

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07057

研究課題名(和文) グルコーストランスポーター1欠損症に対するAAVベクターを用いた遺伝子治療法開発

研究課題名(英文) Gene therapy for a mouse model of glucose transporter-1 deficiency syndrome using AAV vector

研究代表者

中村 幸恵 (Nakamura, Sachie)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20382955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：グルコーストランスポーター1欠損症に対する根本治療を目指し、アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus; AAV)ベクターを用いて、疾患モデルマウス(GLUT1<sup>+/-</sup>マウス)に対する遺伝子治療を試みた。ヒト内在性GLUT1 promoter領域を同定した上で、SLC2A1 cDNA組込AAVベクターを作成し、6週齢GLUT1<sup>+/-</sup>マウスに脳室内および心腔内投与した。脳室内投与後、外因性GLUT1蛋白は、大脳皮質、海馬、視床において、主に血管内皮細胞に発現し、有意な運動機能改善および髄液糖上昇を認めた。外因性GLUT1蛋白は治療後2年経過しても脳組織に維持されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLUT1DSの治療として、エネルギー代替療法としてケトン食療法があるが、高脂肪食の長期維持に伴う高脂血症および循環器疾患の副作用から長期継続が困難となっていた。今回GLUT1DSモデルマウスに対してAAVベクターを用いた遺伝子治療の有効性を示唆したことは、新規の根治治療として意義があると考えられる。遺伝子治療により、外因性GLUT1発現が生理的な発現パターンと異なる場合、過発現による神経毒性などの副作用も危惧されるが、本研究では、本来のヒトGLUT1原因遺伝子(SLC2A1)のプロモーター領域を同定して用いるという特色があり、より生理的に近い発現が得られ、より良い治療効果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：We generated an adeno-associated virus (AAV) vector in which the human SLC2A1 gene, encoding glucose transporter type 1 (GLUT1), was expressed under the human endogenous GLUT1 promoter (AAV-GLUT1). We examined if AAV-GLUT1 administration could lead to functional improvement in GLUT1-deficient mice.

AAV-GLUT1 was administered to GLUT1<sup>+/-</sup> mice via intra-cerebroventricular injection. Additionally, we confirmed that exogenous GLUT1 protein was distributed in the brain and other organs after intra-cardiac injection of AAV-GLUT1. After AAV-GLUT1 injection, exogenous GLUT1 protein was mainly expressed in endothelial cells, and partially expressed in neural cells and oligodendrocytes. It was transduced in the cerebral cortex, hippocampus, and thalamus, and the expression was maintained for 24 months. Cerebral microvasculature was increased compared to un-injected control GLUT1<sup>+/-</sup> mice. AAV-GLUT1 improved the motor function and CSF-glucose levels of GLUT1<sup>+/-</sup> mice without off-target effects.

研究分野：小児神経・遺伝子治療学

キーワード：遺伝子治療 グルコーストランスポーター1欠損症 AAV GLUT1 SLC2A1

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

グルコーストランスポーター1欠損症(GLUT1DS)は、GLUT1を介した脳組織への糖取込機能低下による先天性代謝性疾患で、GLUT1DS患者では *SLC2A1* 遺伝子のヘテロ接合性の *de novo* 変異を認める。欧米を中心に200名以上、国内調査では57名の報告があり、小児希少難病では比較的对象患者が多い[1]。治療としては、エネルギー代替療法であるケトン食療法が代表的で、一部の痙攣症状に有効だが、知的障害や精神症状、運動症状には効果が乏しく、かつ長期に渡る高脂肪食による高脂血症や循環器疾患のリスクもあり、長期継続が困難である[2, 3]。GLUT1DS患者は、難治性痙攣と発達遅滞により、日常生活に支障が大きいため、長期の症状改善が見込める根治治療を開発することは大きな意義を持つ。

AAVベクターは、神経細胞に代表される非分裂細胞に効率よく遺伝子導入が可能であり、癌化の危険性が少なく、かつ長期間の発現が期待できるため、AAVベクターを用いた遺伝子治療は、小児難治性神経疾患の有効な治療法となりうる[4]。小児難治性神経疾患に対する、AAVベクターを用いた遺伝子治療については、2012年に、台湾で、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic l-amino acid decarboxylase; AACD) 欠損症に対し、2型 AAVベクターを用いた遺伝子治療が行われ、運動機能の改善が報告された[5]。さらに、申請者の大学で、2015年から AADC 欠損症に対する AAVベクターを用いた遺伝子治療を行い、6名の患者について、運動機能改善および認知機能改善が得られたと報告した[6]。

申請者は、GLUT1DSの重症度を予測する機能評価系の確立を既に行った[7]が、更に、GLUT1DSに対する根治治療として AAVベクターを用いた遺伝子治療法を開発することを目標に研究をすすめた。最初に、神経細胞に対する特異性が高いシナプシンIプロモーター (syn I promoter) を用いた治療用 AAVベクター (AAV-h*SLC2A1*) を作成した。作成した AAV-h*SLC2A1* は、GLUT1DSモデルマウス (*GLUT1* ノックアウトマウスのヘテロ体; *GLUT1*<sup>+/-</sup>マウス) に全身投与 (腹腔内投与) および中枢神経局所投与 (脳室内投与) した。AAV-h*SLC2A1* 治療後、*GLUT1*<sup>+/-</sup>マウスの脳組織の主として神経細胞に外因性 GLUT1 蛋白発現を確認した[8]。しかし、内在性 GLUT1 の脳組織における主たる発現部位は血液脳関門の血管内皮細胞であり、AAV-h*SLC2A1* 治療後の外因性 GLUT1 発現は通常の内因性 GLUT1 の発現パターンとは異なるため、より生理的発現に近付けた、新たな治療用ベクターの開発が必要と考えた。

### 2. 研究の目的

#### (1) ヒト内在性 GLUT1 promoter 領域の推定および治療用 AAVベクターの開発

ヒト内在性 GLUT1 promoter 領域を推定し、GLUT1 promoter 領域を含む治療用 AAVベクター (AAV-GLUT1) を作成する。

#### (2) 治療用 AAVベクター投与後の蛋白発現評価、機能評価および長期発現評価

AAV-GLUT1 を *GLUT1*<sup>+/-</sup>マウスに脳室内投与および全身投与 (心腔内投与) し、脳組織における mRNA・蛋白発現評価および運動機能評価、生化学的検査を行う。脳組織以外の他臓器への発現 (off-target effect) も同時に評価する。AAV-GLUT1 治療後、長期の GLUT1 発現維持について確認する (~2年後)。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト内在性 GLUT1 promoter 領域の推定および治療用 AAVベクターの開発

ラット GLUT1 では発現に関与する promoter 配列は同定されているが、発現に強く関与するヒト内在性 GLUT1 promoter 配列は明確にされていない[9]。そこで、ラット GLUT1 promoter 配列と相同性の高いヒト塩基配列を BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析し、人工遺伝子合成を行った。合成した promoter 領域は、myc-DDK タグ付 *SLC2A1* 遺伝子発現ベクター (RC222696; Origene Technologies) の CMV promoter と入れ替えた。作成したベクターを用いて神経系培養細胞 SH-SY5Y、血管内皮細胞系培養細胞 HUVEC およびグリア細胞系培養細胞 MO3.13 に遺伝子導入した後、細胞から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR 定量で GLUT1-RNA 発現量を確認し、外因性 GLUT1 蛋白発現は細胞免疫染色で確認した。発現特異性に関与する GLUT1 promoter 配列同定後は、AAV-h*SLC2A1* の syn I promoter と入れ替えた、myc-DDK タグ付 GLUT1 promoter 組込 AAVベクター (AAV-GLUT1) を作成した。

#### (2) 治療用 AAVベクター投与後の蛋白発現評価、機能評価および長期発現評価

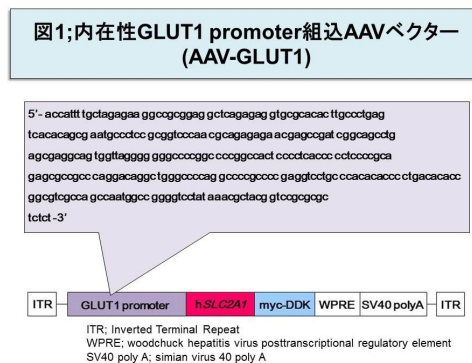
6週齢の *GLUT1*<sup>+/-</sup>マウスに AAV-GLUT1 脳室内投与を行った。AAV-GLUT1 投与量は、以前報告した AAV-h*SLC2A1* 投与量と同一の  $1.85 \times 10^{10}$ vg/匹 ( $9.2 \times 10^{11}$ vg/kg; 低用量) および  $6.5 \times 10^{10}$ vg/匹 ( $3.2 \times 10^{12}$ vg/kg; 高用量) とした。また、投与経路による発現比較として、全身投与として心腔内投与群を作成した。心腔内投与における投与量は、6週齢の *GLUT1*<sup>+/-</sup>マウスに AAV-GLUT1 を  $7.8 \times 10^{11}$ vg/匹 ( $3.9 \times 10^{13}$ vg/kg) とした。投与8週後に、mRNA レベルおよび蛋白レベルの外因性 GLUT1 発現評価を行った。mRNA レベルの発現評価としては、脳組織から抽出した RNA から cDNA 合成し、外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) および GLUT1 の mRNA を

リアルタイム PCR で定量した。蛋白レベルの発現評価として、組織免疫染色を、脳および主要臓器（肝、腎、心、筋）について行った。同時に、脳組織から抽出した蛋白を用いてウェスタンブロット法を行った。外因性 GLUT1 が発現した細胞の種類の評価として、各種細胞マーカー（神経細胞マーカー；  $\beta$ -III-tubulin、アストロサイトマーカー； GFAP、オリゴデンドロサイトマーカー； PLP、血管内皮細胞マーカー； CD31）との多重染色を評価した。また、投与後血管新生の評価として、投与後脳組織の lectin 染色を行った[10]。AAV-GLUT1 投与後運動機能検査として、rota-rod test および footprint test を、生化学的検査として一晩絶食後の髄液糖値を測定した。外因性 GLUT1 蛋白発現評価としての組織免疫染色については、治療後半年、1 年、2 年後についても同様に評価し、蛋白発現維持について確認した。

#### 4. 研究成果

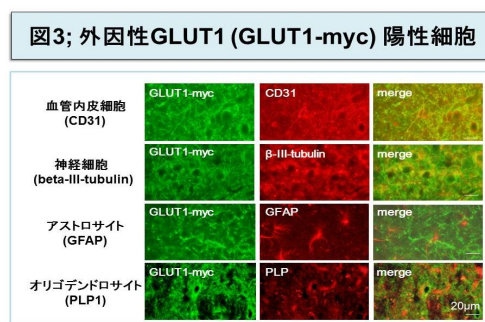
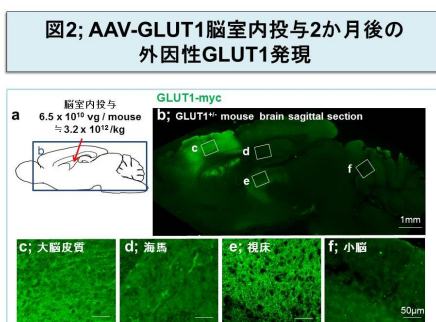
##### (1) ヒト内在性 GLUT1 promoter 領域の推定および治療用 AAV ベクターの開発

ラット *Glut1* において発現調節に強く関与する領域、約 100bp は解明されていたため[9]、ヒト *GLUT1* の 5' 非翻訳領域と上記の約 100bp を含むラット *Glut1* 5' 非翻訳領域について BLAST 解析し、相同性の高い 305 塩基対を同定し、*GLUT1* promoter 領域として人工遺伝子合成し myc-DDK タグ付 *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターの promoter と置換した。この発現ベクターを、神経系培養細胞 SH-SY5Y、血管内皮細胞系培養細胞 HUVEC およびグリア細胞系培養細胞 MO3.13、HEK293 に遺伝子導入したところ、細胞免疫染色で外因性 *GLUT1* (*GLUT1*-myc) 発現が確認できた。HEK293 細胞導入後の *GLUT1*-myc mRNA 発現量は、陰性コントロール 1 に対し *GLUT1* promoter 群が 1.79、MO3.13 細胞導入後の *GLUT1*-myc mRNA 発現量は、陰性コントロール 1 に対し *GLUT1* promoter 群が 1.26 と発現量が増加していた。今回同定したヒト内在性 *GLUT1* promoter 配列(305 塩基対)について、以前申請者が作成した AAV-h*SLC2A1* の syn I promoter 領域を置換し、myc-DDK タグ付 *GLUT1* promoter 組込 AAV ベクター (AAV-GLUT1) を作成した(図 1)。



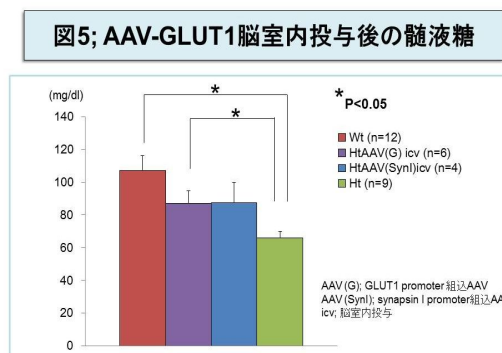
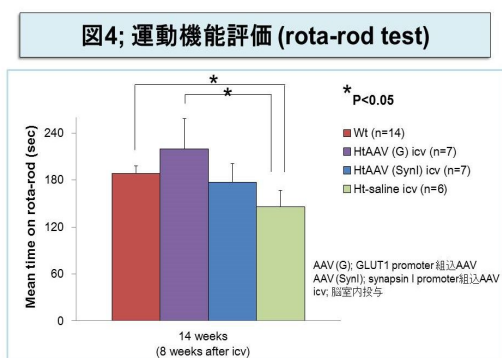
##### (2) 治療用 AAV ベクター投与後の蛋白発現評価、機能評価および長期発現評価

6 週齢の *GLUT1*<sup>+/-</sup> マウスに AAV-GLUT1 脳室内投与を行った。治療 2 か月後の脳組織から抽出した RNA を用いたリアルタイム PCR では、*GLUT1*-myc mRNA は、AAV-h*SLC2A1*、AAV-GLUT1 投与後いずれも検出され、AAV-GLUT1 投与群は AAV-h*SLC2A1* 投与群と比較し *GLUT1*-myc mRNA 定量が増加傾向を示したが、有意差は見られなかった ( $P=0.10$ )。AAV-GLUT1 脳室内投与 2 か月後の脳組織免疫染色において、外因性 *GLUT1* (*GLUT1*-myc) は、穿刺部である側脳室周辺の大脳皮質や海馬、視床に発現していたが、穿刺部から離れた位置の大脳皮質や小脳には発現していなかった(図 2)。AAV-GLUT1 低用量群と比較し、高用量群では、より広範囲に発現がみられた。*GLUT1*-myc 陽性細胞の種類は、血管内皮細胞を主とし、次いで神経細胞やオリゴデンドロサイトにも発現し、生理的な *GLUT1* 発現パターンと類似していた(図 3)。



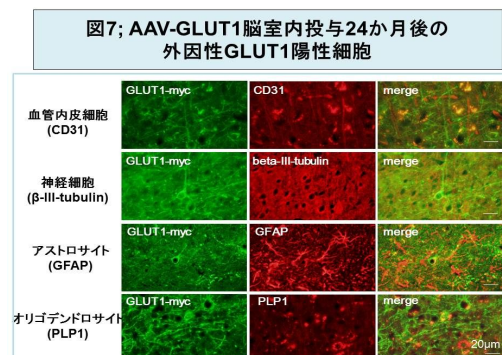
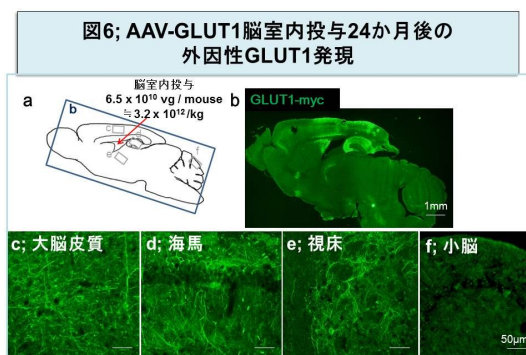
ウェスタンブロットによる、*GLUT1*/ $\beta$ -actin のバンド定量は、無治療の *GLUT1*<sup>+/-</sup> マウス脳組織で  $1.14 \pm 0.10$  ( $n=3$ ) に対し、高用量 AAV-GLUT1 投与群で  $1.35 \pm 0.02$  ( $n=4$ ) だった。*GLUT1*<sup>+/-</sup> マウス脳組織は lectin 染色にて血管新生が減少していることが報告されているが[10]、AAV-GLUT1 脳室内投与後では穿刺部周辺の血管新生の改善がみられた。運動機能評価として rota-rod test では、脳室内投与後 4 週(10 週齢)、8 週(14 週齢)について、AAV-GLUT1 高用量群は、コントロール群である生理食塩水を脳室内投与した *GLUT1*<sup>+/-</sup> マウスと比較し有意に運動機能改善が得られた ( $n=7$ ,  $p<0.05$ )(図 4)。髄液糖については、野生型マウスが  $107 \pm 9.3$  mg/dl ( $n=12$ )、AAV-GLUT1 脳室内投与 *GLUT1*<sup>+/-</sup> マウスが  $87.1 \pm 7.3$  mg/dl ( $n=6$ )、AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 *GLUT1*<sup>+/-</sup> マウスが

87.5mg/dl (n=4)、無治療 GLUT1<sup>+/-</sup>マウスが 66 ± 3.8mg/dl (n=9)であり、野生型のレベルまでは達しないものの、無治療 GLUT1<sup>+/-</sup>マウスと比較し AAV-GLUT1 脳室内投与後有意に改善していた (p<0.05) (図 5)。



心腔内投与群については、治療 2 か月後の脳組織免疫染色で外因性 GLUT1 発現が大脳皮質、海馬、視床、中脳、小脳に確認されたが、脳室内投与と比較し発現量が乏しかった。また、他臓器への影響として、脳室内投与では、心・肝・筋・腎組織に外因性 GLUT1 発現は見られなかったが、心腔内投与では肝・筋組織に外因性 GLUT1 発現していた。

長期発現効果として、AAV-GLUT1 高用量を脳室内投与した群では、治療 2 年後でも外因性 GLUT1 は大脳皮質、海馬、視床に発現維持されていた (図 6)。GLUT1-myc 陽性細胞は、治療 1 年後および 2 年後では、神経細胞の割合が強いものの、血管内皮細胞の一部にも発現維持が確認できた (図 7)。



以上より、AAV-GLUT1 を用いた GLUT1<sup>+/-</sup>マウスに対する遺伝子治療は、外因性 GLUT1 発現を生理的 GLUT1 発現に近似させ、運動機能や髄液糖を改善し、血管内皮細胞や神経細胞において長期発現を維持しうることを確認した。投与経路については、off-target effect や費用対効果を考慮すると、脳室内投与が全身投与と比較してより良いと考えるが、腰椎穿刺による髄腔内投与等の投与経路の比較は必要と考えた。今後、投与経路の検討や、臨床応用を見据えた大動物への投与による発現検討などの課題はあるものの、AAV-GLUT1 を用いた遺伝子治療は GLUT1DS における新規根治治療として有望であると考えた。

< 引用文献 >

[1] Ito Y, Takahashi S, Kagitani-Shimono K, Natsume J, Yanagihara K, Fujii T, Oguni H. Nationwide survey of glucose transporter-1 deficiency syndrome (GLUT-1DS) in Japan. *Brain Dev.* 37: 780-9, 2015.

[2] Fujii T, Ito Y, Takahashi S, Shimono K, Natsume J, Yanagihara K, Oguni H. Outcome of ketogenic diets in GLUT1 deficiency syndrome in Japan: A nationwide survey. *Brain Dev.* 38: 628-37, 2016.

[3] Kwiterovich PO Jr, Vining EP, Pyzik P, Skolasky R Jr, Freeman JM. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA.* 290: 912-20, 2003.

[4] 小澤 敬也. AAV を利用した遺伝子治療. *ウィルス.* 57: 47-56, 2007.

[5] Hwu WL, Muramatsu S, Tseng SH, Tzen KY, Lee NC, Chien YH, Snyder RO, Byrne BJ, Tai CH, Wu RM. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med.* 4: 134ra61, 2012.

- [6] Kojima K, Nakajima T, Taga N, Miyauchi A, Kato M, Matsumoto A, Ikeda T, Nakamura K, Kubota T, Mizukami H, Ono S, Onuki Y, Sato T, Osaka H, Muramatsu SI, Yamagata T. Gene therapy improves motor and mental function of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain*.142: 322-333, 2019.
- [7] Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T. Mutational and functional analysis of Glucose transporter I deficiency syndrome. *Mol Genet Metab*. 116: 157-62, 2015.
- [8] Nakamura S, Osaka H, Muramatsu SI, Takino N, Ito M, Aoki S, Jimbo EF, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T, Yamagata T. Gene therapy for a mouse model of glucose transporter-1 deficiency syndrome. *Mol Genet Metab Rep*.15;10:67-74, 2017.
- [9] Hwang DY, Ismail-Beigi F. Stimulation of GLUT-1 glucose transporter expression in response to hyperosmolarity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281: C1365-1372, 2001.
- [10] Tang M, Gao G, Rueda CB, Yu H, Thibodeaux DN, Awano T, Engelstad KM, Sanchez-Quintero MJ, Yang H, Li F, Li H, Su Q, Shetler KE, Jones L, Seo R, McConathy J, Hillman EM, Noebels JL, De Vivo DC, Monani UR. Brain microvasculature defects and Glut1 deficiency syndrome averted by early repletion of the glucose transporter-1 protein. *Nat Commun*. 8: 14152, 2017.

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

1. Nakamura S, Muramatsu S, Takino N, Ito M, Jimbo EF, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T, Yamagata T, Osaka H. Gene therapy for *Glut1*-deficient mouse using an adeno-associated virus vector with the human intrinsic GLUT1 promoter. *J Gene Med* 20: e3013, 2018. 査読有 .  
doi: 10.1002/jgm.3013.

### 〔学会発表〕(計3件)

1. 中村 幸恵、小坂 仁、山形 崇倫 . グルコーストランスポーター1欠損症(GLUT1DS)に対する遺伝子治療法開発 . 第121回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2018年4月20日~22日 .
2. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Takino N, Ito M, Jimbo EF, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T, Yamagata T. Gene therapy for *Glut1*-deficient mouse using AAV vector with the human intrinsic GLUT1 promoter. The 21st Annual Meeting of the American Society of gene and cell therapy (ASGCT). Chicago, IL, USA, May 16-19, 2018.
3. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Takino N, Ito M, Jimbo EF, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T, Yamagata T. Long-term recovery of *Glut1*-deficient mice by gene therapy using AAV vectors with GLUT1 promoter. 第60回日本先天代謝異常学会総会, 岐阜, 2018年11月8日~10日 .

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)