

氏名	林 夢 夏
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 709 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 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	Fabry 病マウスへの AAV ベクター全身投与による遺伝子治療効果の検討
論文審査委員	(委員長) 教授 森田 光哉 (委員) 教授 金澤 丈治 教授 花園 豊 (委員) 客員教授 山形 崇倫

論文内容の要旨

1 研究目的

Fabry 病 (FD) は代表的なライソゾーム病の一つであり、X 染色体上にある *GLA* 遺伝子の変異によって発症する。*GLA* はライソゾームに存在する加水分解酵素 α -galactosidase A (α -Gal A) をコードし、この α -Gal A の活性が低下すると、酵素基質であるスフィンゴ糖脂質 (主に globotriaosylceramide: Gb3) が、血管内皮、心筋、腎臓等に進行性に蓄積し、多彩な臓器症状を呈する。酵素補充療法、薬理的シャペロン療法の有効性が認められているが、半減期の短さや blood brain barrier (BBB) 非透過性といった課題があり、酵素補充療法では中和抗体産生による効果減弱の可能性や、シャペロン療法では特定の遺伝子変異症例にしか使用できないといった制限がある。FD の遺伝子治療が確立すれば、単回の全身投与によって、中枢神経系を含めた全身臓器において長期間にわたる治療効果が期待できるため、研究の意義は大きい。

今回、我々は adeno-associated viral (AAV) ベクターを用いて、FD モデルマウスにおける遺伝子治療の効果を検討した。

2 研究方法

GLA 発現カセットを持つ AAV ベクター (AAV vector carrying human α -Gal A codon DNA: AAV-hGLA) を作製した。

実験 1 において、6 週齢オスの *GLA* knockout (GLAko) マウス 7-8 匹を 1 グループとし、それぞれ 1×10^{11} vg の AAV2-または AAV9-hGLA 溶液、 2×10^{12} vg の AAV9-hGLA 溶液、phosphate buffered-saline (PBS) を静注後、8 週間飼育した。投与直前、投与 3 週後、8 週後に採血を行い、血漿中の α -Gal A 活性を測定した。投与 8 週後に脳、心臓、肝臓、腎臓を摘出し、臓器中の α -Gal A 活性、ウイルスゲノムコピー数 (viral genome copy numbers: VGCNs)、Gb3 量を測定した。対照として同週齢オスの野生型マウスを 8 匹使用した。

実験 2 において、メスのホモ接合型 GLAko マウスと、オスの human Gb3 synthetase (G3S)-transgenic (TgG3S) マウスとを交配し、TgG3S/GLAko マウスを得た。表現型を持たない GLAko マウスと比べ、TgG3S/GLAko マウスは臓器への Gb3 蓄積が高度であるため角膜混濁、蛋白尿、振戦などの症状を呈し、より FD の臨床に即したモデルと言える。6 週齢オスの TgG3S/GLAko マウス 8 匹に対し、 2×10^{12} vg の AAV9-hGLA 溶液または PBS を静注後、8 週間飼育した。採

血および臓器摘出時期、測定項目は実験 1 に準じた。対照として同週齢オスの野生型マウス、TgG3S マウス、GLAko マウスを 7 匹ずつ使用した。

3 研究成果

実験 1 において、AAV-hGLA 投与後の GLAko マウス臓器中に α -Gal A を発現させ、Gb3 蓄積量が減少することを確認した。AAV9-hGLA 群は同量の AAV2-hGLA を投与した群と比べ、脳を含めたすべての試験臓器で高い α -Gal A 活性を示した。また、 1×10^{11} vg AAV9 投与群と 2×10^{12} vg AAV9 投与群との比較では、後者で VGCNs が有意に多く、 α -Gal A 活性がより上昇し、心臓、肝臓、腎臓において Gb3 蓄積量がより低下していた。

次に実験 2 で、TgG3S マウスと GLAko マウスとを交配して得られた TgG3S/GLAko マウスを用いた。AAV9-hGLA を 2×10^{12} vg 静注 8 週後、すべての試験臓器で VGCNs が有意に増加し、特に心臓、肝臓では有意な α -Gal A 活性の上昇と Gb3 量減少を認めた。脳、腎臓では α -Gal A 活性の有意な上昇を認めず、Gb3 量は未治療群よりも減少したものの有意差はなかった。

4 考察

GLAko マウス、TgG3S/GLAko マウスともに、 2×10^{12} vg の AAV9-hGLA 全身投与による心臓、肝臓への効果は有力であったが、脳と腎臓への影響は限定的だった。

Taguchi らの報告では、生後 5 週の TgG3S/GLAko マウス脳に蓄積する Gb3 量は同週齢の GLAko マウスの 14.9 倍であり、25 週齢の脳組織で神経細胞や血管周囲の細胞内に脂質封入体を認めた。実験 2 での AAV 投与時に TgG3S/GLAko マウス脳で既にこのような組織変化が始まっていた可能性があり、脳における治療遺伝子伝達効率の低さの原因となったかもしれない。また、投与時期の他に、AAV 投与量や投与経路の工夫（髄腔内投与の併用など）についても検討する必要がある。

FD における脳病変の主体は血管内皮細胞への Gb3 沈着であるため、AAV が BBB を透過できなくとも、他臓器由来の α -Gal A 作用により脳の Gb3 量減少が期待できる。しかし、今回の研究で肝臓および血漿中の α -Gal A 活性は野生型を上回るほど増加したが、脳における有意な効果を認めなかった。肝臓での α -Gal A 産生量をさらに増加させることで改善が見られるかどうか、AAV 投与量を増やしたり肝臓特異的プロモーターを採用したりなどして検証する余地がある。

