

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

ライソゾーム病の iPS 細胞の作成と病態、治療への応用に関する研究

研究代表者：衛藤 義勝（東京慈恵会医科大学）

研究要旨

ライソゾーム病、特にヒトファブリ病、ポンペ病、ゴーシェ病患者皮膚繊維芽細胞よりレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いて山中 3 因子或いは 4 因子を導入し、iPS 細胞を作成し、生化学的並びに電顕による超微形態分析並びにポンペ病に対する酵素補充療法による病態解析を行った。

共同研究者：

樋口 孝¹⁾、河越しほ²⁾、小林博司^{1,3)}、井田博幸³⁾、大橋十也^{1,3)}

研究協力者：

高村歩美⁴⁾、藤崎美和⁴⁾、大樂武範⁴⁾、岩本武夫⁵⁾

1. 東京慈恵会医科大学遺伝子治療部
2. 東京慈恵会医科大学皮膚科学講座
3. 東京慈恵会医科大学小児科学講座
4. 財団法人脳神経疾患研究所先端医療研究センター
5. 東京慈恵会医科大学共用研究施設

A) センダイウイルス或いはレトロウイルスベクターを用いたヒトポンペ病、ゴーシェ病、ファブリ病由来 iPS 様細胞の樹立

Generation of iPS like cells from human Pompe, Gaucher, Fabry disease, using Sendai virus or retrovirus vectors.

【目的】ライソゾーム病の内ヒトポンペ病、ゴーシェ病、ファブリ病の患者皮膚繊維芽細胞を用いて山中 3 又は 4 因子をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターに組み込み高橋、或いは西村らの方法に従い各々 iPS 細胞を作成、これらの iPS 細胞が ES 細胞の 15 因子を発現し且つ iPS 細胞に SASP など特有の発現を認め、iPS 細胞を確認し又各疾患特有の性質、酵素欠損、蓄積物質が確認されている。

センダイウイルスはゲノムに組み込まれず理論的に遺伝的毒性がないため感染細胞内で初期化因子を安定的に発現させる事が出来るという特徴を持つ。そのため、レトロウイルスベクターを用いて作成した iPS 細胞と比べてセンダイウイルスベクターでは高品質の iPS 細胞を作成でき、iPS 様細胞を心筋細胞に分化誘導させ、ファブリ病心筋細胞の病態解析を更に進めていく。

B) ゴーシェ病及びポンペ病患者皮膚細胞由来 iPS 様細胞の樹立

Patients-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Lysosomal Storage Diseases

【目的】ゴーシェ並びにポンペ病はライソゾームの代表的疾患であり、細胞内にグルコセレブロシド或いはグリコーゲンが大量に蓄積する。細胞内でのこれら蓄積物質の蓄積による病態の機序並びに治療の効果を検討するために iPS 細胞は患者皮膚細胞などの体細胞を初期化することによって樹立できる iPS 細胞は、遺伝的背景が同じ幹細胞を樹立できる。これまでに当講座では各種のライソゾーム病モデルマウス由来 iPS 細胞を樹立し、そのライソゾーム病の病態解析を行ってきた。我々は今回ヒトライソゾーム病、特にポンペ病とゴーシェ病の病態解析並びに治療効果の解

析を目指し患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞 iPS をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いての iPS 細胞樹立を試みた。

【方法】ヒト初期化因子 (*SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4*, *c-MYC*) を組み込んだ pMXs レトロウイルスベクターを皮膚細胞に感染させることによって iPS 様細胞を樹立した。又ポンペ病患者皮膚線維芽細胞からはセンダイウイルスベクターを用いて西村らの方法に従い作成した。iPS 様細胞は透過型電子顕微鏡 (TEM) をもちいて細胞の内部構造を解析した。

【結果】ゴーシェ病では II 型 (神経型) の iPS 様細胞は樹立できたが、I 型 (非神経型) の iPS 様細胞は作成出来なかった。ポンペ病では乳児型 (心臓型) も遅発型 (筋肉型) も iPS 様細胞が樹立した。ポンペ病 iPS 細胞ではマイオザイムを 10-1000ug/ml medium の濃度で加え細胞内ライソゾームに蓄積している封入体の減少程度を電子顕微鏡下で観察した。電顕上は乳児型ポンペ病で遅発型に比較してかなり多く蓄積し、マイオザイム 1000ug/ml をメジウム内に投与して完全に蓄積物質の消失が見られた。ゴーシェ病 II 型 iPS 様細胞の細胞質には大きな空胞が確認でき又蓄積物質であるサイコシンが tandem MS で正常の 5 倍程度増加していた。

【考察】ゴーシェ病 II 型の iPS 様細胞は、幹細胞の段階から多量の脂質の蓄積物が電顕上細胞質内に蓄積していた。又ゴーシェ病 iPS 細胞からの神経細胞への分化効率を対象と比較して効率が悪く、セルソーターによる分離でも病的細胞での分化効率の低さを示し、蓄積物の影響と考えられた。又ポンペ病 iPS 細胞への酵素補充療法はマイオザイムの酵素量が多ければ完全に細胞を正常化できることを証明した。

【研究発表】

1. 原著論文

1) Takamura A, Sakai N, Shinpoo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S,

Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y. : The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. *Mol Genet Metab.* 2013 Nov;110(3):401-4. Epub 2013 Aug 17.

2) Takenori D, Takeo I, Minami M, Masahiro E, Toya O, Yoshikatu E. : A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab.* Available online 16 November 2013

3) Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab.* 2013 Aug;109(4):386-9.

4) Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood.* 2013;121(16):3267-73.

5) Y. Sato, M. Fujiwara, H. Kobayashi, H. Ida: Massive Accumulation of Glycosaminoglycans in the Aortic Valve of a Patient With Hunter Syndrome During Enzyme Replacement Therapy. *Pediatric Cardiology* 2013;DOI10.1007/s00246-013-0653-0

6) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. *Mol Genet Metab.* 2013 in press

7) J. Ito, T. Saito, C. Numakura, A. Iwaba, S.

Sugahara, R. Ishii, C. Sato, H. Haga, K. Okumoto, Y. Nishise, H. Watanabe, H. Ida, K. Hayasaka, H. Togashi, S. Kawata, Y. Ueno: A Case of Adult Type1 Gaucher Disease Complicated by Temporal Intestinal Hemorrhage. Case Rep Gastroenterol 2013;7:340-346

2. 和論文・総説・書籍

- 1) 衛藤義勝：ライソゾーム病最近の進歩，内分泌・糖尿病・代謝内科 502-511，科学評論社，2013.

【学会発表】

- 1) M Fujisaki, J Matsumoto, A Takamura, T Higuchi, M Furujo, S Kawagoe, H Kobayashi, H Ida, Y Shimada, T Ohashi, T Dairaku, Y Eto Enzymatic Diagnosis of Maroteaux-Lamy disease (MP) in dried Blood Spots on Filter Paper
The 54th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Gifu, Japan, 2012 November 15th – 17th
- 2) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening in dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS I A) in Japanese, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, 2013 September 3rd – 6th
- 3) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto :
Enzymatic screening using dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) in Japanese The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Chiba, Japan, 2013 November 27th – 29th
- 4) Ayumi Takamura, Miwa Fujisaki, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi, Yoshikatsu Eto Abnormal Intracellular Membrane Traffic in Juvenile Neural Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Mutated Cases. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) and the 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), November 27-29, 2013, Chiba, Japan
- 5) 高村歩美, 藤崎美和, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝 PPT1 遺伝子変異による若年型神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年
- 6) Ayumi Takamura, Norio Sakai, Michiko Shinpo, Masanari Yamamoto, Aya Narita, Kosaku Ohno, Toya Ohashi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto. : The Useful Preliminary Diagnosis of Niemann-Pick Disease type C by Filipin Test in Blood Smear 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIM), September 3-6, 2013, Barcelona, Spain
- 7) 高村歩美, 酒井規夫, 新寶理子, 山本真也, 成田綾, 大野耕作, 井田博幸, 衛藤義勝 The useful preliminary diagnostic procedure of Niemann-Pick disease type C - Filipin test in blood smear - ニーマン・ピック病 C 型シンポジウム - 診断と治療 -, 2013 年 4 月 27 日, 東京
- 8) 高村歩美, 衛藤義勝, 藤崎美和, 若林太一, 井田博幸, 萩野谷和裕, 山本真也, 成田綾, 大野耕作 若年型ニーマン・ピック病 C 型 (NPC1) 3 例に対する Miglustat の治療効果. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会, 2012 年 11 月

15-17 日, 岐阜

- 9) 衛藤義勝：ファブリ病の最近の進歩、ファブリ病患者会、大阪 2013, 2,18
- 10) 衛藤義勝、Niemann-Pick C 病の診断、治療に関して、NPC 病シンポジウム、東京、2013.4.27
- 11) 衛藤義勝：ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 日本小児科学会講演, 広島 2013. 4.18
- 12) 衛藤義勝：Immunity of inborn error of metabolism, Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, 2013.5.10
- 13) 衛藤義勝：ニーマン・ピック C 病の診断と治療に関して、第 55 回日本小児神経学会 大分 2013.5.31
- 14) 衛藤義勝：Applications of iPS Cell Technology for the Pathogenesis and Possible Treatment of LSD、International Fabry disease symposium, Hong Kong, June 6, 2013
- 15) 衛藤義勝：ファブリ病最新の進歩、ファブリ病研究会、札幌, 2013.10.5
- 16) 衛藤義勝；先天性ムコ多糖症の進歩、久留米小児科医会、2013.10.11
- 17) 衛藤義勝：ゴーシェ病最近の進歩、中国小児内分泌代謝学会アモイ市、福建省 2013.10.23-24
- 18) 衛藤義勝：Lysosomal acid lipase deficiency, アジア小児肝臓消化器学会一ツ橋会館, 東京, 2013.11.1
- 19) 衛藤義勝：ファブリ病 UpDate, 東北ファブリ病患者会 仙台, 2013.11.3
- 20) 衛藤義勝、Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage disease, Korean Human Genetic Seminar, Seoul, 韓国, 2013, 11,14-16
- 21) 衛藤義勝：New Strategies of the Treatment of Lysosomal Storage disease, 13th Asia LSD symposium, Nov.26, 2013
- 22) 衛藤義勝：Future of clinical and research

prospects in inborn error of metabolism, 第 3 回アジア先天代謝学会、舞浜、東京、2013.11.27-29

【知的財産権の出願・登録状況】

特になし。