

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08262

研究課題名(和文)細胞送達能を高めた改変型酵素を用いるムコ多糖症II型の造血幹細胞遺伝子治療法開発

研究課題名(英文) Hematopoietic stem cell gene therapy using engineered enzyme with high penetrating ability for mucopolysaccharidosis type II

研究代表者

嶋田 洋太 (SHIMADA, Yohta)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20560824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ムコ多糖症II型(MPS II)は、イズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)遺伝子の欠損により生じるX連鎖性のライソゾーム病であり、グリコサミノグリカン(GAG)が蓄積することにより中枢神経症状など様々な症状を全身性に呈する。細胞に移行する能力が高まるよう改変したIDSを造血幹細胞に発現させた後に再度移植する造血幹細胞遺伝子治療の有効性についてMPS IIモデルマウスを用いて検討を行った結果、各種臓器において通常のIDSを用いた場合と同等以上のGAG減少効果をもたらす、特に中枢神経においては顕著な改善をもたらすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、MPS IIに対する治療としては酵素補充療法や造血幹細胞移植が存在するが、一度の治療介入で中枢神経を含む全身の病変の根治が期待できる治療法は存在しない。本研究の成果は、細胞への移行能を向上させたIDSを用いた造血幹細胞遺伝子治療が一度の治療介入で中枢神経を含む各種臓器に高い有効性をもたらすことをモデルマウスで初めて明らかにするものであり、学術的意義は高い。また、本成果は将来的な臨床応用にもつながる成果であり、社会的意義も大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is an X-linked recessive lysosomal storage disease caused by a deficiency of iduronate-2- sulfatase (IDS). Progressive accumulation of glycosaminoglycan (GAG), which is the substrate of IDS, leads to various symptoms including central nervous system involvement. In this study, we analyzed the efficacy of hematopoietic stem cell gene therapy (HSCGT) using engineered IDS with high penetrating ability on a murine model of MPS II. Similar GAG reduction was observed in the visceral organs of MPS II mice between HSCGT using engineered IDS and control IDS. However, HSCGT using engineered IDS improved the GAG accumulation in CNS of MPS II mice compared to HSCGT using control IDS.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：ムコ多糖症II型 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症 II 型 (MPS II) は、イズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) 遺伝子の欠損により生じる X 連鎖性のライソゾーム病である。IDS の基質であるグリコサミノグリカン (GAG) が蓄積することにより、中枢神経病変や骨格変形、肝脾腫、皮膚の硬化など多彩な症状を全身性に呈する。現在、MPS II への治療法として酵素補充療法と造血幹細胞移植が存在しており一定の効果が知られているが、いずれも中枢神経に対する効果は十分ではない。これに加えて、酵素補充療法には毎週の酵素投与が必要となる点や薬価が高額である点、造血幹細胞移植については適切なドナーが必要となる点など、現在の標準治療には短所や難点もあり、これらを解決すると共に MPS II の全ての症状を改善し得る新たな治療法の開発が求められている。

これまで我々は、一度の治療介入で理論上治療が完了する造血幹細胞遺伝子治療の開発を目指して研究を行ってきた。造血幹細胞遺伝子治療とは、レンチウイルスベクターに正常な IDS 遺伝子を搭載し、MPS II 患者さん自身の造血幹細胞に同ベクターを用いて遺伝子導入した後再度移植する治療法であり、造血幹細胞移植のようにドナーを探す必要がなく、一度生着すれば治療効果が長期間期待できる。我々は、MPS II モデルマウスを用いた検討から、レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療は中枢神経を含む様々な臓器に効果をもたらすことを明らかにしてきた。その一方で、通常の IDS を用いた造血幹細胞遺伝子治療では、中枢神経における生化学的改善は体性臓器ほど劇的ではないことも見出しており、より効果的な治療法とするために改善の余地が残されている状況であった。

## 2. 研究の目的

一度の治療介入で長期間の効果が期待でき、中枢神経を含む広範な臓器に有効性をもたらす MPS II への造血幹細胞遺伝子治療のメリットを生かしつつ治療効果をさらに高める方策として、我々は IDS そのものの細胞移行能を向上させることを着想した。そこで、細胞移行能を高めた IDS を搭載するレンチウイルスベクターを開発し、それを用いた造血幹細胞遺伝子治療の有効性を MPS II マウスを用いて明らかとすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 細胞移行能向上型酵素搭載レンチウイルスベクターの構築

マウスのトランスフェリン受容体に結合する抗体 (TfR) を IDS 遺伝子と融合させた融合遺伝子 (mTfR-IDS) を作成し、それを搭載する第三世代の self-inactivating (SIN) 型レンチウイルスベクターを構築した。また、IDS 遺伝子を単独で搭載したレンチウイルスベクターも構築した。構築したレンチウイルスベクターを HEK293T 細胞に感染させ、IDS 活性を評価した。

### 2) MPS II モデルマウスへの造血幹細胞遺伝子治療

#### ・マウス造血幹細胞を用いた検討

C57BL/6 を遺伝背景とする MPS II モデルマウスの造血幹細胞を採取し、1) で構築したレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、MPS II マウスへと移植した。移植から 6 ヶ月経過した後に各種臓器を採取し、IDS 活性及び蓄積している GAG 量など各種解析を行った。

#### ・ヒト造血幹細胞を用いた検討

ヒト CD34 陽性造血幹細胞に対して 1) で構築したレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、NOG を遺伝背景とする MPS II モデルマウスへと移植した。移植から 3 ヶ月経過した後に各種臓器を採取し、CD34 陽性造血幹細胞の生着、ヒト細胞の分化、および IDS 活性解析など各種解析を行った。

### 3) TfR-IDS 酵素活性のさらなる向上を目指した IDS の改変

TfR の融合による IDS の細胞移行能向上に加えてさらに治療効果を高めるために IDS 遺伝子の塩基配列を変更しアミノ酸変異体を複数作成した。作成した変異体は HEK293T 細胞に発現させ IDS 活性測定を行った。

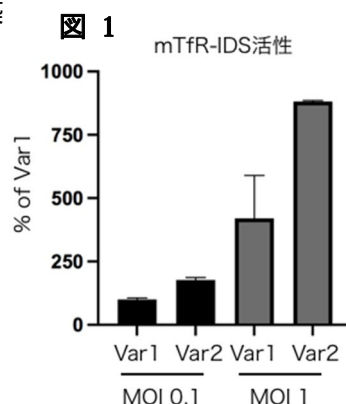
### 4) ヒトに応用可能な TfR-IDS 搭載レンチウイルスベクターの構築

ヒト TfR を IDS 遺伝子と融合させた融合遺伝子 (hTfR-IDS) を作成し、それを搭載する第三世代の SIN 型レンチウイルスベクターを構築した。構築したレンチウイルスベクターを HEK293T 細胞に感染させ、IDS 活性を評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 細胞移行能向上型酵素搭載レンチウイルスベクターの構築

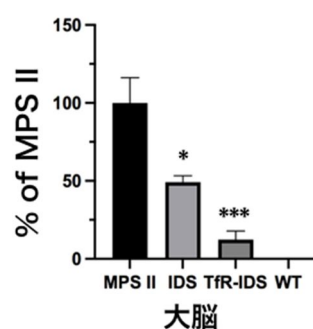
本研究ではアミノ酸配列の異なる mTfR-IDS を搭載する 2 種類のレンチウイルスベクターを作成した。先行して作成した mTfR-IDS (mTfR-IDS Var1) は未修飾の IDS の約 50% 以下の活性しか得られず、酵素活性が上昇し難いことが判明した。そこでアミノ酸配列を見直し、改変型の mTfR-IDS (mTfR-IDS Var2) を作成した。mTfR-IDS Var2 は先行して作成した mTfR-IDS Var1 よりも高い酵素活性を示すことが明らかとなったため (図 1)、本研究ではこの mTfR-IDS Var2 を搭載するレンチウイルスベクターを用いて MPS II モデルマウスへの造血幹細胞遺伝子治療を行った。



### 2) MPS II モデルマウスへの造血幹細胞遺伝子治療

MPS II マウスの造血幹細胞に mTfR-IDS または IDS を搭載するレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入し移植したところ、血中の IDS 活性は両群ともに野生型マウスと同等以上のレベルでエンドポイント (6 ヶ月間) まで持続した。肝臓や脾臓といった内臓においては IDS 群、mTfR-IDS 群共に顕著な GAG 蓄積の減少が認められた。一方で、中枢神経系においては IDS 群では未治療群の 50% 程度の GAG が残存し、mTfR-IDS 群では内臓同様に大幅な GAG の減少が認められ、IDS を上回る治療効果が得られることが明らかとなった (図 2)。以上の結果から、mTfR-IDS を用いた造血幹細胞遺伝子治療は従来の造血幹細胞遺伝子治療よりも効果の高い治療となる可能性が考えられた。

図 2 GAG蓄積

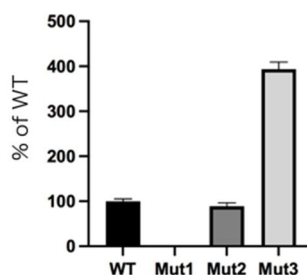


次に、より臨床に近い細胞での検討を目指して、ヒト CD34 陽性造血幹細胞に mTfR-IDS または IDS を搭載するレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、NOG/MPS II マウスに移植を行った。IDS 群、mTfR-IDS 群ともに NOG/MPS II マウスに遺伝子導入造血幹細胞の生着が認められ、骨髄においてヒト CD19 陽性 B 細胞やヒト CD33 陽性ミエロイド細胞が検出された。この結果より、mTfR-IDS を遺伝子導入したヒト造血幹細胞は、IDS を遺伝子導入した場合と変わらず、未分化能と多分化能が保持されていることが明らかとなった。また、NOG/MPS II マウスにおいても中枢神経を含む各種臓器で IDS 活性の上昇が認められ、mTfR-IDS を用いた造血幹細胞遺伝子治療はヒト細胞においてもマウス細胞と同様に機能することが確認された。

### 3) TfR-IDS 酵素活性のさらなる向上を目指した IDS の改変

TfR の融合により IDS の細胞送達能は高まる一方で、未修飾の IDS と比べて酵素活性は上昇し難い傾向が認められた。そこで TfR-IDS の酵素活性上昇を目的に、IDS そのものの改変を試みた。IDS の立体構造情報をもとにアミノ酸を改変した変異体を複数作成した結果、酵素活性が低下してしまう変異体のみならず、天然型よりも高い酵素活性を示す変異体を見出した (図 3)。

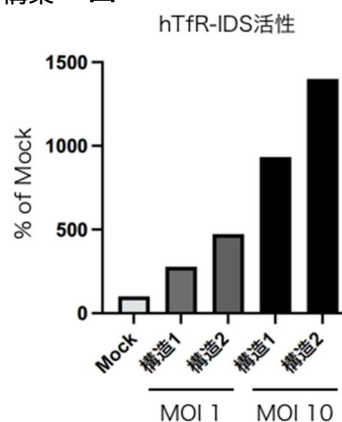
図 3 IDS活性



### 4) ヒトに応用可能な hTfR-IDS 搭載レンチウイルスベクターの構築

2) の検討より、mTfR-IDS を用いた造血幹細胞遺伝子治療は従来の同治療よりも MPS II マウスに対して優れた治療効果が得られることが明らかとなったため、ヒトへの応用を目指してヒト TfR を融合した IDS を搭載するレンチウイルスベクターの構築を試みた。ヒト TfR の Fab 領域を IDS 遺伝子と融合させた配列の異なる hTfR-IDS を複数種類作成し、同酵素を安定発現可能なレンチウイルスベクターの構築に成功した (図 4)。

図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 中枢神経系疾患の治療のための、核酸分子、ベクター、組換え細胞及び薬剤	発明者 木下正文、高木春奈、園田啓之、嶋田洋太、小林博司、他	権利者 JCRファーマ株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/025156	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 中枢神経系疾患の治療のための、核酸分子、ベクター、組換え細胞及び薬剤	発明者 木下正文、高木春奈、園田啓之、嶋田洋太、小林博司、他	権利者 JCRファーマ株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-110492	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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	樋口 孝 (Higuchi Takashi) (30595327)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師  (32651)	
研究分担者	大橋 十也 (Ohashi Toya) (60160595)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授  (32651)	
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
---------	---------