

氏 名	黒川愛恵
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 629 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	AAV ベクターを用いた Niemann-Pick 病 C 型の遺伝子治療の開発
論文審査委員	(委員長) 遠藤 仁 司 教授 (委員) ト部 匡 司 講師 瀬原 吉 英 講師

論文内容の要旨

1 研究目的

Niemann-Pick 病 C 型 (NPC) は、主に NPC1 遺伝子異常により全身に遊離型コレステロールや糖脂質が蓄積し、神経系を中心に症状を呈する難治性疾患で、現在根本的治療法はない。NPC は神経症状発現時期により、乳児早期型、乳児後期型、若年期型、青年期/成人期の 4 つに分類される。乳児早期型は重度肝障害と神経症状、乳児後期型と若年期型は神経症状、青年期/成人期型は神経・精神症状が主体となる。当研究室ではアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて AADC 欠損症の遺伝子治療臨床研究や GLUT1 欠損症に対する遺伝子治療法開発研究を進め、AAV を用いた遺伝子治療の有効性と安全性を確認している。治療対象疾患の拡大を目指し、*Npc1* 欠失型モデルマウスを用いた遺伝子治療の開発研究に着手しその効果を検討した。

2 研究方法

Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より FVB.C-*Npc1*^{m1N}/J (Stock#021755、*Npc1* 欠失) のヘテロ型 (*Npc1*^{+/-}) マウスを購入し、交配させてホモ欠失型 (*Npc1*^{-/-}) マウスを得た。無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの餓死を防ぐため、生後 9 週以降ゼリー状の餌を与えた。一方で、マウスを AAV 治療群 *Npc1*^{+/-}, *Npc1*^{-/-}, 生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-}, 無治療群 *Npc1*^{-/-}, 無治療でゼリー状の餌を与えない群 *Npc1*^{-/-} の 5 つに分けた。また、本学神経遺伝子治療部門と共同でチロシン変異型 AAV 9/3 - CMV - GFP およびチロシン変異型 AAV 9/3 - CMV - *hNPC1* ベクターを作製した。生後約 4 日のマウスの左側脳室に 5 μ L, 大槽に 10 μ L の計 15 μ L の上記 AAV-GFP ベクター (力価 2.6x10¹⁰ vg/ μ L) および AAV-*hNPC1* ベクター (力価 1.8x10¹⁰ vg/ μ L) を 2 倍希釈し、それぞれ計 1.95x10¹¹ vg、計 1.35x10¹¹ vg を注入した。コントロールとして同部位に同量の生理食塩水を注入した。効果の評価方法として、quantitative real-time PCR (qPCR) を用いた AAV-*hNPC1* ベクターゲノム DNA 量測定、reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いた *hNPC1* mRNA の発現解析、Kaplan-Meier 曲線を用いた生存解析、体重測定、rotarod 試験を用いた運動機能解析、抗カルビンジン抗体および hoechst を用いた免疫組織染色による小脳 Purkinje 細胞の確認、filipin 染色による肝臓での非エステル化コレステロールの蓄積確認を実施した。

3 研究成果

AAV-GFP を左側脳室と大槽に注入した *Npc1*^{-/-} マウスでは、小脳や脳幹を含む脳全体で広範囲に GFP の発現を確認した。qPCR でベクターゲノム DNA は脳幹や脊髄を含め広範囲の中樞神経系と肝臓で検出された。RT-PCR で *hNPC1* mRNA は AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} の脳、肝臓、肺、心臓で検出された。生存期間は、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの中でも生後 9 週以降にゼリー状の餌を給餌した群では 20-25 日間延長し、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスではさらに約 105 日間の延長が得られ、最長生存期間は 310 日間だった。体重変化は、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスがいずれも生後 7 週以降で急激な体重減少をしたのに対し、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは生後 15 週まで体重は増加し続け、その後緩徐に減少した。Rotarod 試験ではいずれの無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスも生後 5 週の測定開始時点から急激に運動機能が落ち、全マウスが生後 10 週で測定不能となったが、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスは測定開始時点で *Npc1*^{+/+} マウスとほぼ同値の成績で、生後 8-9 週でも有意差を認めなかった。その後も長期に運動機能は維持されたが、経時的に低下した。組織学的解析として実施した生後 11 週時点での小脳の抗カルビンジン抗体染色では、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは Purkinje 細胞がほとんど脱落していたが、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは多くの Purkinje 細胞や線維の残存を確認した。また、肝臓の filipin 染色では無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスで陽性となる非エステル化コレステロールの蓄積が顕著に見られたが、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは染色強度が弱まっていた。

4 考察

本研究では、チロシン変異型 AAV9/3 ベクターを左側脳室と大槽に注入することで小脳や脳幹・脊髄を含む広範な中枢神経領域に遺伝子導入がされることが示された。NPC に対する遺伝子治療の効果を上げるためには、特に小脳と脳幹を含む中枢神経系のきる限り多くの細胞へで遺伝子導入することが求められる。NPC に対する遺伝子治療の既報告が 3 報あり (Xie C, et al. *J Lipid Res.* 2017, Chandler RJ, et al. *Hum Mol Genet.* 2017, Hughes MP, et al. *Hum Mol Genet.* 2018) それぞれ異なるプロモーターを用い、全身あるいは側脳室投与で実施している。本研究は、それらの報告よりも良い治療成績が得られたが、その理由として広汎な領域に遺伝子導入出来たためと考えられる。本研究では血液脳関門を通り中枢神経の遺伝子治療開発に広く用いられている AAV9 ベクターを選択したが、さらに中枢神経系への遺伝子導入が強化されたことが報告されているチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを用いた。また、投与経路を左側脳室と大槽の両方としており、その結果小脳や脳幹、脊髄を含む広範囲での発現を得た。ベクターゲノム DNA の qPCR および *hNPC1* mRNA の rt-PCR でも広範囲での発現を確認できており、小脳 Purkinje 細胞の脱落に改善が見られたことから裏付けされる。また、中枢神経系に注入したベクターが血液脳関門を通り全身にも移動し肝や肺などの臓器にも遺伝子が導入されたことも確認した。肝臓での filipin 染色では無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスと比較して AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは染色強度が弱まっており、治療効果が得られている。しかし、本研究での治療効果には制限があり、より良い効果を得るためには乳児型などでは全身投与などの追加が必要になるかもしれない。AAV ベクターにより導入されたゲノムは、非ヒト霊長目モデルの脳へ導入した遺伝子の発現が 15 年間確認された報告もあり (Sehara Y, et al. *Hum Gene Ther.* 2017)、非分裂の神経細胞では長期に維持されると考えられる。十分な数の神経細胞に遺伝子導入ができれば、治療を受けた患者が自然寿命を

全うできることも期待でき、本研究結果は患者への治療として将来有望である。

5 結論

Npc1 欠失型モデルマウスに対する AAV9 ベクターを用いた遺伝子治療は、広範囲の中枢神経および肝臓等の全身臓器に遺伝子が導入され、生存期間の延長、体重の維持、rotarod 試験の成績改善、小脳 Purkinje 細胞の維持、そして肝臓での非エステル化コレステロール蓄積の改善を得た。根本的治療法のない NPC 患者に対して AAV9 ベクターを用いた遺伝子治療は、新規治療法として確立することが目前である。

論文審査の結果の要旨

本論文は、NPC1 遺伝子を欠損した Niemann-Pick 病 C 型モデルマウスを用いた、AAV9 ベクターによる遺伝子治療法の開発に関する研究である。本研究では、中枢神経系への遺伝子導入が強化されたことが報告されているチロシン変異型 AAV9/3 をベクターとして使い、CMV プロモーターを連結したヒト NPC1 遺伝子を、投与経路として左側脳室および大槽へ投与した。その結果、小脳、脳幹、脊髄、肝臓を含む広範な遺伝子導入と発現、生存率の増加および rotarod 等の運動機能の改善を示した。また、病理組織学的解析では、小脳 Purkinje 細胞の脱落の改善や、肝臓での filipin 染色による非エステル化コレステロール蓄積の改善を明らかにした。本論文は、使用ベクター、プロモーター、投与経路などを検討し、既報に比べ高い治療効果を示した点で評価できる、有用性の高い論文である。

論文においては、AAV ベクターの標的する細胞特異性や、ベクターゲノムの定量性と mRNA 発現量の乖離についての考察、陽性コントロールの設定についての指摘があった。具体的な訂正としては、primer に関する記述の訂正、分かりやすい図への変更、ベクターゲノムの定量の表記方法、考察の補足などが指導された。また、論文中の誤字等の訂正に関する指導があった。

全般として、本論文は学位論文として相応しいと全員一致で認められた。

最終試験の結果の要旨

申請者は、学位論文の内容の準じ、スムーズに発表を行った。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめた通りである。各審査委員から、実験方法、データ解釈、考察等について多くの質問がなされた。いずれの質問についても適切な返答がなされ、有意義な質疑応答が行われた。以下に質疑応答の抜粋を示す。

- 正常な NPC1 遺伝子の臓器発現パターン、および、疾患の発症時期と遺伝子変異の hot spot との関連性についての質問には、適切に回答があった。
- AAV-hNPC1 ベクターの構築とベクター由来 mRNA を検出する RT-PCR におけるプライマー部位に関する質問には、ベクター由来 mRNA の部位に適切にプライマーを設計しているとの回答があったが、再度上流のプライマーの位置確認を求められ、適切に回答があった。
- 本研究では NPC1 野生型のマウスに AAV-NPC1 を導入した群を陽性コントロールとしているが、本来は NPC1 野生型のマウスを用いた方が良いのではないかという、陽性コントロー

ルの設定に質問があったが、陽性コントロールを野生型マウス AAV-NPC1 導入群とした経緯と意図について説明がなされた。

以上、申請者の発表および質疑応答から、審査員全員が最終試験に合格と判断した。