

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591234

研究課題名(和文) リソゾーム病の神経病変を標的とした新規骨髄移植法の開発

研究課題名(英文) Development of novel bone marrow transplantation for treatment of CNS disorders in lysosomal disease.

研究代表者

三宅 紀子(MIYAKE NORIKO)

日本医科大学・医学部・テクニカルサポートスタッフ

研究者番号：00421206

研究成果の概要(和文)：異染性白質ジストロフィー(MLD:metachromatic leukodystrophy)は arylsulfatase A(ASA)の遺伝的酵素欠損により、脳白質をはじめとする全身の組織にスルファチドなどの脂質が蓄積し、主に大脳白質が広範囲に障害される脱髄疾患である。現在のところ有効な治療法はなく、新しい治療法の開発が期待されている。本研究では神経症状の改善が可能な新規骨髄移植法を開発を目的として、造血幹細胞の自己複製を促進させる homeobox B4(HoxB4)遺伝子発現骨髄細胞を用いた移植により MLD モデルマウスを使用し、神経症状の治療が可能か検討を行った。移植後8ヶ月にて脳を解析したところ、骨髄細胞にHoxB4を遺伝子導入し発現させることにより、脳内により多くの移植細胞が確認され、ASA欠損 MLD マウスにおいてスルファチドの減少と、行動実験において有意な改善を認めた。HoxB4 遺伝子発現骨髄細胞移植は MLD などの脱髄性疾患の治療に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the contribution of bone marrow (BM) cells to treat neurological disorders, we examined the effectiveness of BM cells expressing the homeobox B4 (HoxB4) gene to cure mice with metachromatic leukodystrophy (MLD) through transplantation. Increased number of donor cells was observed in brains of the MLD mice transplanted with HoxB4-transduced BM cells (B4MLD) in contrast to those transplanted with control GFP-transduced BM cells (MIGMLD). Transplantation of BM cells overexpressing HoxB4 appears to effectively prevent the progression of MLD in this mouse model. These findings support the idea that hematopoietic stem cells (HSCs) transduced with a HoxB4 expression vector could be useful carriers of therapeutic proteins into the brain for regeneration of oligodendrocytes to treat such demyelinating disorders as MLD, Krabbe disease and multiple sclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：内科学臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝・先天異常学・異染性白質ジストロフィー

## 1. 研究開始当初の背景

リソゾーム酵素欠損症（以下リソゾーム病）は、リソゾーム内の加水分解酵素が遺伝的に欠損しているため糖脂質が蓄積する先天性代謝異常症である。1型（非神経型）ゴーシェ病やファブリー病など神経症状を伴わないリソゾーム病に対しては精製した欠損酵素を定期的に静脈注射する酵素補充療法の有効性が確認されている。しかし、arylsulfatase A(ASA)の欠損症である異染性白質ジストロフィー(MLD:metachromatic leukodystrophy)のような神経変性を伴う疾患に対しては血液脳関門(BBB: blood brain barrier)の存在が大きな障害となり、有効な治療戦略が立てられていない。また治療法の1つとして骨髄移植も行われ有効例の報告もみられるが、神経症状を伴うリソゾーム病に対しての有効性は疑問がある。これらの中樞神経症状を治療する方法として遺伝子治療が期待されている。我々は、欠損酵素を発現するアデノ随伴ウイルスベクター(AAV: adeno-associated virus)の脳内直接注入による遺伝子治療法を試みMLDモデルマウスの治療に成功している(Kurai *et al.*, Mol. Ther. 2006)。しかしMLDでは全ての神経系組織が障害されており、直接注入法で脳全体を治療するためには広い領域について多数・頻回のベクター注入が必要であり、技術的にも倫理的にも臨床応用の可能性は低い。また欠損酵素を発現する骨髄細胞を移植する骨髄幹細胞遺伝子治療も報告されている(Biffi *et al.*, Nature Med. 2004, J. Clin. Invest. 2006)が、人への臨床応用においては遺伝子導入細胞の生着率が悪いために治療効果が発揮されない可能性が高い。よって遺伝性神経変性疾患を治療するためにはBBBの壁を越える新しいアプローチが必要である。近年、骨髄移植により移植した細胞が脳神経細胞へ分化されることは報告されており神経疾患の治療法として期待されているが、しかし、効率が悪いために治療効果が発揮されないことが問題となっている。我々はhomeobox transcriptional factor B4 (HoxB4)発現骨髄細胞が骨髄幹細胞の増殖をもたらし、その結果移植による生着率の向上が可能である事を報告している(Miyake *et al.*, Stem cell 2006)。この結果に基づき、HoxB4発現骨髄細胞の骨髄移植への有用性、脳神経細胞への分化、しいては神経病変の治療効果を検討する。

## 2. 研究の目的

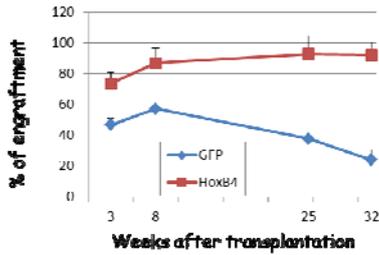
リソゾーム酵素欠損症では、一般的に酵素補充療法の有効性が期待できるが神経変性を伴う疾患に対してはBBBの存在が大きな障害となり、有効な治療戦略が立てられていない。本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う、MLDをモデルとして、脳神経組織に対する新しい骨髄移植法、およびそれを応用した遺伝子治療の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

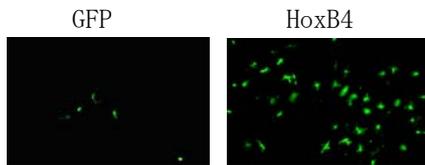
- 1) HoxB4の遺伝子導入  
5FU処理した正常マウスの大腿骨より骨髄細胞を採取し、レトロウイルスベクターにてHoxB4+GFPまたはコントロールとしてGFP遺伝子を導入する。
- 2) 導入細胞の移植  
致死量の放射線を受けたMLDモデルマウスに、①正常骨髄、②GFP遺伝子導入骨髄、③HoxB4+GFP遺伝子導入骨髄を移植する。
- 3) 移植率、生着率の解析  
移植マウスから採血を行い、フローサイトメトリーにより生着率を経時的に確認すると共に、どの細胞へ分化したかを抗体にて染色し確認をする。
- 4) 神経細胞への分化の解析  
マウスから脳を採取し凍結切片作成後、抗GFP抗体にて神経細胞への分化数の比較を行う。またどの神経細胞へ分化したのか免疫染色にて解析を行う。
- 5) 治療効果の検討  
MLDモデルマウス：スルファチドの定量、染色、行動実験を行う。
- 6) 安全性の検討  
治療モデルマウスを長期(1年以上～2年)に観察し、採血を行い異常な細胞増殖、分化等ないか確認をする。また腫瘍等の有無の確認も行う。

## 4. 研究成果

- 1) 新規骨髄移植法として、HoxB4を骨髄細胞に導入し移植実験を行った。移植後3, 8, 25, 32週に経時的に末梢血から採血をおこない、GFP陽性率(移植率)をフローサイトメーターにより解析を行った。HoxB4を導入した骨髄ではコントロールに比べ高い生着率を示した。

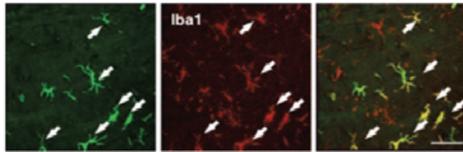


2) 中枢神経系への移植細胞の効率を見るために、移植後8ヶ月にて脳を解析したところ、HoxB4 移植マウスではコントロールに比べ多くのGFP 陽性細胞を認められた。

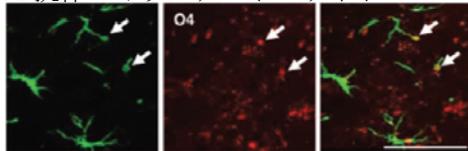


3) 移植細胞がどの神経細胞に分化したのか検討をするために、Iba1 抗体にてマイクログリア、O4 抗体によりオリゴデンドロサイトの免疫染色をおこなった。GFP 陽性細胞はほとんどがマイクログリアに分化していたが HoxB4 移植マウスにおいては、オリゴデンドロサイトにも分化されていることが確認された。

