

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：32651
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791196
 研究課題名（和文）小児型ポンペ病患者由来 iPS 細胞を用いたポンペ病心筋細胞の病態解析
 研究課題名（英文） Generation of iPS Cells from human fibroblast with Pompe Disease and Pathological Analysis of the iPS Cells
 研究代表者
 樋口 孝 (HIGUCHI TAKASHI)
 東京慈恵会医科大学・医学部・ポスドクトラルフェロー
 研究者番号：30595327

研究成果の概要（和文）：

ポンペ病は酸性 α グルコシダーゼの欠損により生じる先天代謝異常症の一つである。ポンペ病は細胞内にグリコーゲンが過剰に蓄積することによって細胞の機能が障害されると考えられているが、未だその詳しいメカニズムはよくわかっていない。本研究ではポンペ病 iPS 細胞を用いてポンペ病の病態の解析を試みた。その結果ポンペ病 iPS 細胞は PAS 染色陽性であること、細胞内に多数の巨大なグリコーゲン顆粒が存在する事などがわかった。

研究成果の概要（英文）：

The Pompe disease is a one of the lysosomal storage disorders. It is caused by an accumulation of glycogen in the lysosome due to deficiency of the lysosomal acid alpha-glucosidase (GAA) enzyme. To reveal pathogenesis of Pompe disease, I generated Pompe disease patient-specific iPS cells (iPSCs) from the patient skin fibroblast. The Pompe-iPSCs were positive-staining using PAS analysis compared to wild-type iPSCs. Transmission Electron Microscope analysis indicated that the Pompe-iPSCs exhibited glycogen granule in the cytosol. Pompe-iPSCs treated with GAA, showed that those granules were decreased depended on GAA concentrations in the cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：遺伝病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝病、ポンペ病、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）

1. 研究開始当初の背景

(1)

ポンペ病は1932年にPompe医師により報告された先天代謝異常症であり、ライソゾーム病(糖原病 II 型)に分類される疾病である。この病気は細胞内小器官のライソゾームに存在するライソゾーム酵素、酸性 α グルコシダーゼ(acid alpha-glucosidase: GAA)の機能不全によりその基質であるグリコーゲンが細胞内オルガネラの一つであるライソゾーム内に過剰蓄積する。現在、GAA の遺伝子異常の解析が進められており200以上の変異が報告されている。

ポンペ病は臨床的には乳児型、遅発型に大別できる。乳児型は心型とも呼ばれ心臓に重篤な疾患を発症し予後は非常に不良である。遅発型は主として骨格筋などに筋力低下をきたす。発症時期は細胞あるいは組織のGAA残存酵素活性の程度と相関する。近年、酸性 α グルコシダーゼ酵素補充療法が確立され、すべての臨床型でその有用性が報告されている。

(2)

人工多能性肝細胞(iPS 細胞)は体の様々な細胞に変化できる分化多能性や、高い自己増殖能をもつ幹細胞で、皮膚などの体細胞に初期化因子 Klf4, Sox2, Oct3/4, c-Myc などを導入することによって樹立できる。

iPS 細胞は、再生医療への応用、薬の有効性や副作用、毒性の解析、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態メカニズムの解析など様々な医療分野で非常に有用な研究ツールとして認知されている細胞である。個人の皮膚細胞からいつでも大量に作成できるため、個人の特徴を持つ iPS 細胞の作成ができ、免疫拒絶の問題や量的問題などの問題も解決できる。

(3)

本研究の対象である心臓は患者から解析用試料を採取することが困難な組織であり、ヒトの心筋細胞を用いた研究はほぼ不可能であった。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いることにより、患者の心筋細胞を創りだすことができ、これを解析することによりその病態メカニズムを解明することができると考えられる。以上の観点から乳児型ポンペ病患者由来 iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導させることによってポンペ病心筋細胞の病態解析が可能になると考えられる。

当研究室ではこれまでに数種類のライソゾーム病モデルマウスを用いて iPS 細胞を作成した実績があり、現在それらマウス iPS 細胞を用いてライソゾーム病の病態解析を行っている。またポンペ病モデルマウスを用いて骨格筋オートファジー亢進の分子メカニ

ズムの解析も行っている。

2. 研究の目的

ポンペ病患者皮膚細胞由来 iPS 細胞および健康人皮膚由来 iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導し、両者の差異を分化開始段階からポンペ病の病態メカニズムの解析することを目的とする。

分化誘導開始から解析することは、乳児期の心筋への影響を解析することに繋がると考えられる。心筋細胞分化誘導後は、PAS 染色・酸性フォスファターゼ染色(ACP 染色)を用いてポンペ病の性質を有する心筋細胞か否かの解析や、c-トロポニン、GATA4 など心筋細胞に特異的に発現する mRNA やタンパク質の発現と局在などの評価、オートファジー亢進の評価などを行い健康人とポンペ病患者との差異を見つける。

3. 研究の方法

【iPS 細胞の培養】

一般的なヒト iPS 細胞の培養方法で iPS 細胞を培養した。フィーダー細胞はエクソ線(50Gy)を照射して増殖を止めた SNL 細胞を用いた。iPS 細胞の凍結保存方法はガラス化法を用いた。iPS 細胞の継代 split は 1:3 程度とした。①継代日に合わせフィーダー細胞を準備した。増殖を止めた SNL 細胞をコーゲンコートされた培養皿に 5×10^5 cells/60 mm dish で播種した。②コロニーが十分大きくなった iPS 細胞をトリプシンで剥がしたのち、コロニーを適当な大きさ(1 塊あたりの細胞数が数十個程度)に砕き①フィーダー細胞上に播種した。原則、毎日培地交換をおこなった。

【iPS 細胞の GAA 処理】

ヒト iPS 細胞培地に終濃度 10、100、1000ug/mL となるように GAA を添加し、3 日間 iPS 細胞を培養した。

【iPS 細胞の PAS 染色とトルイジンブルー染色】

PAS 染色は市販の PAS 染色キットを用いた。トルイジンブルー染色は 1%トルイジン/リン酸バッファーを用いた。iPS 細胞は PBS にて 2 回洗った後 PAS 染色を行い、次にトルイジンブルー染色を行った。

【細胞の電子顕微鏡解析(TEM 解析)】

iPS 細胞または細胞塊は、PBS で 2 回洗った後、2%グルタルアルデヒド/PBS 溶液に

4°C、一晩浸して細胞を固定した。固定した細胞はエポキシ包埋したのち薄切して電顕サンプルとした。

【iPS細胞由来杯様体(EB)の作製】

方法①Y27632(ROCK 阻害剤)で処理したiPS細胞をトリプシンで解離した後、超低吸着培養皿に播種し4~7日間浮遊培養させることでEBを形成させた。

方法②Y27632(ROCK 阻害剤)で処理したiPS細胞をトリプシンで解離した後、超低吸着培養皿に播種し一晩浮遊培養させることでEBを形成させた。

【EBから心筋細胞への分化誘導】

方法①EBを崩さずにコラーゲンコート培養皿に写し、10日間FBS(+)培地で培養した。その後FBS(-)培地で2か月間培養した。

方法②アクターゼを用いてEBを崩し、コラーゲンコート培養皿に播種する。2~3日おきに培地を交換した(*)。EB作製日開始から10日目、アクターゼで細胞塊を剥がし、再度超低吸着培養皿に播種して浮遊培養した。細胞の拍動が確認できるまで5日おきに培地を交換した(1~2か月間)。(*)この間にWntシグナル抑制剤や活性剤を加えた。

【心筋細胞の同定(cTNTの免疫染色)】

培地を除去し、PBSにて1回洗浄したのち、4%パラフォルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。ついで4%Triton X-100にて細胞を処理した。TBSTを用いて細胞を洗浄後、希釈した一次抗体(抗ヒトcTNT抗体)を添加し、4°Cで一晩反応させた。再度TBSTで細胞を洗浄後、二次抗体を添加し、室温、1時間反応させた。最後にTBSTで細胞を洗浄し、DAPIで核染色した。

4. 研究成果

(1)

ポンペ病は細胞内にグリコーゲンが蓄積する病気である。PAS染色は細胞内の多糖を染色する方法であり、ポンペ病においては、細胞内グリコーゲンをPASで染色することでポンペ病を診断できる。そこで樹立したポンペ病iPS細胞にPAS染色を行ない、iPS細胞がポンペ病の病態を示しているか解析した(結果1)。その結果、ポンペ病iPS細胞は強いPAS染色陽性細胞がみられた。一般的に、乳児型は遅発型よりもグリコーゲンの蓄積度合が強い。そこで乳児型と遅発型のポンペ病iPS細胞を比較すると、乳児型の方が遅発型よりもより強く染色されていた。本解析結果はポンペ病iPS細胞でもグリコーゲンの蓄積度合の評価が可能であることを示して

いる。iPS細胞をPAS染色した例は今まで全く報告がなく、iPS細胞の病態解析のツールとして興味深い。

(2)

透過型電子顕微鏡(TEM)を用いてポンペ病の細胞を観察すると、細胞内にグリコーゲンの蓄積(グリコーゲン顆粒)が観察できる。そこで樹立したiPS細胞の細胞内構造のTEM解析を行った(結果2)。その結果、ポンペ病iPS細胞の細胞質には電子密度の高い顆粒の構造物がみられた。PAS染色陽性の所見と合わせて考察するとこの構造物はグリコーゲン顆粒だと考えられる。また、遅発型よりも乳児型においてそのグリコーゲン顆粒が肥大化していた。PAS染色と同様に乳児型ポンペ病iPS細胞は遅発型よりもグリコーゲン蓄積が過剰であった。本結果は、ポンペ病の体細胞を初期化して樹立したiPS細胞でもポンペ病の病態を再現できることを示している。

(3)

ポンペ病の治療方法の一つとしてGAAを静脈注射する酵素補充療法が存在する。本研究ではiPS細胞の培養液にGAAを添加することによって細胞に欠損酵素を取り込ませ、ポンペ病iPS細胞の治療を試みた(結果3)。その結果、遅発型でも乳児型でもGAA処理によりポンペ病iPS細胞中のグリコーゲン顆粒が減少していた。さらにその顆粒の減少はGAA濃度依存的であった。今まで、GAAを用いてポンペ病iPS細胞の治療効果を解析した例はなく、非常に意味深い。

(4)

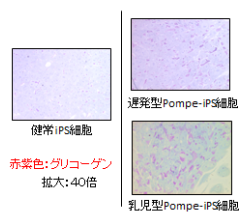
健常iPS細胞と乳児型ポンペ病iPS細胞、遅発型ポンペ病iPS細胞の3種のiPS細胞株を用いて心筋細胞に分化誘導させて、ポンペ病心筋細胞の機能解析を試みた(結果4)。既に報告されている様々な方法を用いて心筋細胞への分化を試みたが、病態解析に使用できる量・質の心筋細胞を得る事が出来なかった。

(5)

患者数が多く有名な疾患のiPS細胞の樹立は全世界的に行われているが、ライソゾーム病を含め、希少な先天代謝異常症由来iPS細胞の樹立と解析はごく少ないことから、本研究「ポンペ病iPS細胞を用いる」は大変意味深いと考えている。今後、このiPS細胞の技術を用いることによって、ポンペ病の病態が明らかになると考えられる。

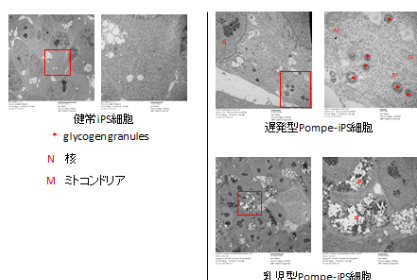
結果 1

ポンペ病iPS細胞のPAS染色+トルイジンブルー染色像



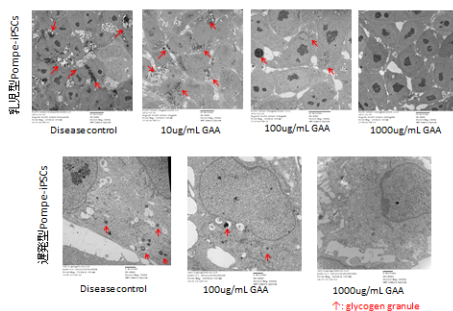
結果 2

ポンペ病iPS細胞の細胞内構造の解析



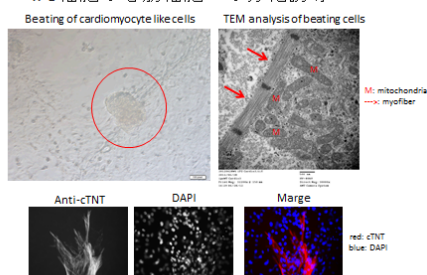
結果 3

GAAによるポンペ病iPS細胞の治療効果



結果 4

iPS細胞の心筋細胞への分化誘導



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 1 件)

[1]

著者名: Shiho Kawagoe, Takashi Higuchi,

他 8 人、②番目

論文標題: Morphological Features of iPS cells generated from Fabry disease Skin Fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp)

雑誌名: Molecular Genetics and Metabolism

査読の有無: 有

巻: 未定(現在印刷中)

発行年(西暦): 2013 年(現在印刷中)

ページ: 未定(現在印刷中)

DOI コード: 未定(現在印刷中)

雑誌 URL : <http://www.journals.elsevier.com/molecular-genetics-and-metabolism/>

以上 1 報

[学会発表] (計 4 件)

[1]

発表者名: Takashi Higuchi, 他 10 人、筆頭者

発表標題: Generation of iPS Cells from human fibroblast with Pompe Disease and Pathological Analysis of the iPS Cells

学会等名: The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases(JSIMD)

発表年月日: (発表予定)2013 年 11 月 27~29 日

発表場所: 舞浜市・千葉県

[2]

発表者名: Takashi Higuchi, 他 10 人、筆頭者

発表標題: Pathological Features of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) Generated from Skin Fibroblasts of Various Lysosomal Storage Diseases

学会等名: 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM2013)

発表年月日: (発表予定)2013 年 9 月 3~6 日

発表場所: バルセロナ・スペイン

[3]

発表者名: 樋口 孝、他 9 人、筆頭者

発表標題: 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

学会等名: 第 54 回日本先天代謝異常学会総会

発表年月日: 2012 年 11 月 15~17 日

発表場所: 岐阜市・岐阜県

【4】

発表者名：河越 しほ、樋口 孝、他 2 人、
②番目

発表標題：センダイウイルスを用いたヒトフ
ァブリー病由来 iPS 様細胞の樹立

学会等名：第 54 回日本先天代謝異常学会総
会

発表年月日：2012 年 11 月 15～17 日

発表場所：岐阜市・岐阜県

以上 4 件

〔図書〕（計 1 件）

【1】

著者名：樋口 孝、他

出版社名：診断と治療社

書名：ライソゾーム病—最新の病態，診断，
治療の進歩

発行年(西暦)：2011 年

執筆ページ：38～40 ページ

以上 1 冊

〔産業財産権〕

【該当なし】

〔その他〕

ホームページ等

【該当なし】

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 孝 (HIGUCHI TAKASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・ポストド
クトラルフェロー

研究者番号：30595327

(2)研究分担者

【該当なし】

(3)連携研究者

【該当なし】

以上