

## 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  
研究者 奥山 虎之

### 分担研究者

- (1) 東京電力病院 小児科 佐々木 吾郎 (平成 14 年度 4 月から平成 15 年 3 月)
- (2) 東京電力病院 小児科 緒方 勤 (平成 13 年 4 月から平成 14 年 3 月)
- (3) 日本ケミカルリサーチ (株) 開発研究所 西沢 幸二

### 要 旨

ムコ多糖症マウスを用いて遺伝子細胞治療の可能性を検討し、羊膜細胞の脳内移植と生後早期のベクター投与の有用性を示した。また、ミクロペニスの一部が、アンドロゲン受容体 (AR) や 5 $\alpha$ 還元酵素 2 型 (SRD5A2) 変異に起因することを示した。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、稀少疾患が多い小児先天異常症のなかで、比較的頻度の高い先天性リソゾーム蓄積症および性分化異常症に関する原因遺伝子の解明と新しい治療法の開発を行うことである。リソゾーム病などの先天代謝異常症に伴う進行性の中樞神経病変は、乳幼児期の精神運動発達遅滞や難治性の痙攣などの症状を呈し、診断時にはすでに広範な中樞神経病変を有していることが多い。これまでリソゾーム病の中樞神経病変に対しては酵素補充療法や骨髄移植による治療が試みられているが、両法ともに生後早期に行われた場合のみ、中樞神経への治療効果が報告されている。成人期の治療では中樞神経病変への治療効果は乏しいと報告されている。また酵素補充療法は莫大な費用がかかり、骨髄移植はドナー不足や安全性などの問題を抱えている。その他にも中樞神経病変に対する様々な治療が試みられているが、いずれも確実な治療効果は得られていない。その理由として、脳血液関門の存在すること、病変が脳内に広く分布していること、などが考えられる。そこで我々は $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUSB) 欠損症である MPSVII (ムコ多糖症 VII 型) のモデルマウスを用いて、成人期の脳内に広範に存在する中樞神経病変を治療する目的で胎児羊膜上皮細胞 (羊膜細胞) による脳内への細胞移植療法と、脳血液関門が未熟で中樞神経病変が進行する以前の新生児期におけるアデノウイルスベクター投与による治療法を検討した。さらに脳への細胞移植療法により適していると考えられる神経幹細胞移植の中樞神経病変治療についても検討した。

ミクロペニスは、通常、種々の遺伝および環境因子に影響される多因子疾患として発症するだけでなく単一遺伝病として出現する場合もあるとされているが、詳細は不明である。今回、多数のミクロペニス患者を対象として、体系的にアンドロゲン受容体 (AR) と 5 $\alpha$ 還元酵素 2 型 (SRD5A2) 遺伝子の変異および多型解析を行い、ミクロペニス患者における AR 遺伝子および SRD5A2 遺伝子の変異の有無、AR 遺伝子の CAG リピート多型および SRD5A2 遺伝子の V89L 多型がミクロペニス発症感受性遺伝子あるいはテストステロン治療の反応性に関与するか否かを検討した。

### 2. 研究方法

#### (1) リソゾーム蓄積症に対する細胞治療法の開発

##### ① $\beta$ -グルクロニダーゼ強発現羊膜細胞移植による細胞療法

妊娠 17 あるいは 18 日目のルイスラットの胎盤より機械的に羊膜を剥離し、培養羊膜細胞を得た。 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUSB) 発現組換えアデノウイルスベクター (AxCAhGUS) を Multiplicity of Infection (MOI)=20 で感染させた羊膜細胞 ( $5 \times 10^5$  個) をムコ多糖症 VII 型のモデル動物である MPSVII マウス (生後 2-3 ヶ月) の片側線条体に移植した。移植後経時的に脳内における羊膜細胞

の分布や病理組織所見の変化を観察した。

### ②新生児期におけるアデノウイルスベクター投与による治療

1×10<sup>7</sup> プラーク形成単位 (pfu) を含む AxCAhGUS ウイルス溶液 100ul を生後 24 時間以内の新生仔 MPSVII マウスの浅側頭静脈から全身投与した。投与 7 日後、各臓器の組織片から DNA を抽出し、ウイルス DNA を PCR 法により検出した。これらを成人期マウスに投与した際のウイルス DNA 分布と比較した。また投与 30、140 日後の脳における GUSB 活性を測定するとともに、病理所見による治療効果を検討した。

### ③マウス神経幹細胞の基礎的研究

ニューロスフェア法を用いてマウスの神経幹細胞を分離した。妊娠 14 日目の B6 マウス胎児脳の線状体から採取した細胞を、20ng/ml 上皮増殖因子 (EGF) 及び 20ng/ml 繊維芽細胞増殖因子 (FGF) などの成長因子を加えた無血清培地 (MHM) 中で 7 日間培養し、神経幹細胞を分離し、神経幹細胞および培地における GUSB の活性値を測定した。MPSVII マウス由来の繊維芽細胞である 3521 細胞を 2 群に分け、一方には神経幹細胞の培養に使用した培地のみを加え、もう一方には培地と 1mM のマンノース 6 リン酸を加え、24 時間後の各群の 3521 細胞の GUSB 活性を比較した。さらに受精後 14 日目の C3H マウス胎児の脳から分離した培養神経細胞および培養グリア細胞を 3521 細胞の場合と同様に 2 群に分け、一方には神経幹細胞の培養に使用した培地のみを加え、もう一方には培地と 1mM のマンノース 6 リン酸を加え、24 時間後の各群の細胞の GUSB 活性を比較した。なお、C3H 細胞の内因性 GUSB 活性を除去するため、65℃、1 時間加熱処理を行い、培地から神経細胞に取り込まれた B6 マウス神経幹細胞由来の GUSB 活性のみを測定した。

### (2) 性分化異常症の原因遺伝子の解明

両親いずれかの承諾が得られたミクロペニス日本人患者 81 人 (年齢 0-14 才, 中央値 7 才) を対象とした。AR, SRD5A2 遺伝子の全翻訳領域の塩基配列の決定、AR 遺伝子の CAG リピート数多型の検出を行った。テストステロンの治療効果は、エンルモン 25mg あたりの陰茎長増加量 (cm/dose) を各患者において算出し、陰茎長増加量と AR 遺伝子の CAG リピート数多型および SRD5A2 遺伝子の V89L 多型との相関を統計学的に解析した。

## 3. 研究結果

### (1) βグルクロニダーゼ (GUSB) 強発現羊膜細胞移植による中枢神経病変の治療効果の検討

GUSB 強発現羊膜細胞 5×10<sup>5</sup> 個を MPSVII マウスの脳線条体へ移植し、移植後の羊膜細胞の生着と分布を調べたところ、移植 1 週間後では線条体周囲に限局して生着していた羊膜細胞は移植 9 週間後では同側脳内に広く移動、生着していることが確認された。移植後の脳内の GUSB 活性は、移植 9 週間後において、移植側では正常マウス脳とほぼ同レベルであり、対側ではその約 10% 程度であった。病理組織所見では、未治療 MPSVII マウスの脳では神経細胞およびグリア細胞でのリソゾームの腫大による細胞内空胞が認められたが、移植されたマウスの脳では、細胞内空胞はほぼ完全に消失していた。

### (2) 新生児期におけるアデノウイルスベクター投与による治療の検討

AxCAhGUS 投与 7 日後、他臓器 (肝、脾、腎、肺、心) と同様に脳においても、PCR 法でウイルスベクター由来のヒト GUSB cDNA を検出した。また AxCAhGUS 投与 30 日後の脳における GUSB 活性値は正常対象マウスの内因性 GUSB 値の約 2 倍で、投与 140 日後の GUSB 活性値は正常対象 GUSB 値の約 30% であった。GUSB 活性染色においても脳内における GUSB 活性陽性細胞が広範に認められた。また病理組織所見では、投与 140 日後の脳において神経細胞およびグリア細胞でのリソゾームの腫大による細胞内空胞などの中枢神経病変の進行は認められなかった。この結果から、新生仔期にアデノウイルスベクターを投与することにより、脳に対しても遺伝子導入が可能であり、さらに脳内で過剰産生された GUSB 蛋白は周囲の神経およびグリア細胞に M6P 受容体を介して取り込ま

れ中枢神経病変の進行を抑制したと考えられた。

### (3) 神経幹細胞を用いた検討

ニューロスフェア法で分離した神経幹細胞の GUSB 活性は、 $647 \pm 240 \text{U/mg protein}$  であり、また神経幹細胞から培地内に分泌された GUSB 活性は  $35 \pm 18 \text{U/mg protein}$  であった。神経幹細胞由来の GUSB を含む培地を、MPSVII マウス由来の線維芽細胞である 3521 細胞に添加したところ、24 時間でその 17.6% が取り込まれた。C3H マウス由来の GUSB は加熱により不活化されるが、B6 マウス由来の GUSB はほとんど不活化されない。この特性を利用し、C3H マウス神経・グリア細胞への取り込みを観察した。その結果、添加した GUSB の 21.9% の取り込みが観察された。また、マンノース 6 リン酸受容体をブロックさせるために、培地内に 10mM のマンノース 6 リン酸を加えた状態で同様の実験を行なうと、取り込み率は 3521 細胞で 2.8%、C3H 神経・グリア細胞で 11.8% であり、マンノース 6 リン酸の添加による有意な低下が確認された。

### (4) ミクロペニス患者の遺伝子解析

AR 遺伝子の変異が、1 症例で検出された。この症例では、第 1 エキソンの シトシンからチミンへの塩基置換を同定した。また、AR 遺伝子の CAG リピート多型解析では、CAG リピート数の平均  $\pm$  標準誤差、中央値、分布は、患者  $23.5 \pm 0.38$ 、24、14-34、対照  $23.7 \pm 0.46$ 、23、16-32 で、両群の間において、有意差は認められなかった。SRD5A2 遺伝子変異解析により、3 症例において変異が同定された。その内容は、Y26X/R227Q、G34R/R227Q、R227Q/R227Q で、全例に R227Q が共有されていた。この R227Q は、正常 100 名中の 1 例において、ヘテロの状態で検出された。AR 遺伝子あるいは SRD5A2 遺伝子変異を有する患者におけるテストステロン治療の効果は乏しかったが、遺伝子変異が認められなかった 78 例では、全例治療により陰莖長は正常範囲内となった。

## 4. 考察・まとめ

### (1) リソゾーム蓄積症の新規治療法の開発

先天代謝異常症に伴う進行性の中枢神経病変の治療のためには十分な量の欠損酵素を脳内全体に長期間、ひろ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枢神経病変の治療が可能になると考えられる。 $\beta$  グルクロニダーゼを高発現するように調製した羊膜細胞を MPSVII マウスの片側線条体に移植した実験では、移植された細胞が、脳の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、および B6/MPSVII マウスの脳病理組織所見を広範囲に改善することが示された。羊膜細胞が比較的容易にかつ大量に調製できるという利点を考慮すると、本法による細胞治療はリソゾーム蓄積症など広範な中枢神経病変を有する先天代謝異常症の治療に適していると考えられる。

しかし先天代謝異常症に伴う中枢神経病変は進行性であり、本来治療のためには病変が進行する以前である新生児期に行われることが望ましい。我々は、おとなのムコ多糖症 VII 型マウスに、組換えアデノウイルスベクターを経静脈的に全身投与した場合、ウイルスは主に肝臓に集積し、肝臓で産生された酵素が血流を介して各臓器の細胞に取り込まれ、GUSB 活性が増加することを報告した。しかし、この検討により、アデノウイルスベクターだけでなく肝臓から体循環に分泌された  $\beta$  グルクロニダーゼ蛋白も脳内に移行せず、脳の病理所見の改善も認められないことが同時に明らかとなった。この問題を解決するため、脳血液関門が未熟である生後早期にアデノウイルスベクターを全身投与する治療を試みた。その結果、心、肝、脾、肺だけでなく、中枢神経でも GUSB 活性が増加し病理所見が改善することが確認された。

神経幹細胞は、自己再生能（増殖と継代培養を繰り返すことができる能力）と多分化能（中枢神経系を構成する神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイト等に分化できる能力）をともに有する細胞である。神経幹細胞は、羊膜細胞と違い本来、脳に存在する細胞であることから、中枢神経病変に対する細胞療法のドナー細胞としてより適していると考えられる。今回の検討により、マンノース 6 リン酸受容体を介した cross-correction により神経幹細胞から分泌された  $\beta$  グルクロニダーゼ蛋白は、培養神経細胞およびグリア細胞に積極的に取り込まれることが *in vitro* の系で確認された。この

ことは神経幹細胞の脳内移植がライソゾーム病の中樞神経病変に対する治療に適していることを示唆している。現在、我々は新生児 MPSVII マウスの中樞神経病変に対する神経幹細胞移植療法を進行中であり、次年度の当研究事業の主要なテーマとする予定である。

## (2) 性分化異常症の原因遺伝子の解明と治療への応用

本研究は、小児ミクロペニスにおいて単一遺伝性疾患としての AR 遺伝子あるいは SRD5A2 遺伝子変異が存在することを明らかとした。特に、SRD5A2 遺伝子変異では、R227Q という約 5% の残存酵素活性を有することが知られている変異が 3 例に共有されていた。これは、残存酵素活性と男性化障害の間に相関関係が存在することを示すものである。さらに、SRD5A2 遺伝子変異患者では、ジヒドロテストステロン軟膏という、保険適応にはなっていないが有効な代替治療薬が存在することから、その診断は患者の治療に大きく貢献すると考えられる。

## 5. 研究発表

- 1) Takahashi M, Deb NJ, Kawashita Y, Lee SW, Furgueil J, Okuyama T, Roy-Chowdhury N, Vikram B, Roy-Chowdhury J, Guha C. A Novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Therapy* (in press)
- 2) Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Therapy* (in press)
- 3) Sasaki G, Nakagawa K, Hashiguchi A, Hasegawa T, Ogata T, Murai M. Giant seminoma in a patient with 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency. *Journal of Urology* (in press).
- 4) Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Hasegawa T, Sato S, Homma K, Takahashi T, Matsuo N. Micropenis and the 5 $\alpha$ -reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (in press).
- 5) Li XK, Kosuga M, Tokieda K, Kanaji A, Fukuhara Y, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Yamada M, Suzuki S, Okuyama T. Prolongation of transgene expression by coexpression of cytokine response modifier  $\alpha$  in rodent liver after adenoviral gene transfer. *Mol Ther* 5:262-268, 2002.
- 6) Kamata Y, Okuyama T, Kosuga M, O'hira A, Kanaji A, Sasaki K, Yamada M, Azuma N. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* 4:307-312, 2001.
- 7) Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Okawa 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.
- 8) Kosuga M, Takahashi S, Tanabe A, Fujino M, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Kakishita K, Ono F, Sakuragawa N, Okuyama T. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant* 10:435-439, 2001.
- 9) Ogata T, Muroya K, Sasaki G, Nishimura G, Kitoh H, Hattori T. SHOX nullizygoty and haploinsufficiency in a Japanese family: implication for the development of Turner skeletal features. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 390-394, 2002.
- 10) Muroya K, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T, Ishii T, Ogata T. Hypospadias and the androgen receptor gene: mutation screening and CAG repeat length analysis. *Mol Hum Reprod* 7:409-413, 2001.
- 11) Ogata T, Muroya K, Ishii T, Suzuki Y, Nakada T, Sasagawa I. Undermasculinized genitalia in

a boy with an abnormally expanded CAG repeat length in the androgen receptor gene. Clin Endocrinol 54:835–838, 2001.

12) Sasagawa I, Suzuki Y, Ashida J, Nakada T, Muroya K, Ogata T. CAG repeat length analysis and mutation screening of the androgen receptor gene in Japanese men with idiopathic azoospermia. J Androl 22:804–808, 2001.

13) 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.

6. 知的財産権の取得状況

1) 特許取得 なし

2) 実用新案登録 なし