

B) ゴーシェ病及びポンペ病患者皮膚細胞由来 iPS 様細胞の樹立

Patients-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Lysosomal Storage Diseases

【目的】ライソゾーム病はライソゾーム内に存在する様々な酵素の欠損または機能の低下により生じる疾患である。ライソゾームは細胞内物質の分解工場として機能するので、ライソゾーム内酵素の機能異常はその基質の過剰蓄積を引き起こし細胞や組織の機能障害につながる。iPS 細胞は分化多能性と自己増殖性を持つ人工多能性幹細胞である。iPS 細胞は皮膚細胞などの体細胞を初期化することによって樹立できる幹細胞なので、ES 細胞（胚性幹細胞）とは異なり、胚の破壊などの倫理的問題を含まない。さらに iPS 細胞は、遺伝的背景が同じ幹細胞を樹立できる。これまでに当講座では各種のライソゾーム病モデルマウス由来 iPS 細胞を樹立し、そのライソゾーム病の病態解析を行ってきた。今回、我々はヒトライソゾーム病、特にポンペ病とゴーシェ病の病態解析を目指し患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞の樹立を試みた。

【方法】ヒト初期化因子 (*SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4*, *c-MYC*) を組み込んだ pMXs レトロウイルスベクターを皮膚細胞に感染させることによって iPS 様細胞を樹立した。iPS 様細胞は透過型電子顕微鏡 (TEM) をもちいて細胞の内部構造を解析した。

【結果】ゴーシェ病では II 型（神経型）の iPS 様細胞は樹立できたが、I 型（非神経型）の iPS 様細胞は作成出来なかった。ポンペ病では乳児型（心臓型）も遅発型（筋肉型）も iPS 様細胞が樹立できた。TEM 解析により、ゴーシェ病 II 型 iPS 様細胞の細胞質には大きな空胞が確認できた。

【考察】ゴーシェ病 II 型の iPS 様細胞は、幹細胞の段階から何らかの蓄積物が細胞質に蓄積していた。又ゴーシェ病よりの神経細胞では分化効率が対象と比較して効率が悪く、セルソーターによ

る分離でも病的細胞での分化効率の低さを証明した。

【研究発表】

1. 原著論文

衛藤義勝、井田博幸、大橋十也、小林博司

- 1) Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Morimoto H, Hirato T, Nishino K, Eto Y. : Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. *Mol Genet Metab.* 2012
- 2) Kobayashi M, Ohashi T, Fukuda T, Yanagisawa T, Inomata T, Nagaoka T, et al. No accumulation of globotriaosylceramide in the heart of a patient with the E66Q mutation in the α -Galactosidase A gene. *Mol Genet Metab.* 2012; 107: 711-715.
- 3) Sato Y, Fujiwara M, Kobayashi H, Ida H. Massive Accumulation of glycosaminoglycans in the aortic valve of a patient with Hunter syndrome during enzyme replacement therapy. *Pediatric Cardiology* (in press)
- 4) Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Higuchi T, Eto Y, Ida H, et al. Administration of anti-CD3 antibodies modulates the immune response to an infusion of alpha-glucosidase in mice. *Mol Ther* 2012;20:1924-1931.
- 5) Nishiyama Y, Shimada Y, Yokoi T, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, (Ohashi T) et al. Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Mol Genet Metab* 2012;107:490-495.1)

2. 和論文・総説・書籍

- 1) 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, 2012(75)1, p.9

3. 学会発表

- 1) Eto Y : Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage Diseases. International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs, 2012. 2.5, 東京
- 2) Eto Y : Japanese Experiences in the Enzyme Replacement Therapy with, Leplagal for Fabry Disease , Russian Pediatric Society, Moscow, 2012.2.25, ロシア
- 3) Eto Y: Novel Strategies of the Treatment for Genetic Diseases, Asian society of LSD & Asian Inherited Metabolic disease, 2012.4.3, 韓国
- 4) Eto Y: Novel Strategies of the Treatment for Genetic Diseases, Asian society of pediatric research, 2012.5.18-20, 韓国
- 5) Eto Y: Mucopolysaccharidosis a diagnostic challenge to pediatricians? The Center of Excellence Program for Mucopolysaccharidoses. 2012,6. 台湾
- 6) 衛藤義勝 : Approach to the child with suspected inborn error of metabolism, Asian-Pacific Congress of Pediatric, 2012.9.10-13, マレーシア
- 7) Eto Y : Novel strategies of treatment of lysosomal storage diseases, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム, 2012.10.4, 東京
- 8) Ariga M, Kobayahi H, Shimada Y, Fukuda T, Iizuka S, Kaneshiro E, Ida H, Eto Y, Ohashi T : Neonatal gene therapy of MPS VII mice by lentiviral vector, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム, 2012.10.5, 東京
- 9) Sato Y, Saito R, Kobayashi H, Fujiwara M, Ohashi T, Ida H, Eto Y : Massive

accumulation of glycosaminoglycans in the aortic valve of a patient with Hunter syndrome during enzyme replacement therapy, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム, 2012.10.6, 東京

- 10) Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Fujikawa K, Ohashi T, Eto Y : CKD severity staging in Fabry patients detected by high risk screening, 第4回国際ライソゾーム病フォーラム, 2012.10.6, 東京
- 11) Eto Y: Clinical Application of iPS technology for LSD research, European Society of Gene Therapy, Versailles, 2012.10.27-31, フランス
- 12) 衛藤義勝 : 遺伝病治療最近の進歩-特に中枢神経系の治療を目指して、久留米大学小児科芳野教授退任記念講演、2012.3.24, 福岡
- 13) Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi : The fabry Outcome Survey (FOS) : Overview of the current status and future developments, 第54回日本先天代謝異常学会, 2012.11.15, 岐阜
- 14) 衛藤義勝、大樂武範、若林太一、井田博幸、萩野谷和裕、山本真也、成田 綾、大野耕策 : 若手型ニーマンピックC病 (NPC1) 3例に対する Miglustat の治療効果, 第54回日本先天代謝異常学会, 2012.11.16, 岐阜
- 15) 樋口 孝、河越しほ、大津 真、加藤総夫、単沢 享、松本朱里、井田博幸、大橋十也、中内啓光、衛藤義勝 : ゴーシェ病及びポンペ病患者皮膚細胞由来 iPS 様細胞の樹立, 2012.11.16, 岐阜
- 16) 河越しほ、樋口 孝、大高真奈美、嶋田洋太、小林博司、井田博幸、大橋十也、岡野ジェイムス洋尚、中西真人、衛藤義勝 : センダイウイルスを用いたヒトファブリー病由来 iPS 様細胞の樹立, 2012.11.16, 岐阜
- 17) 藤崎美和、松本朱里、高村歩美、樋口 孝、古城真秀子、河越しほ、小林博司、嶋田洋太、大橋十也、大樂武範、衛藤義勝 : 乾燥濾紙血を用いたマルトー・ラミー症候群 (MPSVI)

- の診断法の検討, 2012.11.16, 岐阜
- 18)大樂武範、ハミルトン ジョン、マーチン ダナ、衛藤義勝：濾紙血を用いたリソソーム酸性リパーゼ欠損症 (LAL) の診断法の検討, 2012.11.16, 岐阜
- 19)小林正久、大橋十也、衛藤義勝、井田博幸：日本人 Fabry 病家系の遺伝子変異についての研究—特に de novo 変異の発症率について. 第 57 回日本人類遺伝学会. 東京. 2012.10.24-27
- 20)小林正久、大橋十也、衛藤義勝、井田博幸：日本人 Fabry 病家系の de novo 変異の発症率および臨床病型と遺伝子変異の相関についての研究. 第 54 回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 21)佐藤洋平、小林博司、大橋十也、井田博幸：Mucopolysaccharidosis II 型剖検例におけるオートファジー機能不全との関連性. 第 54 回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 22)小林正久、大橋十也、衛藤義勝、井田博幸：Fabry 病の遺伝子解析—そのピットフォール. 第 26 回日本小児脂質研究会. 川越. 2012.11.30-12.1
- 23)櫻井 謙、池本 智、齋藤亮太、安藤達也、富田和江、齋藤義弘、井田博幸：多形紅斑に心筋症を併発し、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症が疑われている 5 歳例, 第 115 回日本小児科学会学術集会. 福岡. 2012.4.20-22
- 24)横井貴之、横井健太郎、秋山和政、樋口 孝、嶋田洋太、小林博司、佐藤 卓、大津 真、中内啓光、西川伸一、衛藤義勝、井田博幸、大橋十也：ACK2(抗 c-kit 抗体)を用いたハンター病に対する細胞治療 / 遺伝子治療における前処置の開発. 第 57 回日本人類遺伝学会. 東京. 2012.10.24-27
- 25)横井貴之、樋口 孝、嶋田洋太、小林博司、大津 真、中内啓光、西川伸一、衛藤義勝、井田博幸、大橋十也：ACK(抗 c-kit 抗体)を用いたハンター病に対する細胞治療 / 遺伝子治療における前処置の開発. 第 54 回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 26)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：インスリンを用いたポンペ病細胞における酵素補充療法抵抗性改善の試み. 第 54 回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 27)秋山和政、飯塚佐代子、嶋田洋太、樋口 孝、福田隆浩、小林博司、井田博幸、衛藤義勝、大橋十也：ムコ多糖症 II 型(MPS II)マウスにおける酵素補充療法と骨髄移植療法の比較検討. 第 54 回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 28)嶋田洋太、西山由梨佳、小林博司、樋口 孝、衛藤義勝、井田博幸、大橋十也：ポンペ病におけるプロテアソーム阻害剤応答性酸性 α グルコシダーゼ変異の探索: 第 54 回日本先天代謝異常学会. 岐阜. 2012.11.15-17
- 29)Hiroshi Kobayashi, Sayoko Izuka, Takahiro Fukuda, Takeo Iwamoto, Asako Morita, Masamichi Ariga, Yota Shimada, Takayuki Yokoi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi. Lentivirus Mediated Gene Therapy For Krabbe Disease. 第 18 回 日本遺伝子治療学会 J S G C T 2012 年 6 月、熊本
- 30)レンチウイルスベクターを用いたクラッペ病モデルマウスに対する新生児遺伝子治療 小林博司、有賀賢典、飯塚佐代子、岩本武夫、嶋田洋太、福田隆浩、衛藤義勝、大橋十也. 第 57 回日本人類遺伝学会 2012 年 10 月、東京

分担研究報告書

Ⅲ. 治療法開発

新しい治療法の開発（ケミカルシャペロン療法・iPS）
ゴーシェ病 3 型患者に対するケミカルシャペロン療法

分担研究者：大野 耕策（鳥取大学・医学部・教授）

研究要旨

ゴーシェ病に対する酵素補充療法は臓器腫大や血液学的所見を改善させる。しかし、酵素製剤は脳血液関門を通過出来ない為、本邦のゴーシェ病患者の過半数を占める神経型の中枢神経症状に、酵素補充療法の効果は乏しく、酵素補充療法に併用する新規治療法の開発が望まれている。今回、我々はカナダのグループがゴーシェ病患者由来皮膚線維芽細胞においてアンブロキソールのシャペロン効果を報告した事を受け、ゴーシェ病患者線維芽細胞と正常マウスで、アンブロキソール投与の有効性と安全性を確認した後、鳥取大学倫理委員会の承認を受け、ゴーシェ病 3 型患者 3 名に対し、アンブロキソールによるケミカルシャペロン療法を行った。

投与を 12～34 カ月間継続し、長期大量投与に伴う有害事象を認めず、リンパ球酵素活性は正常範囲となり、ABX の髄液移行も確認した。全例でミオクローヌスの改善を認め、3 例中 2 例はミオクローヌス軽減によって歩行や介助なしでの食事摂取が再度可能となるなど、顕著な ADL の改善を認めた。重度寝たきりの 1 例に関しても、ミオクローヌスの軽減によって家族の介護負担の軽減が得られた。生理学的マーカーとしては衝動性眼球運動の評価として眼電位図を測定し、水平性衝動性眼球運動の潜時に改善を認めた。加えて、脳幹機能の評価として対光反射の定量的評価を電子瞳孔計を用いて行い、治療による反射の改善を認め、中枢神経系への効果が示唆された。

研究協力者

成田綾・鳥取大学医学部附属病院・助教

白井謙太郎・同上

A. 研究目的

ゴーシェ病はライソゾーム酵素の一つであるグルコセレブロシダーゼの欠損により、その基質であるグルコセレブロシドが肝、脾、骨髄、神経系等に蓄積することで発症する遺伝性疾患で、神経症状の有無、重症度により 3 型に分類される。ゴーシェ病 3 型はその一つの病型で、小児期に発症し肝脾腫、核上性眼球運動障

害、運動失調、不随意運動、発達の退行を認め、寝たきりとなる予後不良の疾患である。現在、酵素補充療法が開発され、治療により肝脾腫、貧血などの身体症状は改善するが、神経症状に対する効果は認められていない。

我々はゴーシェ病の中枢神経系の治療法の開発をめざし、変異酵素を活性化する薬理的シャペロンの開発を行い、N-オクチルバリエナミン（NOV）が 3 型の原因変異である F213I、N188S、G202R の残存酵素活性を上昇させることを見いだした。またスペインとの共同研究で SP2 アザ糖が新しいシャペロンとして働く

ことを見いだした。一方カナダのグループは、FDA 承認薬をスクリーニングし、2009 年 7 月にアンブロキシソール（ムコサル、ムコソルバン）が、F213I や 1 型の原因変異である N370S 変異の酵素活性をあげることを見いだした。アンブロキシソールは低分子化合物である為、血液脳関門を通過し、神経症状への効果が期待できる。また、去痰剤として汎用されている薬剤であり、安全性や薬物動態が比較的明らかにされている事から、より早期の臨床応用が期待できる。

よって、本研究では鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認を得た後、患者家族の同意を得てゴーシェ病 3 型患者 3 名に対して、アンブロキシソール投与を行い、シャペロン療法の有効性と安全性を評価した。また本研究は UMIN-CTR にも登録済である。(UMIN000009392)

B. 研究方法

【患者】

症例 (1) 32 歳女性。12 歳より進行性ミオクロニーてんかん、小脳失調にて発症。その後退行、運動障害が進行し、20 歳時にゴーシェ病 3 型の診断 (変異型: N188S/G193W) を受けた。現在、表情の変化はあるが意思疎通困難、寝たきり、完全経管栄養、喉頭気管分離術後。

症例 (2) 21 歳女性。7 歳より進行性ミオクロニーてんかんにて発症し、その後運動障害が進行。20 歳時、ゴーシェ病 3 型の診断 (変異型: N188S/?) を受けた。現在、知的には良好だが、持続的なミオクローヌスにより歩行不能、全介助。

症例 (3) 16 歳女性、症例 (2) の同胞。8 歳より進行性ミオクロニーてんかんにて発症し、その後運動障害が進行。16 歳時、ゴーシェ病 3 型の診断 (変異型: N188S/?) を受けた。現在、知的には良好だが、持続的なミオクローヌスにより歩行不能、全介助。

【治療薬の調整】

アンブロキシソール塩酸塩製剤 (以下、アンブロキシソール、商品名ムコソルバン) は帝人ファーマ株式会社から購入した。

【治療薬の投与方法】

簡易懸濁法にて溶解したアンブロキシソールを分 3 投与した。アンブロキシソールは 3mg/kg/日 から開始し、3mg/kg ずつ漸増し、最終投与量を 25mg/kg/日 (最大 1g/日) まで増量した。

【治療効果の判定】

血液 (血算、一般生化学検査、酵素活性、アンブロキシソール血中/髄液中濃度)、尿検査、腹部エコー、腹部 CT、脳 MRI、MRS、脳波、電気生理検査 (聴性脳幹反応、短潜時 SEP、視覚誘発電位、Blink reflex、電子瞳孔計を用いた対光反射測定、眼電位図) を治療開始前後に行った。

C. 結果

【治療経過による有害事象】

アンブロキシソール大量投与の副作用として低尿酸血症や消化器症状が挙げられるが、中央値 12 ヶ月 (12~34 カ月) の投与期間中にいずれも認めず、安全に長期大量投与が可能であった。

【酵素活性、アンブロキシソール濃度の推移】

アンブロキシソール投与量増量に伴い、酵素補充療法前の残存酵素活性は正常コントロールの平均 44% (30-52%) に上昇した。また、アンブロキシソールの髄液移行は平均 14% であった。

【臨床所見の推移】

全例でミオクローヌスの改善を認め、3 例中 2 例はミオクローヌス軽減によって歩行や介助なしでの食事摂取が再度可能となるなど、顕著な ADL の改善を認めた。重度寝たきりの 1 例に

