

機関番号： 32202
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2008~2010
課題番号： 20591230
研究課題名 (和文) 肝外組織を標的とするフェニルケトン尿症遺伝子治療
研究課題名 (英文) Extrahepatic tissue-targeted gene therapy for phenylketonuria
研究代表者
久米 晃啓 (KUME AKIHIRO)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10264293

研究成果の概要 (和文)： 古典型フェニルケトン尿症 (PKU) に対する治療戦略として、骨格筋を標的とする遺伝子導入を試みた。レポーター遺伝子を用いた *in vitro* ならびに *in vivo* の検討により、自己相補型アデノ随伴ウイルス (scAAV) ベクターに搭載可能なサイズのなかで最も活性の高いプロモータを選定し、筋注用 scAAV ベクターを作製した。PKU の責任遺伝子であるフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) 搭載 scAAV を PKU モデルマウスに単独筋注した場合、PAH の補酵素 BH_4 の外部投与を併用しても有意な効果は得られなかった。PAH 遺伝子搭載ベクターに加え、 BH_4 合成系 2 酵素の遺伝子を搭載するベクターを混合筋注したところ、有意な効果が得られたが、十分な治療域には達せず、さらなるベクターの改善が必要であった。

研究成果の概要 (英文)： The feasibility of muscle-directed gene transfer for the treatment of phenylketonuria (PKU) was investigated. Small-sized promoters were examined for high expression in the context of self-complementary adeno-associated virus (scAAV) vector. Intramuscular injection of a scAAV encoding phenylalanine hydroxylase (PAH) did not show a significant effect in a mouse model of PKU. Simultaneous injection of three scAAV vectors encoding PAH, GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoil tetrahydrobiopterine synthase resulted in a significant, still moderate decrease of blood phenylalanine in PKU mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児代謝・栄養学、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

代表的な先天代謝異常症である古典型フェニルケトン尿症 (PKU) は、肝に存在するフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) の欠損に起因し、蓄積するフェニルアラニン (Phe) の神経毒性により脳障害をきたす。現在、新生児マススクリーニングによる早期発見と厳格な Phe 摂取制限によって脳障害を防止することは可能であるが、この食餌療法は患者や家族にとって大きな負担であり、医療コストも大きい。根本治療として肝移植も考えられるが、ドナー不足等の問題から普及は難しい。これに対し、患者自身の細胞機能を回復させる遺伝子治療は、少数回の治療で永続的効果も期待でき、社会的・倫理的制約も少ないと考えられるため、その実用化が待たれている。我々は、長らくアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの開発と応用に努めてきたが、AAV キャプシド血清型やプロモータの至適化などの基礎検討を経て、AAV5 型ベクターの門脈内投与により、PKU モデルマウスの治療実験に成功した。しかし、治療効果を得るには超大量の AAV ベクターを要したこと、遺伝子導入効率には大きな性差があった (雄 >> 雌) ことなど、実用化に向けて課題も残ったため、さらにベクターの改良を進めた。AAV8 型キャプシドや新規に開発された自己相補型ゲノム (scAAV) の採用により効率を改善しつつあったが、AAV ベクターの効果における性差は標的臓器が肝臓である場合に最も著しいことが指摘され、安全なベクター投与という観点からも肝外組織、特に骨格筋が有望な標的臓器と考えられた。この戦略における問題点の一つは、PAH の補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (BH₄) が肝外組織では合成されないことで、いかに BH₄ を供給するかについても検討が必要であった。

2. 研究の目的

(1) 筋肉を標的とする自己相補型 AAV ベクターに搭載するプロモータの選定：

scAAV ベクターの遺伝子導入効率は良好で

あるが、ゲノムサイズの制限が厳しい (全長 2.2kb 以下)。そこで、単独の汎用プロモータやそれらと筋特異的エンハンサの組み合わせ・筋特異的プロモータなど様々な可能性の中から、0.5kb 以下のサイズにて筋組織でできるだけ高発現が得られるものを見出す。

(2) PAH 遺伝子導入と補酵素投与を組み合わせた PKU 遺伝子治療：

(1) の結果から選定したプロモータと PAH 遺伝子を搭載する scAAV ベクターを構築し、このベクターの単独筋注にて PKU モデルマウスの遺伝子治療が可能であるか検討する。この場合 PAH の補酵素である BH₄ は外部から補充するが、その投与ルートや投与量についても検討する。

(3) 筋肉への遺伝子導入のみによる PKU 遺伝子治療：

上記 PAH 搭載ベクターのほか、BH₄ 合成系の酵素遺伝子を搭載するベクターも構築し、これらの混合筋注により PKU モデルマウスの遺伝子治療が可能か検討する。

