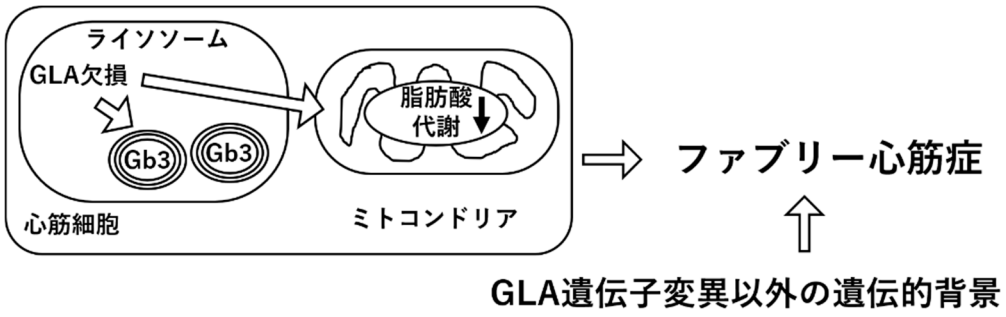
177　ファブリー心筋症のエネルギー代謝異常の機序解明	藏本　勇希

【目的】ファブリー病は先天性代謝異常症の一つで、ライソソーム酵素（αガラクトシダーゼA：GLA）が欠損していることで、基質であるグロボトリアオシルセラミド（Gb3）等が細胞内に蓄積するために起こる。心筋細胞へのGb3蓄積による心筋症の発症はファブリー病患者の主な死因となっているが、Gb3蓄積と心筋細胞障害をつなぐ病態進展の分子機序は未解明である。本研究ではファブリー心筋症の*in vitro*評価系として、患者由来iPS心筋細胞を作製し、そのモデルとしての検証を行い、さらに「ファブリー病の蓄積物が心筋エネルギー源である脂肪酸利用を障害することで心筋エネルギー代謝異常を来している」との仮説を立て、基礎、臨床の両面からファブリー心筋症の代謝異常症としての病態機序を解明し、その中から治療標的を見出すことを目的とする。

【方法】ファブリー心筋症の*in vitro*評価系の確立のため、ファブリー病患者よりiPS細胞作製を行い、心筋細胞へと分化させた。ファブリー病の特徴をiPS細胞、iPS細胞由来心筋細胞で検証し、エネルギー代謝異常の有無に関してフラックスアナライザーを用いて解析した。ファブリー心筋症患者の病態進展因子としてエネルギー代謝異常に関わる遺伝子の変異が関わっているかどうかを、ファブリー病患者の遺伝情報・臨床情報を用いて解析した。

【結果】ファブリー病患者よりiPS細胞株を作製し、GLA活性欠損とGb3の蓄積を確認した。ファブリー病モデルiPS心筋細胞をグルコース非含有培地で培養すると、健常対照iPS心筋細胞と比較して早期に収縮性の低下を認めた。また、フラックスアナライザーによる解析で、ファブリー病モデルiPS心筋細胞では脂肪酸添加時の酸素消費量増加が減弱していた。一方で正常iPS心筋細胞の*GLA*遺伝子ノックダウンによるモデルにおいても同様の結果が得られた。細胞モデルによる解析から脂肪酸の利用障害が示唆されたため、これがファブリー心筋症の重症度に関わっていないかどうかを調べた。ファブリー病患者からのエクソーム解析結果と臨床情報との関連を調べ、ファブリー心筋症の重症度に関わる*GLA*遺伝子変異以外の遺伝的背景因子の候補を見出した。

ファブリー心筋症進展の概念図



177. ファブリー心筋症のエネルギー代謝異常の機序解明

藏本　勇希

大阪大学 大学院医学系研究科 循環器内科学

Key words：ファブリー病，ファブリー心筋症，エネルギー代謝異常，iPS 細胞

緒　言

ファブリー病は先天性代謝異常症の一つである。ファブリー病患者はライソソーム内の加水分解酵素であるαガラクトシダーゼ A（GLA）の遺伝子変異のため、GLA 活性が欠損している。その結果、基質であるグロボトリアオシルセラミド（Gb3）等のスフィンゴ糖脂質がライソソーム内に蓄積することで各種臓器障害を来す。特に心筋細胞への蓄積は左室肥大を来し、その後心不全、心筋梗塞、不整脈等を引き起こすことからファブリー心筋症と呼ばれ、罹患者の主な死因となっている。

ファブリー病に対し、欠損している GLA 酵素を補充する治療法（酵素補充療法）は、基質蓄積を減少させることが知られている。しかしながら、ファブリー心筋症の進行を抑制し予後を改善するという明確な報告はない。ファブリー心筋症の特徴である左室肥大に関しても、全ての症例で改善するわけではなく、10 年程度の経過で左室肥大は治療前と同程度に戻ることが報告されている。またファブリー心筋症の肥大心に蓄積するスフィンゴ糖脂質の質量は左室肥大で正常心よりも肥大している重量のごく一部にすぎないことも知られている。これはファブリー心筋症で起こっている心筋障害が Gb3 蓄積単独の病態像ではなく、基質蓄積の減少以外に、心筋症病態進展の直接の治療標的が他にもあることを示唆している。

ファブリー病の病型は *GLA* 遺伝子変異により古典型、遅発型に分けられることが分かっているが、同一 *GLA* 遺伝子変異の患者同士でも心筋症を含めたファブリー病の病態進展には多様性が認められている［1］。また、ファブリー心筋症の進展機序は、臨床サンプルやモデルマウスによる検討が行われてきたが、これまでに明確に機序を解明した報告はない。これは臨床サンプルの遺伝的背景の違いによるバラつきの大きさや、モデルマウスにおける種の違いによる病態再現性の低さが影響していると考えられた。

そこで、本研究では上記を克服するために患者由来 iPS 細胞を樹立し、ファブリー心筋症の *in vitro* モデルを作製して表現型の解析を行いエネルギー代謝異常に関わる表現型を確認し、機序解明につながる基礎的検討を行った。また、エネルギー代謝異常に関わる遺伝子変異が病態進行の多様性に関わっているかどうかについて、患者レジストリを用いて解析した。

方　法

1. 対象患者及び iPS 細胞樹立・心筋細胞分化

ヘテロ接合体女性ファブリー病患者とその息子から iPS 細胞を作製した。いずれの患者も臨床的にファブリー病が疑われ、GLA 活性欠損と *GLA* 遺伝子変異により診断されていた。女性患者は、40 歳代で左室肥大と狭心症を示し、その後心不全と心房細動を伴う洞不全症候群を発症したが、他の臓器に重度の機能障害は見られなかった。息子は左室肥大と末期腎疾患を示し、30 代で腎移植を受けた。iPS 細胞の作製は、過去の報告に従ってセンダイウイルスベクターを使用して末梢血単核細胞から作製した。iPS 細胞は、StemPro-34 培地（Thermo Fisher Scientific）を使用し、胚様体形成プロトコルを用いて心筋細胞に分化させた［2］。

2. iPS 細胞由来心筋細胞の表現型解析

iPS 細胞由来心筋細胞を高密度に播種し、細胞がシート状に生着して全体的に同期拍動するようにした。解析はセルモーションイメージングシステム（Sony 社）を用いた non-label で得られる細胞収縮動態解析を行った。

また、エネルギー代謝異常の解析の為、フラックスアナライザー（Agilent 社）のキットを用いてミトコンドリアにおける酸化的リン酸化による酸素消費量を測定した。

3. ファブリー病患者からの遺伝子解析及び臨床情報解析

大阪大学医学部付属病院に通院中のファブリー病患者 22 名より遺伝子解析研究の同意を取得した。血液からゲノム DNA を抽出し、全エクソン解析を行った。得られたシークエンスデータからリファレンス配列との差異を抽出し、そのアレル頻度や病原性などの付加情報をデータベース検索により取得した。臨床情報に関しては患者の年齢・性別及び心エコー所見を取得した。

