

## 脳クレアチン欠乏症候群の病態解明に対する研究

分担研究者 小坂仁 自治医科大学小児科 教授

### 研究要旨

近年アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が、様々な遺伝性疾患の治療として用いられている。現在有効な治療法のないクレアチントランスポーター欠損症も、この治療対象となることが考えられる。昨年度に引き続き小児期発症のトランスポーター疾患である、グルコーストランスポーター1型欠損症（GLUT1DS）の治療研究を行った。9型 AAV- SLC2A1 ベクターを作製し、Glut1 (+/-)への脳室内投与を行い、脳内での SLC2A1 蛋白発現を確認し、髄液糖の上昇と症状軽減を確認した。

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の多い疾患からなり、Glut1欠損症の治療成功は同様の膜蛋白（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。

研究協力者 中村幸恵 自治医科大学小児科

### A．研究目的

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、血清型1-9型よりなるが、2型、9型は特に中枢神経系への移行性が高く、また多くの小児は既に感染しているが、症状を示さない。また長期の安定性や、免疫原性の少なさから全身投与ではサイトカインストームを起こすことがあるが、髄腔内投与では見られないため、特に小児中枢遺伝性疾患の治療に適している。脊髄性筋萎縮症Ⅰ型の患者では既にPhaseⅠとして遺伝子治療が15例に試みられ、ほとんどの患者で座位を獲得し、補助呼吸や経管栄養が回避されており、自然歴との大きな違いは明らかである。また自治医科大学では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行っており、5例で安全性と有効性を確かめた。クレアチントランスポーター欠損症に対してもAAVベクターを用いた遺伝子治療が有効と考えるが、既に国内での疫学調査が済んでいるグルコーストランスポーター1型欠損症(Glucose transporter 1 deficiency syndrome, GLUT1DS)治療研究を本年度は、動物モデルで行い、この治療を成功させることで、今後クレアチントランスポーター欠損症に適応することを目指す。

### B．研究計画・方法（概要）

今年度は、AAV9-hSLC2A1を、GLUT1+/-マウス(6週齢)の両側側脳室にAAV9-hSLC2A1(合計1.85 x 10<sup>10</sup> vg)を注入し、脳における遺伝子導入によるGLUT1の発現および治療効果を検討した。

### C．研究結果

マウス大脳から抽出したRNAを抽出後、RT-PCRにより脳室内投与におけるmRNAの発現を確認した。また外因性GLUT1をウエスタンブロッティングにて確認することができた。組織免疫染色では、GLUT1陽性細胞は、刺入経路の周辺組織に沿って側脳室周辺の大脳皮質および海馬に強発現していた。共焦点レーザー顕微鏡にて、発現細胞の細胞種を検索したところ、外因性のGLUT1陽性細胞は、神経細胞のマーカーであるβ-III-Tubulin陽性であり、アストロサイトのマーカーであるGFAPや、血管内皮細胞のマーカーであるCD31は陰性であり、神経細胞特異的な発現を確認した。Rota-rod testでは、治療後4週である10週齢で、GLUT1+/-マウスの円筒滞在時間が、脳室内投与後改善傾向が認められた。また臨床応用で用いられる、タグ無AAV9-hSLC2A1を作製し、同様に脳室内投与後4週のRota-rod testを行ったところ、有意な改善を認めた。

### D．結論

GLUT1DS モデルマウスに対して、AAV ベクターを用いたマウスモデルの治療に成功した。クレアチントランスポーター欠損症も、同様に形質膜に存在するトランスポーターであり、根本治療は可能であると考えられる。

## E . 研究発表

### 1 . 論文発表

1. Sakamoto S, Monden Y, Fukai R, Miyake N, Saito H, Miyauchi A, et al. A case of severe movement disorder with GNAO1 mutation responsive to topiramate. *Brain Dev.* 2017;39(5):439-443.
2. Omata T, Nagai J, Shimbo H, Koizume S, Miyagi Y, Kurosawa K, et al. A splicing mutation of proteolipid protein 1 in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Dev.* 2016;38(6):581-4.
3. Nakashima M, Takano K, Tsuyusaki Y, Yoshitomi S, Shimono M, Aoki Y, et al. WDR45 mutations in three male patients with West syndrome. *J Hum Genet.* 2016;61(7):653-61.
4. Nakashima M, Kouga T, Lourenco CM, Shiina M, Goto T, Tsurusaki Y, et al. De novo DNMT1 mutations in two cases of epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2016;57(1):e18-23.
5. Miyauchi A, Monden Y, Osaka H, Takahashi Y, Yamagata T. A case of anti-NMDAR encephalitis presented hypotensive shock during plasma exchange. *Brain Dev.* 2016;38(4):427-30.
6. Miyake N, Abdel-Salam G, Yamagata T, Eid MM, Osaka H, Okamoto N, et al. Clinical features of SMARCA2 duplication overlap with Coffin-Siris syndrome. *Am J Med Genet A.* 2016;170(10):2662-70.
7. Kondo T, Funayama M, Miyake M, Tsukita K, Era T, Osaka H, et al. Modeling Alexander disease with patient iPSCs reveals cellular and molecular pathology of astrocytes. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):69.
8. Inaguma Y, Matsumoto A, Noda M, Tabata H,

Maeda A, Goto M, et al. Role of Class III phosphoinositide 3-kinase in the brain development: possible involvement in specific learning disorders. *J Neurochem.* 2016;139(2):245-55.

9. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Kuhara T, Shibata T, Kobayashi K, et al. SSADH deficiency possibly associated with enzyme activity-reducing SNPs. *Brain Dev.* 2016;38(9):871-4.

### 2 . 学会発表

1. Sachie Nakamura, Hitoshi Osaka, Shinichi Muramatsu, Naomi Takino, Shiho Aoki, Eriko F. Jimbo, Kuniko Shimazaki, Tatsushi Onaka, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki, Takanori Yamagata. : Gene therapy for a mouse model of glucose transporter-1 deficiency syndrome. 第58回日本小児神経学会学術集会イングリッシュセッション, 2016.6.2, 東京.
2. 小坂 仁, 中村幸恵, 神保恵理子, 村松慎一, 山形崇倫. : シンポジウム 14 : 小児神経疾患に対する遺伝子治療の幕開け— AADC 欠損症を中心に—アデノ随伴ウイルスがひらく遺伝性神経疾患治療. 第58回日本小児神経学会学術集会, 2016.6.3, 東京.