

令和元年6月14日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09605

研究課題名(和文) AAVベクターによる低ホスファターゼ血症の遺伝子治療

研究課題名(英文) The gene therapy for hypophosphatasia animal model

研究代表者

松本 多絵 (Matsumoto, Tae)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10366742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低ホスファターゼ血症は、重症型では骨形成不全のため出生後早期に死亡することもある。遺伝子異常がアルカリホスファターゼ酵素の欠損を起こして発症する。既に酵素補充療法の有効性が示されており、酵素発現させる遺伝子治療の有用性が大きいと考えた。低ホスファターゼ血症のモデルマウス(Akp2<sup>-/-</sup>マウス)の新生児期に、AAV8-TNALP-D10ベクターを筋肉内投与し、生命予後の改善、骨形成の改善が得られるか検討した。ベクターを1x10<sup>11</sup> vg/ml以上投与することで、18力月間の延命とコントロール群に極めて近い骨密度を得られた。副作用も認めず安全で有効な治療法であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低ホスファターゼ血症はヒトでは多様な重症度を示し、重症型では骨形成が不十分で胸郭の形態が維持されず呼吸不全で出生後早期に死亡することもあるが、軽症でも乳歯脱落のため義歯が必要であったり骨折をおこしやすく、生活の質がさがりやすい。単一遺伝子の異常によりおこるアルカリホスファターゼ酵素欠損による疾患であり、遺伝子治療で、体内でアルカリホスファターゼ産生ができるようになれば治療意義が大きい。AAV8-TNALP-D10ベクターの筋肉注射での治療成功は、ただ一回のベクター局所投与でのヒトでの治療可能性を示した、臨床応用に大きな一歩と言える。

研究成果の概要(英文)：Hypophosphatasia is an inherited skeletal disease characterized by defective bone and teeth mineralization due to the deficiency of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNALP), which leads to abnormal mineralization of skeletal and dental tissues. TNALP knockout (Akp2<sup>-/-</sup>) mice are good models for infantile HPP. We used a single intramuscular injection of Adeno associated vector type 8 (AAV8) with a bone-targeted form of human TNALP in which a deca-aspartate sequence is linked to the C terminal end of soluble TNALP (TNALP-D10) to prolong Akp2<sup>-/-</sup> mice life with insufficient bone maturity. Treated Akp2<sup>-/-</sup> mice with AAV8-TNALP-D10 lived longer than 1 year with normal physical activity and healthy appearance, while control Akp2<sup>-/-</sup> mice died in 3 weeks. At 18 months, bone mineral density and bone volume/tissue volume values were close to those of control ones. The success of intramuscular gene therapy for Akp2<sup>-/-</sup> mice with AAV8-TNALP-D10 shows possibility to achieve human therapy.

研究分野：小児医学

キーワード：低ホスファターゼ血症 アルカリホスファターゼ 遺伝子治療 AAVベクター

## AAV ベクターによる低ホスファターゼ血症の遺伝子治療

### 1. 研究開始当初の背景

低ホスファターゼ血症(HPP)は組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNALP)遺伝子の異常が原因で、アルカリホスファターゼ(ALP)酵素が欠損もしくは減少するために様々な症状を起こす疾患である。ALP は骨形成に特に重要な働きをする酵素である。HPP の臨床症状は発現する酵素の量により重症度が多岐にわたるが、特に周産期型、乳児型の HPP は酵素の発現量が少なく、胎児期に骨折したり、出生後に胸郭形成を維持できず呼吸障害で出生後早期に死亡する。これまで、重症型 HPP を対象に、酵素補充療法や骨髄細胞移植が試みられてきたが、軽度の改善が見られても根本的な治療には至っていない。以上より、継続的に ALP 活性を維持できる根治療法が切望されてきた。

