

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07067

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来骨格筋幹細胞によるポンペ病に対する細胞移植治療

研究課題名(英文) Cell therapy for Pompe disease using iPSC-derived muscle stem cells

研究代表者

櫻井 英俊 (Sakurai, Hidetoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：80528745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポンペ病はGAAの変異により、ライソゾーム内にグリコーゲンが異常蓄積し、心筋・肝臓・骨格筋などに障害を来す疾患である。酵素補充療法により生命予後は劇的に改善されたが、骨格筋症状の改善は乏しい。

そこで本研究では、ポンペ病患者由来iPS細胞にGAAを強制発現することで遺伝子治療を施し、その細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導し移植することで、筋再生と同時に強制発現されたGAAが補充され、酵素補充療法としても効果があるかどうかを検証した。その結果、生着部位のみならず周辺の筋線維も含めてライソゾーム肥大が消失していた。このことは再生医療に加え酵素補充療法としても効果があったことを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポンペ病はライソゾーム病に分類され、酵素補充療法によってその生命予後は劇的に改善した。しかしこの効果は心筋や肝臓での効果を反映しており、骨格筋に対する酵素補充の効果は限定的で、人工呼吸器の使用を余儀なくされる症例も多い。これは一つには骨格筋への酵素の取り込み効率が悪いこと、もう一つには骨格筋の体積が非常に大きく、十分な酵素の細胞内濃度を確保できないことにある。我々の開発した方法では、これらの問題点を解決しうることを示唆されており、今後のポンペ病に対して、自家iPS細胞への遺伝子治療を施した細胞移植酵素補充療法の確立に向けた第一歩になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Pompe disease is a disease caused by mutations in GAA, resulting in abnormal accumulation of glycogen in lysosomes and damage to cardiac, liver, and skeletal muscles. Although enzyme replacement therapy has dramatically improved the prognosis of the patients, the improvement of skeletal muscle symptoms has been poor.

In this study, we applied gene therapy by over expressing GAA in iPSC cells derived from Pompe disease patients, and then induced differentiation and transplantation of skeletal muscle stem cells from the cells to see if the over expressed GAA could be replenished at the same time as muscle regeneration and if it was effective as enzyme replacement therapy. The results showed that lysosomal hypertrophy disappeared not only in the grafted area but also in the surrounding muscle fibers. This suggests that the treatment was effective not only as a regenerative medicine but also as an enzyme replacement therapy.

研究分野：再生医学

キーワード：ポンペ病 細胞移植治療 遺伝子治療 酵素補充療法

1. 研究開始当初の背景

ポンペ病は糖原病 2 型とも呼ばれ、ライソゾームでグリコーゲンを分解する酵素である酸性 alpha glucosidase(GAA)の変異により、ライソゾーム内にグリコーゲンが異常蓄積し、乳児重症型ではライソゾーム機能が高度に障害されることにより、心筋・肝臓・骨格筋などに障害を来す。2006 年よりリコンビナント GAA 製剤である Myozyme が臨床で使用されるようになり、心筋・肝臓の症状は劇的に改善され生命予後は飛躍的に延びた。しかしながら骨格筋症状の改善は乏しく、治療開始が遅れると生命は維持できるものの呼吸筋機能不全のため人工呼吸器管理が必要となる。なぜ Myozyme の治療効果が骨格筋で乏しいのかには未だ議論があるが、骨格筋への GAA の取り込みが不良で効果が不十分と考えられている。また 2 週に 1 回、大量の GAA 酵素製剤を輸注するため、GAA 酵素製剤に対する抗体の産生が惹起されることもあり、治療効果が次第に減弱してゆくと考えられている。筋症状の改善のため、別のアプローチとして遺伝子治療などが模索されているが、骨格筋内に安定してデリバリーすることが困難であり、いまだ臨床応用されていない。

我々はこれまで筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の開発を進めてきた。ヒト iPS 細胞から高い骨格筋再生能力を持つ幹細胞を分化誘導することに成功しており (Zhao et al. Stem Cell Reports, 2020) その骨格筋幹細胞を筋ジストロフィーモデルマウスに移植することで、筋再生を起こし病的・機能的に治療効果を確認している。本研究ではポンペ病に対してもこの iPS 細胞由来骨格筋幹細胞移植治療が有効であるのではないかと「問い」について研究を進め、ポンペ病に対する細胞移植治療法の開発につなげるものである。さらに将来的には自己 iPS 細胞を用いた自家移植での治療法確立も視野に入れ、Pompe 病患者由来 iPS 細胞にゲノム編集により原因遺伝子 GAA を強制発現させた修復株を作製し、この修復株から分化誘導した骨格筋幹細胞を移植することで治療効果を持つかどうかを明らかにしたいと考えた。また強制発現された GAA が細胞間輸送により他の筋線維に取り込まれ、治療効果の範囲が大きくなるという「細胞移植酵素補充療法」という概念を検証したいと考えた。また少量でも持続的に細胞から放出される点、放出される際にはエクソソームなどの脂質膜に囲まれた状態で生体から放出される点を考えても、抗体産生を惹起しにくい方法であることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来骨格筋幹細胞移植によるポンペ病モデルマウスの筋病態の改善効果を検証することであり、遺伝子治療の手法を組み合わせることにより、有効性と効果の持続性を兼ね備えた新規ポンペ病治療法の開発につなげることである。

3. 研究の方法

将来的な自家移植治療法の確立を念頭に、ポンペ病患者由来 iPS 細胞 (Pompe-iPS 細胞) を用いて、恒常的発現が期待できるゲノム領域として知られる AAVS1 領域に CAG プロモーター下でヒト GAA の cDNA が発現されるトランスジェニック iPS 細胞 (GAA-Pompe-iPS 細胞) をゲノム編集技術を用いて作製する。GAA が正常に発現しているかどうかを GAA 活性を測定して確認する。次に得られた GAA-Pompe-iPS 細胞を *in vitro* で骨格筋細胞に分化誘導し、細胞表現型であるグリコーゲンの蓄積やライソゾーム肥大を、PAS 染色やグリコーゲン定量、ライソゾームマーカーである Lamp2 の免疫染色によって解析し、GAA の強制発現により細胞表現型が改善するかどうかを検証する。

並行して、*in vivo* 解析のため免疫不全マウスである NSG マウスバックグラウンドに掛け合わせたポンペ病モデルマウス (GAA-KO/NSG マウス) を作出する。In vivo での移植治療効果検証のため、健常者由来コントロール iPS 細胞、Pompe-iPS 細胞、GAA-Pompe-iPS 細胞それぞれより、2020 年に我々が報告した分化誘導法 (Zhao et al. Stem Cell Reports, 2020) を用いて骨格筋幹細胞を分化誘導し、GAA-KO/NSG マウスの前脛骨筋に筋注にて移植する。移植後 4 週で抗ヒト核抗体にて移植細胞を同定し、骨格筋幹細胞が着生した筋線維において組織学的解析を進め、ポンペ病モデルマウスの表現型であるライソゾーム肥大に対し低下させる効果があるか、筋萎縮が改善しているかを解析する。また GAA-Pompe-iPS 細胞移植サンプルでは、過剰発現した GAA が遠隔で効果を持つ可能性があるため、ヒト核が認められる筋線維だけでなく、遠隔部のヒト核陰性の筋線維においても組織学的な改善があるかどうかを検証する。

4. 研究成果

Pompe-iPS 細胞に GAA を恒常発現させるベクターを AAVS1 領域にノックインし、GAA 安定発現 Pompe 病患者由来 iPS 細胞 (GAA-Pompe-iPS 細胞) の作製に成功した。ホモ株もヘテロ株も、ほぼ同様に GAA 活性の上昇が確認でき、健常者由来株の 2~3 倍程度の活性を持つことが分かった。

また MyoD 強制発現ベクターを用いて骨格筋細胞へと分化誘導し、Pompe 病の表現型について解析した。Pompe-iPS 細胞由来筋細胞では Lamp2 陽性のライソゾームが腫大し核の付近に貯留している様子が認められるが、GAA-Pompe-iPS 細胞由来筋細胞ではそのライソゾームの量が減少していること確認できた。また PAS 染色にて PAS 陽性のグリコーゲン顆粒が Pompe-iPS 細胞由来筋細胞に多く認められるのに対し、GAA-Pompe-iPS 細胞由来筋細胞では減少している様子が観察された。さらにグリコーゲン定量にて GAA-Pompe-iPS 細胞由来筋細胞で有意にグリコーゲンの蓄積が減少していることが明らかとなった。以上の結果から GAA を強制発現することで Pompe 病患者由来筋細胞においても、In vitro で治療効果があることが確認された。

続いて健常人 iPS 細胞、Pompe-iPS 細胞、GAA-Pompe-iPS 細胞の 3 種の iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導した。分化 84 日後に分化細胞を剥離し、フローサイトメトリー解析にて CD82 陽性 CD57 陰性細胞で現わされる骨格筋幹細胞が全ての細胞種で 10%以上誘導できていることを確認した。それらの剥離後の分化細胞を免疫不全ポンペ病モデルマウスの前脛骨筋に麻酔下で移植し、4 週後に安楽死の後に組織学的に評価した。Pompe-iPS 細胞由来の骨格筋幹細胞を移植したマウスでは、ヒト細胞の生着は認めるもののライソゾーム肥大には変化がなく、予想通り Pompe 病病態に対する治療効果がなかった。次に健常人 iPS 細胞由来骨格筋幹細胞を移植したマウスでは、ヒト細胞が生着した筋線維でライソゾーム肥大が消失しており、細胞補充による治療効果が認められた。しかしながら、ヒト細胞が生着していない筋線維ではライソゾーム肥大には変化がなく、周辺の筋線維に及ぶ治療効果は認められなかった。一方で、GAA 安定発現患者細胞では、生着部位でのライソゾーム肥大の消失はもちろん確認された。その上、ヒト細胞生着部位周辺の筋線維までライソゾーム肥大が消失していた。このことは、移植された細胞から産生された GAA がエクソソームなどにより周辺に放出されて、周辺の筋線維で取り込まれて治療効果が得られたことを示唆する。

以上の結果により、Pompe 病患者由来 iPS 細胞に GAA を強制発現するベクターを AAVS1 領域という安定発現が見込めるゲノムローカスに組み込むことで、iPS 細胞自体の表現型が改善することはもちろん、iPS 細胞から分化させた筋細胞でも表現型が改善され、GAA 強制発現の有用性は証明された。さらに GAA-Pompe-iPS 細胞から分化誘導した骨格筋幹細胞を移植することで、移植部位での筋再生による治療効果はもちろん、おそらくは多く発現した GAA が周りの筋線維に取り込まれることにより広い範囲でライソゾーム肥大という病態を改善することが明らかとなり、本研究のコンセプトである「細胞移植酵素補充療法」の有用性は証明されたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有本江里、櫻井英俊
2. 発表標題 CRISPR-Cas9による遺伝子編集患者由来iPS細胞を用いた細胞治療と酵素補充療法の組み合わせによるポンペ病の治療
3. 学会等名 第7回 若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有本江里、櫻井英俊
2. 発表標題 ポンペ病に対する細胞移植による酵素補充療法の開発
3. 学会等名 第8回 骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------