結　果

1. ファブリー病患者からの iPS 細胞及び iPS 細胞由来心筋細胞の作製

ファブリー心筋症の発症メカニズムの解明のための細胞モデルを確立するため、ヘテロ接合体の女性ファブリー病患者（FD1）とそのヘミ接合の息子（FD2）からそれぞれ 14 個と 4 個の細胞株を樹立し、GLA 活性を測定することで各クローンのファブリー病としての特徴を確認した。また、健常ボランティアからも iPS 細胞株を作製し、健常対照 iPS 細胞株として使用した。

iPS 細胞の GLA 活性は健常対照 iPS 細胞株で正常、ヘミ接合体男性患者由来 iPS 細胞株で欠損していることを確認した。次に、ヘテロ接合体女性患者 iPS 細胞株の GLA 活性を調べたところ、GLA 活性が正常な iPS 細胞株（FD1（＋））と、GLA 活性が欠損している iPS 細胞株（FD1（－））の 2 つのグループに分けられた（図 1）。これは，ヒト女性の体細胞から iPS 細胞を作製すると、元々の体細胞の X 染色体不活化が維持されるために、X 関連遺伝子の発現が mono-allelic になるという過去の報告と矛盾しない結果であった［3］。

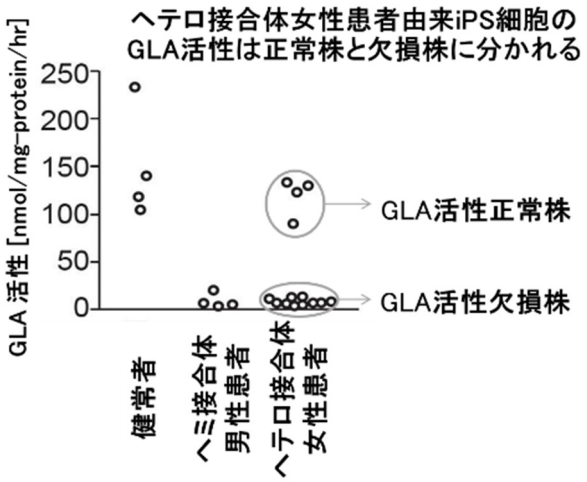


図 1. iPS 細胞の GLA 活性

GLA 活性はヘミ接合体男性患者由来 iPS 細胞株は欠損しており、ヘテロ接合体女性患者由来 iPS 細胞株は正常株と欠損株に分けられた。

一方、iPS 細胞の X 染色体の不活化は不安定で，培養時間とともに“erosion”を受けることがあると知られている［4］。不活性化された X 染色体の erosion は時間とともに進行し，最終的には不活化されていた allele の再活性化を引き起こして bi-allelic な発現となる。したがって、ヘテロ接合体女性患者由来 iPS 細胞株では、培養時間の経過とともに erosion が進行し、*GLA* 遺伝子に関しても mono-allelic から bi-allelic な発現に変化し、それが GLA 活性に影響を与える可能

性につき検討した。ヘテロ接合体女性患者由来 iPS 細胞株の GLA 活性を長期に渡り継代を続けて比較したところ、継代数と共に GLA 活性が上昇する細胞株を認めた（図 2a、FD1（−）-4）。一方、別の FD1（−）iPS 細胞株（FD1（−）-7）と FD1（＋）iPS 細胞株（FD1（＋）-3）では、GLA 活性は変化しなかった。

次に、FD1（−）-4 での GLA 活性の増加が不活化 X 染色体の erosion と *GLA* 遺伝子の bi-allelic な発現によるものかどうかを調べるために、細胞の転写産物の RFLP アッセイを行った。Control および FD2 iPSC からの GLA cDNA は、それぞれ野生型および変異型の mono-allelic パターンを示した（図 2b）。GLA 活性の変化から予想されたように、FD1（−）-4 由来の GLA cDNA は、継代初期には変異型の mono-allelic パターンを示したが、継代を重ねると野生型 allele の発現が徐々に増加した。一方、FD1（−）-7 と FD1（＋）-3 の GLA cDNA は、それぞれ変異型と野生型の mono-allelic パターンを示し、長期継代後も維持されていた。これらの結果から、X 染色体不活化の erosion と bi-allelic な発現はクローン間で不均一に起こり、mono-allelic な *GLA* 遺伝子発現は一部のクローンで長期間維持されていることがわかった。このため、FD1（−）-7 および FD1（＋）-3 iPS 細胞株は、それぞれファブリー病モデルおよびそのアイソジェニックコントロールとして用いることができることがわかった。

