

はじめに

ライソゾーム病 (LD) はライソゾームに存在する水解酵素などの遺伝的欠損により様々な基質が細胞内に蓄積する疾患であり、約40種類知られている。臨床症状は欠損する酵素により様々であるが中枢神経症状を呈することが多い。またある種の疾患では新生児期に胎児水腫で発症する場合もある。現在、本邦では治療法として酵素補充療法 (ERT)、骨髄移植 (BMT) ならびに基質合成阻害療法が行われている。ERTはゴーシェ病、ファブリー病、ムコ多糖症I型、II型、VI型、ポンペ病に行われており一定の効果が認められているが中枢神経系に効果がないこと、骨症状にも効果が乏しいこと、酵素に対する中和抗体が出現したりアレルギー症状が出現したりすること、疾患によってはオートファジーの亢進により輸注された酵素がライソゾームに局在せずにオートファゴゾームにトラップされることなどの問題点もある。また生涯にわたり1~2週に1回の点滴を定期的かつ継続的に受けなければならず患者への負担も大きい。一方、BMTはERTが1990年代に行われるようになる前はゴーシェ病、ムコ多糖症、クラッペ病、異染性脳白質変性症などを中心にファーストラインの治療法として行われていた。しかしながらドナーを得るのが困難であったり、治療そのものに付随する危険性があったり、最近ではあまり行われなくなった。しかしながら骨髄の生着が認められ

ば繰り返しの治療が必要でないこと、骨髄細胞は中枢神経系にも浸潤するため中枢神経障害にも効果が期待出来ることなどによりその利点も大きい。基質合成阻害療法は現在本邦ではニーマンピックC型にのみ適応があるが今後、海外ですでに適応のあるゴーシェ病などに拡大する可能性がある。

我々は本邦における現行の主な治療法である、ERT、BMTの問題点を克服すべく遺伝子治療、細胞治療の可能性を検討すると共に現行の治療法であるERT、BMTの欠点を補う治療法の開発を、モデルマウスなどを用いて行った。

現行の治療法の欠点と克服法の開発

中枢神経障害への限定的効果

現行の治療法、特にERTは中枢神経系への効果がないことにより、脳の治療を目指して、間葉系幹細胞¹⁾や神経幹細胞²⁾に遺伝子導入する事により欠損酵素を大量発現させて、脳室内投与を新生児期にムコ多糖症VII型のモデルマウスに行った。間葉系幹細胞の移植を例にとると、移植された間葉系幹細胞は脳室より移動し脳実質内に浸潤すると共に脳の各部位での酵素活性の上昇 (Figure 1)、蓄積物質の低下 (Figure 2) を認めると共に、マウス記憶力の増強を認めた。神経幹細胞を移植した場合も同様の効果を認めた。

細胞・遺伝子治療以外の方法としてはムコ多糖症

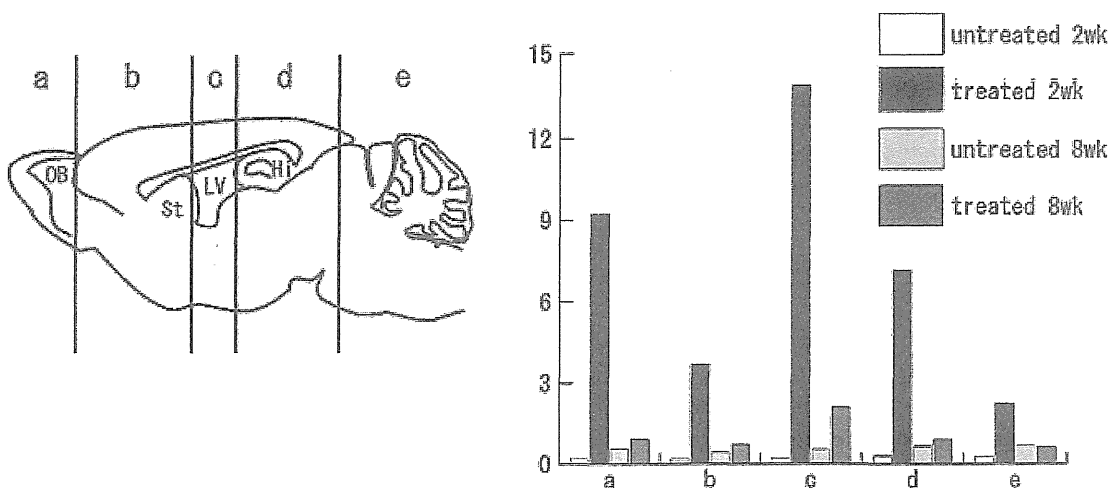


Figure 1. 1間葉系幹細胞を脳室内移植したムコ多糖症VII型マウスの脳での酵素活性

II型のモデルマウスに酵素製剤を脳室内投与した³⁾。ムコ多糖症II型マウスはワイルドタイプマウスに比較して過成長を示すが酵素の脳内投与では、その過成長を抑制はしなかった (Figure 3 A)。これは脳外への酵素の以降は非常に限定的と考えられるため理解可能な結果であった。脳をFigure 3 Bの様に3分割し酵素活性を測定すると大脳では有意な酵素活性の上昇を認めしたが、小脳では酵素活性の上昇は認めなかった (Figure 3 C)。蓄積物質であるGAGs (Glycosaminoglycans) も各部位で低下が認められ、酵素活性の有意な上昇の無かった小脳でもGAGsの低下傾向が認められた (Figure 3 D)。また脳外の組織でも肺を除き様々な組織での軽度の酵素活性の上昇を認め、これは髄液を介して酵素が全身組織へ

流出したためと考えられた (Figure 3 E)。

中和抗体の出現

ERTでは酵素製剤に対する中和抗体が出現し治療効果を阻害したりアレルギー反応が起き治療継続が困難になったりする場合がある。我々もファブリー病のERTで抗体価が非常に高い場合は、ERTによる蓄積物質の低下が阻害される事を明らかにしたが^{4, 5)} 臨床効果を阻害するか否かの結論は得られなかった。ファブリー病は酵素の欠損により腎臓、心臓などに糖脂質が蓄積し、腎障害、心障害を呈する疾患である。しかしながら最近の研究では免疫応答は治療効果も阻害する事が報告されている⁶⁾。

