

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：81603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461536

研究課題名(和文) iPS細胞を用いてのファブリ病、ポンペ病の病態解析並びに新規酵素補充療法の開発

研究課題名(英文) Pathogenetic Studies and Novel Enzyme Treatment using Fabry, Pompe and Tay-Sacks iPS cells

研究代表者

衛藤 義勝 (Eto, Yoshikatsu)

一般財団法人脳神経疾患研究所・先端医療研究センター・センター長

研究者番号：50056909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム病の病態解明のためにFabry病、Tay-Sacks病、NPCのiPS細胞をSendaiウイルスベクターを用いて樹立し神経細胞或いはクローン化した神経細胞に於いて病態、治療に関しての研究を行った。

1) Tay-Sacks病iPS細胞での病態代謝の解明 iPS細胞から神経細胞に分化し、ガングリオシドGM2の合成系とGM3合成系を検討し、GM3の合成系の低下GM2の合成の亢進系の病態を解明。又デオキシノジリマイシンの合成系影響を検討した。

2) ファブリ病、NPCでの病態を解析では神経細胞にクローン化した細胞での、オートファジーのメカニズム、Spin1治療の応用に関して検討した。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathology of lysosomal disease, iPS cells of Fabry disease, Tay-Sacks disease, NPC were established using Sendai virus vector, and try to generate in neuron cells. Using clonal cells and iPs derived cells, we conducted the research on disease mechanism and their treatment. 1) Elucidation of pathological metabolism in iPS cells of Tay-Sacks disease - differentiation from iPS cells into nerve cells to investigate the synthesis system of Ganglioside GM2 and GM3. 2) Analysis of autophagy and its treatment in Fabry disease and NPC clonal cells: Increased Leucine with high expression level of Spin 1 leads to decreased autophagic expression in NPC patient-derived cell lines. These findings indicate the possibility that leucine might contribute to the treatment of NPC and Spin 1 expression contributes to treatment of NPC.

研究分野：小児科学

キーワード：ライソゾーム病 IPS細胞 Tay-Sacks病 Niemann-Pick病 Fabry病 MLD

### 1. 研究開始当初の背景

ライソゾームは種々の加水分解酵素を有し、細胞内において不要となった老廃物を分解する役割を担っている細胞小器官である。ライソゾーム病はこの分解酵素が先天的に欠損あるいは活性低下することにより、老廃物が体内に蓄積することで引き起こされる疾患である。欠損している酵素により約40疾患が知られている。本研究ではライソゾーム病診断法開発のためにライソゾーム病の病態、診断、治療に向けての研究をiPS細胞樹立し、病態代謝、治療法の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

研究成果は、各種ライソゾーム、ファブリ病(古典型、亜型)、テイサック病、MLD各種細胞からセンダイウイルス又はレトロウイルスベクターを用いてiPS細胞の作成並びにiPS細胞並びに神経細胞での形態検討(電子顕鏡、特異的マーカーによる染色等)を明らかにした。iPS細胞の病態を解析するためNPC或いはファブリ病でのオートファジーの解析、更にオートファジーの治療に関してSpin-1などの治療法を検討した。

### 3. 研究の方法

各種ライソゾーム病患者皮膚線維芽細胞からセンダイウイルス、レトロウイルスベクターを用いてiPS細胞を作成し、Tay-Sacks病iPS細胞でのガングリオシド合成系。更にてオキシノジリマイシンの治療効果を検討すると同時にNPC細胞でのオートファジーの異常並びにロイシンの治療効果を検討した。

### 4. 研究成果

ライソゾーム病の病態解明のためにFabry病、Tay-Sacks病、NPCのiPS細胞をSendaiウイルスベクターを用いて樹立し、神経細胞或いはクローン化した神経細胞に於いて病態、治療に関しての研究を行った。

1) Tay-Sacks病iPS細胞での病態代謝の解明 iPS細胞から神経細胞に分化し、ガングリオシドGM2の合成系とGM3合成系を検討し、GM3の合成系の低下、GM2の合成の亢進系の病態を解明。又、デオキシノジリマイシンの合成系影響を検討した。

2)ファブリ病、NPCでの病態を解析：神経細胞にクローン化した細胞での、オートファジーのメカニズム、Spin1治療の応用に関して検討した。ニーマン・ピック病の患者由来繊維芽細胞株を通常培地からアミノ酸、及び血清除去した培地に8時間処理すると、ライソゾームが増大し、オートファゴソームが増加(LC3II)し、オートファジー基質であるp62が蓄積した。そこで、オートファジー不

全を検証するため、LC3 turnover assayにより、オートファジーfluxが停止していた。これらの結果により、ニーマン・ピック病の患者由来繊維芽細胞株では、オートファジーが不全であると示唆された。また、ロイシン添加により、増大したライソゾーム、蓄積したp62が減少したため、ロイシンがニーマン・ピック病の治療に寄与する可能性を見出した。さらに、正常繊維芽細胞株と比較し、ニーマン・ピック病の患者由来繊維芽細胞株ではSpin1の発現量が低かった。これは、Spin1の発現がニーマン・ピック病の機序に関与し、特に未解明であるオートファジー後期機構解明につながる重要な現象であると示唆された。

### 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 10件)

1. The severe clinical phenotype for a heterozygous Fabry female patient correlates to the methylation of non-mutated allele associated with chromosome 10q26 deletion syndrome. Hossain MA, Yanagisawa H, Miyajima T, Wu C, Takamura A, Akiyama K, Itagaki R, Eto K, Iwamoto T, Yokoi T, Kurosawa K, Numabe H, Eto Y. Mol Genet Metab. 2017 S1096-7192(17)30012-4.

2. Identification of Cryptic Novel -Galactosidase A Gene Mutations: Abnormal mRNA Splicing and Large Deletions. Higuchi T, Kobayashi M, Ogata J, Kaneshiro E, Shimada Y, Kobayashi H, Eto Y, Maeda S, Ohtake A, Ida H, Ohashi T JIMD Rep. 2016;30:63-72.

3. Characteristics of Cerebral Microbleeds in Patients with Fabry Disease. Kono Y, Wakabayashi T, Kobayashi M, Ohashi T, Eto Y, Ida H, Iguchi Y. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016 Jun;25(6):1320-5.

4. Cholesterol ester storage disease with a novel LIPA mutation (L264P) that presented massive hepatomegaly: A case report. Kuranobu N, Murakami J, Okamoto K, Nishimura R, Murayama K, Takamura A, Umeda T, Eto Y, Kanzaki S. Hepatol Res. 2016 Mar;46(5):477-82.

5. Disease modeling and lentiviral gene transfer in patient-specific induced pluripotent stem cells from late-onset Pompe disease patient. Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Shimada Y, Era T, Kimura S, Eto Y, Ida H, Ohashi T. *Mol Ther. Methods Clin Dev.* 015 Jul 8;2:

6. Prevalence of Fabry disease in dialysis patients: Japan Fabry disease screening study (J-FAST).

Saito O, Kusano E, Akimoto T, Asano Y, Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Akiba T, Saito A, Ishimura E, Hattori M, Hishida A, Guili C, Maruyama H, Kobayashi M, Ohashi T, Matsuda I, Eto Y. *Clin Exp Nephrol.* 2016 Apr;20(2):284-93. doi: 10.1007/s10157-

7. A method for measuring disease-specific iduronic acid from the non-reducing end of glycosaminoglycan in mucopolysaccharidosis type II mice.

Shimada Y, Wakabayashi T, Akiyama K, Hoshina H, Higuchi T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. *Mol Genet Metab.* 2016 Feb;117(2):140-3.

8. Identification of a novel GLA MUTATION (F69I) in a Japanese Patient with late onset Fabry disease

Umeda T., Hashimoto S., Takamura A., Fujisaki M., Eto Y. *Human Genome Variation*, 2015, 2, 15044

9. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Corrects Neuropathic Phenotype in Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type II. Wakabayashi T, Shimada Y, Akiyama K, Higuchi T, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. *Hum Gene Ther.* 2015 Jun;26(6):357-66.

10. Proteasome Inhibitor Bortezomib Enhances the Activity of Multiple Mutant Forms of Lysosomal  $\alpha$ -Glucosidase in Pompe Disease.

Shimada Y, Nishimura E, Hoshina H, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. *JIMD Rep.* 2015;18:33-9.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27 日～29 日、東京  
乾燥ろ紙血 (DBS) を用いての酸性ライソゾームリパーゼ欠損症 (LALD) のハイリスクスクリーニングに関する研究 宮島任司, 秋

山けい子, Wu Chen, 五十嵐純子, Mohammad Arif Hossain, 柳澤比呂子, 衛藤義勝

2. 第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27 日～29 日、東京

ニーマンピツク C 型におけるオートファージ不全を改善する因子の解析

柳澤比呂子、秋山恵子、石井智裕、渡部和彦、衛藤義勝他

3. 第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27 日～29 日、東京

ファブリ病腎移植男性例 2 例の経過と有効性 衛藤薫、宮島任司、Arif Hossain、柳澤比呂子、衛藤義勝他

4. 第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27 日～29 日、東京

著明な反復性下腿大潰瘍を呈した古典型ファブリ病男性例

岡田隼、宮島任司、Arif Hossain、柳澤比呂子、衛藤義勝

5. 第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27 日～29 日、東京

新生児スクリーニング DBS で解析した Lys o P C の X 連鎖性副腎白質ジストロフィー症診断としての可能性、Wu Chen、宮島任司、五十嵐純子、秋山恵子、柳澤比呂子、衛藤義勝

6. 第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27 日～29 日、東京

乾燥ろ紙血を用いた神経セロイドリポフスチン症 NCL1, II 患者ハイリスクスクリーニングに関する研究、板垣里奈、柳沼恵子、遠藤昌弘、高村歩美、秋山恵子、柳澤比呂子、岩本武夫、衛藤義勝

