

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：32666  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25461564  
研究課題名(和文) 低フォスファターゼ症マウスを用いた先天性代謝異常症の再生医療・細胞治療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine and cell therapy for inherited metabolic diseases using hypophosphatasia mice

研究代表者  
飯島 修 (Iijima, Osamu)  
日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40466206  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：低ホスファターゼ症モデルマウス(Akp2<sup>-/-</sup>マウス)に対して骨髄幹細胞を用いた酵素補充療法の検討を行った。骨親和性を付与した組織非特異型アルカリホスファターゼ(TNALP-D10)遺伝子を導入した骨髄幹細胞を生後2日目のAkp2<sup>-/-</sup>マウスに静脈経路で移植した。治療したAkp2<sup>-/-</sup>マウスにおいて、生存期間の有意な延長、骨の石灰化の改善などの治療効果が確認された。これらの結果より、低ホスファターゼ症などの先天性代謝異常症に対する、新規再生医療・細胞治療法の開発に有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the feasibility of bone marrow stem cell-based enzyme replacement therapy (ERT) for hypophosphatasia model mice (Akp2<sup>-/-</sup> mice). Bone marrow stem cells transduced with bone-targeted form of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNALP-D10) gene was intravenously transplanted into neonatal Akp2<sup>-/-</sup> mice on day 2 after birth. The treated Akp2<sup>-/-</sup> mice showed significantly prolonged survival with improved bone mineralization. These results provided us important insight regarding development of novel regenerative and cell therapy for inherited metabolic diseases including hypophosphatasia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生・細胞医療 遺伝子治療 低ホスファターゼ症 骨髄幹細胞 造血幹細胞 骨格筋芽細胞 レンチウイルスベクター アルカリホスファターゼ

### 1. 研究開始当初の背景

低ホスファターゼ症(以下 HPP)は組織非特異型アルカリホスファターゼ(以下 TNALP)遺伝子の異常によって発症する常染色体劣性の先天性代謝異常症で、特に重症度の高い周産期型は血中アルカリホスファターゼ(ALP)活性の減少、全身の骨形成不全を伴って生後早期に死亡するため、出生前後から有効な治療法の開発が待たれている。近年、骨親和性を付与した組換え TNALP 製剤を用いた酵素補充療法が、日本をはじめ米国、ヨーロッパなどで承認されたが、酵素の半減期が短いため定期的な投与が必要で患者への負担や経済的負担が大きい。

酵素補充療法に代わる新たな治療法の開発を目指して、我々は遺伝子治療用のウイルスベクターを用いて正常な TNALP 遺伝子を生後 1~2 日目の HPP マウス (*Akp2*<sup>-/-</sup>マウス)に導入する *in vivo* 遺伝子治療を行い、血中 ALP 活性や骨形成不全の改善など一定の治療効果を確認している (J Bone Miner Res 2011; 26:135-142, Hum Gene Ther 2011; 22:1355-1364)。しかし、体内に直接ウイルスベクターを投与する方法は、投与したベクターへの免疫応答や、生殖組織等への遺伝子導入の可能性など、安全性に関して改善の必要な課題が残されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の問題点を解決するために、*Akp2*<sup>-/-</sup>マウスを用いて、遺伝性の代謝異常症の治療を目的として以下の検討を行った。最初に、骨髄幹細胞が治療用の酵素を全身に供給する担体として機能するか、*Akp2*<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討を行う。

本研究の成果をもとに、先天性代謝異常症など遺伝子治療の適用が考えられている疾患に対して、安全で治療効果の高い新規再生医療・細胞治療技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 骨髄幹細胞への遺伝子導入：8~12 週齢のマウスから骨髄を採取し、磁気ビーズ法にて造血幹細胞を含む骨髄幹細胞を調製した。骨親和性 TNALP (TNALP-D10) 遺伝子を搭

載したレンチウイルスベクターを用いて、骨髄幹細胞に遺伝子導入を行った。

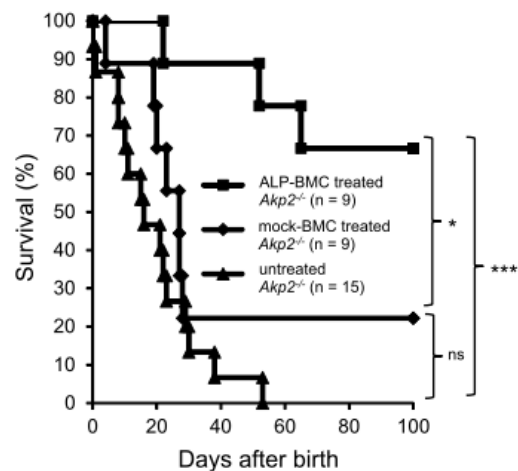
(2) *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスへの骨髄幹細胞移植および治療効果の判定：TNALP-D10 発現骨髄幹細胞を生後 2 日目の新生児 *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスに静脈投与により移植した。治療した *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスから継時的に採血を行い、血中 ALP 活性およびドナー由来の血液細胞の生着率を測定した。観察期間経過後に各臓器を採取し、TNALP-D10 の発現、および骨局所への集積の有無を測定した。

(3) 骨の低石灰化改善効果の確認：治療した *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスから摘出した大腿骨の  $\mu$ CT 解析を行い、得られた骨形態計測パラメーターから、骨形成能の改善効果の有無を評価した。

(4) 骨格筋芽細胞を用いた酵素補充療法の可能性の検討：骨格筋芽細胞が骨髄幹細胞と同様に酵素補充療法の担体として機能するか確認するために、筋肉組織から骨格筋芽細胞を調製し、遺伝子導入効率の検討を行った。

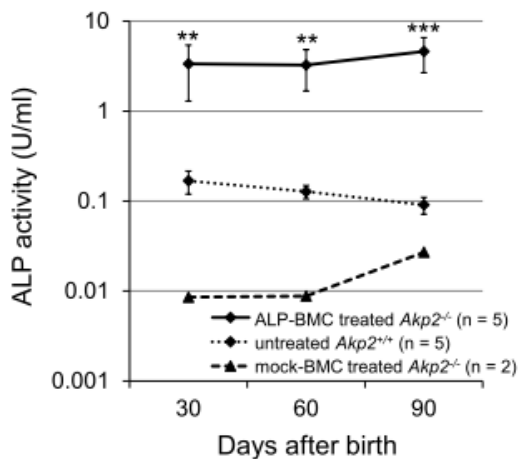
### 4. 研究成果

(1) 未治療の *Akp2*<sup>-/-</sup>マウス(未治療マウス)の生存期間が約 3 週間である一方、TNALP-D10 発現骨髄幹細胞を移植した *Akp2*<sup>-/-</sup>マウス(治療マウス)は 3 か月以上の生存が確認され、未治療マウスまたは未処置の骨髄幹細胞を移植したマウス(対照マウス)と比較して有意に生存期間が延長した(下図。：治療マウス、：対照マウス、：未治療マウス)。

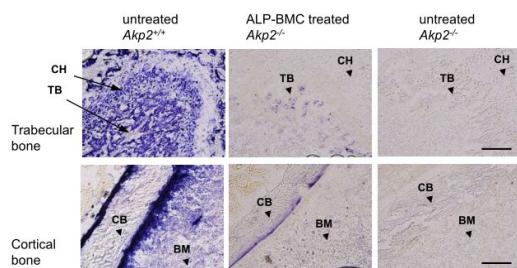


(2) 治療マウスから継時的に採血を行い、血中 ALP 活性を測定した。その結果、移植し

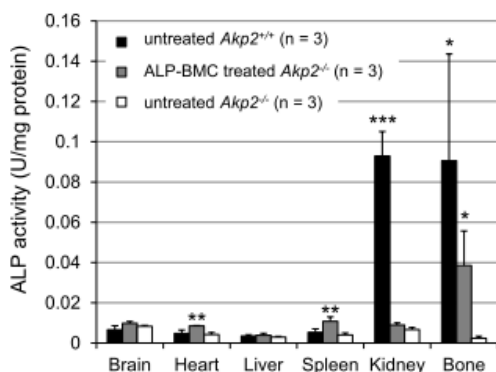
た骨髄幹細胞の生着率は 20~30%の割合で維持されていた。また、治療マウスの血中 ALP 活性は移植後早期に上昇し、治療効果の期待できる 1 U/ml 以上の ALP 活性が長期間維持されていることを確認した(下図)。



(3) 野生型マウス、治療マウス、未治療マウスの下肢大腿骨を摘出し、組織 ALP 活性染色を行った。その結果、未治療マウスでは ALP 活性は全く確認できなかったが、治療マウスにおいて骨梁および皮質骨表面に ALP 活性が認められた(下図中央)。



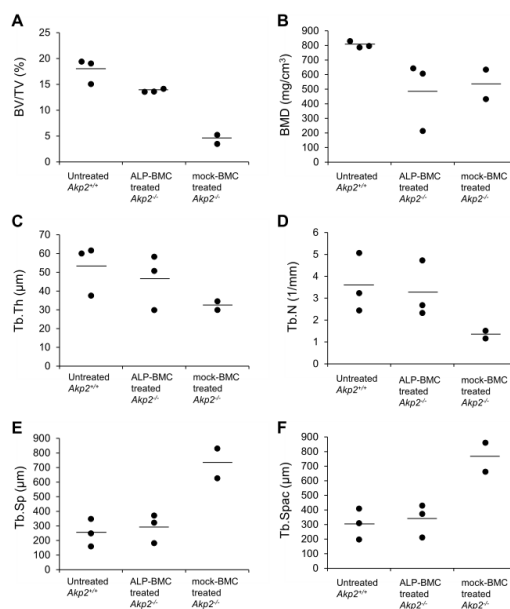
また、各臓器における ALP 活性を測定したところ、骨組織における ALP 活性の有意な上昇を認めた。



これらの結果から、生着した骨髄幹細胞から効率よく骨親和性の TNALP-D10 が発現し、骨

表面に集積して治療効果を発揮していることが示唆された。

(4) 治療後 3 か月間生存したマウスの下肢大腿骨を摘出して  $\mu$ CT 解析を行った。その結果、対照マウスと比較して明らかに骨形成能が改善し、BMD を除く各種骨形態パラメーターが野生型マウスと同レベルまで回復していることが確認された。



(5) 生後 3~5 日の仔マウスから採取した筋肉組織をコラゲナーゼ・ディスパーゼ酵素処理し、得られた細胞懸濁液をプラスチックシャーレに播種した。シャーレ底面に生着した細胞を回収し、抗 Desmin 抗体で染色した結果、骨格筋芽細胞であることを確認した。この細胞に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターで遺伝子導入を行った。その結果、約 80%の細胞で EGFP の発現が確認され、骨格筋芽細胞が酵素補充療法の担体として応用可能であることが示唆された。

本研究によって、低ホスファターゼ症などの先天性代謝異常症に対して一回の移植で長期間持続的な治療効果が得られる、新規再生医療・細胞治療法の有用性が確認された。

## 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 3 件)

1. Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai H, Iijima O, Miyake N, Adachi K, Nitahara-Kasahara Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán JL, Shimada T, Okada T.: Treatment of Hypophosphatasia by Muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatasia via self-complementary AAV8 vector. Mol Ther Methods Clin Dev. 【査読有】3: 15059, 2016.
2. Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Miyake N, Igarashi T, Kanokoda C, Nakamura-Takahashi A, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán JL, Okada T, Shimada T.: Prevention of Lethal Murine Hypophosphatasia by Neonatal Ex Vivo Gene Therapy Using Lentivirally Transduced Bone Marrow Cells. Hum Gene Ther. 【査読有】26: 801-12, 2015.
3. Watanabe A, Satoh S, Fujita A, Naing BT, Orimo H, Shimada T.: Perinatal hypophosphatasia caused uniparental isodisomy. Bone. 【査読有】60: 93-97, 2014.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Nakamura A, Miyake K, Watanabe A, Hirai H, Miyake N, Iijima O, Adachi K, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Shimada T, Okada T.: Gene therapy to rescue lethal hypophosphatasia model mice by Adeno-associated virus mediated muscle transduction of bone-targeted alkaline phosphatase. The 21th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Osaka, July 23-26, 2015.
2. Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Miyake N, Igarashi T, Kanokoda C, Nakamura-Takahashi A, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán JL, Okada T, Shimada T.: Rescue of lethal murine

hypophosphatasia using genetically modified bone marrow cells expressing bone-targeted tissue non-specific alkaline phosphatase. 第11回ALPS研究会、東京、2015年7月18日.

3. Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Iijima O, Miyake N, Adachi K, Nitahara-Kasahara Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán JL, Shimada T, Okada T.: Long-term enzyme replacement therapy for hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone targeted alkaline phosphatase using self-complementary AAV8 vector. 第11回ALPS研究会、東京、2015年7月18日.
4. Nakamura A, Miyake K, Watanabe A, Hirai H, Miyake N, Iijima O, Adachi K, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Shimada T, Okada T.: Prolonged survival and improved phenotypes of lethal hypophosphatasia model mice by Adeno-associated virus mediated muscle transduction of bone-targeted alkaline phosphatase. The 18th American Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting, New Orleans, LA, May 13-16, 2015.
5. Okawa R, Iijima O, Kishino M, Okawa H, Toyosawa S, Shimada T, Okada T, Ooshima T, Nakano K.: Gene therapy improves dental manifestations in Akp2-/- hypophosphatasia mice. The 93th International Association for Dental Research Session, Boston, MA, March 11-14, 2015.
6. Nakamura A, Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Okada T, Shimada T.: Rescue of lethal hypophosphatasia model mice by adeno-associated virus mediated muscle specific expression of bone targeted alkaline phosphatase. The 64th American Society of Human Genetics Annual Meeting, San Diego, CA, October 18-22, 2014.

7. Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Nakamura A, Igarashi T, Kanokoda C, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Okada T, Shimada T.: Neonatal transplantation of lentivirally transduced bone marrow cells for the treatment of lethal hypophosphatasia mice. The 20th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, August 6-8, 2014.
8. Nakamura A, Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Okada T, Shimada T.: Improvement of hypophosphatasia model mice by muscle specific expression of bone targeted alkaline phosphatase using self-complementary AAV8 vector. The 20th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, August 6-8, 2014.
9. Iijima O, Miyake K, Nakamura A, Igarashi T, Kanokoda C, Watanabe A, Shimada T.: Bone marrow cell based enzyme replacement prolongs survival and improves disease phenotypes in a mouse model of lethal hypophosphatasia. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, December 7-10, 2013.
10. 飯島修、三宅弘一、中村有希、鹿子田千津、五十嵐勉、渡邊淳、島田隆：低フォスファターゼ症マウスに対する ex vivo 遺伝子治療法の検討、第 58 回日本人類遺伝学会、仙台、2013 年 11 月 20 日～23 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯島 修 (IIJIMA Osamu)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40466206

### (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：90267211

島田 隆 (SHIMADA Takashi)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20125074  
(平成 27 年度より分担研究者)

### (3) 連携研究者

渡邊 淳 (WATANABE Atsushi)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10307952