3. 研究の方法

(1) プロモータの *in vitro* 評価：

汎用プロモータとしてサイトメガロウイルスプロモータ (CMV) と翻訳延長因子 I α のコアプロモータ (EFS)、筋特異的プロモータとしてクレアチンキナーゼのコアプロモータ (CK)、比較対照として肝特異的プロモータ (LP1) を用意した。コアプロモータには、サイズの許す限り CK 遺伝子のエンハンサを 1 個 (s) または 2 個 (d) 連結し、発現効率と組織特異性を評価した。発現効率の評価にはレポーターとして PAH 遺伝子と同じサイズ (約 1.4kb) のヒト凝固第 IX 因子 (FIX) 遺伝子を用い、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞・ヒト肝癌由来 Huh7 細胞・筋分化能を有するマウス C2C12 細胞にトランスフェクトした後、培地

中のFIXをELISA法とイムノブロット法で測定した。

(2) プロモータのin vivo評価：

(1) において高発現が得られたCMVとdCKプロモータにFIX遺伝子を組み合わせてscAAVゲノムを構築した。これをAAV1型キャプシドに包埋して組換えAAV (scAAV1/CMV-FIX、scAAV/dCK-FIX) を作製し、野生型C57BL/6マウスに筋注後、血中FIX濃度をELISA法で測定した。

(3) PAH遺伝子搭載AAVベクター単独の治療効果：

上記(2)で作製したAAVベクターの遺伝子をPAH遺伝子に置き換え、PKUモデルマウスに筋注した。治療効果は蛍光プレート法による血中Phe濃度の測定と、Pheの酸化的脱炭酸能測定で判定した。後者は、安定同位体標識Phe ($1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Phe}$) が脱炭酸反応 (PKUではこの反応が行えない) を受け、 $^{13}\text{CO}_2$ が呼気中に放出される現象を利用したもので、 $^{13}\text{CO}_2$ 測定はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリ法で行った。BH₄は、治療効果判定の8時間前に腹腔内投与した。

(4) AAVベクター3種混合筋注の治療効果：

BH₄合成の第一・第二段階を触媒するGTPシクロヒドラーゼI (GCH) および6-ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素 (PTS) の遺伝子を搭載する自己相補型AAVベクターをそれぞれ作製し、PAH遺伝子搭載AAVとともにPKUマウスに混合筋注した。効果判定は(3)と同様に血中Phe濃度測定と $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験によった。

4. 研究成果

(1) プロモータのin vitro評価：

CMV・sEFS・sCK・dCK・LP1の各プロモータとFIXレポーター遺伝子をscAAV骨格に組込んで、発現ベクターを構築し、HEK293細胞・Huh7細胞・分化誘導前のC2C12細胞にトランスフェクトし、培養上清中のFIXをELISAならびにイ

ムノブロットで、細胞中のFIXをイムノブロットで定量・半定量した。C2C12細胞については、筋管細胞に分化誘導後も同様の測定を行った。その結果、HEK293細胞における活性はCMV >> その他、Huh7細胞にてはCMV > LP1 >> その他だった。一方、未分化C2C12細胞における発現はいずれも弱くdCK > CMV > sEFS >> LP1, sCK だったが、筋管細胞へと分化させるにつれてエンハンサ活性が顕著に現れ、分化誘導末期での発現はdCK (4.6%) > sEFS (4.4%) > sCK (2.4%) > CMV (1.5%) >> LP1 (0%) となった。

(2) プロモータのin vivo評価：

scAAV1/CMV-FIXならびにscAAV1/dCK-FIXベクターを作製して野生型マウスの後肢筋に注射し、血漿中のFIXをELISAで定量追跡した。ベクター筋注後血中のFIXは緩やかに上昇し、scAAV1/CMV-FIX投与群は8週後に平均約2%、16週後に約6%に達し、以後4-5%で推移した。一方、scAAV1/dCK-FIX投与群は8週後に平均約2%に至り、以後そのレベルで推移した。これらの値は期待よりやや低いものの、血友病Bの治療レベルに達した。以上の結果から、PKUモデルマウスの治療実験にはCMVプロモータを使用することにした。

(3) PAH遺伝子搭載AAVベクター単独の治療効果：

CMVプロモータとPAH遺伝子を搭載する自己相補型AAVベクター (scAAV1/CMV-PAH) 2×10^{11} vector genomes (vg) を雌PKUマウス3頭に筋注し、BH₄に反応して血中Pheが低下するか検討した。筋注1週後に 31.3 ± 3.4 mg/dLから 23.5 ± 1.6 mg/dL ($p = 0.023$)、2週後には 30.3 ± 2.8 mg/dLから 22.7 ± 2.9 mg/dL ($p = 0.031$)、5週後には 29.1 ± 2.2 mg/dLから 17.4 ± 4.9 mg/dL ($p = 0.020$)へと軽度の低下をみたが、BH₄投与後のPhe絶対値は、ベクター筋注前 (26.5 ± 3.2 mg/dL) と有意差がなかった。

