

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07859

研究課題名（和文）脳神経病変を標的とした異染性白質ジストロフィーの新規治療法（遺伝子治療）の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy (gene therapy) for metachromatic leukodystrophy

研究代表者

三宅 紀子 (Miyake, Noriko)

日本医科大学・医学部・テクニカルスタッフ

研究者番号：00421206

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：酵素補充療法はライソゾーム病において有望な治療法であるが、一般的に中枢神経変性を伴うライソゾーム病に対しては血液脳関門の存在が大きな障害となり有効な治療戦略が立てられていない。本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う、異染性白質ジストロフィー（MLD）の非侵襲的かつ安全な中枢神経疾患に対する長期の酵素補充療法が出来る革新的な治療法の開発を目的とする。我々は髄腔内投与による、成体MLDモデルマウスのAAVベクターを用いた治療実験を行い、中枢神経病変の改善を認めその有効性を報告。AAVベクターの静脈内投与と髄腔内投与では、髄腔内投与の方がより少ないベクター量で治療可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う、異染性白質ジストロフィーをモデルとし、非侵襲的かつ安全で中枢神経組織に長期の酵素補充療法が出来る治療法を開発を行った。髄腔内投与することにより、より少ないベクター量で中枢神経疾患への治療が可能になり、ライソゾーム病のみならず、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病などの様々な中枢神経病変を伴う疾患に応用が可能となると示唆された。

研究成果の概要（英文）：Enzyme replacement therapy is a promising treatment for lysosomal disease, but the presence of the blood-brain barrier is generally a major obstacle to effective treatment strategies for lysosomal disease associated with CNS degeneration. The aim of this study is to develop an innovative therapy for the non-invasive and safe long-term enzyme replacement therapy for CNS disease of metachromatic leukodystrophy (MLD), which is associated with extensive neurodegeneration throughout the brain.

We have reported the efficacy of intrathecal administration of AAV vectors in the treatment of an adult mouse model of MLD, showing improvement of CNS lesions, and confirmed that intrathecal administration of AAV vectors is more effective than intravenous administration of AAV vectors, requiring less vector.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 異染性白質ジストロフィー アデノ随伴ウイルス ライソゾーム病 中枢神経病変

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム酵素欠損症(以下ライソゾーム病)では、一般的に酵素補充療法の有効性が期待できるが神経変性を伴う疾患に対しては血液脳関門(blood brain barrier ; BBB)の存在が大きな障害となり、有効な治療戦略が立てられていない。本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う、異染色性白質ジストロフィー(metachromatic leukodystrophy ; MLD)の非侵襲的かつ安全で、中枢神経組織に対する長期の酵素補充療法が出来る革新的な治療法の開発を目的とする。近年申請者らは中枢神経症状を伴う新生児 MLD モデルマウスの治療法の確立に成功している。しかし、BBB が大きな障害となり成体マウスでの治療には未だ至っていない。治療用アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus ; AAV) ベクターの改善として BBB を通過可能な血清型、self-complementary AAV (scAAV)を用い、中枢神経病変の治療に最良のベクター選択を行う。そのベクターを用いて成体 MLD モデルマウスに静脈内投与または髄腔内投与を行い成体マウスでも治療可能な方法を確立する。また、これらの有効性を大型動物(サル)で検証し、安全性の評価も行い臨床応用を目指す。

## 2. 研究の目的

ライソゾーム病は、ライソゾーム内の加水分解酵素が遺伝的に欠損しているため糖脂質が蓄積する先天性代謝異常症である。1型(非神経型)ゴーシェ病やファブリー病など神経症状を伴わないライソゾーム病に対しては精製した欠損酵素を定期的に静脈注射する酵素補充療法の有効性が確認されている。しかし、アリルスルファターゼA(arylsulfatase A; ARSA)の欠損症である MLD のような神経変性を伴う疾患に対しては BBB の存在が大きな障害となり、有効な治療戦略が立てられていない。

我々は現在までに中枢神経症状を伴う MLD モデルマウスを対象に中枢神経症状を治療する方法として欠損酵素を発現する AAV ベクターの脳内直接注入(Kurai *et al.*, Mol. Ther. 2006)、髄腔内投与(Iwamoto *et al.*, J. Gene Med. 2009)を試みてきたが、直接注入法で脳全体を治療するためには広い領域について多量・頻回のベクター注入が必要であり、技術的にも倫理的にも臨床応用の可能性は低く、髄腔内投与では治療に十分な遺伝子導入効率を得るのは困難であった。近年申請者らは AAV ベクターを新生児に投与することにより脳神経組織に広範囲に遺伝子導入が可能であることを報告(Miyake *et al.*, Brain Res. 2011)しており、この研究成果を踏まえ、中枢神経症状を伴う新生児 MLD モデルマウスの治療法の確立(Miyake *et al.*, Gene Ther. 2014)に成功している。しかし、BBB が大きな障害となり成体マウスでの治療には未だ至っていない。本研究を進展させるにあたり、BBB がより成熟した成体での治療が可能か?また、マウスとヒトにおいては BBB の発達などに違いがあり、臨床応用するにあたり、ヒトでも中枢神経系の治療が可能であるか?の「問い」があげられる。本研究ではこれらの「問い」を解決すべく既存の治療用 AAV ベクターの改良を行い、成体 MLD モデルマウスの治療法の確立と、大型動物(サル)での有用性と、安全性の評価を行い臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

成体ではすでに BBB が形成されているために、既存のベクターの全身投与では神経症状を改善させる事は困難と考えられるので BBB を効率よく通過し治療効果を増強するために single stranded (ss)AAV9 or self-complementary (sc)AAV9 型 vector を作製し以下の項目を検討した。

(1) プロモータの改良：現在一般的に使われているCBAプロモータとCAGSプロモータをそれぞれEGFPを発現するベクターを作製し8週齢のマウスへ尾静脈投与を行い、脳内でのEGFP発現を比較検討する。

(2) BBB通過検討の評価：*in vitro*及び*in vivo*にて中枢神経病変の治療に最良のベクターの選択を行う。具体的にはssAAV9またはscAAV9ベクターが効果的にBBBを通過するかどうかを解析するために、*in vitro* BBBモデルシステムRBE-12 BBB Kit（ファーマコセル株式会社）を使用。このシステムは、ラット（Wistar rat）の脳毛細血管内皮細胞、脳周皮細胞、アストロサイトの3種類の細胞の初代培養と、トリプル共培養システムを用いて、*in vivo*でのBBBの特徴を示す。EGFP発現ssAAV9およびscAAV9ベクターを用いて、メーカーのプロトコルにしたがってBBBモデルに $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  vector genomes (vg)/cellで導入する。導入3日後に、導入効率と導入された細胞内のベクターゲノムを解析する。また、*in vivo*では8週齢のマウス尾静脈にssAAV9またはscAAV9ベクターを注入し、ベクター注入8週間後に脳内におけるEGFPの発現とベクターゲノムを解析する。

(3) 導入経路の探索：全身（静脈）投与及び髄腔内投与

8週齢のマウスへEGFP発現scAAV9ベクター $2 \times 10^{12}$  vgを全身投与、またはssAAV9ベクター $4 \times 10^{11}$  vgを髄腔内投与を行い発現効率の比較検討を行う。

(4) 大型動物（サル）での有用性と、安全性の評価：サルを用いて治療用AAVベクターの静脈投与、髄腔内投与を行い、脳神経組織における酵素活性、分布等を検討すると共に、血液検査による安全性の評価を行う。

#### 4．研究成果

(1) プロモータの改良

現在一般的に使われているCBAプロモータとCAGSプロモータの比較検討を行った。中枢神経以外の臓器（肝臓、心臓、腎臓）ではCBAプロモータの方が高い発現効率が見られたが、中枢神経内ではCAGSプロモータの方が、より強い発現を確認した。

(2) BBB通過検討の評価

*In vitro* BBBモデルシステムのアストロサイトへの導入効率を解析したところ、ssAAV9ではEGFP陽性細胞は検出されなかった。一方、scAAV9ではEGFP陽性細胞の効率的な導入が観察された。しかし、導入細胞のベクターゲノムを定量PCRにて解析したところ、ssAAV9導入アストロサイトとscAAV9導入アストロサイトの間に差は見られなかった。*In vivo*実験では、scAAV9導入で脳全体に効率的なEGFP発現が確認されたが、ssAAV9ではEGFP陽性細胞はほとんど観察出来なかった。しかし、定量PCR解析により、scAAV9導入マウスだけでなく、ssAAV9導入マウスの脳内でも効率的なベクターゲノムが検出されることがわかった。さらに、10倍量のssAAV9を注入したところ、中枢神経系でEGFP陽性細胞が観察された。

(3) 導入経路の探索

EGFP発現scAAV9ベクター $2 \times 10^{12}$  vgを全身投与するより、より少ないベクター量( $4 \times 10^{11}$  vg)のssAAV9ベクターを髄腔内投与した方が、脳内（特に小脳、脳幹）でEGFPの強い発現を確認した。

(4) 大型動物（サル）での有用性と、安全性の評価

サルの準備をしていたが、コロナ禍で移動制限、制約が出てしまい本課題の遂行は困難と判断し、次回への課題とした。

以上の検討により 9 型 AAV を用いて、CAGS プロモータを使用することにより、脳内で強い発現を確認できたので、我々は治療用遺伝子 (ARSA) を発現するベクターを作製し、MLD モデルマウスに髄腔内投与を行い治療効果の判定を行った。成体期に髄腔内投与することで、未治療群と比べて優位に、スルファチド蓄積の抑制、行動実験による改善を認め中枢神経症状の治療効果を確認した。 (Miyake *et al.*, Sci.Rep. 2021)

これらの事より髄腔内投与することで、より少ないベクター量で中枢神経疾患への治療が可能になり、ライソゾーム病のみならず、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病などの様々な中枢神経病変を伴う疾患に応用が可能になると示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsumoto T, Miyake K, Miyake N, Iijima O, Adachi K, Narisawa S, Millan JL, Orimo H, Shimada T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Treatment with bone maturation and average lifespan of HPP model mice by AAV8-mediated neonatal gene therapy via single muscle injection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev.	6. 最初と最後の頁 330-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2021.06.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Suzuki H, Shimada T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Treatment of adult metachromatic leukodystrophy model mice using intrathecal administration of type 9 AAV vector encoding arylsulfatase A.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99979-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 1.Miyake K, Miyake N and Shimada T.	4. 巻 3
2. 論文標題 A new method for in vivo targeted gene transfer into oligodendrocytes using adenoviral and HIV vectors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical J. of Sci. & Tec. Res.	6. 最初と最後の頁 31379-31385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26717/BJSTR.2021.39.006306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Haginiwa S, Sadahiro T, Kojima H, Isomi M, Tamura F, Kurotsu S, Tani H, Muraoka N, Miyake N, Miyake K, Fukuda K, Ieda M.	4. 巻 513
2. 論文標題 Tbx6 induces cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult mouse hearts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1041-1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.087.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Terada K, Miyake K, Yamaguchi H, Miyake N, Yamanaka K, Kojima S, Ito E, Inokuchi K, Okada T.	4. 巻 -
2. 論文標題 TERT and TERC mutations detected in cryptic dyskeratosis congenita suppress telomerase activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Lab Hematol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijlh.13176.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 松本 多絵, 三宅 紀子, 趙 東威, Mohammad Shadid, Eric Gaukel, 成澤 園子, Millan Luis Jos, 三宅 弘一
2. 発表標題 低ホスファターゼ症に対する新規治療法 (遺伝子治療薬: ARU-2801) の開発
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 多絵, 三宅 紀子, 趙 東威, Mohammad Shadid, Eric Gaukel, 成澤 園子, Millan Luis Jos, 三宅 弘一
2. 発表標題 低ホスファターゼ症に対する新規治療法 (遺伝子治療薬) の開発
3. 学会等名 第55回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shadid M, Gaukel E, Zhao D, Miyake N, Tanaka Y, Matsumoto T, Miyake K
2. 発表標題 Evaluation of efficacy and safety of a novel gene therapy drug (ARU-2801) for hypophosphatasia in non-human primates
3. 学会等名 Society for Endocrinology BES 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shadid M, Gaukel E, Zhao D, Tanaka Y, Miyake N, Matsumoto T, Miyake K
2. 発表標題 Validity and safety preclinical in vivo study of gene therapy for hypophosphatasia using ARU-2801 (AAV8 vector expressing TNALP-D10)
3. 学会等名 The 29th Annual Meeting of the European Society of Gene & Cell Therapy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shadid M, Gaukel E, Zhao D, Miyake N, Matsumoto T, Miyake K
2. 発表標題 Non-human primate in vivo study of ARU-2801, an investigational adeno-associated viral gene therapy intended for hypophosphatasia, shows durable transgenic plasma alkaline phosphatase levels are achievable without any toxicities
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2022 Annual Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 紀子, 三宅 弘一, 酒井 真志人, 島田 隆
2. 発表標題 異染性白質ジストロフィーの遺伝子治療
3. 学会等名 The 28th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 趙 東威, 松本 多絵, 三宅 紀子, Shadid Mohammad, Gaukel Eric, 成澤 園子, Millan Luis Jos, 三宅 弘一
2. 発表標題 低ホスファターゼ症に対する遺伝子治療薬 (ARU-2801) の有効性及び安全性の検討
3. 学会等名 The 28th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 Miyake N, Sakai A, Yamamoto M, Miyake K
2 . 発表標題 Safety and efficacy of intrathecal administration of type 9 AAV vector encoding arylsulfatase A in adult metachromatic leukodystrophy model mice.
3 . 学会等名 25th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Matsumoto T, Miyake N, Zhao D, Narisawa S, Millan JL, Miyake K
2 . 発表標題 Successful adeno-associated virus mediated neonatal gene therapy treatment of hypophosphatasia murine model resulted in bone maturation and increased survival to at least 18 months
3 . 学会等名 Society for Endocrinology BES 2021, ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Matsumoto T, Miyake K, Miyake N, Narisawa S, Millan JL
2 . 発表標題 Successful adeno-associated virus mediated neonatal gene therapy treatment of a murine model of infantile hypophosphatasia resulted in bone maturation and increased survival to at least 18 months
3 . 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2021 Annual Meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Noriko Miyake, Koichi Miyake, Motoko Yamamoto, Takashi Shimada, Takashi Okada
2 . 発表標題 Direct comparison between single-stranded and self-complementary type 9 AAV vector to treat adult MLD model mice by intravenous injection
3 . 学会等名 The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy
4 . 発表年 2018年



1. 発表者名 Tsutomu Igarashi, Kazuhisa Takahashi, Koichi Miyake, Maika Kobayashi, Chiemi Yaguchi, Noriko Miyake, Shuhei Kameya, Hiroshi Takahashi, Takashi Okada
2. 発表標題 Intravitreal injection of AAV vector in cynomolgus monkeys affects neutralizing antibody titer against AAV in the serum
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Miyake K, Miyake N, Shimada T.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 InTech	5. 総ページ数 9
3. 書名 Neonatal Gene Therapy for Inherited Disorders. Selected Topics in Neonatal Care.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三宅 弘一  (Miyake Koichi)  (90267211)	日本医科大学・医学部・教授   (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------