

令和元年5月23日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2018

課題番号：16H07213

研究課題名(和文)低ホスファターゼ症の遺伝子治療—硬組織石灰化不全に対する新規治療法の開発—

研究課題名(英文)Development of new gene therapy for normal mineralization in hypophosphatasia

研究代表者

高橋 有希 (Takahashi, Aki)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30778626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、まずin vivo遺伝子治療において解析されていない顎骨、歯牙支持組織に対する治療効果を確認し、大腿骨などの全身骨と由来が異なる硬組織の状態を確認した後に、硬組織に分布するアルカリホスファターゼ(ALP)濃度を上昇させるための至適AAVベクター投与量を検討し、硬組織における石灰化不全の改善の可能性および安全性に関して検証することを目的とした。

血中のALP活性が1U/mLの低用量治療マウスの顎骨および大腿骨は伸長不全、形態不整および低石灰化の残存が確認されたのに対し、血中ALP活性が20U/mLの高用量治療マウスではこれらの治療不全が正常マウスと差がないまでに改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のHPP治療法においては、硬組織の石灰化不全に関する有効な治療法はない。したがって、低身長や易骨折性、乳歯の早期脱落の治療は困難である。硬組織の石灰化不全にも有効であるHPP治療法の開発は患者のQOLを高めることが期待できる。

また、これまでの研究は延命効果を検討しているものが多く、免疫反応や異所石灰化等の副作用に関して明瞭に評価しているものはない。また、すべての重篤な遺伝病において遺伝子治療は唯一の治療法である。よって、安全性の確認はHPPのみならず、他の遺伝病における遺伝子治療の可能性を見出す上で、重要な意義を担う。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop a more effective and clinically applicable approach, we assessed the efficacy of ALP replacement closer to optimal levels on the full recovery of the bone structure as well as the safety of this approach.

We constructed a self-complementary AAV8 vector expressing TNALP driven by the chicken beta-actin (CBA) promoter (scAAV8-CBA-TNALP-D10). The scAAV8-CBA-TNALP-D10 was intravenously injected into newborn HPP mice at a lower-dose of 1.5×10^{11} v.g./body (1U/mL of serum ALP activity) and a higher-dose of 4.5×10^{12} v.g./body (20U/mL of serum ALP activity).

Improved bone structure in the knee joints of the higher-dose treated mice was demonstrated by X-ray images. There was no significant difference in the femur bone mineral density between higher-dose treated mice and WT mice, while lower-dose treated mice densities were significantly lower ($n=5$, $p<0.01$).

研究分野：薬理学および分子遺伝医学

キーワード：低ホスファターゼ症 遺伝子治療 アデノ随伴ウイルス 硬組織 アルカリホスファターゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低ホスファターゼ症 (hypophosphatasia, HPP) は、組織非特異的アルカリホスファターゼ遺伝子 (TNALP) の変異により、血中アルカリホスファターゼ (ALP) 濃度が低下し、痙攣発作、呼吸困難、硬組織の石灰化不全、乳歯の早期脱落を主徴とする遺伝性疾患である。本邦においては致死性である周産期型や乳児型の頻度が高い。現在、アスホターゼアルファを使用した酵素補充療法が行われているが、酵素の半減期が短いため、長期反復投与の必要性があり、また侵襲性も高い。そこで申請者は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる遺伝子治療実験を行うことにより、単回投与で延命効果を得ることに成功している。しかしながら、低身長や易骨折性、乳歯の早期脱落などの原因となる硬組織の石灰化不全に対しての有効な治療法はない。よって、その改善が可能な新規治療法の開発が急がれる。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず *in vivo* 遺伝子治療において解析されていない顎骨、歯牙支持組織に対する治療効果を確認し、大腿骨などの全身骨と由来が異なる硬組織の状態を確認した後に、硬組織に分布するアルカリホスファターゼ (ALP) 濃度を上昇させるための至適 AAV ベクター投与量を検討し、硬組織における石灰化不全の改善の可能性および安全性に関して検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) AAV ベクター投与による顎骨、歯牙支持組織に対する治療効果

重症型 HPP モデルである TNALP ノックアウト (*Akp2*^{-/-}) マウスに対して、出生 1 日後に筋肉特異的クレアチンキナーゼ (MCK) プロモーターにより TNALP-D₁₀ を発現する AAV8 型ベクター (scAAV8-MCK-TNALP-D₁₀) を 2.5×10^{12} vector genome (v.g.)/body 大腿四頭筋に筋肉内投与し、20 日齢と 90 日齢において下顎骨および歯牙、歯牙支持組織の評価を放射線学的評価および病理組織学的評価により行った。比較対象として、野生型 (WT) と未治療 *Akp2*^{-/-} マウスを用いた。

2) 硬組織における石灰化不全の改善

Akp2^{-/-} マウスに対して、出生 1~2 日後にチキン β アクチン (CBA) プロモーターにより強力に TNALP-D₁₀ を発現する AAV8 型ベクター (scAAV8-CBA-TNALP-D₁₀) を大腿四頭筋に 1.5×10^{11} v.g./body (低用量)、 7.5×10^{11} v.g./body、 1.5×10^{12} v.g./body、および 4.5×10^{12} v.g./body (高用量) 筋肉内投与し、90 日齢において硬組織における石灰化不全の改善の可能性を検証した。

3) AAV ベクター投与による安全性

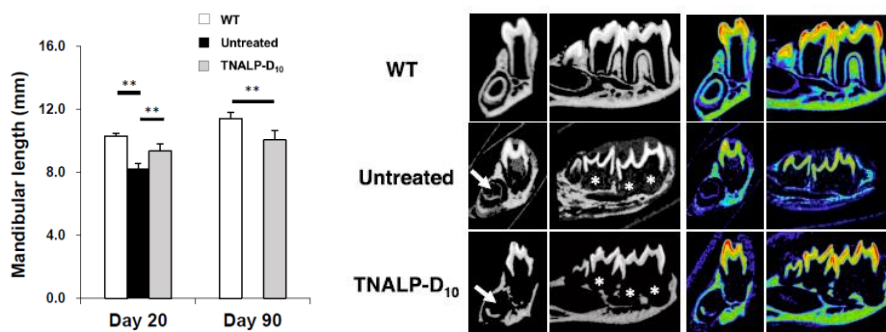
上記高用量治療マウスにおいてベクター投与部位である大腿四頭筋および主要臓器であり、AAV8 において遺伝子導入されやすい肝臓における免疫反応および異所性石灰化を評価し、さらに行動量の測定を行い、全身性の安全評価を行った。

4. 研究成果

1) AAV ベクター投与による顎骨、歯牙支持組織に対する治療効果

Akp2^{-/-} マウスに 2.5×10^{12} v.g./body 筋肉内投与したところ、血中 ALP 活性は約 1 U/mL となった。解析結果を以下に示す。

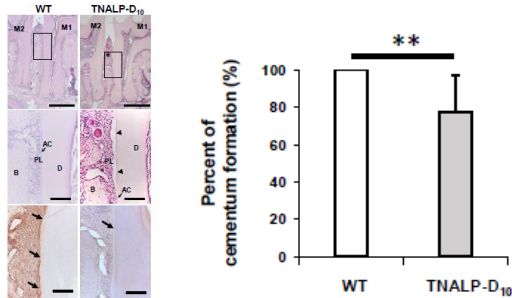
- ① 20 日齢のマウス下顎骨をエックス線画像で解析した結果、治療 *Akp2*^{-/-} (TNALP-D₁₀) マウスの下顎骨長径は、未治療 *Akp2*^{-/-} (Untreated) マウスと比較して有意に高値となった。また、マイクロ CT 撮影画像より、Untreated マウスのエナメル質および歯槽骨の石灰化度は低値であったのに対し、TNALP-D₁₀ マウスでは改善されていることが確認された。実際に骨密度を測定した結果、Untreated マウスと比較して TNALP-D₁₀ マウスは有意に高値となった。



- ② 90 日齢の WT マウスと TNALP-D₁₀ マウスの下顎骨をエックス線画像で解析した結果、TNALP-D₁₀ マウスの下顎骨長径および幅径は、WT マウスと比較して有意に低値となった。

マイクロ CT 撮影画像より、第一大臼歯の歯牙全長、歯根長およびセメントエナメル境—歯槽骨頂間距離を測定した結果、いずれも有意に低値となった。また、TRI/3D-BON による歯槽骨、エナメル質および象牙質の石灰化密度および骨梁構造計測を行った結果、象牙質に関しては有意な差は認められなかったのに対し、その他の計測項目はすべて有意に低値となった。

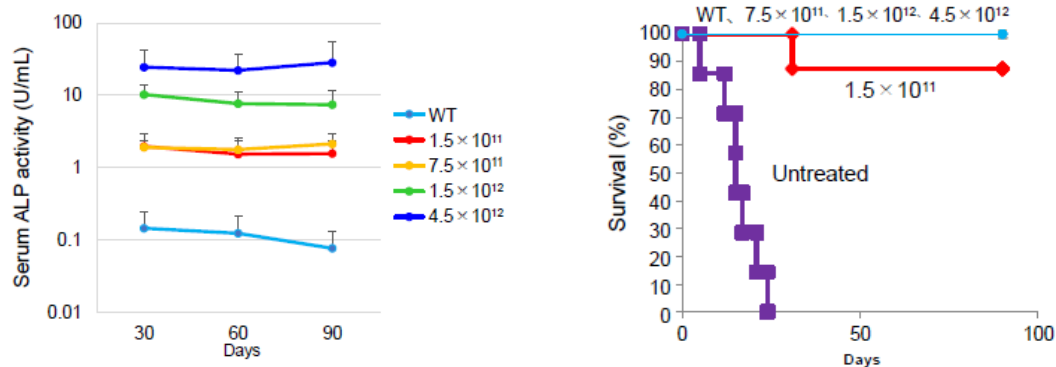
- ③20 日齢および 90 日齢マウス下顎骨の組織学的評価より、TNALP-D₁₀ マウスにおいて歯槽骨頂の低下や歯根膜細胞の配列不整、無細胞セメント質の部分的な欠如が認められ、WT マウスでは歯根周囲にオステオポンチンの発現が認められたのに対し、TNALP マウスでは不明瞭であった。以上から、scAAV8-MCK-TNALP-D₁₀ 治療による歯周組織の改善は不完全であるということが示唆された。



以上の結果から、歯牙および歯周組織の石灰化は、scAAV8-MCK-TNALP-D₁₀ 投与により改善が確認されたもの、石灰化不全が残存することが示唆された。

2) 硬組織における石灰化不全の改善

- ④ *Akp2*^{-/-} マウスに対して、scAAV8-CBA-TNALP-D₁₀ を大腿四頭筋に 1.5×10^{11} v.g./body (低用量)、 7.5×10^{11} v.g./body、 1.5×10^{12} v.g./body、および 4.5×10^{12} v.g./body (高用量) 筋肉内投与した結果、血清において 90 日の間それぞれ約 1.5、2.1、7.4、28.3 U/mL の ALP 活性が得られた (n=7)。いずれの用量においても血清 ALP 活性が 1 U/mL 以上であるため、延命効果には差が認められなかった (n=7)。



- ⑤90 日齢の WT マウスと各用量で治療したマウスの大腿骨をエックス線画像で解析した結果、低用量治療マウスの大腿骨は成長板における杯状変化の残存が確認された。それに対して、高用量治療マウスは杯状変化が治癒しており、ほぼ正常な形態に改善されていることが分かった。実際に大腿骨長径を測定した結果、他の用量で治療したマウスでは WT マウスと比べ、明らかに伸長不全が残存していたのに対し、高用量治療マウスは同程度までに改善した (n=7, 高用量治療マウス vs. WT マウス; 14.02 ± 0.43 mm vs. 14.66 ± 0.38 mm, NS)。

さらに詳細な解析を行うためにマイクロ CT 撮影を行ったところ、低用量治療マウスの大腿骨は皮質骨の部分欠如、骨梁の配列不整が確認された。高用量治療マウスでは、これらは改善されていた。骨密度を測定したところ、低用量治療マウスでは WT マウスと比べ、有意に低値となり (n=5, 低用量治療マウス vs. WT マウス; 806.2 ± 39.7 mg/cm³ vs. 927.7 ± 43.5 mg/cm³, $p < 0.01$)、高用量治療マウスでは同程度に改善した (n=5, 高用量治療マウス vs. WT マウス; 927.1 ± 68.5 mg/cm³ vs. 927.7 ± 43.5 mg/cm³, NS)。

- ⑥90 日齢治療マウス大腿骨の組織学的評価により、低用量治療マウスでは軟骨細胞層および皮質骨の一部に線維状構造物が迷入しており、石灰化が不完全であることが確認された。ALP 染色を行った結果、ほぼ染色される部位が観察されず、ALP 補充量が不足していることが分かった。それに対し、高用量治療マウスでは、繊維状構造物の迷入は確認されず、正常な石灰化が行われていることが分かった。ALP 染色では、WT マウスほどではないが、ALP 補充量の改善が確認された。

以上より、高用量治療を行うことで大腿骨の伸長不全および石灰化不全が改善できる可能性

が示唆された。

3) AAV ベクター投与による安全性

上記高用量治療マウスにおいて、HE 染色により、大腿四頭筋および肝臓における免疫反応を評価したが特に異常は観察されなかった。異所性石灰化に関しても同様に今回の系では観察されなかった。行動量の測定を行ったところ、どの治療マウスも異常行動は認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- Ikeue, R., Takahashi, A.N., Kasahara, Y.N., Watanabe, A., Muramatsu, T., Sato, T., Okada, T:
Bone-targeted alkaline phosphatase treatment of mandibular bone and teeth in lethal hypophosphatasia via an scAAV8 vector. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 10: 361-370, 2018
doi: 10.1016/j.omtm.2018.08.004.
査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. Takahashi, A.N., Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Iijima O, Miyake N, Adachi K, Kasahara, Y.N., Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Shimada T, Okada T:
Therapeutic effects of recombinant adeno-associated virus-mediated muscle transduction to express bone-targeted alkaline phosphatase of lethal hypophosphatasia model mice.
ICHG 13th Annual Meeting, 2016
2. 高橋 (中村) 有希、渡邊 淳、笠原正貴
致死性低ホスファターゼ症モデルマウスの硬組織石灰化不全治療を目的とした新規遺伝子治療
第 134 回日本薬理学会関東部会、2016 年
3. Ikeue R, Takahashi A, Watanabe A, Okada T, Sato T
Morphological change of mandible and teeth in lethal hypophosphatasia model mice after gene therapy
第 34 回日本骨代謝学会、2016 年
4. Ikeue R, Takahashi A, Muramatsu T, Kasahara Y, Watanabe A, Shimada T, Okada T, Sato T
Assessment of the alveolar bone and tooth in lethal hypophosphatasia mice treated by rAAV8-TNALP-D10
JSGCT 22th Annual Meeting, 2016
5. Takahashi, A.N., Ikeue R, Kasahara, Y.N., Watanabe A, Hirai Y, Kasahara M, Okada T
Therapeutic effects of scAAV8-mediated high dose expression of bone targeted alkaline phosphatase on the lethal hypophosphatasia mice
JSGCT 22th Annual Meeting, 2016
6. 高橋 (中村) 有希、池上 良、平井幸彦、笠原正貴
致死性低ホスファターゼ症モデルマウスに対する新規 TNALP 高発現遺伝子治療による硬組織石灰化不全の改善と延命効果
第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年
7. 池上 良、高橋有希、佐藤 亨、笠原正貴、村松 敬
酵素補充遺伝子治療を行った致死性低ホスファターゼ症モデルマウスの顎骨および歯に対する効果の解析
第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年
8. 池上 良, 高橋有希, 佐藤 亨, 笠原正貴, 村松 敬, 岡田尚巳
重症乳児型低ホスファターゼ症モデルマウスに対する酵素補充遺伝子治療の顎骨・歯へ

の治療効果

第 303 回東京歯科大学学会（総会）、2017 年

9. 池上 良, 高橋有希, 佐藤 亨, 村松 敬, 笠原優子, 渡邊 淳, 岡田尚巳
重症型低ホスファターゼ症モデルマウスへの酵素補充遺伝子治療が顎骨や歯に
もたらす治療効果

第 12 回 ALPS 研究会、2017

10. Takahashi, A.N., Ikeue, R., Kasahara, Y.N., Watanabe, A., Hirai, Y., Okada, T.,
Kasahara, M.

Improvement of lethal hypophosphatasia in mice by high level expression of bone targeted
alkaline phosphatase using self-complementary AAV8 vector.

JSGCT 24th Annual Meeting, 2018

11. Ikeue, R., Takahashi, A.N., Kasahara, Y.N., Kasahara, M., Muramatsu, T., Sato, T.,
Okada, T

Improvement of dentoalveolar condition in lethal Hypophosphatasia by gene therapy.

IADR 96th Annual Meeting, 2018

12. 高橋有希、池上 良、棚瀬稔貴、笠原正貴

遺伝子治療による重症低ホスファターゼ症モデルマウスの大腿骨伸長不全の改善
と行動量の正常化

第 60 回歯科基礎医学会学術大会、2018 年

13. 高橋有希、棚瀬稔貴、松永 智、阿部伸一、新谷誠康、笠原正貴

高用量のアデノ随伴ウイルスベクターは低ホスファターゼ症の大腿骨伸長不全を改善する
第 306 回東京歯科大学学会（総会）、2018 年

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。