

機関番号：32651

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591233

研究課題名 (和文) レンチウイルスベクターシステムによるクラッベ病遺伝子治療

研究課題名 (英文) Lentiviral vector mediated gene therapy for Krabbe disease

研究代表者

小林 博司 (KOBAYASHI HIROSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90266619

研究成果の概要 (和文)：我々は改変した HIV 由来のレンチウイルスベクターシステムを用いて進行性神経疾患であるクラッベ病の遺伝子治療を検討した。クラッベ病の欠損酵素発現遺伝子 GALC を組込んだレンチウイルスを作成し、大量培養および超遠心により高力価ウイルスの作成に成功。日齢 1 - 2 のクラッベ病モデルマウス (Twitcher mouse) に対して高力価レンチウイルスを静脈経路で全身投与し、その効果を調べた結果、治療群において栄養状態、寿命の有意な改善を見た。また大腿神経の病理学的な改善 (グロボイド細胞の減少) も得られている。また基質合成阻害剤である L-シクロセリンの皮下注射を併用したところ、表現型の更なる改善が認められた。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the effect of lenti-virus mediated gene therapy for Krabbe disease. We succeeded in preparing high titer lenti-virus including GALC, deficient enzyme in Krabbe disease expressing gene by large scale harvesting and ultracentrifuge, and injected for neonatal twitcher mouse, model for Krabbe disease resulted in efficient improvement in nutrition and life span. And we had more efficient improvement in the phenotype of twitcher mice by the combination of gene therapy and substrate reduction therapy using L-cycloserine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝、先天異常学、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

本研究では脳をはじめとする多臓器の広範な病変を有する疾患、特に遺伝性酵素欠損症の一つであるライソゾーム蓄積症の中でも出生後早期に発症し急激な脱髄による進行性神経症候を発現するGloboid Leukodystrophy (GLD, Krabbe disease)を研究対象とする。この疾患群では細胞内小器官であるライソゾームに存在する酵素 β -galactocerebrosidase, GALCの遺伝的欠損により様々な細胞にその基質が蓄積し細胞機能障害を引き起こし、神経系にも異常蓄積が存在する。

理論的には欠損酵素GALCをコードする遺伝子を中枢神経を含む各臓器に導入することが重要な治療戦略となるが、特に中枢神経系への導入は血液脳関門の存在により大循環系からのアプローチは困難とされる。このため最近ではマウスモデル脳への直接注射、マンニトールなどの前処置などの工夫が為されているが、広範な部位への遺伝子導入やその発現の持続においては解決すべき課題も多い。また中枢神経系に導入できても、機能生命予後の改善は思わしくないことも多く、原因として末梢神経系を含む他臓器細胞の不十分な遺伝子発現や免疫の関与も考慮されている。

今回我々はこれまで十分に解決されていないこれらの諸問題を検討し、我々の研究室で従来扱ってきた Twitcher mice

(Krabbe 病マウスモデル)を用いて有効な遺伝子治療法を研究開発することを本研究の目的とする。

2. 研究の目的

今回我々はこれまで十分に解決されていないこれらの諸問題を検討し、我々の研究室で従来扱ってきた Twitcher mice (Krabbe 病マウスモデル)を用いて臨床でも有効な遺伝子治療法を研究開発することを本研究の最終目的とする。

3. 研究の方法

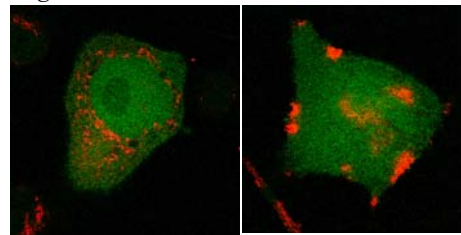
Krabbe 病欠損酵素 GALC を組み込み、下流に I R E S 配列を介した e G F P (enhanced green fluorescent protein) 発現遺伝子を組込んだレンチウイルスベクター(SMPUR-MCU3-GALC-IEGFP)を作成し、更に大量培養、超速心などにより力価の向上を図る。高力価レンチウイルスベク

ターを新生児モデルマウスに静脈投与し(日齢 0-2 での顔静脈への静脈注射による新生児マウスへの全身投与)、時系列での栄養状態、寿命、中枢神経系を中心とした各臓器での酵素活性発現、蓄積物質サイコシンの定量、real time PCR によるベクターコピー数の検討により遺伝子治療の効果を検討する。また現在骨髄移植との併用で効果を上げている基質合成阻害剤 L-シクロセリンの皮下注射を日齢 5 から隔日で施行し遺伝子治療と併用する群を作成し、遺伝子治療単独群と比較検討した。

4. 研究成果

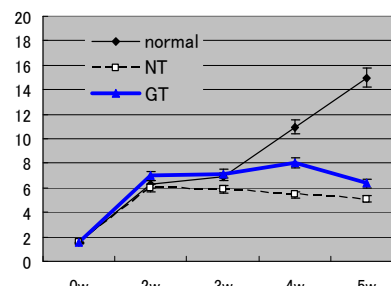
まず培養細胞株において感染させた希釈系列に従って濃度依存性に GALC 酵素活性の上昇、G F P の発現が見られた。更に oligodendrocyte cell line において感染させた細胞は G F P 発光および O 4, π G S T などの oligodendrocyte 特異的なマーカーの共発現が見られた。(Fig. 1a, b)

Fig.1a(O4/GFP) 1b(π GST/GFP)



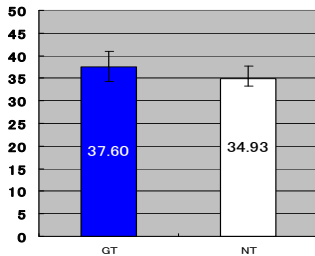
次に in vivo での実験系では、マウス新生児遺伝子治療群において栄養状態、寿命の有意な改善を見た。栄養状態としては 3 週齢、4 週齢のマウスで無治療群より有意に平均体重の増加が得られ ($p=0.000146$, $p=0.000136$) だが、5 週齢以降では見られなかった。(Fig.2)

Fig.2



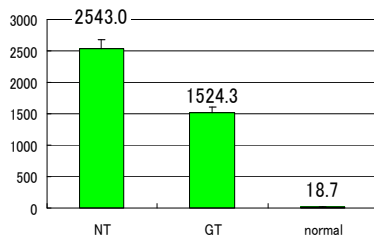
また寿命に関しては無治療群平均 34.93 日に対し、遺伝子治療群では 37.6 日と有意な延長が見られた ($p=0.03$) (Fig.3.)

Fig.3



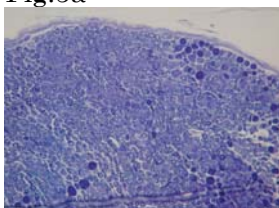
生化学的にも脳、肝臓で酵素活性の上昇、(脳での無治療群 3.14pmol/mg, 治療群 3.30pmol/mg, 肝での無治療群 2.39nmol/mg, 治療群 0.90nmol/mg、 $p=0.01$) サイコシン蓄積の有意な低下 (脳での無治療群 2543.0pmol/mg, 治療群 1524.3pmol/mg, $p=0.009$ [Fig.4], 肝での無治療群 50.5pmol/mg、治療群 54.3 pmol/mg) が見られた。

Fig.4. Psychosine accumulation

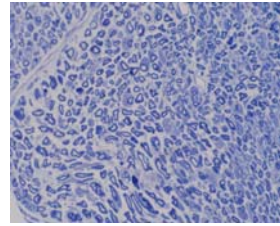


また治療に用いるレンチウイルスの力価を上げることによって、大腿神経の病理学的な改善 (グロボイド細胞の減少) も確認されている。(Fig.5a 低力価ウイルスベクターでの治療群; グロボイド細胞が多く見られる、5b 高力価での治療群: グロボイド細胞がほとんど見られず、神経線維の走行も正常化)

Fig.5a

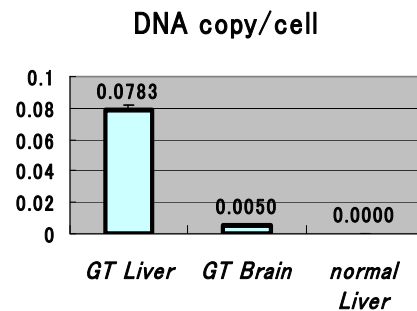


5b



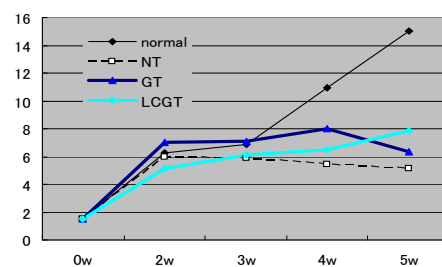
更に5週齢での各臓器のレンチウイルス DNA の定量的な分布計測では realtime PCR にて 遺伝治療群の肝で 0.0783copy/cell 脳で 0.0050copies/cell と5週齢でも存続がみられている。これは長期発現を裏付ける結果と考えられる。

Fig.6



また基質合成阻害剤である L-シクロセリンの皮下注射を併用したところ、表現型の更なる改善が認められた。特に5週以降で遺伝子治療単独群の平均体重を逆転し、最終日齢も伸びている。

Fig.7



以上よりレンチウイルスは Krabbe 病遺伝子治療に用いるのに有効なベクターだと考えられるが、生命予後を劇的に改善させるまでには至っていない。今回施行した基質合成阻害剤の併用など新たな戦略が必要となると考えられる。

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)

[学会発表] (計2件)

Kobayashi H., Ariga M., et al. 16th
Japanese Society of Gen and Cell
Therapy. 2010.7.1. Tochigi., Japan.

小林博司、有賀賢典ほか 第113回日本小
児科学会 2010.4.24.盛岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 博司 (KOBAYASHI HIROSHI)
東京慈恵会医科大学 医学部 講師
研究者番号：90266619

(2) 研究分担者

木村 高弘 (KIMURA TAKAHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：00307430

河合 利尚 (KAWAI TOSHINAO)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：20328305