関しても、ミオクロヌスの軽減によって家族の介護負担の軽減が得られた。

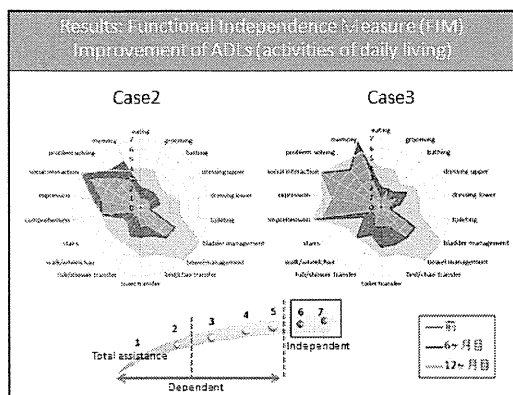


図 1 ADL の変化 (FIM を用いた評価)

【電気生理検査の推移】

治療効果判定の生理学的指標として、従来の電気生理検査に加え、眼電位図による水平性衝動性眼球運動の潜時を測定し、治療後に改善を認めた。加えて、脳幹機能の評価として対光反射の定量的評価を電子瞳孔計を用いて行い、治療による反射の改善を認め、両者から中枢神経系への効果が示唆された。その他、脳波で 1 例 (症例 3) に spike index の低下を認めた。

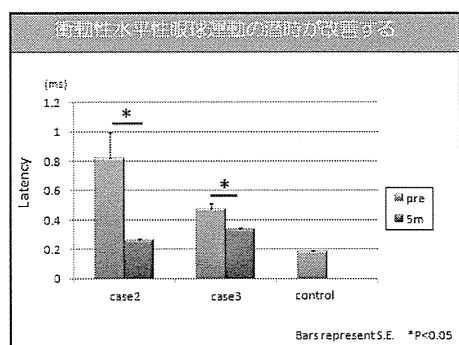


図 3 衝動性水平性眼球運動の潜時の変化

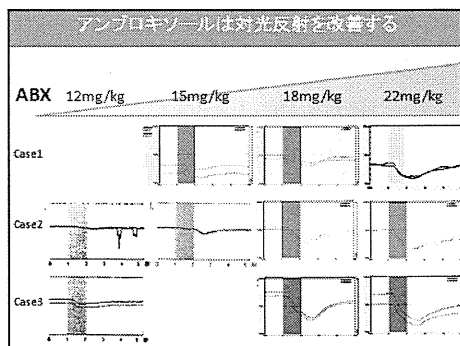


図 4 対光反射の変化

D. 考察

投与例全例においてミオクロヌス及び痙攣の軽減を認め、それに伴う ADL の改善が得られた。また、眼球運動潜時や対光反射などの生理学的指標においても中枢神経における改善が確認できた。

中央値 12 ヶ月 (12~34 カ月) の投与期間中に大量投与による有害事象を認めず、髄液移行も確認されたことから、安全性の点からアンブロキシソールはゴーシェ病の中枢神経治療薬として早期臨床応用が期待出来る。

E. 結論

ゴーシェ病 3 型患者へのアンブロキシソールの大量長期経口投与は、有害事象を伴わず、患者の残存酵素活性を上昇させた。また、進行例であってもミオクロヌスや対光反射の改善等の神経症状に対する改善効果を有する可能性が示唆された。

加えて今回用いた電子瞳孔計による対光反射測定は、指示に応じる事が困難な年少児や重症例においても施行可能な客観的評価方法であり、効果判定の有用な指標となり得る事が示唆された。

今後は症例数を増やし、ゴーシェ病 3 型に加えて 2 型も対象に組み込み、中枢神経治療薬としての有効性を更に検討していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Luan Z, Li L , Higaki K ,Ohno K, et al. The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. Brain Dev. 2012 Jun 7
- 2) Suzuki Y, Ichinomiya S, Ohno K, et al. Therapeutic chaperone effect of N-octyl 4-epi- β -valienamine on murine G(M1)-gangliosidosis. Mol Genet Metab. (2012) 106(1), 92-98.

2. 学会発表

- 1) Aya Narita, Luan Zhuo, Kousaku Ohno, et al. Chemical chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease. 12th International Child Neurology Congress (2012)
- 2) 成田綾、白井謙太郎、大野耕策他
神経型 Gaucher 病に対するケミカルシャペロン療法 第54回日本先天代謝異常学会

小児期発症の Niemann-Pick 病 C 型における miglstat の使用経験 -早期診断に有用な検査所見の検討

分担研究者：大澤真木子（東京女子医科大学医学部小児科）

研究協力者：

衛藤薫（東京女子医科大学医学部小児科）

伊藤康（東京女子医科大学医学部小児科）

A. 研究目的

① Niemann-Pick 病 C 型（以下、NPC）は、ライソソームと後期エンドソームに遊離コレステロールが蓄積することによる細胞内コレステロール輸送障害を主体とする脂質代謝異常症である。

② その治療に関しては、対症療法のみであるが、近年、Gaucher 病の治療薬である糖脂質のグルコシルセラミド合成阻害薬；miglstat (Brazaves®) が神経症状の進行を抑えることが報告されている。2012 年 6 月よりわが国でも認可された。

③ NPC の診断は、神経学的症状、肝脾腫に加え、皮膚の線維芽細胞による Filipin 染色や遺伝子検査により確定診断される。しかし、早期診断に有用な指標はなく、また、miglstat が若年発症の NPC 患者に於いて神経症状の進行を抑えることが文献報告されているが、臨床症状以外に客観的に治療効果を判定する診断マーカーが現段階ではない。今回、神経学的な臨床所見に加え、画像・生理学・血液検査などにより治療効果を判定し、さらに、早期診断に有用な指標の探索を目的とした。

B. 研究方法

1. NPC 患者に於ける MR spectroscopy (MRS) の

検討は症例が少ないが、若年期発症例の miglstat 開始 24 カ月後の評価にて、半卵円中心で細胞膜代謝の指標である Cho/Cr 比の低下が報告されている (Galanaud, 2009)。本研究にて、治療開始前後の MRS にて神経細胞や細胞膜の代謝の評価を行い、治療効果の指標となりうるか検討した。

2. miglstat 導入前後の神経学的な症状の変化、及び、画像検査、生理学検査、血液検査を行い治療効果に有用なマーカーの検索を目的とした。

3. 小児期発症の NPC 患者に於いて、以下の項目に関して、治療前、治療開始 2 か月、6 カ月、12 カ月、18 か月、24 か月に定期的に評価することとした。

① ビデオ撮影（安静時肢位、筋緊張亢進、てんかん、眼球運動、神経学的所見など）② 睡眠覚醒リズムの変化の記録（覚醒度の変化）③ 脳波（てんかん波の評価、周波数解析など）④ 脳幹機能検査 (ABR) ⑤ 末梢神経伝導検査 (MCV, SCV)、視覚誘発電位 ⑥ MRS ⑦ 腹部超音波、腹部 CT（肝脾腫の評価）⑧ 糖脂質の網内系への蓄積（酸性ホスファターゼ上昇、血小板低下）、中枢神経系への蓄積（糖脂質の代謝経路に於ける蓄積物質：GM1, GM2 ガングリオシド、グロボトリアオシルセラミドなど）、神経伝達物質 (NSE、Tau) の測定

C. 研究成果

① miglstat 導入後、報告時点で 2 カ月経過したが、副作用として多く報告されている下痢は

認めておらず、現在も継続治療中である。

② 治療開始前の MRS では、大脳深部白質に於いて著明な NAA の低下、橋で Cho の上昇を認めた。

③ 治療開始 2 カ月後の評価では、

- 臨床症状では、睡眠・覚醒時間に変化はないが、**覚醒度が上昇した。**
- 覚醒時脳波の周波数解析では δ 波が減少した。
- MRS に於いて、小脳での Cho の上昇をみとめた。
- バイオマーカーの変動に関しては、評価の途中である。

D. 考察

① MRS では、大脳深部白質に於いて著明な NAA の低下あり、神経細胞の減少を認めた。橋で Cho の上昇あり、Cho は細胞膜代謝に関連するリン脂質の代謝物であり、本疾患におけるリン脂質の蓄積や脱髄などの反映の可能性が考えられた。

② 治療 2 カ月後の評価では、覚醒度が上昇し、また、覚醒時脳波にて徐波の減少傾向を認め、大脳皮質機能の活性化が示唆された。MRS における小脳での Cho の上昇に関しては、その病的意義は不明であり、今後再現性を含めて評価をする予定である。

E. 結論

① NPC における根本治療はなく、それゆえ、早期に診断し miglstat の内服を開始することが必要である。また、早期の診断や治療効果の判定に際し、有用な診断マーカーの検討が重要である。

② miglstat の神経症状に対する効果の客観的な評価として MRS に加え、脳波検査、聴性脳幹反応などが有用と考えられるが、症例が少なく今後のさらなる検討が重要である。

③ 治療 2 カ月後の評価では、副作用としての下痢は認めず、覚醒度が上昇し、また、覚

醒時脳波にて徐波の減少傾向を認め、大脳皮質機能の活性化が示唆された。

F. 研究発表

- 1) Eri ODA, Keiko ISHIGAKI, Takashi SAITO, Terumi MURAKAMI, Takatoshi SATO, Sachiko KAJINO, Yoko YOSHIKAWA, Makiko OSAWA. Different responses to enzyme replacement therapy in two patients with childhood-onset Pompe disease 東京女子医大雑誌 第 83 巻 第 E1 号 受理 (平成 25 年 1 月 31 日発行予定)
- 2) 伊藤 進 片側性の脳室上衣下嚢胞と脳室内隔壁を呈したピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症の一女兒例 東京女子医大雑誌 第 83 巻 第 E1 号 受理 (平成 25 年 1 月 31 日発行予定)

ゴーシェ病 III 型の骨髄移植症例の長期経過

研究分担者：渡邊 順子（久留米大学医学部小児科）

研究要旨

ゴーシェ病 III 型患者の同種骨髄移植後の経過を観察し、治療効果を評価した。生後 9 ヶ月で喉頭痙攣などを発症、3 歳 7 ヶ月で本症と診断、4 歳 0 か月で骨髄移植を受けドナー細胞の持続的生着が確認された。神経症状の発症が早かったわりには思春期半ばからの神経症状の進行は相対的に遅いと考えられ、骨髄移植によって修飾された可能性が考えられた。

研究協力者：

芳野 信（久留米大学医学部小児科）

A. 研究目的

ゴーシェ病 III 型における骨髄移植の治療効果を後方視的に評価する。

B. 研究方法

同種骨髄移植を受けたゴーシェ病 III 型女性 1 例を対象とし、臨床経過を分析し、非移植例（歴史的対照）と対比する。

C. 研究成果

症例 9 ヶ月時、喉頭痙攣で発症、3 歳 7 ヶ月時、酵素診断（ β -グルコシダーゼ活性低下）および遺伝子解析（D409H/IVS10-1）の結果、Gaucher 病 III 型と確定。4 歳 0 ヶ月で脾臓摘出後に東海大学で同種骨髄移植を施行されている。移植後 13 年 6 ヶ月経過時には、ドナー細胞（野生型ホモ）が 100%であり、酵素活性はドナーと同レベルであり、ドナー細胞の持続的

生着が確認された。この間、神経症状の進行はほとんどみられなかった。15 歳前後から歩行障害が出現し、18 歳以降は筋緊張が強くなり、その後も意識消失や全身性の強直発作を時に認めた。20 歳 7 ヶ月時、両側角膜混濁を認めた。20 歳時、酵素補充療法を希望し当科を受診、家族の強い希望により 22 歳 1 ヶ月から 1 年 5 ヶ月にわたりイミグルシダーゼ補充療法を行ったが神経症状は不変であったことから中止した。現在は、不随意運動、強直発作のため座位保持が不可能で、もっとも本人がリラックスできるという腹臥位の状態で主に生活している。

D. 考察

骨髄移植前に脾臓が摘出されているため BMT および酵素補充療法による臓器の縮小効果は評価できなかったが、21 歳の時点で大腿骨近位端の斑状低吸収域（MRI の T1 強調画像）は典型例に比べ比較的軽度であり BMT によって軽減された可能性はある。いっぽう、酵素補充療法前後で変化を認めなかった。

Gaucher 病Ⅲ型の臨床像はかなり多様性に富むためBMTの効果を評価するのは困難であるが、本患者はⅢ型の既報例と比較して発症年齢が早いわりには思春期中盤以降の神経症状の進行は相対的に遅いと考えられ、BMTによってその進行が修飾された可能性が考えられる。本患者の場合、BMT実施が4歳と年長であったが、さらに早い年齢で行えば神経症状の発症・進行をさらに遅らせる可能性はあると考えられる。

本患者では両側角膜混濁が認められた。これはD409H変異をヘテロにもつことが関係しているかもしれない。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012 May 10. doi: 10.1002/ajmg.a.35335. [Epub ahead of print] PubMed PMID:22577095. *Am J Med Genet A*. 2012 Part A 9999:1-6
- 2) ○ Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T, Yoshino M: An adult patient with mucopolidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism. *Brain & Development*, DOI: 10.1016/j.braindev.2012.07.009,

2012

- 3) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: a previously unrecognized complication. *Pediatrics*, originally published online December 3, 2012; DOI: 10.1542/peds.2012-0030
- 4) ○ Mitobe S, Togawa T, Tsukimura T, Kodama T, Tanaka T, Doi K, Noiri E, Akai Y, Saito Y, Yoshino M, Takenaka T, Saito S, Ohno K, and Sakuraba H: Mutant α -galactosidase A with M296I does not cause elevation of the plasma globotriaosylsphingosine level. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2012 Jul 14. [Epub ahead of print]

2. 総説・著書

- 1) 渡邊順子: IX. ビタミン代謝異常. 3. 遺伝性コバラミン転送異常、コバラミン代謝異常 (1) トランスコバラミン II (TC II) 欠損症 (別名: トランスコバラミン欠損症: TC 欠損症). 先天代謝異常症候群 (第2版) 下、別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.20, 286-290. 2012
- 2) 渡邊順子: IX. ビタミン代謝異常. 3. 遺伝性コバラミン転送異常、コバラミン代謝異常 (2) 遺伝性コバラミン代謝異常症先天代謝異常症候群 (第2版) 下、別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.20, ; 291-294. 2012
- 3) ○渡邊順子: XII. ライソゾーム病. 18. コ

バラミン代謝異常症 F 型 (cblF) 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下、別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.20, ; 611-613. 総頁数 911. 2012

- 4) 渡邊順子：治療法の実際と現状 -糖質代謝異常症の食事療法- 小児科診療特集 診断と治療社 (東京) 1:23-128. 2013
- 5) 芳野 信：モリブデン補因子欠損症 VIII 金属代謝異常症、先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下、別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.20, 252-255, 2012.
- 6) 芳野 信：亜硫酸酸化酵素単独欠損症 VIII 金属代謝異常症、先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下、別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.20, 256-258, 2012.
- 7) ○芳野 信、小須賀基通：6. ハーラー症候群 内科 増大号 「知っておきたい内科症候群」109 (6) 1353-1354, 2012.

ライ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。BBB の幼若性を期待して新生児期マウスへのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの全身投与を行った。ベクター及び ASA タンパク質は肝臓や筋肉だけでなく BBB を越えて脳や脊髄でも検出された。又、ASA に対する免疫寛容が誘導され、ASA が長期間血中に分泌されていた。18 ヶ月後の治療マウスは未治療マウスと比較して運動機能が著明に改善していた。脳や脊髄では ASA タンパク質の持続発現とサルファチドの減少が確認された。新生児遺伝子治療は MLD などの重篤な遺伝性神経変性疾患に対する治療法の重要な選択肢になると考えられる。

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

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。

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サ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

我々は、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) のサルファチドの減少や運動機能が回復することを報告している。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。この実験では後者の可能性を検討した。

B. 研究方法

AAV ベクターに GFP 遺伝子或いは ASA 遺伝子を組み込んだ AAV-GFP 及び AAV-ASA 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濃縮した。

AAV ベクターを MLD マウスの新生児（生後 1 日）の頸静脈、或いは成体（8 週齢）の尾静脈に投与した。12 から 18 ヶ月後に脳組織を解析した。ASA タンパク質は免疫組織染色及び ELISA 定量法で、サルファチドは Alcian blue 染色及び TLC 展開後に定量した。運動機能は Balance Beam Test 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

始めに AAV-ASA ベクター静注後の AAV ベクターと ASA タンパク質の体内動態を検討した。成体 MLD マウスに AAV-ASA を投与するとベクターゲノム及び ASA タンパク質は肝臓や筋肉では認められたが、脳内では認められなかった。一方、新生児 MLD マウスに投与した場合は肝臓や筋肉だけでなく脳内でもベクターゲノム及び ASA の発現を認めた。又、ASA の血中動態を調べたところ、成体にベクターを投与した場合は、血中 ASA は一時的に高値になるが直ぐに減少し検出限界以下になった。コントロールとして行った成体免疫不全マウス（NOD-SCID）への投与実験では血中への ASA タンパク質の長期分泌が認められた。一方、新生児にベクターを静注した場合は長期間