7. 第 58 回日本先天代謝異常学会、2016 年 10 月 27 日～29 日、東京

SPG1 (Spastic paraplegia) - 著明な色素沈着を呈し ALD が疑われた症例

衛藤義勝、板垣里美、柳沼恵子、柳澤比呂子、三井純他

8. 第 21 回日本ライソゾーム病研究会、9 月 30 日、10 月 1 日、東京

ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症に対するセベリパーゼアルファの第三相臨床試験における日本人症例報告 衛藤 義勝 1、村上潤 2、天野 克之 3

9. 第 21 回日本ライソゾーム病研究会、9 月 30 日、10 月 1 日、東京

Severe Clinical Phenotype of Fabry Female Patient with Mental Retardation  
MA Hossain, H Yanagisawa, T Miyajima, C Wu, R Itagaki, K Akiyama, T Iwamoto and Y Eto.  
Advanced Clinical Research Center,  
Institute of Neurological Disorders.

10 . 第30回日本小児脂質研究会、11月26  
~27日、東京

A Severe Accumulation of  
Globotriaosylceramide with a Fabry Female  
Patient Advance Clinical Research Centre,  
Institute of Neurological Disorders ○  
Mohammad Arif Hossain, H Yanagisawa, T  
Miyajima, C. Wu, R Itagaki, K Akiyama,  
T Iwamoto, Y Eto

11 . 第30回日本小児脂質研究会、11月26  
~27日、東京副腎白質変性症

(Adrenoleukodystrophy, ALD,  
Adrenomyeloneuropathy, AMN) の遺伝子治  
療に向けて DBS を用いた極長鎖脂肪酸のタ  
ンデム MS によるスクリーニング法の検討  
○Chen Wu1) 2) 岩本 武夫 3) 宮島任  
司 1) 2) 五十嵐 純子 2) 秋山けい子 1)  
柳澤 比呂 1) Arif Hossein1) 新宅治  
夫 4) 衛藤義勝

12 . 第30回日本小児脂質研究会、11月26  
~27日、東京 ニーマンピック病C型におけ  
る治療効果をオートファジー不全から探る

○柳澤比呂子 1) 秋山けい子 1) 石井智裕  
2) 河上江美子 3) 遠藤 堅太郎 3) 山元  
大輔 4) 渡部和彦、衛藤義勝

13 . 第39回日本分子生物学会 2016年(横  
浜) オートファジーの視点による Fabry 病治  
療効果

柳澤比呂子、ホセイン・モハンマド・アリフ、  
宮島任司、秋山けい子、五十嵐純子、  
衛藤義勝

14 . WORLD Symposium 2017、2017年2月  
13日~16日、サンディエゴ

Lysosomal acid lipase deficiency: high  
risk screening of patients with fatty  
liver and dyslipidemia using DBS in Japan.  
Takashi Miyajima, Keiko Akiyama, Junko  
Igarashi, Mohammad Arif Hossain, Hiroko  
Yanagisawa, Yoshikatsu Eto

15 . WORLD Symposium 2017、2017年2月  
13日~16日、サンディエゴ

The severity of phenotype for a  
heterozygous Fabry female patient

correlates to the methylation of  
non-mutated allele

Mohammad Arif Hossain\*, Hiroko  
Yanagisawa, Takashi Miyajima, Chen Wua,  
Ayumi Takamura, Keiko Akiyama, Rina  
Itagaki, Kaoru Eto, Takeo Iwamoto, d,  
Yoshikatsu Eto\*\*

16 . WORLD Symposium 2017、2017年2月  
13日~16日、サンディエゴ

A Fabry Male Patient Associated with  
Recurrent Giant Skin Ulcer In Lower  
Extremity  
Jun Okada1, Takeshi Miyajima2, Arif  
Hossein2, Hiroko Yanagisawa2, Yoshikatsu  
Eto2

17 . WORLD Symposium 2017、2017年2月  
13日~16日、サンディエゴ

Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL) Type  
I Associated with Diabetes Mellitus  
Kaoru Eto, Rina Itagaki, Takamura A.,  
Satoru Nagata, Yoshikatsu Eto

〔図書〕(計 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：  
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

衛藤 義勝 (ETO, Yoshikatsu)  
一般財団法人脳神経疾患研究所・

先端医療研究センター・センター長  
研究者番号：50056909

(2)研究分担者

藤崎 美和 (FUJISAKI, Miwa)  
一般財団法人脳神経疾患研究所・  
先端医療研究センター・その他  
研究者番号：50642641

研究分担者

辻 佳代子 (TSUJI, Kayoko)  
一般財団法人脳神経疾患研究所・  
先端医療研究センター・研究員  
研究者番号：60584232

研究分担者

柳澤 比呂子 (YANAGISAWA, Hiroko)  
一般財団法人脳神経疾患研究所・  
先端医療研究センター・研究員  
研究者番号：60416659

研究分担者 HOSSAIN Arif  
一般財団法人脳神経疾患研究所・  
先端医療研究センター・研究員  
研究者番号：40777893

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし