

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15406

研究課題名（和文）I-cell病モデルマウスに対する幹細胞移植による治療戦略の創成

研究課題名（英文）Establishment of treatment strategy by stem cell transplantation for I-cell disease model mouse

研究代表者

大倉 隆司（OHKURA, TAKASHI）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・（非）研究員

研究者番号：50183223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はI-cell病(ICD)というライソゾーム病の中でも治療法のない遺伝性多酵素欠損症を中心に病態の解析と幹細胞移植治療法の開発を試みた。ヒトICD患者fibroblastからiPS細胞を作成し、これより各種臓器細胞に分化させて臓器ごとに特徴的な代謝不全物質（複合糖質）の構造を明らかにした。これにより臓器ごとのライソゾーム酵素要求性が明らかになることから、それに最適の分解酵素分泌性を有する細胞をI-cell病のモデルマウスに対して移植し、その治療効果および総合的な安全性を解析・評価した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to analyze pathology and develop stem cell transplantation therapy mainly on multienzyme deficiency of enzyme without treatment, among lysosomal diseases called I-cell disease (ICD). IPS cells were prepared from human ICD patient fibroblasts and differentiated into various organ donor cells to clarify the structure of a characteristic metabolic disorder (structural carbohydrate) around organs. As a result, lysosomal enzyme requirement for each organ was clarified, cells having optimal degradative enzyme secretion properties were transplanted into model mice, and the therapeutic effect and comprehensive safety were analyzed and evaluated

研究分野：医歯薬学

キーワード：先天性異常 ライソゾーム病 成育医療 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は厚生労働省の特定疾患「難病」に指定されている遺伝性疾患群である。なかでも I-cell 病(ICD)は、多くのライソゾーム酵素に結合するライソゾーム移行シグナル、マンノース 6-リン酸残基の生合成を司る転移酵素遺伝子(GNPTAB)の遺伝的欠損を原因とする。ライソゾーム病に対する治療には欠損酵素を補う治療法のひとつである酵素補充療法が実施されており、血流が豊富な臓器を中心にある程度の治療効果が得られ、現在日本ではライソゾーム病 6 疾患(Gaucher 病, Fabry 病, Pompe 病, ムコ多糖症 I, II, VI 型)に対する酵素補充療法製剤が承認されている。しかしながら、酵素補充療法製剤は中枢神経症状に効果がないこと、毎週或いは隔週 1 回の点滴投与を一生涯継続する必要があること、莫大な医療費を必要とするなどの問題がある。また ICD についてはその欠損酵素が 30 種以上に及びそれら全てを含む酵素製剤は全くの不可能な事であることから対象外に置かれている。現時点では細胞移植治療は先天性代謝異常症に対する唯一の根治治療法であり、今後これらの細胞を用いた安全かつ安定的な新規細胞移植治療の開発が切望されている。現在実施されているライソゾーム病に対する治療法は主に酵素補充療法であるが、効率的に細胞内に取り込まれる酵素を安定的に大量に作製する事は一酵素だけでも高技術・高コストを要しており、その生涯にわたる投与は患者及び社会に対する大きな負担として問題になっている。まして ICD のような 30 種以上の酵素の欠損を人工酵素製剤により補う事は将来的にも考えられず、ICD の病態を詳細に解析しそれに効率的に対応できる新たな細胞移植治

療法の早な開発・実用化が望まれている。他のほとんどのライソゾーム病と ICD の異なる点は ICD が数十種類に及ぶライソゾーム酵素の細胞内欠損であり、それらが部分欠損である事である。多種酵素欠損という同じ異常を示す各種細胞でもその属する臓器により各酵素の欠損程度、必要量等は異なっていると考えられ、全ての臓器細胞が全ての酵素の不足を来しているのではないことは容易に推測される。このように臓器ごとにどの酵素が本当に機能的に不足しているかを解析する事は非常に困難である。これは酵素の発現量や活性量を測定しても判定できず、唯一分解不全産物を解析しどの酵素が不足しているかを推測する事により可能になる。またこのような超微量な臓器特異的代謝不全物質の解析は現在最もよく使われている質量分析機による糖鎖構造解析法では感度的に不可能であり、申請者が開発した超高感度糖鎖構造解析法であるメタボリックラベル/レクチン解析法(Methods Mol.Biol.200:79,2014)でのみ可能になると考える。これまでに Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウスに対して、ヒト胎盤動脈由来内皮細胞(Hum Mol Genet.,2011),羊膜上皮由来間葉系細胞(J Cell Physiol, 223:695, 2010),ヒト月経血由来細胞(Mol Biol Cell.18:1586, 2007)等の非侵襲的に大量に採取が可能な細胞を用いた移植治療研究が行われている。

## 2. 研究の目的

本研究は I-cell 病(ICD)というライソゾーム病の中でも治療法のない遺伝性多酵素欠損症を中心に病態の解析と幹細胞移植治療の開発を試みるものである。まずヒト ICD 患者 fibroblast から iPS 細胞を作成し、

これより各種臓器細胞に分化させて臓器ごとに特徴的な代謝不全物質（複合糖質）の構造を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト ICD 患者 fibroblast 由来 iPS 細胞からの各種細胞への分化誘導

ICD の臓器ごとの代謝異常の実態を探りそれに応じたモデルマウスを用いた細胞治療実験を構築するため、ヒト ICD 患者 fibroblast より作製した iPS 細胞の肝臓、神経、膵臓細胞などへの分化誘導を行って生化学分析が可能な細胞を作製した。

(2)ICD 分化細胞の代謝不全産物の生化学的構造解析

ICD 患者 fibroblast では細胞中及び培養液中に高マンノース少糖と特徴的な糖ペプチドが蓄積していることを報告した。同様の分析法を用い、各種 ICD 分化細胞を 3H-グルコサミンで代謝標識し、細胞中に産生される 3H 標識代謝不全産物を各種クロマトグラフィー、各種酵素消化法などを駆使して構造を解析した。その他蓄積すると考えられる糖脂質、タンパク質等は免疫学的手法も用いて評価した。

(3) ICD モデルマウスの改変(Scid 化)

移植実験に際しては拒絶反応の制御が重要であるが、免疫抑制剤の使用によりデータのばらつきが生じる可能性がある。そのため、ICD マウスを scid マウスと交配させることで、細胞移植時に免疫学的拒絶が起こらない ICD マウス(ICD-scid)を作製した。

(4) ICD-scid マウスへの移植実験

最も酵素要求に適した細胞を選択し、ICD-scid マウスの腹腔内に移植し、その効

果を解析する。解析する項目は、寿命、体重変化、神経症状、酵素活性、移植した細胞の生着および酵素活性の組織内分布、移植に伴う副反応の有無等を総合的に定法に従い解析した。同時に尿中、血液中、組織中の代謝不全産物を定量的に解析し、その効果を判定した。

### 4. 研究成果

独自の超高感度糖鎖構造解析法を用いて ICD fibroblast の分解不全産物を解析し、患者尿中の代謝不全産物として報告されていた少糖とは全く違う少糖が蓄積している事を明らかにした。これにより初めて少量の iPS 由来分化細胞レベルでの構造解析が可能となった。細胞移植治療においては臓器ごとの病態を考慮し、効率的、合理的に最適細胞を選択する事が可能になる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[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]

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

大倉 隆司(OHKURA, TAKASHI)  
国立研究開発法人 国立成育医療研究センター 細胞医療研究部 研究員  
研究者番号: 50183223

(2)研究分担者

梅澤 明弘(UMEZAWA, AKIHIRO)  
国立研究開発法人 国立成育医療研究センター 再生医療センター センター

長

研究者番号：70213486