

総括研究報告書

1. 研究開発課題名: 疾患特異的 iPS 細胞を用いたポンペ病に対する新規治療薬の開発研究
2. 研究開発代表者: 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 准教授 櫻井 英俊
3. 研究開発の成果

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・神経などに障害を来す。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。

そこで我々はポンペ病患者由来iPS細胞を用いて骨格筋細胞を分化誘導し、筋細胞でのMyozyme取り込みを促進する薬剤を市販薬の中からスクリーニングし、ドラッグリポジショニングによって、筋症状を改善するための併用薬剤を同定することを目標とした。

本年度はまずスクリーニングに適した 96well plate での骨格筋細胞分化誘導法の確立と、残存 GAA 活性の評価法の確立を実施した。

骨格筋分化誘導法では、昨年度までは、フィーダー上で培養された iPS 細胞からの筋分化誘導を実施していたが、より安定した分化誘導実現のためフィーダーフリーからの筋分化誘導を実施した。ポンペ病患者由来 iPS 細胞でもフィーダーフリーからの筋分化誘導に成功し、96well フォーマットでロボティクスを用いた分化誘導を実施できた。

残存 GAA 活性の評価法では、分化 8 日目で薬剤を投与し分化 9 日目で rhGAA を添加し、分化 10 日目で rhGAA の取り込み量を解析するプロトコールにて検証を重ねた。ネガティブコントロールとして、マンノース 6 リン酸そのものを添加することにより、rhGAA の細胞内取り込みを阻害できるという報告があったため、この方法を我々のアッセイ系に当てはめ実験した。結果として、競合的な取り込み疎外を確認したものの、想定より非常に多くの rhGAA が筋細胞に取り込まれていることが分かったため、薬剤の有効性が評価しきれない可能性が明らかとなった。現在は、rhGAA 添加時間をより短時間にすることで、十分な陽性ウインドウを持つアッセイ系とする検証を進めている。

また DMSO 添加の影響を検討した。DMSO 添加により 2%vol. までは分化誘導の阻害も、rhGAA の取り込み阻害も起きないことが明らかとなった。この結果より、添加する薬液の量は培地 100uL に対し、2uL で行うことを決定した。最後に病態改善の指標として、ライソゾーム拡大を Lamp2 抗体で検出するプロトコールを確立した。

来年度は、これらの確立されたプロトコールにより、既存薬パネルを用いてのスクリーニングを実施する。