

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合分担研究報告書

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 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 (human β -glucuronidase) を組込んだレンチウイルスを作成し、細胞への導入で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、オートファジービルドアップ抑制効果も得られた。またクラッペ病の欠損酵素 GALC (β -galactocerebrosidase) を組込んだレンチウイルスも開発し、細胞株 (293A、ヒトオリゴデンドロサイト細胞株) 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クエンスを改変した codon optimization GALC を組み込み、同様に効果を検討し体重増加などで有効性が見られた。

これらの研究から効果に疾患ごとの差異は当然あるものの、レンチウイルスベクターによる新生児遺伝子治療はライソゾーム病の表現型の改善に有効と考えられた。

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クエンスを改変した 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。また脳組織でのオートファジービルドアップの抑制効果が遺伝子治療群で見られ、これは時間経過につれて小さくなることが確認された。また生命予後は遺伝子治療群で有意に改善が見られた。

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。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、in vivo でも体重増加にやや優位性が見られた。

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。クラッペ病でも有意な生命・症状発現遅延効果は得られ、基質合成阻害、codon optimization などにより更に相乗効果が期待された。これら二つの基質の異なるライソゾーム蓄積症において効果に差はあったがレンチウイルスベクターを用いた新生児遺伝子治療は有効であったと考えられた。

E. 健康危険情報なし

F. 研究発表

- 1) 小林博司、飯塚佐代子、有賀賢典、島田洋太、井田博幸、衛藤義勝、ほか: レンチウイルスベクターシステムを用いたクラッペ病の遺伝子治療 (ポスター) 日本小児科学会 2010.4. 盛岡
- 2) Kobayashi H., Ariga M., Shimada Y., Izuka S., Yokoi T., Iwamoto T. et al. Neonatal Gene Therapy for the mouse model of Krabbe Disease. Japanese Society of Gene and Cell Therapy. Utsunomiya, Tochigi., Japan. July. 2010.
- 3) 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) 2011. May Seattle, WA.
- 4) 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17回日本遺伝子治療学会 福岡、2011年7月
- 5) 有賀賢典、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年11月
- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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.
- 10) 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
- 11) Gene Therapy for Krabbe Disease. Hiroshi Kobayashi, Yota Shimada, Takeo Iwamoto, Takahiro 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