

学位授与番号：甲 1 0 1 7 号

氏 名：若林 太一

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 4 月 13 日

学位論文名：

Hematopoietic stem cell gene therapy corrects neuropathic phenotype in murine model of mucopolysaccharidosis type II.

学位論文名（翻訳）：

（ムコ多糖症 II 型モデルマウスに対する造血幹細胞遺伝子治療による中枢神経病変への効果の検討）

学位審査委員長：教授 馬目佳信教授

学位審査委員：教授 岡野ジェームズ洋尚教授 教授 松浦知和教授

# 論 文 要 旨

論文提出者名	若林太一	指導教授名 井田博幸
--------	------	------------

主論文

## Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Corrects Neuropathic Phenotype in Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type II.

(ムコ多糖症 II 型モデルマウスに対する造血幹細胞遺伝子治療による中枢神経病変への効果の検討)

Taichi Wakabayashi, Yohta Shimada, Kazumasa Akiyama, Takashi Higuchi, Takahiro Fukuda, Hiroshi Kobayashi, Yoshikatsu Eto, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi

Hum Gene Ther. 2015 Jun;26(6):357-66

【緒言】ムコ多糖症 II 型 (MPS II, Hunter 病) は、ライソゾーム酵素であるイズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) の欠損により、基質であるグリコサミノグリカン (GAGs)、特にヘパラン硫酸とデルマタン硫酸が全身性に蓄積する事で中枢神経系を含めた種々の症状を呈する疾患である。治療法として酵素補充療法や骨髄移植などが選択されている。酵素補充療法は各種臨床症状に対して一定の効果を達成しうるが、血液脳関門の存在により中枢神経系への効果は乏しい。一方で、骨髄移植は中枢神経系も含めた効果が期待されたが、我々の先行研究も含め否定的な見解が多い。近年、異染性白質ジストロフィー、副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞遺伝子治療の臨床研究が行われ、その有効性が示されている。またムコ多糖症では MPS I、MPS III のモデルマウスで造血幹細胞遺伝子治療への中枢神経を含めた効果が確認されている。本研究において我々は MPS II の中枢神経病変に対するレンチウイルスを用いた造血幹細胞遺伝子治療の有効性についてモデルマウスを用いて検討した。【方法】MPS II マウス (ドナー) の骨髄造血幹細胞に第 2 世代レンチウイルスを用いて IDS 遺伝子を導入し、9 週齢の MPS II マウス (レシピエント) に移植した。移植後 2 4 週にわたり血清酵素活性を測定し、その後各臓器における酵素活性、総グルコサミノグリカン (GAGs) の蓄積量、疾患特異的 GAGs の蓄積量、オートファジー機能の評価、Y 字迷路による中枢神経機能評価を行った。また同プロトコールのもと eGFP 遺伝子を導入しドナー細胞の移植後の動態を追った。【結果】血清酵素活性は正常マウスの約 1 5 倍の値を維持し、肝臓、心臓でも正常酵素活性を大きく上回った。一方で脳では正常比 2.9% の酵素活性を示すにすぎなかった。総 GAGs 蓄積量は、肝臓、心臓では MPS マウスで有意に蓄積し、治療により正常レベルまで改善した。疾患特異的 GAGs は MPS II マウスの脳で著明に蓄積し、治療により有意に低下した。オートファジー機能解析では LC3-II/LC3-I 比、p62 が MPS II マウスの脳で増加し、かつ治療による改善を認めた。Y 字迷路による中枢神経機能解析では MPS II マウスは 33 週齢において有意に成績が低下したのに対して、治療を受けた MPS II マウスでは成績の低下が認められなかった。【結論】レンチウイルスを用いた造血幹細胞移植は MPS II マウスの中枢神経病変に有効であることが示された。

## 学位審査の結果の要旨

若林太一氏の学位審査論文は主論文 1 編からなり、論文は「Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Corrects Neuropathic Phenotype in Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type II」と題するもので Human Gene Therapy に掲載され、小児科学講座に於いて井田博幸教授の指導によるものである。以下、学位申請論文の要旨と委員審査会における審査結果について報告する。

ムコ多糖症 II 型 (MPS II, Hunter 病) はアジア地域では最も頻度の高いムコ多糖症で、X連鎖性劣性形式で遺伝する遺伝病である。この疾患ではイズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) の欠損により、基質であるグリコサミノグリカン (GAGs)、特にヘパラン硫酸とデルマタン硫酸が全身性に蓄積し様々な臨床症状を引き起こす。代表的な臨床症状として骨変形、皮膚硬化、関節拘縮、心臓弁膜症、肝脾腫などが挙げられ、中枢神経症状として精神運動発育障害が認められる。現在治療法として、欠損酵素を直接的に静脈内注射する酵素補充療法、正常酵素活性をもつドナーからの造血幹細胞移植などが用いられている。酵素補充療法は各臨床症状に一定の効果を認めているが中枢神経病変への効果が乏しい。これは血液中に投与された酵素の中枢神経への移行が血液脳関門によって阻害されていることが原因である。一方、造血幹細胞移植について、他の同様の疾患では中枢神経系への効果が確認されているが、本疾患について効果は明らかになっていない。そこで若林氏はレンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞に IDS 遺伝子を導入し、得られた細胞を移植するという造血幹細胞遺伝子治療 (ex vivo gene therapy) を本症のモデルマウスである MPSII マウスに対して行い効果を測定した。有効性を血清や各臓器での酵素活性、総および疾患特異的グルコサミノグリカン(GAGs)等で示し、またオートファジー異常の改善や Y 字迷路による評価で中枢神経系に対しても有効であることを明らかにした。さらに移植されたドナー造血幹細胞が移植後にマイクログリアに分化して脳内に生着していることなどを観察した。

公開学位審査会を平成 26 年 3 月 22 日、岡野ジェイムス洋尚教授 松浦知和教授のご臨席の下、開催した。主論文の概要を中心とした若林氏の発表に続いて口頭試問を行った。席上、審査委員から内容に関する以下のような数多くの質疑があった。

- Lineage depletion kit でどのような細胞が除去できるのか。
- 導入遺伝子のコドン最適化はどのように行ったのか。
- 遺伝子を発現させるためのプロモータはどのように選択したのか。

- レンチウイルスによる造血幹細胞への感染率はどの程度か。
- キメリズムを上昇させるためにはもっと感染率を上げる必要があるのではないか。
- オートファジーがこの疾患で上昇しているのは何故か。
- オートファジーを低下させることが疾患の治療とどのように結びつくのか。
- プロテアソームの状態はどうだったのか。
- 使用した 8~9 週齢のマウスは人間ではどのような年齢層に相当するのか。
- モデルマウスは週齢を重ねていくと神経細胞はどのような変性をおこすのか。
- 病変の分布や改善は脳皮質のみなのか、中枢神経系全体に及んでいるのか。
- グリコサミノグリカンの蓄積する細胞は神経細胞のみなのか、グリア細胞にも及ぶのか。
- 治療によって脳内の酵素活性が顕著に上昇しないのは何故か。
- 脳での酵素活性の上昇は血球細胞の混入による可能性はないのか。
- Y 迷路試験が改善したマウスでの海馬の所見はどのようなものだったのか。
- 中枢神経以外の臓器で過剰発現している酵素は毒性を生じないのか。
- 脳内に直接ウイルスを感染させる方法との差は何か。
- 造血幹細胞が脳内に入りミクログリアに分化することは一般に認められているのか。
- 脳内ミクログリアを増加させる工夫としてどのようなものがあるか。

若林氏はこれらの質問に過去の報告と実験的根拠に基づいて明確に回答した。岡野ジェイムス洋尚教授 松浦知和教授と慎重に審議し本研究がムコ多糖症 II 型の中枢神経系病変に対する造血幹細胞遺伝子治療の効果を明らかにしたものとして意義は大きいものと判定し、学位を授与するに十分値すると認定した次第である。