

令和元年6月6日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09594

研究課題名(和文) クラッペ病における骨髄移植を越える新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel approaches to improve the effect of bone marrow transplantation using a mouse model of Krabbe disease

研究代表者

近藤 洋一 (Kondo, Yoichi)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：40284062

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)：本研究の目的は致死的な脱髄疾患クラッペ病のモデルであるtwitcherマウス(Twi)を用いて、現在限定的である骨髄移植の効果を改善することである。45日程度しか生きられないTwiマウスに対し、神経症状を発症する前または後に骨髄移植を行うと、生存期間の中央値はそれぞれ168日および113日と延長した。これら200日以上生存したマウスを組織学的に解析すると、小脳プルキンエ細胞の脱落や視床の神経核の傷害がみられた。骨髄移植を行っても疾患が遷延するとクラッペ病は神経変性疾患として捉える必要があること、また骨髄移植(おそらく移植前に行う化学療法)による神経傷害を考慮する必要性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クラッペ病は我が国では特定疾患に指定されている神経難病である。骨髄移植によって遺伝的に欠乏する酵素を補うことが唯一の効果的な治療法であるが、根治的ではない。本研究では骨髄移植により延命したクラッペ病モデルマウスに神経変性が見られることを見出した。神経細胞死がクラッペ病の病因に起因するのか、骨髄移植の作用なのかは不明だが、クラッペ病治療において神経細胞を護る必要性を提唱できたことは意義深い。本研究が提案した骨髄移植と他の酵素補充療法を組み合わせることについては、研究期間中に類似の論文が2報続けて米国から発表され、本研究のオリジナリティが下がってしまったが、方向性が正しいことは証明された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to improve the effect of bone marrow transplantation (BMT) in Krabbe disease, in which a genetic deficiency in the galactocerebrosidase activity causes devastating demyelination both in the central and peripheral nervous system. Using twitcher mice (Twi), a truthful animal model of Krabbe disease, BMT was performed in combination with chemical bone marrow ablation. BMT significantly extended the lifespan of Twi, especially when it was performed before the onset (median survival: 168 days v.s. 51 days in untreated animals). In long lived Twi (> 200 days survival), the number of Purkinje neurons was significantly decreased. Moreover, some neurons in the thalamic nuclei were lost, which formed multiple cavities in the thalamus. These results indicate that the neurodegenerative aspects need to be considered for the longterm survival in Krabbe disease.

研究分野：神経科学

キーワード：白質ジストロフィー クラッペ病 骨髄移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

クラッペ病はライソゾーム酵素であるガラクトセレブロシダーゼ (GALC) の遺伝子変異により GALC 酵素活性が消失または減弱して起こる、主に小児にみられる難病である。ミエリン(髄鞘)の維持に GALC を必要とするオリゴデンドロサイトとシュワン細胞が失われて急速に全身の脱髄が進行し死に至る。したがってクラッペ病では GALC を補うことが治療の要となる。現在、骨髄または臍帯血移植が行われるが、発症前(生後2~6ヶ月)であれば数年程度の延命効果が期待でき、症状がみられてからでは効果に乏しい。骨髄移植を行うとドナー由来のマクロファージが末梢・中枢両神経系に大量に移入し、ミエリン形成細胞はこのマクロファージが放出した GALC を取り込んで間接的に利用していると考えられる。申請者はクラッペ病のモデル Twitcher マウスを用いて、GALC 欠損オリゴデンドロサイトが外来の GALC を取り入れ、安定して生存、ミエリンを維持できることを示した(文献①)。この骨髄移植モデルを進展させて、ミエリンや神経を長期にわたって守ることができる治療法を開発することが本研究の最終的な目標となった。

## 2. 研究の目的

本研究ではクラッペ病のモデルマウスを用いて骨髄移植が根治的な治療になるような強化法を模索することを目的とした。クラッペ病は遺伝性の致死的な脱髄疾患である。現在ほぼ唯一の治療法である骨髄または臍帯血移植の効果は限定的で、数年の延命効果が期待できるのみである。そこで骨髄移植に加えて1) 正常なグリア前駆細胞の移植を組み合わせる、2) 脱髄部位の炎症の状態を再生に好ましい環境に傾けることを検討し、さらに3) 遺伝子編集の手法によって変異遺伝子を修復することでクラッペ病根治治療法開発のための基礎的資料を築くこととした。

骨髄移植を改良する方策としてドナー骨髄細胞に GALC を過剰発現させ、補充する酵素の量を増やすことも考えられるが、レンチウイルスを用いた他の研究者の報告ではその効果は限定的であり、申請者が独立して行った実験でも効果に乏しかった。そこで、骨髄移植のような間接的な酵素補充だけではミエリンは守れないとの仮説に立って、以下の3つのアプローチを提案した。(1) 骨髄移植に加え GALC 遺伝子を正常に保ったオリゴデンドロサイトを供給して真に安定したミエリンを形成する。(2) クラッペ病では非常に多数のマクロファージが脱髄部位に集積することが知られていたが、その病的意義は不明であった。申請者はマクロファージを欠くクラッペ病モデルマウスを作製し、マクロファージはミエリンを破壊する一方でミエリンを再生するために重要な働きもしていることを示唆する知見を得た(文献②)。そこでマクロファージの有益性を最大限に利用するために、近年注目されているマクロファージの極性 M1(組織破壊型)と M2(組織再生型)を M2 へと分極させる薬理学的手段を探索することとした。(3) 最新の遺伝子編集技術である CRISPR/Cas9 システムを利用して GALC 遺伝子の変異修復を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髄移植後、グリア前駆細胞移植の効果。

Twitcher マウスの脳内に正常なミエリンを形成し得るグリア前駆細胞や神経幹細胞の移植をした報告は過去に散見されるが、脳内の炎症が激しいためか、ドナー細胞は広範にミエリンを形成することはない。そこで骨髄移植により GALC を補充し炎症の程度を軽くしてからグリア前駆細胞を移植することは合目的的である。骨髄移植はブスルファンで骨髄抑制した10日齢の Twitcher マウスに野生型マウスから分離した骨髄単核細胞を腹腔内投与するが、その方法は申請者がすでに確立している。続いて30日齢となったマウスに GFP 蛍光を発するトランスジェニックマウスの新生児脳から培養したグリア前駆細胞(文献①)を移植する。申請者の知見では小脳・脳幹部の脱髄やマクロファージの集積が Twitcher マウスの嚙下・摂食、呼吸の障害、粗大な振戦といった機能障害の増悪によく呼応しているため、小脳脚をターゲットとして両側性に移植し、広範囲の再ミエリン化を促す。

グリア前駆細胞移植後30日(60日齢)で脱髄の改善を組織学的に調べるため一つのグループは、固定液で灌流固定して、組織をミエリンに対する蛍光免疫組織化学に供し、小脳・脳幹部を中心としてミエリンを定量的に解析する。移植細胞由来のミエリンは GFP 蛍光により区別し、内因性の再ミエリン化と合わせて定量する。

2つ目のグループでもグリア前駆細胞移植後30日(60日齢)でマウス脳を取り出し、吸光度計を用いて生化学的に GALC 酵素活性を測定する(文献①)。

3つ目のグループでは寿命延長の効果をみるため、マウスの神経症状を観察しながら、瀕死となる直前で灌流固定し、得た脳は再生ミエリンの広がりなどの評価に供する。これらは骨髄移植のみのコントロール群と比較する。

### (2) マクロファージ極性の調節。

骨髄移植20日後(30日齢)に Twitcher マウスのマクロファージを M2(再生型)に分極させるため、候補となる薬剤をミニ浸透圧ポンプ(Alzet, Model 2004)を使用して大脳脚へ留置したカテーテルから30日間持続投与する。薬剤としては M2 系サイトカインである IL-4, IL-10, TGF $\beta$ を予定している。評価は M1/M2 のマーカーに対する免疫組織化学により判定し、M2 マーカーのアルギニンやマンノースレセプターの発現が高まっている薬剤を探索する(文献

②). また脱髄の程度や GALC 活性も定量する.

### (3) CRISPR/Cas9 システムによる GALC 遺伝子変異の修復.

① **In vitro** での修復. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを介して, Twitcher マウス由来細胞の変異 GALC 遺伝子の修復を試みる. この変異点を含む配列に対するガイド RNA および Cas9 を載せた AAV2 ベクター (Takara) を準備する. また正常 GALC 配列を持つターゲットベクターを合成する. ここではグリア前駆細胞を修復した後, オリゴデンドロサイトへと分化して生存維持するかどうか, およびグリア前駆細胞からオリゴデンドロサイトへと分化させた後に遺伝子編集し, 既存のミエリン形成細胞の修復ができるかを調べる. Twitcher マウスの GALC 遺伝子には一箇所のナンセンス変異があり, GALC 蛋白が存在しない. そこで GALC に対する免疫細胞化学染色によって個々の細胞の修復を確認する. GALC 酵素活性は生化学的に吸光度計を用いて測定する. また CRISPR/Cas9 システムの短所であるオフターゲット効果がないか, なども調べる. 次の 3. (3) ②へ進むためには高い修復率が必要であり, ここではそのための AAV 感染条件ほか, 種々の遺伝子編集のための条件を検討する.

② **In vivo** での応用. 上記で得た AAV-CRISPR/Cas9 ベクターと修復用ターゲットベクターを Twitcher マウス (生後 1-3 日) の両側大脳半球, 両側小脳半球の計 4 箇所 (文献③) へ投与する. 実際に遺伝子修復が起こるかが焦点となるが, 3. (3) ①で述べたように, 脱髄の改善, GALC 活性の上昇, 寿命の延長などの遺伝子修復による効果も調べる.

## 4. 研究成果

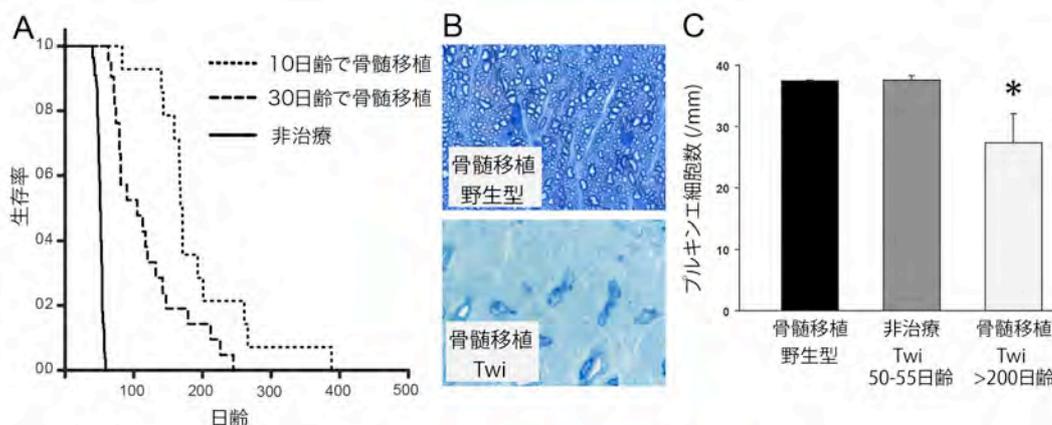


図 1. A. 骨髄移植を受けた Twitcher マウスの生存曲線. 非治療群に比べれば効果があるが限定的である. B. 骨髄移植後 200 日を経過したマウスでは視神経のミエリンは失われている. C. 小脳プルキンエ細胞も失われている [n = 4, \*p < 0.05].

(1) 骨髄移植は神経症状出現後に行うほうが効果的である.

Twitcher マウスには生後 12 日目頃から振戦が出現する. そこで症状出現前である生後 10 日目および症状出現後の 30 日目に骨髄移植を行い, 延命効果を調べた. 非治療マウスの寿命 (生存中央値) が 51 日であったのに対し, 生後 10 日目と 30 日目の骨髄移植により, 寿命が 168 日および 113 日にそれぞれ延長した (図 1A). このことはクラッペ病の患者への骨髄移植が神経症状を呈する前に行われないと効果がないという事実によく合致している. したがって, 発症後に Twitcher マウスに行う骨髄移植は, クラッペ病発症後の患者への骨髄移植の効果を改善・検討するためのよいモデルになると考えられた.

(2) 骨髄移植後長期間を経ると髄鞘だけでなく神経細胞も傷害を受ける.

骨髄移植により Twitcher マウスの寿命は延びたものの, 体重の増加はわるく, また振戦が消失することはなかった. これは緩徐にはあるが疾患は進行していることを示唆していた. 組織学的に検討したところ, 骨髄移植により 200 日以上生存したマウスの白質には高度な脱髄がみられた (図 1B). また小脳のプルキンエ細胞をみると, 骨髄移植を行わずに重症となり寿命を迎えた Twitcher マウスでも数は減っていないのに対して, 骨髄移植を行い 200 日を経た Twitcher マウスでは有意にプルキンエ細胞数が減っていた (図 1C). これは遷延したクラッペ病による変化なのか, 骨髄移植前に行った化学療法 (ブスルファンとシクロヘキシミドを使用) の影響なのかは現時点では不明だが, いずれにしても骨髄移植によりクラッペ病を治療する際には神経細胞のダメージを考慮する必要があることがわかった.

(3) 骨髄移植後長期間を経てもミクログリア／マクロファージは活性化されている。脱髄によるミエリンの残渣を貪食し、風船のように形を変えたミクログリア／マクロファージはグロボイド細胞とよばれ、クラッペ病の病理学的特徴の一つある。骨髄移植後 200 日以上を経た Twitcher マウスでもやはりミクログリア／マクロファージは活性化しており、血管の周囲に大きな塊として多数集積していた (図 2)。これら炎症性の細胞が白質を占拠することで慢性的に軸索が傷害される可能性がある。

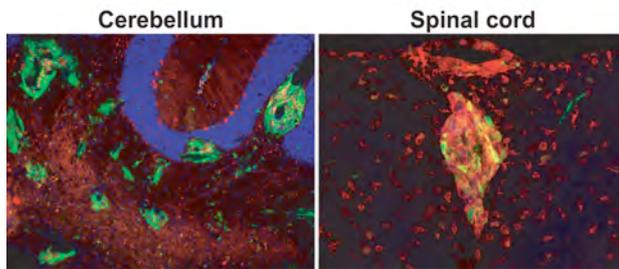


図 2. 骨髄移植後 200 日以上を経た Twitcher マウスの白質におけるマクロファージ集積像。左：小脳；右：脊髄。緑：GFP 陽性ドナー細胞；赤：CD45 陽性マクロファージ；青：DAPI 対比染色。

(4) 骨髄移植後長期間を経ても起こる視床の神経細胞の脱落。骨髄移植後 200 日以上経過した Twitcher マウスの内側腹側視床核には脱落した神経細胞の領域が複数個存在した (図 3)。骨髄移植を受けた野生型マウスでも程度は軽いものの同様な所見がみられたため、これはおそらく骨髄移植時に行う化学療法による副作用ではないかと考えられた。

(5) 本研究の目的は Twitcher マウスを用いて、現在限定的である骨髄移植の効果を改善することであった。その方策として、骨髄移植を軸として髄鞘形成細胞の脳内移植や炎症環境を制御するサイトカイン等の投与を組み合わせを行い Twitcher マウスの寿命を延長することを目指した。ところが平成 27 年度中に米国の研究グループから、骨髄移植と他の治療法の組み合わせを Twitcher マウスに用いて延命効果を認めたという報告がなされた (文献④)。続いてアデノ関連ウイルスを用いて GALC 遺伝子を導入し、Twitcher マウスの寿命を平均 300 日近くまで伸ばす論文が発表された (文献⑤)。これらは治療アプローチとしては本研究と競合し、また十分有用な効果を示したため、本研究のインパクトを弱くしてしまった。ただし複合治療法という本研究のコンセプトが正しかったことは確かである。特に本研究では、クラッペ病の治療において長期的に考えると神経細胞を護ることも考えなければならないことを提案できた意義は大きい。今後であるが、本研究の一步先の計画として考えていた、ヒト由来グリア前駆細胞の Twitcher マウスへの移植実験をすでに始めている。ヒト iPS 細胞株 (409B2 株, 理化学研究所) を胚様体、続いて神経幹細胞へと誘導し、olig2 陽性、PDFD-R-alpha 陽性のグリア前駆細胞へと誘導することができた。このヒト前駆細胞を移植実験に用いることで、実際の治療へ向けて研究を進めていく予定である。

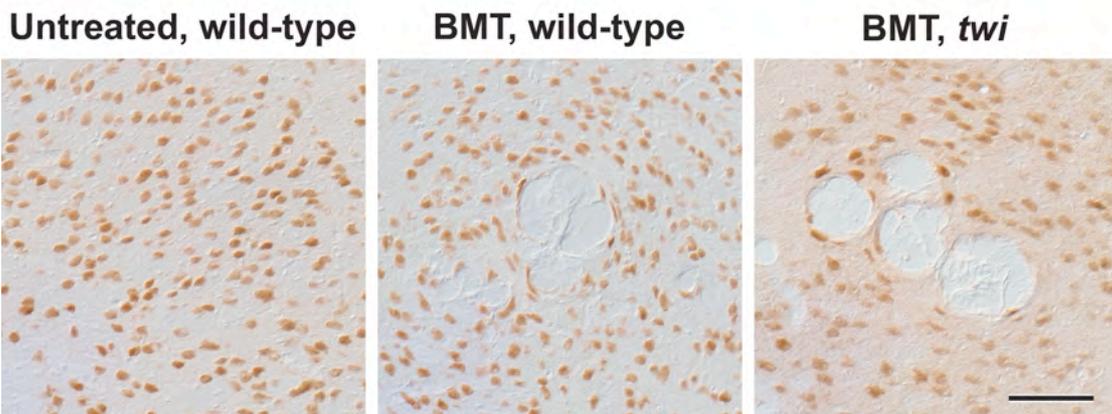


図 3. 内側腹側視床核の抗 NeuN 抗体による免疫染色像。骨髄移植 (および化学療法による骨髄抑制) を行うと、Twitcher マウス (右) および野生型マウス (中) とともに囊胞状の神経細胞脱落巣がみられた。(左) は骨髄移植を行っていない野生型マウス。Bar = 100  $\mu$ m。

## <引用文献>

- ① Kondo Y, Wenger DA, Gallo V, Duncan ID (2005) Galactocerebrosidase-deficient oligodendrocytes maintain stable central myelin by exogenous replacement of the missing enzyme in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18670-18675.
- ② Kondo Y, Adams JM, Vanier MT, Duncan ID (2011) Macrophages counteract demyelination in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *J Neurosci* 31:3610-3624.
- ③ Kondo Y, Windrem MS, Zou L, Chandler-Militello D, Schanz SJ, Auvergne RM, Betstadt SJ, Harrington AR, Johnson M, Kazarov A, Gorelik L, Goldman SA (2014) Human glial chimeric mice reveal astrocytic dependence of JC virus infection. *J Clin Invest* 124:5323-5336.
- ④ Hawkins-Salsbury JA, Shea L, Jiang X, Hunter DA, Guzman AM, Reddy AS, Qin EY, Li Y, Gray SJ, Ory DS, Sands MS (2015) Mechanism-based combination treatment dramatically increases therapeutic efficacy in murine globoid cell leukodystrophy. *J Neurosci* 35:6495-6505.
- ⑤ Marshall MS, Issa Y, Jakubauskas B, Stoskute M, Elackattu V, Marshall JN, Bogue W, Nguyen D, Hauck Z, Rue E, Karumuthil-Melethil S, Zaric V, Bosland M, van Breemen RB, Givogri MI, Gray SJ, Crocker SJ, Bongarzone ER (2018) Long-Term Improvement of Neurological Signs and Metabolic Dysfunction in a Mouse Model of Krabbe's Disease after Global Gene Therapy. *Mol Ther* 26:874-889.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kondo Y and Duncan ID (2016) Myelin repair by transplantation of myelin-forming cells in globoid cell leukodystrophy. *J Neurosci Res* 94: 1195-1202, doi: 10.1002/jnr.23909 (総説、査読なし)

## 6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
- (2) 研究協力者 なし