

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02783

研究課題名(和文) GM1ガングリオシドーシスの造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Hematopoietic Stem Targeted Gene Therapy for GM1-gangliosidosis

研究代表者

大橋 十也 (Ohashi, Toya)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60160595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,160,000円

研究成果の概要(和文)：GM1ガングリオシドーシスはライソゾーム蓄積症の一つであり、ガラクトシダーゼの欠損により細胞内にGM1ガングリオシド(GM1)が蓄積し中枢神経障害、骨症状などを呈し、有効な治療法はない。造血幹細胞を標的としたレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の効果をモデルマウスで検討し、血清酵素活性の上昇、末梢臓器および中枢神経系での酵素活性の上昇、大脳、小脳においてGM1蓄積の低下、末梢臓器および中枢神経におけるレンチウイルスベクターの存在、大脳皮質において遺伝子導入ミクログリアの存在、GFAP陽性アストログリアの低下、ロータロッド試験の改善、2次移植後の血中の酵素活性が上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GM1ガングリオシドーシスは中枢神経系や骨症状を主徴とする難病であり、現在、有効な治療法はない。乳児から成人まで広い年齢層で発症するが乳児型の場合は生後6か月までに神経症状で発症し、急速に進行して寝たきりとなる。我々は今回、造血幹細胞を標的としたレンチウイルスベクターを使用した遺伝子治療の本症の中枢神経障害への有効性をモデルマウスで初めて明らかにし、その学術的意義は高い。一方、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法は原発性免疫不全症、サラセミアで既に欧米では承認されており、診療として行われている。よって、今回の我々の結果も臨床応用への道は既に示されており、社会的意義も大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：GM1 gangliosidosis is one of lysosomal storage diseases, and GM1 ganglioside (GM1) accumulates in cells due to β -galactosidase deficiency, causing central nervous system disorders and bone symptoms. There is no effective treatment, so far. The effect of gene therapy using a lentiviral vector targeting hematopoietic stem cells was examined in model mice, and it was found that increased serum enzyme activity, increased enzyme activity in peripheral organs and central nervous system, decreased GM1 accumulation in the cerebral and cerebellum, presence of lentiviral vectors in peripheral organs and central nervous system, presence of gene-introduced microglia in cerebellar cortex, decrease in GFAP-positive astroglia, improvement of rotarod test, increase in blood enzyme activity after secondary transplantation.

研究分野：先天性代謝異常症

キーワード：GM1ガングリオシドーシス 造血幹細胞 レンチウイルスベクター 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

GM1 ガングリオシド シスは、ライソゾーム病の一つであり、ライソゾームに存在する、ガラクトシダーゼ (gal) の遺伝的欠損により、その基質である GM1 ガングリオシド (GM1) などの糖脂質等が蓄積する疾患で中枢神経症状、骨症状を呈する。やはり gal が欠損する疾患に骨系統疾患の一つであるモルキオ B 病があるが、それに比べて中秋神経症状が顕著である。常染色体劣性遺伝形式で遺伝し、その頻度は 10 万人から 20 万人に一人と言われている。本症は発症時期により乳児型、若年型、成人型に分類される。最も重症の乳児型は生後 6 か月以内に発達の遅れ・退行、筋緊張低下、腱反射の亢進、けいれんなどで発症し進行性の経過をたどり寝たきりとなる予後不良の疾患である。若年型は 1 歳以降に発症し、乳児型と症状は類似しているが、その程度は軽度である。成人型は知的障害が少なく構音障害、ジストニアなどの錐体外路障害、歩行障害などが目立つ。本症には現在、有効な治療法が存在しない。

ライソゾーム病は約 30 種類あるが、最も多く行われている治療法は酵素補充療法である。酵素補充療法は酵素製剤を静脈内から投与するので、血液脳関門のため脳に到達することができず、中枢神経障害には無効である。また中和抗体が発生したり、生涯に渡る繰り返しの投与が必要であったり問題点も多い。ライソゾーム病の中枢神経障害を治療するために酵素を脳内に投与したり、脳移行シグナルのついた酵素を静脈内に投与したりする方法も一部の疾患にはあるが、本症ではまだ開発されていないし、開発されたとしても繰り返しの投与が必要であったり、中和抗体が出来るという点は通常の酵素補充療法と同じである。中枢神経移行が期待できる低分子薬を用いた治療法として薬理的シャペロン療法、基質合成阻害療法が他のライソゾーム病で承認されている薬物はあるが、本症ではない。また薬理的シャペロン療法は特定の遺伝子変異にのみ効果があるため使用できる患者さんが限られる。

理想的には生涯一度で済み、かつ中枢神経系にも効果のある治療法が開発されるのが理想的である。近年、生涯一度の治療法として遺伝子治療法が様々な疾患で、その有効性が実証されて承認薬が相次いでいる。遺伝性疾患でもリポプロテインリパーゼ欠損症、レーバー先天黒内障、ADA 欠損症、サラセミア、脊髄性筋萎縮症などで遺伝子治療薬が承認されており、その他に中枢神経疾患にも有効性が示唆されたという臨床試験がライソゾーム病を含む多くの遺伝性疾患で報告されている。それらには正常遺伝子を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを脳内等に直接投与するもの、正常遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞に正常遺伝子を導入し移植を行うものがある。後者は遺伝子が導入された造血幹細胞より分化したミクログリアが脳内に侵入して効果を発揮するとされている。両者にはそれぞれ一長一短があるが、いずれにせよ現在の治療法の欠点を補える可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では造血幹細胞を標的としたレンチウイルスベクターを用いた GM1 ガングリオシドーシスに対する遺伝子治療の有効性を、モデルマウスを用いて検討し臨床開発に向けた基礎データを取得することにある。前述の様に、脳への遺伝子治療は 2 種類あるが、脳へアデノ随伴ウイルスを直接投与する場合は、脳の局所しか効果が期待できない。GM1 ガングリオシドーシスは脳の広範囲に病変があること、骨など中枢神経系以外にも病変が存在する。一方造血幹細胞を標的としたレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療は造血幹細胞より分化した破骨細胞、ミクログリア細胞が、それぞれの組織に移行して酵素を分泌して効果を発揮するものであり、脳の広範囲な部位ならびに骨にも効果が期待出来る。よって、今回の研究では造血幹細胞を標的としたレンチウイルスベクターを使用した遺伝子治療法を選択した。

3. 研究の方法

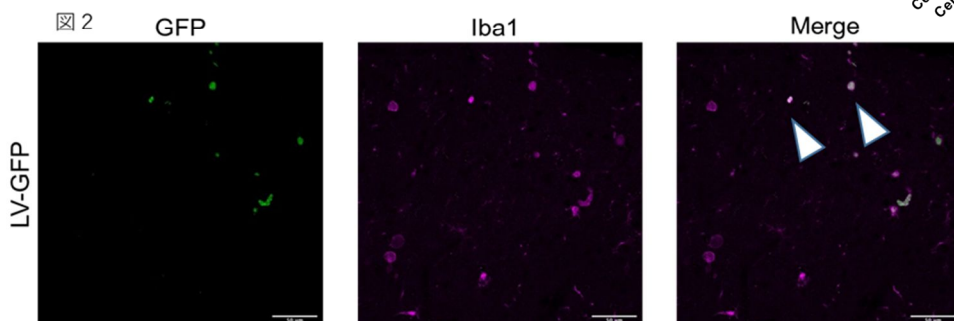
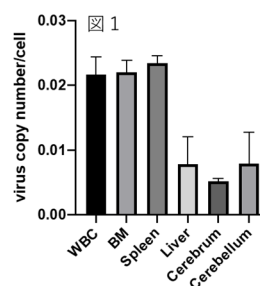
- 1) モデルマウス : GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス (KO) は医基盤健康栄養研究所より入手した。本マウスはマウス gal 遺伝子のエクソン 15 に Neo 遺伝子を挿入した KO マウスである。
- 2) 生化学的検討 : gal の活性は人工基質である 4MU-galactopyranoside を用いて測定した。GM1 の定量は、LC/MS/MS を用いて測定した。またアストログリオシスの程度を定量化するため抗 GFAP 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。又、ベクターのコピー数を qPCR にて検討した。
- 3) 病理学的検討 : アストログリア (GFAP)、ミクログリア (Iba1)、神経細胞 (NeuN) に特異的な抗体 (括弧内に抗原を記載) を用いて蛍光免疫染色を行い細胞種の特定を行った。GM1 の蓄積度合いを組織学的に検討するため、GM1 に結合するコレラトキシンサブユニット b (CTXb) を用

いて蛍光染色を行い検討した。

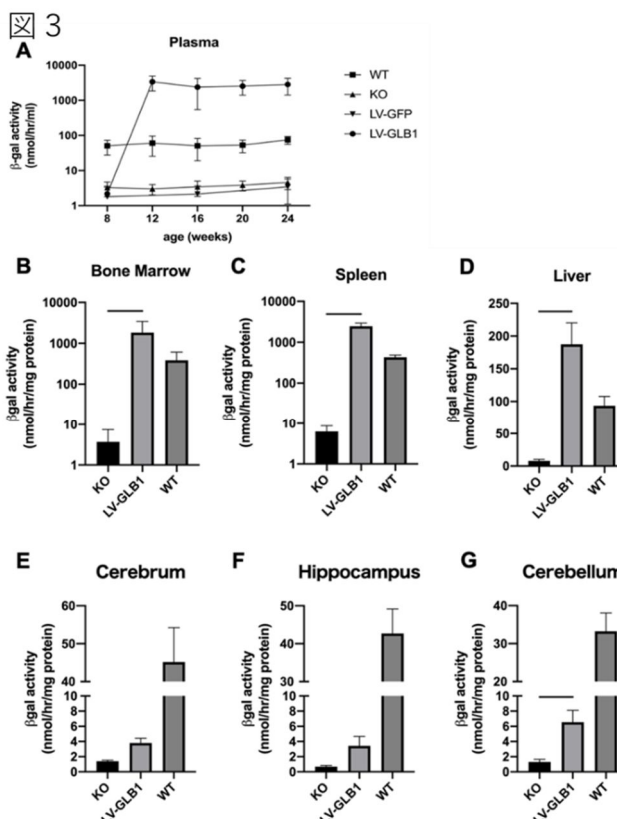
- 4) レンチウイルスベクター：第3世代 self-inactivating レンチウイルスベクターの基本骨格のMNDプロモーター(myeloproliferative virusのエンハンサー、Molony murine leukemia virusのLTR (R, U5) CMV ウイルスのTATA サイト) 下に人 gal もしくはEGFPのcDNAを挿入した。定法に従いレンチウイルスベクターを作成した。EGFPベクターは未治療コントロールとして使用した。
- 5) 遺伝子治療：KOの大腿骨より骨髓を採取しLineage Cell Depletion Kit(ミルテニー社)にて造血幹細胞を濃縮しMOI 50でレンチウイルスベクターを感染させた。その後、致死量の放射線を照射した8週齢のKOに経静脈的に移植した。2次移植は移植24週後に安楽死後、大腿骨より骨髓細胞を採取し、やはり致死量の放射線照射をしたKOマウスに移植し、8週後に採血を行った。
- 6) 行動試験：行動試験としてロタロッド試験、オープンフィールド試験を移植後24週で行った。
- 7) 評価：移植後4週おきに16週まで採血を行った。移植後16週で安楽死させ、各臓器を摘出し前述の様々な解析を行った。行動試験は移植後24週に行った。

4. 研究成果

- 1) ベクターの分布：移植後16週のベクターコピー数は、造血系組織である、白血球(WBC)、骨髓(BM)、脾臓に多かったが非造血系組織である肝臓や、大脳、小脳などの造血系組織にも認められた(図1)。またGFAPを発現するレンチウイルスベクターを用いた場合脳内でGFPとミクログリアの特異的マーカーであるIba1と共局在する細胞が認められ(矢印)、遺伝子導入された造血幹細胞より分化したミクログリアが脳内に存在していることが示唆された(図2)。

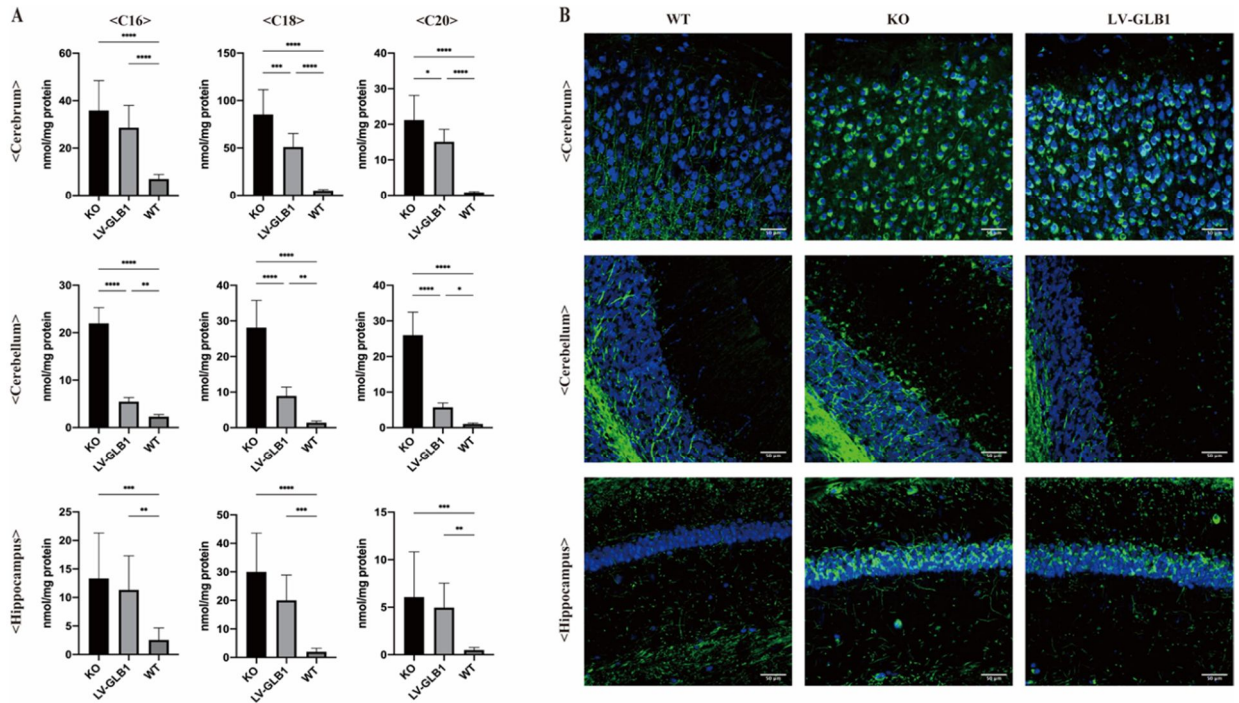


- 2) 血清、各臓器での酵素活性(図3): 血清中の酵素活性は移植後4週から上昇を認め、その後も移植16週後(24週齢)まで低下することなくWT(ワイルドタイプ)以上の活性値が維持された(A)。骨髓、肝臓、脾臓(B,C,D)ではWTと同程度の酵素活性を認めた。中枢臓器(大脳、小脳、海馬)ではKOと比較すると高い活性値(有意差があるのは小脳)が得られた(E,F,G)。(3)



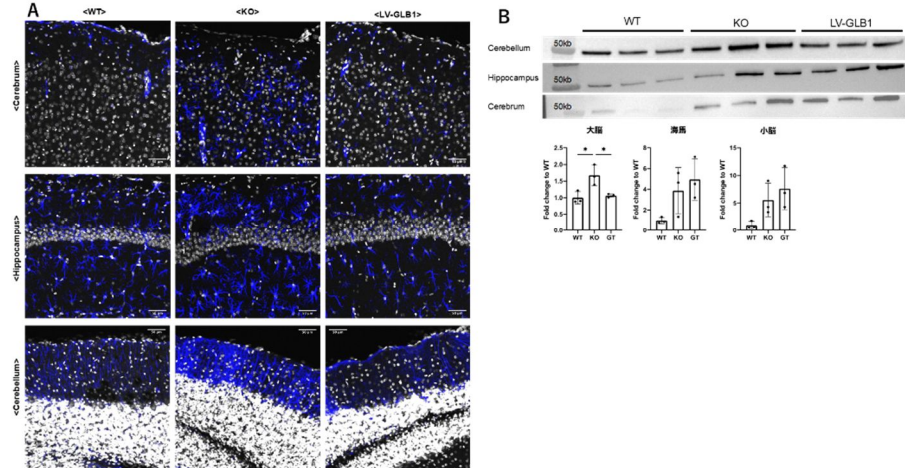
- 3) 各臓器におけるGM1の蓄積の評価(図4): 大脳、海馬、小脳におけるGM1をLC/MS/MSで測定した(A)大脳におけるC18とC20 GM1, 小脳における全ての分子種のGM1がKOに比べて低下していた。又、GM1と特異的に結合するこれらトキシサブユニットbと神経細胞特異的マーカーであるNeuNの共染色の結果をBに示す。大脳、小脳で神経細胞(NeuN青)におけるGM1の蓄積(CTxb緑)は軽減していた。

図 4



4) 炎症性変化の評価(図5): 本症では炎症性変化によりアストログリオシスが起こることが知られている。アストログリアのマーカである GFAP に対する特異抗体で大脳、海馬、小脳を染色した (A)。アストログリオシスは治療群で KO に比して大脳、海馬、小脳で低下していた (青 GFAP, 白 DAPI)。定量的に解析する目的で GFAP に対するウェスタンプロットを行ったが (B) 大脳で治療により GFAP の低下が認められた。

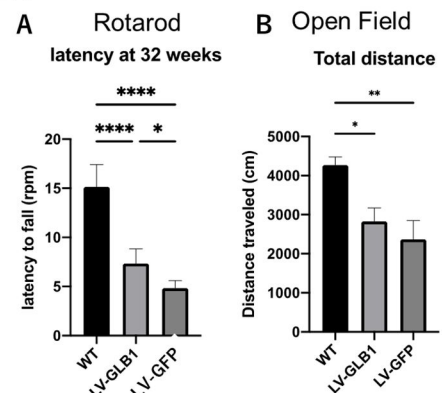
図 5



5) 行動の評価(図6): 治療による行動の改善を評価する目的で治療 24 週後にロタロッド試験とオープンフィールド試験を行った。ロタロッド試験では治療により GFP 治療群 (LV-GFP) に比べて治療群 (LV-GLB1) で改善が認められた。オープンフィールド試験 (B) では改善が認められなかった。

6) 2 次移植: 1 次移植後 3 2 週のマウスより骨髓細胞を採取、致死量の放射線を照射した KO にマウスに移植した。移植後 8 週で血中の酵素活性が高く保てており、遺伝子が造血幹細胞に挿

図 6



入されていることが示唆された (図7)。

7) KO の特徴づけ：遺伝子治療の効果の評価項目を検討するために、治療実験の前に幾つかの免疫組織学的検討を脳で行った。実際には評価には用いなかったが、新たな知見があるため付記する (図8)。まずアストログリオシス以外にもミクログリアが KO 大脳皮質 (A)、海馬歯状回 (B) で増えていた。これは炎症性変化を示唆する。また海馬歯状回で神経幹細胞が減少していた (図8C)。

図7 2nd transplant

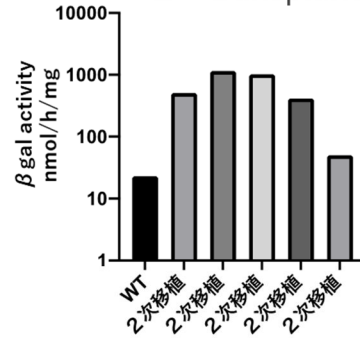
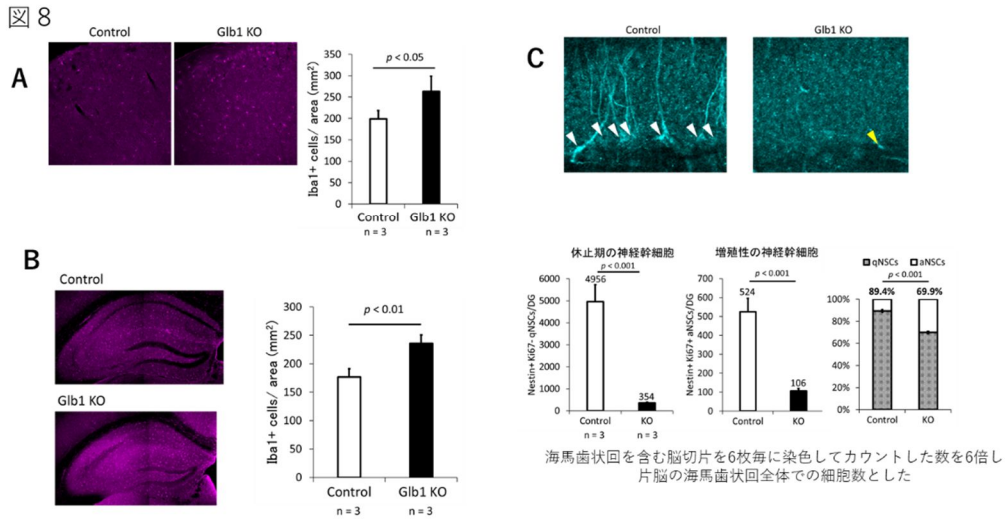


図8



結論として造血幹細胞を標的としたレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療法は GM1 ガングリオシスの中樞神経障害に有効である事が示唆された。

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〕

〔その他〕

東京慈恵会医科大学 基礎臨床講座 遺伝子治療研究部 http://www.jikei.ac.jp/academic/course/16_idensichiryu.html 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 遺伝子治療研究部 http://www.jikei-gene.com/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡部 文子 (Watabe Ayako) (00334277)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	
研究分担者	嶋田 洋太 (Shimad Yohta) (20560824)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	樋口 孝 (Higuchi Takashi) (30595327)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	福田 隆浩 (Fukuda Takahiro) (60228913)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小林 博司 (Kobayashi Hiroshi) (90266619)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関