AAV9 が BBB を透過する詳細な機構についてはまだわかっていない。現在カプシド遺伝子変異による研究が行われている。2022 年には AAV-CAP.B の、マーモセットの BBB 透過性が証明され、今後この種のカプシドが FD 研究の有力なツールとなるかもしれない。

腎臓に関して、AAV9 型の全身投与による遺伝子導入効率は高くなく、我々の研究でも、GLAko マウス、TgG3S/GLAko マウスともに、心臓や肝臓と比べると腎における AAV ゲノムコピー数は少なく、 α -Gal A 活性や Gb3 量を見ても部分的な効果にとどまった。TgG3S/GLAko マウスの腎臓では、電子顕微鏡所見で近位・遠位尿細管および集合管に層状の構造を持つ脂質封入体を認める一方で、ボーマン嚢の構造には異常を認めず、尿中クレアチン値は終始変化しなかったことから、TgG3S/GLAko マウスにおける糸球体濾過機能は終生保たれることが示唆されている。腎糸球体は、そのサイズバリアによって 50 kDa 以上の分子が通過することはできないが、AAV を含めた大半の遺伝子ベクターは MDa 単位である。

今回の実験で、濾過機能が正常に保たれた腎糸球体を AAV 自体は通過できなかったが、血漿中を循環する α -Gal A (分子量 49 kDa) が腎臓で機能したのかもしれない。腎臓での Gb3 蓄積を防ぐためには、腎臓への AAV 投与法の改良により *GLA* 遺伝子導入効率の改善を図るか、あるいは肝臓での導入効率をさらに上昇させて血中に分泌される α -Gal A 発現量を増加させることで、間接的な腎臓への効果を期待するものと思われる。

今回の研究において、AAV-hGLA 全身投与の効果は限定的であったが、症候性の FD モデル動物で遺伝子治療効果を評価できたことは有意義であった。今後の課題として、①脳・腎臓自体の遺伝子導入効率を向上させるための AAV 投与時期や投与経路、カプシド選択の工夫、②肝臓での *GLA* 遺伝子導入効率を更に向上させた場合の脳・腎臓への効果の検証が挙げられる。

5 結論

GLA 遺伝子を搭載した AAV9 型ベクターの単回静注によって、FD モデルマウスの主要臓器に α -Gal A を発現させ、Gb3 蓄積量を減少させた。脳や腎臓で十分な効果を発揮するには、これらの臓器自体に対する遺伝子導入効率を向上させるか、血液中を循環する α -Gal A 量を増加させるかを念頭に置き、手法を検討する必要がある。

論文審査の結果の要旨

遺伝子変異により α -Gal A (*GLA*) 活性が低下することが原因で、基質であるスフィンゴ糖脂質 (主に globotriaosylceramide: Gb3) が血管内皮、腎臓、心臓等に蓄積して発症する Fabry 病 (FD) への遺伝子治療開発を目指した研究である。

申請者は、*GLA* ノックアウト (GLAko) マウスおよび GLAko マウスと human Gb3 synthetase-transgenic マウスを交配させ、Fabry 病の表現型を示す FD モデルマウスを用いて、ヒト *GLA* (hGLA) 遺伝子を組み込んだ AAV2 ないし AAV9 ベクターを用いて遺伝子導入実験を行った。特に FD モデルマウスを用いた研究は申請者らが初めてとなる。

GLAko マウスを用いた実験では、AAV9-hGLA 導入群で AAV2-hGLA 導入群より高い酵素活性を示し、また AAV9-hGLA 群でも高用量群 (2×10^{12} vg) で低用量群 (1×10^{11} vg) より高い酵素活性と心臓・肝臓・腎臓で Gb3 の蓄積量が低下していることを確認した。

FD モデルマウスを用いた実験では心臓、肝臓にて有意に酵素活性が増加し、Gb3 量が減少していたが、脳・腎臓での酵素活性上昇および Gb3 量減少に有意差は示せず、生存期間の延長も得られなかった。これらの結果については *J Gene Med* に採択され、既に論文として発表されている。

FD モデルマウスへの遺伝子導入で効果がなかった理由、特に腎臓での遺伝子導入の効果があまりなかった点について指摘されたが、今後投与時期、投与量・投与方法の検討が予定されており、これらの改良が得られれば実際の治療への応用も期待できる。

以上を総合的に検討した結果、林 夢夏殿が提出した学位論文について、本学学位授与にふさわしいものと判断した。

最終試験の結果の要旨

申請者から研究の背景・方法・結果・考察について必要十分な発表がなされた後質疑応答が実施された。

発表後の質疑においてはほぼ的確な返答がなされたが、申請者が中枢への遺伝子導入について重視していた点について、病変首座が血管内皮細胞であり、また臨床的には腎障害がより重要であることが指摘され、今後の研究の方向性についても議論された。

さらに FD モデルマウスへの投与で効果がなかった理由、特に腎臓に対する効果があまりなかった点やヒト GLA 遺伝子を導入して免疫反応を惹起する可能性等についてさらなる考察を求められ、学位論文の修正・追記が行われた。

これらの質疑・修正を踏まえて、本研究のさらなる発展・治療法の開発が見込まれることから、学位審査について合格と判断した。