

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5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590303

研究課題名（和文） ファブリー病に対する遺伝子治療：ミニブタを用いた検討

研究課題名（英文） Gene Therapy for Fabry disease: development of a miniature swine model

研究代表者

竹中 俊宏 (TAKENAKA TOSHIHIRO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：70363645

研究成果の概要（和文）：

Fabry 病への遺伝子治療法の安全性・効果を検証する前臨床試験として、ミニブタを用いた大動物モデルの樹立を目指した。まず、遺伝子導入標的細胞である造血幹細胞の骨髄からの採取を試みたが、十分量の採取は困難であった。このため、G-CSF による末梢血造血幹細胞動員でのアフエーシスを試みた。電解質異常によると推測される致死的不整脈を認めたが、十分な細胞数は回収可能と考えられた。造血幹細胞純化のため、FITC-抗ミニブタ CD34 ペプチド抗体を作製したが、抽出した細胞の造血幹細胞能の確認は困難であった。ミニブタを用いた遺伝子治療法の前臨床試験には、ミニブタ造血幹細胞のより詳細な解析が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to develop a miniature swine model for gene therapy for Fabry disease. We tried to collect hematopoietic stem cells from bone marrow or G-CSF mobilized peripheral blood mononuclear cells, however G-CSF mobilized apheresis method only allowed us to collect enough number of peripheral blood mononuclear cells. We also tried to establish mouse anti-miniature swine CD34 peptide antibody, however the cells recognized by the antibody did not grow in cytokine containing methycellulose plate. Further characterization of miniature swine hematopoietic stem cell need to be clarified for utilizing this model in gene therapy preclinical mode.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：遺伝子治療、心 Fabry 病、Fabry 病、ミニブタ、造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

Fabry 病は、リソゾーム加水分解酵素のひとつである α -galactosidase A (α -gal A) の活性低下により生ずる X 染色体劣性のスフィンゴ糖脂質代謝異常症である。典型的 Fabry 病男性患者では、 α -gal A 活性の低下により、全身の細胞のリソゾームに globotriaosylceramide (Gb3) をはじめとしたスフィンゴ糖脂質が進行性に蓄積する。このため、幼少時より被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁などの症状が出現し、40-50 歳代で腎臓、脳、心臓の障害により死亡する。

本症の頻度は、これまで欧米人男性約 40,000 人に 1 人と非常に稀な疾患とされてきた。これに対し我々は、鹿児島県の原因不明の左室肥大を有する男性患者の 3%に、心障害のみを主症状とし、典型的 Fabry 病で認める症状を欠く非典型的な Fabry 病が存在することを報告し (N Engl J Med 1995; 333: 288-293)、心 Fabry 病という疾患概念を提唱した。さらに我々は、心 Fabry 病が肥大型心筋症と診断された英国人男性患者の 4%に存在することも報告した (Circulation 2002; 106: 1407-1411)。その後、我々は、腎不全透析患者の 1.2%に Fabry 病患者が検出されたことも報告した (Kidney Int 2003; 64: 801-807)。これらの結果から、心 Fabry 病を含む Fabry 病は、これまで報告されていたより高い頻度で人種を越えて存在することが推測されていたが、近年、イタリアでの連続 37,104 人の新生児スクリーニングにより、約 3,100 人に 1 人の割合で Fabry 病が見いだされたことが報告された (Am J Hum Genet 2006; 79: 31-40)。さらに最近になり、台湾での連続 90,000 人の新生児スクリーニングにより、1,250 人に 1 人の割合で Fabry 病が検出されたことが報告され (Hum Mutat 2009; 30: 1-9)、今後ますます本症患者母集団の増加が

予想される。

心 Fabry 病を含む Fabry 病に対する原因療法のひとつとして、本邦でも 2004 年 4 月から α -gal A 酵素補充療法が開始され、一定の効果をj得ているが、本療法が患者の QOL・生命予後を改善するか否かについては不明である。また、酵素補充療法は高額な治療費に加え、2 週間に 1 度の点滴による治療を余儀なくされ、不可逆的臓器障害出現前の若年者において社会生活を営む上での大きな障壁となっている。

そこで我々は、一回の治療で生涯にわたる治癒の可能性を秘めた治療法として、遺伝子治療に着目して研究を進めてきた。まず、Fabry 病モデルマウスの系において、ゲノムに組み込まれることで長期に渡り安定した遺伝子導入が可能である組み換えオンコレトロウイルスベクターを用いた、骨髄単核細胞を標的細胞とする遺伝子治療法の有用性を報告した (Exp Hematol 1999; 27: 1149-1159. Hum Gene Ther 1999; 10: 1931-1939. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 7515-7520. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 3428-3433.)。その後、安定した遺伝子導入が可能であるばかりでなく、非分裂期細胞への感染力もあり、濃縮・保存可能な組み換えレンチウイルスベクターを用い、Fabry 病モデルマウスの系で、新生児マウス、心筋細胞、骨髄単核細胞を標的とした遺伝子治療法の有用性を報告した (Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 16909-16914. Circ J 2006; 70: 1503-1508. Gene Ther 2007; 14: 256-265)。

以上のように、Fabry 病モデルマウスでは、遺伝子治療の長期に渡る安定した効果が確認された。この方法を臨床応用するためには、克服すべき多くの課題が存在する。その課題の解決の為には、大動物モデルを用いた安全性・治療効果評価のための前臨床試験が必須

と考えられる。

本学動物実験施設においては、長年に渡りミニブタの飼育ノウハウ、動物実験経験の蓄積を有している。そこで我々は、心 Fabry 病を含む Fabry 病に対する遺伝子治療法の確立に向けて、ミニブタを用いた大動物モデルでのレンチウイルスベクターを用いた心 Fabry 病・Fabry 病に対する遺伝子治療法の長期に渡る安全性・有用性の評価を目的として、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心 Fabry 病を含む Fabry 病に対するレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の長期に渡る安全性・有用性を、ミニブタを用いた大動物モデルで評価することである。

3. 研究の方法

1) ミニブタからの安全かつ有効な造血幹細胞採取法の確立:

本学動物実験施設は、ミニブタを用いた飼育・研究経験が豊富であり、熟練したスタッフのもと全身麻酔、術後管理に関する十分な支援体制がある。これまでに当講座でも、ミニブタに対し全身麻酔下での経腸骨アプローチによる骨髓採取を試みている（動物実験承認番号：第H18 医歯学 190 号）。有効な遺伝子治療に必要と考えられる CD34 陽性細胞は $5 \times 10^6/\text{kg}$ と考えられており、体重 40kg のミニブタでは 2.0×10^8 個の CD34 陽性細胞を必要とする。骨髓単核細胞の約 4% が CD34 陽性細胞と報告されており（Layton DS et al. Exp. Hematol. 2007; 35: 171-178）、 5×10^9 の骨髓単核細胞を採取保存する必要がある。これまでの我々の採取実績は $2.4 \times 10^8/200 \text{ ml}$ 程度であり、約 4000 ml の骨髓液の採取を必要とする。このような大規模の採取には、その出血量から、分割して採取・保存する必要があると考えられた。本研究では、安全な一回採取量の上限および採取間隔についても検討予定とした。CD34 陽性細胞採取が不十分な場合、骨髓内でも CD34 陽性細胞を増加さ

せる G-CSF の連続投与により CD34 陽性細胞数の推移を検討することにより、このモデルにおいて適切な CD34 陽性細胞採取法を検討する。

2) 抗ミニブタ CD34 モノクローナル抗体の作製:

ブタ CD34 陽性細胞は、造血幹細胞能を有していることが示されている。遺伝子を導入する標的細胞として CD34 陽性細胞を用いるため、抗ミニブタ CD34 抗体を用いた CD34 陽性細胞の純化を行う。現在、抗ミニブタ CD34 抗体の入手は困難であり、ペプチド抗原を用いた抗ミニブタ CD34 モノクローナル抗体の作製を試みた（動物実験承認番号：第 H19 医歯学 061 号）。抗原ペプチドでの抗体樹立が困難な場合、我々の樹立したミニブタ骨髓間葉系細胞から RNA を抽出し、cDNA を作製、全長 CD34 cDNA をクローニングし、発現ベクターからの蛋白精製後、抗原としてマウスへの免疫を行う。

4. 研究成果

1) 造血幹細胞採取:

ケタラール 3.0 ml、ドミツール 1.2 ml、ミダゾラム 1.2 ml による麻酔後、剃毛を行い、気管内挿管により人工呼吸器を用いて全身麻酔を行った。静脈ラインを確保した後、大腿部をメスで 8 cm 程度皮膚切開後、筋肉を掻き分けて大腿骨に達し 2.3 mm 電動ドリルで 2 mm 程度の穴を開け、骨髓穿刺針を用いて骨髓腔へアプローチした。ヘパリン化生理食塩水で希釈し採取を行った。分離された有核細胞数は極めて少なく、遺伝子治療に十分な細胞数の確保は困難であった。このため、G-CSF 動員末梢血造血幹細胞採取を試みた。 $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の G-CSF を 4 日間投与し、末梢血白血球数は $7,870/\mu\text{l} \rightarrow 33,760/\mu\text{l}$ と増加を認めた。ヒト G-CSF がミニブタの白血球増加に作用することが確認された。気管内挿管後、人工呼吸管理下でアフレーシスを行い、 9×10^9 の細胞を採取できた。ヒト単核球保存液で保存し、解凍後の生細胞数も検討した。

冷凍保存時 2.5x10⁸/vial

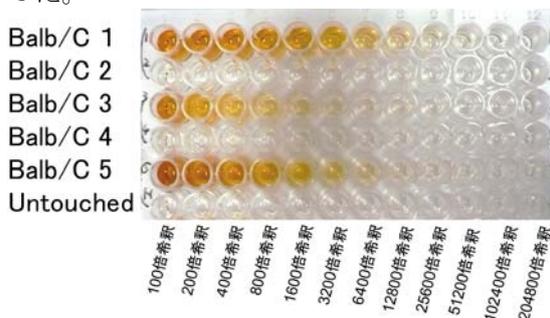
解凍時生細胞 1.32x10⁸

生細胞率 53%

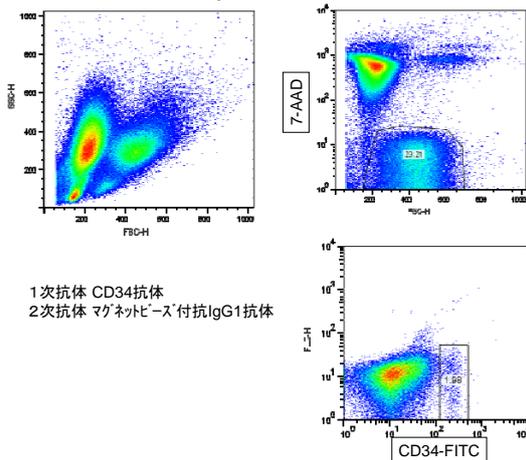
本法ではG-CSFにより末梢血白血球数の増加を認め、アフエレーシスにより多数の有核細胞数を確保、冷凍保存することが可能であることが確認された。

2) 抗ミニブタ CD34 抗体の作製:

細胞表面抗原である CD34 の細胞表面部分のエピトープ解析を行い、ペプチド抗体作製を行った。ペプチド名:pCD34 SPY 配列:SPYTSSPPTPGSHKGEVK とし、KLH 結合ペプチドを抗原として用いた。Balbc マウスに免疫し、血清を用いて ELISA(下図)を行い、抗力価マウス脾臓を用いてハイブリドーマ樹立を行った。



樹立したハイブリドーマに蛍光色素である FITC を結合させ以下のようにフローサイトメトリーを行った。



CD34 を認識する分画を認めたため、FITC を認識するマグネットビーズで CD34 陽性分画を抽出し、本細胞が機能的に幹細胞であることを確認するためにメチルセルロースアッ

セイを行ったがコロニー形成を認めなかった。

メチルセルロースアッセイは、ヒトのサイトカインを用いたアッセイであり、ミニブタの造血をサポートするかは不明であることから、本抗体で得られた細胞集団が造血幹細胞であるかのさらなる検討が必要と考えられた。

5. 発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Pacienza N, Yoshimitsu M, Mizue N, Au BCY, Wang JCM, Fan X, Takenaka T, Medin JA. Lentivector transduction improves outcomes over transplantation of human HSCs alone in NOD/SCID/Fabry mice. *Molecular Therapy*. 2012(20) 1454-1461. 査読有
2. Yoshimitsu M, Higuchi K, Fan X, Takao S, Medin JA, Tei C, Takenaka T. Sequencing and characterization of the porcine alpha-galactosidase A gene: towards the generation of a porcine model for Fabry disease. *Mol Biol Rep*. 2011(38) 3145-3152. 査読有
3. Yoshimitsu M, Higuchi K, Miyata M, Devine S, Mattman A, Sirrs S, Medin JA, Tei C, Takenaka T. Identification of novel mutations in the α -galactosidase A gene in patients with Fabry disease: Pitfalls of mutation analyses in patients with low α -galactosidase A activity. *Journal of Cardiology*. 2011 (57) 345-353. 査読有
4. Higuchi K, Yoshimitsu M, Fan X, Guo X, Rasaiah VI, Yen J, Tei C, Takenaka T, Medin JA. Alpha-galactosidase A-Tat fusion enhances storage reduction in hearts and kidneys of fabry mice. *Molecular Medicine*. 2010 (16) 216-221 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中俊宏 (TOSHIHIRO TAKENAKA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任准教授

研究者番号：70363645

(2) 研究分担者

樋口公嗣 (KOJI HIGUCHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任助教

研究者番号：90448580

吉満誠 (MAKOTO YOSHIMITSU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任助教

研究者番号：70404530