

表 題 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 の 区 分 博士課程

著 者 名 林 夢夏

担当指導教員氏名 水上 浩明 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 人間生物学系
専攻分野 生体分子医学
専攻科 分子医学

2024年1月10日申請の学位論文

目次

・略語一覧	2
1. 緒言	3
2. 材料と方法	6
2-1. AAV-hGLAベクターの作製	
2-2. 実験動物	
2-3. 検体の収集と処理	
2-4. α -Gal A 酵素活性の測定	
2-5. ゲノム DNA の精製と定量	
2-6. Gb3 の抽出と定量	
2-7. 組織化学染色	
2-8. 抗 AAV9 中和抗体の測定	
2-9. 生存曲線	
2-10. 統計解析	
3. 結果	15
4. 考察	33
5. 結語	39
・謝辞	39
・参考文献	40

略語一覧

AAV: adeno-associated virus

AAV-hGLA: AAV vector carrying human α -Gal A codon DNA

α -Gal A: α -galactosidase A

BBB: blood brain barrier

CMV: cytomegalovirus

dg: diploid genome

FBS: fetal bovine serum

FD: Fabry disease

Gb3: globotriaosylceramide

GLAko: GLA knockout

G3S: human Gb3 synthetase

HEK: human embryonic kidney

ITR: inverted terminal repeat

NAb: neutralizing antibody

NS: not significant

pA: polyadenylation

PBS: phosphate buffered saline

qPCR: quantitative PCR

SV40: simian virus 40

TgG3S: G3S-transgenic

vg: vector genomes

WT: wild type

1. 緒言

Fabry病 (FD) は代表的なライソゾーム病のひとつであり、X染色体上に存在する *GLA* 遺伝子 (GenBank: NM_000169.3) の変異によって発症する¹⁻³。 *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、自律神経節、角膜等に進行性に蓄積し^{3,4}、脳血管障害、四肢末端痛、虚血性心疾患、心筋症、腎障害、発汗低下、下痢・腹痛、角膜混濁など多彩な臓器症状を呈する⁵。発症頻度は40000人に1人程度とされていたが、我が国の新生児スクリーニングの検討では男児約3600人に1人と報告されており⁶、従来の報告よりも多くの患者が潜在していることが示唆される。

病型は古典型と遅発型とに分けられ、古典型の α -Gal A 残存活性は1%未満で、小児期に四肢末端痛、発汗低下で発症し、20歳以降に尿蛋白、30歳以降に心肥大、脳血管障害、40歳以降に進行性の腎不全、不整脈を認め、平均死亡年齢は41歳である。遅発型の α -Gal A 残存活性は5-10%未満で、成人期以降に心肥大や腎不全を呈し、重症度は多様である。左室肥大を有する男性患者の3%⁷、男性の透析患者の1%⁸、原因不明の若年性脳梗塞を発症した男性患者の0.4%⁹がFabry病であったとする報告がある。

また、FDはX連鎖性顕性伝形式をとるが、女性のヘテロ患者も存在する。発症年齢や症状の進行は男性患者よりも遅い傾向にあるが、男性遅発型患者と同様に多様な臨床症候を呈する。スクリーニングで測定される白血球 α -Gal A活性は低下していない場合が多く、診断にはGLA遺伝子解析が必要となる。

FDに対する標準治療として酵素補充療法があり、経静脈的に投与されたヒト組換え α -Gal Aは細胞膜に存在するmannose-6-phosphate受容体を介して組織へと吸収される¹⁰。この治療は特に発症早期に行えば進行性の臓器障害に対する予防効果を発揮するが¹¹、半減期が短いため2週間ごとの反復投与（点滴静注）が必要であることや、組換え酵素に対する中和抗体の産生、血液脳関門（blood brain barrier: BBB）透過性を持たないことなど多くの課題が残っている。このほかに、薬理的シャペロン療法（経口薬）が認可されたが、特定のGLA遺伝子変異のみに適応が限られている¹²。

今後FDに対する遺伝子治療が確立すれば、単回の治療によって長期にわたる全身的な効果が期待できるため、その開発が期待されている。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。

AAVは非病原性の一本鎖DNAウイルスで、分裂細胞・非分裂細胞どちらにも感染することができ、その安全性と有用性から遺伝子のベクターとして研究や

臨床の場で広く使用されてきた¹³⁻¹⁶。AAVには100を超える血清型・変異型が存在し、その違いによって組織指向性が異なることが知られている。多くの種類で神経細胞に遺伝子を送達することが知られているが、その機序についてはまだ十分に解明されていない^{17,18}。

これまでに、GLA knockout (GLAko)マウスに対してAAV1型、AAV2型、AAV6型、AAV8型、AAV9型をベクターとして使用し、ヒト*GLA*遺伝子を導入した報告があり¹⁹⁻²³。各種臓器の α -Gal A活性の回復、Gb3蓄積量の減少に成功している。

しかしながら、GLAkoマウスはFDの実験モデルとして広く使用されているものの、FDの表現型をもたない²⁴。TaguchiらはGLAkoマウスが表現型を得るにはGb3蓄積量が不足していることを示し、GLAkoマウスとhuman Gb3 synthetase (G3S)-transgenic (TgG3S)マウスとを交配させ、より高度にGb3が臓器に蓄積する症候性のFDモデルマウス (TgG3S/GLAkoマウス)を生み出した。このTgG3S/GLAkoマウスは生後7週で角膜混濁、10週で蛋白尿、20週で振戦、動作緩慢や歩行障害といった神経症状を呈し、36週で死亡することが報告されている（50%生存期間: 27週）^{25,26}。

今回の研究で、我々はまずGLAkoマウスにヒト*GLA*遺伝子発現カセットを搭載したAAV2型、AAV9型ベクターを経静脈投与し、脳・心臓・肝臓・腎臓組織中の α -Gal A活性、ウイルスゲノムコピー数、Gb3蓄積量を測定した。その結果、2

$\times 10^{12}$ vector genomes (vg) AAV9投与群、 1×10^{11} vg AAV9投与群、 1×10^{11} vg AAV2投与群の順に、ウイルスゲノムコピー数、 α -Gal A活性が増加し、Gb3量が少ないことがわかった²⁷。

次の実験で、TgG3S/GLAkoマウスにGLA遺伝子搭載AAV9ベクターを 2×10^{12} vg静注し、初回の実験と同様の評価を行った。心臓と肝臓では、未治療群と比べて有意に α -Gal A活性が上昇し、Gb3量も有意に減少していた。脳と腎臓においても同様の傾向が見られたが、未治療群との有意差はなかった。抗Gb3モノクローナル抗体を用いた免疫組織学染色では、AAV投与後の脳、心臓、肝臓、腎臓でGb3沈着が減少していた。

以上の結果から、AAV ベクターの単回投与によってFD モデルマウスの主要臓器に α -Gal A を発現させ、Gb3 蓄積が軽減することが示された。特に脳と腎臓で治療遺伝子の導入効率を上げるためにさらなる研究が必要である。

2. 材料と方法

2-1. AAV-hGLA ベクターの作製

pUC57 プラスミド (Azenta Life Sciences)にサブクローニングしたヒト GLA を pAAV-MCS プラスミド (Agilent Technologies)にサブクローニングし、cytomegalovirus (CMV) promoter、GLA、simian virus 40 (SV40) polyadenylation

(pA)シグナル配列を含む pAAV-CMV-GLA プラスミドを構築した。

pAAV-CMV-GLA プラスミド、アデノウイルスヘルパープラスミド pHelper (Agilent Technologies)、ヘルパープラスミド (pAAV2 Rep/AAV2 Cap 遺伝子または pAAV2 Rep/AAV9 Cap 遺伝子を含む) を human embryonic kidney (HEK)293 細胞に共移入し、AAV purification kit (タカラバイオ)を用いて AAV ベクター (以下、AAV vector carrying human α -Gal A codon DNA: AAV-hGLA と称する)溶液を精製した。ウイルスの力価は SV40 pA シグナル配列 (forward, 5'-CAAATAAAGCAATAGCATCACAAA-3'; reverse, 5'-ATGAGTTTGGACAAACCACAAC-3') の定量的 PCR によって測定した。

2-2. 実験動物

実験動物は自治医科大学実験医学センターで飼育され、実験は自治医科大学動物実験規程に従って行われた。

<実験 1>

Gla 遺伝子の exon 3 と intron 3 がネオマイシン耐性遺伝子カセットによって組み換えられた *B6;129-Gla^{tm1Kul}/J* (GLAko マウス、#3535; Jackson Laboratory) を実験に使用した。6 週齢オスの GLAko マウス 7-8 匹を 1 グループとし、それぞれ 1×10^{11} vg (以下、「低用量」と表記する)の AAV2-または AAV9-hGLA 溶液、 $2 \times$

10^{12} vg (以下、「高用量」と表記する)の AAV9-hGLA 溶液、phosphate buffered saline (PBS)を後眼窩静脈叢から投与後、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、Gb3 量を測定した。対照として同週齢オスの C57BL/6J マウス (野生型) を 8 匹使用した (図 1)。

<実験 2>

メスのホモ接合型 GLAko マウスと、オスの TgG3S マウス (nbio232; 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 実験動物研究資源バンク)とを交配し、TgG3S/GLAko マウスを得た。TgG3S マウスは片側アレルに CMV immediate early enhancer- CAG promoter を備えた G3S 導入遺伝子をもち、臓器中にヒト Gb3 を過剰発現させたマウスで、Shiozuka ら²⁸によって創出された。

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 を後眼窩静脈叢から投与後、8 週間飼育した。実験 1 と同様に、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、Gb3 量を測定した。対照として同週齢オスの野生型マウス、

TgG3S マウス、GLAko マウスを各 7 匹ずつ使用した (図 2)。

2-3. 検体の収集と処理

AAV 投与直前、投与 3 週後、8 週後に、イソフルランによる全身麻酔下で下顎静脈から毛細管採血を行った。採取した血液はヘパリン化し、遠心分離によって ($1000 \times g$ 、 4°C 、15 分間) 血漿を分離した。血漿と、AAV 投与 8 週後に摘出した脳、心臓、肝臓、腎臓は液体窒素で瞬間凍結後、 -80°C で保存した。

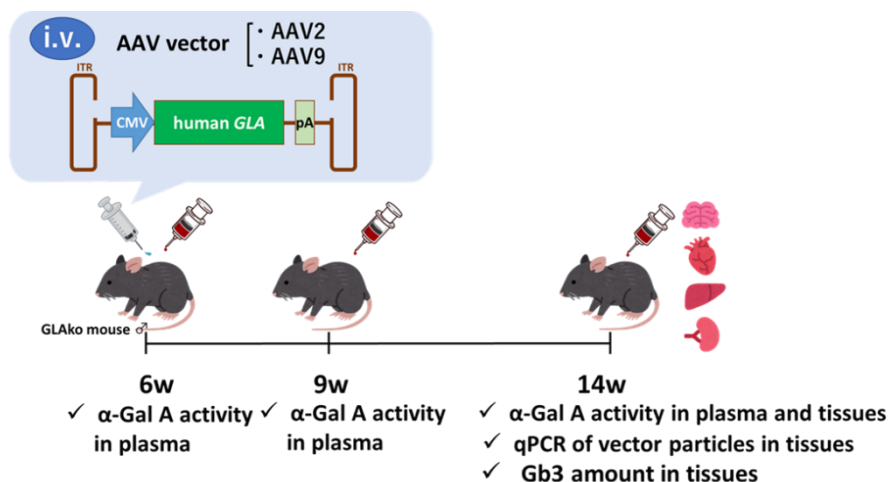


図 1. 実験スケジュール (実験 1)

生後 6 週齢オスの GLAko マウスに対し、AAV2 または AAV9 ベクターを経静脈的に投与する。AAV ベクターは両端の inverted terminal repeat (ITR) 構造間に CMV immediate-early promoter、ヒト *GLA* 遺伝子、SV40 pA 配列を有している。注射直前、注射 3 週後、8 週後に採血を行い、血漿中の α -Gal A 活性を測定する。8 週後に脳・心臓・肝臓・腎臓を摘出し、組織中の α -Gal A 活性、ウイルスゲノムコピー数、Gb3 蓄積量を測定する。

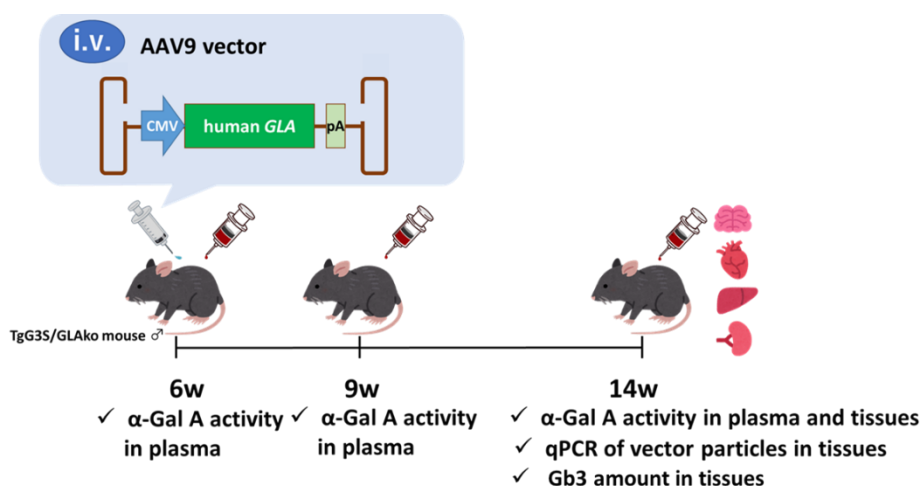


図 2. 実験スケジュール (実験 2)

生後 6 週齢オスの TgG3S/GLAko マウスに対し、AAV9 ベクターを経静脈的に投与する。AAV ベクターの構造、採血および臓器摘出時期、測定項目は実験 1 に準じる。

2-4. α -Gal A 酵素活性の測定

Alpha Galactosidase Activity Assay Kit (Biovision) のプロトコールに従い測定した。組織検体をキット中のバッファーとホモジネートした後、4 °C、12000 × g で 10 分間遠心分離を行い、その上清を α -Gal A 基質と 37 °C で 2 時間反応させた。 α -Gal A と反応した基質から発せられた蛍光の強度を Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific) で測定し (励起光 360 nm、蛍光 445 nm)、4-methylumbelliferone を用いて作成した検量線から、分解された基質量 (nanomole) を求めた。1 時間・組織中の蛋白質 1mg あたり分解された α -Gal A 基質量 (nanomole/h/mg protein) を、 α -Gal A 酵素活性として表した。組織中の蛋白質濃度は BCA Protein Assay Kit (タカラバイオ) を用いて測定した。

血漿も同様にして α -Gal A 基質と反応させ、1 時間・血漿 1 ml あたり分解された基質量 (nanomole/h/ml) によって α -Gal A 活性を表記した。

2-5. ゲノム DNA の精製と定量

マウスの脳、心臓、肝臓、腎臓から DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、SYBR green master mix、StepOne real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。AAV ベクターゲノムの検出には、SV40 pA シグナル配列 (上述) をプライマーとした。同時に、マウ

スゲノムの内部標準遺伝子として hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 を測定し (プライマー配列; forward, 5'-AGGCCCAGCTCTACAAGTTT-3'; reverse, 5'-TGATTGCGCATTCCCACAAA-3'), それらの結果を vg/diploid genome (dg) として表記した。

2-6. Gb3 の抽出と定量

マウスから摘出した脳、心臓、肝臓、腎臓をメタノールでホモジネートした後、クロロフォルム/メタノール (1/2, v/v) によって希釈し、内部標準として Gb3 (C17:0) (Matreya 社) を加えた²⁹。遠心分離後の上清から、液体クロマトグラフ質量分析計 (LCMS-8060 (島津製作所)) によって Gb3 アイソフォームの分離・濃度測定を行った。Multiple Reaction Monitoring transition の設定は Kodama らの報告³⁰ に従った。検量線は、Gb3 mixture (Matreya 社) のアイソフォームを測定して作成した。総 Gb3 量は、各 Gb3 アイソフォーム量の和によって求められた。この実験は各グループ 3 匹のマウスで実施した。

2-7. 組織化学染色

<実験 1>

AAV9 高用量群マウスの脳、心臓、肝臓、腎臓から 10 μ m 厚の組織凍結切片を

作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

<実験2>

マウスの脳、心臓、肝臓、腎臓から 10 μ m 厚の組織凍結切片を作成し、抗 Gb3 モノクローナル抗体 (#A2506, 東京化成工業)と 4 °Cで一晩反応させた（希釈倍率は脳、心臓、肝臓で 1:1、腎臓で 1:4）。その後、室温でビオチン標識した第二抗体 (#414321, ニチレイバイオサイエンス)と 10 分間、次いで 3,3'-diaminobenzidine と 20 分間反応させた。

2-8. 抗 AAV9 中和抗体の測定

<実験1>

AAV投与8週後に、AAV9低用量群、AAV9高用量群、野生型群から採取した血漿中の抗AAV9中和抗体価を測定した。この実験は各グループ4-8 匹のマウスで実施した。

<実験2>

3匹のTgG3S/GLAkoマウスから、AAV9投与直前および投与8週後に血液を採取し、抗AAV9中和抗体価を測定した。

<測定手順>

10% fetal bovine serum (FBS)加Dulbecco's Modified Eagle Medium/HAM F12培地 100 μ l に含まれたHEK293由来2V6.11細胞 5×10^4 個を96穴培養プレートに撒き、E4遺伝子発現を誘導するためPonasterone Aを添加した。翌日、サンプルの血漿 10 μ lとAAV9-CMV-LacZ (1細胞あたり1000 vgに調整) 10 μ lとを混合し、37 °Cで1時間温置後、2V6.11細胞培養プレートに添加した。スクロース溶液を最終濃度 125 nmol/lとなるよう培地に加え、48時間温置後、培養液を除去した。 β -galactosidaseの活性を測定するため、酵素基質となるortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Invitrogen)を添加後、SpectraMax 190 (Molecular Devices)で405 nmの吸光度を測定した。コントロール (50%FBS)よりも β -galactosidaseの活性が抑制されていれば、抗AAV9中和抗体陽性と判定した。抗体の力価は、 β -galactosidase活性を抑制した血漿の最大希釈倍率として表記した。

2-9. 生存曲線

実験 2 において、各群の生存期間を比較するため Kaplan–Meier 曲線を作成した。マウスは各群 5 匹とし、観察期間は生後から 18 カ月間とした。

2-10. 統計解析

統計解析には GraphPad Prism software version 9.1.1 (GraphPad Software)を用いた。 α -Gal A 活性、ウイルスゲノムコピー数、Gb3 量について、各群間の比較には、一元配置分散解析後に Tukey の事後検定を行った。Kaplan–Meier 曲線によって示された各群の生存期間はログランク検定を用いて比較した。

いずれも、有意水準として $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

3. 結果

<実験 1>

AAV-hGLA 全身投与により GLAko マウス血漿中の α -Gal A 活性が上昇

各群における血漿 α -Gal A 活性の推移を調べるため、AAV 投与直前、投与 3 週後、投与 8 週後に採血を行い α -Gal A 活性を測定した (図 3、表 1)。

AAV2、AAV9 低用量投与後の α -Gal A 活性はわずかに上昇し、最終的にそれぞれ野生型の酵素活性の 62.4%、54.3%に達した。他方、AAV9 高用量群では、AAV 投与 3 週後の α -Gal A 活性は野生型の 3.1 倍に上昇し、8 週後まで持続した。野生型マウスと未治療の GLAko マウスでは、 α -Gal A 活性の上昇は見られなかった。

