

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21791023

研究課題名（和文） ライソゾーム病に対する再生医療技術を応用した「埋め込み型酵素補充療法」の開発

研究課題名（英文） Improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intramuscular transplantation of marrow-derived cells

研究代表者

田中 藤樹 (TANAKA TOJU)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：50415585

研究成果の概要（和文）：

ムコ多糖症は、ムコ多糖を分解するライソゾーム酵素の先天性欠損により、全身にグリコサミノグリカンが蓄積し、ガーゴイル様顔貌、骨変形、肝脾腫、関節拘縮、呼吸障害、心臓弁膜症、角膜混濁、難聴、精神運動発達遅滞などの多彩な症状を呈する先天代謝異常症である。2005年に本邦初のムコ多糖症Ⅰ型酵素製剤ラロニダーゼが承認、販売され、酵素補充療法が国内で保険診療を展開するようになった。その後、2007年にⅡ型酵素製剤イデュルスルファーゼ、2008年にⅥ型酵素製剤ガルスルファーゼが承認され、多くのムコ多糖症患者が酵素補充療法を受けている。その中で、酵素補充療法によって改善を認める症状もあるが、改善に至らないもしくは進行する症状もあり、加えて毎週の点滴投与に対する本人、家族の負担はかなり大きいため、更なる有効性が高く、かつ長期持続効果を有する治療法の開発が急務である。

本研究においては、ムコ多糖症に対する再生医療技術を応用した「埋め込み型酵素補充療法」を考案した。骨髄より間葉系細胞を分離、培養し、レトロウイルス、レンチウイルスベクターにより遺伝子導入した後、MPS7型モデルマウスに移植し、治療効果の判定を行った。特に間葉系細胞をマウスの筋肉内に移植し、酵素を供給することで全身の蓄積しているムコ多糖を代謝する実験系を確立することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The therapeutic efficacy of cell transplantation for muscular lesions in lysosomal storage disorders was explored using a murine model of mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII). We used stromal cells derived from bone marrow and expanded in vitro as the source of graft materials. We transplanted marrow stromal cells into the muscular tissue of MPS VII mice and found that donor cells migrated far beyond the site of injection. The GUSB activity was recovered after transplantation. In addition, histological analysis revealed a widespread decrease in lysosomal storage in the recipients. These results suggest that intramuscular transplantation of marrow stromal cells is feasible for treatment of lesions associated with lysosomal storage disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：再生医療、ライソゾーム病

1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症は、ムコ多糖を分解するライソゾーム酵素の先天性欠損により、全身にグリコサミノグリカンが蓄積し、ガーゴイル様顔貌、骨変形、肝脾腫、関節拘縮、呼吸障害、心臓弁膜症、角膜混濁、難聴、精神運動発達遅滞などの多彩な症状を呈する先天代謝異常症である。2005年に本邦初のムコ多糖症 I 型酵素製剤ラロニダーゼが承認、販売され、酵素補充療法が国内で保険診療を展開するようになった。その後、2007年に II 型酵素製剤イデュルスルファーゼ、2008年に VI 型酵素製剤ガルスルファーゼが承認され、多くのムコ多糖症患者が酵素補充療法を受けている。その中で、酵素補充療法によって改善を認める症状もあるが、改善に至らないもしくは進行する症状もあり、加えて毎週の点滴投与に対する本人、家族の負担はかなり大きいため、更なる有効性が高く、かつ長期持続効果を有する治療法の開発が急務である。

2. 研究の目的

ムコ多糖症に対する再生医療技術を応用した「埋め込み型酵素補充療法」を考案する。骨髄より間葉系細胞を分離、培養し、レトロウイルス、レンチウイルスベクターにより遺伝子導入した後、MPS7 型モデルマウスに移植し、治療効果の判定を行う。特に間葉系細胞をマウスの筋肉内に移植し、酵素を供給することで全身の蓄積しているムコ多糖を代謝する実験系を確立する。

3. 研究の方法

ムコ多糖症 VII 型マウス大腿筋に β グルクロニダーゼ遺伝子導入ヒト間葉系細胞を移植し、有効性を検討する。

1) ヒト間葉系細胞をムコ多糖症 VII 型マウス大腿筋に移植し、筋肉への分化、生着を評価、確認する。

2) 上記 1) で、脳、心、肺、肝、脾、腎、血清における病理組織の改善と β グルクロニダーゼ活性定量および活性染色で有効性を評価する。

3) β グルクロニダーゼ遺伝子が発現するレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを感染させたヒト間葉系細胞を、ムコ多糖症 VII 型マウスの大腿筋に移植し、遺伝子導入した間葉系細胞の筋肉への分化生着を評価する。

4) 移植細胞において cross correction が機能

していることを評価する。

5) 上記 3) で各組織の病理組織の改善と β グルクロニダーゼ活性定量、活性染色で有効性を評価する。

6) レトロウイルス感染細胞とレンチウイルス感染細胞のそれぞれの移植マウスに対して、酵素活性の生物学的半減期や長期生存状況、臨床症状の改善度を調査する。

4. 研究成果

1) ヒト間葉系細胞をムコ多糖症 VII 型モデルマウス筋肉内に移植し、筋肉への分化・生着の評価系の確立

骨髄由来ヒト間葉系細胞および子宮内膜由来ヒト間葉系細胞を分離、培養し、約 2.5×10^7 ほどマウスの右大腿筋に移植した。移植後 1 週間、4 週間、長期間で、投与部位である大腿筋において、移植細胞の筋肉への分化、生着をビメンチン染色、ジストロフィン染色で評価した。また同様に、投与部位である大腿筋において、 β グルクロニダーゼ活性染色を行い、移植細胞の β グルクロニダーゼ活性を評価した。ビメンチン染色にてヒト間葉系細胞の存在を確認し、ジストロフィン染色、 β グルクロニダーゼ活性染色の両者が染色されることにより、ヒト間葉系細胞の筋肉への分化を評価した。

2) 移植後マウスの脳、心、肺、肝、脾、腎、血清における病理組織の改善と β グルクロニダーゼ活性定量および活性染色の有効性評価

移植後マウスの脳、心、肺、肝、脾、腎、血清の β グルクロニダーゼ活性を定量し、 β グルクロニダーゼの全身への効果を評価した。同時に、それらのパラフィン切片、凍結切片を作製して各臓器の β グルクロニダーゼ活性定量と活性染色を行った。

3) 遺伝子導入した間葉系細胞の筋肉への分化・生着の評価

β グルクロニダーゼ遺伝子が発現するレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを β グルクロニダーゼ欠損細胞、ヒト間葉系細胞に感染させ、遺伝子導入の至適条件の検討を行った。各細胞の β グルクロニダーゼ活性定量および活性染色で酵素活性が増強されていることを確認した。その遺伝子導入細胞を約 2.5×10^7 ほどムコ多糖症 VII 型マウスの右大腿筋に移植し、移植後 1 週間、4 週間、長期間で、投与部位である大

腿筋において、移植細胞の筋肉への分化、生着をビメンチン染色、ジストロフィン染色、 β グルクロニダーゼ活性染色で評価した。

4) 移植細胞における cross correction の評価

レトロウイルスベクター感染細胞とレンチウイルス感染細胞の各々の培養上清を β グルクロニダーゼ欠損細胞の培養上清と交換し、感染細胞から発現し、培養上清中に分泌された β グルクロニダーゼが欠損細胞内に取り込まれる“cross correction”の確認と評価を行った。細胞内 β グルクロニダーゼ活性定量を行って、細胞内への取り込みを確認するとともに、低量により両者の取り込み量を比較した。

5) 遺伝子導入後細胞の β グルクロニダーゼ活性定量と活性染色による有効性評価

移植部位である大腿筋において、 β グルクロニダーゼ活性染色を行い、移植細胞の β グルクロニダーゼ活性を評価した。また、移植後マウスの各組織の β グルクロニダーゼ活性を定量し、 β グルクロニダーゼの全身への効果を評価した。同時に、それらのパラフィン切片、凍結切片を作製して各臓器の病理組織の改善と β グルクロニダーゼ活性染色での有効性を評価した。

6) レトロウイルス感染細胞とレンチウイルス感染細胞のそれぞれの移植マウスに対して、酵素活性の生物学的半減期や長期生存状況、臨床症状の改善度の調査

レトロウイルスベクター感染細胞とレンチウイルス感染細胞のそれぞれの移植マウスに対して、移植後に評価する項目として β グルクロニダーゼ活性定量および活性染色により経時的な酵素活性量を検討した。また、長期生存状況を観察することで、生存期間の延長が得られるかを評価した。また、その期間内で行動や症状の改善についても観察、評価した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 藤樹 (TANAKA TOJU)

独立行政法人国立成育医療研究センター・

生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：50415585