2008 年に、乳児型 HPP のモデルマウスである *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスに対して、骨に親和性のあるペプチド D10 (連続した 10 アミノ酸残基のアルギニン酸) を付けた TNALP (TNALP-D10) を連日皮下注射することで、酵素補充療法により、モデルマウスの延命治療が成功したことが報告された(J. Bone Miner. Res (2008) 23:777)。この成功を元に、臨床的な酵素補充療法が認可されたが、連日大量の皮下投与を必要とし、医療費、患者 QOL に対しても最善とはいえない。我々は、この TNALP-D10 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクター(J Bone Miner Res. (2011) 26:135)、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター (Hum Gene Ther. (2011) 22: 1355) を新生児期 *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスに経静脈的に単回投与することにより、マウスが成獣となる 2 か月間まで、健康な状態で延命することを確認した。また、胎児の腹腔内へのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター投与でも同様の治療効果を確認した (Hum Gene Ther. (2012) 23: 399)。以上より、TNALP-D10 遺伝子の全身投与は、これまでにない新しい根治療法であり、臨床応用が強く期待された。

### 2. 研究の目的

レンチウイルスベクターは発がん性の問題などから臨床応用が限られているが、AAV ベクターは広範な組織特異性、低い免疫原性、非病原性などから、ヒトに対する臨床研究に既に使用されており、より現実的な選択肢である。本研究では、静脈注射より簡単に投与でき、また局所投与であるためより安全性が高いと考えられる筋肉注射でも、全身投与と同様な治療効果が得られるか、安全性、治療効果について検討することを目的とした。また、マウスの一般的な寿命である約 2 年間、TNALP-AAV ベクターで導入された TNALP 産生能力が低下せず、治療効果が継続するか確認することも目的とした。さらに、過剰投与した際に副作用があるかについても検討した。これらは今後ヒトへの臨床応用を考えた場合、非常に重要となってくる。

### 3. 研究の方法

本研究では、新生児期の *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスに対して、筋肉内注射で AAV ベクターを利用した TNALP 遺伝子の導入を行い、遺伝子導入して生存期間の延長したマウスに対して、寿命の延長、

血清 ALP 値の上昇、骨形成不全の改善（病理学的、画像評価、骨密度、骨長）を指標に治療効果を判定する。成獣マウスに対して同ベクターを過剰投与し、血清 ALP 活性を過剰発現させた際の異所性石灰化、臓器障害、電解質異常の有無を確認することで、過剰発現の副作用についても検討する。

生後 1 日までに出生したマウスから DNA を抽出して *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスを確認し、治療対象マウスとする。生後 3 日までの新生児期に *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスを実験台に粘着テープで固定し、大腿四頭筋をつまみ上げるようにして 10 $\mu$ l ハミルトンマイクロシリンジを使用して 2 $\mu$ l の AAV ベクターをただ 1 回投与した。

#### (1) 治療効果の確認

【導入された遺伝子の発現の改善】生後 1 日の *Akp2*<sup>-/-</sup>マウスに対して、すでに静脈内投与で治療効果の確認された AAV8-TNALP-D10 ベクター（Hum Gene Ther. (2011)22:1355）を筋肉内投与し、導入された遺伝子が発現しているのかを評価する。つまり、延命、血清 ALP 値の上昇、骨形成不全の改善（病理学的：ALP 活性染色、画像評価：骨密度、骨構造）を指標に、まずは、生後 2 ヶ月、つまり成熟マウスとなるまでの治療効果を判定する。

【より長期での治療効果の維持】を確認後、同様の検索を生後 18 ヶ月まで行ない、長期間治療状態が維持されるのかを確認することで、生涯ただ 1 度の遺伝子治療での治療が可能か評価する。レントゲン写真、マイクロ CT による骨密度、骨構成を、Wild type (WT) と治療マウスで比較する。また、AAV ベクターの臓器への分布も検討する。

#### (2) AAV ベクターの投与量の最適化

投与量を 3 段階に設定して、治療可能な必要十分投与量を決定する。

#### (3) ALP の過剰発現マウスの作製による血清 ALP 高値の副作用の検討

治療域の 10 倍を超えた ALP 活性を発現するほど大量の AAV ベクターをマウスに投与し、肝機能、腎機能のような臓器への影響、血清 ALP 値、Ca, P, PTH など骨化に関わる指標の評価、異所性石灰化の出現の有無を確認し、生理的活性の 100 倍以上の高値で ALP が副作用を起こすかの検討を行う。

### 4. 研究成果

AAV8-TNALP-D10 ベクターを 3x10<sup>11</sup> vg/ml 以上投与することで、検体を採取するまでの 18 カ月間の延命と（図 1）、血清 ALP 値が WT の約 10 倍の高値を維持することを確認した（図 2）。治療群では肝機能障害、腎機能障害など副作用を認めず、ただ 1 回の治療で寿命に近い延命を可能にした。また、解剖で腫瘍発生や、臓器・血管の石灰化を認めず、全身のレントゲン写真で異所性石灰化は認めず、治療量での AAV ベクターの安全性が担保された。AAV8-TNALP-D10 ベクターの筋肉注射での治療成功は、ベクターの局所投与での治療可能性を示した。また、マイクロ CT で骨密度を検討したところ、コントロール群にきわめて近い骨化を得られ、骨形成にも有意であることを示した。

図1 Life span

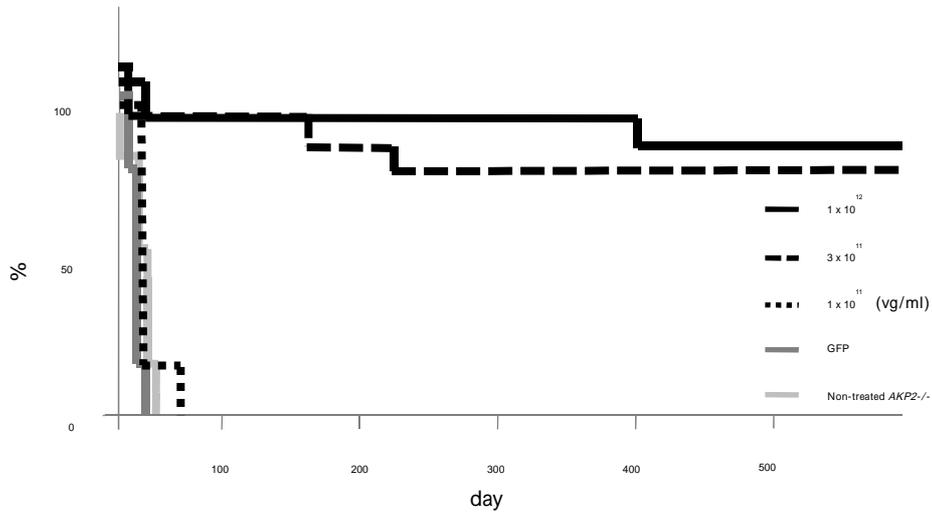
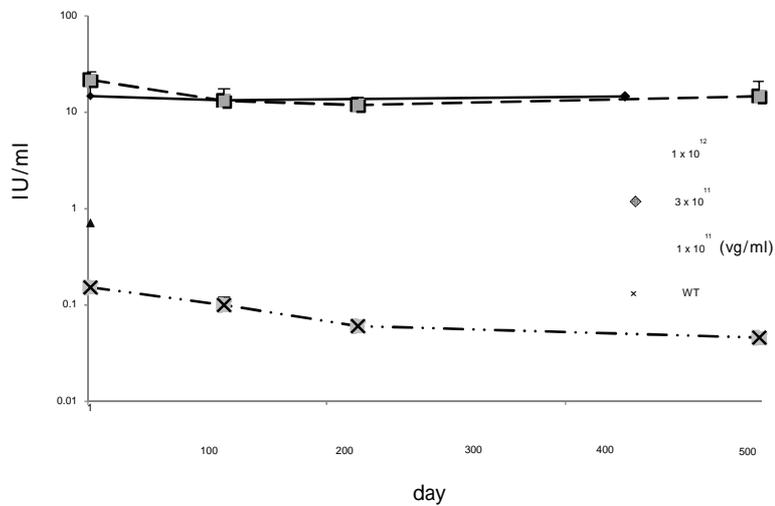


図2 血清 ALP 値



なお、非生理的な高濃度の血清 ALP 濃度による副作用がないか確認するために、生後 6 週のおスの BL6 マウスに、同ベクターを大量に大腿四頭筋肉内投与したところ、血中 ALP 濃度が 1000IU/ml を超えてくると、四肢の肉球部分に異所性石灰化を生じるマウスが出現した（図 3）。活動に影響はなく、解剖しても内臓には肉眼的に石灰化を認めなかった。血液検査で電解質異常や副甲状腺ホルモンの異常はなかった。



図3

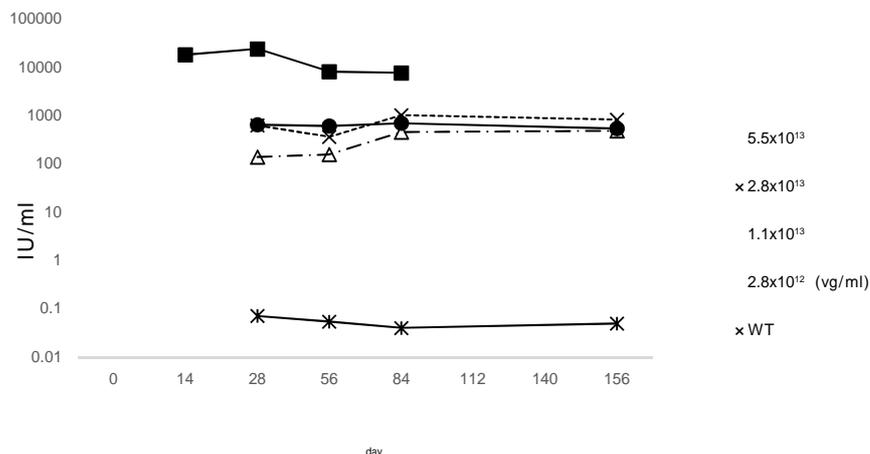


図4 血清ALP値

以上より、たった1回の筋肉注射によるAAV8-TNALP-D10ベクター投与により *Akp2*<sup>-/-</sup> マウスは十分な延命を得られることが示された。また、治療量でのベクター投与によるALP活性では、生理的な値より高値であっても有意な副作用を認めなかった。このことは、今後の低ホスファターゼ血症の遺伝子治療の臨床応用に向けて大きな布石となり、ヒトへの遺伝子治療の可能性がより現実的にする実験成果といえる。

## 5. 主な発表論文など

### 【雑誌論文】(計4件)

1. **松本多絵**, 近 利雄. 渡航者ワクチンの現状と課題 成人と小児におけるワクチン選定法と国内の課題(解説/特集). 日本医事新報, 査読なし, 4789, 2016, 20-26
2. **松本多絵**. こどもの渡航医学 子どもの発達と渡航. 診断と治療社チャイルドヘルス, 20 巻. 査読なし, 2017, 48-50(448-450)
3. **松本多絵**, 近 利雄. こどもの渡航医学 山・海での注意点. 診断と治療社チャイルドヘルス, 20 巻. 査読なし, 2017, 58-61(698-701)
4. **松本多絵**. こどもの渡航医学 発達小体のある子どもとの渡航. 診断と治療社チャイルドヘルス, 20 巻. 査読なし, 2017, 66-567(786-787)

### 【学会発表】(計6件)

1. **松本多絵**. 内科的コントロールが困難な尿路感染に外科的介入を要した水腎、巨大尿管の1乳児例. 第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 2015
2. **松本多絵**. 一般小児科におけるHCV母子感染フォロー. 第86回日本感染症学会 西日本地方会学術集会 / 第59回日本感染症学会 中日本地方会学術集会 / 第64回日本化学療法学会 西日本支部総会. 2016
3. **松本多絵**. 最近17年間で経験した当院での小児化膿性関節炎の検討. 第92回日本感染症

学会総会・学術講演会. 2018

4. **松本多絵**. 教育講演：呼吸器疾患でも快適な空の旅を. 第 51 回小児呼吸器学会. 2018
5. Noriko Miyake, Koichi Miyake, Motoko Yamamoto, Takashi Shimada, Takashi Okada. Direct comparison between single-stranded and self-complementary type 9 AAV vector to treat adult MLD model mice by intravenous injection. The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2018.
6. Tsutomu Igarashi, Kazuhisa Takahashi, Koichi Miyake, Maika Kobayashi, Chiemi Yaguchi, Noriko Miyake, Shuhei Kameya, Hiroshi Takahashi, Takashi Okada. Intravitreal injection of AAV vector in cynomolgus monkeys affects neutralizing antibody titer against AAV in the serum. The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2018.

【図書】(計2件)

1. **松本多絵**, 南山堂, トラベル&グローバルメディスン 229-237, 2017
2. Miyake K, Miyake N, Shimada T., InTech, Neonatal Gene Therapy for Inherited Disorders. Selected Topics in Neonatal Care. 191-199, 2018

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三宅弘一

ローマ字氏名：MIYAKE Koichi

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 90267211

(2)研究協力者

なし