

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

心筋細胞治療を目指したポンペ病 iPS 細胞に対する遺伝子治療

分担研究者：大橋十也（東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター遺伝子治療研究部）

研究要旨

われわれは遅発型ポンペ病 iPS 細胞を用いて、ポンペ病の心合併症の発症メカニズムの検討を行った。心筋細胞に分化誘導を行ったところ、明らかなサルコメアの異常は見られなかったが、細胞質にはライソゾームの腫大とグリコーゲンの蓄積が見られ、遅発型ポンペ病での心合併症のメカニズムの一部を解明した。

研究協力者氏名：

佐藤 洋平（東京慈恵会科大学遺伝子治療研究部
大学院生）

A . 研究目的

ポンペ病はグリコーゲンの加水分解酵素の欠損により、ライソゾームにグリコーゲンが蓄積する常染色体劣性遺伝のライソゾーム病である。進行性の筋力低下、呼吸不全、肥大型心筋症などの臨床症状を呈するが、症状の出現時期によって乳児型と遅発型の2つの臨床型に大別される。

2007年より本邦でも酵素補充療法が開始されたが、酵素補充療法への反応に関しては個人差があり、新規治療法の開発が急務となっている。

なぜグリコーゲンの蓄積が細胞機能不全を起こすのかは依然として不明である。新規治療法の開発を行う上で、ポンペ病の病態に関するメカニズムの解明が必要と考えられる。そのため、心筋や骨格筋などの標的臓器での病態を正確に反映する *in vitro* モデルの開発が期待されている。

2011年に台湾の研究グループによって乳児型ポンペ病患者から iPS 細胞が樹立され、心筋様細胞に分化させたという報告がなされた。

われわれは日本人の遅発型ポンペ病患者より樹立した iPS 細胞を用いて *in vitro* でポンペ病の病態再現をすることを目的に研究をしている。また、レンチウイルスベクターにより欠損酵素である GAA を発現させることで、遺伝子修復した iPS 細胞を作成し、治療効果の検討や病態の解明を目指して研究を行った。

B . 研究方法

熊本大学発生医学研究所で樹立された遅発型ポンペ病 iPS 細胞3クローン（HPS0175, 0176, 0177）の提供を受ける。iPS 細胞としての品質を検証するため、免疫蛍光染色（SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-80）や未分化マーカー（Oct, Sox, Nanog）などの iPS 細胞に特徴的な分子マーカーの発現を確認する。

また、疾患特異的 iPS 細胞の研究において特に注意すべきである“クローン間での表現型の差”に関しては、iPS 細胞を電子顕微鏡で観

察することでグリコーゲンの蓄積などの病理学的特徴に関して評価を行い、検証する。

心筋細胞の分化誘導に関しては、従来用いられてきた胚葉体を經由して分化誘導する方法は、効率が低く、未熟型の心筋細胞しか誘導できないことが問題とされていた。近年注目されている Wnt 阻害薬を使用したプロトコルを用いて、Robust な分化誘導を行い、効率よく、成熟型の心筋細胞の誘導を試みる。

また、欠損遺伝子の GAA を発現するような第 3 世代レンチウイルスベクターをクローニングする。また、蛍光蛋白である Venus を発現するベクターを同時に作成する。HEK293A 細胞や健康人由来 iPS 細胞に感染させて、GAA の酵素活性および Venus の陽性率を測定することで、遺伝子の導入効率と治療効果の最適化を行う。

最終的に、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子修復を行ったポンペ病 iPS 細胞を作成する。さらに、遺伝子修復した iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導することで、治療効果に関して生化学的・病理学的に判定する。

C . 研究結果

ポンペ病iPS細胞のcharacterizationに関しては、いずれのクローンにおいてもALPだけでなく、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81などの未分化マーカーが陽性であることから、iPS細胞であることが確認された。

電子顕微鏡でiPS細胞を観察したところ、いずれの細胞もライソゾームにグリコーゲンの蓄積が確認された。しかし、明らかなクローン間での表現型の違いは見られなかった。

ポンペ病iPS細胞から分化誘導した心筋細胞にはグリコーゲンの蓄積やライソゾームの腫大などのポンペ病に特徴的な病理学的変化が観察

された。アクチンやミオシンなどのサルコメアレベルでの明らかな構造異常は認められなかった。

レンチウイルスベクターをHEK293A細胞、ならびに健康人由来iPS細胞に感染させたところ、容量依存性にGAAおよびVenusが発現することが確認された。

現在、ポンペ病iPS細胞に対しても同様のプロトコルで遺伝子導入を行うことを予定している。ポンペ病iPS細胞においてGAAの発現が確認できた場合には、心筋細胞に分化させることで治療効果の検討を行う予定となっている。

(倫理面への配慮)

東京慈恵会医科大学倫理委員会から承認を得ている

D . 考察

本研究に使用した遅発型ポンペ病 iPS 細胞は未分化マーカー陽性であり、iPS 細胞としての性質を持っていることが確認された。

疾患特異的 iPS 細胞の研究においては、クローン間での表現型の違いがしばしば問題になることがあるが、本研究で使用した iPS 細胞に関しては、3 クローンのうち明らかな表現型の違いは見られなかった。

すでに乳児型ポンペ病では、iPS 細胞から心筋細胞に分化させた場合に、グリコーゲンの蓄積やライソゾームの腫大が見られると報告されている。遅発型ポンペ病でも乳児型に比較してより軽症ではあることが多いが、一部の患者では心肥大などの心合併症がみられることが報告されている。

われわれは遅発型ポンペ病 iPS 細胞から心筋細胞を分化させた場合でも、同様の病理学的変化が見られることを見出した。

また、家族性肥大型心筋症の原因となる、サルコメア蛋白異常症などで見られるような、錯綜配列などのサルコメアの構造異常は見られないことから、ポンペ病の心肥大のメカニズムとして、細胞質でのライソゾームの腫大による細胞肥大が影響している可能性が示唆された。

今後研究を進めるにあたり、乳児型ポンペ病との病態比較や、骨格筋や肝細胞などの他の標的臓器の細胞への分化誘導を試みる予定となっている。

E . 結論

遅発型ポンペ病から誘導した心筋細胞でも、グリコーゲンの蓄積とライソゾームの腫大が見られた。遅発型ポンペ病で見られる心筋病変の病態再現に成功し、メカニズムの一部を解明した。

F . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Y.Sato, T Higuchi, H Kobayashi et al.
“Cardiomyocyte differentiation of Pompe disease specific iPSC following lentiviral gene therapy” The 7th TAKAO International Symposium
- 2) Y.Sato, H Kobayashi, T Higuchi et al.
“Cardiomyocyte differentiation of Pompe disease specific iPSC following lentiviral gene therapy” 3rdACIMD/55thJSIMD

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし