

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860884

研究課題名(和文)ライソゾーム蓄積病の骨髄移植における必要最低骨髄細胞生着率の検討

研究課題名(英文)Effect of donor chimerism to reduce the level of glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II

研究代表者

横井 健太郎 (Yokoi, Kentaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20459655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：8週齢のMPSII型のモデルマウスに照射を行い、モデルマウス由来の骨髄細胞と野生型マウス由来の骨髄細胞の比率を4種に混合した後、移植した。全白血球および各血球系のキメリズムは、移植片の割合と同様の傾向を示した。GAGの減少は肝臓や脾臓では低いキメリズムでも治療効果が十分得られたが、心臓では75%以上のキメリズムが必要であった。IDSの改善はGAGの減少と同様の傾向を示した。脳や腎臓、骨では100%キメリズムであっても有意なGAGの減少は認めず、治療効果も乏しかった。MPSII型のBMTにおける治療効果はより高いキメリズムが望ましく、低いキメリズムの場合には追加治療を考慮すべきと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is a lysosomal storage disorder caused by deficient activity of the iduronate-2-sulfatase. This leads to accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) in the lysosomes of various cells. Although it has been proposed that bone marrow transplantation (BMT) may have a beneficial effect for patients with MPS II, the requirement for donor cell chimerism to reduce GAG levels is unknown. We transplanted various ratios of normal and MPS II bone marrow cells in a mouse model of MPS II and analyzed GAG accumulation in various tissues. Chimerism of whole leukocytes and each lineage of BMT recipients' peripheral blood were similar to the infusion ratios. GAGs were significantly reduced in the liver, spleen and heart of recipients. The level of reduction of GAGs in these tissues depends on the percentage of normal cell chimerism. In contrast to these tissues, a reduction in GAGs was not observed in the kidney and brain even if 100% donor chimerism was achieved.

研究分野：小児科学

キーワード：MPS II 骨髄移植 キメリズム

## 1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症 II 型 (MPS II 型、あるいはハンター症候群) は X 連鎖劣性遺伝形式のライソゾーム蓄積病 (LSD) である。イズロン酸 2 スルファターゼ (IDS) 活性低下により、グリコサミノグリカン (GAG)、特にヘパラン硫酸とデルマタン硫酸が諸臓器に蓄積するため、患者は骨格異常、心肥大・心弁膜症、肝脾腫、特徴的な顔貌、上気道閉塞、難聴、中枢神経症状などを呈する。治療法は我が国では酵素補充療法 (ERT) が 2006 年から認可され現在では第 1 選択である。しかし、抗体産生に伴うアレルギー反応や中和抗体による酵素活性の低下、生涯にわたる治療の必要性、中枢神経病変への有効性など様々な問題点が指摘されている。

1980 年代より骨髄移植は、MPS I 型、MPS VI 型、グロボイド細胞白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィーなどの LSD の治療として注目され、ERT の限界を克服しうる可能性を秘めている。しかしながら LSD では通常免疫能が保たれているため、結果としてドナー細胞の生着に強力な移植前処置を必要とし、移植前処置そのものが患者さんの全身状態を悪化させることもある。この問題を克服するための骨髄非破壊的移植前処置は、ドナー細胞の割合の低いキメリズムを生じるため、その治療効果が十分でない場合がある。これまで、ゴーシェ病 I 型、MPS VII 型、ファブリー病に関して、低いキメリズムによる主要臓器への治療効果に関して報告されている。

## 2. 研究の目的

しかし、MPS II 型においてキメリズムと治療効果との関係については解明されておらず、今後、より侵襲性の低い移植前処置が確立された際には非常に重要な情報となる。そこで我々は様々な割合で正常細胞と混合した移植片を用いて人工的に作り出した混

合キメラ状態を作成し、ドナー細胞の生着率、および蓄積物質と酵素活性を諸臓器で検討したので報告する。

## 3. 研究の方法

### 3-1. モデルマウス

提供された雌の MPS II 型ヘテロ接合マウス C57BL/6Ly45.2 (CD45.1<sup>-</sup>CD45.2<sup>+</sup>)(IDS<sup>+/+</sup>) を雄の正常マウスと交配し、MPS II 型モデルマウス C57BL/6Ly45.2 (CD45.1<sup>-</sup>CD45.2<sup>+</sup>)(IDS<sup>-0</sup>) (以下、モデルマウス) を得た。

また、C57BL/6Ly45.1 正常マウス (CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>) と C57BL/6 正常マウス (CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) を交配し、ドナー用の C57BL/6 (CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) 正常マウスを得た。生後 4 週齢で tail tip の PCR 分析により遺伝子型を確定した。今回の動物実験は本学動物実験委員会における審査承認を得て施行した。

### 3-2. 骨髄移植

移植前処置については、生後 8 週齢モデルマウスに対し、MBR1,520R 照射器 (Hitachi) を用いて 9 Gy の全身放射線照射 (条件: 20mA、150kV、4 分以上、2mm アルミニウムフィルター) を行った。移植に用いるモデルマウス及び正常ドナーマウスの骨髄細胞は、大腿骨及び脛骨の骨髄腔へ PBS を急速に通過させて得られた骨髄細胞の塊を 100- $\mu$ m ナイロンストレイナーに通し、BD FACS<sup>TM</sup> Lysing 液 (BD Biosciences) にて赤血球成分を溶血させた。次に、正常ドナーマウスの骨髄細胞数の比が 25%、50%、75%、100% になるように正常ドナーマウスとモデルマウスの骨髄細胞を混合し、放射線照射後のモデルマウスの尾静脈内に  $2 \times 10^6$  個投与した。

### 3-3. フローサイトメトリー

移植後 8 週及び 12 週に末梢血を浅側頭静脈から採血し、溶血後に白血球を FITC-CD45.1 抗体と APC-CD45.2 抗体、および各血球系に関しそれぞれ特異的抗体

(CD45R 抗体：B 細胞系、CD3e 抗体：T 細胞系、Ly6G 抗体：顆粒球系、CD11b 抗体：マクロファージ系)を用いて染色し、フローサイトメトリー (MACSQuant) にて測定した。解析は MACSQuantify にて行い、生着率はドナー由来の細胞すなわち CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>陽性細胞の割合を用いた。

### 3-4. 臓器採取と組織検体の均質化

生後 20 週齢 (移植後 12 週) に、移植を行ったモデルマウスと移植を行っていないモデルマウスの組織採取を行った。全身麻酔下で 20 ml の PBS を用いて心臓還流を行い、大脳・小脳・心臓・肝臓・脾臓・腎臓を摘出し NS-310EH (Microtecnica) で 10 秒間/回、3 回ホモジナイズした。次に検体を 4、14,000g、15 分間遠心し、上清を酵素活性と蓄積物質の測定に用いた。蛋白濃度はピシンコニン酸蛋白定量キット(Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。

### 3-5. 組織 IDS 活性

IDS 酵素活性はこれまでの我々と同様に、4-methylumbelliferyl-alpha-iduronide-2-sulfate (Moscerdam Substrates)を用いて、蛍光光度分光計 RF-5300PC (SHIMADZU Co)にて測定した。酵素活性は nmol/4hr/μg protein で表示し、検査値は 2 回測定の平均で算出した。

### 3-6. 組織全 GAG 測定

組織中の全 GAG はこれまでの我々と同様に、Wieslad® sGAG quantitative Alcian blue-binding assay kit (Euro-Diagnostica)を用いて、コンドロイチン 6 硫酸をスタンダードとして測定した。GAG は μg /mg protein で表示し、検査値は 2 回測定の平均で算出した。

### 3-7. 骨評価

鼻骨から頬骨下顎関節まで頭部を、LCT-200 experimental animal CT システム (Hitachi-Aloka Medical) を用いて測定し、骨密度や皮質骨の厚さは同社の Latheta software を用いて再構築した画像を基に算出した。

### 3-8. 統計学的解析

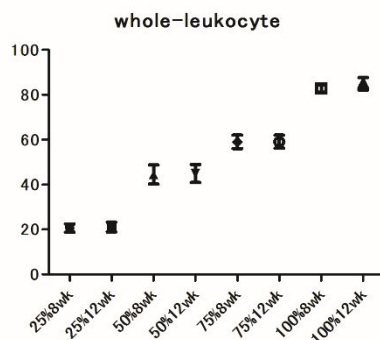
検討には Student's-test を使用し、いずれも  $P < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。すべての統計処理には統計解析ソフトウェア Graphpad Prism software (Graphpad Software, Inc.) を用いた。

## 4. 研究成果

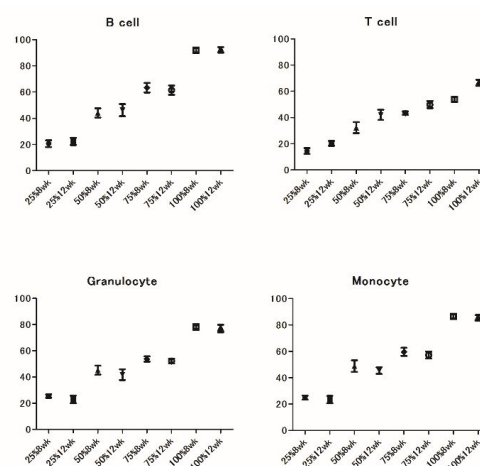
### 4-1. 末梢血における生着率

移植後 8 週と 12 週で測定した末梢血のキメリズムは、混合された移植片の割合とほぼ一致した (a)。すなわち正常骨髄細胞 25% とモデルマウス骨髄細胞 75% の混合移植片を移植すると、正常血液細胞 25% のキメリズムをもつマウスが作製された。また B 細胞、T 細胞、顆粒球、単球についても同様の傾向を認めため (b)、スプリットキメラ状態は否定された。ただ、T 細胞系は他の 3 系統と比較するとやや低い生着率であった。

(a)



(b)

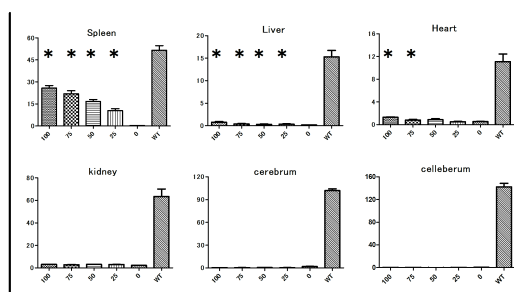


### 4-2. IDS 酵素活性 (図 2)

異なったキメリズムの治療群とモデルマ

ウスにおいて、移植後 12 週に諸臓器の IDS 酵素活性を測定した。

モデルマウスと比較し、肝臓や脾臓では 25%の低いキメリズムでも IDS 酵素活性の有意な上昇を認めた。25%キメリズムにおける肝臓と脾臓での酵素活性は、それぞれ正常マウスの 2%と 20%であった。これに対し心臓では 75%以上の高いキメリズムでなければ、有意な酵素活性の上昇(正常マウスの 7%程度)は認められなかった。そして、腎臓、大脳、小脳では 100% (正常細胞のみ) ドナータイプであっても、有意な酵素活性の上昇を得られなかった。

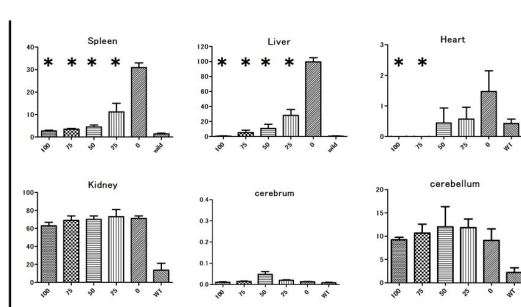


#### 4-3. 全 GAG の蓄積レベル

異なったキメリズムの治療群とモデルマウスにおいて、移植後 12 週に諸臓器の全 GAG を測定した。

モデルマウスと比較し、肝臓や脾臓では 25%の低いキメリズムでも全 GAG の有意な改善を認めた。25%キメリズムにおける肝臓と脾臓での全 GAG は、それぞれモデルマウスの 36%と 28%であった。またこれらの組織では GAG の改善はより高いキメリズムで効果的であり、100%キメリズムが最も効果的な GAG 改善を認めた。これに対し心臓では 75%の高いキメリズムでなければ有意な GAG の改善は認められなかった。

一方、100% (正常細胞のみ) ドナータイプであっても、腎臓、大脳、小脳では有意な酵素活性の上昇を得られず GAG の減少も認められなかった。大脳や小脳では、正常マウスとモデルマウスの GAG 蓄積量に差を認めなかった。



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yokoi K, Akiyama K, Kaneshiro E, et al.( 11 人中 1 番目) 査読あり、Effect of donor chimerism to reduce the level of glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II

*J Inherit Metab Dis.* 2015 Mar;38(2):333-40.

doi: 10.1007/s10545-014-9800-x

〔学会発表〕(計 2 件)

横井健太郎、他 11 人、MPSII 型マウスの骨髄移植における、必要最低骨髄細胞生着率の検討第 56 回日本先天代謝異常学会 . 仙台 . 2014 年 10 月

日本小児血液がん学会

横井健太郎、他 11 人、Effect of donor chimerism to reduce the level of glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II. 第 117 回日本小児科学会 . 名古屋 . 2014 年 4 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jikei-gene.com/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

横井 健太郎 (YOKOI, Kentaro)  
東京慈恵会医科大学 医学部 助教  
研究者番号：20459655

(2)研究分担者

なし ( )

(3)連携研究者

なし ( )

(4)研究協力者

なし ( )