

アデノ随伴ウイルスによる小児期遺伝性疾患治療

～ 適応疾患拡大を目指して～

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学医学部 小児科学 教授

研究協力者 中村幸恵¹、青木志保¹、村松慎一²、山形崇倫¹

¹自治医科大学小児科学、²神経内科学

研究要旨

小児期遺伝性疾患は、機能喪失により発症する疾患が多く、原因蛋白の発現増加により機能回復を見るため、ウイルスベクター治療の良い適応となる。AADC 欠損症に引き続き AAV 治療対象を拡大するためグルコーストランスポーター1 型欠損症（GLUT1DS）の治療研究を行い、*Glut 1 (SLC2A1)* の一過性発現により細胞膜表面での細胞内局在を確認し、糖取込試験では、細胞内糖取り込みが上昇し、取り込み能と重症度との間に相関関係を認め、糖輸送評価系を確立した。また 9 型 AAV- SLC2A1 ベクターを作製し、Glut1 (+/-)への腹腔内投与を行い、脳内での SLC2A1 蛋白発現を確認した。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は 100 例前後と希少で種類が多い疾患からなり、Glut1 欠損症を初めとする膜蛋白（トランスポーター、受容体等）の治療法の確立により更に多くの患者の治療が可能になる。

A . 研究目的

近年の次世代シーケンス解析等により、遺伝子診断される小児遺伝性神経疾患例が飛躍的に増えてきている。しかしながら原因が判明しても大多数の疾患には対症療法のみしか存在せず、根本的治療は確立されていない。小児遺伝性神経疾患は、対象患者は数百人からなる数百種の“希少性難病”より構成されている。これらの希少難病は、劣性遺伝形式をとり、機能欠失で発症する場合が多い事にある。この点で優性遺伝形式をとり、変異による細胞毒性が年余に渡り蓄積し発症する成人発症の遺伝性疾患と比較した特徴である。これらの優性遺伝性疾患では、詳

細な病態の解明の上で細胞毒性を軽減させる治療法の開発が必要である。アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）は遺伝性疾患治療において、現在最も有望視されている遺伝子治療のベクターであり、本研究班では、AAV ベクターを用いたアミノ酸脱炭酸酵素欠損症； Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)欠損症での、遺伝子治療臨床研究を進めている。AAV ベクターによる遺伝子導入は現在治療法の存在しない多くの小児難治性遺伝性疾患患者および家族にとり、大きな希望となっている。この治療法を、今後多くの患児に行うためには、AADC 欠損症に加え、

新たな対象疾患の拡大が必要である。現在私達は、治療のモデルとしてグルコーストランスポーター 1 型欠損症 (Glucose transporter 1 deficiency syndrome, GLU1DS) 治療研究を細胞レベル、動物モデルで行った。

B . 研究計画・方法 (概要)

1) ヒト培養細胞への SLC2A1 導入

HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞) に SLC2A1 正常型および SLC2A1 変異体ベクター、を用いて遺伝子導入する。変異体ベクターは、ミスセンス変異の 2 種類 (A405D; 軽症、R333W; 中等症)、フレームシフト変異 1 種類 (V303fs; 重症) を作成する。それぞれの変異に対応するオリゴヌクレオチドを作成し、アニーリングの後、制限酵素反応およびライゲーションで発現ベクターに組み込む。フレームシフト変異は患者 cDNA より RT-PCR 法により合成する。作成したプラスミドをリポフェクタミン法により一過性発現させ、得られたタンパク発現確認は anti c-myc Ab. (9E10; Santa Cruz Biotechnology)、anti GLUT1 Ab. (N-terminus; OriGene Technologies) を用いて免疫染色およびウェスタンブロットによる蛋白の検出を行う。

2) ヒト神経系培養細胞への AAV9-SLC2A1 導入

SLC2A1 遺伝子をインサート DNA として、経静脈投与で脳移行が確認されている 9 型 AAV ベクター (AAV9) に組み込む。ヒト神経系培養細胞である SH-SY5Y 細胞 1×10^5 cell に AAV9-SLC2A1 (myc-DDK タグ付) を 3×10^9 vg 感染させ免疫染色を行う。

3) Glu1(+/-)への AAV9-SLC2A1 導入

ウイルスベクターの投与経路として、経

静脈投与もしくは髄腔内/脳室内投与の比較検討をおこなう。GLUT1 は、赤血球や脳の血管内皮細胞、神経細胞に発現を認める。今回ニューロン特異的プロモーターであるシナプシン 1 プロモーターを用い神経細胞で発現効率を上げる。

生後 1 週間前後の新生児マウスは、乳幼児に対応し、脳血液関門の脆弱性があり、腹腔内投与でも薬剤が高率に脳移行するため、日齢 7 にヘテロマウス Glut1 (+/-) に AAV9-SLC2A1 1.5×10^{10} vg 腹腔内投与する。

(倫理面への配慮)

研究実施にあたって、自治医科大学遺伝子解析研究倫理委員会、自治医科大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得た。

C . 研究結果

1) ヒト培養細胞への SLC2A1 導入

一過性発現後の細胞を用いたウェスタンブロット法にて、正常型およびミスセンス変異を有する SLC2A1 の発現を確認した。免疫染色では、SLC2A1 正常型およびミスセンス変異で細胞膜近傍に myc 染色陽性を確認した。フレームシフト変異では、ウェスタンブロットティングおよび免疫染色法いずれもタンパク発現はみられず、蛋白が安定せず小胞体で分解していることが考えられた。また GLUT の細胞内の糖取込み機能を 2-デオキシグルコース (2DG) 取込試験で評価した。SLC2A1-正常型、ミスセンス変異、フレームシフト変異、コントロールベクター導入細胞の順に糖取込み能は低下しており重症度との相関を認めた。

2) ヒト神経系培養細胞への AAV9-SLC2A1 導入

AAV9-SLC2A1 を導入した SH-SY5Y 細胞

膜近傍に SLC2A1 の発現を確認した。

3) Glu1+/-1 への AAV9-SLC2A1 導入

生後 6 週で、脳組織を採取し採取した脳組織で免疫染色 (anti-GLUT1, anti-myc-tag)、ウェスタンブロット法 (anti-GLUT1, anti-myc-tag) でタンパク発現確認を行ったところ ~ 1 % の中枢神経細胞で発現を認めた。

D . 考察

SLC2A1 遺伝子導入による、糖輸送機能の獲得を、2DG 取込試験で評価する系を作成した。GLUT1DS の重症度と関連しており、GLUT1 の機能評価として適切であることが示された。また Glu1 KO マウス、Glu1(+/-) に AAV-SLC2A1-9 を腹腔内に投与したところ、脳内での発現を確認した。導入効率が低いため、今後は脳室内投与を行い、導入効率や Glu1(+/-) に認められる、失調症状、小頭症等の臨床症状の改善が認められるか観察する。

E . 結論

AADC 欠損症に対する遺伝子治療を国内における難治性神経疾患のさきがけとして、更に治療対象を拡大するため GLUT1DS を対象とした研究を行っている。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は 100 例前後 (希少で) の数多くの (種類の多い) 疾患からなる。AADC のように発現が、脳内の基底核に限られた疾患は、少なく、GLUT1DS のように、欠損蛋白が、広く脳内に分布するものが多いため、GLUT1DS の治療法の確立により、多くの適応疾患 ; 膜受容体・キャリア蛋白、またライソゾーム病、ミトコンドリア病、ペルオキシゾーム病などの細胞内小器官の遺伝性神経難病への AAV 治療の応用拡大を目指すことが可能となり、結果として多くの小児遺伝性疾患患者・家

族にとって待ち望んだ根本治療を提供することになる。

F . 健康危険情報
特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol.* 2014;50:99-100.

2. 学会発表

1) Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T.: Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome. 第 64 回アメリカ人類遺伝学会 2014.10.18-22 サンディエゴ

H . 知的所有権の取得状況

なし。