

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790716

研究課題名（和文）：心ファブリー病患者人工多能性幹細胞を用いた心臓特異的病態の解明

研究課題名（英文）：(Explication of organ specific pathogenesis in patients with cardiac Fabry disease using induced pluripotent stem cells)

研究代表者：吉満 誠 (YOSHIMITSU MAKOTO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70404530

## 研究成果の概要（和文）：

心Fabry病患者の心臓特異的病態の解明を目的とした研究である。倫理委員会承認後に心Fabry病患者より線維芽細胞を採取し、レンチウイルス、レトロウイルスを用いた系でiPS細胞の樹立を試みた。健常者線維芽細胞からのiPS細胞樹立は容易であったが、心Fabry病患者からのiPS細胞樹立はできなかった。幹細胞へのリプログラミング過程における $\alpha$ -galactosidase Aの役割についてさらなる検討が必要である。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to explicate organ specific pathogenesis in patients with cardiac Fabry disease using induced pluripotent stem cells. Upon approval of our local ethical committee, cardiac Fabry patient derived fibroblasts were established. Despite the success of establishment of iPS cells from healthy donor, we are not able to establish iPS cells from cardiac Fabry patient derived fibroblasts using lentiviral or retroviral reprogramming gene transduction. Further study is definitely required to reveal the role of defective enzyme alpha-galactosidase A in the process of reprogramming into iPS cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：iPS細胞、心Fabry病

## 1. 研究開始当初の背景

Fabry病は $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -gal A)酵素活性欠損・低下によって全身への基質の蓄積により引き起こされる。これまで500を超える遺伝子異常が報告されているが、その中で唯一g. 9331 G>A変異によるスプライシング異常(exon4-5間にintron4の57塩基挿入)は心Fabry病のみで同定されている。その臓器特異的障害機序は明らかでない。これまで心室後壁の菲薄化を伴う心機能の著しく低下した心Fabry病患者では心筋生検による検討は極めて侵襲的かつ不十分な検体採取量であることから本遺伝子異常の心筋細胞での意義は詳細に検討できていない。本研究はFabry-iPSモデルを用い、心筋細胞を含めた様々な組織細胞への分化誘導を試みることで、組織別 $\alpha$ -gal A遺伝子のスプライシング異常/正常mRNA比、酵素活性、基質の蓄積を比較検討し、その病態解明を目指す。本テーマはiPS細胞技術の開発が、これまで困難であった疾患の病態解明・治療法探索へ応用できる格好のモデルである可能性がある。

## 2. 研究の目的

Fabry-iPS モデルを用い、心筋細胞を含めた様々な組織細胞への分化誘導を試みることで、組織別 $\alpha$ -gal A 遺伝子のスプライシング異常/正常 mRNA 比、酵素活性、基質の蓄積を比較検討し、その病態解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) レトロウイルスベクターを用いたリプログラム因子の遺伝子導入により Fabry 病患者及び心 Fabry 病患者より iPS 細胞樹立を樹立する。iPS 細胞特異的遺伝子発現の確認、

免疫不全マウスへの接種による奇形腫作成能の確認を行い ES 細胞様形質を持つことを確認する。

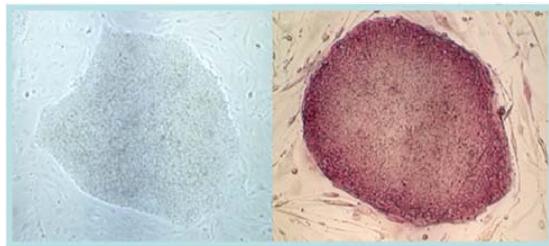
(2) Fabry-iPS 細胞の心筋細胞/神経細胞を含めた 3 胚葉系への分化誘導を試みる。組織特異的遺伝子発現・形態的特長を観察し分化能を評価する。心 Fabry-iPS 細胞由来心筋細胞における異常/正常スプライシング  $\alpha$ -gal A mRNA の定量、 $\alpha$ -gal A 酵素活性の定量、基質(Gb3)の定量を行うことで、心 Fabry 病患者における心筋細胞とその他の組織での異同を in vitro で再現、評価する。尚比較対象として、正常人由来 iPS 細胞、他の Fabry 病由来 iPS 細胞、iPS 由来神経細胞を用いる。

## 4. 研究成果

(1) インフォームドコンセントの取得・Fabry 病及び心 Fabry 病患者からの皮膚線維芽細胞の樹立

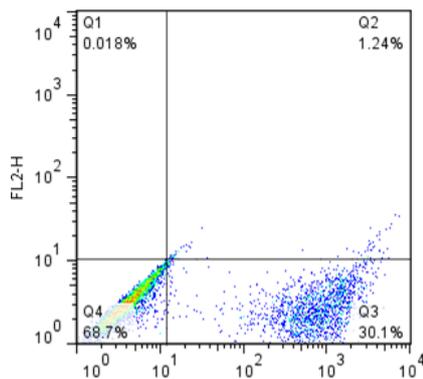
当講座では、比較的稀とされる心 Fabry を含む Fabry 病患者の診療を日常的に行っている。このため、心 Fabry 病・Fabry 病患者より線維芽細胞を樹立し、iPS 細胞を樹立しやすい継代数の低い状態で iPS 細胞の作製に使用することが可能である。課題名“ファブリー病及び心ファブリー患者由来細胞からの iPS 細胞の樹立、iPS 細胞を用いたファブリー病の病態解明・細胞/遺伝子治療法の確立”で鹿児島大学臨床倫理審査申請を行い、承認を得た。また遺伝子組み換え技術を用いるため第二種使用等拡散防止措置機関承認を得た。上記倫理委員会承認後、これまで高齢者心 Fabry 病患者 1 名より同意を得た後、皮膚生検を行い、皮膚線維芽細胞を樹立できた。

(2) まず正常ヒト皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立することを試みた。下図のようにヒト ES 細胞様で、アルカリフォスファターゼ染色陽性となる細胞を樹立することができた。



ヒトiPS細胞      アルカリフォスファターゼ染色

(3) Fabry-iPS 細胞の樹立にあたり、ヒト Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 cDNA をレトロウイルスベクターを用いて導入した。遺伝子導入効率確認のために用いた GFP 発現を確認した。



左に示すように GFP 発現効率は 30%程度と、正常ヒト皮膚線維芽細胞での発現効率 (~80%) と比較し著しく低下していた。心 Fabry 病発症患者は高齢であることが多く、皮膚線維芽細胞

増殖能も低下していることが多い。本症例でも増殖能の低下が遺伝子導入効率の低下を招いていると考えられる。

本細胞を用いて心 Fabry iPS 細胞の樹立を試みたが、樹立できなかった。

(4) 近年 iPS の樹立にあたり、樹立効率を改善するさまざまな試薬が試みられている。PD0325901, CHIR99021, Thiazovivin, SB431542 を組み合わせて樹立を試みたが樹立できなかった。さらにはレンチウイルスベクターを用いて p53 の発現をノックダウンすることで樹立効率の改善を試みたが、樹立することができなかった。

【本研究の意義/今後の展望】 本研究は Fabry 病及び心 Fabry 病疾患特異的 iPS 細胞樹

立を目指した初めての試みであった。本研究は Fabry 病における臓器特異的障害の発症機序の解明を目指した研究であった。心臓のみに障害を起こす心 Fabry 病患者由来 iPS 細胞を用い、心筋への分化誘導を促すことで、典型的 Fabry 病との違いについて検討予定であった。正常皮膚線維芽細胞からは iPS 細胞を樹立することができたが、心 Fabry 病患者由来線維芽細胞からの樹立は、さまざまな条件で検討したが、できていない。Fanconi 貧血のような先天性疾患では iPS 細胞樹立が極めて困難なことが知られているが、Fabry 病では明らかでない。今後引き続き他の心 Fabry 病、ないしは典型的 Fabry 病患者由来の線維芽細胞からの iPS 細胞樹立を試みる。さらには iPS 細胞樹立に必要な因子の検討も併せて行っていきたい。

#### 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 8 件)

1. Pacienza N, Yoshimitsu M, Mizue N, Au BCY, Wang JCM, Fan X, Takenaka T, Medin JA. Lentivector transduction improves outcomes over transplantation of human HSCs alone in NOD/SCID/Fabry mice. *Molecular Therapy*. 2012 Advance online publication 査読有
2. Yoshimitsu M, Higuchi K, Fan X, Takao S, Medin JA, Tei C, Takenaka T. Sequencing and characterization of the porcine alpha-galactosidase A gene: towards the generation of a porcine model for Fabry disease. *Mol Biol Rep*. 2011(38) 3145-3152. 査読有
3. Yoshimitsu M, Higuchi K, Miyata M, Devine S, Mattman A, Sirrs S, Medin JA, Tei C, Takenaka T. Identification of novel mutations in the  $\alpha$ -galactosidase A gene in patients with Fabry disease: Pitfalls of mutation analyses in patients with

low  $\alpha$ -galactosidase A activity.

Journal of Cardiology. 2011 (57)

345-353. 査読有

4. Higuchi K, Yoshimitsu M, Fan X, Guo X, Rasaiah VI, Yen J, Tei C, Takenaka T, Medin JA. Alpha-galactosidase A-Tat fusion enhances storage reduction in hearts and kidneys of fabry mice. Molecular Medicine. 2010 (16) 216-221 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉満誠 (YOSHIMITSU MAKOTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・

特任助教

研究者番号 : 70404530