申し上げます。また、本研究の御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

1) Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, et al. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. PLoS One. 2008;3(11):e3642. doi: 10.1371/journal.pone.0003642. PubMed PMID: 18985159; PubMed Central PMCID: PMCPMC2575416.

2) Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, et al. Molecular pathogenesis of spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. EMBO Mol Med. 2014;6(8):1028-42. doi: 10.15252/emmm.201303809. PubMed PMID: 25007800; PubMed Central PMCID: PMCPMC4154131.

3) Dusanic M, Dekomien G, Lucke T, Vorgerd M, Weis J, Epplen JT, et al. Novel Nonsense Mutation in SLC39A13 Initially Presenting as Myopathy: Case Report and Review of the Literature. Mol Syndromol. 2018;9(2):100-9. doi: 10.1159/000485881. PubMed PMID: 29593477; PubMed Central PMCID: PMCPMC5836206.

4) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nat Methods. 2011;8(5):409-12. doi: 10.1038/nmeth.1591. PubMed PMID: 21460823.

5) Uchimura T, Otomo J, Sato M, Sakurai H. A human iPS cell myogenic differentiation system permitting high-throughput drug screening. Stem Cell Res. 2017;25:98-106. doi: 10.1016/j.scr.2017.10.023. PubMed PMID: 29125995.

6) Zorzano A, Palacin M, Guma A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. Acta Physiol Scand. 2005;183(1):43-58. doi: 10.1111/j.1365-201X.2004.01380.x. PubMed PMID: 15654919.