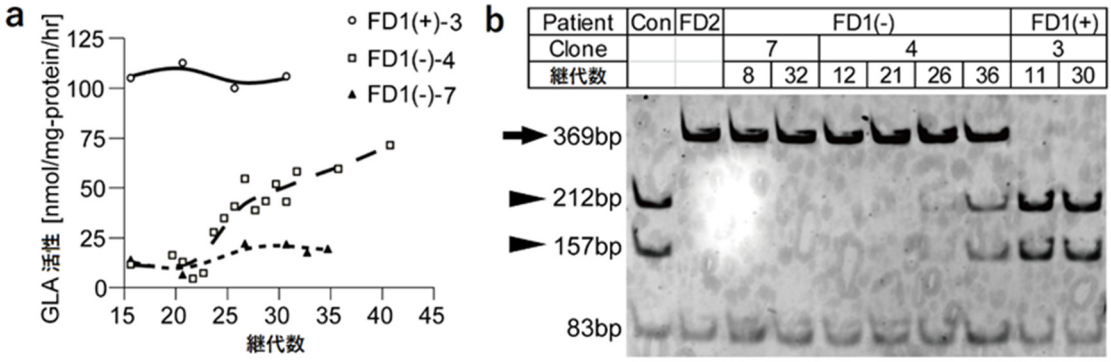


図 2. 女性由来 iPS 細胞の X 染色体不活化の長期培養による変化

a）iPS 細胞の GLA 活性の長期培養による変化を示す。ヘテロ接合体女性患者から樹立した iPS 細胞株（FD1）の中で、FD1（−）-4 クローンは長期培養中に GLA 活性の漸増を認めた。

b）iPS 細胞の *GLA* 遺伝子発現パターンの長期培養による変化を示す。*GLA* 遺伝子変異周辺を PCR で増幅した後に、健常配列のみ切断できる制限酵素を反応させた。健常人由来 iPS 細胞（Con）では切断され（矢頭）、ヘミ接合体男性患者由来 iPS 細胞（FD2）では切断されなかった（矢印）。FD1（−）-4 は継代数 26 で野生型 allele の発現を認め、継代数 36 で更に増強している。

2. ファブリー心筋症モデルにおける表現型スクリーニング

1 にて確立されたファブリー病モデル iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞の表現型を確認した。iPS 細胞由来心筋細胞の免疫染色及び質量分析にてファブリー病モデルにおいて Gb3 がより多く蓄積していることを認めた。しかしながら、電気生理学的な特性には有意な変化を認めなかった。ファブリー心筋症モデルにおける Gb3 蓄積以外の表現型スクリーニングとして、ハイスピードカメラによる iPS 心筋細胞の収縮性の評価を行った。グルコース含有培地とグルコース非含有培地での収縮速度を比較すると、健常モデルでは有意な差を認めなかったが、ファブリーモデルでは早期にグルコール非含有培地での収縮速度の低下を認めた。エネルギー源の枯渇により収縮性の低下を来すことから、エネルギー代謝異常のあることが示唆された。グルコース非含有培地で早期に収縮性低下を認めたことから、エネルギー源として脂肪酸の利用障害があり、グルコースへの依存性が高まっていると考えられた。

エネルギー代謝異常を更に詳しく調べるため、フラックスアナライザーを用いて酸化的リン酸化による酸素消費量の測定を行った。Agilent 社の XF Palmitate Oxidation Stress Test Kit のプロトコルに従い、解析前日より低血清培地で培養し、解析 1 時間前に無血清、グルタミン不含、低グルコース培地で培養した状態で、脂肪酸添加の有無により酸素消費量を比較すると、ファブリーモデルにおいて脂肪酸添加時の酸素消費量増加が減弱していた。このことから、

脂肪酸利用障害のあることが示唆された。

この現象は患者由来 iPS 細胞モデルだけでなく、健常由来 iPS 細胞に対し siRNA を用いて *GLA* 遺伝子をノックダウンすることによっても確認された。このモデルでは GLA 活性は正常の 50%程度であり、Gb3 の蓄積は認めなかった。一方で、Gb3 の添加によって細胞内に Gb3 を蓄積させるモデルでは脂肪酸添加時の酸素消費量増加は障害されなかった。このことよりファブリー病におけるエネルギー代謝異常は Gb3 蓄積を介さずに *GLA* 遺伝子欠損により直接的に起こっていることが考えられた。

3. ファブリー病患者の心筋症重症度と脂肪酸代謝関連遺伝子変異との関わり

これまでの *in vitro* モデルによる研究で、ファブリー心筋症の病態に脂肪酸利用障害というエネルギー代謝異常のあることが示唆された。これをファブリー病患者の層別化に活用できるかどうかを、独自に収集したファブリー病患者のゲノム情報及び臨床情報を用いて検討した。

大阪大学医学部付属病院に通院中のファブリー病患者 22 名より同意を得て、エクソーム解析を行った。診療情報よりその検査所見、心病変の進行の有無などを調べた。心エコー所見より左室駆出率、左室収縮末期径を取得し、また心筋線維化が進行したファブリー病心病変に見られる所見（後壁基部の菲薄化、壁運動低下、輝度上昇）の有無を確認した。

患者は 31～81 歳（中央値 55.5 歳）の男性 8 名、女性 14 名で、うち男性 5 名、女性 8 名が左室重量係数＞125 g/m^2 より左室肥大と判断された。左室重量係数は年齢に従って増大する傾向を認め、また男性の方が女性よりも若年で左室肥大を示す傾向を認めた（図 3a）。*GLA* 遺伝子変異は同意取得時点で既に殆どの症例で同定されており、未同定であった症例も今回のゲノム解析にて同定された。12 種類の *GLA* 遺伝子変異が同定され、6 種類は未報告の変異であり、既報告の変異 6 種類のうち 1 種類は遅発型、残り 5 種類は古典型として報告されていた（図 3a）。

ファブリー心筋症の病態進展指標として *GLA* 遺伝子変異以外の遺伝的背景因子として、脂肪酸β酸化に関わる遺伝子変異の有無を調べたところ、重篤な変異（truncating mutation ないし疾患ゲノムデータベースで病原性変異として登録されている）を 8 名の患者で認めた。このうち 5 名（62.5%）で心エコーにて心筋の線維化所見を認めた（図 3b、橙色三角印）。一方で変異を認めなかった 14 名のうち、心エコーにて線維化所見を認めたのは 5 名（35.7%）だった（図 3b、橙色丸印）。脂肪酸β酸化に関わる重篤な遺伝子変異があると線維化所見を来しやすいことが示唆されたが、統計学的有意差は認めなかった（p=0.22、カイ二乗検定）。

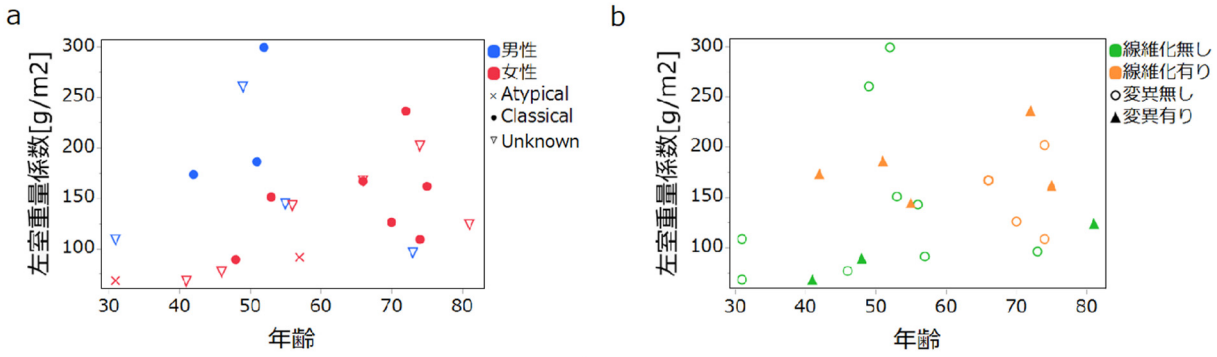


図 3. ファブリー病患者の臨床情報とゲノム情報との関連

ゲノム解析を行ったファブリー病患者 22 名の左室重量係数と年齢の分布を示す。

a）男性、女性をそれぞれ青色、赤色で示す。*GLA* 遺伝子変異の種類を遅発型（atypical）、古典型（classical）、未報告（unknown）をそれぞれ×印、○印、△印で示す。