ASA 活性が血中で認められた。これらのマウスの抗 ASA 抗体を測定したところ、ベクターを成体に投与した場合は ASA に対する抗体が作られていたが、新生児に投与した場合は抗体の産生は認められなかった。これらの結果は、AAV ベクターが新生児の BBB を通過して脳内に侵入し脳組織に感染できることを示している。更に、新生児期にベクターを投与することで ASA タンパク質に対する抗体産生が抑制される免疫寛容が誘導できることを示唆している。

次に、MLD マウスの新生児遺伝子治療実験を行った。新生児期に AAV-ASA を静注後、18 ヶ月の時点で Balance Beam Test を行ったところ、無治療 MLD マウスと比較して顕著な運動機能の改善を認めた。その後、脳組織の解析を行ったところ、ASA タンパク質の長期の発現と、サルファチドの著明な減少を認めた。これらの生化学的、組織学的改善は脳だけでなく脊髄でも認められた。

D. 考察

新生児遺伝子治療は成人の遺伝子治療で問題になっている多くの課題を克服できる可能性がある。新生児期は組織の発達が未完成のため生体のもつ生体防御機構を回避した広範囲な遺伝子導入が期待できる。例えば BBB を越えた神経組織への遺伝子導入や、発現タンパク質やベクターに対する免疫寛容の誘導などが期待される。その他にも出生直後から発症する重篤な遺伝病に対する早期の治療ができること、生体の治療に比較して少ないベクターで治療できることなどが考えられる。本研究はこれらの新生児期の遺伝子治療の特徴を実験的に明らかにし、MLD マウスの治療に成功したものである。

我々は既に様々な AAV ベクターが新生児期の脳組織に遺伝子導入できることを報告している (Miyake et al., Brain Res, 1389, 19 (2011))。特に 9 型 AAV ベクターにより広範な脳組織への遺伝子導入が可能であったことから本実験では ASA 遺伝子を組み込んだ AAV9 ベクターによる治療実験を行った。

遺伝的に欠損しているタンパク質に対する免疫反応は酵素補充療法や遺伝子治療を行ううえで大きな問題になっている。本実験では成体マウスで惹起される抗 ASA 抗体の産生が、新生児遺伝子治療により抑制できることを示している。免疫寛容の誘導は遺伝病の治療を目的とした遺伝子治療では極めて重要な利点と考えられる。抗体の産生が抑制されたことで M6P レセプター経由に起こる ASA タンパク質の細胞間の移送 (cross correction) が担保され MLD の治療に結びついたものと考えられる。

MLD の症状が出現するのは 1 歳以降のため MLD の発症者が新生児遺伝子治療の対象になることはない。しかし、発症前の同胞の治療法としては重要な選択肢になる。現在、イタリアでは発症前の MLD 患者に対する造血幹細胞遺伝子治療が行われている。AAV ベクターの静脈内投与は自己造血幹細胞移植と比較して侵襲性が少なく、ベクターの組み込みによる癌化の問題もないなど有利な点が多い。安全性の問題を慎重に検討しながら臨床応用に結びつけたい。

E. 結論

AAV ベクターを新生児 MLD マウスに静注することで MLD の遺伝子治療に成功した。新生児遺伝子治療は MLD などの重篤な遺伝性神経変性疾患に対する治療法の重要な選択肢になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugano, H., Matsumoto, T., Miyake, K., Watanabe, A., Iijima, O., Migita, M., Narisawa, S., Millán, J.L., Fukunaga, Y., Shimada, T. (2012) Successful gene therapy *in utero* for lethal murine hypophosphatasia. Hum. Gene Ther. 23:399-406
- 2) Tamai, H., Miyake, K., Yamaguchi, H., Takatori, M., Dan, K., Inokuchi, K., Shimada, T. (2012) AAV-8 vector expressing IL-24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice. Blood 119:64-71
- 3) Takeichi, N., Midorikawa, S., Watanabe, A., Naing, B.T., Tamura, H., Kano, T., Sugihara, H., Nissato, S., Saito, Y., Aita, Y., Ishii, K., Igarashi, T., Kawakami, Y., Hara, H., Ikeda, T., Shimizu, K., Suzuki, S., Shimano, H., Kawamoto, M., Shimada, T., Watanabe, T., Oikawa, S., Takekoshi, K. (2012) Identical germline mutations in the *TMEM127* gene in 2 unrelated Japanese patients with bilateral pheochromocytoma. Clin Endocrinol. 77:707-714
- 4) Masuno, M., Watanabe, A., Naing, B.T., Shimada, T., Fujimoto, W., Ninomiya, S., Ueda, Y., Kondo, E., Yamanouchi, Y., Ouchi, K., Kuroki, Y. (2012) Ehlers-Danlos Syndrome, Vascular Type: A Novel Missense Mutation in *COL3A1* Gene. Congenit Anom. 52:207-210

- 5) Miyake, K., Miyake, N., Yamazaki, Y., Shimada, T., Hirai, Y. (2012) Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *J Nippon Med Sch.* 79:394-402
2. 学会発表
- 1) Watanabe, A., Satoh, S., Fujita, A., Naing, B.T. Orimo, H., Shimada, T. Perinatal (lethal) type of hypophosphatasia resulting from paternal isodisomy of chromosome 1. American College of Medical Genetics 2012 Annual Meeting. 2012.3. Charlotte, NC
- 2) Shimada, T. Gene therapy for Hypophosphatasia. 6th International Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia Symposium. 2012.5. Huningue, France
- 3) Watanabe, A., Satoh, S., Fujita, A., Naing, B.T. Orimo, H., Shimada, T. Perinatal (lethal) type of hypophosphatasia resulting from paternal isodisomy of chromosome 1. 6th International Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia Symposium. 2012.5. Huningue, France
- 4) Sugano, H., Miyake, K., Watanabe, A., Iijima, A., Narisawa, S., Millan, J.L., Fukunaga, Y., Shimada, T. Successful gene therapy *in utero* for lethal murine hypophosphatasia. 6th International Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia Symposium. 2012.5. Huningue, France
- 5) Iijima, O., Sugano, H., Watanabe, A., Miyake, K., Shimada, T. Ex vivo gene therapy of severe infantile hypophosphatasia model mice using lentiviral transduced bone marrow cells. 6th International Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia Symposium. 2012.5. Huningue, France
- 6) Miyake, N., Miyake, K., Sakai, A., Yamamoto, M., Endo, A., Suzuki, H., Shimada, T. Gene therapy of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. 15th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2012. 5. Philadelphia, Pennsylvania
- 7) Watanabe, A., Naing, B.T. , Shimada, T. A novel gene therapy strategy for vascular Ehlers-Danlos syndrome. 1st International symposium on Ehlers-Danlos syndrome. 2012.9. Ghent, Belgium
- 8) Watanabe, A., Hatakeyama, M., Tsunoda, R., Matsumoto, K., Kawame, H., Shimada, T. Hypermobility Syndrome in Japan. 1st International symposium on Ehlers-Danlos syndrome. 2012.9. Ghent, Belgium
- 9) Miyake, N., Miyake, K., Sakai, A., Yamamoto, M., Endo, A., Suzuki, H., Shimada, T. AAV9 mediated gene therapy of MLD model mice. 20th Annual Meeting of the European Society of Gene & Cell Therapy. 2012.10. Versailles, France
- 10) Iijima, O., Miyake, K., Sugano, H.,

Igarashi, T., Kanokoda, C., Watanabe, A., Shimada, T. Rescue of lethal hypophosphatasia mice by neonatal ex vivo gene therapy using lentivirally transduced bone marrow cells. 54th American Society of Hematology Annual Meeting. 2012.12. Atlanta, GA

- 11) Shimada, T. Gene Therapy in Japan -Problems and Prospects-第 18 回日本遺伝子治療学会 2012.6. 熊本
- 12) Miyake, N., Miyake, K., Sakai, A., Yamamoto, M., Endo, A., Suzuki, H., Shimada, T. Successful treatment of adult MLD model mice by intrathecal administration of AAV9 vector. 第 18 回日本遺伝子治療学会 2012.6. 熊本
- 13) 島田 隆: 遺伝子治療の最近の動向ーゲノム医療の世界の動向と本邦における臨床応用の展望ー. 第 21 回日本 Cell Death 学会 2012.7. 名古屋
- 14) 島田 隆: 遺伝子治療の最近の動向ー我が国の遺伝子治療臨床研究の進歩ー. つくばオンコロジーフォーラム 2012.8. 筑波
- 15) 坂井敦、齋藤文仁、三宅紀子、三宅弘一、島田隆、鈴木秀典: DRG 神経における miR-7a 過剰発現は神経障害性疼痛を特異的に抑制する. 第 35 回日本神経科学大会 2012.9. 名古屋
- 16) Shimada, T. AAV Vector Mediated Gene Therapy for Lysosomal Storage Diseases. 第 4 回国際ライソゾーム病フォーラム・第 17 回日本ライソゾーム病研究会 2012.10. 東京
- 17) Miyake, N., Miyake, K., Sakai, A., Yamamoto, M., Endo, A., Suzuki, H.,

Shimada, T. Gene therapy of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. 第 4 回国際ライソゾーム病フォーラム・第 17 回日本ライソゾーム病研究会 2012.10. 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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。またタンパク質のミスフォールディングによる遺伝子発現の低下などを抑制する目的で組込む遺伝子のシーケンスを改変した codon optimization GALC を組み込み、同様に効果を検討している。 研究協力者：有賀賢典 東京慈恵会医科大学助教

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

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。

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を作って感染させ、GFP および欠損酵素の力価を計測した。

3. 新生児マウスへの投与：

日令 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。

またタンパク質のフォールディングによる遺伝子発現の低下などを抑制する目的で組み込む遺伝子のシーケンスを改変した codon optimization GALC を（Gen Script 社に依頼合成）組み込み、同様に新生児注射による効果を検討した。

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。

3. codon optimization GALC を組込んだレン

チウイルスベクターによる新生児遺伝子治療では細胞株において十分な over expression が見られたが、in vivo では現在評価中である。

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。クラッペ病では有意な生命・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. 結論

レンチウイルスベクターによるライソゾーム病モデルマウスに対する新生児遺伝子治療は有効と考えられる。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

- 1) Lentiviral Vector Mediated Neonatal Gene Therapy of Krabbe Disease Model Mice. Hiroshi Kobayashi, Yota Shimada, Sayoko Izuka, Takashi Higuchi, Masamichi Ariga, Takeo Iwamoto, Takahiro Fukuda, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi. (O-18) The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2012. April, Soul.
- 2) Lentivirus Mediated Gene Therapy For Krabbe Disease. Hiroshi Kobayashi, Sayoko Izuka, Takahiro Fukuda, Takeo Iwamoto, Asako Morita, Masamichi Ariga, Yota Shimada, Takayuki Yokoi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto, Toya Ohashi. 第18回 日本遺伝子治療学会 JSGCT 2012年6月、熊本
- 3) レンチウイルスベクターを用いたクラッペ病モデルマウスに対する新生児遺伝子治療 小林博司、有賀賢典、飯塚佐代子、岩本武夫、嶋田洋太、福田隆浩、衛藤義勝、大橋十也. 第57回日本人類遺伝学会 2012年10月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし