

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

## 第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

## 第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

## 第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

## 小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究

所 属 国立成育医療センター 遺伝診療科 医長  
研究者 奥山 虎之

### 分担研究者

- (1) 東京電力病院 小児科医長 緒方 勤
- (2) 日本ケミカルリサーチ株式会社 開発研究所 主席研究員 西沢 幸二

### 要 旨

小児先天異常症のなかで、リソゾーム蓄積症および小児ミクロペニスの病態解明と治療法の開発について検討した。リソゾーム蓄積症については、遺伝子導入胎児羊膜細胞の脳内移植によりムコ多糖症マウス神経細胞の病理学的正常化が得られることを見出した。

#### 1. 研究目的

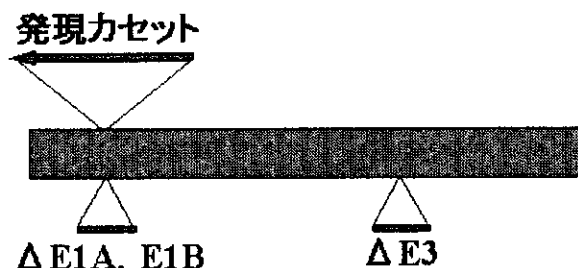
小児先天異常症のほとんどは、症例数が極めて少ない「希少疾患」に分類されるものである。しかし、疾患の種類は多く、病態も多岐にわたっている。また、ほとんどの疾患については、治療法が確立していないのが現状である。本研究の目的は、分子遺伝学的なアプローチを利用することにより、これらの疾患の病態解明と新規治療法を開発することである。小児先天異常症のなかで、代謝異常および形態異常の代表的疾患であるリソゾーム蓄積症と小児ミクロペニスを取りあげる。リソゾーム蓄積症については、遺伝子治療、細胞治療等によるリソゾーム蓄積症の中樞神経病変に対する新規治療法の開発研究をムコ多糖症モデルマウスを用いて検討する。小児ミクロペニスについては、アンドロゲン受容体の遺伝子異常との因果関係について解析する。

#### 2. 研究方法

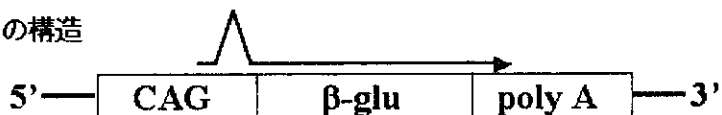
##### 1) リソゾーム蓄積症の遺伝子導入細胞治療法の開発

B6/MPSVII マウスは、ムコ多糖症 VII 型 (Sly disease) のモデル動物である。ムコ多糖症 VII 型は、 $\beta$ -グルクロニダーゼの欠損により各組織の細胞のリソゾームに酸性ムコ多糖が蓄積して特有の顔貌、肝脾腫、軟骨内骨化障害、角膜混濁、および精神運動発達遅滞などの広範な症状を呈する。Wistar 系ラットの胎仔から単離・培養した羊膜上皮細胞 (rat amniotic epithelial cell, RAE cell) に、ヒト  $\beta$ -グルクロニダーゼ発現組換えアデノウイルスベクター (AxCAhGUS) (図 1) を用いて遺伝子導入し、 $\beta$ -グルクロニダーゼを大量に発現するドナー細胞を調製する。この細胞の培養上清中に分泌されたヒト GUSB を用いて、マンノース 6 リン酸受容体を介した培養神経細胞中への GUSB の取り込みを検討する。さらに、遺伝子導入羊膜細胞を B6/MPSVII マウスの脳内 (片側の線状体) に移植し、移植後経時的に脳内における羊膜細胞の分布を GUSB の活性染色により観察する。また、中枢神経病変の治療効果を評価するため、脳組織の病理所見を検討する。

(A) E1,E3欠損型アデノウイルスベクターの遺伝子構造



(B) 発現カセットの構造



CAG サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリβ-アクチンプロモーターを複合させたプロモーター  
polyA ウサギβ-グロビンポリAシグナル  
β-glu ヒトβ-グルクロニダーゼ cDNA

図1. ヒトβ-グルクロニダーゼ遺伝子発現組換えアデノウイルス (AxCAhGUS) の構造

ヒトβ-グルクロニダーゼ (GUSB) を発現するアデノウイルス AxCAhGUS の構造を示す。5型アデノウイルスのE1およびE3部分を取り除き、かわりにE1部分にGUSBの発現カセットを挿入した(A)。GUSBの発現カセットは、ニワトリのβ-アクチンプロモーターにサイトメガロウイルスのエンハンサーを付加したCAGプロモーターの制御下で、ヒトβ-グルクロニダーゼが発現するように構築されている(B)。

2) 小児マイクロペニスにおけるアンドロジェン受容体遺伝子の変異解析

解析に関して両親いずれかの承諾が得られたマイクロペニス日本人患者64人(年齢0-14才, 中央値7才)を対象とした。全ての患者は、1)伸展陰莖長が日本人同年齢対照の-2.0 SD未満、2)尿道下裂なし、3)女性化乳房なし、4)身長が日本人同年齢対照の-2.0 SD以上かつ+2.0 SD以下、5)性腺ないし外性器異常を合併する奇型症候群なし、6)染色体核型46,XYの条件を満たした。対照群として、両親いずれかの承諾が得られた男児50人と成人男性50人を解析した。すべて、精査後に特発性低身長と診断された日本人で、外性器身体所見に異常なく、染色体核型は46,XYであった。これらの症例について、アンドロジェン受容体(AR)遺伝子の変異について解析した。AR遺伝子の全翻訳領域を含むようにプライマーを設定し、各領域をPCRで増幅した。その後、PCR産物をheteroduplex法によるdenaturing high performance liquid chromatography(DHPLC)法で解析し、遺伝子変異の有無をスクリーニングし、DHPLCの波形がwild typeと異なるPCR産物に対して、直接シーケンス法で塩基配列を決定した。AR遺伝子のCAGリピート数多型は、蛍光プライマーを使用したPCRで増幅し、autosequencer上においてGene Scanにより決定した。SRD5A2遺伝子のV89L多型は、直接シーケンス法により決定した。その後、両遺伝子の多型頻度を、患者集団と正常集団において統計学的に比較した。

### 3. 研究成果

#### 1) リソゾーム蓄積症の遺伝子導入細胞治療法の開発

##### a) 培養細胞での検討

AxCAhGUS (MOI=1,5,20) を感染させた3日後にそれぞれの羊膜細胞におけるGUSB活性を測定した。MOI=1および5で感染させた羊膜細胞は感染前 ( $2.7 \times 10^3 \text{U/mg}$ ) の約100倍 ( $2.5 \times 10^5 \text{U/mg}$ ) および150倍 ( $4.0 \times 10^5 \text{U/mg}$ ) のGUSB活性を示し、MOI=20で感染させた羊膜細胞は感染前の約900倍のGUSB活性 ( $2.38 \times 10^6 \text{U/mg}$ ) を示した。それぞれの細胞中のGUSB活性はMOIに比例して増加した。AxCAhGUS感染後羊膜細胞の培地中のGUSB活性を同様に測定した。未感染の羊膜細胞の培地中にはGUSB活性はほとんど認められなかったが ( $1.5 \text{U}/10^6 \text{cells}/24\text{hr}$ )、MOI=5で感染させた羊膜細胞は感染前の約200倍のGUSB活性 ( $3.0 \times 10^2 \text{U}/10^6 \text{cells}/24\text{hr}$ ) を示し、MOI=20で感染させた羊膜細胞は感染前の約370倍のGUSB活性 ( $5.7 \times 10^2 \text{U}/10^6 \text{cells}/24\text{hr}$ ) を示した。次に、神経細胞のGUSBの取りこみを確認するため、GUSB強発現羊膜細胞の培地をラット培養神経細胞に加えて、24時間後に神経細胞のGUSB活性を測定した。また同時にGUSB取りこみがマンノース6-リン酸受容体を介していることを確認するため、一方には培地とともに10mMマンノース6-リン酸を加えた。培養神経細胞のGUSB活性は、加えた培地のGUSB活性に比例して増加し、GUSB強発現羊膜細胞の培地 (MOI=20) を加えた神経細胞のGUSB活性は培地添加前の約150倍となった。培地と10mMマンノース6-リン酸の両方に加えた培養神経細胞のGUSB活性は軽度増加するのみであった。以上の結果から、GUSB強発現羊膜細胞から分泌されたGUSBがマンノース6-リン酸受容体を介して培養神経細胞への取りこまれたことが確認された。

##### b) MPSVIIマウスにおける検討

MOI=20でAxCAhGUSを感染させた遺伝子導入羊膜細胞  $5 \times 10^5$  個をMPSVIIマウスの片側の脳線条体へ移植した。マウスは、移植後1週と9週の時点で屠殺し、脳を4ブロックに分割し、それぞれのGUSB活性を定量した。また、遺伝子導入未施行の羊膜細胞を同様の方法で、MPSVIIマウスに移植し、対照とした。遺伝子導入未施行の羊膜細胞をMPSVIIマウスに移植した場合、脳内におけるGUSB活性の増加はほとんど見られなかったが (図2A)、遺伝子導入羊膜細胞の移植1週間後には同側で正常の100から1000倍 (図2B:I, II)、対側で10-100倍のGUSB活性が認められた (図2B:III, IV)。さらに、移植9週間後においても同側で約100倍 (図2C:I, II)、対側で約10倍程度のGUSB活性が認められた (図2C:III, IV)。以上の結果は、1)遺伝子導入羊膜細胞が、長期にわたりマウスの脳内に生着できること、2)GUSB活性が、投与部位に限局せず脳全体に広がっていることが示していた。また、治療効果について病理組織学的に検討した。MPSVIIマウスの脳では、神経細胞およびグリア細胞内のリソゾームの腫大による特徴的な空胞変性が認められるが、羊膜細胞を移植した側の皮質神経細胞およびグリア細胞においてこの特徴的な空胞変性は、ほぼ完全に消失していた。

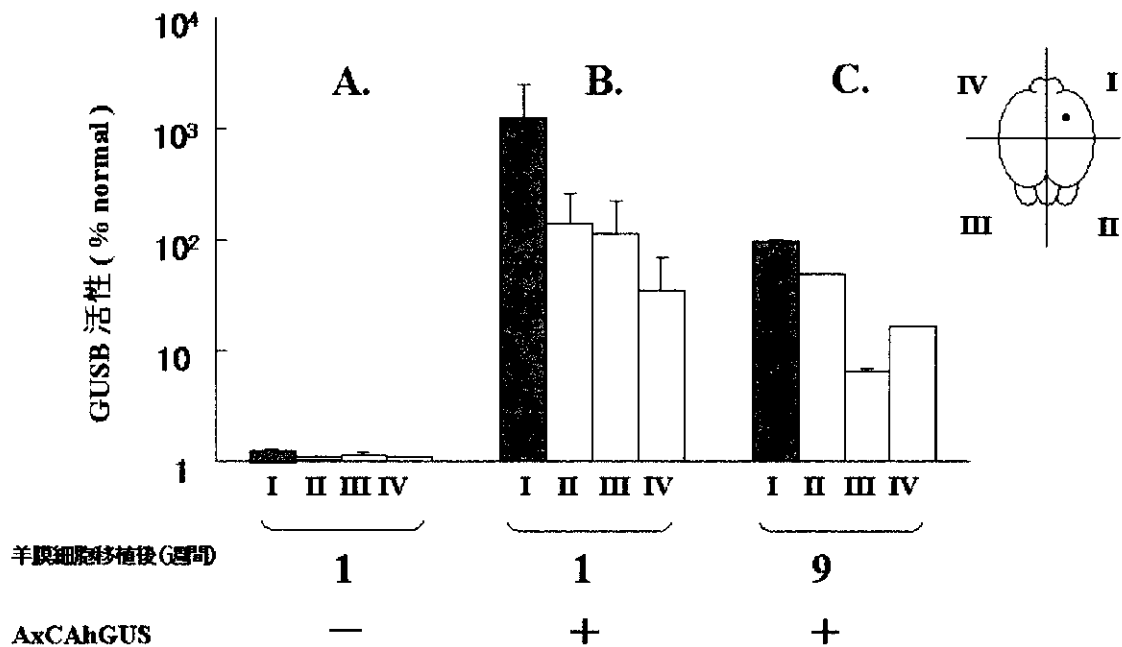


図2. 遺伝子導入羊膜細胞の MPSVII マウスへの移植による効果

AxCAhGUS を感染させた遺伝子導入羊膜細胞  $5 \times 10^5$  個を MPSVII マウスの片側の脳線条体へ移植した。マウスの脳は、4ブロックに分割し、各ブロックの GUSB 活性を定量した。また、遺伝子導入未施行の羊膜細胞を同様の方法で、MPSVII マウスに移植した。遺伝子導入未施行の羊膜細胞を MPSVII マウスに移植した場合、脳内における GUSB 活性の増加はほとんど見られなかったが (A)、遺伝子導入羊膜細胞の移植 1 週間後には同側で正常の 100 から 1000 倍 (B:I, II)、対側で 10-100 倍の GUSB 活性が認められた (B:III, IV)。さらに、移植 9 週間後においても同側で約 100 倍 (C:I, II)、対側で約 10 倍程度の GUSB 活性が認められた (C:III, IV)。

## 2) 小児マイクロペニスにおけるアンドロゲン受容体遺伝子の変異解析

1 症例において、DHPLC スクリーニングでエクソン 2 を含む領域に野生型とは異なった chromatogram を認めた。この chromatogram は、他のマイクロペニス患者や対照男児では認められなかった。塩基配列を cycle sequencing 法により決定し、イントロン 1 の 3' スプライスコンセンサス配列の -3 位に、シトシンからチミンへの塩基置換を同定した。他の領域では、野生型と異なる chromatogram を認めなかった。CAG リピート数の中央値および一定値以上のリピート数を有する相対頻度は、対照とマイクロペニス患者の間において、有意な相関を認めなかった。

## 4. 考 察

リソゾーム蓄積症の中樞神経病変は脳全体に存在しており、治療のためには充分量の欠損酵素を脳内に広く行きわたらせる必要がある。すなわち治療目的遺伝子を高発現する細胞を脳内に広く分布、生着させることによりリソゾーム蓄積症の中樞神経病変の治療が可能になると考えられる。今回の結果より、1) アデノウイルスベクターを用い、導入遺伝子を高発現する羊膜細胞が調製できること、2) 脳内に移植した羊膜細胞が広い範囲に移動分布し、長期間にわたり生着していること、3) 羊膜細胞脳移植により B6/MPSVII マウスの脳病理組織所見を広範囲に改善することを確認しえた。

この結果は、リソゾーム蓄積症の中樞神経病変の新規治療法の開発につながる成績である。

また、本研究で解析した 64 人の小児マイクロペニス患者では、原因変異と断定できるアンドロゲン受容体遺伝子異常は認められなかった。この点に関して、DHPLC では検出できなかった原因変異が存在している可能性は否定できない。実際、DHPLC スクリーニングの感度に関しては、塩基配列決定との比較で、95-100%と報告されている。また、5'側や 3'側のプロモーターないしはエンハンサー領域、エクソン 1 の三塩基リピート領域など解析に含めなかった領域に原因変異が存在している可能性は否定できない。実際、CAG リピート内のナンセンス変異がアンドロゲン不応症一例で報告されている。しかしながら、本研究でえられた結果は、マイクロペニス患者ではアンドロゲン受容体遺伝子変異の頻度が低いことを示唆しており、アンドロゲン受容体以外の遺伝子異常が主要な要因であると考えられる。

## 5. まとめ

遺伝子導入羊膜上皮細胞の脳内移植により、リソゾーム蓄積症の細胞治療が可能であることを、ムコ多糖症 VII 型マウスを用いて示した。また、小児マイクロペニスとアンドロゲン受容体遺伝子異常との関連について検討し、マイクロペニス患者ではアンドロゲン受容体遺伝子変異の頻度が低いことが示された。

## 6. 研究発表

Kosuga, M., Sasaki, K., Tanabe, A., Li, XK., Ohkawa, H., Ogino, I., Okuda, O., Arai, H., Sakuragawa, N., Kamata, Y., Azuma, N., Suzuki, S., Yamada, M. & Okuyama, T. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Ther.* 3, 139-148(2001).

Ishii, T., Sato, S., Kosaki, K., Sasaki, G., Muroya, K., Ogata, T. & Matsuo, N. Micropenis and the AR gene: mutation and CAG repeat-length analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5372-5378(2001).

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社