b）心エコー画像にて線維化を示唆する所見（左室後壁の輝度上昇、菲薄化、壁運動低下のいずれか）の無し、有りをそれぞれ緑色、橙色で示す。ゲノム解析での脂肪酸β酸化関連遺伝子の重篤変異の無し、有りをそれぞれ○印、△印で示す。

考　察

本研究は、ファブリー心筋症の病態解明及び疾患層別化因子の探索を目的として行われた。ファブリー病のヘテロ接合体女性患者から iPS 細胞を作製すると、同一ゲノムを持ちながらエピジェネティックな修飾の違いにより疾患モデルと、健常対照モデルが得られることを初めて示した。しかしそれと同時に、長期培養などによって X 染色体を不活化しているエピジェネティック修飾は失われてゆくことも確認した。他のヘテロ接合体 X 連鎖疾患においても同様の現象が確認されており、X 連鎖疾患のヘテロ接合体女性患者から iPS 細胞を作製し、疾患モデルとアイソジェニックな健常対照とすることには注意が必要である。

ファブリー心筋症モデルの表現型解析において脂肪酸代謝障害というエネルギー代謝異常が認められた。患者由来の疾患モデルだけでなく、遺伝子ノックダウンによるモデルにおいても同様の現象が確認された。遺伝子ノックダウンによるモデルでは GLA 活性は低下しているが明らかな Gb3 蓄積は来していなかったことから、エネルギー代謝異常は Gb3 蓄積を介さずに起こっていることが示唆された。今後はライソソームにおける GLA 蛋白とミトコンドリア内で起こる脂肪酸代謝を繋ぐ機序の解明が求められる。

近年様々な疾患の遺伝的リスクスコアが遺伝統計学的解析によって算出されるようになっている。単一遺伝子疾患においても、疾患重症化のリスクを疾患原因遺伝子以外の遺伝情報から推定できるようになることが期待されている。今回の解析ではファブリー心筋症の重症化に関わる遺伝的背景因子を示唆する貴重な情報を集積することができた。今後更に症例数を増やすことで、遺伝統計学的な解析が可能となれば、ファブリー心筋症の重症度や発症時期の予測が可能なバイオマーカーの同定につながることが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学の坂田泰史教授、朝野仁裕講師、及び大阪大学大学院医学系研究科先進心血管再生医学共同研究講座の李鍾國特任教授である。

文　献

1) Daniela Sorriento, Guido Iaccarino. The Cardiovascular Phenotype in Fabry Disease: New Findings in the Research Field. Int J Mol Sci. 2021 Jan 29;22(3):1331. PMID: 33572752 DOI: 10.3390/ijms22031331

2) Yuki Kuramoto, Atsuhiko T Naito, Hiromasa Tojo, Taku Sakai, Masamichi Ito, Masato Shibamoto, Akito Nakagawa, Tomoaki Higo, Katsuki Okada, Toshihiro Yamaguchi, Jong-Kook Lee, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Yasushi Sakata, Issei Komuro. Generation of Fabry cardiomyopathy model for drug screening using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a female Fabry patient. J Mol Cell Cardiol. 2018 Aug;121:256-265. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30048710 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.07.246

3) J. Tchieu, E. Kuoy, M.H. Chin, H. Trinh, M. Patterson, S.P. Sherman, O. Aimiuwu, A. Lindgren, S. Hakimian, J.A. Zack, A.T. Clark, A.D. Pyle, W.E. Lowry, K. Plath. Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. Cell Stem Cell. 2010 Sep 3;7(3):329–342. PMID: 20727844 DOI:10.1016/j.stem.2010.06.024

4) S. Mekhoubad, C. Bock, A.S. De Boer, E. Kiskinis, A. Meissner, K. Eggan. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. Cell Stem Cell. 2012 May 4;10(5):595–609. PMID: 22560080 DOI:10.1016/j.stem.2012.02.014