

令和元年6月15日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09601

研究課題名(和文) iPS細胞及び遺伝子改変システムを用いたムコ多糖症等治療用デバイス作成

研究課題名(英文) Preparation of device for mucopolysaccharidosis treatment using iPS cells and gene modification system

研究代表者

小林 博司 (Kobayashi, Hiroshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90266619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回ムコ多糖症(MPS)およびクラッペ病由来iPS細胞を臓器系統に分化させ、遺伝子改変システムによる治療効果を評価し、更に治療補助用デバイスの実現を目指した。まずクラッペ病モデルマウス由来のiPS細胞より神経系細胞への分化誘導を試み、神経系スフェアへの分化誘導に成功した。ただしそこから神経系起源基細胞、各神経系細胞への分化誘導に成功せず、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入の有無による移植比較実験に移行することが難しかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ライソゾーム病は細胞内小器官であるライソゾーム関連酵素の欠損により基質が蓄積し、臓器不全を呈する疾患群の総称である。このうちMPSは酵素欠損により中枢神経、肝、脾、心、腎、骨系統などにGAGが蓄積し、多発性臓器障害を来すとされる。現在型、型、VI型において酵素補充療法が保険承認されているが、中枢神経系、心弁膜症・心筋症、骨系統合併症には効果が不十分とされている。またクラッペ病も酵素欠損により中枢神経系が主に障害され、現在有効な保険承認治療がない。これらの疾患の予後向上を目指し、重要臓器の病態解析および治療戦略としてのデバイス作成を計画した。

研究成果の概要(英文)：Mucopolysaccharidosis (MPS) and Krabbe's disease are diseases in which substrates are accumulated and damaged by enzyme deficiency. In this study, we used the disease-derived iPS cells to differentiate into organ lineages, evaluated the therapeutic effect of gene modification systems such as viral vectors, and aimed to realize autologous therapeutic devices. MPS type VII, Krabbe's iPS cells have been successfully created and maintained. At first, we try to induce differentiation of neural cells from iPS cells derived from Krabbe's disease model mouse, and successfully induce differentiation into nervous system spheres. However, the induction of differentiation into neural lineage-derived base cells and individual lineage neurons was not sufficiently successful, and we have not succeeded to shift to comparative experiments with and without gene transfer using lentiviral vectors.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：iPS細胞 MPS クラッペ病 神経系スフェア 治療補助用デバイス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は細胞内小器官であるライソゾーム関連酵素の欠損により基質が蓄積し、臓器不全を呈する疾患群の総称である。このうちMPS は酵素欠損により中枢神経、肝、脾、心、腎、骨系統などにGAG が蓄積し、多発性臓器障害を来すとされる。現在 I 型、II 型、VI 型において酵素補充療法が保険承認されているが、中枢神経系、心弁膜症・心筋症、骨系統合併症には効果が不十分とされている。更にMPS におけるこれら3系統の重要臓器の病態解析および治療戦略はこれまでも報告されているが、必ずしも十分とは言えない。

我々は従来MPSII 型(ハンター病),VII 型(スライ病)のモデルマウスを用いて造血幹細胞移植、遺伝子治療を含め様々な検討を行ってきた。この疾患の欠損酵素活性の測定、また蓄積するGAG の定量、更に免疫染色などの病理解析、骨髄・末梢血などのフローサイトメトリーによる解析などの系は確立されており、またマウスの飼育環境、尾部からのDNA抽出による遺伝子診断などによる疾患マウス系統の維持も確立されている。更にMPS,クラッペ病、ポンペ病などを含めたライソゾーム病の iPS 細胞の作製、および各組織への分化誘導は2010年以降継続的に行なっており、上記3系統の内 心筋、神経への誘導はすでに系が確立しつつある。骨系統に対しては当院整形外科研究チームとの連携がすでにできしており、今回の骨系統への分化およびデバイス作成においても協力体制をとる方針である。

2. 研究の目的

先天代謝異常症のムコ多糖症(Mucopolysaccharidosis, MPS)は酵素欠損により全身臓器にグリコサミノグリカン(GAG)が蓄積し、多発性臓器障害を来す疾患である。近年、I, II, VI 型には酵素補充療法も保険承認されているが、中枢神経、心、骨系統に関しては効果が限定的で、その原因は十分に解明されていない。今回疾患由来 induced pluripotent stem cell(iPS 細胞)を用いてこれらの臓器系統に分化させ、ウイルスベクター、zinc finger などの遺伝子改変システムによる治療効果を評価し、更に自己由来心筋シート、骨芽細胞、中枢神経起源基細胞といった臨床治療補助用のデバイス作製を実現させることによるMPS 患者の生活の質の改善を目指す。また同じライソゾーム病で主に中枢神経症候を来すクラッペ病に対しても同様に行なう。

3. 研究の方法

1). 疾患由来 iPS 細胞樹立および誘導

MPS VII 型,クラッペ病の iPS 細胞はすでに作成に成功し保持している。I 型に関しては新たに作成する。またヒト由来の細胞は新たに作成する。これらの細胞に対して、コントロールとして何も治療を加えない群と共に、欠損酵素を組み込んだレンチウイルスベクター(これらもすでに作成済み)および相同組換えを考慮した Zinc Finger Nuclease(ZFN)システムを用いて欠損酵素の遺伝子導入を行う。ZFN に関してはシグマ社などに依頼しドナープラスミドをデザインする。(小林)

2). 疾患由来およびコントロール iPS 細胞の重要臓器 3 系統への分化誘導

作成したiPS細胞を心筋、骨系統、神経系統の3系統へ分化誘導を開始する。心筋への分化に関しては樋口、骨系統は小林および連携研究者、神経系は嶋田が担当する。我々はすでに同じライソゾーム病であるポンペ病iPS 細胞の心筋、骨格筋への分化、ゴーシェ病iPS細胞の神経系への分化に成功している。(Kawagoe et al. Mol Genet Metab. 2011, Higuchi et al. Mol Genet Metab. 2014)

3) 前年度で作成したMPSの細胞について、遺伝子治療を加えたものとそのまま分化させ

たものを比較検討する。心筋では電位、拍動状況、各種マーカーによる抗体染色により評価する。骨系統は自然歴としての骨代謝がある程度明らかになったうえで、シグナル伝達因子、病理などの骨系統の解析、さらに骨系統でのオートファジーの解析を行う(嶋田)。神経系細胞も活動電位、各種マーカーによる抗体染色により評価する。更に心筋シート、分化軟骨細胞、神経系細胞をモデルマウスに移植し、効果を見る。モデルマウスへの移植での評価で有意差を持って有効性が確認され、かつ腫瘍原性のないデバイス系列を選定し、倫理委員会の審査を経たうえでGMP施設内限定でヒトMPS患者由来iPS細胞からヒトMPS患者用(移植、置換用)のデバイスを作成する。本研究ではこのデバイス試作および機能評価までを目標とし、実際のヒトへの移植・置換計画は次の段階とする

4. 研究成果

ムコ多糖症・クラッペ病のマウス由来 iPS 細胞はすでに構築されている。

クラッペ病由来の iPS 細胞から分化させた分化誘導細胞としてまず神経組織への誘導を試みた。神経系スフェアの前段階までの構築は出来、神経細胞・グリア細胞などの分化を確認するまでには至ったが、遺伝子治療修飾と未修飾群の群の比較・評価は未確認。更にモデルマウスへの移植実験までは到達できていない。ムコ多糖症 VII 型由来の iPS 細胞からの分化誘導が進まず、遺伝子治療修飾と未修飾群の群の比較・評価も未確認。更にモデルマウスへの移植実験までは到達できていない。

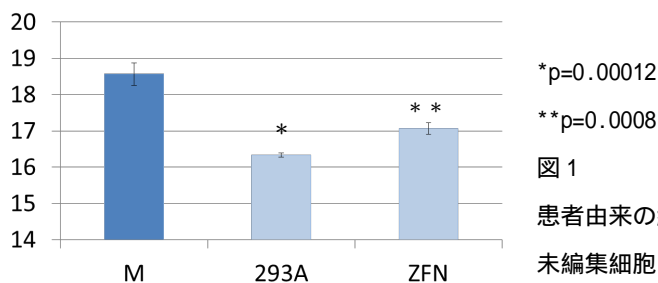


図1
患者由来の細胞に ZFN による遺伝子編集を施したものの未編集細胞 (M) に比べて有意に蓄積基質サイコシンの低下が見られる

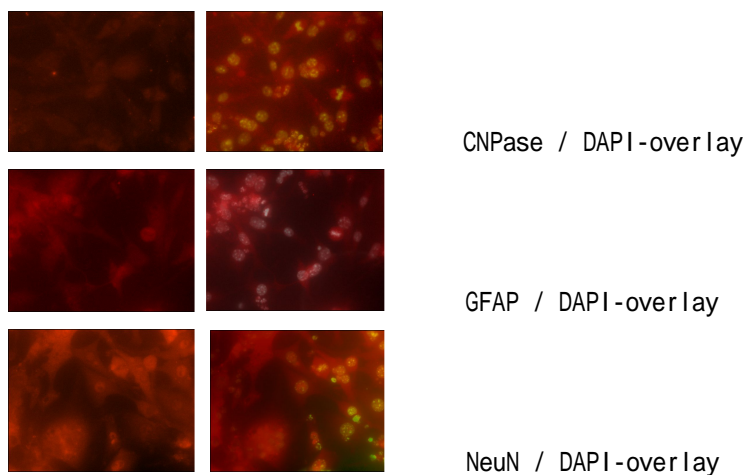


図2
クラッペ病マウス由来 iPS 細胞を分化させたニューロスフェアの免疫染色
各神経系細胞への分化を確認 (CNPase: oligodendroglia, GFAP: astroglia, NeuN: neuron)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小林博司 飯塚佐代子 有賀兼典 福田隆浩 嶋田洋太 樋口孝 岩本武夫 Katherine
Ponder Mark Haskins 大橋十也
Gene Therapy and Gene Editing for lysosomal storage diseases
The 23rd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (2017年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：樋口 孝

ローマ字氏名：Higuchi Takashi

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：総合医科学研究センター遺伝子治療研究部

職名：助教

研究者番号(8桁): 30595327

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大橋 十也

ローマ字氏名：Ohashi Toya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。