

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461533

研究課題名(和文) ムコ多糖症モデルにおける骨代謝の解析～自然歴と治療効果～

研究課題名(英文) Analysis of the Pathophysiological Mechanism of Bone Lesion in Mucopolysaccharidosis Mouse Model ; Its Natural History and Therapeutic Effect

研究代表者

井田 博幸 (Ida, Hiroyuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90167255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではムコ多糖症(MPS) 型の骨病変の病態メカニズムを探ると共に、レンチウイルスベクターによる造血幹細胞を標的とした遺伝子治療を行ない、MPS 型の骨病変に対する効果を検討し、根治療法の開発を目的とする。まず治療効果を評価する項目を検討する目的でMPS 型マウスの骨の病理学的検討を行なうと共に、骨病変の進行度を表すバイオマーカーの検索を行った。病理では骨形成・吸収のバランスが骨形成に傾いていることが示唆されたが、mRNAによる骨形成・吸収マーカー群の発現を解析したところ有意差を認めず、バイオマーカーは同定出来なかった。現在レンチウイルスベクターを用いた治療介入の効果を調査している。

研究成果の概要(英文)： In this study, we investigate the pathophysiological mechanism of bone lesion in Mucopolysaccharidosis type II (MPS II), and study the effect of ex vivo gene therapy targeting for hematopoietic stem cells.

At first, we investigated the pathology of bone disorder in MPS II mouse model to detect items as control for evaluating therapeutic effects, and searched for bio-markers reflecting the progress of bone lesion. As a result, in the pathological study the balance between bone formation and resorption has been inclined to bone formation in this model, but we could not detect the efficient bio-marker of mRNA reflecting bone formation and resorption for evaluating the therapeutic effect. We are currently evaluating the effect of ex vivo gene therapy for MPS II mouse model using recombinant lentivirus vector.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：ムコ多糖症 型 骨病変 病理 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症 (MPS) 型はライソゾーム酵素のひとつであるイズロン酸 2-サルファターゼ (IDS) の酵素活性低下により全身にグリコサミノグリカン (GAG) が蓄積する疾患であり、肝脾腫、中枢神経障害、心臓弁膜症、骨障害など多彩な症候を呈する疾患であり、ライソゾーム病の一つである。早期幼児期に発症し重症の場合 10 歳前後で死亡する。現時点で、治療法としては造血幹細胞移植や酵素補充療法があるが、本症の QOL を著しく阻害する中枢神経障害や骨病変への効果は不十分である。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は MPS II の骨病変に対する新規治療法を開発する事である。

## 3. 研究の方法

我々の研究室ではレンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞を標的とした遺伝子治療により MPS 型モデルマウスでの中枢神経障害の改善に成功している (Wakabayashi et al. Hum Gene Ther, 2015)。これは、ウイルスベクターにより酵素 IDS を造血幹細胞で大量発現させたことにより、大量の酵素 IDS が持続的に血中に分泌されたため、造血幹細胞移植や酵素補充療法では認められない中枢神経系への効果が認められたものと考えている。そこで骨病変への効果も同様に遺伝子治療により造血幹細胞で酵素 IDS を大量に発現させれば骨病変にも効果があるのではないかという仮説を立てた。今回、破骨細胞・骨芽細胞・骨密度・骨強度など、従来注目

されてこなかった整形外科的視点も取り入れて MPS 型の骨病変の病態メカニズムを探ると共に、レンチウイルスベクターによる造血幹細胞を標的とした遺伝子治療を行ない、MPS 型の骨病変に対する効果を検討し、MPS 型の骨病変への治療法の確立を目指す。

## 4. 研究成果

最初に MPS 型マウスの骨病変への治療効果を検討する上で、何を評価項目としたら良いかを検討する目的で MPS 型マウスの骨の病理学的検討を行なうと伴に、骨病変の進行度を表すバイオマーカーの検索を行うため以下の研究を行った。

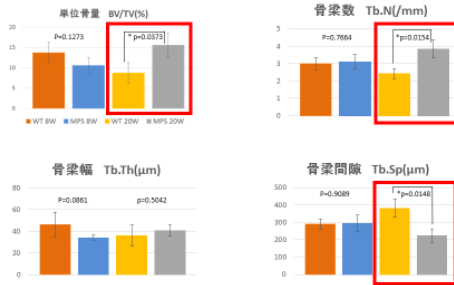
MPS 型マウス・正常マウス (WT) において新生児・生後 8 週・20 週・28 週令のマウスを、n=6 ずつ犠牲死させ、血清、臓器 (脳・肝臓)、頭蓋骨・椎体骨・大腿骨・脛骨を回収した。そのうち、椎体骨・大腿骨からは骨細胞・骨芽細胞・破骨細胞の形態評価、骨密度測定装置 (pQCT) による骨密度・骨塩量測定、3 点曲げ試験による骨強度試験、骨コラーゲン量測定を行った。また脛骨からは病理像を用いて骨形態計測を行い、頭蓋骨からは CT 画像による形態の比較、もう片脚骨・血清・臓器からは血清・骨 mRNA から骨系統のマーカー (骨形成・骨吸収マーカー等) の発現測定を行なった。

### 現時点での結果：

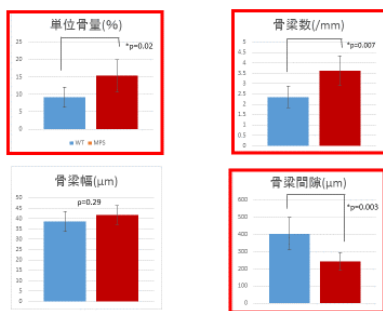
1. 脛骨病理を用いた骨形態計測の結果から生後 20、28 週令いずれの時点においても MPS 型マウスでは単位骨量、骨梁数は増加し、骨梁間隙は減少して

いた(下図)。

骨形態計測(8W,20W n=3)

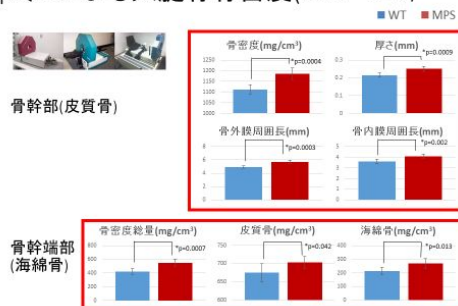


骨形態計測(28W n=6)



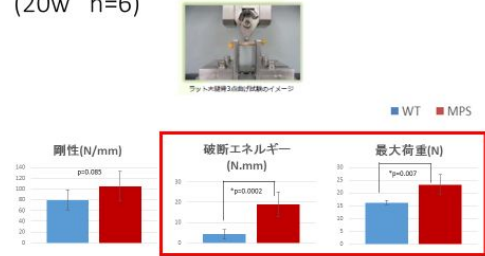
2. pQCTによる大腿骨骨密度測定では骨幹部、骨幹端部ともにMPS型マウスで骨密度が上昇していた(下図)。

pQCTによる大腿骨骨密度(20w n=6)



3. 大腿骨骨強度試験では骨強度は、MPS型マウスで有意に上昇していた(下図)。

大腿骨・骨強度試験(3点曲げ試験)(20w n=6)



4. 血清、骨中の骨システムーカー発現では有意に差があるものは認められなかった。

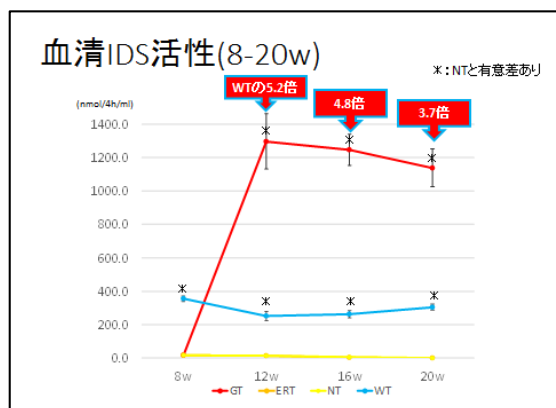
現時点での結論：

以上の結果から、骨形成と骨吸収のバランスが骨形成に傾いていることが示唆されたが、血清・骨 mRNA による骨形成・骨吸収マーカーの発現を解析した結果、MPS 型マウスと WT マウス間では有意差を認めるものはなく、骨形成が増加しているのか、骨吸収が減少しているのかはどちらか不明であった。また治療効果を反映するバイオマーカーは同定出来なかった。これに関しては本モデルマウスの骨病変が軽症であることがその一因である可能性が考えられた。しかし、**骨への遺伝子治療の効果**を評価するためには**脛骨病理による骨形態計測、放射線学的評価(骨密度・骨強度)、が有効であることが判明した。**

## 今後の展望

### マウス造血幹細胞を標的とした MPS 型モデルマウスのレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療

生後 8 週令の MPS マウス(ドナー B6 バックグラウンド 以下 B6MPS マウス)の骨髄から採取した造血幹細胞にレンチウイルスベクターを用いて IDS 遺伝子を導入し、酵素 IDS を大量に発現するようになった造血幹細胞を、放射線 9Gy 照射の前処置をした生後 8 週令 MPS マウス(レシピエント)に移植する。その後 4 週ごとに採血・体重測定を行い、生後 20 週令(治療 12 週後)に安楽死させ、血清・臓器・骨(頭蓋骨・椎骨・大腿骨・脛骨)を回収する。予備実験による途中経過ではあるが、血清による酵素 IDS 活性測定の結果では、治療 B6MPS マウスでは正常(WT)マウスに比べて約 5.2 倍(未治療 B6MPS マウスに比べて約 800 倍)に増加を認めた(下図)。



この約 5.2 倍の酵素 IDS 活性の上昇が骨病変をどの程度の影響を与えるかを、以前の研究で判明した項目(脛骨病理による骨形態計測、放射線学的評価(骨密度・骨強度)を解析して B6MPS マウスの骨病変へ

の治療効果を検討してゆく。予想される結果としては、遺伝子治療を施行したことにより、血清・骨・多臓器における酵素 IDS 活性は増加し、それに伴い蓄積物質 GAG 値は減少し、B6MPS マウスはより WT マウスの骨形態に近づくと推測される。しかし骨病変への改善にはどの程度の酵素 IDS 活性の増加が必要になるのかは不明であり、今後の結果を踏まえ検討していく必要がある。それに加え、以前の研究で明らかにできなかった、骨形成・骨吸収のどちらが有意なのかを反映するバイオマーカーの検索に関しても、マイクロアレイなどによる網羅的検索を検討している。そして骨形成・骨吸収の発現に関しては破骨細胞培養・骨芽細胞培養により B6MPS マウスと WT マウスの破骨細胞・骨芽細胞の発生の比較検討もしていく予定である。

## 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

和田美穂、嶋田洋太、樋口孝、前田和洋、齋藤充、井田博幸、大橋十也、小林博司  
ムコ多糖症 型モデルマウスの骨病変の病理・分子生物学的解析  
第 58 回日本先天代謝異常学会 口演発表  
(2017 年、東京)

和田美穂、嶋田洋太、樋口孝、前田和洋、  
斎藤充、井田博幸、大橋十也、小林博司

ムコ多糖症 型モデルマウスの骨病変の分  
子・病理学的解析

第 120 回日本小児科学会 口演発表

(2017 年、東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

井田 博幸 (IDA Hiroyuki)  
東京慈恵会医科大学・小児科学講座・教授  
研究者番号：90167255

### (2)研究分担者

大橋 十也 (OHASHI Touya)  
東京慈恵会医科大学・総合医科学研究セン  
ター、小児科学講座・教授  
研究者番号：60160595

小林 博司 (KOBAYASHI Hiroshi)  
東京慈恵会医科大学・総合医科学研究セン  
ター、小児科学講座・准教授  
研究者番号：90266619

斎藤 充 (SAITO Mitsuru)  
東京慈恵会医科大学・整形外科学講座・  
准教授  
研究者番号：50301528

嶋田 洋太 (SHIMADA Yohta)  
東京慈恵会医科大学・総合医科学研究セン  
ター 助教  
研究者番号：20560824

樋口 孝 (HIGUCHI Takashi)  
東京慈恵会医科大学・総合医科学研究セン  
ター 助教  
研究者番号：30595327

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

前田 和弘 (MAEDA Kazuhiro)  
東京慈恵会医科大学・整形外科学講座・  
助教  
研究者番号：50548849

和田 美穂 (WADA Miho)  
東京慈恵会医科大学・小児科学講座  
・大学院生