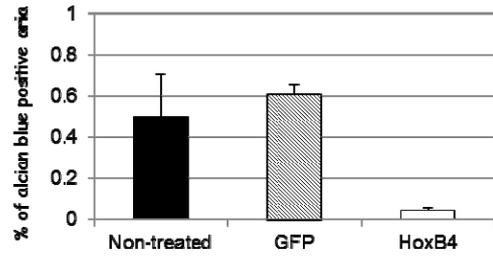
Iba1 抗体:マイクログリア



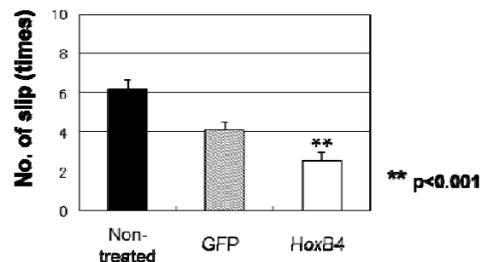
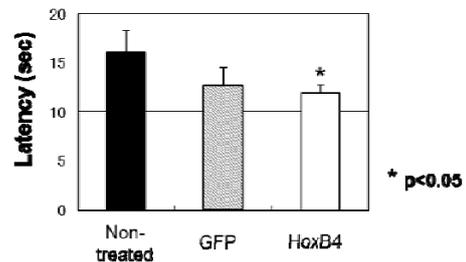
O4 抗体:オリゴデンドロサイト



4) 中枢神経への治療効果をみるために移植後8ヶ月にて脳を解析した。ASA 遺伝子欠損により、脳へ蓄積するスルファチドを Alcian blue により染色及び生化学的定量を検討した。HoxB4 移植 MLD マウスはコントロールと比べて優位にスルファチドの減少を認めた。



5) またもう一つの中枢神経への治療効果の判定のためにバランスビームテストによる行動実験を行った。行動実験においても、HoxB4 移植 MLD マウスはコントロールと比べて優位に Latency, slip とともに神経症状の改善が認められた。



6) このことより骨髄細胞に HoxB4 を遺伝子導入し発現させることにより、脳内により多くの移植細胞が確認され、ASA 欠損 MLD マウスにおいてスルファチドの減少と、行動実験において有意な改善を認めた。より多くの移植細胞が脳内に確認されたのは HoxB4 発現により脳内にて増殖されたためと推測された。また、HoxB4 を発現させることにより、オリゴデンドロサイトへの分化が確認され、HoxB4 遺伝子発現骨髄細胞移植は MLD などの脱髄性疾患の治療に有用と考えられた。本研究では治療実験中に癌化等の副作用は認められなかったが、今後臨床応用に向けて、慎重な副作用、安全性の検討を行っていく必要があると思われる。

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)

[雑誌論文] (計7件)

1. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Hirai Y, Shimada T: Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. Brain Res. (査読・有) 2011. 1389:19-26
2. Miyake N, Miyake K, Karlsson S and Shimada T: Successful treatment of metachromatic leukodystrophy using bone marrow transplantation of HoxB4 overexpressing cells. Mol. Ther. (査読・有) 2010. 18:1373-1378
3. Iwamoto N, Watanabe A, Yamamoto M, Miyake N, Kurai T, Teramoto A, Shimada T: Global diffuse distribution in the brain and efficient gene delivery to the dorsal root ganglia by intrathecal injection of adeno-associated viral vector serotype 1. J Gene Med. (査読・有) 2009. 11:498-505

[学会発表] (計7件)

1. Miyake N et al. Long term correction of biochemical and neurological abnormalities of MLD model mice by systemic neonatal injection of serotype 9. 2010. 5. 21. Washington, DC. 13th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy
2. Miyake N et al. Global gene transfer in the CNS and phenotypic correction of MLD model mice by systemic neonatal injection of serotype 9 AAV vector. 2010. 6. 14. Gothenburg, Sweden. European Human Genetics Conference
3. Miyake N et al. Widespread transduction in the CNS and phenotypic correction of MLD model mice by systemic neonatal injection of serotype 9 AAV vector. 2010. 7. 3. Tochigi. The 16th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. Miyake N et al. Adeno associated virus (AAV)-mediated neonatal gene therapy of metachromatic leukodystrophy. 2009. 10. 23. Hawaii. 59th Annual Meeting of the American Society of

Human genetics

5. Miyake N et al. Adeno-associated virus (AAV) mediated neonatal gene therapy of metachromatic leukodystrophy. 2009. 9. 26. Nagoya. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases
6. Miyake N et al. Direct comparison of adeno-associated virus serotypes for global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery 2009. 7. 9. Osaka. The 15th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy
7. Miyake N et al. Direct comparison of adeno-associated virus serotypes for global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery 2009. 5. 30. San Diego. The 12th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy

[図書] (計1件)

医学のあゆみ: 三宅 紀子 他: 医歯薬出版株式会社: 2011. 228-232

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 紀子 (MIYAKE NORIKO)

日本医科大学・医学部・テクニカルサポートスタッフ

研究者番号: 00421206

(2) 研究分担者

三宅 弘一 (MIYAKE KOICHI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90267221