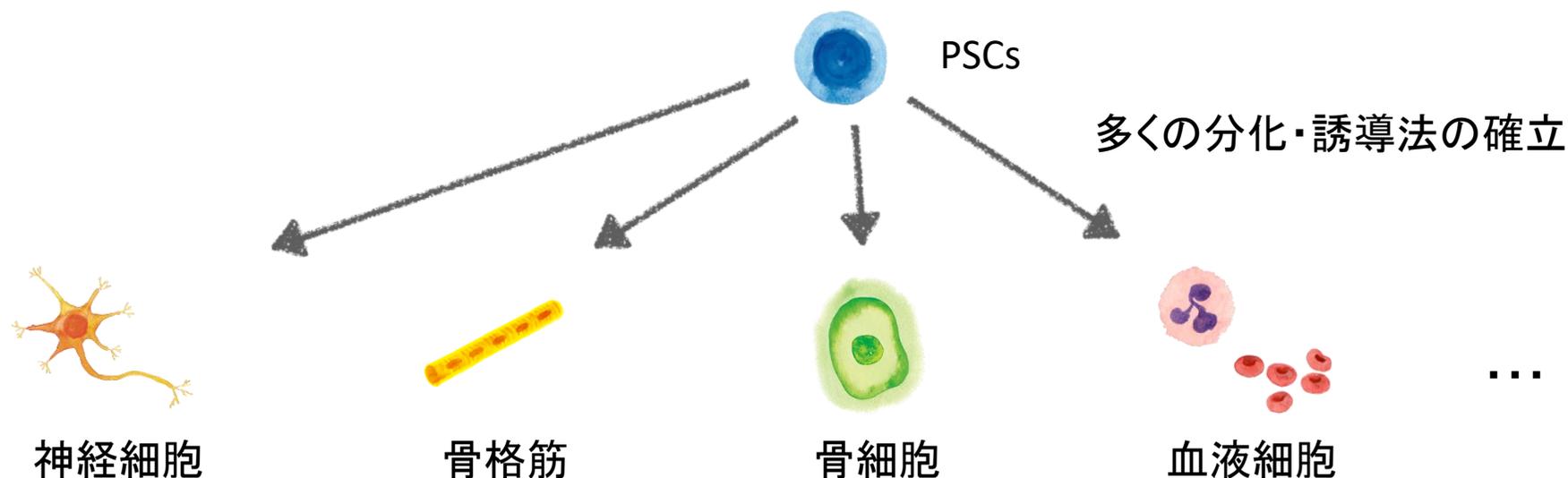


多能性幹細胞由来の病態再現モデルを用いた 中條西村症候群の 創薬候補化合物スクリーニング

京都大学 iPS細胞研究所
教授 齋藤 潤

2022年6月28日

多能性幹細胞 (Pluripotent stem cells: PSCs) の医学応用



1. 再生医療としての応用

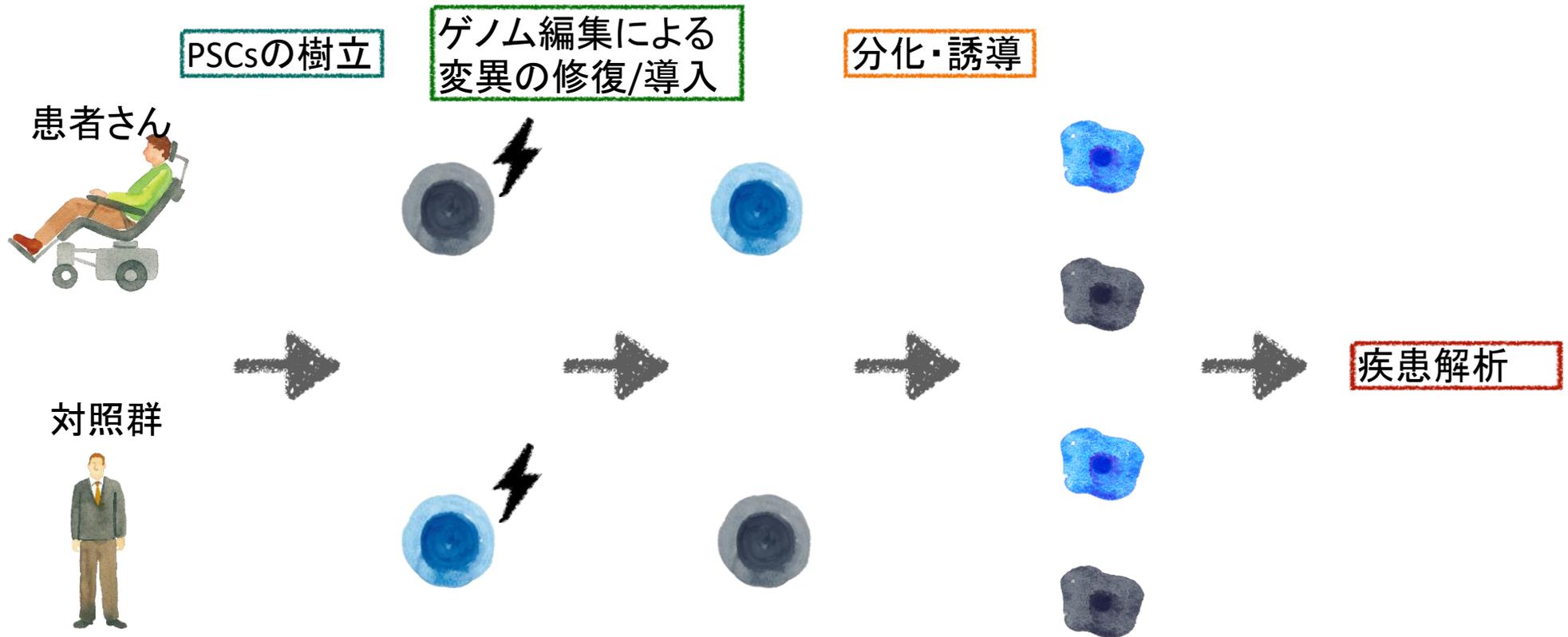
分化・誘導した細胞・組織を体内に移植し、治療する。

2. 疾患モデルとしての応用

分化・誘導した細胞・組織を疾患モデルとし、疾患解析や創薬に応用する。

PSCsを疾患モデルとして応用する - 1

- PSCsを用いた疾患解析のフロー -



PSCsを疾患モデルとして応用する - 2

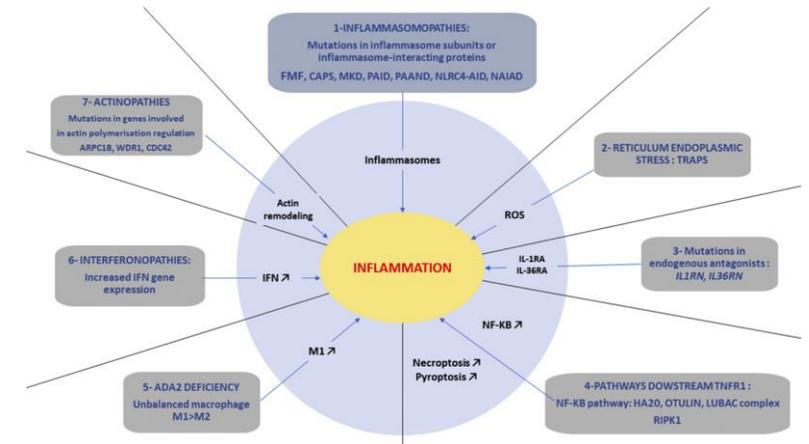
- 疾患解析にPSCsを用いるメリット -

- ▶ 人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を用いることで、患者の遺伝的背景を再現することができる。
- ▶ ゲノム編集などの遺伝子操作の効率が非常によい。
- ▶ 分化法によっては、発生過程に着目した疾患解析が行える。

- 疾患解析にPSCsを用いるデメリット -

- ▶ PSCsの維持や分化・誘導にかかるコストが高い。
- ▶ 方法によっては、分化・誘導に日数がかかる。

私たちの研究対象疾患 自己炎症性疾患



- 不明熱・周期熱、皮膚症状など全身性の炎症症状を示す。
- 単球マクロファージ系の細胞の異常がみられることが多い。
- 単一遺伝子の変異により発症するケースが多い。
- 症状の複雑さなどから診断が困難なケースが多い。
- 診断がつくものについては抗体医薬を用いた特異な治療が可能となりつつある。

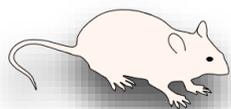


Georgin-Laviella S et al. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* (2020)

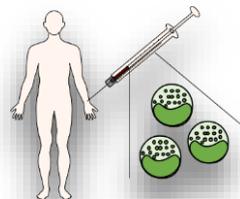
PSCs由来単球は、自己炎症性疾患のモデルとして有効なツールとなり得る

- 自己炎症性疾患の疾患モデル比較 -

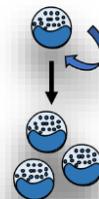
動物モデル



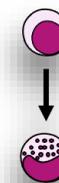
患者由来単球



単球細胞株



PSCs由来単球

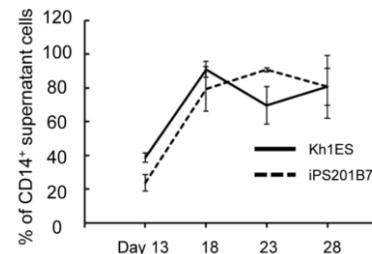
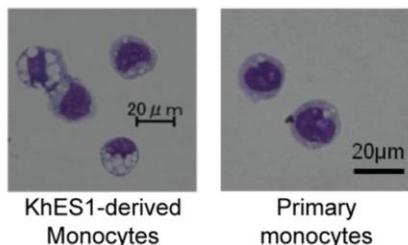
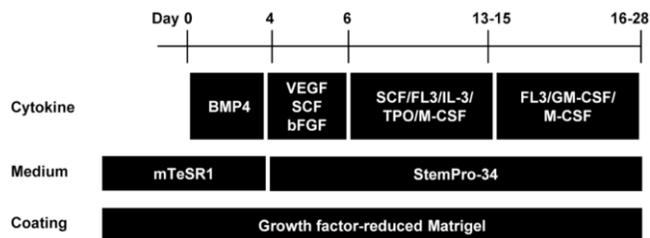


	動物モデル	患者由来単球	単球細胞株	PSCs由来単球
サンプル量の豊富さ	+	-	+++	++
疾患表現型の正確さ	+++	++++	+	++
遺伝子編集の容易さ	++	-	+	+++
実験スパンの短さ	+	-	+++	+

利点: 遺伝子編集が容易である。
欠点: 分化に20日ほど要するため、研究が長期化する

PSCs由来単球は 特定の遺伝子を導入することで株化が可能である

- PSCs由来単球の分化誘導方法 -



Yanagimachi MD et al. *PLoS One*. (2013)

- ▶ 当研究室で開発された高効率な単球分化誘導法
- ▶ 分化開始から18日目には、約90%の細胞が単球マーカーであるCD14を発現する。

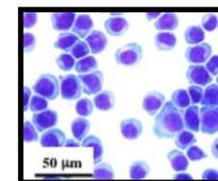
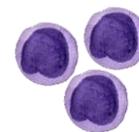


研究期間の短縮、サンプル数の確保のため株化

- PSCs由来単球株 (PSC-derived Monocyte Cell Lines: PSC-MLs) の樹立 -



+



Haruta M et al. *Hum Immunol*. (2013)

PSCs由来単球に3遺伝子を導入することで、PSC-MLsへと株化

PSC-MLsは PSCs由来単球の欠点を克服するツールである

- 自己炎症性疾患の疾患モデル比較 -

	動物モデル	患者由来単球	単球細胞株	PSC-MLs
サンプル量の豊富さ	+	-	+++	+++
疾患表現型の正確さ	+++	++++	+	++
遺伝子編集の容易さ	++	-	+	+++
実験スパンの短さ	+	-	+++	+++

PSC-MLsへの株化により、研究期間を大幅に短縮可能

中條・西村症候群 (Nakajo-Nishimura Syndrome: NNS)

- ▶ 常染色体の潜性遺伝により発症する自己炎症性疾患。
- ▶ 周期熱や凍瘡様発疹に加え、脂肪・筋萎縮を併発する難病。
- ▶ 免疫プロテアソームのサブユニット $\beta 5i$ をコードするPSMB8遺伝子にホモ接合性の変異(p.G201V)を持つ。
- ▶ 現行の治療は、炎症症状の緩和を目的としたステロイドの内服だが、長期投与による合併症が懸念され、さらに脂肪・筋萎縮に対しては効果が認められない。



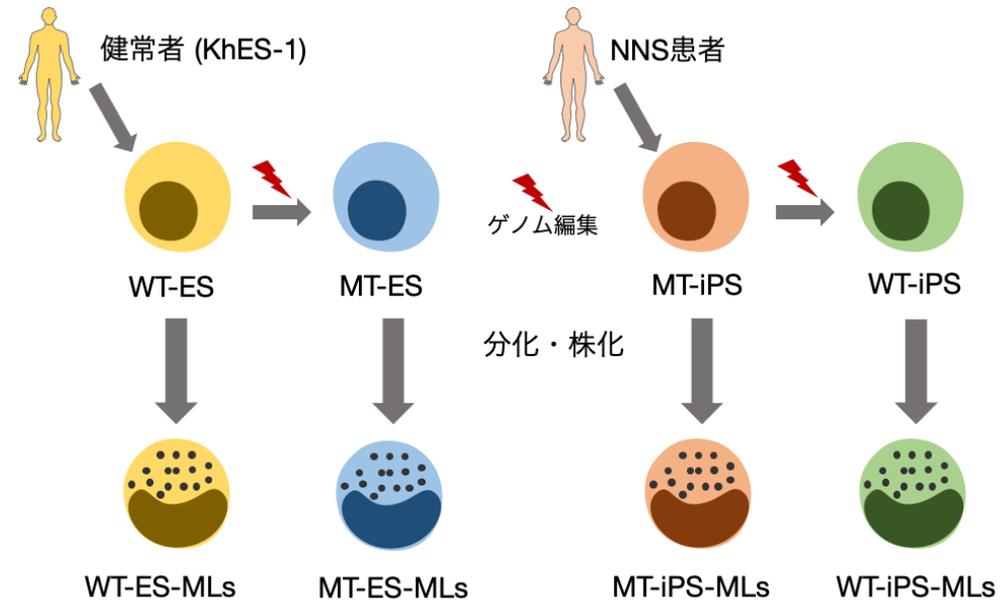
NNSに対する詳細な疾患解析と創薬が望まれている。



<http://aid.kazusa.or.jp/2013/disease/nns>

NNSの病態再現のため PSC-MLsのアイソジェニックペアを樹立した

- ▶ ES細胞株KhES-1をゲノム編集によりNNSが持つ変異を導入し、KhES-1由来のアイソジェニックペアを作製。
- ▶ NNS患者由来iPS細胞をゲノム編集によりNNSが持つ変異を修復し、患者iPS由来のアイソジェニックペアを作製。
- ▶ 上記4クローンを分化・株化しPSC-MLsを作製。