ポンペ病では中和抗体による臨床効果の阻害が明らかである。そこで我々はポンペ病を対象にマウスを用いて酵素製剤に対する免疫寛容療法を試みた。ポンペ病は α グルコシダーゼ (GAA) の欠損によりグリコーゲンが蓄積する疾患で心肥大、筋力低下を呈する。最初に経口免疫寛容を試みた⁷⁾。腸管には蛋白質に対して免疫寛容を誘導するメカニズムが存在する。そこでGAAを経口投与し、その後、マウスをGAAにて免疫した。するとGAAを経口投与したマウスではGAAに対する抗体価の上昇が抑制された (Figure 4)。ただ大量の酵素が必要であることが問題点であった。

もう一つのアプローチとして抗CD3抗体による免疫寛容を試みた⁸⁾。CD3抗原はT細胞受容体の一画をなしておりT細胞に発現している。マウスに抗CD3抗体を投与し、その後ERTを行ったところ、抗CD3抗体は著明に酵素製剤に対する免疫応答を抑制した (Figure 5)。また抗CD3抗体は既に成立している免疫応答に関しても有効であった (Figure 6)。CD4⁺CD25⁺T細胞を抗CD25抗体にて枯渇させると、抗CD3抗体による免疫寛容導入効果は消失し、免疫寛容導入に於いて制御性T細胞は重要であることが判明した。ヒトCD3に対する抗体は既に糖尿病、潰瘍性大腸炎、などで臨床試験が行われておりヒトへの応用も可能と考えられた。ただ、この結果はあくまでマウスに対する抗CD3抗体で有効性の免疫寛容における有効性が証明されただけであり、抗ヒトCD3抗体が同様の効果を示すかは不明である。

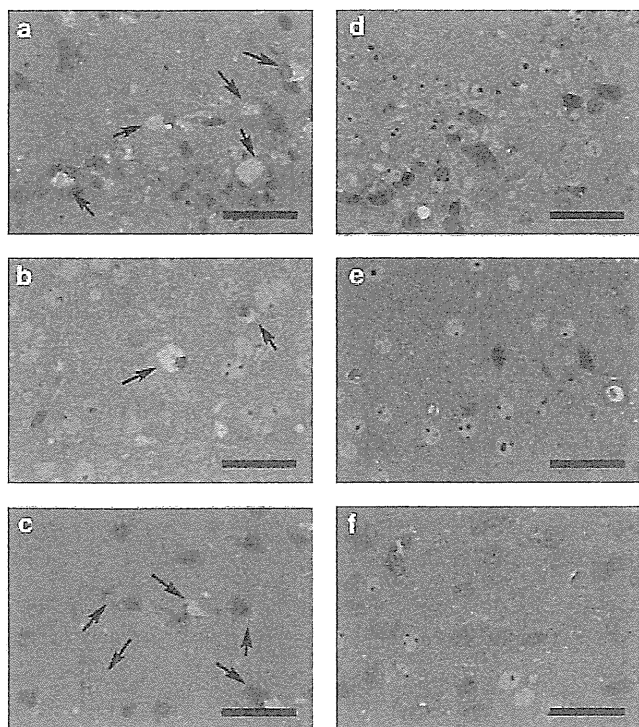


Figure 2. 間葉系幹細胞を脳室内移植したムコ多糖症VII型マウスの脳病理

間葉系幹細胞を移植したムコ多糖症VII型マウスの脳病理 (a-c) 無治療のムコ多糖症VII型マウス。 (d-f) 間葉系幹細胞を移植したムコ多糖症VII型マウス。 (a and d) 嗅球, (b and e) 線条体, (c and f) 大脳皮質。 矢印: 蓄積物質を認める細胞

