

の酵素の取り込みを検討した

【方法】

雄 IDS-KO mice を用いた。IDS 酵素には、CHO 細胞で発現・精製された遺伝子組換えヒト iduronate 2-sulfatase を用いた。マウスの表現系の解析は実験動物用 X 線 CT 撮影装置を用いて骨格異常を解析した。ヒト MPS II 型ハンター症候群患者由来皮膚線維芽細胞を用いて細胞への取り込み実験を行った。21 週齢 IDS-KO mice 右脳室内に 20 μg の IDS を 3 週間おきに 4 回連続投与し脳室内酵素補充療法の各組織への有効性を生化学的、病理組織学的に検討した。

【結果 & 考察】

1) 頭蓋骨への治療効果 : iduronate 2-sulfatase ノックアウト MPS II 型モデルマウス (IDS-KO mice) は鼻が低い独特の顔貌をしていた。X 線 CT 撮影の結果、鼻部や眼球周囲の骨形成異常等が特徴的であり、酵素に治療により効果が示された (図 1)

A	Wild-type	MPS II + saline	MPS II + IDS	nontreated MPS II mouse (12wks)
Nose	sharp	round	round	round
Eye	normal	puffy eye	big round eye	big round eye
Hair	good	bad	a little bad	good

図 1. assessment of 40 week-old mouse face in treatment effects of long-term IDS multiple intraventricular ERT (IDS intraventricular ERT administration protocol (IDS 20 μg / 3 weeks x 8 times for 16 week-old mouse) description of confer data: 12 week-old nontreated MPS II mouse (B) H&E stain, toluidine stain and Lamp2 immunostaining analysis of 40 week-old mouse tissues treated with long-term IDS intraventricular ERT (brain (cerebellum), liver, kidney, and testis) Arrowhead design (▲) is vacuole in the Purkinje cell, the tubular epithelial cell or Leydig cell. Arrow design (→) is vacuole in the margin cell of the Purkinje cell.

図 1

2) IDS の各組織取り込みと : 時間依存的に MPS II マウス組織において IDS が効率良く取り込まれたことから、酵素補充が可能と考えられた。マウス大脳組織内 IDS 酵素活性が正常 control マウス群と比較して数倍、IDS-KO mice 生食投与群と比較して数百〜一千倍上昇した。小脳の IDS 酵素活性は正常 control マウスと同程度まで上昇した。IDS 酵素活性は 3 週間毎の投与により脳組織でその活性を高く維持又脳以外の組織肝臓、脾臓、腎臓、心臓などの組織

への取り込みも高く (図 2) GAGs の脳組織蓄積程度、Lapm2 タンパク質などのライソゾームの種々のマーカー分子を含め治療群では低下していたことから、酵素による治療効果を明らかにした。

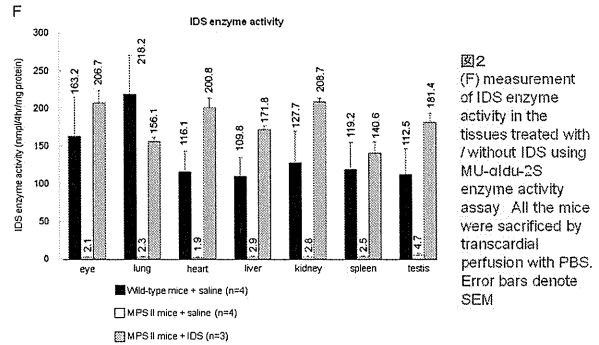


図 2 (F) measurement of IDS enzyme activity in the tissues treated with / without IDS using MU-oidu-2S enzyme activity assay. All the mice were sacrificed by transcardial perfusion with PBS. Error bars denote SEM

図 2

(2) ポンペ病よりの iPS 細胞の樹立と骨格筋細胞への分化 : 形態的变化

今回は Pompe 病モデルマウスから iPS 細胞を樹立し、骨格筋細胞への分化を試みたので報告する。iPS 細胞、分化した骨核筋細胞の形態的变化を検討した。

【方法・結果】

10 週齢の Pompe 病モデルマウスの尾から線維芽細胞を採取し、初期化因子である Klf4、Oct3/4、Sox2 の 3 因子を導入し、約 1 ヶ月培養することで iPS 様細胞コロニーが得られた。

樹立した Pompe 病由来 iPS 細胞を用いて作成したテラトーマを 3 胚葉由来のマーカー分子の発現について免疫染色で解析したところ、陽性領域が認められた。また、この Pompe-iPS 細胞で GAA 活性の顕著な低下が認められ、酸性ホスファターゼ活性染色についても陽性細胞が確認できた。iPS 細胞の電顕的検討ではすでに iPS 細胞の段階で著明な蓄積物質の蓄積を認めた (図 3)。

次に、樹立した Pompe-iPS 細胞から骨格筋様細胞への分化誘導を行った。骨格筋のマーカータンパク質であるミオシン重鎖について免疫染色を行ったところ、陽性細胞が認められた。

形態的にも特徴的な骨核筋細胞の構築が認めら

れた。又ヒトファブリ病、ゴーシェ病皮膚細胞からも iPS 細胞を作成し、現在機能解析中である。

Ultra structure of Mouse Pompe-iPS cells

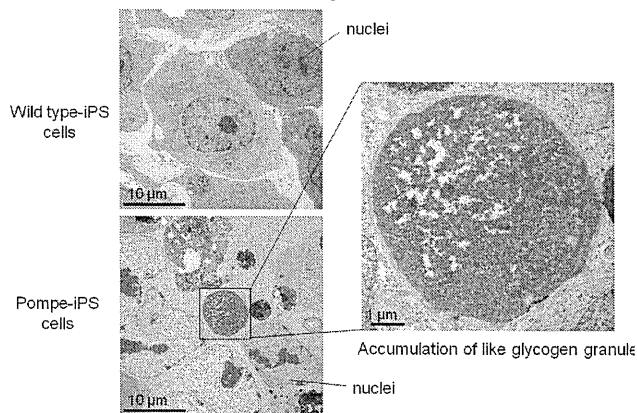


図 3

C. 考察・展望

MPS II 型マウスへの酵素の髄注は神経系並びに骨変化、肝臓、脾臓などの内臓器への取り込みにも効果があることが示された、Pompe 病モデルマウスの線維芽細胞から、Pompe-iPS 細胞を樹立し、すでに iPS 細胞の段階で蓄積物質が認められた。ポンペマウス骨格筋細胞から特徴的な電子顕微鏡的特徴を明らかにし又グリコーゲンの蓄積を証明した。

ヒトゴーシェ病、ファブリ病 iPS 細胞の作成に成功した。

健康危険情報

該当なし

D. 研究発表

1. 論文

1) Kawagoe S, Higuchi T, Meng XL, Shimada Y, Shimizu H, Hirayama R, Fukuda T, Chang H, Nakahata T, Fukada S, Ida H, Kobayashi H, Ohashi T, Eto Y : Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol Genet Metab.*

2011.9-10 ; 104(123-8). Epub 2011.6.2

- 2) Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Eto Y, Ishige N, Kitagawa T, Otsu M, Nakauchi H, Ida H, Ohashi T : Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med*, 13(5) : 262-8, 2011.5
- 3) Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Eto Y, Ida H, Hachimura S, Kobayashi H : Oral administration of recombinant human acid α -glucosidase reduces specific antibody formation against enzyme in mouse. *Mol Genet Metab*, 103(1) : 98-100, 2011.5, Epub, 2011.1.27
- 4) Shimada Y, Nishida H, Nishiyama Y, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T : Proteasome inhibitors improve the function of mutant lysosomal α -glucosidase in fibroblasts from Pompe disease patient carrying c.546G > T mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011.10.18, [Epub ahead of print]
- 5) Shimada Y, Kobayashi H, Kawagoe S, Aoki K, Kaneshiro E, Shimizu H, Eto Y, Ida H, Ohashi T : Endoplasmic reticulum stress induces autophagy through activation of p38 MAPK in fibroblasts from Pompe disease patients carrying c.546G>T mutation. *Mol Genet Metab*, 2011.9.14, [Epub ahead of print]

2. 総説・著書

- 1) 衛藤義勝 : ライソゾーム病の歴史, ライソゾーム病の機能と取り組み機序『ライソゾーム病ー最新の病態, 診断, 治療の進歩ー』2-9, 診断と治療社, 2011
- 2) 衛藤義勝 : 治療の概説『ライソゾーム病ー最新の病態, 診断, 治療の進歩ー』83-84, 診断と

- 治療社, 2011
- 3) 衛藤義勝：ポンペ病『ライソゾーム病－最新の病態，診断，治療の進歩－』239-249，診断と治療社, 2011
 - 4) 衛藤義勝：最先端医療の進歩－臓器移植・再生医療・遺伝子治療，小児科診療. 診断と治療社, 75(1)：9, 2012
 - 5) 衛藤義勝：拡大する酵素補充療法の適応疾患，日本医師会雑誌, 140(6)：1272-1274, 2011.9
 - 6) 衛藤義勝：先天代謝異常症における iPS 細胞技術の応用，医学のあゆみ, 239(14)：1359-1363, 2011
 - 7) 衛藤義勝：マルチプルスルファターゼ欠損症，ムコ多糖症 UPDATE, E・N MEDIX, 154-158, 2011.
 - 8) 衛藤義勝：所謂ムコリピドーシスの鑑別，ムコ多糖症 UPDATE, E・N MEDIX, 182-183, 2011.
- ### 3. 学会発表
- 1) 河越しほ，樋口 孝，河合利尚，孟 興麗，嶋田洋太，清水寛美，福田隆浩，張 璽，中畑龍俊，深田宗一郎，小林博司，井田博幸，大橋十也，衛藤義勝：Pompe 病モデルマウス由来 iPS 細胞から分化誘導した骨格筋細胞の形態学的解析. 第 16 回日本ライソゾーム病研究会，東京, 2011.9.30
 - 2) 樋口 孝，清水寛美，福田隆浩，河越しほ，松本朱里，小林博司，井田博幸，大橋十也，衛藤義勝：ハンター病モデルマウスにおける脳室内酵素補充療法の治療研究. 第 16 回日本ライソゾーム病研究会，東京, 2011.9.30
 - 3) 嶋田洋太，福田隆浩，西山由梨佳，小林博司，衛藤義勝，井田博幸，大橋十也：ポンペ病骨格筋におけるオートファジー異常検出のための血中バイオマーカーとしてのユビキチン化. 第 16 回日本ライソゾーム病研究会，東京, 2011.9.29
 - 4) 西山由梨佳，嶋田洋太，小林博司，大橋十也，衛藤義勝，井田博幸：ポンペ病細胞で生じるオートファジー活性化への Akt シグナル経路の関与. 第 16 回日本ライソゾーム病研究会，東京, 2011.9.30
 - 5) 河越しほ，樋口 孝，嶋田洋太，清水寛美，福田隆浩，張 璽，小林博司，井田博幸，大橋十也，衛藤義勝：Pompe 病モデルマウス由来 iPS 細胞を用いた骨格筋細胞への分化と細胞移植療開発に向けての試み. 第 53 回日本先天代謝異常学会，千葉, 2011.11
 - 6) 嶋田洋太，西田ひかる，長尾 陸，西山由梨佳，小林博司，衛藤義勝，井田博幸，大橋十也：プロテアソーム阻害剤を用いたポンペ病に対する新規シャペロン療法の開発. 第 53 回日本先天代謝異常学会，千葉, 2011.11
 - 7) 大橋十也，飯塚佐代子，嶋田洋太，樋口 孝，井田博幸，衛藤義勝，小林博司：ライソゾーム病酵素補充療法における酵素製剤に対する免疫反応に関する研究. 第 53 回日本先天代謝異常学会，千葉, 2011.11
 - 8) 樋口 孝，清水寛美，福田隆浩，河越しほ，松本朱里，小林博司，井田博幸，大橋十也，衛藤義勝：脳室内酵素補充療法によるハンター病モデルマウスの治療. 第 53 回日本先天代謝異常学会，千葉, 2011.11
 - 9) 小林正久，大橋十也，柳澤智義，猪又孝元，北川照男，衛藤義勝，井田博幸，草野英二： α -Galactosidase A に E 66Q 変異を持つ男性透析患者の心臓病理所見についての検討. 第 53 回日本先天代謝異常学会，千葉, 2011.11
 - 10) 西山由梨佳，嶋田洋太，小林博司，衛藤義勝，井田博幸，大橋十也：ポンペ病細胞における小脳体ストレス非依存的オートファジー活性化機構の解析. 第 53 回日本先天代謝異常学会，千葉, 2011.11
 - 11) 小林博司，有賀賢典，嶋田洋太，飯塚佐代子，福田隆浩，岩本武夫，衛藤義勝，井田博幸，大橋十也：レンチウイルスを用いたクラッペ病の遺伝子治療. 第 53 回日本先天代謝異常学会，

千葉, 2011.11

- 12) 有賀賢典, 小林博司, 嶋田洋太, 飯塚佐代子, 金城栄子, 衛藤義勝, 井田博幸, 大橋十也: レンチウイルスベクターによる遺伝子治療を施行した新生児 MPS VIIマウスの脳内 LC3 蛋白発現の検討. 第 53 回日本先天代謝異常学会, 千葉, 2011.11
- 13) 河越しほ, 樋口 孝, 河合利尚, 孟 興麗, 嶋田洋太, 清水寛美, 平山怜美, 福田隆浩, 張璽, 中畑龍俊, 深田宗一郎, 小林博司, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝: Pompe 病モデルマウス由来 iPS 細胞の樹立及び骨格筋細胞への分

化誘導. 第 56 回日本人類遺伝学会, 千葉, ポスター, 2011.11.10

- 14) 樋口 孝, 清水寛美, 福田隆浩, 河越しほ, 松本朱里, 小林博司, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝: ハンター病の新規治療法の開発～脳室内酵素補充療法によるハンター病モデルマウスの治療効果～, 第 56 回日本人類遺伝学会, 千葉, ポスター, 2011.11.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

ムコ多糖 II 型への髄注

分担研究報告書

Ⅲ. 早期診断法・新規治療法の開発

乾燥濾紙血液を用いた糖原病Ⅱ型の酵素学的スクリーニング法の研究
：免疫捕捉酵素活性測定法と競合酵素阻害法の比較

分担研究者：北川 照男(財団法人 東京都予防医学協会理事長)

研究要旨

糖原病Ⅱ型(以下 GSDⅡ)のスクリーニング法としてこれまでに知られている2つの方法、すなわち Umapathysivam らの免疫捕捉酵素活性測定法(immunocapture enzyme assay ; 以下、免疫捕捉法)及び Chamoles らの競合酵素阻害法(competitive enzyme inhibition assay ; 以下、競合阻害法)を用いて、新生児及び患者の乾燥濾紙血液中のライソゾームの酸性 α -glucosidase(以下 LGAA)活性を測定し、患者判定の容易さを比較した。

その結果、いずれの方法を用いても GSDⅡ患者群の LGAA 活性は、対象新生児の正常群に比較して明らかに低値を示すのが認められたので、両者とも、患者を容易に発見する事が可能と考えられた。従って、GSDⅡの新生児スクリーニングの一次検査には、手技が簡便で大量検体の処理が可能な免疫捕捉法を用い、陽性であった場合に、競合阻害法で確認検査を行うのが良いと思われた。

研究協力者

藤川 研人 (財)東京都予防医学協会
鈴木 健 (財)東京都予防医学協会
石毛 信之 (財)東京都予防医学協会
穴澤 昭 (財)東京都予防医学協会
大和田 操 (財)東京都予防医学協会
大橋 十也 東京慈恵会医科大学小児科
井田 博幸 東京慈恵会医科大学小児科
衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科
田中あけみ 大阪市立大医学部小児科

A. 緒言

糖原病Ⅱ型(以下 GSDⅡ)はライソゾームの酸性 α -glucosidase(以下 LGAA)の欠損を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患であり、乳児型の Pompe 病は心肥大、筋力低下、嚥下障害等の症状をきたし生後二年以内に死亡する事多い疾患であるが、新生児期から酵素補充療法を行えば、多

くは予後を改善できるので、新生児マススクリーニングが必要とされている。他方、若年型及び遅発型の GSDⅡの臨床症状は筋力低下を中心とし、生命予後は比較的良いが、酵素補充療法により QOL を向上させる事ができるので、これらも早期に診断し、治療を始めるのが望ましい。

体内には、至適 pH が酸性の maltase-glucosylase (以下 MG)、中性の glucosidaseⅡ及び中性 α -glucosidase C およびライソゾーム酸性 α -glucosidase A(LGAA)があり、GSDⅡは LGAA の遺伝子変異に基づく疾患である。従って、GSDⅡを酵素学的に診断するには、LGAA の活性を正確に測定する必要がある。そのためには、次の2つの方法が開発されている。すなわち酸性の緩衝液中にアカルボース¹⁾等の阻害剤を加えて、MG 活性を抑えると共に、至適 pH が中性の2種類の類似酵素の活性も同時に抑制して、LGAA 活性のみを測定する Chamoles ら²⁾の競合酵素阻害

法(competitive enzyme inhibition assay ; 以下、競合阻害法)と Umaphysivam ら⁴⁾が開発した抗 LGAA 抗体を用いて LGAA のみを捕捉し、その活性を直接測る免疫捕捉酵素活性測定法(immunocapture enzyme assay ; 以下、免疫捕捉法)がある。これらはいずれも有用な方法と思われるが、この2つの方法を比較検討した報告はない。そこで我々は両法を用いて新生児及び GSD II 患者の LGAA 活性の測定を試み、その成績を比較したので、ここに報告する。

B. 対象

大阪市立大学小児科グループの依頼により、予めインフォームドコンセントが得られた、2009年11月から2010年10月の間に同大学病院で出生した1,050例の新生児について、GSD II のスクリーニング検査を行った。また、某病院でフォローアップされていた、既知の GSD II 患者4例の乾燥濾紙血液(以下 DBS)を、正常新生児の LGAA 活性測定値と対比する目的で本研究に使用した。患者4例の病型は、乳児型2例、成人型1例、病型不明1例であった。

C. 方法

1. 免疫捕捉酵素活性測定法^{4,5)}

本研究では、Genzyme 社から購入した GSD II 酵素補充療法剤マイオザイム®を抗原として、ウサギ抗 LGAA ポリクローナル抗体を作製した。この抗体を50mmol/L炭酸ナトリウム緩衝液,pH9.6で20mg/Lの濃度に希釈し、96穴マイクロプレート(469949 ; Nunc 社)の各ウェルに100 μ Lずつ加え、25°Cで48時間静置して固相化した。250mmol/Lの塩化ナトリウムを含む20mmol/L Tris-HCl,pH7.0(以下洗浄緩衝液)でプレートを3回洗浄した後、0.2g/Lのチメロサル(Sigma 社)及び1g/Lのウシ血清アルブミン(以下 BSA ; Sigma 社)を含むリン酸緩衝液を加えた生理食塩水、pH7.4(以下 PBS)で各ウェルを満たし、使用直前まで4°Cで保存した。

測定方法は、直径3.2mmのDBSディスク3枚を試験管に取り、1g/LのBSA及び0.5mL/LのTween20(Sigma 社)を含むPBS,pH7.2を300 μ L加え、室温で1時間振盪し、得られた血液溶出液を抗体固相化プレートの各ウェルに100 μ L加えた。各試験毎に、共通のブランクウェル及び測定精度管理用ウェルを設け、PBS, pH7.2で希釈した0~20 μ g/Lの濃度のマイオザイム溶液をそれぞれに100 μ Lずつ加えた。プレートを室温で5分間振盪後、4°Cで20時間静置し、抗原抗体反応を行った後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。

その後、40mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液pH3.8中に4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside(以下4-MUG ; Sigma 社)を1.4mmol/Lの濃度に溶解して調整した基質溶液を各ウェルに100 μ L加え、室温で5分間振盪後、37°Cで20時間インキュベートし、酵素反応を行った。反応後、各ウェルに150mmol/L EDTA \cdot 4Na, pH11.1(以下反応停止液)を100 μ L加え、室温で5分間振盪して酵素反応を停止した。その後、反応液を蛍光測定プレート(MS-8496K ; 住友ベークライト社)に移し、蛍光マイクロプレートリーダー MTP-600F(コロナ電気社)を用いて、励起波長360nm、蛍光波長450nmで蛍光値を測定した。

試験は2重測定で行った。また、各試験毎に標準曲線用ウェルを設け、精製水で希釈した0~6.5 μ mol/L 4-methylumbelliferone(以下4-MU ; Sigma 社)溶液を100 μ L加え、反応停止液100 μ Lを加えた後、蛍光値を測定し、標準曲線を作成した。これを用いて各サンプルの遊離4-MU濃度を算出し、ブランクの値を差し引いた後、直径3.2mm DBSディスク中の血液量を3.36 μ LとしてLGAA活性(μ mol/h/L)を計算した。活性の検出限界値はブランクの平均値+SDと定め、この値を下回るサンプルは、活性が無いものとみなした。また、精度管理用ウェルの測定値を用いて、試験間CVを計算した。

2. 競合酵素阻害法

本研究では Chamoles ら²⁾が開発した方法を一部改変して用いた。本法では、①中性 (pH7.0)、②酸性 (pH3.8) 並びに③酸性 (pH3.8) で且つ阻害剤アカルボース (Toronto Research Chemicals 社) を加えた緩衝液を用いて酵素反応を行い、①の緩衝液で得られた活性値を $N\alpha G$ 、②の緩衝液で得られた活性値を $A\alpha G$ 、③の緩衝液で得られた活性値を $A\alpha GIA$ とし、 $N\alpha G$ を中性 α -glucosidase の総活性、 $A\alpha G$ を酸性 α -glucosidase の総活性、 $A\alpha GIA$ を LGAA の活性とみなすものとし、以下の手順で測定した。

直径 3.2mm の DBS ディスク 1 枚を試験管に取り、精製水 360 μL を加え、室温で 1 時間振盪し、血液溶出液を得た。また、pH7.0 及び 3.8 の 40mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液中に 4-MUG を 1.4mmol/L の濃度に溶解して、中性及び酸性 pH の基質溶液をそれぞれ調整した。その後、蛍光測定プレート中で以下の通り溶液を混和し、酵素反応を行った。 $N\alpha G$ 測定用ウェルに血液溶出液 40 μL 、中性 pH の基質溶液 50 μL 、精製水 10 μL を、 $A\alpha G$ 測定用ウェルに血液溶出液 40 μL 、酸性 pH の基質溶液 50 μL 、精製水 10 μL を、 $A\alpha GIA$ 測定用ウェルに血液溶出液 40 μL 、酸性 pH の基質溶液 50 μL 、80 $\mu\text{mol/L}$ のアカルボース溶液 10 μL をそれぞれ加え、プレートを室温で 5 分間振盪した後、37°C で 20 時間インキュベートした。反応後、各ウェルに反応停止液を 200 μL 加え、室温で 5 分間振盪して酵素反応を停止した後、蛍光値を測定した。ブランク用ウェルには酸性 pH の基質溶液 50 μL 及び精製水 10 μL のみを加え、37°C で 20 時間インキュベートした後、試験管中で 37°C で 20 時間インキュベートした血液溶出液 40 μL 及び反応停止液 200 μL を加えて、室温で 5 分間振盪した後、蛍光値を測定した。

試験は 2 重測定で行った。各試験毎に標準曲線用ウェルを設け、精製水で希釈した 0~6.5 $\mu\text{mol/L}$ 4-MU 溶液を 100 μL 加え、反応停止液 200 μL を加えた後、蛍光値を測定し、標準曲線を作成した。

これを用いて各サンプルの遊離 4-MU 濃度を算出し、ブランクの値を差し引いた後、直径 3.2mm の DBS ディスク中の血液量を 3.36 μL として酵素活性 $A\alpha GIA$ ($\mu\text{mol/h/L}$) 及び活性比率 $N\alpha G/A\alpha GIA$ 、 $(A\alpha G - A\alpha GIA)/A\alpha G$ を計算した。血中色素がブランクの蛍光強度に干渉するため、ブランクの値を用いた定量限界値の算定は行わなかった。判定基準：判定の指標として、免疫捕捉法では LGAA 活性を、競合阻害法では活性比率 $N\alpha G/A\alpha GIA$ 及び $(A\alpha G - A\alpha GIA)/A\alpha G$ を用いた (表 1)。最初に試験した新生児 159 例の活性分布から、免疫捕捉法では LGAA 活性の 3% タイル値 ($<0.419 \mu\text{mol/h/L}$)、競合阻害法では $N\alpha G/A\alpha GIA$ の 98% タイル値 (>14.6)、 $(A\alpha G - A\alpha GIA)/A\alpha G$ の 2% タイル値 ($\geq 65.0\%$) をそれぞれのカットオフ値と定め、全検査対象者の判定に用いた。一次検査では、前述した指標のいずれかでカットオフ値を超えた例を陽性と判定し、二次検査では LGAA 活性の再測定及び遺伝子解析を依頼した。二次検査の活性測定には競合阻害法を用い、カットオフ値は LGAA 活性では対照平均値の 8%、 $N\alpha G/A\alpha GIA$ では 60、 $(A\alpha G - A\alpha GIA)/A\alpha G$ では 80% とした。また、遺伝子解析では pseudodeficiency 遺伝子変異 c.1726G>A の検索を行った。

なお、本研究では Chamoles らの原著²⁾に従い、前述した 2 種類の活性比率のみを患者判定指標として用いたが、 $A\alpha GIA$ を LGAA の活性とみなす事ができると考えられるため、 $A\alpha GIA$ の 3% タイル値 (0.745 $\mu\text{mol/h/L}$) を参考値として用いた。

3. ELISA 法による酵素蛋白測定法

1) Genzyme 社から購入した GSD II 酵素補充療法剤マイオザイム®を抗原として、ウサギ抗 LGAA ポリクローナル抗体 (LGAA 抗体) を作製し、この抗体の一部を用いてペルオキシダーゼを標識した抗 LGAA ポリクローナル抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗体) を作製した。

2) LGAA 抗体固相化マイクロプレートの作製 および保存

LGAA 抗体を 50mmol/L 炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6 で 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に希釈し、96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μL ずつ加え、25°C で 48 時間静置して固相化した。250mmol/L 塩化ナトリウムを含む 20mmol/L Tris-HCl (洗浄緩衝液) でプレートを 3 回洗浄した後、0.2g/L チメロサル (Sigma 社) および 1g/L ウシ血清アルブミン (Sigma 社) を含むリン酸緩衝液を加えた生理食塩水 (PBS), pH7.0 で各ウェルを満たし、使用前まで 4°C で保存した。

3) 測定方法

- (1) PBS, pH7.0 で 0~20ng/mL 濃度を 7 段階に希釈したマイオザイム溶液を LGAA 抗体固相化プレートの各ウェルに 100 μL ずつ加えたものを標準物質とし、また他の 2 ウェル毎に 4 例の健常成人血漿 25 μL を測定試料として加え、このプレートを室温で 5 分間振盪し、25°C で 20 時間静置し、抗原抗体反応を行った。
- (2) 次に、洗浄緩衝液で 3 回洗浄した後、PBS で 2,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体 100 μL を各ウェルに加え、25°C、3 時間反応させた。
- (3) 0.015% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 pH4.5 で溶解した 0-フェニレンジアミン基質溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度) を 100 μL 各ウェルに加え、25°C、20 分反応させた。
- (4) 反応後、3N 硫酸溶液 100 μL で反応を停止した後、マイクロプレート用分光光度計を用いて、波長 492nm で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪市立大学医学部倫理委員会、(財) 東京都予防医学協会倫理委員会のも承認を得て、本研究の GSD II 患者と新生児正常対照者、および大阪市大病院で出生した新生児対象者の濾紙血液は、その用途、研究目的を事前に文章で説明した後、承諾書に署名を得てから採取し、これらの検

体を使用して本研究を行った。

D. 結果

1. スクリーニング成績

免疫捕捉法における LGAA 活性の試験間 CV (n=10) は 5.1% から 20.3% であり、定量限界値は 0.120 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{L}$ であった。また、競合阻害法の N α G/A α GIA の試験間 CV は 14% 以下であることを Chamoles ら²⁾が報告している。

対象新生児 (n=1,050) 及び既知の GSD II 患者 (n=4) の一次スクリーニング成績を表 2 に示した。免疫捕捉法における LGAA 平均活性値は、対象新生児群 2.652 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{L}$ に対して患者は全例が検出限界値を下回り、両者に顕著な差が認められた。また、競合阻害法の指標である N α G/A α GIA、(A α G-A α GIA)/A α G、及び A α GIA はいずれも、患者群と対象新生児群に差があることが示され、N α G/A α GIA が比較的良く患者を分離できる傾向にあった。なお、競合阻害法で MG 活性を阻害して得た A α GIA と免疫捕捉法の LGAA 活性の平均値を比較したところ、対象新生児群では両者共ほぼ同様の値で、いずれも患者の分離が可能であり、また、患者の活性値は、LGAA 活性が検出限界値未満であったのに対して、A α GIA では平均 0.142 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{L}$ と若干高値を示す傾向にあった。既知の GSD II 患者 4 例は、すべての項目でカットオフ値を超える値を示した (表 2)。一次スクリーニング及び確認検査で、いずれかの判定基準が陽性を示し、再採血を依頼した対象新生児は 43 例 (4.1%) であり、その内訳は、免疫捕捉法の LGAA 活性でカットオフ値を超えたもの 33 例 (3.1%)、競合阻害法の N α G/A α GIA で 36 例 (3.4%)、及び (A α G-A α GIA)/A α G で 35 例 (3.3%) であった。これらの一次スクリーニング陽性 43 例の再検酵素活性測定の結果は、42 例が正常、1 例が陽性であり、遺伝子診断の結果は、29 例は病原性が無いと言われている pseudodeficiency 遺伝子変異⁶⁾ c.1726G>A の homozygote、7 例は c.1726G>A の heterozygote、2 例は c.1726G>A を持たない

ものであり、他の5例は再検査を行っていない再採血依頼中のものであった。再検酵素活性が陽性であった1例は、c.1726G>Aのheterozygoteであったので、LGAAのexon全長の塩基配列を決定したが、既報の病原性変異を持たなかったため、経過観察が必要と考えられた。

c.1726G>Aのhomozygote 29例の活性の分布範囲は、免疫捕捉法によるLGAA活性で0.000~0.891 $\mu\text{mol/h/L}$ 、競合阻害法によるA α GIAでは0.049~4.065 $\mu\text{mol/h/L}$ であり、いずれも患者4例の分布範囲と一部重複した。

また、免疫捕捉法によるLGAA活性及び競合阻害法によるA α GIAの回帰分析の結果、両者には $r=0.622$ の相関が認められた。2.0 $\mu\text{mol/h/L}$ 未満の低活性値域は、免疫捕捉法では0.000~0.497 $\mu\text{mol/h/L}$ の低活性群が形成され、このうち4例は患者であり、28例はpseudodeficiency homozygoteであった。一方、競合阻害法では低活性値を示す群は0.013~0.800 $\mu\text{mol/h/L}$ であり、免疫捕捉法のものよりも幅広く広がり、これらの群の中で一次スクリーニング陽性群と陰性群とが混在していた。

2. ELISA法による蛋白測定結果

標準物質マイオザイムの酵素蛋白を捕捉した後の残液をELISA法で再測定した結果、残液に含まれていた蛋白量は平均22.8%であった。このことは使用したマイオザイム蛋白量の約80%が捕捉されていることを示し、Umapathysivamらの報告とほぼ一致していた。図2に示したマイオザイム蛋白値は、2000pgまで直線性を示し、良好な結果であった。また、同時に測定した健常成人4例の血漿蛋白値は6.4~30.8ng/mLの範囲にあった。

E. 考察

今回の研究結果から、我々が試みた免疫捕捉法と、従来から用いられている競合阻害法の両者を比較した結果、感度は両法とも100%であり、特異度は、免疫捕捉法では97.2%、競合阻害法では

95.3%と高い数値であったので、いずれの方法ともGSD IIの新生児スクリーニングに使用可能と思われる。また、これまでに報告されている、免疫捕捉法における捕捉時の酵素活性の低下は、患者の発見には影響しないと考えられた。免疫捕捉法は競合阻害法と比較して、捕捉したLGAAの活性を直接測定しており、また、類似酵素を阻害する手順が不要で、手技が簡便である点が優れている。

また、競合阻害法の3種類の指標の内、A α GIAと(A α G-A α GIA)/A α GIAには患者の分離精度にほぼ差が無いと思われたので、試験手技をより簡便化するため、A α GIAを判定基準として採用し、N α G/A α GIAと組み合わせて判定を行うのが良いと考えられた。

本来一つの測定法でスクリーニングを行うことが望ましいと思われるものの、2つの方法を組み合わせれば、より正確な診断が可能であり、判定基準の変更によってpseudodeficiencyの陽性例をある程度減少することは可能と思われた。しかし、pseudo-deficiency homozygoteは、日本では約26人に一人存在すると言われ⁷⁾、また、LGAA活性低値を示すheterozygoteの存在も今回の検討で明らかになっており、これらの一部の例は、免疫捕捉法および競合阻害法では患者と区別出来ないため、新生児を対象としたスクリーニングを行う上で注意が必要である。

我々が経験している患者は4例に過ぎず、遅発型の患者の経験も少なく、今後さらに多くの患者や新生児の検査を行って結論を得たいと考えている。また、ELISA法で濾紙血液中のLGAA蛋白を測定し、免疫捕捉法および競合阻害法による酵素活性測定と合わせてより精度の高いスクリーニング法を行いたいと考えている。

F. 文献

- 1) Li Y, Scott CR, Chamoles NA, et al : Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. Clin Chem, 50 : 1785-1796, 2004

- 2) Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C : Glycogen storage disease type II : enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. Clin Chim Acta, 347 : 97-102, 2004
- 3) Chien YH, Chiang SC, Zhang XK, et al : Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible : Results from the Taiwan screening program. Pediatrics, 122 : e39-e45, 2008
- 4) Umaphysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ : Determination of acid α -glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. Clin Chem, 47 : 1378-1383, 2001
- 5) Dean CJ, Bockmann MR, Hopwood JJ, Brooks DA, Meikle PJ : Detection of Mucopolysaccharidosis type II by measurement of iduronate-2-sulfatase in dried blood spots and plasma samples. Clin Chem, 52 : 643-649, 2006
- 6) Kroos MA, Mullaart RA, Van Vliet L, et al : p.[G576S; E689K] : pathogenic combination or polymorphism in Pompe disease?. Eur J Hum Genet, 16 : 875-879, 2008
- 7) Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, et al : High frequency of acid α -glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. Mol Genet Metab, 97 : 190-195, 2009
- 5) Dean CJ, Bockmann MR, Hopwood JJ, Brooks DA, Meikle PJ : Detection of
- G. 知的財産の出願・登録状況
特になし

表 1 一次検査のカットオフ値

	LGAA 活性 $\mu\text{mol/h/L}$	N α G/A α GIA Times	(A α G-A α GIA) /A α G %	A α GIA $\mu\text{mol/h/L}$
免疫捕捉法	<0.419 ^{I)}	—	—	—
競合阻害法	—	>14.6 ^{II)}	≥ 65.0 ^{III)}	(<0.745) ^{IV)}

I)～III)のいずれか一つでも超えた例を陽性と判定し、IV)は参考値として用いた

表2 一次スクリーニング成績

2009年11月～2011年11月

検査対象	N	免疫捕捉法	N α G/A α GIA	競合阻害法	A α GIA*
		LGAA活性 μ mol/h/L	times	(A α G-A α GIA) /A α G %	A α GIA* μ mol/h/L
		cut off <0.419	cut off >14.6	cut off \geq 65.0	参考値 <0.745
新生児	1050	2.652 \pm 1.592 (0.000~12.141)	6.1 \pm 14.1 (0.9~329.0)	41.3 \pm 11.6 (0.0~97.5)	3.077 \pm 1.844 (0.049~12.270)
陰性例 〔上記の基準の全てが陰性の例〕	1007	2.749 \pm 1.548 (0.419~12.141)	4.6 \pm 2.1 (0.9~13.3)	40.1 \pm 9.9 (0.0~64.9)	3.178 \pm 1.810 (0.205~12.270)
陽性例 〔上記の基準のいずれかが陽性の例〕	43				
免疫捕捉法の陽性例	33	0.142 \pm 0.137 (0.000~0.385)			0.647 \pm 0.706** (0.049~4.065)
競合阻害法の N α G/A α GIAの陽性例	36		45.5 \pm 64.3 (15.0~329.0)		
競合阻害法の (A α G-A α GIA)/A α Gの陽性例	35			74.1 \pm 8.7 (65.0~97.5)	
既知のGSD II 患者	4	0.000 \pm 0.000	209.3 \pm 258.5 (42.5~591.5)	90.7 \pm 6.7 (84.8~98.8)	0.142 \pm 0.142 (0.013~0.315)

mean \pm SD(range)

* A α GIAは今回判定基準として用いなかっが、LGAA活性とみなされる

**免疫捕捉法で陽性であった33例について、競合阻害法のA α GIAを記載した

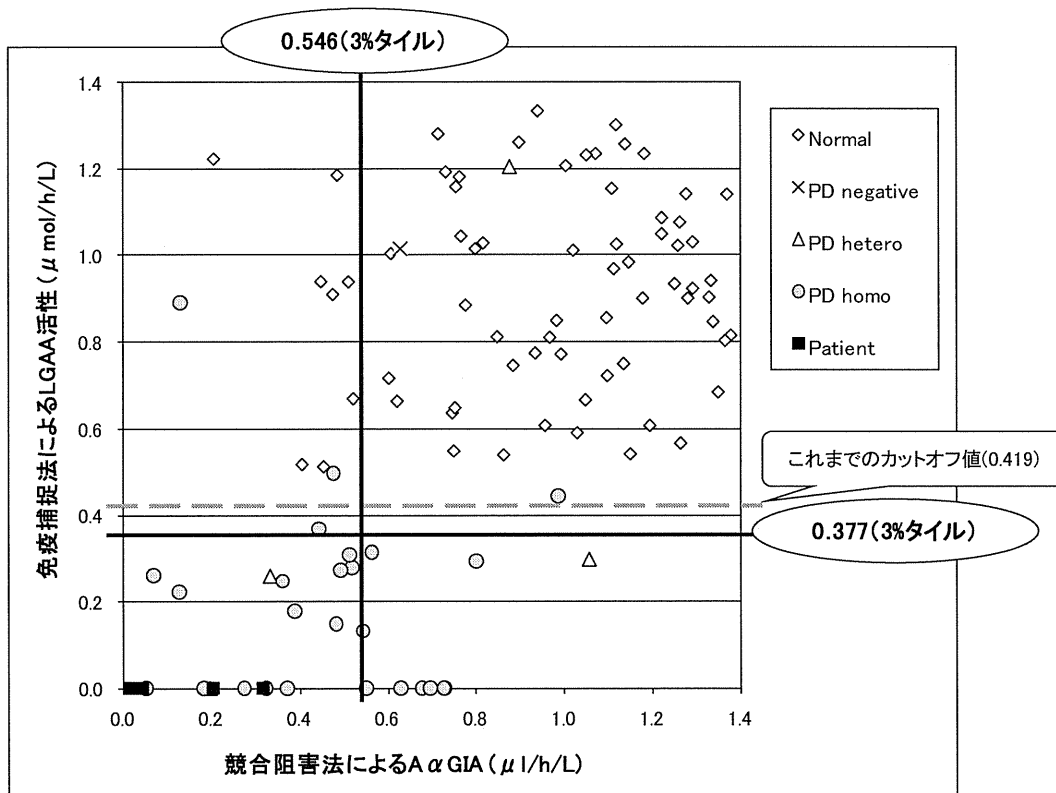


図1 免疫捕捉法並びに競合阻害法による基底 GSD II 患者の LGAA 活性値の相関関係 (両方で下位 20%以内の低活性例のみを示し、PD は pseudodeficiency を表す)

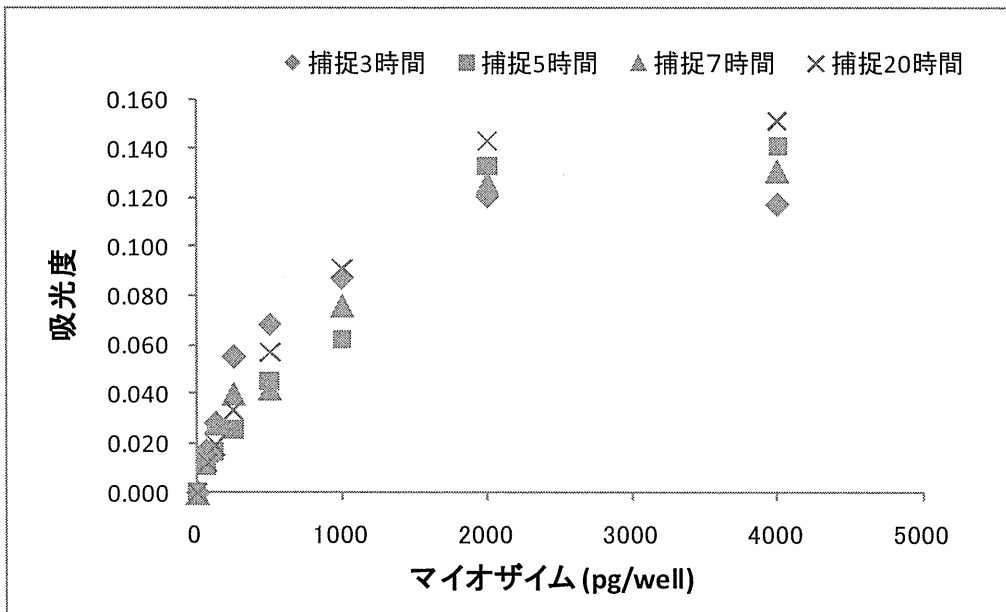


図2 ELISA 法による捕捉時間による蛋白量の変化

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

分担研究者：島田 隆(日本医科大学教授)

研究要旨

ArylsulfataseA (ASA) の遺伝的欠損症である異染性白質ジストロフィー (MLD) に対する遺伝子治療法の可能性を検討している。通常の酵素補充療法は、脳血液関門 (BBB) のため神経症状の改善には効果がない。我々はこれまで BBB を通過して MLD を治療する方法として、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの脳内直接投与や、BBB が未熟な新生時期の全身投与による遺伝子治療の有効性と安全性を検討してきた。本年度の研究では AAV ベクターの髄腔内注射による MLD 治療の可能性を検討した。神経組織に親和性の高い 9 型の AAV ベクターを、未発症の 6 週齢の若い MLD マウスと、既に神経症状が出現している 12 ヶ月齢の MLD マウスの後頭蓋窩から注入した。14-15 ヶ月時点での解析では、小脳や脳幹部を中心に広範囲な脳組織での遺伝子導入と遺伝子発現が確認された。ASA の発現に伴い、蓄積していたスルファチドは減少した。運動機能については、6 週齢に治療したマウスではコントロールと比較して著明な改善が見られたが、12 ヶ月齢に治療したマウスでは改善は認められなかった。この結果は、神経症状の治療には早期の ASA の補充が必要であることを示唆している。

研究協力者

三宅 弘一(日本医科大学・准教授)

三宅 紀子(日本医科大学・研究生)

A. 研究目的

異染性白質ジストロフィー (MLD) をモデルとして、遺伝性神経変性疾患の細胞遺伝子治療の可能性について検討している。MLD は ArylsulfataseA (ASA) の遺伝的欠損により脳白質や末梢神経でスルファチドが蓄積し、広範囲な脱髄を呈する。様々な神経症状を呈するが、最も頻度が高い乳児型では生後数年以内に除脳硬直状態となり死亡する。早期の骨髄移植が唯一の治療法とされているが、症状の出現を遅らせる効果しか報告されていない。骨髄移植の効果は、血液細胞が脳内に侵入しミクログリアに分化して ASA を分泌するためと考えられている。最近、イタリアでレンチウイ

ルスベクターで遺伝子導入した骨髄細胞の移植が開始されたが、その有効性と安全性は明らかになっていない。

これまでの研究で、AAV ベクターを直接脳内投与することで ASA ノックアウトマウス (MLD マウス) のスルファチドの減少や運動機能の回復を認めている。しかし、臨床応用を行うためにはより侵襲性の低い方法でしかも数百倍の大きさのヒト脳への遺伝子導入が必要である。BBB を越えて脳組織を非侵襲的に治療する方法としてウイルスベクターの髄腔内投与と、BBB の幼若性が期待できる新生児期のベクターの全身投与を検討している。この実験では前者の可能性を検討した。

B. 研究方法

神経組織に親和性が高いことが知られている 9 型 AAV ベクターに ASA 遺伝子と GFP 遺伝子

を組み込んだ AAV9-ASA-GFP ベクターを作製した。組換えベクターはベクタープラスミド、パッケージプラスミド、ヘルパープラスミドのトリプルトランフェクション法により作製し、Iodixanol の密度勾配遠心により精製した。

AAV ベクターを、症状の無い 6 週齢の若い MLD マウスと、既に神経症状が出現している 12 ヶ月齢の MLD マウスの後頭蓋窩から注入した。14-15 ヶ月齢時点で生化学的、免疫組織学的解析を行った。運動機能はバランスビームテストで評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は日本医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

AAV9 ベクターを後頭蓋窩から注入したところ、脳組織全体に GFP の発現が確認された。特に小脳や脳幹部の神経細胞、脊髄後索のファイバー、脊髄後根神経節内の神経細胞体で強い発現を認めた。免疫染色では小脳と嗅球で ASA の強い発現が見られた。Alcian blue の染色、及び TLC を使った定量的測定の結果、小脳、脳幹部のスルファチドは著明に減少していた。

バランスビームによる運動機能の評価では 12 月齢にベクターを投与したマウスでは改善が見られなかった。一方、6 週齢に治療したマウスでは未治療のマウスに比べ明らかな改善が示された。

D. 考察

この実験により、未発症の MLD マウスの治療法として、AAV ベクターの髄腔内注入は有効であることが示された。これまでの研究で、AAV ベクターを脳実質内に直接投与する治療法を報告してきたが、髄腔内注入は脳内注入に比較して安全で、繰り返すことも容易であり治療法としては優れている。

一方、既に神経症状が出現している MLD マウ

スの治療法としては AAV ベクターの髄腔内注入は効果がなかった。スルファチドの減少は確認されているにもかかわらず、運動機能の改善は見られなかった。既に、神経系細胞に不可逆的な変化が起きていると考えられる。

MLD を治療するためには、早期診断と早期治療が重要であることが再確認された。現在、イタリアで臨床研究が開始されている、造血幹細胞を使った遺伝子治療においても未発症の患児が対象となっている。神経症状が明らかになっている多くの MLD の患児の治療のためには新たな戦略が必要である。

E. 結論

AAV ベクターを未発症のマウスの髄腔内に注入することで MLD の症状の出現を抑制できた。神経症状が出現している MLD マウスにたいしては髄腔内注入の効果は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T : AAV-8 vector expressing IL-24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice. *Blood*, 2011, In press
- 2) Kato S, Kuramochi M, Takasumi K, Kobayashi K, Inoue K, Takahara D, Hitoshi S, Takenaka K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K : Neuron-Specific Gene Transfer through Retrograde Transport of Lentiviral Vector Pseudotyped with a Novel Type of Fusion Envelope Glycoprotein. *Hum. Gene Ther*, 22 : 1511-1523, 2011
- 3) Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Hirai Y, Shimada T : Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors.

- Brain Res, 1389 : 19-26, 2011
- 4) Matsumoto T, Miyake K, Yamamoto S, Orimo H, Miyake N, Odagaki Y, Adachi K, Iijima O, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T : Rescue of Severe Infantile Hypophosphatasia Mice by AAV Mediated Sustained Expression of Soluble Alkaline Phosphatase. Hum. Gene Ther, 22 : 1355-1364, 2011
 - 5) Isotani M, Miyake K, Miyake N, Hirai Y, Shimada T : Direct comparison of four adeno-associated virus serotypes in mediating the production of anti-angiogenic proteins in mouse muscle. Cancer Invest, 29 : 353-359, 2011
 - 6) Nihira T, Yasuda T, Hirai Y, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H : Adeno-associated viral vector-mediated gene transduction in mesencephalic slice culture. J Neurosci Methods, 201 : 55-60, 2011
 - 7) Takasu K, Sakai A, Hanawa H, Shimada T, Suzuki H : Overexpression of GDNF in the Uninjured DRG Exerts Analgesic Effects on Neuropathic Pain Following Segmental Spinal Nerve Ligation in Mice. J. Pain, 12 : 1130-1139, 2011
 - 8) Yamamoto S, Orimo H, Matsumoto T, Iijima O, Narisawa S, Maeda T, Millán J, Shimada T : Prolonged survival and phenotypic correction of Akp2^{-/-} hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy. J. Bone Miner. Res, 26 : 135-142, 2011
 - 9) Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K : A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. Hum. Gene Ther, 22 : 197-206, 2011
 - 10) Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T : In Vivo Application of an RNAi Strategy for the Selective Suppression of a Mutant Allele. Hum. Gene Ther, 22 : 27-34, 2011
 - 11) Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T, Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T : Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles. Biochem. Biophys. Res. Commun, 405 : 204-209, 2011
 - 12) Yasuda T, Hayakawa H, Nihira T, Ren YR, Nakata Y, Nagai M, Hattori N, Miyake K, Takada M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H : Parkin-Mediated Protection of Dopaminergic Neurons in a Chronic MPTP-Minipump Mouse Model of Parkinson Disease. J Neuropathol Exp Neurol, 70 : 686-697, 2011
2. 学会発表
- 1) Matsumoto T, Miyake K, Miyake N, Orimo H, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T : Successful Treatment of Hypophosphatasia Model Mice by a Single Intramuscular Injection of AAV Type 8 Vector Expressing Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, Seattle, WA, 2011.5
 - 2) Sugano H, Matsumoto T, Miyake K, Watanabe A, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T : Fetal Gene Therapy for Lethal Murine Hypophosphatasia. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, Seattle, WA, 2011.5

- 3) Igarashi T, Miyake K, Asakawa N, Shimada T, Takahashi H : Direct Comparison of Administration Routes for AAV 8 Mediated Ocular Gene Therapy. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, Seattle, WA, 2011.5
- 4) Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, Shimada T : Intrathecal Administration of Type 9 AAV Vector Expressing Arylsulfatase A Is Effective for Reduction of Sulfatide Storage but Not for Correction of Neurological Deficits in Adult Metachromatic Leukodystrophy Model Mice with Overt Neurological Symptoms. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, Seattle, WA, 2011.5
- 5) Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Inokuchi K, Shimada T, Dan K : A single injection of AAV-8 vector expressing IL-24 efficiently suppresses tumor growth mediated by multiple anti-tumor mechanisms in MLL/AF4 positive ALL model mice. 2011 European Hematology Association Congress, London, 2011.6
- 6) 五十嵐 勉, 三宅弘一, 浅川なぎさ, 島田 隆, 高橋 浩: AAVtype8 ベクターの投与方法の違いによる遺伝子導入効率と発現期間の検討. 第 115 回日本眼科学会総会, 2011.4
- 7) Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, Shimada T : Gene Therapy for MLD by Intrathecal Administration of Type 9 AAV Vector Expressing ASA. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011.7
- 8) Miyake K, Matsumoto T, Miyake N, Orimo H, Fukunaga Y, Shimada T : AAV Type 8 Mediated Bone-Targeted and Muscle Directed Neonatal Gene Therapy for Hypophosphatasia. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011.7
- 9) Osamu I, Sugano H, Miyake K, Shimada T : Successful treatment of severe infantile hypophosphatasia by ex vivo gene therapy using bone marrow cells expressing bone targeted TNALP. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011.7
- 10) Asakawa N, Igarashi T, Miyake K, Shimada T, Takahashi H : Direct comparison of administration routes for AAV8 mediated ocular gene therapy. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011.7
- 11) Miyake K, Shimada T : Development of cell targeting strategy using HIV vector pseudotyped with HIV envelope. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011.7
- 12) 菅野華子, 飯島 修, 渡邊 淳, 福永慶隆, 島田 隆: 低フォスファターゼ症モデルマウスの胎児期遺伝子治療. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2011.7
- 13) 飯島 修, 菅野華子, 渡邊 淳, 島田 隆 : 骨髓細胞移植による低フォスファターゼ症の遺伝子治療. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2011.7
- 14) 渡邊 淳, 菅野華子, 飯島 修, 折茂英生, 島田 隆 : 日本における周産期型低フォスファターゼ症 高頻度変異部位 1559delT と周産期時期からの follow up の重要性. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2011.7
- 15) Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Shimada T, Inokuchi K, Dan K : The effect and specific mechanisms of systemic gene therapy using AAV8-IL24 in MLL/AF4 Tg mice. 日本血液学会総会, 名古屋, 2011.10

レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発

分担研究者：小林 博司(東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部)

研究要旨

ムコ多糖症VII型(MPSVII)、およびクラッペ病は、ライソゾーム性分解酵素欠損による常染色体劣性遺伝病である。我々はレンチウイルスを用いたこの二疾患に対する遺伝子治療の検討を進めた。まず MPSVIIの欠損酵素 HBG を組込んだレンチウイルスを作成し、細胞への導入を試みたところ有意な活性上昇を見た。更に新生児マウスへの静脈注射により、生命予後の改善、中枢神経系への長期遺伝子発現も得られた。次にクラッペ病の欠損酵素 GALC を組込んだレンチウイルスも開発し、細胞株およびマウス新生児での肝臓での酵素発現上昇、脳でのサイコシン蓄積の減少が見られた。更に基質合成阻害薬を併用することで相乗効果的な生命予後の改善が見られた。今後更なる in vivo での効果を目指して研究を推進する。

研究協力者

有賀 賢典(東京慈恵会医科大学助教)

を作って感染させ、GFP および欠損酵素の力価を計測した。

A. 研究目的

ムコ多糖症およびクラッペ病の根本的治療としての有効な遺伝子治療の開発

3. 新生児マウスへの投与：

日齢0-2の新生児マウスの顔静脈へ作成した組換えウイルスを静脈注射し、5週間で臨床所見、病理、脳、肝臓などでの欠損酵素およびレポーター遺伝子発現を評価した。MPSVIIではグリコサミノグリカン、クラッペ病ではサイコシンといった蓄積物質の評価も行った。更にクラッペ病では基質合成阻害剤 L-シクロセリンを遺伝子治療を行ったマウス群で日齢5から隔日で皮下注射し効果を検討した。

B. 研究方法

1. 組換えレンチウイルス

HIV由来であり NEF, VIF などの副蛋白を除去し、IRES 配列を介してレポーター遺伝子として GFP を組込んだレンチウイルスベクターに MPSVIIの欠損酵素 HBG、さらに Krabbe 病の欠損酵素 GALC をクローニングし、2種類の組換えレンチウイルスを作成した。

C. 研究結果

1. MPSVIIの欠損酵素 HBG を組み込んだウイルスを感染させた細胞株(293A)は HBG と GFP 両方の発現が容量依存性に見られ、FITC フィルタを用いた蛍光顕微鏡では GFP 発現細胞を数多く確認できている。新生児モデルマウスへの遺伝子導入では30週齢を超えても中枢神経

2. 細胞培養

実験に使用する 293A 細胞は 10% ウシ胎児血清と抗生物質とを加えた DMEM (D-10) 培地を用いて、5% 二酸化炭素の環境下において、37°C で培養した。これに対し組換えウイルスを希釈を系列

系への遺伝子発現が realtime PCR により確認され、更に主要臓器での蓄積物質の減少も見られた。

2. Krabbe 病の欠損酵素 GALC を組み込んだウイルスを感染させた細胞株(293A)では GALC, GFP 両方の発現が見られ、モデルマウスへの新生児注射では 1 週間後の肝において正常の 10%の酵素活性が得られた。更に 5 週齢の脳ではサイコシンの減少が有意に見られた。また基質合成阻害剤 L-シクロセリン併用群では生命予後、症状発現遅延効果において有意な所見が得られた。

D. 考 察

MPSVIIに関しては生命予後の改善、導入遺伝子の長期発現が証明され遺伝子治療の in vivo での有用性が示唆された。クラッベ病では有意な生命・症状発現遅延効果は得られたが、十分な予後改善とは言えず、今後ベクター構築、導入遺伝子の再検討も含めて研究を推進する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

- 1) Kobayashi H., Izuka S., Ariga M, et al. : Lentivirus mediated neonatal gene therapy for Krabbe disease. 14th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT), Seattle, WA, 2011.5
- 2) 小林博司, 飯塚佐代子ほか: レンチウイルスベクターを用いたクラッベ病に対する遺伝子治療. 第 17 回日本遺伝子治療学会, 福岡, 2011.7
- 3) 有賀正道, 小林博司ほか: レンチウイルスベクターを用いたムコ多糖症VII型に対する遺伝子治療. 第 53 回日本先天代謝異常学会, 千葉, 2011.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

ライゾーム病の新しい分子治療法開発

分担研究者：鈴木 義之(国際医療福祉大学教授)

研究要旨

GM1-ガングリオシドーシスのモデルマウスに経口シャペロン薬 NOEV を投与し、その薬理動態、組織内分布、シャペロン効果を検討した。NOEV は経口摂取後速やかに腸管から吸収され、血液に入り、尿に排泄された。そして血液脳関門を通過し脳組織に入り、シャペロン効果により β -ガラクトシダーゼ活性を上昇させた。組織内濃度上昇は一過性であり、長期の投与後も蓄積傾向はなかった。このシャペロン化合物が薬剤として開発可能であるという結論が得られた。

研究協力者：

久保孝利(生化学工業株式会社中央研究所・研究員)

A. 研究目的

GM1-ガングリオシドーシスに対する新しい治療薬としてのシャペロン化合物 NOEV(N-オクチル-4-エピ- β -バリエナミン)のモデルマウスへの投与後の体液・組織内移行、排泄動態を調べ、薬剤としての適格性を確認すること。

B. 研究方法

ヒト若年型変異遺伝子を発現する軽症型 GM1-ガングリオシドーシスのモデルマウス(R201 マウス)、または野生型マウスにシャペロン化合物 NOEV を水溶液として経口投与した。まず野生型マウスに定量的な単回投与後、血中濃度を解析し、

薬物動態を調べた。次に野生型マウスへの短期間投与中・投与中止後の組織・体液濃度の変化を調べた。そしてモデルマウスへの長期投与における NOEV 濃度の変動、 β -ガラクトシダーゼ活性に対するシャペロン効果を解析した。

(倫理面への配慮)

国際医療福祉大学・生化学工業株式会社の動物実験倫理規定に従って投与実験を行った。

C. 研究結果

野生型マウスへの経口ゾンデによる 1.5mg/kg または 3mg/kg NOEV の定量的単回投与後、いくつかの薬物動態パラメータを算出した(表 1)。C_{max} と AUC は 3mg/kg 投与群で高く、しかもより水溶性の高い塩酸塩に高い値が得られた。血

表 1 NOEV 単回投与後の薬物動態パラメータ(血中濃度解析)

	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (min)	T _{1/2} (min)	AUC _{0-∞} (ng-min/ml)	AUC/D (ng-min-k _g /ml/ng)	MRT _{0-∞} (min)
Free NOEV (3 mg/kg, N=2)	501.5	60.0	86.5	94703	0.03	149.0
HCl salt (3 mg/kg, N=4)	664.0	60.0	112.3	144037	0.05	186.5
Free NOEV (1.5 mg/kg, N=2)	259.2	30.0	76.0	45996	0.03	127.1
HCl salt (1.5 mg/kg, N=2)	368.6	45.0	77.9	50346	0.03	121.2

C_{max} = peak blood concentration; T_{max} = time to reach C_{max}; T_{1/2} = elimination half-life; MRT = mean residence time; AUC = area under the blood concentration-time curve; AUC/D = AUC/dose.