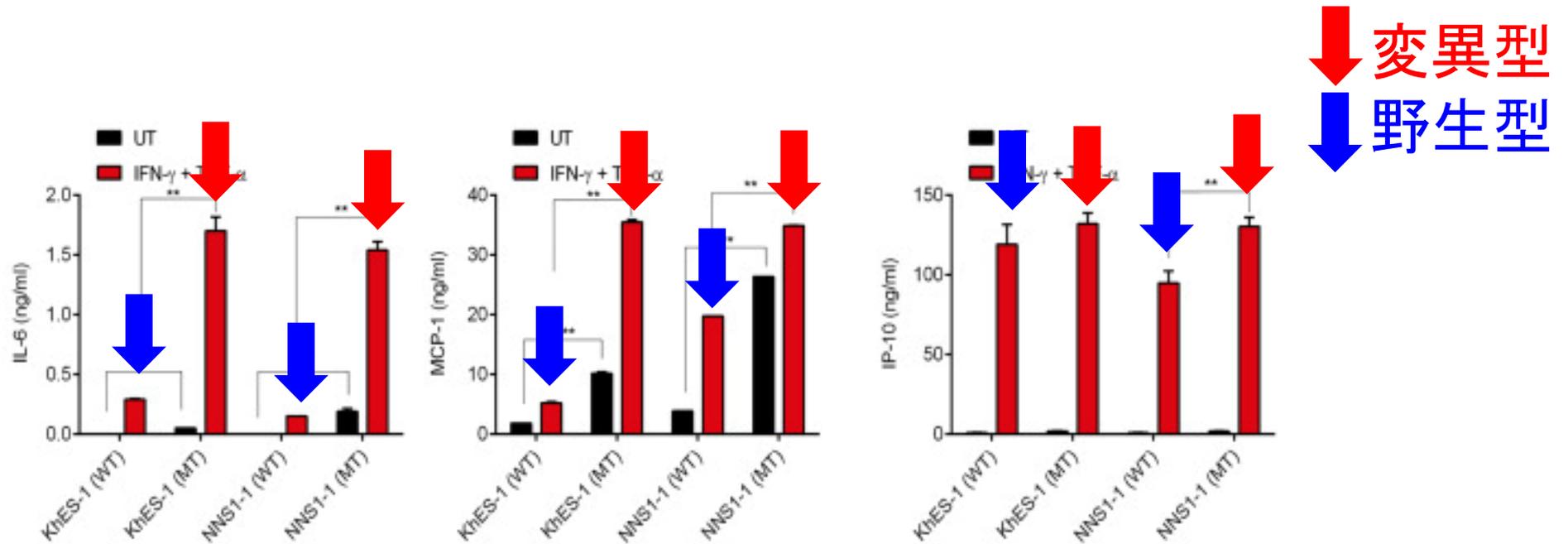


WT:野生型
MT:変異型



遺伝的背景に影響されることなく、NNS患者の変異が及ぼす表現型の変化に言及することが可能になった。

変異型PSC-MLsは NNSに特徴的な炎症性サイトカイン/ケモカインの 過剰産生を示した

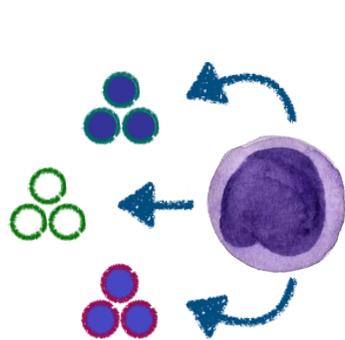


変異型PSC-MLsは過剰なMCP-1, IP-10, IL-6の産生を認めた。

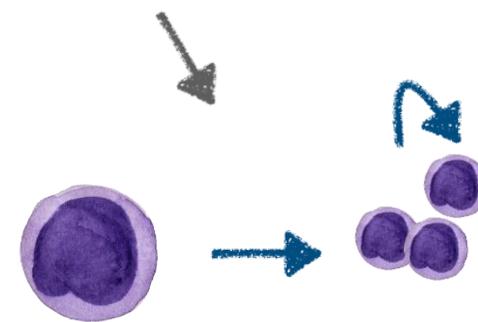
PSC-MLsは、大規模な網羅的化合物評価を可能にする

- PSCs由来細胞を用いたハイスループットスクリーニング (HTS) -

- ▶ HTSは、大規模の化合物を網羅的に評価する創薬手法。
- ▶ 近年、PSCs由来細胞を用いたHTSがヒット化合物の特定に成功している。
Ex.) 進行性骨化性線維異形成症 Hino *et al.* *J Clin Invest* (2017), 筋萎縮性側索硬化症 Imamura *et al.* *Sci Transl Med* (2017)
- ▶ しかし、PSCs由来細胞を用いたHTSには、安定した疾患表現型を有し、且つ大量の細胞数の確保が課題である。



MCP-1, IP-10, IL-6の過剰産生



株化による細胞増殖能の獲得

PSC-MLsは、NNSに対するHTSへ応用可能である。

PSC-MLsを用いたHTSによる候補化合物の探索

- HTSの実験方法 -

▶ 使用細胞

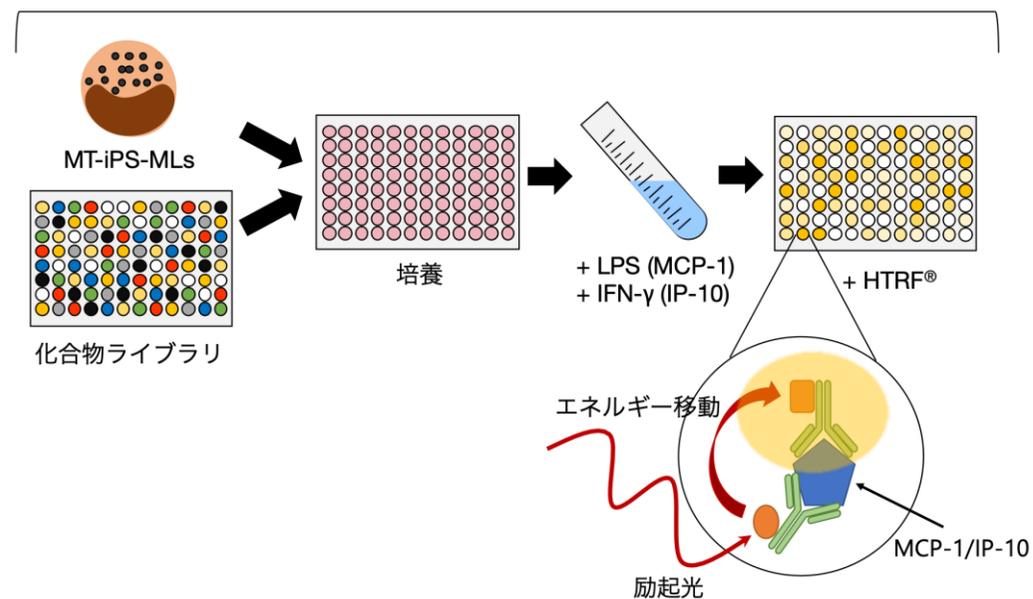
- 変異型PSC-MLs (MT-iPS/ES-MLs)

▶ 化合物ライブラリ

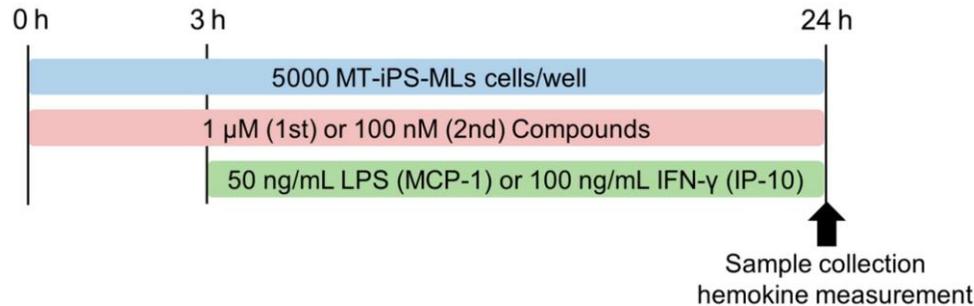
- FDA承認薬を含むキナーゼ阻害剤や生理活性がある化合物5,821種

▶ 評価方法

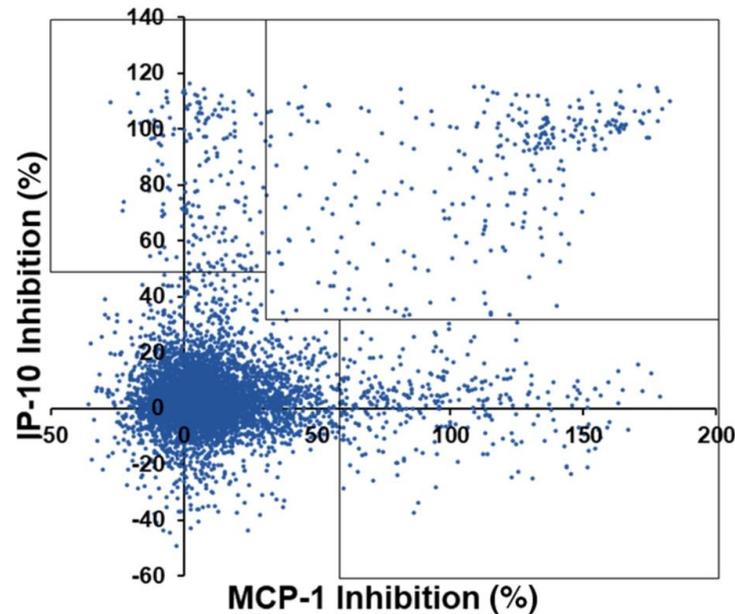
- MCP-1及びIP-10の産生阻害率により化合物を評価
- MCP-1及びIP-10の定量は、ホモジニアス時間分解蛍光法(HTRF[®])による簡便な定量方法を採用。



1次スクリーニングにより、626化合物を特定した

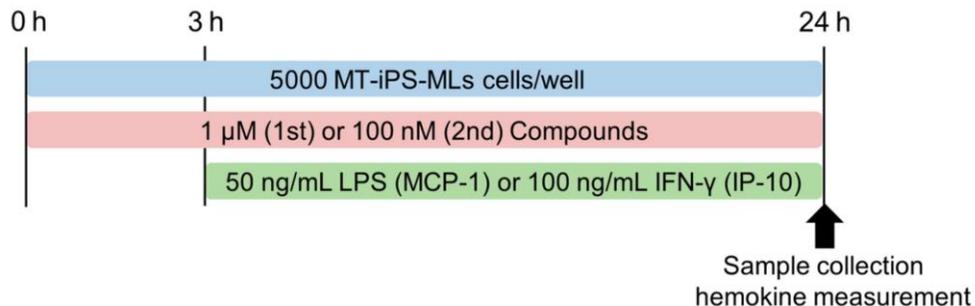


- ▶ 化合物濃度1 μ M
- ▶ 5000細胞/wellのMT-iPS-MLs
- ▶ MCP-1に対してLPS, IP-10に対してIFN- γ の刺激により産生されたMCP-1, IP-10の濃度を定量

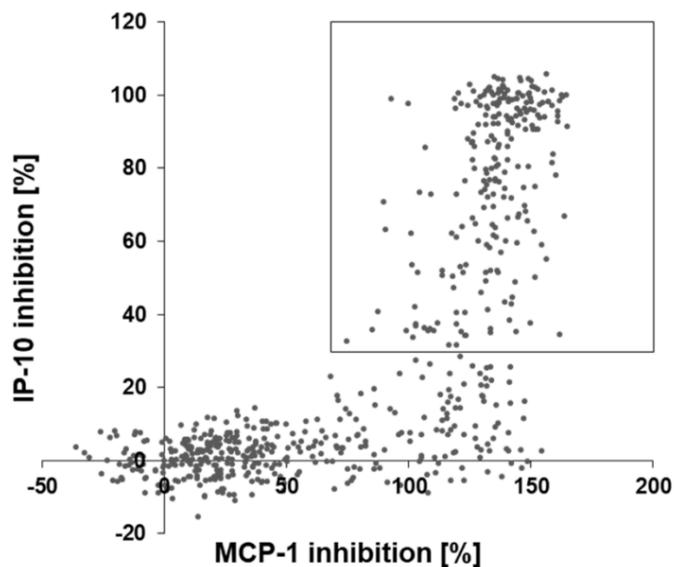


- ▶ MCP-1阻害率60%以上
- ▶ IP-10阻害率50%以上
- ▶ MCP-1阻害率30%以上且つIP-10阻害率30%以上より626化合物をヒット化合物とした。

1次スクリーニングの再現性を確認し 108化合物を特定した

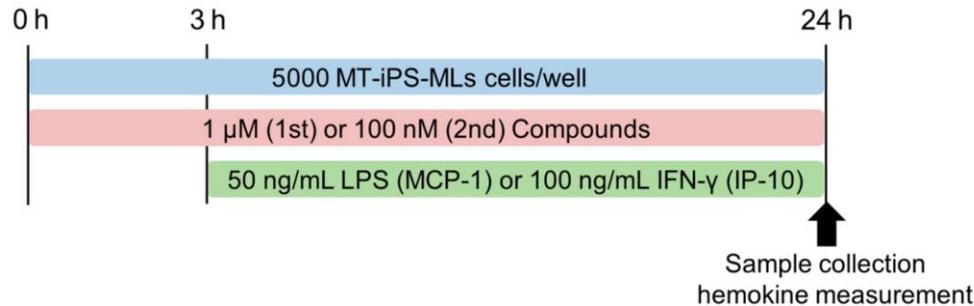


- ▶ 化合物濃度1 μ M
- ▶ 5000細胞/wellのMT-iPS-MLs
- ▶ MCP-1に対してLPS, IP-10に対してIFN- γ の刺激により産生されたMCP-1, IP-10の濃度を定量

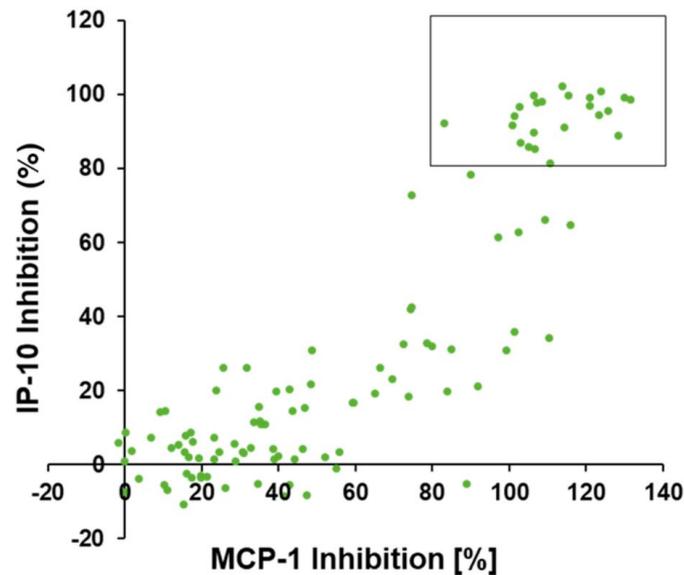


- ▶ MCP-1阻害率70%以上且つIP-10阻害率30%以上より108化合物をヒット化合物とした。

2次スクリーニングにより、26化合物を特定した

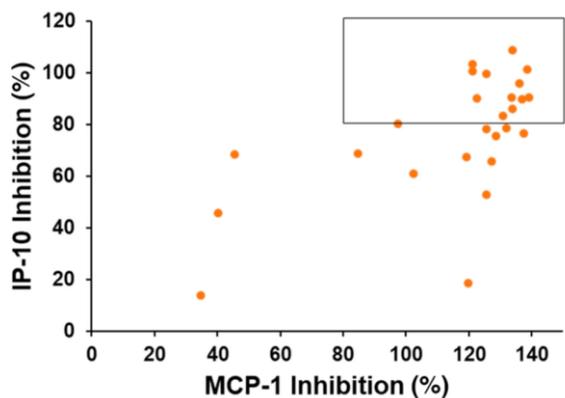


- ▶ 化合物濃度100 nM
- ▶ 5000細胞/wellのMT-iPS-MLs
- ▶ MCP-1に対してLPS, IP-10に対してIFN- γ の刺激により産生されたMCP-1, IP-10の濃度を定量

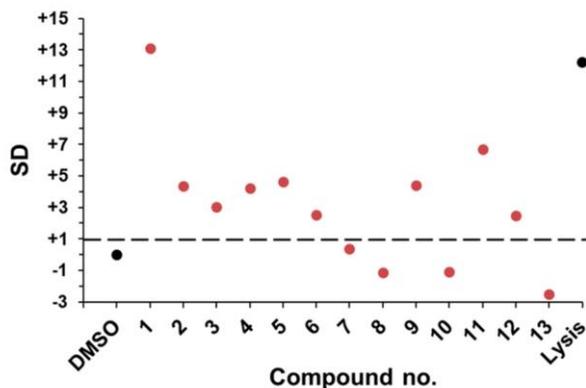


- ▶ MCP-1阻害率80%以上且つIP-10阻害率80%以上より26化合物をヒット化合物とした。

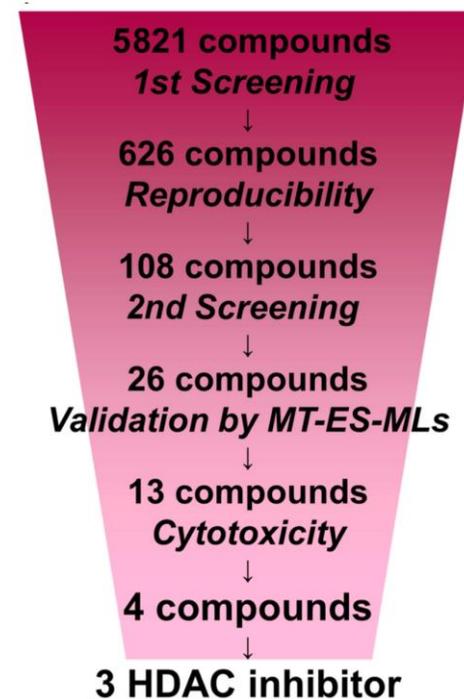
再現性の確認と細胞傷害性の評価により 3種のHDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)阻害剤を特定した



ES-MT-MLsにより評価をし、効果の再現性を確認した。

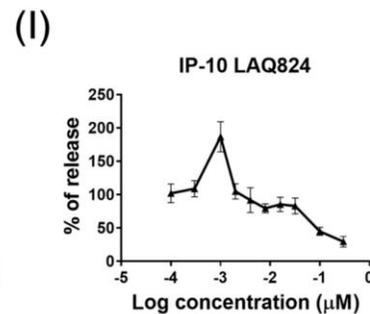
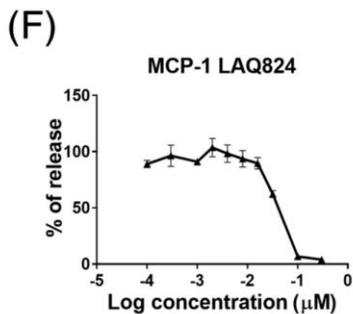
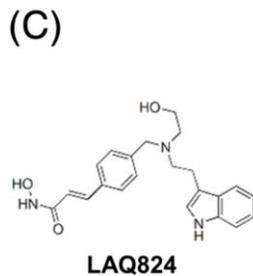
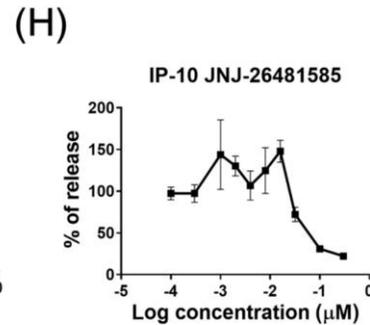
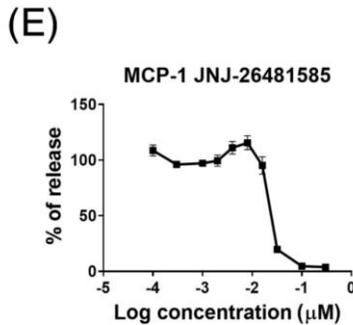
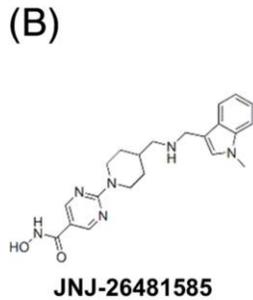
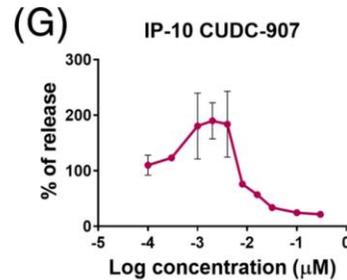
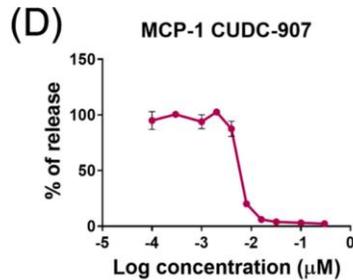
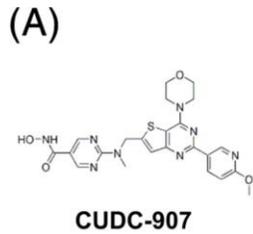


化合物の細胞傷害性を確認した。



HTSにより、3種のHDACを特定することができた。

CUDC-907は、より効果的なMCP-1, IP-10産生抑制効果を示した



Compound	MCP-1 (nM)	IP-10 (nM)
CUDC-907	6.0	21.7
JNJ-26481585	25.7	73.6
LAQ824	38.6	101.9

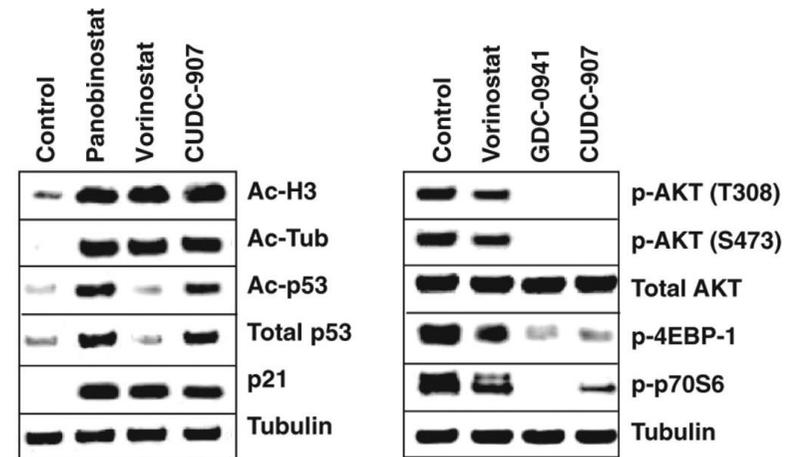
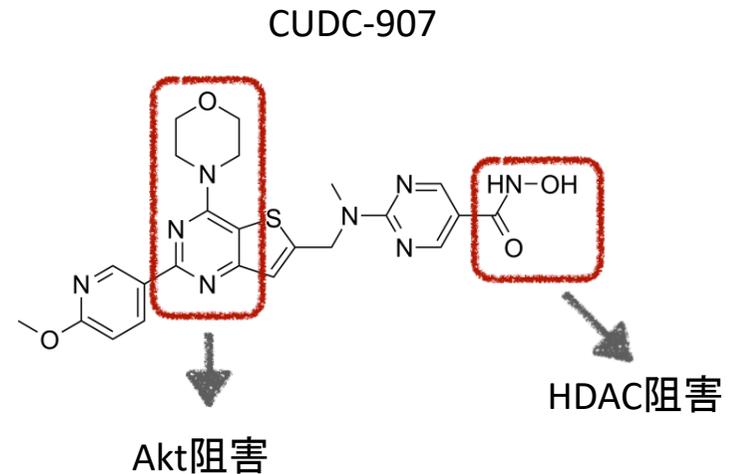


→ CUDC-907は、他2種のHDAC阻害剤に比べより効果的なMCP-1, IP-10産生抑制効果を示した。

CUDC-907は HDACとAktの両阻害剤として抗腫瘍活性が確認されている

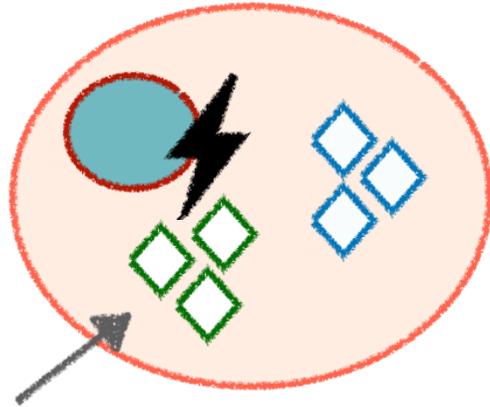
- CUDC-907 (Fimepinostat) -

- ▶ Akt及びHDACの両阻害活性を持った化合物。
- ▶ リンパ腫や骨髄腫などへの抗腫瘍活性が期待されている。
- ▶ 多発性リンパ腫及び多発性骨髄腫に対する第2相試験まで進んでおり、良好な忍容性を示した。
- ▶ CUDC-907を炎症性疾患の治療薬として検討した報告はない。



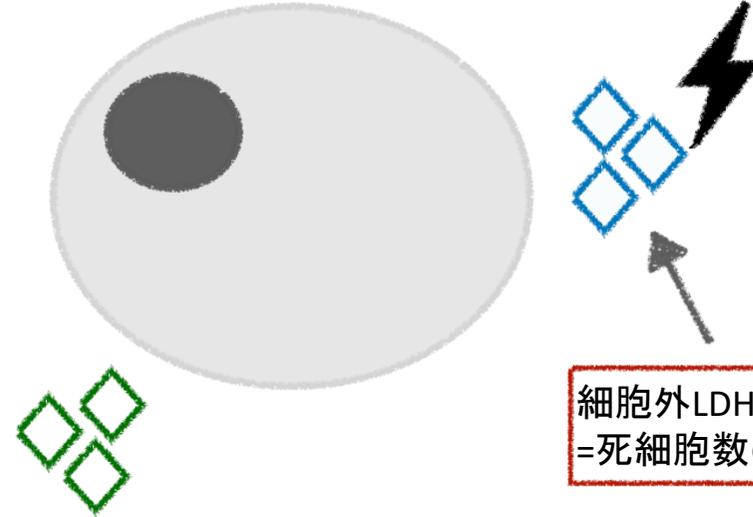
Qian C et al. Clin Cancer Res. (2012)

CUDC-907は 短期間培養において細胞傷害性を示さなかった



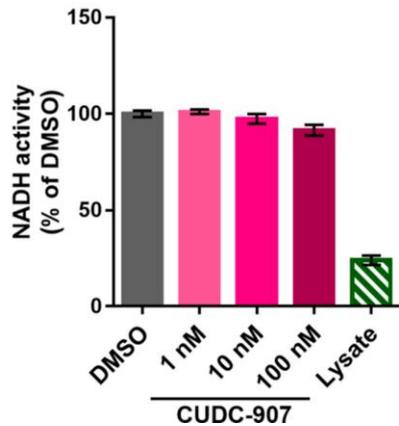
細胞内NADH活性を定量。
=生細胞数の定量

細胞死
→

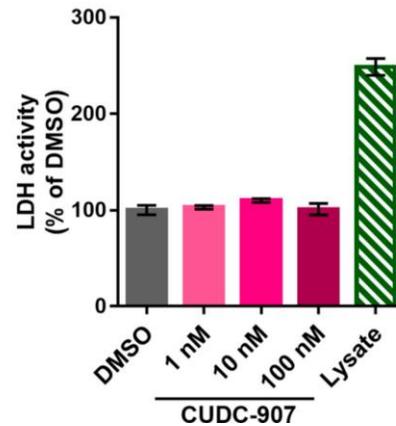


細胞外LDH活性を定量。
=死細胞数の定量

(J)



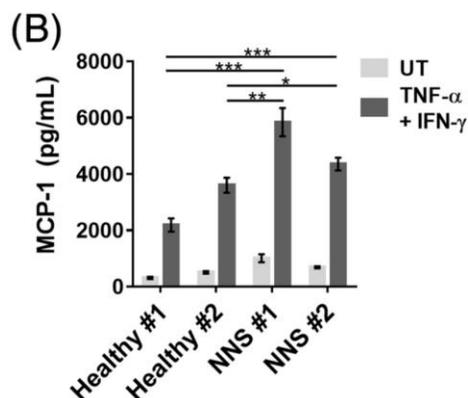
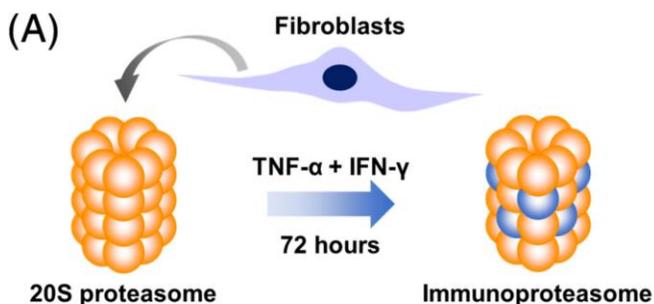
(K)



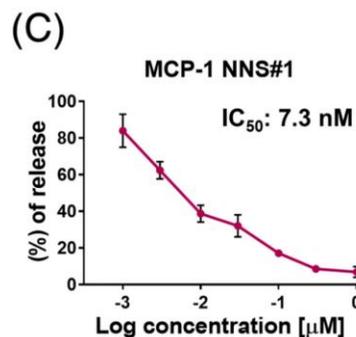
CUDC-907の短期間処理は、iPS-MT-MLsに対して
顕著な細胞傷害性を示さなかった。

CUDC-907は

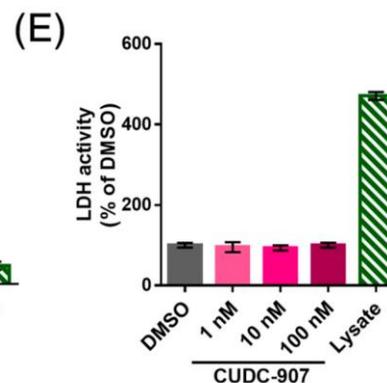
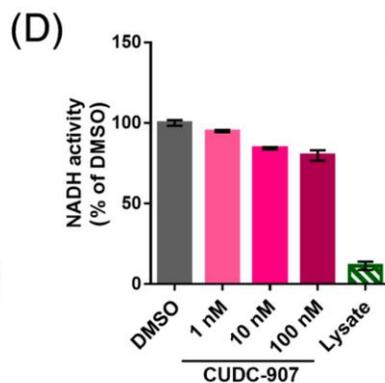
患者由来の線維芽細胞においても効果的に作用した



患者由来線維芽細胞は、健常人由来に比べて過剰なMCP-1産生を示した。



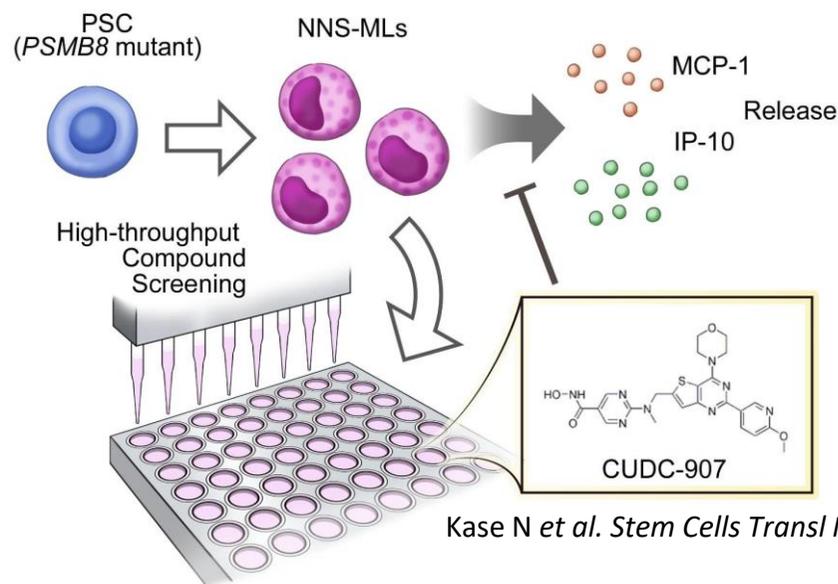
CUDC-907は、患者由来線維芽細胞に対して効果的にMCP-1の産生を抑制した。



CUDC-907の短期間処理は、患者由来線維芽細胞に対して顕著な細胞傷害性を示さなかった。

まとめ

- ▶ 変異型PSC-MLsを用い、HTSによる網羅的化合物評価を行った。
- ▶ HTSの結果、3種のHDAC阻害剤をヒット化合物として特定した。
- ▶ 3種HDAC阻害剤のうち、CUDC-907は最も効果的に作用した。
- ▶ CUDC-907は短期間処理では細胞傷害性を示さなかった。
- ▶ CUDC-907は、患者由来線維芽細胞に対しても、効果的に作用した。



Kase N et al. Stem Cells Transl Med. (2021)

従来技術とその問題点

- 中條西村症候群には、有効な特異的治療法が存在しない。
- iPS細胞を用いた表現型スクリーニングには多大な労力と費用が掛かる。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来特異的な治療法の存在しなかった、中條西村症候群の治療薬候補化合物を同定することに成功した。
- iPS細胞由来単球株を用いたHTSの構築により、細胞培養に係る費用と期間が低減され、スクリーニングのコストが大幅に削減されることが期待される。

想定される用途

- 同定された化合物をもとに、動物モデルや他の細胞種で評価を行うことで、新規治療薬の開発や、本疾患の病態解析に貢献できると考えられる。
- iPS細胞由来単球株を用いたHTSは、他のマクロファージ異常症の化合物スクリーニングにも応用が可能である。

実用化に向けた課題

- 同定化合物の動物モデル等での評価や、より効率の高い化合物を狙った合成展開を行う必要がある。
- iPS細胞由来単球株では評価できない表現型もある。

企業への期待

- iPS細胞由来単球株を用いた創薬が期待される疾患を標的に開発している企業や、試してみたい化合物がある企業と共同研究できればうれしいです。

※単球株化の特許は熊本大学が所持しており、別途契約が必要です。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 中條・西村症候群の治療剤
- 出願番号 : PCT/JP2021/017367
- 出願人 : 国立大学法人京都大学
- 発明者 : 齋藤 潤、加瀬 直也

お問い合わせ先

iPSアカデミアジャパン株式会社
ライセンス部 藤城 修平

TEL 075-754-0625

FAX 075-761-3577

e-mail license@ips-ac.co.jp