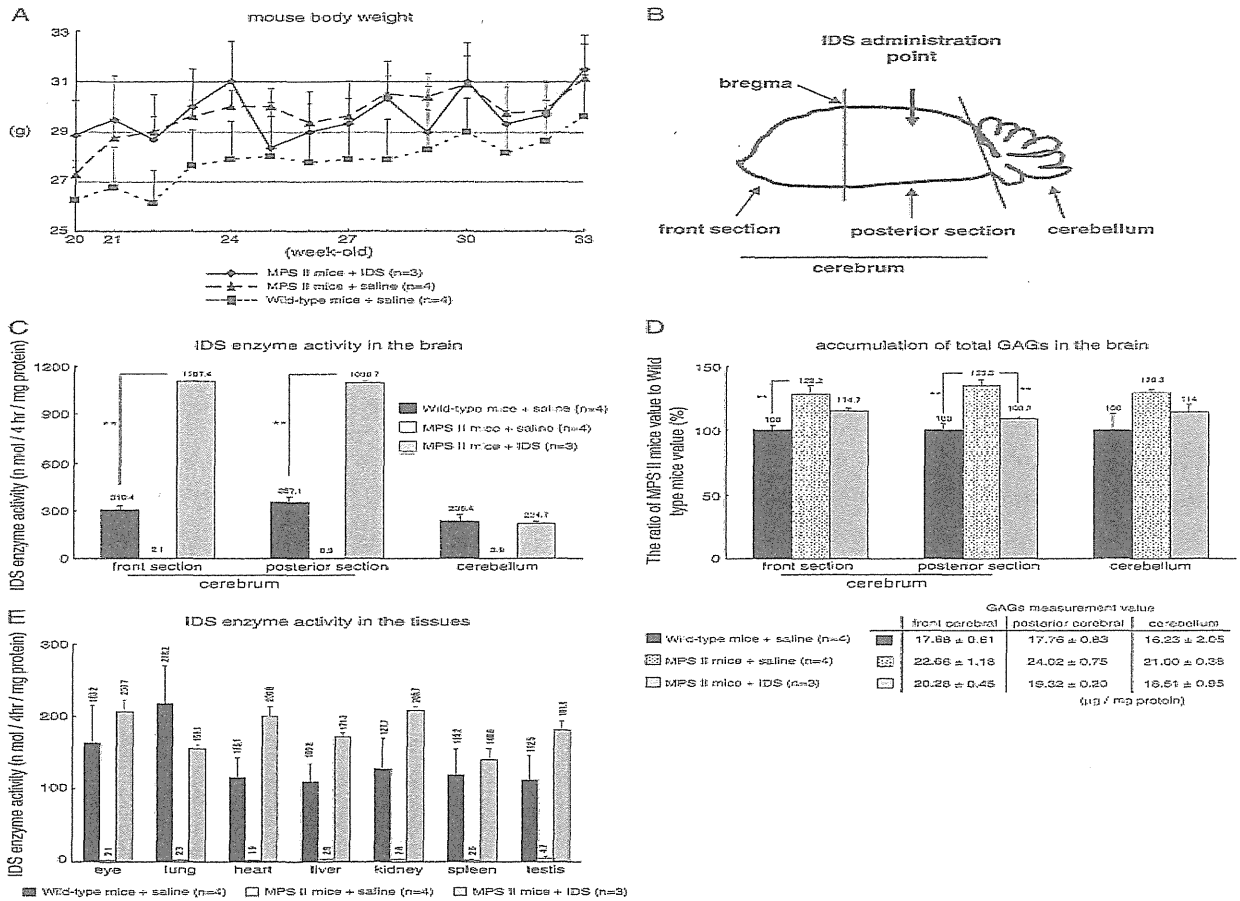


Figure 3. 酵素の脳室内投与によるムコ多糖症Ⅱ型の脳病変への治療

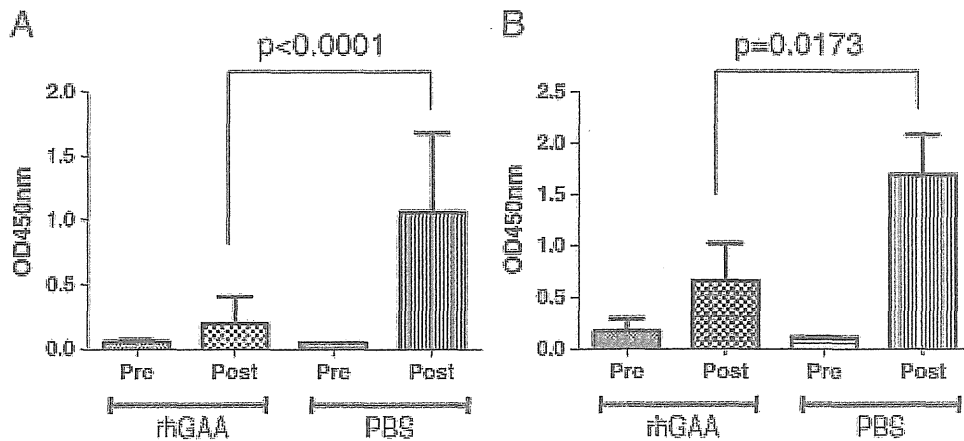


Figure 4. GAAの経口投与によるGAAへの免疫寛容導入

経口免疫寛容

BALB/cマウス(A)C57BL/6マウス(B)にrhGAA (recombinant human GAA) もしくはPBSを経口投与後、rhGAAで免疫。その後rhGAAに対する抗体価を測定した。rhGAAを投与した群では抗体価の上昇が少ない。

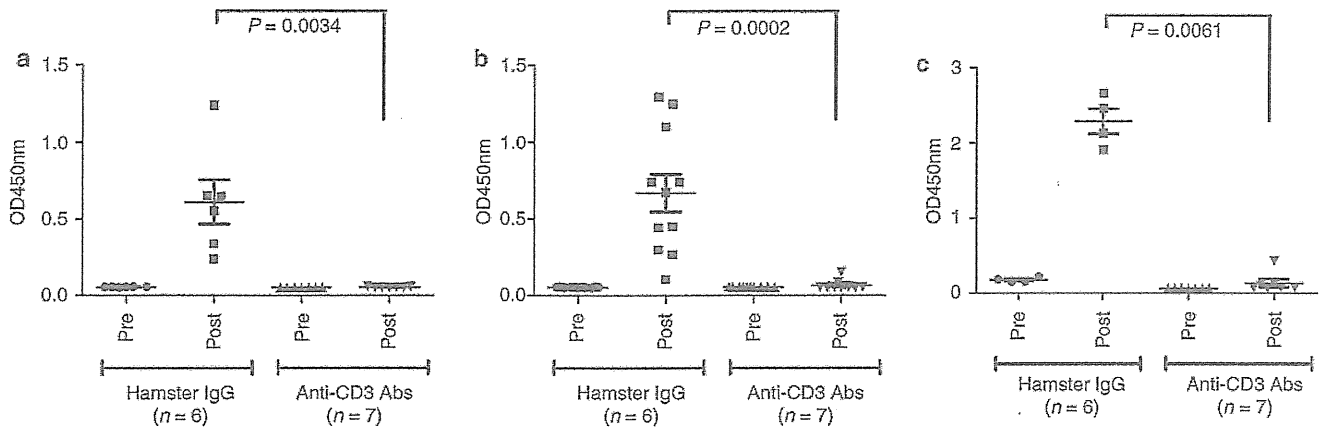


Figure 5. 抗CD3抗体前投与によるGAAへの免疫寛容導入

BALB/cマウス (a) C57BL/6マウス (b) に抗CD3抗体またはコントロールとしてHamster IgGを投与しその後4回rhGAAを投与してマウスを免疫した。その後、抗rhGAA抗体を測定した。抗CD3抗体を投与したグループでは有意に抗体の産生が抑制された。11週後にBALB/cは再度rhGAAで4回免疫したところやはり抗CD3抗体投与群ではrhGAAに対する抗体の発生が抑制された (C)。

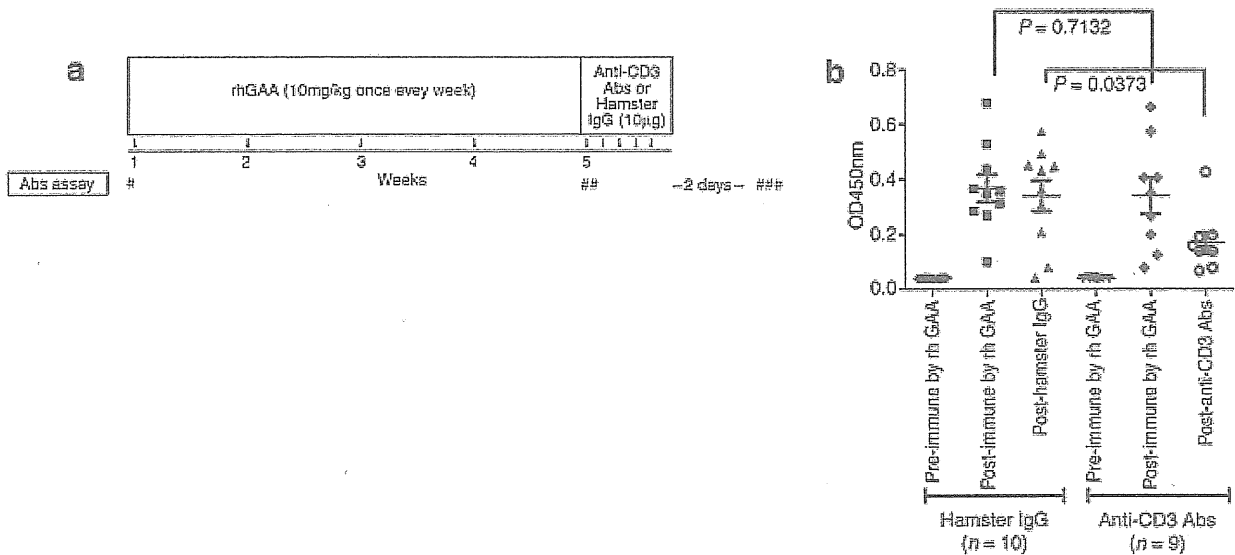


Figure 6. 既に成立しているGAAに対する抗CD3抗体の効果

実験スケジュールをaに記載する。BALB/cマウスにrhGAAを週に1回合計4回投与しその1週後より連日5日間抗CD3抗体またはコントロールとしてHamster IgGを投与した。その2日後にrhGAAに対する抗体を測定した (b)。rhGAAを投与すると両群でrhGAAに対する抗体は同等に上昇し (Post-immune by rhGAA aで##) 抗CD3抗体を投与することにより抗体価は下降した (post-anti-CD3 aで###)。

ドナーの不在 (遺伝子治療法の開発)

BMTではドナーがないことが問題であるが遺伝子治療法はドナーを必要としないため、BMTの欠点を克服できる可能性がある。我々は新生児ポンペ病モデルマウスに組換えレンチウイルスベクターを経静脈的に投与して心臓、で著明な長期間にわたる遺伝子発現と組織におけるグリコーゲンの減少効果を得た⁹⁾ (Figure 7)。

iPS細胞を用いた治療法の開発

LDでiPS細胞を作成する意味は2つある。1つは病態の解明であり、もう一つは治療法への応用である。我々はファブリー病、クラッペ病、ムコ多糖症VII型¹⁰⁾、ポンペ病モデルマウス¹¹⁾よりiPS細胞を樹立した。iPS細胞は3胚葉への分化能を有し、またポンペ病マウス由来iPS細胞は筋細胞へ分化した (Figure 8)。今後、本細胞を用いて病態の解析、治療へ応用を行う予定である。

文 献

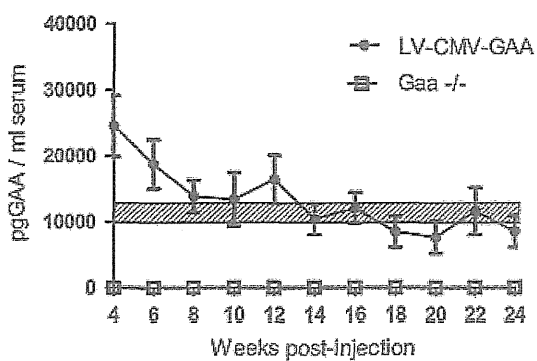
1) Sakurai K, Iizuka S, Shen JS, Meng XL, Mori T, Umezawa A, Ohashi T, and Eto Y. Brain transplantation of genetically modified

bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice. *Gene Ther* 2004; 11(19): 1475-81.

2) Meng XL, Shen JS, Ohashi T, Maeda H, Kim SU, Eto Y. Brain transplantation of genetically engineered human neural stem cells globally corrects brain lesions in the mucopolysaccharidosis type VII mouse. *J Neurosci Res* 2003; 74(2): 266-77.

3) Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Morimoto H, Hirato T, Nishino K, Eto Y. Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. *Mol Genet Metab* 2012; 107 (1-2): 122-8.

4) Ohashi T, Sakuma M, Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Eto Y. Influence of antibody formation on reduction of globotriaosylceramide (GL-3) in urine from Fabry patients during agalsidase beta therapy. *Mol Genet Metab* 2007; 92(3): 271-3.

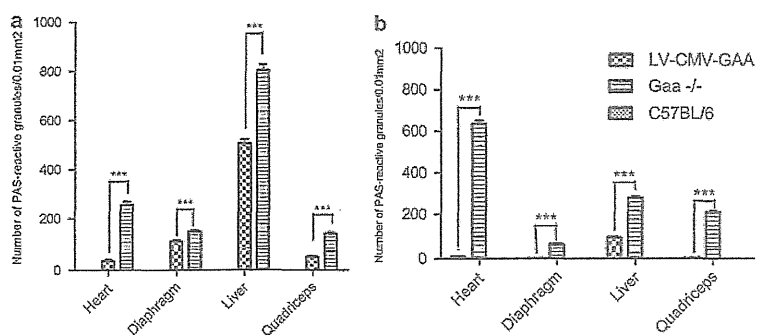


治療後の血清GAA量

新生児ポンペ病モデルマウスにGAAを発現する組換えレンチウイルスを静脈内投与。定期的に血清中のGAA蛋白量を測定した。少なくとも24週まで発現が続いた。

LV-CMV-GAA: 組換えレンチウイルス投与群

Gaa^{-/-}: 無治療ポンペ病マウス



治療後の組織のPAS染色

治療16週後 (a)24週後 (b)各組織をPAS染色し、PAS陽性細胞の数を数えた。心臓、横隔膜、肝臓、大腿四頭筋でPAS陽性の細胞の数が減少している。

LV-CMV-GAA: 組換えレンチウイルス投与群

Gaa^{-/-}: 無治療ポンペ病マウス

Figure 7. 組換えレンチウイルスを用いたポンペ病モデルマウスの遺伝子治療法

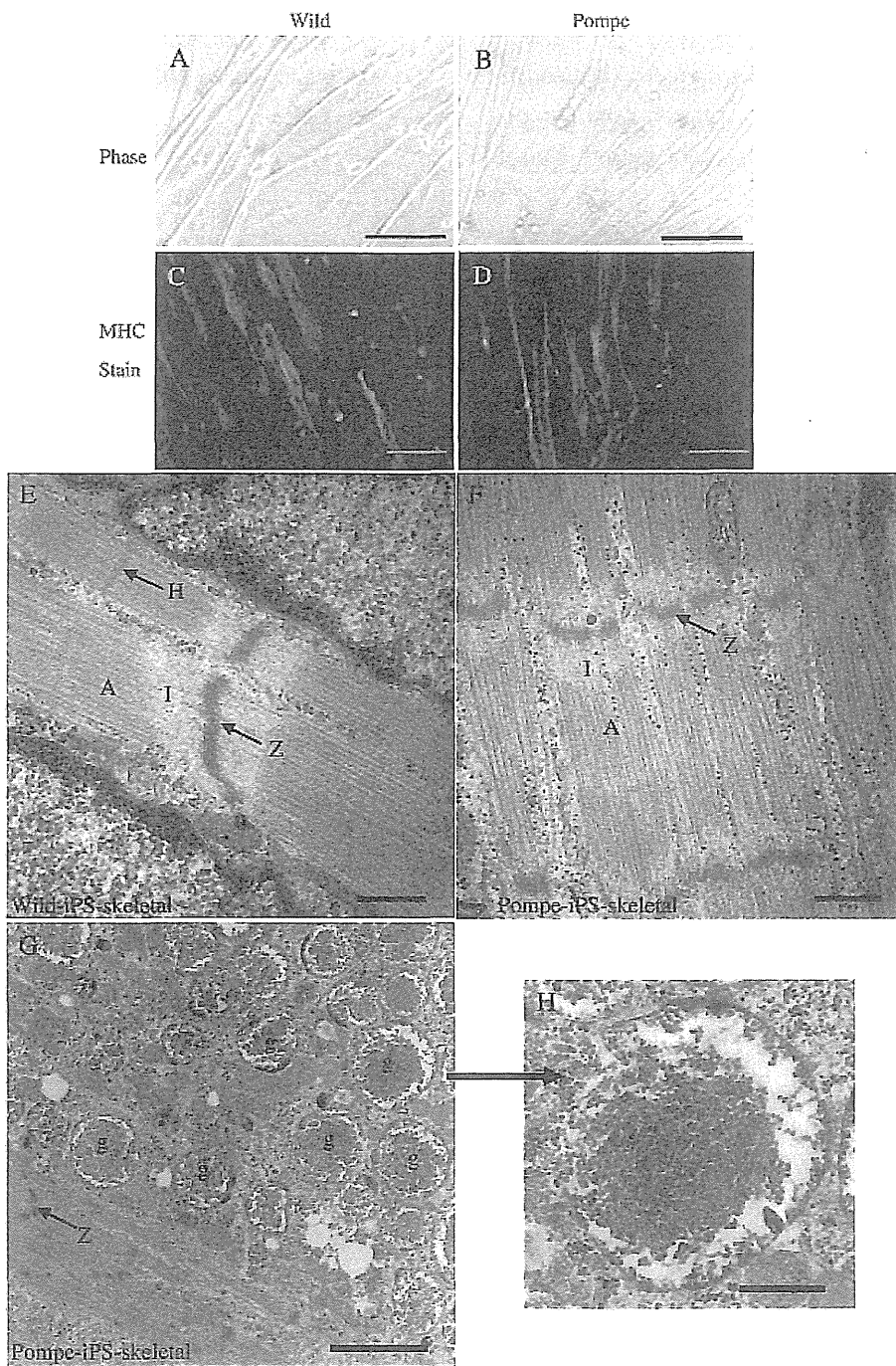
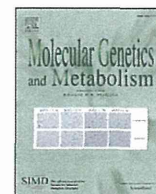


Figure 8. ポンペ病マウスより樹立したiPS細胞の心筋細胞への分化
 ワイルドタイプマウスiPS (A)、ポンペ病マウスiPS (B) より分化した骨格筋細胞
 の形態。
 両細胞はMHC (myosine heavy chain) 陽性であり、電顕では (E, F) H-band (H),
 A-band (A), I-band (I), Z-band (Z) を認めた。またポンペ病マウスiPS由来骨格
 筋細胞ではグリコーゲンの蓄積 (g) も確認できた (G,H)。

- 5) Ohashi T, Iizuka S, Ida H, Eto Y. Reduced alpha-Gal A enzyme activity in Fabry fibroblast cells and Fabry mice tissues induced by serum from antibody positive patients with Fabry disease. *Mol Genet Metab* 2008; 94(3): 313-8.
- 6) Rombach SM, Aerts JM, Poorthuis BJ, Groener JE, Donker-Koopman W, Hendriks E, Mirzaian M, Kuiper S, Wijburg FA, Hollak CE, Linthorst GE. Long-Term Effect of Antibodies against Infused Alpha-Galactosidase A in Fabry Disease on Plasma and Urinary (lyso) Gb3 Reduction and Treatment Outcome. *PLoS One* 2012; 7(10): e47805.
- 7) Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Eto Y, Ida H, Hachimura S, Kobayashi H. Oral administration of recombinant human acid alpha-glucosidase reduces specific antibody formation against enzyme in mouse. *Mol Genet Metab* 2011; 103(1): 98-100.
- 8) Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Kobayashi H. Administration of anti-CD3 antibodies modulates the immune response to an infusion of alpha-glucosidase in mice. *Mol Ther* 2012; 20(10): 1924-31.
- 9) Kyosen SO, Iizuka S, Kobayashi H, Kimura T, Fukuda T, Shen J, Shimada Y, Ida H, Eto Y, Ohashi T. Neonatal gene transfer using lentiviral vector for murine Pompe disease: long-term expression and glycogen reduction. *Gene Ther* 2010; 17(4): 521-30.
- 10) Meng XL, Shen JS, Kawagoe S, Ohashi T, Brady RO, Eto Y. Induced pluripotent stem cells derived from mouse models of lysosomal storage disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(17): 7886-91.
- 11) Kawagoe S, Higuchi T, Meng XL, Shimada Y, Shimizu H, Hirayama R, Fukuda T, Chang H, Nakahata T, Fukada S, Ida H, Kobayashi H, Ohashi T, Eto Y. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol Genet Metab* 2011; 104(1-2): 123-8.



Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp)

Shiho Kawagoe^a, Takashi Higuchi^a, Manami Otaka^c, Yohta Shimada^d, Hiroshi Kobayashi^{a,d,e}, Hiroyuki Ida^{a,e}, Toya Ohashi^{a,d,e}, Hirotaka J. Okano^f, Mahito Nakanishi^c, Yoshikatsu Eto^{a,b,*}

^a Department of Genetic Diseases and Genomic Science, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

^b Advanced Clinical Research Center, Institute of Neurological Disorders, Kanagawa, Japan

^c Research Center for Stem Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan

^d Department of Gene Therapy, Institute of DNA Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

^e Department of Pediatrics, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

^f Division of Regenerative Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2013

Received in revised form 3 June 2013

Accepted 3 June 2013

Available online 12 June 2013

Keywords:

iPS cells

Fabry disease

Sendai virus vector

Ultrastructure

ABSTRACT

We generated iPS cells from human dermal fibroblasts (HDFs) of Fabry disease using a Sendai virus (SeVdp) vector; this method has been established by Nakanishi et al. for pathogenic evaluation. We received SeVdp vector from Nakanishi and loaded it simultaneously with four reprogramming factors (Klf4, Oct4, Sox2, and c-Myc) to HDFs of Fabry disease; subsequently, we observed the presence of human iPS-like cells. The Sendai virus nucleocapsid protein was not detected in the fibroblasts by RT-PCR analysis. Additionally, we confirmed an undifferentiated state, alkaline phosphatase staining, and the presence of SSEA-4, TRA-1-60, and TRA-1-81. Moreover, ultrastructural features of these iPS cells included massive membranous cytoplasmic bodies typical of HDFs of Fabry disease. Thus, we successfully generated human iPS cells from HDFs of Fabry disease that retained the genetic conditions of Fabry disease; also, these abnormal iPS cells could not be easily differentiated into mature cell types such as neuronal cells, cardiomyocytes, etc. because of a massive accumulation of membranous cytoplasmic bodies in lysosomes, possibly the persistent damages of intracellular architecture.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Fabry disease is characterized by a deficiency of alpha-galactosidase, which results in the accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) in the kidney, heart and other tissues throughout the body. Takahashi et al. established a method for generating iPS (induced pluripotent stem) cells from somatic cells (e.g., fibroblasts, lymphocytes) by introducing reprogramming factors (e.g., Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc) using a retroviral vector [1]. These cells were maintained in a pluripotent undifferentiated state with the ability to self-propagate. iPS technology is expected to aid in developing novel drugs, regenerative medicine and analysis of disease states.

Recently, a number of procedures for generating iPS cells have been introduced; these procedures involve chemicals and plasmid (such as Sendai virus vector), episomal, or viral (such as retrovirus or lentivirus) vectors. Each procedure has advantages and disadvantages.

Viral vectors create a risk of malignant transformation, whereas plasmid vectors, such as Sendai viral vector, or episomal vectors create less risk of malignant transformation. Sendai virus, a negative-strand RNA virus (Fig. 1), can infect various mammalian cells. The Sendai virus genome is replicated in the cytoplasm and has no genomic venomousness with high security. Moreover, Nishimura et al. [2] established that siRNA can erase the genomic RNA of the Sendai virus from SeVdp-iPS cells, making it a highly safe vector. Recently, the generation of induced pluripotent stem cells has been reported from both mouse and human somatic cells with different genetic diseases using defined factors [3–9]; this advance may provide information regarding the pathogenesis and treatment of human diseases. To generate iPS cells from these diseased cells, such as lysosomal storage disease cells, is a challenge because these cells are already damaged by the accumulation of inclusion bodies in the lysosomes [4]. However, there have been few studies on the morphological characteristics of lysosomal storage diseases. In this study, we generated iPS cells from human fibroblasts of Fabry disease using the established SeVdp vector. The purpose of this study was to compare the heart disease state in iPS cells generated with the SeVdp vector and in iPS cells generated with a retroviral vector. This paper is the first to present the detailed morphological features of iPS cells of lysosomal storage diseases, particularly human Fabry iPS cells, by electron microscopy.

* Corresponding author at: Department of Genetics and Genome Science, Tokyo Jikei University School of Medicine, Nishishinbashi 3-25-8, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan. Fax: +81 0443229991.

E-mail address: yosh@sepia.ocn.ne.jp (Y. Eto).

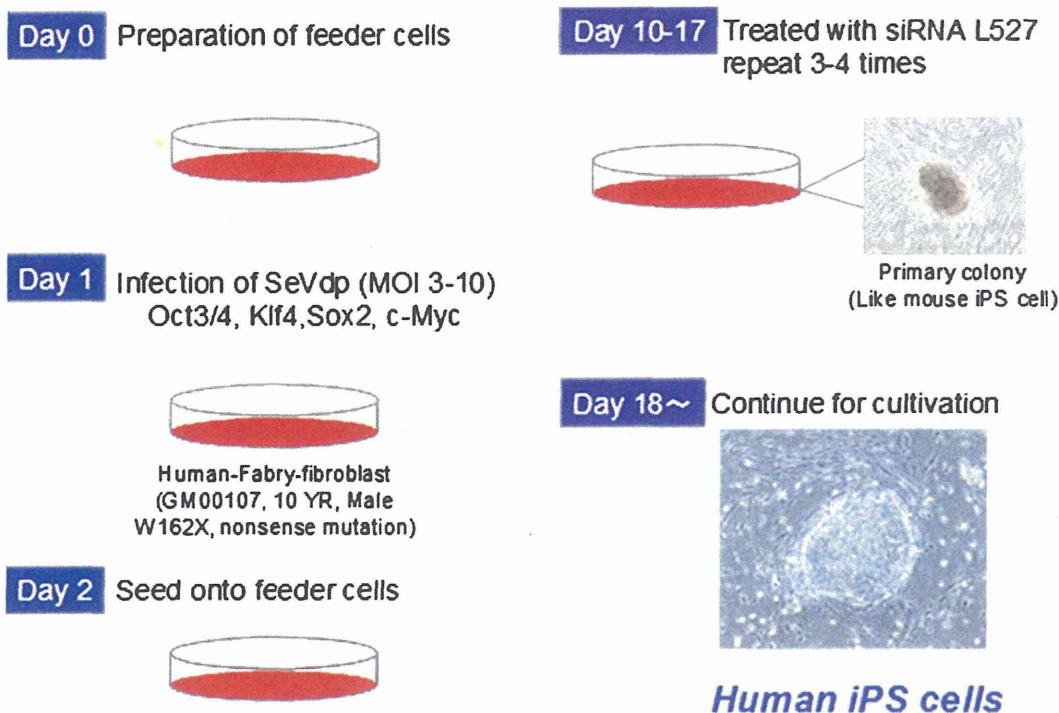


Fig. 1. Method to generate human iPS cells using SeVdp. On day 0, we seeded SNL feeder cells, then, on day 1, HDF from Fabry disease transfected four reprogramming factors using SeVdp (MOI 3–10). On days 10–17, parallel with a subculture primary colony, we treated siRNA L527 for knock down genomic RNA of SeVdp vector. Keeping the cultivation, we could confirm human iPS-like cells.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and generation of iPS cells

To produce iPS cells from Fabry HDFs two viral vectors were used; a retroviral vector according to Takahashi and Yamanaka [1] and the Sendai virus vector [2]. Fabry iPS cells produced by a retroviral vector expressing OCT3/4, SOX2, KLF4 or Myc were also generated as previously described [3,4]. The SeVdp vector, which simultaneously delivers four Yamanaka factors (Klf4, Oct4, Sox2, and c-Myc) to generate human iPS cells from wild type HDFs, and the siRNA L527 (5-GGUUCAGCAU CAAUAUGAAG-3, 3-UACCAAGUCGUAGUUUUAUCU-5) were provided by Nishimura et al. [2]. Fabry HDFs (GM00107, 10 year old male, W162X, nonsense mutation) were purchased from the Coriell Institute, USA. SeVdp Fabry-hiPS cells were generated from Fabry HDFs using the SeVdp vector according to the protocol described by Nishimura et al. [2].

2.2. RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured iPS cells using the RNeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany). For reverse transcription, we used the SuperScript II kit (Invitrogen) and Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, CA, USA) to form 2 µg of cDNA. PCR was performed according to the established method [2].

2.3. Immunostaining and cytochemical staining

The immunostaining study was performed as previously described [3,4].

The primary antibodies used were Ms X SSEA-4 IgG, Ms X TRA-1-60, and Ms X TRA-1-81 (Millipore, MA, USA). Cytochemical staining was performed using alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, MO, USA) according to the manufacturer's recommendations.

2.4. Electron microscopy

The iPS cells were doubly fixed with 2% glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.2) and 1% osmium tetroxide/0.1 M PB (pH 7.2) and were dehydrated with an ethanol gradient. Then, the cells were embedded in epoxy resin. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Hitachi H7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo).

3. Results

3.1. Analysis of generated SeVdp Fabry-hiPS cells for the SeVdp-NP marker of SeVdp infection and for the undifferentiated state

We generated iPS cells from Fabry HDFs (GM00107, Coriell, USA) using the SeVdp vector installed with Klf4, Oct4, Sox2, and c-Myc.

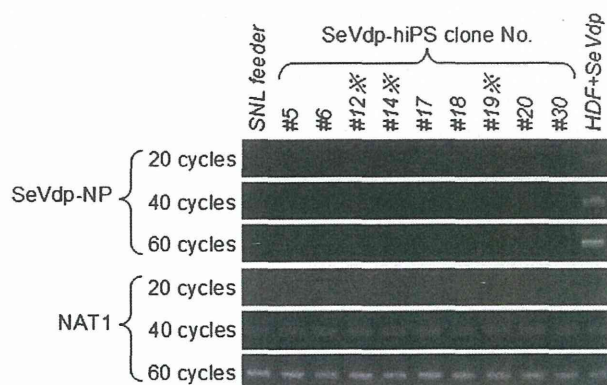


Fig. 2. RT-PCR analysis of SeVdp-NP gene. Analysis of RT-PCR for isolated SeVdp Fabry-hiPS cells using SeVdp nucleocapsid protein (SeVdp-NP) marker gene. NAT1 is internal control. SNL feeder is negative control, and HDF + SeVdp is positive control.

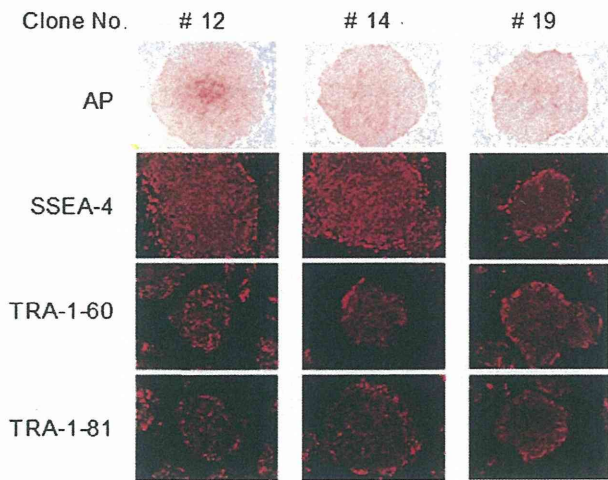


Fig. 3. Analysis of undifferentiated state of SeVdp Fabry-hiPS. Sendai virus-free hiPS cells were significant positive cells for alkaline phosphatase, SSEA-4, TRA-1-60, and TRA-1-81 stains.

Five days after transfection, we confirmed the presence of primary colonies similar to mouse iPS cells. The SeVdp vector RNA genome of the primary colonies was erased with siRNA 527, and cultivation was continued thereafter. We confirmed the generation of human iPS cells (Fig. 1).

We performed RT-PCR for the Sendai viral nucleocapsid protein (NP) gene, a marker for SeVdp infection, with 20, 40, and 60 cycles (Fig. 2).

We could not detect the SeVdp-NP gene by RT-PCR analysis of SeVdp-hiPS cells, indicating that siRNA L527 successfully knocked down the Sendai virus genome in SeVdp Fabry-hiPS cells. Additionally, the SeVdp Fabry-hiPS cells generated had high alkaline phosphatase activity and were highly positive for SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81 (Fig. 3). These results indicate that SeVdp Fabry-hiPS cells with an undifferentiated state were generated and were induced into putative iPS cells.

3.2. Analysis of the ultrastructure in isolated RV and SeVdp Fabry-hiPS cells

Electron microscopic analysis indicated that iPS cells produced by retrovirus (RV) or SeVdp Fabry-hiPS both exhibited typical membranous cytoplasmic body (MCB) structures in lysosomes; however, less packed inclusion bodies or immature inclusions were observed in these cells compared to Fabry HDFs (Fig. 4) because the Fabry HDFs contained more densely packed MCBs.

These results also suggest that isolated Fabry-hiPS cells generated from RV or SeVdp retain the typical pathological features of Fabry disease. Morphological differences in Fabry-hiPS cells generated with retrovirus or SeVdp virus were not observed.

4. Discussion

The SeVdp vector used in this study has several features: no genetic toxicity with high security, wide host range (including human hematopoietic stem cells), efficient reprogramming ability, stable expression in the cytoplasm and high security.

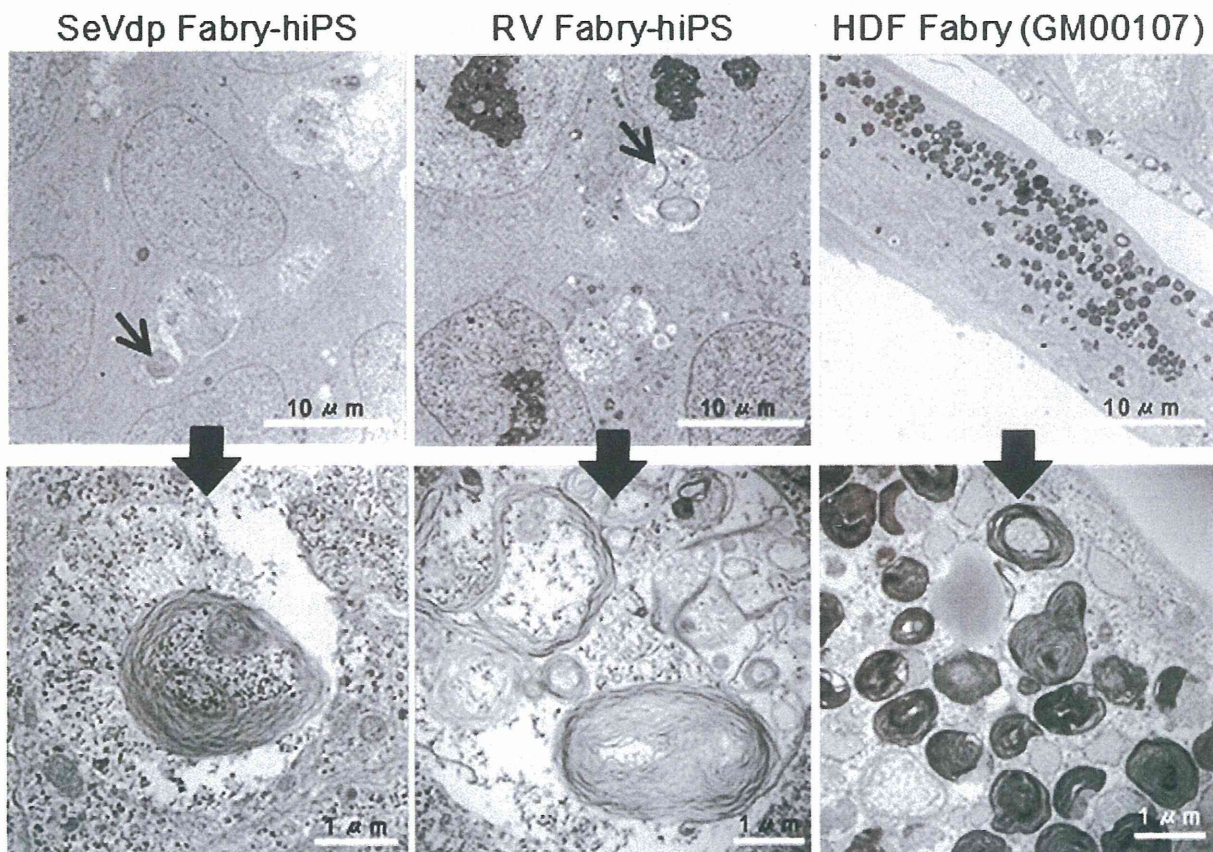


Fig. 4. Electron microscopic photographs of SeVdp Fabry-hiPS, RV Fabry-hiPS and HDF of Fabry disease. The upper panels show narrow expansion and the lower panels show wide expansion. The bar indicates each size. We could demonstrate many typical membranous cytoplasmic body structures in lysosomes generated by SeVdp Fabry-hiPS cells and RV Fabry-hiPS cells which are rather similar to those of HDF of Fabry disease, but look more like immature membranous cytoplasmic inclusion bodies, compared to those of HDF.