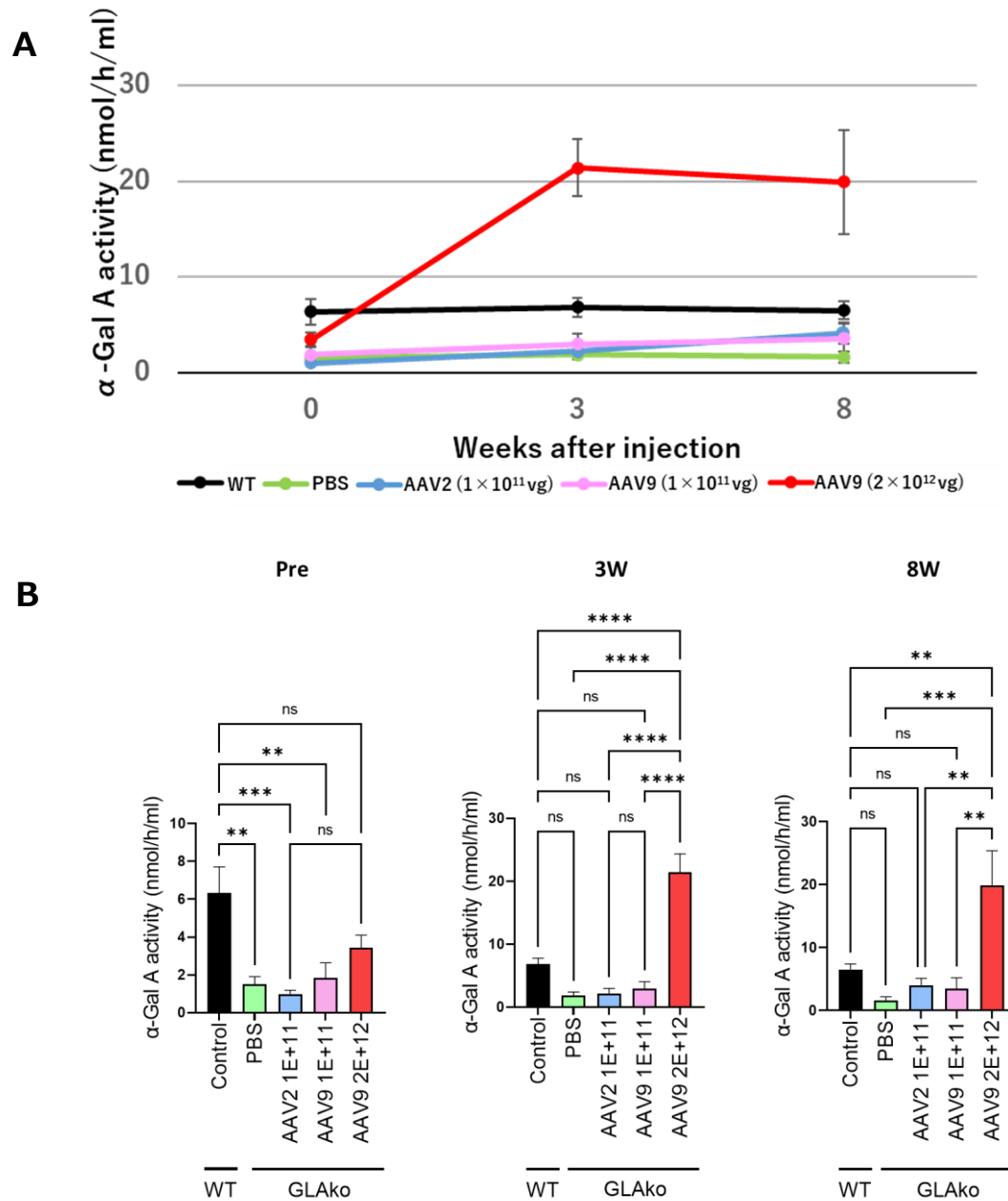


図 3. GLAko マウス群と野生型マウス群における血漿中 α -Gal A 活性の推移
 6 週齢オスの GLAko マウスを AAV2 (1×10^{11} vg) 投与群、AAV9 (1×10^{11} vg) 投与群、AAV9 (2×10^{12} vg) 投与群、PBS 投与群に分け、同週齢オスの野生型マウス群とともに、AAV (または PBS) 投与直前、投与 3 週後、8 週後の血漿中 α -Gal A 活性を蛍光検出法にて測定した。AAV9 2×10^{12} vg 投与群の α -Gal A 活性は野生型群の活性を超え、投与 8 週後まで維持されていた (A)。測定時期ごとの各群間の比較を (B) に示した。ns, not significant; **** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. エラーバーは標準誤差を表す。

表 1. GLAko マウスと野生型マウスにおける AAV 注射前後の血漿中 α -Gal A 活

性値

	WT	PBS	AAV2	AAV9 1E+11 vg	AAV9 2E+12 vg
plasma (pre)	6.33 ± 1.38	1.51 ± 0.39	0.98 ± 0.21	1.85 ± 0.79	3.43 ± 0.68
plasma (3W)	6.81 ± 0.97	1.87 ± 0.58	2.19 ± 0.83	2.96 ± 1.11	21.41 ± 2.96
plasma (8W)	6.48 ± 0.92	1.61 ± 0.58	4.05 ± 1.09	3.52 ± 1.70	19.93 ± 5.45

平均 \pm 標準誤差 (単位: nmol/h/ml)

AAV9-hGLA 全身投与により GLAko マウス臓器に α -Gal A が発現

AAV による臓器組織中の GLA 遺伝子発現を評価するため、AAV 投与 8 週後に各群マウスから脳、心臓、肝臓、腎臓を摘出し、 α -Gal A 活性、ウイルスゲノムコピー数、Gb3 量を測定した (図 4、表 2-4)。

α -Gal A 活性とウイルスゲノムコピー数は、どの臓器においても AAV9 低用量投与群が同量の AAV2 投与群よりも高い傾向を示した。

心臓と肝臓における α -Gal A 活性とウイルスゲノムコピー数は、全グループ間で AAV9 高用量群が有意に最も高く、心臓の α -Gal A 活性は野生型の約 4 倍、肝臓は 2 倍に達していた。Gb3 蓄積量も、有意差はなかったものの、GLAko マウス群間で AAV9 高用量群が最も少なかった。

他方、脳と腎臓では、AAV9 高用量群で未治療 GLAko マウス群と比べ有意にウイルスゲノムコピー数が上昇していたものの、 α -Gal A 活性の上昇は野生型の脳の 10.2 %、腎臓の 39.7 %にとどまり、未治療 GLAko マウス群との有意差はなかった。腎臓における Gb3 蓄積量は AAV9 高用量群で最も減少していたが、他群との有意差はなかった。脳における Gb3 量は、どの AAV 投与群も低下しなかった。

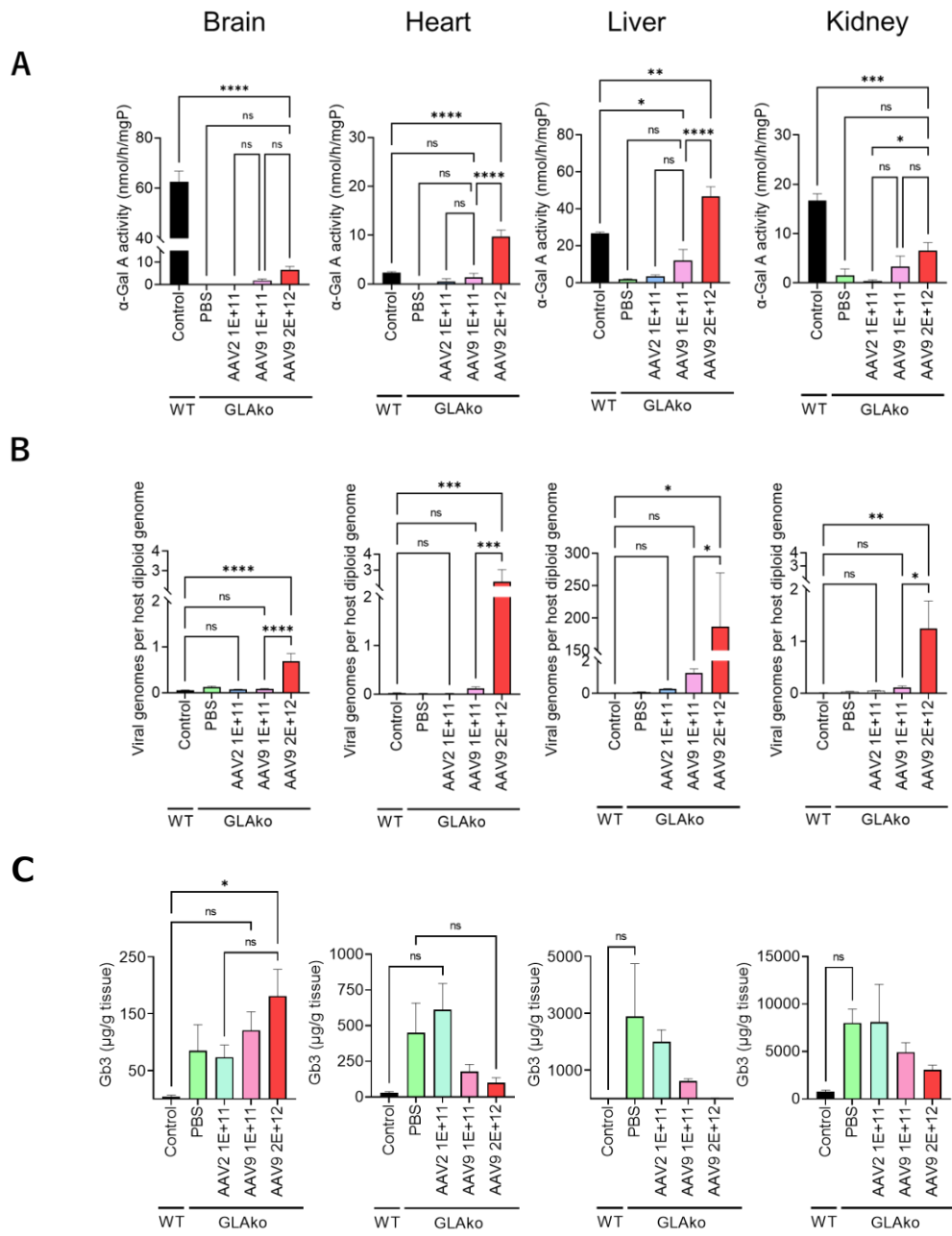


図 4. GLAko マウスと野生型マウス臓器における AAV 注射後の α -Gal A 活性、ウイルスゲノムコピー数、Gb3 量の比較

2×10^{12} vg AAV9 投与された GLAko マウスの心臓、肝臓で、野生型と比べて有意な α -Gal A 活性の上昇を認めた (A)。同群の脳・心臓・肝臓・腎臓におけるウイルスゲノムコピー数は PBS 投与群と比べて有意に上昇していた (B)。同群の心臓・肝臓・腎臓の Gb3 量は他の GLAko マウス群よりも低下していたが、有意差はなかった (C)。ns, not significant; ****P < 0.0001; ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05. エラーバーは 標準誤差を表す。

表 2. GLAko マウスと野生型マウス臓器における AAV 注射後の α -Gal A 活性値

	WT	PBS	AAV2	AAV9 1×10^{11} vg	AAV9 2×10^{12} vg
brain	62.62 \pm 4.18	ND	ND	1.73 \pm 0.75	6.41 \pm 1.59
heart	2.37 \pm 0.17	ND	0.54 \pm 0.54	1.39 \pm 0.81	9.75 \pm 3.65
liver	26.57 \pm 0.78	1.80 \pm 0.29	3.41 \pm 0.75	11.88 \pm 5.98	46.77 \pm 5.06
kidney	16.71 \pm 1.38	1.55 \pm 1.29	0.43 \pm 0.25	3.33 \pm 2.13	6.63 \pm 1.58

平均 \pm 標準誤差 (単位: nmol/h/mgP)

表 3. GLAko マウスと野生型マウス臓器における AAV 注射後のウイルスゲノムコピー数

	WT	PBS	AAV2	AAV9 1×10^{11} vg	AAV9 2×10^{12} vg
brain	0.05 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.69 \pm 0.17
heart	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.12 \pm 0.04	2.30 \pm 0.74
liver	0.04 \pm 0.00	0.08 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02	1.27 \pm 0.25	186.75 \pm 82.89
kidney	0.01 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	0.05 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	1.52 \pm 0.53

平均 \pm 標準誤差 (単位: viral genomes per diploid genome (vg/dg))

表 4. GLAko マウスと野生型マウス臓器における AAV 注射後の Gb3 量

	Brain					Heart					Liver					Kidney				
	WT	PBS	AAV2	AAV9 1×10 ¹¹ vg	AAV9 2×10 ¹² vg	WT	PBS	AAV2	AAV9 1×10 ¹¹ vg	AAV9 2×10 ¹² vg	WT	PBS	AAV2	AAV9 1×10 ¹¹ vg	AAV9 2×10 ¹² vg	WT	PBS	AAV2	AAV9 1×10 ¹¹ vg	AAV9 2×10 ¹² vg
Gb3	4.4±2.2	84.9±45.7	73.3±21.4	120.7±32.4	181.2±46.7	28.8±9.9	451.6±207	611.7±183.6	179.5±49.1	100.1±35.1	7.3±1.1	2886±1857.3	2001.9±411.6	615.6±80.5	19.6±4.9	738.5±192.4	8010±1443.6	8108±3957.3	4926.3±1009.2	3066.8±492.7
Gb3 (C16:0)	3.9±2.3	9.4±6.2	10±0.8	42.2±34.7	43.8±32	12.2±4.3	108.9±38.6	107.6±21.7	49.9±20.6	32.1±12.4	5.8±1	1063.6±621	639.1±91.8	346.5±10.5	12.8±2.5	185.3±27.8	1439.6±376.2	869.7±394.5	727.2±187.3	533.2±74.6
Gb3 (C18:0)	0.2±0.1	2.8±0.7	2.7±0.4	6.1±2.5	5.2±2.1	0	0.8±0.2	0.5±0.3	0.1±0.1	0	0	7.4±2.8	5.1±2.4	5.5±5.5	0	0	6.9±3.3	5.1±2.4	2.3±1	1.1±0.6
Gb3 (C20:0)	0	0.1	0.1	0.1	0.1±0.1	0	0.8±0.2	1.1±0.5	0.4	0.2±0.1	0	1.8±0.7	1.7±0.6	0.5±0.3	0	0	4±1.6	2.1±0.6	3.1±1	2.2±0.9
Gb3 (C22:0)	0	3.5±3.5	4.3±2.6	8.5±5.2	10±3.4	0.8±0.4	19.4±11	48.2±25.6	8.6±3.7	5.9±3.5	0	228.4±187	105.5±24.7	10.9±2.7	0.4±0.4	30.5±2.7	699.6±248.3	631.2±97.3	375.3±66.9	322.6±62
Gb3 (C24:1)	0	2.1±0.7	7.3±3.5	3.9±0.8	4±1.4	0	23.4±3.6	35.5±20.9	8±2.1	3.6±1.8	0	223.2±121.1	151.1±33.8	35.6±20	0.2±0.2	18.9±6.9	551±307.4	519.3±238.4	279.9±57.2	91.2±7.6
Gb3 (C24:0)	0.3±0.3	66.9±34.6	48.9±21.2	59.8±18.9	117.8±32.7	15.7±5.7	298.4±155.8	418.6±140.1	112.4±33.1	58.3±17.5	1.4±0.3	1361.6±930.4	1098.6±302.7	216.4±67	6.2±1.9	462.7±199.6	5201.9±644.8	5896.5±3769.3	3426.9±781.6	1993.3±353.9
Gb3 (C24OH)	0	0.1±0.1	0.1	0	0.3±0.1	0	0.1±0.1	0.2±0.1	0	0.1±0.1	0	0	0.7±0.3	0.2±0.2	0	41±14.3	106.8±6.9	184±59.3	111.4±21.4	123.3±6.3

平均 ± 標準誤差 （単位: µg/g tissue）

AAV9 投与による組織障害所見はなかった

AAV9 高用量群のマウスから摘出した脳、心臓、肝臓、腎臓の凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色をおこなった (図 5)。炎症細胞浸潤や組織の変性・壊死など、AAV 投与による組織障害を示唆する所見を認めなかった。

AAV9 投与群の血漿中で抗 AAV9 中和抗体を検出

AAV9 投与群と野生型マウスの血漿中に存在する抗 AAV9 中和抗体の測定結果を表 5 に示した。抗体価は低用量群 (1:1400 から 1:22400) と比べて、高用量群 (1:22400 から 1:89600) の方が高力価を示した。野生型は全て抗体陰性だった。

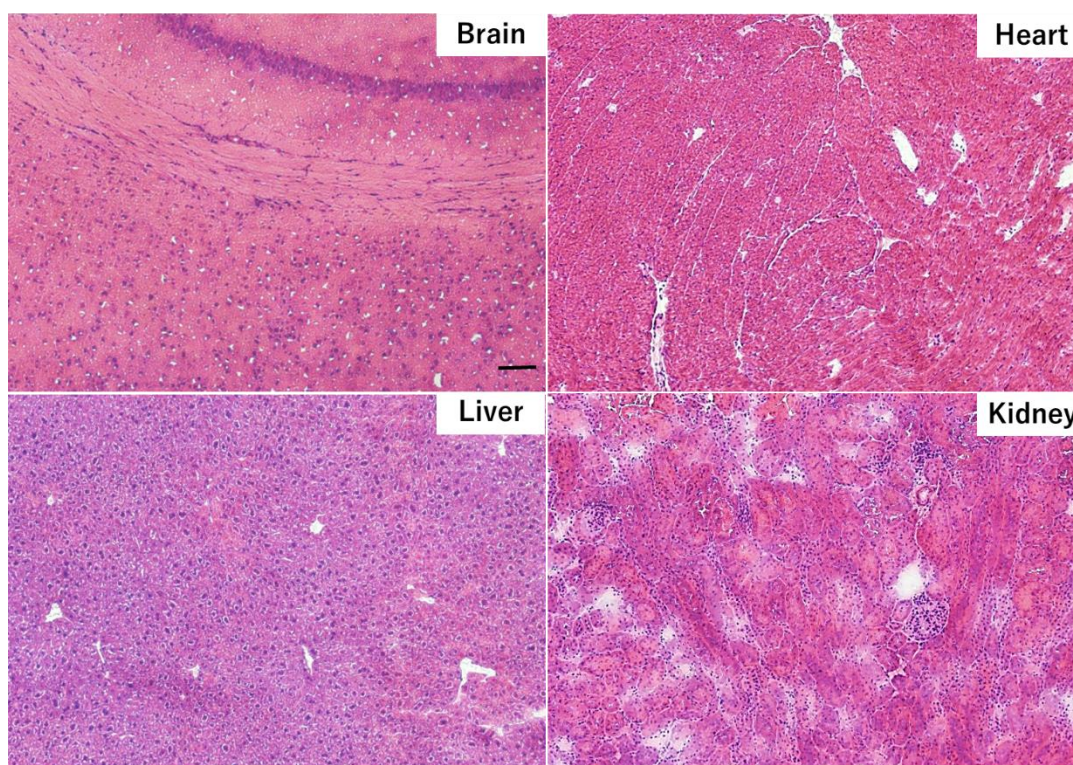


図 5. AAV9 投与後の GLAko マウスの臓器組織本

GLAko マウスに AAV9 (2×10^{12} vg) 静注した 8 週間後の脳、心臓、肝臓、腎臓組織のヘマトキシリン・エオジン染色。どの組織においても炎症や変性の所見を認めなかった。スケールバーは 100 μ m を表す。

表 5. 野生型マウスおよび AAV9 投与 GLAko マウス群血漿における抗 AAV9 中和抗体価

WT

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
NAb titier	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

GLAko (AAV9 1×10^{11} vg)

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
NAb titier	1:11200	1:1400	1:11200	1:11200	1:11200	1:11200	1:22400

GLAko (AAV9 2×10^{12} vg)

	#1	#2	#3	#4
NAb titier	1:89600	1:22400	1:44800	1:22400

NAb: neutralizing antibody

<実験 2>

AAV9-hGLA 全身投与により TgG3S/GLAko マウス血漿中の α -Gal A 活性が上昇

実験 1 と同様に、AAV 投与前後での血漿中 α -Gal A 活性の推移を確認するため、AAV 投与直前、投与 3 週後、投与 8 週後に採血を行い α -Gal A 活性を測定した (図 6、表 6)。

投与前の α -Gal A 活性は、野生型と比較して TgG3S マウス群 139.5 %、GLAko マウス群 27.8 %、PBS-TgG3S/GLAko マウス群 49.0 %、AAV9-TgG3S/GLAko マウス群 12.8 %だった。AAV9-TgG3S/GLAko マウス群以外の群ではエンドポイントまで α -Gal A 活性が変化しなかったのに対して、AAV9-TgG3S/GLAko マウス群の活性は投与 3 週間後に野生型と同程度まで上昇し、8 週後には野生型の約 2 倍にまで達した。

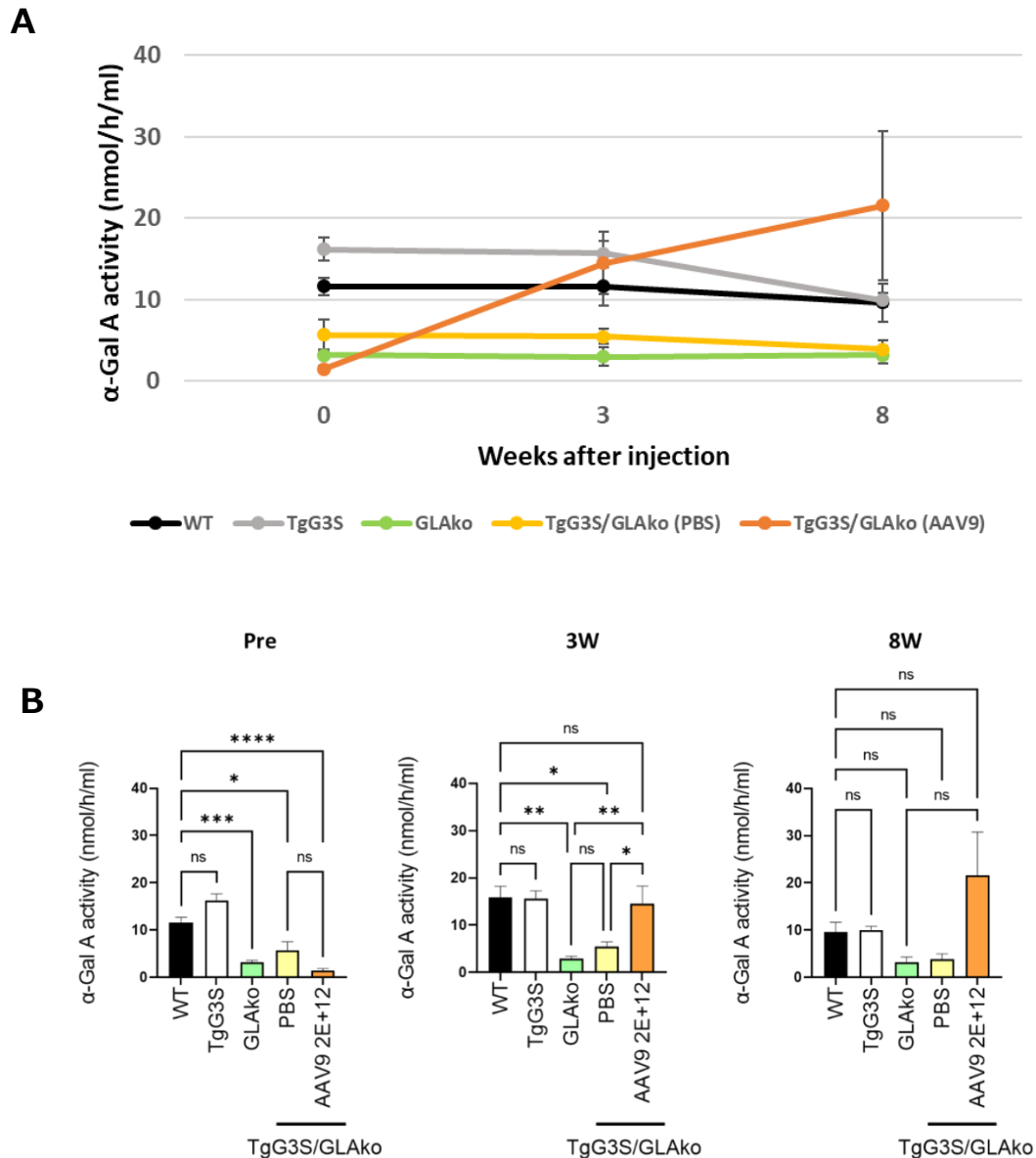


図 6. 各群の血漿中 α -Gal A 活性値の推移

6 週齢オスの TgG3S/GLAko マウスを 2×10^{12} vg AAV9 投与群と PBS 投与群に分け、同週齢オスの野生型マウス群、TgG3S マウス群、GLAko マウス群とともに、AAV (または PBS) 投与直前、投与 3 週後、8 週後の血漿中 α -Gal A 活性を蛍光検出法にて測定した。AAV9 2×10^{12} vg 投与群の α -Gal A 活性は徐々に上昇し、8 週後には野生型マウスの活性の約 2 倍となった (A)。測定時期ごとの各群間の比較を (B) に示した。ns, not significant; **** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. エラーバーは 標準誤差を表す。

表 6. 各群における AAV 注射前後の血漿中 α -Gal A 活性値

	WT	TgG3S	GLAko	TgG3S/GLAko PBS	TgG3S/GLAko AAV9
plasma (pre)	11.6 \pm 1.1	16.2 \pm 1.4	3.2 \pm 0.3	5.7 \pm 1.9	1.5 \pm 0.4
plasma (3W)	11.6 \pm 2.3	15.7 \pm 1.6	3 \pm 1.1	5.5 \pm 0.9	14.5 \pm 3.8
plasma (8W)	9.6 \pm 2.3	10 \pm 0.8	3.2 \pm 1.1	3.9 \pm 1.1	21.6 \pm 9.2

平均 \pm 標準誤差 (単位: nmol/h/ml)

AAV9-hGLA 全身投与により TgG 3S/GLAko マウス臓器に α -Gal A が発現、Gb3 蓄積を改善

TgG3S/GLAko マウスでの AAV による臓器組織中の GLA 遺伝子発現を評価するため、実験 1 と同様に、AAV 投与 8 週後に各群マウスから脳、心臓、肝臓、腎臓を摘出し、 α -Gal A 活性、ウイルスゲノムコピー数、Gb3 量を測定した (図 7、表 7-9)。AAV9 を投与した TgG3S/GLAko マウスの心臓と肝臓において、ウイルスゲノムコピー数は有意に上昇し、 α -Gal A 活性は全群間で最も高く、それぞれ野生型の 2.9 倍、1.1 倍だった。この 2 臓器における同群の Gb3 蓄積量は PBS 投与群のそれぞれ 15.7%、3.3%と有意に少なかった。他方、脳、腎臓において、AAV9-TgG3S/GLAko 群のウイルスゲノムコピー数は有意に増加していたものの、 α -Gal A 活性は PBS 投与群と有意差がなかった。ただし注目すべきことに、同群の Gb3 量は脳において PBS 群の 47.7%、腎臓で 43.7%と、PBS 群よりも少なかった (野生型との有意差なし)。野生型と TgG3S マウス群間、GLAko マウス群と PBS-TgG3S/GLAko マウス群間において、いずれの臓器でも α -Gal A 活性の有意差を認めなかった。以上により、実験 1 と同様に、TgG3s/GLAko マウスにおいても AAV9 全身投与によって四臓器すべてのウイルスゲノムコピー数が有意に増加したが、PBS 群と比較して有意な α -Gal A 活性の上昇および Gb3 量の減少効果は心臓、肝臓にのみ認められた。

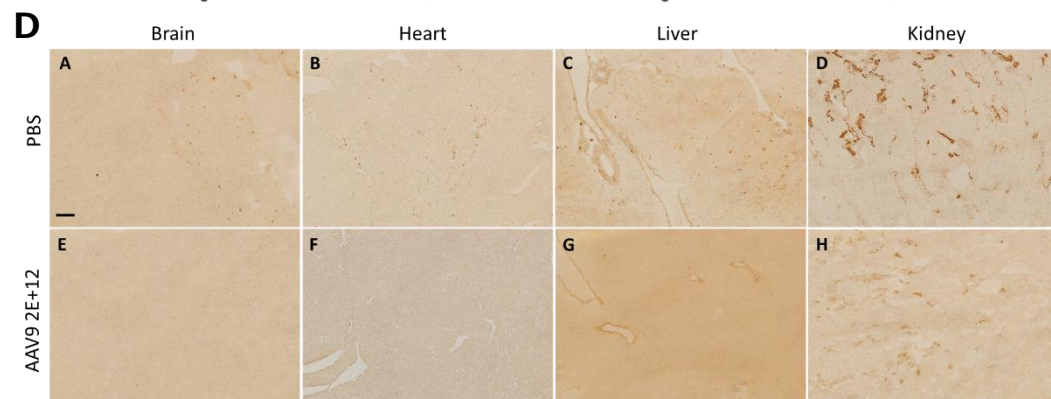
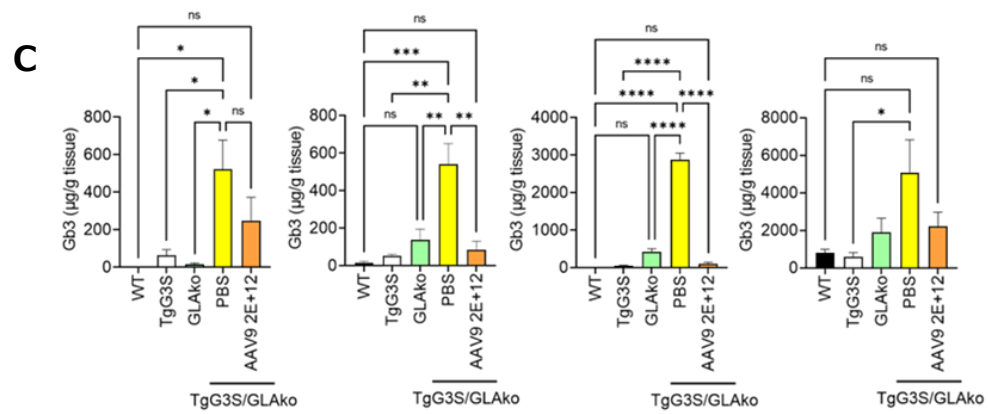
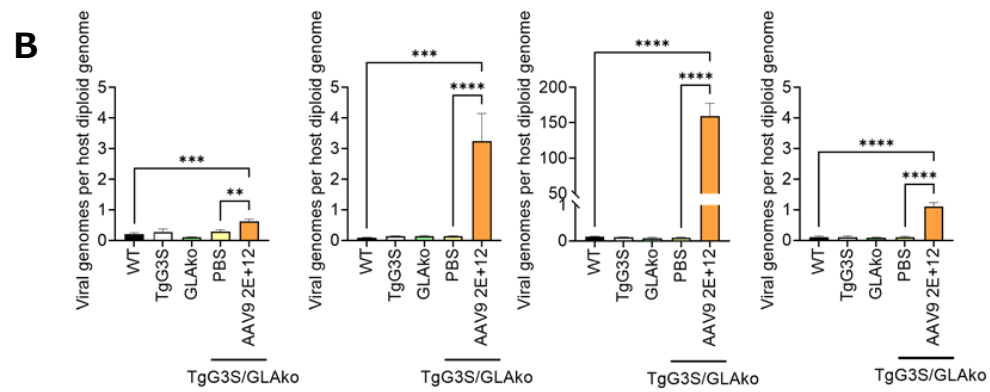
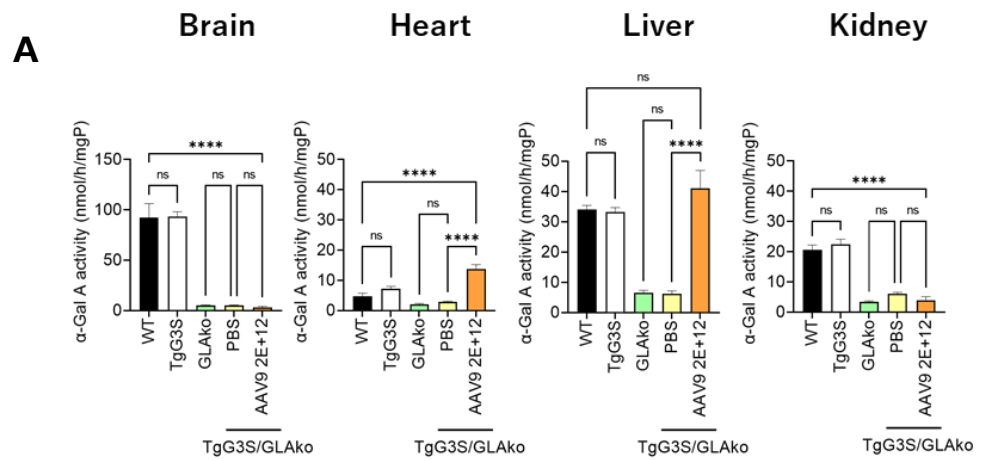


図 7. 各群マウスの臓器における α -Gal A 活性 (A)、ウイルスゲノムコピー数 (B)、Gb3 定量 (C) の比較と TgG3S/GLAko マウス臓器の抗 Gb3 免疫組織化学染色 (D)

AAV9 投与された TgG3S/GLAko マウス群では、心臓と肝臓における α -Gal A 活性が未治療 TgG3S/GLAko マウス群と比べて有意に上昇し (A)、脳、心臓、肝臓、腎臓におけるウイルスゲノムコピー数も有意に増加していた (B)。同群の臓器 Gb3 量は未治療群よりも少なく、特に心臓と肝臓で有意差を認めた (C)。抗 Gb3 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色標本で、AAV9 投与 TgG3S/GLAko 群における四臓器への Gb3 沈着は未治療群よりも軽減していた。スケールバーは 100 μ m を表す (D)。ns, not significant; ****P < 0.0001; ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05. エラーバーは 標準誤差を表す。

表 7. 各群マウスの臓器における AAV 注射後の α -Gal A 活性値

	WT	TgG3S	GLAko	TgG3S/GLAko PBS	TgG3S/GLAko AAV9
brain	92.34 \pm 13.90	93.24 \pm 4.91	5.01 \pm 0.72	5.16 \pm 0.41	3.28 \pm 1.0
heart	4.71 \pm 1.05	7.25 \pm 0.75	2.09 \pm 0.28	2.86 \pm 0.24	13.80 \pm 1.41
liver	34.0 \pm 1.41	33.12 \pm 1.54	6.46 \pm 0.89	6.23 \pm 0.90	41.10 \pm 5.85
kidney	20.70 \pm 1.55	22.46 \pm 1.70	3.34 \pm 0.39	6.09 \pm 0.47	3.88 \pm 1.26

平均 \pm 標準誤差 (単位: nmol/h/mgP)

表 8. 各群マウスの臓器における AAV 注射後のウイルスゲノムコピー数

	WT	TgG3S	GLAko	TgG3S/GLAko PBS	TgG3S/GLAko AAV9
brain	0.22 \pm 0.04	0.28 \pm 0.10	0.11 \pm 0.02	0.29 \pm 0.07	0.63 \pm 0.07
heart	0.09 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.13 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02	3.25 \pm 0.90
liver	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02	159.12 \pm 18.35
kidney	0.11 \pm 0.04	0.11 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	1.10 \pm 0.13

平均 \pm 標準誤差 (単位: viral genomes per diploid genome (vg/dg))

表 9. 各群マウスの臓器における AAV 注射後の Gb3 量

	Brain					Heart					Liver					Kidney				
	WT	TgG3S	GLAko	TgG3S/ GLAko PBS	TgG3S/ GLAko AAV9	WT	TgG3S	GLAko	TgG3S/ GLAko PBS	TgG3S/ GLAko AAV9	WT	TgG3S	GLAko	TgG3S/ GLAko PBS	TgG3S/ GLAko AAV9	WT	TgG3S	GLAko	TgG3S/ GLAko PBS	TgG3S/ GLAko AAV9
Gb3	0.4±0.4	62.7±31.4	16.6±6.3	522.6±155.4	249.2±123.3	16.1±8.3	52.2±10.4	137.8±56.9	540.5±110.3	85.0±45.8	5.4±2.0	46.3±13.8	423.4±77.7	2867.7±181.2	94.6±48.2	813±176.5	599.5±214.2	1896.0±747.5	5082.6±1748.5	2222.1±751.2
Gb3 (C16:0)	0.4±0.4	22.9±22.3	6.9±4.6	34.0±5.7	10.4±6.2	15.4±7.6	7.1±0.4	44.6±22.8	69±25.5	23.5±9.6	4.8±2.5	19.1±5.3	148.4±3.9	1294.3±125.4	38.0±19.1	115.2±44.3	110.0±36.4	441.4±294.8	342.8±132.1	169±85.8
Gb3 (C18:0)	0	25.8±5.7	1.5±0.4	373.8±124.6	187.7±105.3	0	0.7±0.2	5.7±5.4	8.5±3.4	1.8±1.1	0	0	2.3±0.8	16.0±4.9	0	0.2±0.1	0.1±0.1	6.9±4.2	8.5±4.8	6.5±3.6
Gb3 (C20:0)	0	0.1±0.1	0	9.0±1.7	3.6±2.7	0	2.0±0.3	0.2±0.1	12.3±3.6	2.1±1.3	0	0	0.6±0.1	1.4±0.2	0	0.1±0.1	0.2±0.1	5.5±3.1	7.5±1.8	3.2±2.8
Gb3 (C22:0)	0	1.6±1.5	1.1±0.3	27.8±7.1	10.0±5.0	0	22.8±8.6	9.9±3.5	111.9±9.8	16.2±9.8	0	5.0±1.6	17.8±6.5	276.4±22	15.7±10.3	53.4±21.4	59.1±18.9	448.8±164.0	1339.6±497.0	944.7±464.6
Gb3 (C24:0)	0	11±11	6.8±1.9	70.7±20.5	35.1±3.9	0.7±0.7	17.6±0.3	69.5±33.1	304.6±111.1	38.0±21.7	0.6±0.6	18.5±6.7	194.4±71.5	777±285.5	23.1±11.4	406.7±150.4	198.9±77.2	407.3±262.0	2213.9±730.2	850.6±261.5
Gb3 (C24:1)	0	1.2±1.2	0.2±0.2	6.2±1.3	2.4±1.0	0	2.0±1.1	7.9±3.6	32.2±9.5	3.4±2.3	0	3.3±0.7	57.2±13.0	349.4±112.3	8.7±5.2	50.1±22.4	23.1±8.7	273.4±92.4	428.9±175.9	179.4±55.4
Gb3 (C24OH)	0	0	0	1.1±0.5	0	0	0	0	2.0±1.7	0	0	0.4±0.4	2.8±1.6	153.2±64.2	9.0±4.8	187.3±23.6	208.1±83.0	312.8±163.5	741.4±267.7	68.6±17.4

平均 ± 標準誤差 (単位: µg/g tissue)

中和抗体は AAV9 投与後に出現

血漿中に抗 AAV9 中和抗体が既存していないか確認するため、AAV 投与前後で抗体価を測定した。

AAV 投与前の TgG3S/GLAko マウス血漿中で中和抗体は検出されず、投与 8 週後の血漿中で検出された (1:44800 または 1:89600 (表 10))。

AAV9-hGLA 投与後 TgG3S/GLAko マウスの生存期間は延長しなかった

AAV9-hGLA による寿命延長効果を評価するため、各群のマウス生存数を生後から 18 ヶ月間観察した (図 8)。各群間の生存期間に有意差を認め、TgG3S/GLAko マウスは野生型と比べて生存期間が短かった。AAV9-TgG3S/GLAko マウス群と PBS-TgG3S/GLAko マウス群とは両者とも生存期間中央値が 11 ヶ月で、16 ヶ月までに全数死亡し、差異はなかった。野生型と GLAko マウスは生後 18 ヶ月時点で全数生存していた。

表 10. 野生型マウスおよび AAV9 投与 GLAko マウス群血漿における抗 AAV9 中和抗体価

AAV9 2E+12 pre

	# 1	# 2	# 3
NAb titier	Negative	Negative	Negative

AAV9 2E+12 8w

	# 1	# 2	# 3
NAb titier	1:89600	1:44800	1:89600

NAb: neutralizing antibody

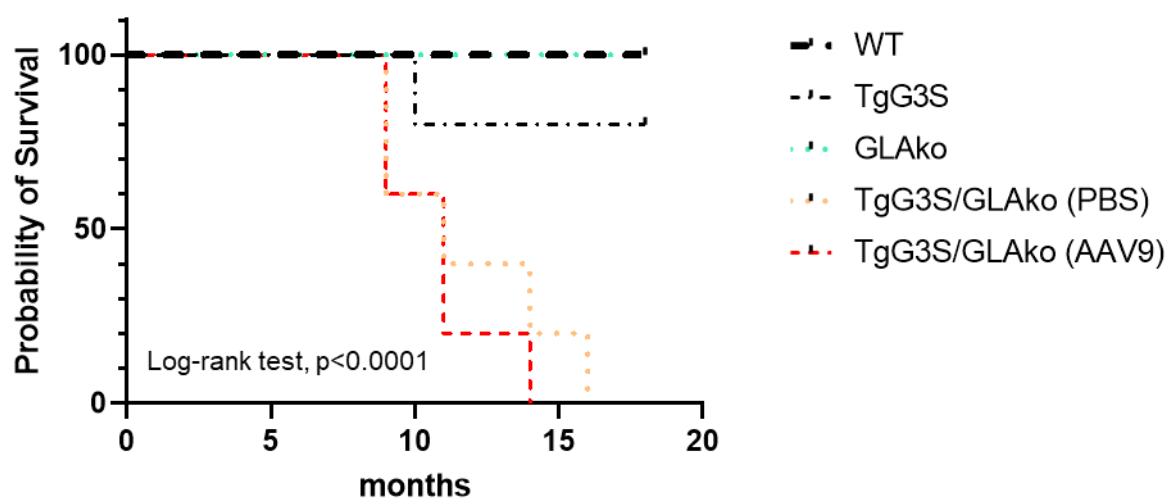


図 8. 各群の Kaplan–Meier 曲線

AAV 治療群、未治療群ともに TgG3S/GLAko マウスの生存期間中央値は 11 カ月で、野生型マウス群、TgG3S マウス群、GLAko マウス群と比べて短かった。

4. 考察

FD の治療として酵素補充療法、薬理的シャペロン療法の有効性が認められているが、これらの治療には、半減期の短さや BBB 非透過性といった課題があり、特に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。Fabry 病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の治療効果が期待できるため、研究の意義は大きい。

GLA 遺伝子が X 染色体上に存在するため FD は X 連鎖性の遺伝形式をとるが、ヘテロ接合型の女性でも α -Gal A 活性が様々な程度に低下し、FD を発症する場合がある³¹。女性患者における α -Gal A 活性の多様さは、不均一なライオニゼーションに起因すると考えられている³²。最終的には両性の TgG3S/GLAko マウスで評価が必要であるが、初回の試みとしてオスに焦点を絞り実験をおこなった。

AAV には数多くの血清型が存在し、なかでも AAV2 型は AAV の生物学的研究のために広く用いられ、遺伝子治療のベクターとしても汎用されてきた。

それに対し、2004 年に Gao ら³³によって報告された AAV9 は、心臓^{34,35}や肝臓³⁶への高い遺伝子導入効率に加え、神経系組織への指向性と BBB 透過性を有する³⁷⁻³⁹と言われている。FD における中枢神経症状の主体は血管内皮細胞の障害による脳血管障害であるが、血管平滑筋の Gb3 沈着^{40,41}や神経細胞、アスト

ロサイトの形態異常⁴²も伴っている。血管内皮細胞での治療効果に加え、これらの組織障害も防げるような BBB 透過性を備えた治療手段が理想的と言える。

実験 1 において、AAV9-hGLA 低用量群は同量の AAV2-hGLA を投与した群と比べ、脳を含めたすべての被検臓器で高い α -Gal A 活性を示した。また、AAV9 低用量群と高用量群とを比較すると、後者でウイルスゲノムコピー数が有意に多く、 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。

続く実験 2 では、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。これまで FD 研究のモデルマウスとして GLAko マウスが広く使用されてきたが、GLAko マウスは FD の表現型を持たず、生存期間も正常マウスと変わらない。GLAko マウスよりも高度な組織 Gb3 の蓄積を示し、アルブミン尿や神経症状といった表現型を呈する TgG3S/GLAko マウスの方がより FD の病態に近く、モデル動物として適している。この TgG3S/GLAko マウスに AAV9-hGLA を静脈投与したところ、すべての試験臓器で AAV ゲノムコピー数が有意に増加し、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。

以上から、GLAko マウス、TgG3S/GLAko マウスの両方で、高用量 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充分とは言えないことがわかった。

実験 1 において高用量 AAV9-hGLA 投与後 GLAko マウス脳での α -Gal A 活性は野生型の 10 %程度であった。Biferi ら²³が生後 1 か月の GLAko マウスに 1.8×10^{14} vg/kg の AAV9-hGLA を静脈投与した結果、脳の α -Gal A 活性は野生型の 30 %程度であったが、出生直後に投与した場合の脳 α -Gal A 活性は野生型と同程度にまで回復していた。このことから、中枢神経系で十分な効果を得るには、より早期のタイミングで AAV 投与することが必要と考えられた。

Taguchi らの報告²⁵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。

投与時期の他に、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^{37,43}。

AAV9 は BBB を構成する血管内皮細胞の層を通過し、星状細胞に伝達すると推測されているが^{37,44,45}、詳細な機構についてはまだわかっていない。現在、カプシド遺伝子の変異による研究が行われている⁴⁶。近年、BBB 透過性をさらに

向上させた AAV-PHP.eB が開発され、脳を含めた全身臓器への遺伝子伝達ツールとして期待されたが、ヒト以外の霊長類では BBB 透過性がないことが判明した^{47,48}。2022 年には AAV-CAP.B の、マーモセットにおける BBB 透過性が証明され⁴⁹、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。

FD モデルマウスに AAV-hGLA を投与する場合の治療戦略として、肝臓特異的に α -Gal A を発現させて血漿中の α -Gal A 濃度を増加させ、他臓器に作用させる手法の有効性が報告されている^{21,50,51}。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が、その効果を検証した報告はまだない。

今回の研究で、肝臓および血漿中の α -Gal A 活性は野生型と比較して有意に増加したが、脳における α -Gal A 活性の増加には寄与しなかった。血管内皮細胞以外の病変である血管平滑筋、神経細胞に対する治療効果に関しては、更に肝臓での α -Gal A 産生量を増加させることで改善が見られるのか、AAV 投与量を増やすか肝臓特異的プロモーターを採用するかなどして検証する余地がある。

腎臓への AAV9 型の全身投与による遺伝子導入効率が高くなく^{23,36,52}、AAV1-8 型、AAVrh10 を使用した報告も同様の結果を示している^{19,52,53}。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

けるウイルス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。

全身投与された AAV が腎臓へ到達しにくい理由として、Rubin ら⁵³ は腎糸球体の構造を挙げ、そのサイズバリアにより 50 kDa 以上の分子は通過できないのに対し AAV を含めた大半の遺伝子ベクターが MDa 単位であることを指摘している。

他方で、Biferi らの報告²³ では、AAV9-hGLA の全身投与により GLAko マウスの腎臓における α -Gal A 活性が有意に上昇したが、腎臓でのウイルスゲノムコピー数は心臓や肝臓を大きく下回っていた。これらの結果は、肝臓等の他臓器で産生された α -Gal A が腎臓で作用した可能性を示唆している。AAV6 型、8 型ベクターを使った研究でも同様に、GLAko マウスの腎臓で α -Gal A 活性が上昇した報告があるが^{21,22,50}、AAV ウイルスゲノムコピー数や mRNA コピー数が測定されていないため、腎臓以外の場所で α -Gal A が産生された可能性が残る。

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²⁵。

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、Gb3 蓄積をある程度防いだのかもしれない。

以上から、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 α -Gal A 発現量を更に増加させることで、間接的に腎臓への効果を期待する必要があるものと思われる。

実験 1、2 から、抗 AAV9 中和抗体は AAV9 静注によって産生が誘導され、AAV9 投与量に比例して高い力価を呈すると考えられた。このことは、AAV9 を追加投与するような場合に、その効果を減弱させる可能性を示唆している。

TgG3S/GLAko マウスは過去の報告と同様に、GLAko マウスと比べて明らかに生存期間が短かった。この理由は明らかにされていないが、今回の実験で AAV9-hGLA 投与によって心臓と肝臓とに明らかな治療効果を認めたにもかかわらず、生存期間の延長を認めなかったことから、脳と腎臓における Gb3 蓄積が致命的な影響を与えたのではないかと推測している。

今回の我々の研究において、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. 結語

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。

謝辞

研究の遂行にあたり、多くのご助言とご指導を頂きました自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 瀬原吉英先生ならびに水上浩明先生、小児科学講座 渡邊美由紀様、村松一洋先生に心より御礼申し上げます。また、実験動物に関して新潟大学大学院医歯学総合研究科腎医学医療センター 田口淳美先生に技術のご助言を賜り深く感謝申し上げます。実験に使用した TgG3S マウス (Nb10232)は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 実験動物研究資源バンクから提供いただきました。最後に、研究生活において多くのご協力を頂いた遺伝子治療研究部の皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng C. M, Sakuraba H, Desnick R. J. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. *J Clin Invest.*83(4):1390-1399,1989
2. Ishii S, Kase R, Sakuraba H, Suzuki Y. Characterization of a mutant alpha-galactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun.*197(3):1585-1589,1993
3. Shimotori M, Maruyama H, Nakamura G, Suyama T, Sakamoto F, Itoh M, Miyabayashi S, Ohnishi T, Sakai N, Wataya-Kaneda M, Kubota M, Takahashi T, Mori T, Tamura K, Kageyama S, Shio N, Maeba T, Yahagi H, Tanaka M, Oka M, Sugiyama H, Sugawara T, Mori N, Tsukamoto H, Tamagaki K, Tanda S, Suzuki Y, Shinonaga C, Miyazaki J, Ishii S, Gejyo F. Novel mutations of the GLA gene in Japanese patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone. *Hum Mutat.*29(2):331,2008.
4. Alroy J, Sabnis S, Kopp JB. Renal pathology in Fabry disease. *J Am Soc Nephrol.* 13 Suppl 2:S134-138,2002
5. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C, Linhart A, Sunder-Plassmann G, Ries M, Beck M. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest.*34(3):236-242,2004
6. Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S. Newborn screening for Fabry disease in Japan: prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J Hum Genet.*58(8):548-552,2013.
7. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, Yoshida A,

- Kuriyama M, Hayashibe H, Sakuraba H. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*.333(5):288-293,1995
8. Tanaka M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Miyamura N, Nishida K, Araki E, Itoh K, Matsushita K, Hara M, Kuwahara K, Nakano T, Yasumoto N, Nonoguchi H, Tomita K. Identification of Fabry's disease by the screening of alpha-galactosidase A activity in male and female hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. 64(4):281-287,2005
 9. Rolfs A, Fazekas F, Grittner U, Dichgans M, Martus P, Holzhausen M, Böttcher T, Heuschmann P. U, Tatlisumak T, Tanislav C, Jungehulsing G. J, Giese A K, Putaala J, Huber R, Bodechtel U, Lichy C, Enzinger C, Schmidt R, Hennerici M. G, Kaps M, Kessler C, Lackner K, Paschke E, Meyer W, Mascher H, Riess O, Kolodny E, Norrving B. Acute cerebrovascular disease in the young: the Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke*.44(2):340-349,2013
 10. Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem*.264(21):12115-12118,1989
 11. Oder D, Nordbeck P, Wanner C. Long Term Treatment with Enzyme Replacement Therapy in Patients with Fabry Disease. *Nephron*.134(1):30-36,2016.
 12. Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, Bichet, D. G, Giugliani R, Wilcox W. R, Feliciani C, Shankar S. P, Ezgu F, Amartino H, Bratkovic D, Feldt-Rasmussen U, Nedd K, Sharaf El Din U, Lourenco C. M, Banikazemi M, Charrow J, Dasouki M, Finegold D, Giraldo P, Goker-Alpan O, Longo N, Scott C. R, Torra R, Tuffaha A, Jovanovic A, Waldek S, Packman S, Ludington E, Viereck C, Kirk J, Yu J, Benjamin E. R, Johnson F, Lockhart D. J, Skuban N, Castelli J, Barth J, Barlow C, Schiffmann, R. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic

- Chaperone Migalastat. *N Engl J Med.* 375(6):545-555,2016.
13. Leong TW, Pal A, Cai Q, Gao Z, Li X, Bleris L, Hayenga H. N, Qin Z. Clinical gene therapy development for the central nervous system: Candidates and challenges for AAVs. *J Control Release.*357:511-530,2023.
 14. Sehara Y, Fujimoto KI, Ikeguchi K, Katakai Y, Ono F, Takino N, Ito M, Ozawa K, Muramatsu S. I. Persistent Expression of Dopamine-Synthesizing Enzymes 15 Years After Gene Transfer in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 28(2):74-79,2013.
 15. Sehara Y, Hayashi Y, Ohba K, Uchibori R, Urabe M, Inutsuka A, Shimazaki K, Kawai K, Mizukami H. Higher Transduction Efficiency of AAV5 to Neural Stem Cells and Immature Neurons in Gerbil Dentate Gyrus Compared to AAV2 and rh10. *Hum Gene Ther.*33(1-2):76-85,2022.
 16. Muramatsu K, Muramatsu SI. Adeno-associated virus vector-based gene therapies for pediatric diseases. *Pediatr Neonatol.*64 Suppl 1:S3-s9,2023.
 17. Bedbrook CN, Deverman BE, Gradinaru V. Viral Strategies for Targeting the Central and Peripheral Nervous Systems. *Annu Rev Neurosci.*41:323-348,2018.
 18. Castle MJ, Turunen HT, Vandenberghe LH, Wolfe JH. Controlling AAV Tropism in the Nervous System with Natural and Engineered Capsids. *Methods Mol Biol.* 1382:133-149,2016.
 19. Ogawa K, Hirai Y, Ishizaki M, Takahashi H, Hanawa H, Fukunaga Y, Shimada T. Long-term inhibition of glycosphingolipid accumulation in Fabry model mice by a single systemic injection of AAV1 vector in the neonatal period. *Mol Genet Metab.*96(3):91-96,2009.
 20. Ziegler RJ, Lonning SM, Armentano D, Li C, Souza D. W, Cherry M, Ford C,

- Barbon C. M, Desnick R. J, Gao G, Wilson J. M, Peluso R, Godwin S, Carter B. J, Gregory R. J, Wadsworth S. C, Cheng S. H. AAV2 vector harboring a liver-restricted promoter facilitates sustained expression of therapeutic levels of alpha-galactosidase A and the induction of immune tolerance in Fabry mice. *Mol Ther*. 9(2):231-240,2004.
21. Yasuda M, Huston MW, Pagant S, Gan L, St Martin S, Sproul S, Richards D, Ballaron S, Hettini K, Ledebor A, Falese L, Cao L, Lu Y, Holmes M. C, Meyer K, Desnick R. J, Wechsler T. AAV2/6 Gene Therapy in a Murine Model of Fabry Disease Results in Supraphysiological Enzyme Activity and Effective Substrate Reduction. *Mol Ther Methods Clin Dev*.18:607-619,2020.
 22. Choi JO, Lee MH, Park HY, Jung SC. Characterization of Fabry mice treated with recombinant adeno-associated virus 2/8-mediated gene transfer. *J Biomed Sci*. 17:26,2010.
 23. Biferi MG, Cohen-Tannoudji M, García-Silva A, Souto-Rodríguez O, Viéitez-González I, San-Millán-Tejado B, Fernández-Carrera A, Pérez-Márquez T, Teijeira-Bautista S, Barrera S, Domínguez V, Marais T, González-Fernández Á, Barkats M, Ortolano S. Systemic Treatment of Fabry Disease Using a Novel AAV9 Vector Expressing α -Galactosidase A. *Mol Ther Methods Clin Dev*.20:1-17,2021.
 24. Ohshima T, Schiffmann R, Murray GJ, Kopp J, Quirk J. M, Stahl S, Chan C. C, Zerfas P, Tao-Cheng J. H, Ward J. M, Brady R. O, Kulkarni A. B. Aging accentuates and bone marrow transplantation ameliorates metabolic defects in Fabry disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.96(11):6423-6427,1999.
 25. Taguchi A, Maruyama H, Nameta M, Yamamoto T, Matsuda J, Kulkarni A. B,

- Yoshioka H, Ishii S. A symptomatic Fabry disease mouse model generated by inducing globotriaosylceramide synthesis. *Biochem J.* 2013;456(3):373-383.
26. Maruyama H, Taguchi A, Nishikawa Y, Guili C, Mikame M, Nameta M, Yamaguchi Y, Ueno M, Imai N, Ito Y, Nakagawa T, Narita I, Ishii S. Medullary thick ascending limb impairment in the Gl_a. *FASEB J.*32(8):4544-4559,2018.
 27. Hayashi Y, Sehara Y, Watano R, Ohba, K, Takayanagi Y, Muramatsu K, Sakiyama Y, Mizukami H. Therapeutic strategy for Fabry disease by intravenous administration of adeno-associated virus 2 or 9 in α -galactosidase A-deficient mice. *J Gene Med.* e3560, doi:10.1002/jgm.3560,2023
 28. Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni A. B, Furukawa K, Ishii, S. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human α 1,4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem.*149(2):161-170,2011.
 29. Sueoka H, Aoki M, Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H. Distributions of Globotriaosylceramide Isoforms, and Globotriaosylsphingosine and Its Analogues in an α -Galactosidase A Knockout Mouse, a Model of Fabry Disease. *PLoS One.*10(12):e0144958,2015.
 30. Kodama T, Tsukimura T, Kawashima I, Sato A, Sakuraba H, Togawa T. Differences in cleavage of globotriaosylceramide and its derivatives accumulated in organs of young Fabry mice following enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab.*120(1-2):116-120,2017.
 31. Whybra C, Kampmann C, Willers I, Davies J, Winchester B, Kriegsmann J, Brühl K, Gal A, Bunge S, Beck M. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of

- disease in female heterozygotes. *J Inherit Metab Dis.*24(7):715-724,2001.
32. Beck M, Cox TM. Comment: Why are females with Fabry disease affected? *Mol Genet Metab Rep.*21:100529,2019.
 33. Gao G, Vandenberghe L. H, Alvira M. R, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson J. M. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.*78(12):6381-8,2004.
 34. García-Olloqui P, Rodríguez-Madoz J, R.Di Scala M, Abizanda G, Vales Á, Olagüe C, Iglesias-García O, Larequi E, Aguado-Alvaro L. P, Ruiz-Villalba A, Prosper F, Gonzalez-Aseguinolaza G, Pelacho B. Effect of heart ischemia and administration route on biodistribution and transduction efficiency of AAV9 vectors. *J Tissue Eng Regen Med.* 14(1):123-134, 2020.
 35. Inagaki K, Fuess S, Storm T. A, Gibson G. A, Mctiernan C. F, Kay M. A, Nakai H. Robust Systemic Transduction with AAV9 Vectors in Mice: Efficient Global Cardiac Gene Transfer Superior to That of AAV8. *Mol Ther.* 14(1):45-53, 2006
 36. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz J. E. Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol Ther.* 16(6):1073-80, 2008
 37. Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, Kells A. P, Foust K. D, Bringas J. R, Lamarre C, Forsayeth J, Kaspar B. K, Bankiewicz K. S. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Hum Gene Ther.*23(4):382-389,2012.
 38. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar A. M, Fyfe J, Moullier P, Colle M. A, Barkats M. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther.*17(7):1187-1196,2009.

39. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol.*27(1):59-65,2009.
40. Garzuly F, Maródi L, Erdős M, Grubits J, Varga Z, Gelpi E, Rohonyi B, Mázló M, Molnár A, Budka H. Megadolichobasilar anomaly with thrombosis in a family with Fabry's disease and a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *Brain.*128(Pt 9):2078-83,2005.
41. Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford: *Oxford PharmaGenesis*; 2006. Chapter 39.
42. Okeda R, Nisihara M. An autopsy case of Fabry disease with neuropathological investigation of the pathogenesis of associated dementia. *Neuropathology.* 28(5):532-40, 2008.
43. Mimuro J, Mizukami H, Shima M, Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol.*86(11):1990-1997,2014.
44. Merkel SF, Andrews AM, Lutton EM, Mu D, Hudry E, Hyman B. T, Maguire C. A, Ramirez S. H. Trafficking of adeno-associated virus vectors across a model of the blood-brain barrier; a comparative study of transcytosis and transduction using primary human brain endothelial cells. *J Neurochem.*140(2):216-230,2017.
45. Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, Yadav S, Ojeda SR, Samulski RJ. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol Ther.*19(6):1058-1069,2011.
46. Ogden PJ, Kelsic ED, Sinai S, Church GM. Comprehensive AAV capsid fitness

- landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. *Science*. 366(6469):1139-1143,2019.
47. Hordeaux J, Wang Q, Katz N, Buza EL, Bell P, Wilson JM. The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Mol Ther*.26(3):664-668,2018.
 48. Mathiesen SN, Lock JL, Schoderboeck L, Abraham WC, Hughes SM. CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain. *Mol Ther Methods Clin Dev*.19:447-458,2020.
 49. Goertsen D, Flytzanis NC, Goeden N, Chuapoco M. R, Cummins A, Chen Y, Fan Y, Zhang Q, Sharma J, Duan Y, Wang L, Feng G, Ip N. Y, Pickel J, Gradinaru V. AAV capsid variants with brain-wide transgene expression and decreased liver targeting after intravenous delivery in mouse and marmoset. *Nat Neurosci*. 25(1):106-115,2022.
 50. Ziegler RJ, Cherry M, Barbon CM, Cherry M, Berthelette P, Romanczuk H, Ioannou Y. A, Zeidner K. M, Desnick R. J, Cheng S. H. Correction of the Biochemical and Functional Deficits in Fabry Mice Following AAV8-mediated Hepatic Expression of α -galactosidase A. *Mol Ther*.15(3):492-500,2007.
 51. Jung SC, Han IP, Limaye A, Xu R, Gelderman M. P, Zervas P, Tirumalai K, Murray G. J, During M. J, Brady R. O, Qasba P. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer results in long-term enzymatic and functional correction in multiple organs of Fabry mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(5):2676-81,2001.
 52. Rocca CJ, Ur SN, Harrison F, Cherqui S. rAAV9 combined with renal vein injection is optimal for kidney-targeted gene delivery: conclusion of a

comparative study. *Gene Ther.*21(6):618-628,2014.

53. Rubin JD, Nguyen TV, Allen KL, Ayasoufi K, Barry MA. Comparison of Gene Delivery to the Kidney by Adenovirus, Adeno-Associated Virus, and Lentiviral Vectors After Intravenous and Direct Kidney Injections. *Hum Gene Ther.* 30(12):1559-1571,2019.