

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659513

研究課題名(和文)ライソゾーム病モデル動物に対するヒトiPS細胞及び体性幹細胞による治療戦略の創成

研究課題名(英文)Development of A Cell Based Therapy for Animal Models for Lysosomal Storage Disorder

研究代表者

大倉 隆司(OHKURA, TAKASHI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・研究員

研究者番号：50183223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：厚生労働省の特定疾患「難病」に指定されている疾患群であるライソゾーム病は現在それぞれに対応する酵素の補充療法が検討されているが、その効果は不十分である。これに代わる治療法としてサンドホッフ病(SD)モデルマウスを例としてヒト間葉系幹細胞やiPS細胞を用いた細胞移植治療法の有効性及び安全性について解析、評価した。SD-scidマウスにiPS細胞を移植したところ血清酵素活性に回復が認められ、効果が示された。

研究成果の概要(英文)：Instead of enzyme replacement therapy (ERT) for lysosomal storage diseases (LSDs), cell replacement therapy of mesenchymal stem cells or iPS cells is estimated its validity and safety using Sandhoff disease (SD) mouse. Urinary oligosaccharides of SD mouse were tritium-labelled and analysed structurally using lectin affinity chromatography and HPLC. It contained the same oligosaccharides, GlcNAc1-2-Man3-GlcNAcOT as human's one. It was indicated that serum enzyme activity of SD-scid mouse was recovered 5-15% of wild type by transplantation of iPS cells

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ライソゾーム病

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は細胞内での正常の代謝に必要な各種のライソゾーム加水分解酵素が遺伝的に欠損し、本来分解されるべき細胞構成物質が分解されずに異常に蓄積し、重篤な症状を呈する疾患群であり、障害を受ける酵素や代謝経路により 40 種類以上が分類されている。発症頻度は数万～数十万人に 1 人程度の希少疾患であるが小児科や内科をはじめ幅広い臨床領域で現われる重要な疾患群で、厚生労働省の特定疾患「難病」に指定されている。ライソゾーム病のひとつであるサンドホフ病(SD)は、ライソゾーム酵素  $\beta$  ヘキササミニダーゼの  $\beta$  鎖遺伝子(HEXB)の遺伝的欠損により、基質である GM2 を主体とする糖脂質、オリゴ糖などが主に中枢神経系の神経細胞等のライソゾームに蓄積し、重症型では重篤な神経症状を呈して乳児期に死亡する病気である。ライソゾーム病に対する治療には 2 つのアプローチ方法がある。1 つ目は欠損酵素の基質の合成を阻害する方法であり、2 つ目は欠損酵素を補う方法である。このうち 1 つ目の基質合成阻害剤はあくまで合成を遅延させるだけなので、重症型に多い酵素の完全欠損型の場合、蓄積は進行する。一方、欠損酵素を補う治療法のひとつである酵素補充療法は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 SD を含むほとんどのライソゾーム病で起きる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継続する必要があり、莫大な医療費を必要とするなどの問題がある。欠損酵素を補うもうひとつの方法として、欠損酵素の分泌能をもった細胞群を体内に移植・生着させ、必要な酵素を持続的に供給させる細胞移植療法がある。現在、広く臨床応用されている細胞移植療法は、造血幹細胞移植であり、早期に造血幹細胞移植を行うことで病状の改善、進行抑制が認められるが、進行した骨や中枢神経病変への治療効果が芳しくないこと、ドナー不足による供給の不安定性、安全性(移植の成功率の低さ)などの問題を抱えている。現在、新規の細胞移植療法として、体性幹細胞、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞等を用いた細胞移植治療の研究がなされている。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。

## 2. 研究の目的

本研究は先天性代謝異常症のひとつであるライソゾーム病に対する新規の細胞移植治療法の開発を目的とする。ヒト間葉系(幹)細胞およびヒト iPS 細胞をライソゾーム病のモデルマウスに対して移植し、治療効果および安全

性を総合的に解析・評価する。本研究は現在根本的な治療法がないライソゾーム病に対して有望な治療法を提示する。

## 3. 研究の方法

SD モデルマウスの中枢神経系に対する細胞治療を想定し、我々のグループで樹立したヒト間葉系(幹)細胞・iPS 細胞の神経細胞への分化誘導を行う。ヒト間葉系(幹)細胞、iPS 細胞、神経細胞を SD マウス由来の繊維芽細胞(樹立済)および初代培養神経細胞と共培養し、SD マウス由来の細胞への取り込みを酵素定量法によって解析する。また、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、SD 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 SD マウス(SD-scid)を作製する。細胞移植治療の効果の評価については SD 病の特徴的分解不全産物として知られている N-グリカン由来分解不全糖鎖の量を指標にする。そのためにその分析法として、尿中糖鎖を精製してトリチウムによる還元末端標識をし、その構造を HPLC により解析する。

## 4. 研究成果

(1) Man-6P 糖鎖結合  $\beta$ -Hexosaminidase 精製のための MPR-カラムの作成

SD 病治療で必要とする Man-6P 糖鎖の結合した  $\beta$ -Hexosaminidase の存在量を示すためには、この糖鎖に特異的に結合する Man-6P 受容体(MPR)固定化カラムが必須である。そこで産業技術総合研究所 千葉博士から御供与頂いた Man-6P 受容体ドメイン 9 を発現した酵母から Man-6P 受容体を精製した。これを CNBr-活性化セファロース 4B に常法に従い固定化した。固定化ゲルのタンパク量は 0.2mg/ml gel であった。

この Man-6P 固定化ゲルの活性を検定するため、Man-6P 糖鎖結合  $\beta$ -Hexosaminidase を分泌している健常人線維芽細胞(Detroit)とこの Man-6P 糖鎖を全く生合成できない I-cell 病患者線維芽細胞(F657)の培養液を用いた。これらの培養液を 0.5ml ゲルを詰めたカラムにアプライし、Man-6P 溶液で結合成分を溶出した。各画分の  $\beta$ -Hexosaminidase 活性を測定した結果、I-cell 酵素では全く結合成分が無かったのに対し健常人では約 16%の活性がゲルと特異的に結合しており、このゲルが SD 病治療で必要とする Man-6P 糖鎖結合  $\beta$ -Hexosaminidase の存在量を示し、またその精製にも利用可能であることを示した(図 1)。

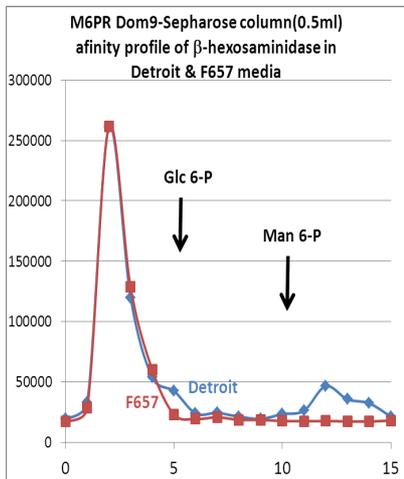


図1 健康人線維芽細胞(青線)及び I-cell 病患者線維芽細胞(赤線)の培養液に存在するβ-Hexosaminidase の MPR 固定化カラムに対する結合性

(2) リソゾーム病患者尿中に存在する特異的オリゴ糖の精製のためのカラムの選択

ヒトやマウス尿中には糖鎖分析を妨害する様々な物質が混在しており、これらを除去して特異的糖鎖のみを精製する前処理カラムを選択する必要がある。そこで、モデル糖鎖としてマンノシドーシスと GM1-ガングリオシドーシス患者尿中から精製し、トリチウムで還元標識したオリゴ糖を用いた。試したカラムは糖鎖精製によく用いられている Con A-セファロース、Porous Graphite Carbon (PGC)、BuOH:EtOH:Water(4/1/1)系によるセファロース 4B、活性炭の4種である。マンノシドーシス糖鎖(Man<sub>2-9</sub>GlcNAc<sub>OT</sub>)、GM1-ガングリオシドーシス糖鎖((Gal-GlcNAc)<sub>1-n</sub>Man<sub>2-3</sub>GlcNAc<sub>OT</sub>)とも活性炭カラムで非結合画分(青色)がほとんどなく結合画分(赤色)のみ認められるが、総溶出量他のカラムよりも少ない(図2)。最も回収率が高く妨害成分の分離も期待できるカラムは PGC であった。

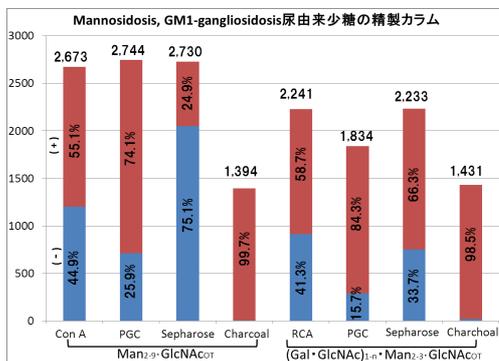


図2 モデル糖鎖を用いた4種類の糖鎖精製カラムの結合性の違い  
左がマンノシドーシス患者由来糖鎖、右が GM1-ガングリオシドーシス患者由来糖鎖

(3) ヒトおよびマウスSD病患者尿中に存在する特異的オリゴ糖の分析

リソゾーム病ではその疾患原因酵素特有の分解不全オリゴ糖が尿中に蓄積していること

が知られている。その蓄積量を定量化すれば細胞移植による治療効果を判定する良い指標となる。ヒト SD 病患者尿に排泄されるオリゴ糖の構造は既に多くの報告があるが、マウスではまだ詳細は明らかになっていない。そこでヒトおよびマウス SD 病個体の尿から Porous Graphite Carbon カラムでオリゴ糖を精製し、NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>により還元末端標識した。<sup>3</sup>H-標識オリゴ糖を SD 病特異的オリゴ糖を認識する PVL カラムにアプライすると、一部結合成分が溶出された(図3)。これを HPLC により分析すると、ヒト、マウスとも GlcNAc<sub>1-2</sub>-Man<sub>3</sub>-GlcNAc<sub>OT</sub> の溶出位置と一致するピークが認められ(図4)、マウスでもヒトと同様のオリゴ糖が尿中に大量に排泄されていることが明らかになった。このことから、細胞移植治療を行った SD マウスの尿中オリゴ糖を分析すれば、その治療効果を継時的に非侵襲的に判定することが可能になった。

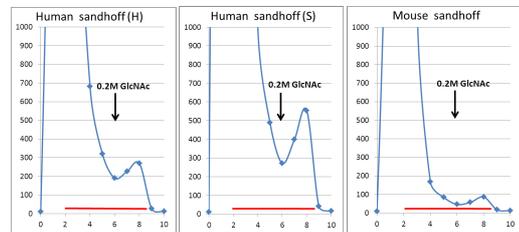


図3 PVLカラムによるSD病特異的オリゴ糖の分離 赤線部分(遅延画分と結合画分)を回収する。

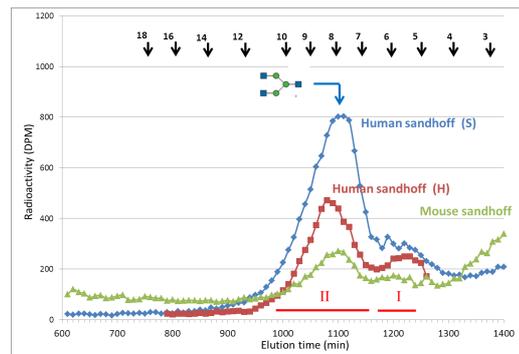


図4 図1中のPVL結合オリゴ糖のHPLC溶出プロフィール

(4) SD-scid モデルマウスを用いた細胞移植治療の試み

細胞移植に際し免疫学的拒絶を起こさないようにするため SD マウスを重症複合免疫不全マウス(scid マウス)と交配させ、SD-scid マウスを作製した。次に SD-scid マウスに対して iPS 細胞を移植し細胞治療を試みた。45日後に血清中のβ-Hexosaminidase 活性を測定したところ、正常マウスの5~15%程度まで酵素活性が回復していた(図5)。

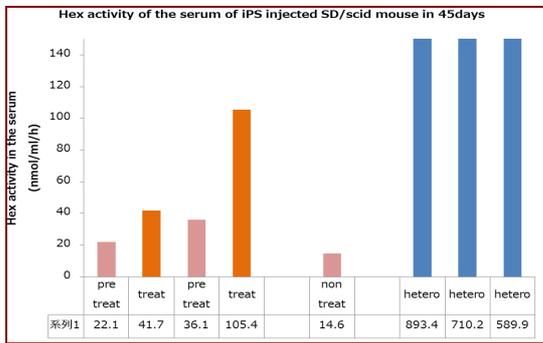


図5 細胞製剤移植によるSD-scidマウスの血中-Hexosaminidase量の増加

このことから、iPS細胞の移植治療による酵素製剤治療に代わるSD病治療の可能性が示された。期待される結果は100%の活性の回復の必要は無く、少しの回復でも細胞内の分解不全を解消するには十分で可能性もあり、これを証明するには上に示したような分解不全産物糖鎖の解析が必要であり、現在解析中である。

#### 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1件)

大倉隆司, 神崎誠一, 梅澤明弘, 「リソゾーム病(I-cell病)細胞の分解不全少糖」第87回日本生化学会大会、京都、平成26年10月17日

[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]

無し

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

大倉 隆司(OHKURA, TAKASHI)

独立行政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)

独立行政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