

Title	Krabbe病モデルマウス(twitcherマウス)に対するレトロウイルスを用いた遺伝子治療の酵素レベルと臨床経過に及ぼす効果
Author(s)	國府, 力
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41684
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	こく ぶ ちから 國 府 力
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 9 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Krabbe病モデルマウス (twitcherマウス) に対するレトロウイルスを用いた遺伝子治療の酵素レベルと臨床経過に及ぼす効果
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 金田 安史 教 授 内山 安男

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Krabbe 病のモデル動物として知られる twitcher マウスは、リソソーム酵素ガラクトセレブロシダーゼ (GALC) の遺伝的欠損による中枢・末梢神経の脱髄を主症状とし、寿命が6週前後と他のリソソーム病モデルマウスと比べても短いため、小児期死亡の単一遺伝子病に対する遺伝子治療のモデルとして優れている。従来 twitcher マウスに対しては、正常マウスからの骨髓移植が寿命延長効果を示すことが報告されてきた。そこで本研究ではヒト GALC cDNA を組み込んだ組換えレトロウイルスを作製し、twitcher マウスに対する骨髓細胞を介した *ex vivo* の遺伝子治療の可能性を検討した。

【方法】

ヒト GALC cDNA (2.2kb) をレトロウイルスベクター pDL+ (岡崎国立共同研究機構生理学研究所、池田一裕教授より供与) に組み込み、amphotropic パッケージング細胞 ϕ -CRIP に導入して、レトロウイルス産生細胞 ϕ -CRIP / pDL+GA35を得た。次に日齢20-35の twitcher マウスに対して 5-FU (150mg/kg) を投与し、5日後に骨髓単核細胞を採取した。これを SCF, IL-6 を添加した無血清培地にて48時間刺激した後 CH-296 (Takara shuzo, Co., Ltd.) コーティング・ディッシュに移し、上記ウイルス培養上清で3日間培養した。一方レシピエントとしては、妊娠17, 18日目の母体に対して busulfan (15mg/kg/dose) を皮下注射した後、得られた新生仔の中から PCR 法でホモ接合変異体 (twi/twi) を選び出した。これに対し上記骨髓細胞 8×10^6 個を生後1日目に腹腔内に移植し、寿命、体重変化を追跡した。また一部のマウスは6週齢の時点で、十分に脱血灌流した後、各臓器を摘出して PCR 法によるプロウイルスの検出、GALC 酵素活性の測定に供した。

【成績】

ϕ -CRIP / pDL+GA35により産生されるウイルス力価は 6×10^5 c.f.u./ml で、twitcher マウス由来骨髓幹細胞への遺伝子導入効率は、CFC アッセイにより 9~28% と算出された。また twitcher 骨髓細胞の GALC 活性は、遺伝子導入によって *in vitro* では正常レベルまで補正されていた。

次にマウス個体レベルでは、今回の遺伝子治療による寿命延長効果は認めなかった。しかし twitcher マウスを、

非治療群, busulfan 投与群, busulfan+twitcher マウスからの骨髄移植群, busulfan + 遺伝子治療群の 4 群に分けて体重経過を追跡したところ, busulfan は体重増加に対し負の作用を示したが, 遺伝子治療はそれを上回る正の効果を示した。PCR 分析によると, 遺伝子治療から 6 週間後のマウスの末梢血・骨髄からは, プロウイルスを有する細胞が既に排除されていた。しかしその時期においても, 主要罹患臓器である坐骨神経には例外なくプロウイルスが残存しており, 坐骨神経における GALC 活性を非治療群の 2 倍まで上昇 ($P < 0.01$, Student's *t*-test) させていた。

【総括】

本研究は, Krabbe 病のモデルマウスである twitcher マウスに対して *ex vivo* の遺伝子治療を試みた初めての報告である。導入遺伝子の効果により, twitcher マウスの病勢の指標となる体重曲線が改善し, 主要罹患臓器である坐骨神経の GALC 活性が上昇した。これは Krabbe 病の遺伝子治療の可能性を示唆する結果である。

twitcher マウスでは坐骨神経の脱髄病変に大量のマクロファージが動員されることが知られている。本実験で坐骨神経から検出されたプロウイルスの宿主も, 遺伝子導入を受けた骨髄幹細胞が分化して脱髄病変に定着した組織マクロファージと考えられる。この系では既に発症している病的ドナーから採取した骨髄細胞を使わざるを得ないため, 移植後早期には体重増加を改善させたがその後の造血系再構築が不十分であり, 寿命延長に至る長期効果は得られなかったと解釈される。

busulfan による移植前処置は放射線照射に比べて神経病理変化を起こしにくいので twitcher マウスの解析に適しているが, 消化管粘膜上皮の増殖障害による体重増加不良の副作用が知られている。ヒト Gaucher 病に対する遺伝子治療の臨床プロトコルではレシピエントに対する骨髄抑制処置は行われていないが, 結果として高い生着率は得られておらず, その必要性を見直す動きもある。本研究の結果は, 遺伝子治療のプロトコル各段階の risk-benefit を個別に評価していく上で, twitcher マウスの系が有用なモデルとなり得ることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

リソソーム病の分野では, Gaucher 病患者に対するレトロウイルスを用いた遺伝子治療の試みが既に米国で始まっているが, 未だ導入効率が低く, 臨床的有效性も確認されていない。そこでこの分野でも, モデル動物を用いた基礎研究の重要性が再認識されている現状がある。

本研究は, Krabbe 病のモデルマウスである twitcher マウスに対して *ex vivo* 法による遺伝子治療を試み, マウス個体レベルでの効果を確認した初めての報告である。導入遺伝子の効果により, 主要罹患臓器である坐骨神経でガラクトセレブロンダーゼ活性が上昇し, 病勢の指標となる体重曲線が有意に改善していることが示された。生後 1 日目の遺伝子治療という操作を実行し得たことは, 小児期死亡の単一遺伝子病に対する治療法の開発に大きな示唆を与える成果である。また体重曲線の改善はヒト患者の quality of life に対応するとも考えられ, レシピエントに対する骨髄抑制処置による影響の評価と合わせて, この系の遺伝子治療モデルとしての有用性を実証している。さらに導入された遺伝子が坐骨神経に優先的に分布していたことは, 脱髄疾患モデルとしての twitcher マウスの病態解明の観点からも, 今後の展開が期待される重要な知見である。

以上, 本研究は Krabbe 病の遺伝子治療法の開発・臨床応用へ向けて重要な基礎データを提示するものであり, 学位の授与に値するものと認める。