

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

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総合医科学研究所遺伝子治療研究部）

研究要旨

ムコ多糖症 VII 型(MPSVII、スライ病)、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。我々は組換えレンチウイルスベクターを用いて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、新生児モデル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、オートファジー活性の変化も得られた。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た。

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℃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。また脳組織での LC3 I/II といったオートファジー活性を示すマーカー蛋白質をウエスタンブロットで検討したところオートファジービルドアップが無治療群に比べて遺伝子治療群では抑制されていたが、7 週令に比べて 31 週令ではややその効果が減弱していた。更に生命予後も有意差を持って改善していた(p<0.01)。

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 またはオリゴデンドロサイト細胞株：下図 1）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。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 でも体重増加などでやや優位性が見られた。

図1 ヒトオリゴデンドロサイト細胞株へのレンチウイルスベクターによるGFP遺伝子導入

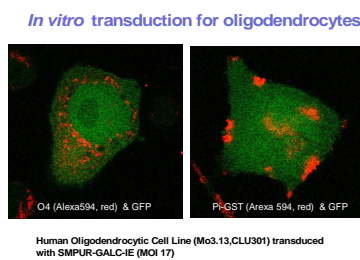
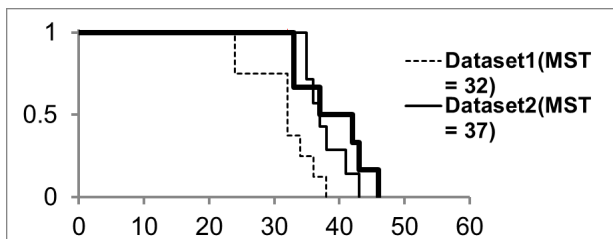


図2 Krabbe 病モデルマウスの生存曲線



点線：無治療群

実線：遺伝子治療群 (p=0.03)

太線：遺伝子治療・基質阻害剤併用群 (p=0.013)

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。クラッペ病でも有意な生命・症状発現遅延効果が得られ、基質合成阻害剤や codon optimization GALC を用いることで更に相乗効果が期待された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

- 1) Kobayashi H., Izuka S., Ariga M, et al. Gene therapy for mouse model of Krabbe disease. 16th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) 2013.May Saltlakecity, UT.
- 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ペ病に対する遺伝子治療 第19回日本遺伝子治療学会 岡山、2013年7月
- 3) Gene Therapy for KrabbeDisease. Hiroshi Kobayashi, Yota Shimada, Takeo Iwamoto, Tkakahiro Fukuda, Masamichi Ariga, Yohei Sato, Taichi Wakabayashi, Sayoko Izuka, Yoshikatsu Eto, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi. (P-101) The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease (ACIMD) and The 55th Annual Meeting for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) joint meeting 2013. Nov., Chiba, Japan.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし