

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18970

研究課題名（和文）低ホスファターゼ症に対する新規胎児遺伝子治療の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel fetal gene therapy for hypophosphatasia

研究代表者

高橋 有希（Takahashi, Aki）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30778626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 麻酔下に、胎齢15日から18日の母体マウスを開腹し、子宮膜上から作製した AAV-eMCK-ALPを胎仔の腹腔内に投与し、胎児治療を行った。その結果、治療したHPPモデルマウスは正常な体重増加が生じ、痙攣発作をなく、未治療HPPモデルマウスと比較し、治療マウスは大幅に生存率が改善した。また、血清ALP活性の上昇および大腿骨の形態不整の改善が確認された。さらに、AAVベクターの分布を確認したところ、腹腔膜および筋肉で高発現しており、肝臓などではあまり発現していないことが分かった。次に母体の観察を行ったところ、特に異常は確認されず、仔マウス離乳後に再度、妊娠および出産が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のHPP治療法は開始時期が出生後であるため、胎生期に症状が進行し、死産となる症例がある。安全な胎児遺伝子治療法の確立は、このような重症例の患者を治療することができ、臨床において非常に重要な意義をもつと考える。また、遺伝子診断技術の発展により、診断可能な遺伝病は増えている。しかし、治療法がないために人工妊娠中絶を選択する症例も多い。安全性が確認された胎児遺伝子治療法の確立は、HPPのみならず、他の重篤な遺伝病における治療の可能性が期待でき、臨床において大きな意義をもつ。さらに、胎児は血液脳関門や硬組織の形成が不十分であるため、治療酵素が行しやすい。そのため、投与量の減量が可能である。

研究成果の概要（英文）： Under anesthesia, laparotomy was performed on maternal mice on days 15 to 18 of pregnancy, and AAV-eMCK-ALP prepared from the uterine membrane was intraperitoneally administered to fetuses for treatment. As a result, the treated HPP model mice developed normal weight gain, did not develop seizures, and the survival rate of treated mice was greatly improved compared to untreated HPP model mice. In addition, the increase in serum ALP activity and the improvement in malformation of the femur were confirmed. Furthermore, when the distribution of the AAV vector was confirmed, it was found to be highly expressed in the peritoneal membrane and muscle, but not so much in the liver.

When the maternal body was then observed, no particular abnormalities were confirmed, and pregnancy and childbirth were possible again after weaning offspring.

研究分野： 先天性の硬組織系統疾患の病態評価、治療実験

キーワード： 低ホスファターゼ症 胎児治療 遺伝子治療 アルカリホスファターゼ 骨系統疾患

1. 研究開始当初の背景

低ホスファターゼ症 (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、血中のアルカリホスファターゼ (ALP) 濃度が低下し、硬組織の石灰化不全、呼吸困難、痙攣発作、乳歯の早期脱落を主徴とする遺伝性疾患である。発生頻度は海外において 10 万人に 1 人とされている一方で、日本では欧米に比べ高い頻度で発生することがわかっている。その理由として、日本人特有の *TNALP* 遺伝子変異である 1559 番目の塩基 T 欠失の保因者頻度が一般人口の約 1/500 の頻度でみられるためである。

発症時期、症状により六病型 (周産期重症型・周産期良型・乳児型・小児型・成人型・歯限局型) に分類され、特に本邦では致死性の周産期重症型や乳児型の頻度が高く、2015 年に小児慢性特定疾患に加えられた。現在、治療薬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しなければならず、また身体的負担や高額な医療費が課題である。さらに、出生前診断が可能にもかかわらず、治療開始時期が出生後となるため、胎生期に症状が進行し、死産ないしは出生直後に死亡する症例もある。

したがって、安全性を確立した新規胎児遺伝子治療法の開発が急務である。

2. 研究の目的

現在の治療法では、胎生期に症状が進行する本疾患には対応できない。一方で、組織非特異的プロモーターによる胎児遺伝子治療は、ウイルスベクターにより遺伝子導入されたすべての臓器で酵素が過剰に発現するため、主要臓器への影響や生殖細胞への影響など安全面での課題が残されている。

そこで本研究では、標的臓器に長期安定して酵素供給ができ、治験で安全性が確認されている筋肉に限定した遺伝子発現の下、胎児遺伝子治療法を検討することで、安全性を確立した新規胎児遺伝子治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 強力な筋特異的プロモーター制御アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの構築

本研究ではすでに報告した筋特異的プロモーターである筋肉クレアチンキナーゼ (MCK) プロモーターをさらに強力なものに変更 (eMCK プロモーター) し、eMCK プロモーター制御下に EGFP を発現するように構築した AAV ベクターの作製を行った。マウス横紋筋細胞である C2C12 に作製した AAV ベクターを投与し、筋特異性が保たれているか確認した。筋特異性が保たれていることを確認した後、治療用遺伝子 ALP を発現するように構築した AAV ベクターの作製 (AAV-eMCK-ALP) を行い、治療実験に移行した。



図1 手術手技説明

(2) 新規胎児遺伝子治療法による治療効果の確認と安全性の評価

麻酔下に、胎齢 15 日から 18 日の母体マウスを開腹し、子宮膜上から作製した AAV ベクターを胎仔の腹腔内に投与し、吸収糸にて縫合した。体重測定、痙攣発作発生の有無および生存率の評価を行い、治療効果を検証する。また、20 日齢および 160 日齢で採血および主要臓器、大腿骨の摘出を行った。血清 ALP 活性測定および主要臓器より DNA を抽出し、ベクター検出用 qPCR を用いてその分布を検証した。さらに、硬組織形成不全の治療効果の検証を行うために、マイクロ CT 撮影および組織学的解析を行った。

(3) 新規胎児遺伝子治療法による母体の安全性の評価

出産時および出産直後の母体の様子を観察し、異常がないか評価した。また、仔マウス離乳後に再度交配をかけ、再妊娠・出産が可能であるか、産まれた新たな仔マウスに前回の投与 AAV ベクターが検出されるか否か検証した。

4. 研究成果

(1) 組織非特異的プロモーターである CAG プロモーターを改変した eMCK プロモーター制御下に EGFP を発現するように構築した AAV ベクターを作製した。マウス横紋筋細胞である C2C12 およびコントロールとして子宮頸がん細胞である HeLa 細胞に作製した AAV ベクターを投与した。その結果、eMCK プロモーターは、C2C12 細胞で EGFP を高発現させ、HeLa 細胞ではあまり発現しなかった。このことから、eMCK プロモーターは筋特異性が保たれてい

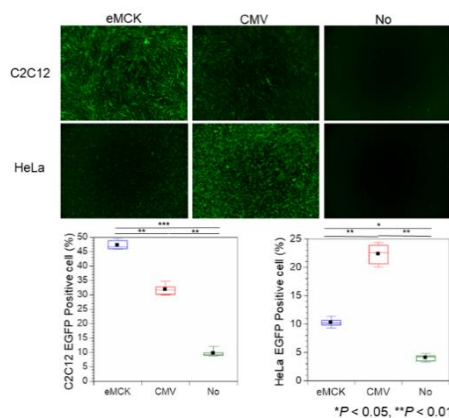


図2 eMCKプロモーターの筋特異性

ることが分かった。

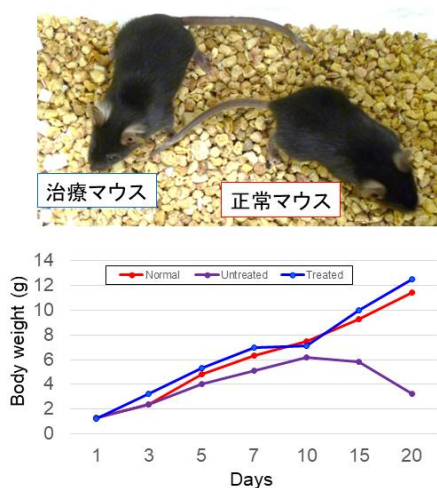


図3 正常な体重増加

(2) 作製した eMCK プロモーター制御下に ALP を発現するように構築した AAV ベクターを胎齢 15 日~18 日の胎仔の腹腔内に投与した。治療した HPP モデルマウスは正常な体重増加が生じ、痙攣発作を起こすこともなく、毛並みもよく健康であった。未治療 HPP モデルマウスと比較し、治療マウスは大幅に生存率が改善した。20 日齢で採血を行った後にサンプリングを行い解析した結果、血清 ALP 活性の上昇および大腿骨の形態不整の改善が確認された。また、投与した AAV ベクターの分布を確認したところ、腹腔膜および筋肉(大腿四頭筋)で高発現しており、肝臓などではあまり発現していないことが分かった。このことにより、筋肉に限定した遺伝子発現の下、正常な体重増加、延命効果および大腿骨の形態不整の改善が可能であることを示している。

(3) 当初は三種混合麻酔下に手術を行っていた。しかし、三種混合麻酔では体温の低下が起り、母体死亡もしくは胎児死亡が多かった。そこで麻酔薬をイソフルラン 2% 吸入麻酔に変更した。次に、手術後に探索行動の異常増加および摂食量の減少が、また出産後に育児放棄が確認されたため、手術直後に非ステロイド性消炎・鎮痛剤であるリマダイル注射液を皮下投与することとした。以上 2 点を変更した結果、出産時および出産直後の母体の様子が変わったところはなく、正常に子育てをしていることが確認された。母体マウスは仔マウス離乳後に再度、妊娠および出産が可能であった。また、その次世代仔マウスの各種臓器をサンプリングし、DNA を抽出後にベクター検出用 qPCR を用いてその分布を検証した結果、どの臓器からもベクター分布は検出されなかった。



図4 正常な子育ての確認

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aki Nakamura-Takahashi, Toshiki Tanase, Satoru Matsunaga, Seikou Shintani, Shinichi Abe, Yuko Nitahara-Kasahara, Atsushi Watanabe, Yukihiro Hirai, Takashi Okada, Akira Yamaguchi, Masataka Kasahara	4. 巻 106
2. 論文標題 High-Level Expression of Alkaline Phosphatase by Adeno-Associated Virus Vector Ameliorates Pathological Bone Structure in a Hypophosphatasia Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 665-677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00223-020-00676-5	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Aki Nakamura-Takahashi
2. 発表標題 Gene therapy for hypophosphatasia
3. 学会等名 the 312th Annual Meeting of Tokyo Dental College (Asian Rising Star Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋有希、棚瀬稔貴、松永 智、阿部伸一、新谷誠康、笠原正貴
2. 発表標題 低ホスファターゼ 症における石灰化不全改善のための新規治療法の開発
3. 学会等名 第307回東京歯科大学学会・例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Tanase, Aki Nakamura-Takahashi, Yuko Nitahara-Kasahara, Atsushi Watanabe, Takashi Okada, Seikou Shintani, Masataka Kasahara
2. 発表標題 Therapeutic effects on the mandibular bone and teeth of hypophosphatasia by high levels expression of alkaline phosphatase via gene therapy
3. 学会等名 International Association of Paediatric Dentistry 27th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋有希、棚瀬稔貴、笠原優子、松永 智、渡邊 淳、平井幸彦、阿部伸一、新谷誠康、笠原正貴、岡田 尚巳
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクターによるALP遺伝子高発現は低ホスファターゼ症の大腿骨石灰化不全を改善する
3. 学会等名 第13回ALPS研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚瀬稔貴、高橋有希、新谷誠康、笠原正貴
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクターによるALP遺伝子の 高発現は低ホスファターゼ症モデルマウスの歯の石灰化不全を改善する
3. 学会等名 第34回日本小児歯科学会関東地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋有希、棚瀬稔貴、松永 智、阿部伸一、新谷誠康、笠原正貴
2. 発表標題 低ホスファターゼ症における石灰化不全改善のための新規治療法の開発
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚瀬稔貴、高橋有希、新谷誠康、笠原正貴
2. 発表標題 重症乳児型低ホスファターゼ症の顎骨および歯に対するTNALP高発現遺伝子治療
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚瀬稔貴、高橋有希、新谷誠康、笠原正貴
2. 発表標題 8型アデノ随伴ウイルスベクターによるALP遺伝子の高発現は低ホスファターゼ症モデルマウスの歯の形態不整を改善する
3. 学会等名 第308回東京歯科大学学会・例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋有希
2. 発表標題 低ホスファターゼ症の遺伝子治療
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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

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