

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) The Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Drug Development for Pompe Disease by Patient-derived iPS Cells
- 研究開発担当者 (日本語) iPS 細胞研究所 准教授 櫻井 英俊
所属 役職 氏名： (英語) Center for iPS Cell Research and Application, Associate Professor, Hidetoshi Sakurai
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) スクリーニング系の至適化、実施
開発課題名： (英語) Optimization and Operation of Drug Screening
- 研究開発分担者 (日本語) iPS 細胞研究所 特定拠点教授 太田 章
所属 役職 氏名： (英語) Center for iPS Cell Research and Application, Professor, Akira Ohta
- 分担研究 (日本語) 病態評価の至適化
開発課題名： (英語) Optimization of Pathological Analysis
- 研究開発分担者 (日本語) 大学院医学研究科発達小児科学 助教 栗屋 智就
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Assistant Professor, Tomonari Awaya
- 分担研究 (日本語) ポンペ病患者由来 iPS 細胞の樹立および提供
開発課題名： (英語) Establishment of Pompe Disease-Specific iPS cells
- 研究開発分担者 (日本語) ウイルス・再生医科学研究所/iPS 細胞研究所 教授 戸口田 淳也
所属 役職 氏名： (英語) Institute for Frontier Life and Medical Sciences/ Center for iPS Cell Research and Application, Professor, Junya Toguchida

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

（和文）

我々は、ポンペ病患者由来 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングにより、ポンペ病に対する酵素補充療法の効果を高める治療薬の開発を行い、In vitro 評価系において筋細胞内への酵素の取り込みを活性化する作用が見られる既存薬 12 種を同定した。

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アルファグルコシダーゼ(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 製剤であるマイオザイム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。なぜマイオザイム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。

我々は、これまでにポンペ病患者由来 iPS 細胞を用いて、筋細胞でのポンペ病の病態再現に成功している。さらに、マイオザイム投与にて筋細胞中のグリコーゲンが減少することも確認しており、マイオザイムの薬効評価が定量的に可能である。そこで、筋細胞でのマイオザイム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、筋症状を改善するための併用薬剤を同定することを目指した。

96 ウェルプレートにポンペ病患者由来 iPS 細胞を播種し、8 日間の骨格筋分化誘導を行い均一な患者筋細胞を得た。マイオザイムを培地に添加し 3 時間後に培養上清を取り出し、培養上清中の GAA 活性を解析することで、細胞中に取り込まれたマイオザイムの量を算定した。化合物の添加は分化 6 日目から 8 日目までの 2 日間とし、コントロール条件の活性値から 5SD 以上の活性低下を認めた化合物をヒット化合物とした。2160 個の既存薬を含む既知の化合物ライブラリをスクリーニングし、53 個の第 1 ヒット化合物を得た。さらに再現性試験を行い 30 個の化合物を絞り込み、続いて細胞生存率の検証を行い、細胞死を誘導する毒性の強い化合物 18 個を除外した。最終 12 個の化合物についてライソゾーム内に異常蓄積したグリコーゲンを減少させるかどうかを検証し至適化合物の同定を進めた。今後はヒット化合物によるライソゾーム機能改善の検証を目指す。

(英文)

Pompe disease is caused by an inborn defect of lysosomal acid α -glucosidase (GAA) and is characterized by lysosomal glycogen accumulation primarily in the skeletal muscle and heart. Patients with the severe type of the disease, infantile-onset Pompe disease (IOPD), show generalized muscle weakness and heart failure in early infancy. They cannot survive over two years. Enzyme replacement therapy with recombinant human GAA (rhGAA) improves the survival rate, but its effect on skeletal muscle is insufficient compared to other organs. Although, it is still under discussion why the effect of rhGAA treatment is limited on skeletal muscle, several reports have shown that the intake of administrated rhGAA in skeletal muscle cells is lower than that of cardiomyocytes.

Here we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with IOPD and differentiated them into myocytes. Differentiated myocytes showed lysosomal glycogen accumulation, which was dose-dependently rescued by rhGAA. This cell model enables us to evaluate the efficacy of rhGAA treatment in IOPD-iPS cell-derived myocytes. Then, we plan to screen repositioning drugs which can act as a “rhGAA intake inducer” using patient-iPS cell model for screening.

We have developed myogenic differentiation protocol of human iPS cells in 96 multi-well plate. We added candidate drugs at six days differentiation. Eight days after induction, IOPD-iPS cell-derived myocytes were differentiated in more than 80% efficiency, and we administrated rhGAA in the culture wells. Three hours after administration, we took out the supernatant of each culture well and analyzed the activity of GAA. If GAA activity of the supernatant were reduced, cellular intake of rhGAA might increase by the added drugs. We configured a criteria for hit compounds as decrease the supernatant residual rhGAA activity more than 5 SD of control wells. We had screened 2,160 existing drugs and known chemical compounds, and obtained 53 hit compounds which met the criteria. Next, we assessed the reproducibility of induction of rhGAA intake of each hit compounds, and obtained 30 reproducibly hit compounds. Next, we assessed the toxicity of each hit compounds by analyzing cell viability after 24 hour treatment. We found out that 18 compounds showed cell toxicity, then we obtained 12 hit compounds. Finally, we have been confirming the effect of 12 hit compounds to analyze an amount of glycogen in the lysosome of IOPD-myocytes after co-treatment of rhGAA and the candidate compounds. In future, we will confirm an amelioration of lysosomal dysfunction by the treatment of some hit compounds.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Modeling Muscular Disease Utilizing Patient-derived iPS Cell、口頭、Hidetoshi Sakurai、
The 29th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell
Technology、2016/11/10、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞研究の最前線—その成り立ちと臨床応用への取り組み、櫻井英俊、福知山成美高校特別
講演会、2016/8/2、国内

(4) 特許出願

該当なし