

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791208

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 New Biologics Product (Cell based product) for Lysosomal Storage Disorder

研究代表者

神崎 誠一(Kanzaki, Seiichi)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：20589741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト間葉系(幹)細胞及びヒト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した。ヒト間葉系細胞またはヒトiPS細胞がライソゾーム酵素を細胞外に分泌するかどうかをin vitroで検討した結果、間葉系細胞に比べiPS細胞では分泌量が2倍以上多いことが確認された。次にSDマウスより樹立した細胞とiPS細胞より分化させた細胞を共培養した結果、酵素が取り込まれ、in vitroで治療効果が確認された。続いてSD-scidマウスにiPS細胞を移植し、50日後に血清中のHex活性を測定したところ、正常マウスの5～15%まで酵素活性が回復した。

研究成果の概要(英文)：The cell transplant treatment is regard as the only cure cure for the congenital metabolic disorder, and development of the safe and effective new cell transplant treatment are expected. In this study, I examined effectiveness and safety of the cell based product using the in vitro and in vivo models of SD. The hexosaminidase activity and storage in the fibroblast from SD mouse were improved after cocultivation with the iPS cell derived differentiated cells by the mechanism of cross-correction. Next, I transplanted iPS cells product to SD-scid mouse. In 45 days of transplantation, The serum Hex activity was restored to around 5-15% of the normal mouse. It was thought that an evaluation of the effectiveness of this new biologics product (cell processing product) was enabled by evaluating endpoints such as the improvement of the overall survival rate.

研究分野：再生医療

キーワード：ライソゾーム サンドホフ 再生医療 細胞治療 iPS

1. 研究開始当初の背景

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βヘキサミニダーゼ(Hex)のβ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。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的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・評価することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト間葉系細胞またはヒトiPS細胞は成育医療研究センター細胞医療研究部で樹立された株を用いた。SDマウスは成育医療研究センター動物室にて飼育した(003-2)。In vitroにおけるモデル細胞であるSDマウス由来線維芽細胞(SD cell)は胎生13.5日齢のSDマウスより常法により樹立した。Hexosaminidase活性は4MU法を用いて定量した。In vitroにおける共培養は、セルカルチャーインサートを用いて、分化細胞:SDを細胞量1:1に調製して72時間、共培養を行った。SD-scidマウスはScidマウスとSDマウスとの交配により作製した。

4. 研究成果

ライソゾーム酵素は細胞外に分泌され、隣接する細胞に取り込まれる。このメカニズムはクロスコレクションとして知られており、この原理を利用したライソゾーム病

に対する細胞治療法が開発が望まれている。ヒト間葉系細胞またはヒトiPS細胞がライソゾーム酵素を細胞外に分泌するかどうかをin vitroで検討した。その結果、間葉系細胞(EPCおよびYub)に比べiPS細胞では分泌量が2倍以上多いことが確認された(Fig.1)。

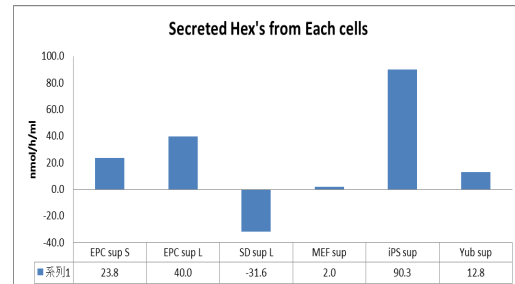


Fig.1 各細胞から分泌された

Hexosaminidase 量

次に、治療効果をIn vitroの系において検討した。SDマウスより線維芽細胞株(SD cell)を樹立した。SD cellにおいてはHex活性が低下しており、治療モデルとして有用であることが確認された。続いて、治療効果を確認する細胞として、iPS細胞より分化させた細胞を選択した。セルカルチャーインサートを用いて、LowerチャンバーにSDマウス線維芽細胞を播種し、UpperチャンバーにiPS細胞由来分化細胞を播種し、72時間の共培養後、SDマウス線維芽細胞のHexosaminidase取り込み量を定量した。その結果、5.6%ライソゾーム酵素量が増加した(Fig.2)。ライソゾーム酵素量は正常の5%程度の量があれば基質の分解は行われると考えられており、本製品の有効性を支持する結果が得られたと考えられる。

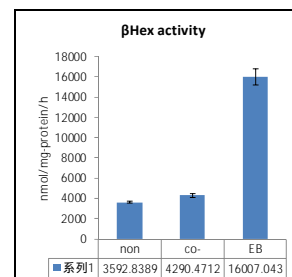


Fig.2 共培養実験によるSDcellへのHexosaminidaseの取り込みの確認

さらに、Hexosaminidase が取り込まれたことにより、酵素の基質の蓄積が減少しているかどうかを検討した。蓄積量と細胞ごとのライソゾーム量(数)には相関関係があることより、蓄積量はライソゾームの蛍光標識マーカーである LysoTracker を用いて、Flowcytometry で定量した。iPS 細胞由来分化細胞との共培養により蓄積量の減少が確認された。また、ライソゾーム酵素の細胞外レセプターであるマンノース 6 リン酸受容体(M6PR)を M6P を用いてブロックしたところ、蓄積量は減少しなかったことより、蓄積の減少がクロソレクションによるものであることが確認された(Fig.3)。

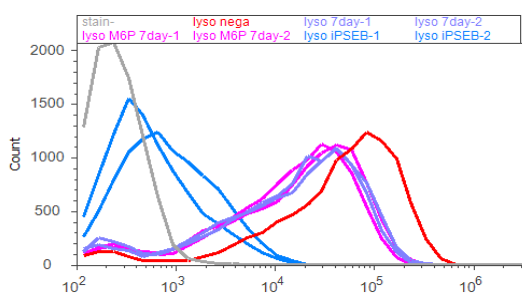


Fig.3 共培養による蓄積量の減少の確認

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、細胞移植時に免疫学的拒絶が起こらない SD マウス(SD-scid) を作製した。SD-scid マウスに対して iPS 細胞を移植し細胞治療を試みた。移植して 45 日後に血清中の Hex 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た(Fig.4)。

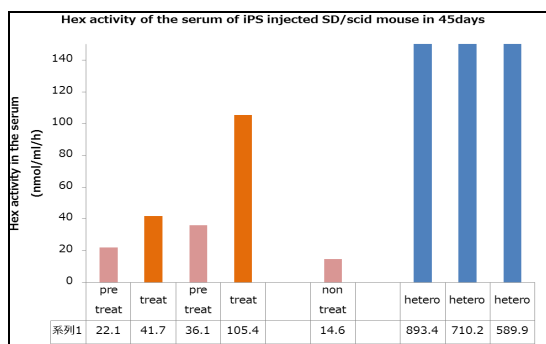


Fig. 4 SD マウスの血中 Hexosaminidase 量の細胞製剤移植による増加

結論

本新規バイオロジクス製剤を SD モデル細胞またはモデルマウスを用いて、in vitro、in vivo で有効性評価を行った結果、欠損酵素である Hexosaminidase の取り込み(クロソレクション)が確認された。また、in vitro では蓄積の減少も確認された。今後は、in vivo におけるさらなる Proof of concept の取得をめざしていく必要があると考えられた。

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)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

(神崎誠一)

研究者番号：20589741

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：