(4) AAVベクター3種混合筋注の治療効果：

scAAV1/CMV-PAHに加え、BH₄合成系2酵素(GCHおよびPTS)の遺伝子を搭載するベクター(scAAV1/CMV-GCH、scAAV1/CMV-PTS)を4×10¹¹vgずつPKUマウスに混合筋注し(雄4頭、雌7頭)、静止時の血中Pheを測定した。雄(治療前31.9±1.1 mg/dL)・雌(治療前29.4±2.7 mg/dL)とも治療後2週から血中Pheは有意に低下し、その効果は27週後も持続していた(雄17.3±1.4 mg/dL : p = 0.00014、雌22.2±3.4 mg/dL : p = 0.00087)。この治療系はPAHベクターの単独筋注より優れた効果をもたらしたが、血中Pheは目標の治療域(< 10 mg/dL)には達しなかった。本実験で用いたCMVプロモータよりさらに高発現なものを使用する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura KI, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K: Systemic delivery of IL-10 by an AAV-vector presents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther* 16:383-391, 2009 (査読有)
- ② Kawaguchi H, Okamoto S, Sikdar D, Kume A, Li F, Mohafez OM, Shehata MH, Hiraga K: Genomic organization of regions that regulate chicken glycine decarboxylase gene transcription: Physiological and pathological conditions. *Gene* 432:7-18, 2009 (査読有)
- ③ Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med* 11:373-381, 2009 (査読有)
- ④ Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B,

- Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyakawa N: Kinetics and effect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 20:777-783, 2009 (査読有)
- ⑤ Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731-1735, 2010 (査読有)
 - ⑥ Yagi H, Ogura T, Mizukami H, Urabe M, Hamada H, Yoshikawa H, Ozawa K, Kume A: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J Gene Med* 13:114-122, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 八木洋也、水上浩明、小倉剛、濱田洋実、吉川裕之、小澤敬也、久米晃啓：自己相補型アデノ随伴ウイルスベクターによるフェニルケトン尿症の遺伝子治療 - maternal PKUの予防に向けて -。第61回日本産婦人科学会学術講演会、2009年4月5日、京都
- ② 小倉剛、水上浩明、八木洋也、濱田洋実、吉川裕之、小澤敬也、久米晃啓：筋組織を標的とするAAVベクターを用いた「フェニルケトン尿症」に対する新生仔遺伝子治療の長期的効果。第61回日本産婦人科学会学術講演会、2009年4月5日、京都
- ③ 久米晃啓、八木洋也、小倉剛、水上浩明、ト部匡司、小澤敬也：改良型アデノ随伴ウイルスベクターによるフェニルケトン尿症遺伝子治療。第112回日本小児科学会小児科学会学術集会、2009年4月18日、奈良
- ④ Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Mizukami H, Ogura T, Urabe M, Hamada H,

Yoshikawa H, Ozawa K, Kume A: Improvement of monoamine metabolism in phenylketonuria mouse brain treated with a self-complementary adeno-associated vector. American Society of Gene Therapy' s 12th Annual Meeting, May 27, 2009, San Diego, CA, USA

⑤ Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyaka T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N: Kinetics and defect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. 第 15 回日本遺伝子治療学会、2009 年 7 月 11 日、吹田

⑥ Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Mizukami H, Ogura T, Urabe M, Hamada H, Yoshikawa K, Ozawa K, Kume A: liver-targeted gene therapy with a self-complementary AAV ameliorated brain aminergic deficit in phenylketonuria mice. 第 15 回日本遺伝子治療学会、2009 年 7 月 11 日、吹田

⑦ Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Ishiwata A, Mimuro J, Madoiwa S, Ohmori T, Sakata Y, Ozawa K: Promoter selection for muscle-directed self-complementary AAV toward hemophilia B gene therapy. 第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 23 日、京都

⑧ Kume A, Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Mizukami H, Urabe M, Ozawa K: Liver-targeted gene therapy with a self-complementary AAV ameliorates brain aminergic deficit in phenylketonuria mice. XVIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, November 22, 2009, Hannover, Germany

⑨ Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Ishiwata A, Mimuro J, Madoiwa S, Ohmori T, Sakata Y, Ozawa K: Promoter selection for AAV vector-mediated factor IX expression in skeletal muscle. American

Society of Gene Therapy' s 13th Annual Meeting, May 21, 2009, Washington, DC, USA

⑩ Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Ishiwata A, mimuro J, Madoiwa S, Ohmori T, Sakata Y, Ozawa K: Choice of small-sized promoter for AAV-mediated factor IX expression in skeletal muscle. 第 16 回日本遺伝子治療学会、2010 年 7 月 1 日、宇都宮

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 晃啓 (KUME AKIHIRO)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10264293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし