

表題 グルコーストランスポーター1 欠損症に対する  
アデノ随伴ウィルスベクターを用いた遺伝子治療法の  
開発

論文の区分 博士課程

著 者 名 中村 幸恵

担当指導教員氏  
名 山形 崇倫 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
生殖・発達医学 分野  
成育医学

2017年1月10日申請の学位論文

## 目次

1. はじめに-----	1
2. 対象と方法-----	5
2.1 GLUT1DS 疑い患者の遺伝子変異解析-----	5
2.1.1 対象-----	5
2.1.2 DNA 抽出-----	5
2.1.3 PCR およびダイレクトシーケンス-----	6
2.2 変異体 <i>SLC2A1</i> 遺伝子発現ベクターの発現評価および機能評価-----	7
2.2.1 新規 <i>SLC2A1</i> 遺伝子変異のクローニング-----	7
1) RNA 抽出-----	7
2) cDNA 合成-----	7
3) TA クローニング-----	8
2.2.2 変異体 <i>SLC2A1</i> 遺伝子; 軽症 (A405D) ,中等症 (R333W), および 重症(V303fs) 発現ベクターの作製-----	9
2.2.3 終止コドンの影響を排除した重症発現ベクター (V303fs without stop codon) の作製-----	10
2.2.4 Empty vector の作製-----	13
2.2.5 HEK293 細胞に対する正常型/変異体 <i>SLC2A1</i> 遺伝子発現・機能評価--	13
1) 培養細胞-----	14
2) Western blot analysis-----	14
3) 細胞免疫染色-----	15
4) 2-deoxyglucose (2DG) を用いた糖取込機能評価-----	16
2.3 ヒト <i>SLC2A1</i> 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h <i>SLC2A1</i> ) による、 ヒト培養細胞および疾患モデルマウスへの発現評価・機能評価-----	18
2.3.1 ヒト <i>SLC2A1</i> 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h <i>SLC2A1</i> ) の作製-----	18
2.3.2 SH-SY5Y 細胞に対する AAV-h <i>SLC2A1</i> を用いた遺伝子発現評価-----	19
1) 培養細胞-----	19
2) 細胞免疫染色-----	20
2.3.3 GLUT1DS モデル動物に対する AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与-----	20
1) GLUT1DS モデル動物-----	21

2) <i>Glut1</i> 遺伝子ノックアウトマウスの遺伝型検定	21
3) GLUT1 <sup>+/-</sup> マウスに対する AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与	22
2.3.4 AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与後の内因性および外因性 <i>GLUT1</i> mRNA 発現評価	23
1) RT-PCR	23
2) リアルタイム PCR	25
2.3.5 AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与後の内因性および外因性 GLUT1 蛋白発現評価	26
1) 組織免疫染色	26
2) Western blot analysis	27
2.3.6 AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与後の運動機能評価	28
1) rota-rod test	28
2) footprint test	29
2.3.7 AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与後の髄液糖・血糖測定	30
2.4 統計学的解析	30
3. 結果	31
3.1 GLUT1DS 疑い患者の <i>SLC2A1</i> 遺伝子変異解析	31
3.2 HEK293 細胞に対する正常型/変異体 <i>SLC2A1</i> 遺伝子導入および蛋白発現	32
3.3 HEK293 細胞に対する正常型/変異体 <i>SLC2A1</i> 遺伝子導入後の糖取込機能	35
3.4 ヒト <i>SLC2A1</i> 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h <i>SLC2A1</i> ) を用いた SH-SY5Y 細胞への <i>SLC2A1</i> 遺伝子導入および蛋白発現	36
3.5 GLUT1DS モデル動物に対する AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与後の GLUT1 発現	37
3.6 GLUT1DS モデル動物に対する AAV-h <i>SLC2A1</i> 投与後の運動機能および 生化学的検査	42
4. 考察	45
4.1 GLUT1DS 患者における <i>SLC2A1</i> 遺伝子変異と GLUT1 発現	45
4.2 GLUT1DS 患者における機能評価系の確立	45
4.3 GLUT1DS の遺伝子治療法開発	47
4.3.1 治療用ベクターとプロモーターの選択	47
4.3.2 治療用ベクターの投与経路	49
5. おわりに	52
6. 参考文献	53
7. 謝辞	60

## 略語

GLUT1: Glucose transporter type 1

GLUT1DS: Glucose transporter type 1 deficiency syndrome

SLC2A1: solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1

BBB: blood brain barrier

3-OMG: 3-*O*-Methyl-D-Glucose

MCT: monocarboxylate transporter

AAV: Adeno-associated virus

AADC: aromatic l-amino acid decarboxylase

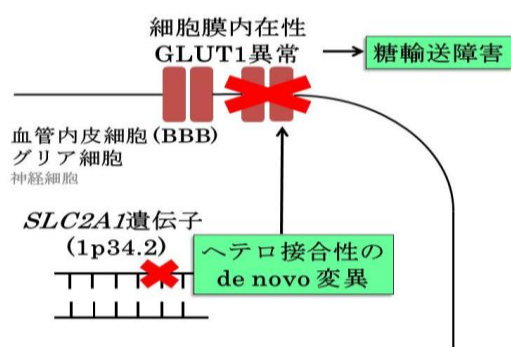
HEK293 cell: Human Embryonic Kidney 293 cell

2DG: 2-deoxyglucose

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

## 1. はじめに

グルコーストランスポーター1 欠損症 (Glucose transporter 1 deficiency syndrome; GLUT1DS, Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM #606777) は、グルコーストランスポーター1 (Glucose transporter type 1; GLUT1) を介した脳組織への糖取込み機能の低下による、代謝性疾患である。GLUT1DS は、常染色体優性遺伝で、GLUT1DS 患者の大多数に、染色体 1p34.2 に位置する *SLC2A1* 遺伝子 (OMIM \*138140) のヘテロ接合性の *de novo* 変異を認める。発症形式はハプロ不全であり、ヘテロ接合体の機能不全でも重篤な神経症状を呈するという特徴がある。[1, 2, 3]。GLUT は、細胞内への糖受動輸送を担う 12 回膜貫通型の細胞膜内在性蛋白質で、ヒトにおいて 14 種類が存在する [4, 5, 6]。GLUT1 は、同一遺伝子 *SLC2A1* から翻訳され、糖鎖付加 (グリコシル化) の違いによる分子量 45kDa と 55kDa の 2 種類の isoform を持つ。GLUT1 の脳内における主たる発現部位は、血液脳関門の血管内皮細胞であり、他に、アストロサイトやミクログリア、オリゴデンドロサイトと、ニューロンにも存在する [7, 8]。GLUT1DS では、*SLC2A1* 遺伝子変異により、主に脳内 GLUT1 を介した糖取込障害が起こり、神経細胞の機能障害を反復することによ



り、最終的には非可逆的な神経障害による症状を呈する (図 1)。

### (図 1) GLUT1 欠損症の発症機序

*SLC2A1* 遺伝子のヘテロ接合性の *de novo* 変異により、細胞膜内に存在する GLUT1 蛋白の機能/構造異常が生じ、細胞内への糖輸送障害から症状を呈する。

欧米を中心に約 200 名の報告例があるが、国内調査では 57 名の報告があり、更に未報告の小児および成人例が存在すると考えられている [3]。

典型例の症状としては、乳児期早期発症の難治性痙攣や知的障害、小脳失調やジストニア、痙性麻痺といった様々な複合型運動機能障害が挙げられる [1, 2, 3]。成人期になると、発作性運動誘発性ジスキネジアなども見られる [9]。

現在の診断では、髄液糖低下 (<40mg/dl) や髄液糖/血糖比低下 (<0.45)、赤血球における 3-O-メチル-D-グルコース (3-OMG) 取込試験の低下、および *SLC2A1* 遺伝子変異検索から総合的に確定診断するが、新規遺伝子変異が検出された際の機能評価系については確立されていない [1-3, 10-12]。

GLUT1DS の治療としては、ケトン食療法が代表的である。ケトン体は、脳血管関門およびグリア細胞に存在する monocarboxylate transporter (MCT) 1、神経細胞に存在する MCT2 を介して中枢神経系に取り込まれ、糖に代わり脳内のエネルギー供給を担うことが出来るため、GLUT1DS の治療に用いられている。また近年では、修正アトキンス法による食事療法も報告されている [13-15]。しかし、一部の痙攣症状には有効だが、知的障害や精神症状、運動障害には効果が乏しく、かつ食べるのを嫌がる子も多く、高脂血症のリスクもあるため、長期継続が困難である [2, 15, 16]。一方、合成脂質であるトリヘプタノインがジスキネジアの減少をもたらすという報告もあるが、少数例の検討である [17]。以上のように、長期の症状改善が見込める根治治療は現在のところ存在しない。

アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV) ベクターを用いた遺伝子治療研究は以前から行われていたが、改良が進み、現在、世界的に、多くの疾患で治療法が開発されてきている。野生型 AAV は、約 5kb の線状一本鎖 DNA

で、非病原性ウィルスであることから安全性が高い。AAV ベクターは、野生型 AAV の両端の inverted terminal repeats (ITR) 配列を残し、その間にプロモーターや目的遺伝子を組み込んでいる。AAV ベクターは、神経細胞に代表される非分裂細胞に効率よく遺伝子導入が可能であり、かつ長期間の発現が期待できる [18]。血清型によって分布する組織特異性があることが知られ、神経組織では 2 型 AAV ベクターの組織特異性が高く、神経疾患における遺伝子治療研究では、神経組織に組織特異性の高い 2 型 AAV ベクターが用いられることが多かった [18]。さらに 2002 年以降、100 種類以上の AAV 血清型やバリエーションがヒトおよびサルから単離され、標的組織に有効に分布する AAV ベクターの選択に関する研究が進み、その中で、新生児マウスにおいて、9 型 AAV ベクターを経静脈投与すると血液脳関門を通過し中枢神経系に広範囲に分布することが注目されるようになった [19-22]。一方で、AAV ベクターは、小型ウィルスに由来するベクターであるため、挿入できる遺伝子の大きさに限界がある (~4.5kb) [18]。

自治医科大学ではパーキンソン病患者に対する 2 型 AAV ベクターを用いた第 1 相臨床試験の経験がある [23]。小児難治性疾患に対する遺伝子治療としては、2012 年に、台湾から、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic l-amino acid decarboxylase; AADC) 欠損症に対して、2 型 AAV ベクターを用いた 4 例の遺伝子治療について、運動機能および oculogyric crisis の改善が報告された [24]。さらに、自治医科大学でも、2015 年度に AAV ベクターを用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療が患者 4 名に行われ、現在までに運動機能改善等の良好な経過を得ている。今後、他の遺伝性の小児難治性神経疾患に対しても AAV ベクターを用いた遺伝子治療法を開発できれば、治療対象となる患者拡大につながる。

GLUT1DS の原因遺伝子 *SLC2A1* の cDNA は 1,479 塩基対であり、AAV ベクターに挿入可能な大きさである。かつ、マウス *Glut1* 遺伝子ノックアウトマウスのヘテロ体は既に作成されており、小頭、髄液糖低下、脳波異常、運動機能障害、PET 撮影で評価した脳内糖取込能低下といった、ヒト GLUT1DS の古典例に類似した症状を呈することが明らかになっていることから、GLUT1DS モデルマウスとして使用可能である [25, 26]。

以上の背景から、本研究では、新規 GLUT1DS 患者に対する *SLC2A1* 遺伝子変異検索および新規遺伝子変異検出時の機能評価系の確立を第一主題とし、更に GLUT1DS に対する新規治療として、AAV ベクターを用いた、GLUT1DS モデルマウスに対する遺伝子治療を開発することを第二主題とした。



## 2. 対象と方法

### 2.1 GLUT1DS 疑い患者の遺伝子変異解析

#### 2.1.1 対象

2013 年 4 月から 2016 年 3 月において、臨床症状から GLUT1DS が疑われ、本学遺伝子組換え実験計画書（承認番号 13-39, 15-81）に従い同意が得られた患者 2 名について、患者リンパ芽球を用いて *SLC2A1* 遺伝子変異を解析した。以下に患者背景を示す；

患者 1; 18 歳男性。4 か月時に内服治療抵抗性の難治性痙攣で発症。体幹動揺、企図振戦といった小脳失調や知的障害あり。4 歳時に髄液糖低値 (39mg/dl; 基準範囲 50-80mg/dl)、髄液糖血糖比の低値 (0.32; 基準範囲 0.6-0.7)、7 歳時に赤血球の 3-OMG 取込低下 (40%) あり。7 歳時にケトン食療法を開始したが、知的障害 (13 歳時 IQ31)、体幹動揺、痙攣が残存。加えて、長期のケトン食療法により、高脂血症 (T.Chol 220mg/dl; 基準範囲 140-199mg/dl、TG 213mg/dl; 基準範囲 30-149mg/dl) の合併あり。

患者 2; 2 歳女兒。1 か月時に強直性痙攣で発症。髄液糖低値 (40mg/dl)、髄液糖血糖比の低値 (0.40) あり。3 か月時から痙性麻痺あり。

#### 2.1.2 DNA 抽出

患者リンパ芽球を 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) で溶解した後、ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (A5081; Promega Corporation, Madison, WI) を用いて、付属のプロトコールに従い genomic DNA を抽出した。DNA

濃度測定には、NanoDrop 2000 (Thermo scientific, Waltham, MA) を用いた。

### 2.1.3 PCRおよびダイレクトシーケンス

リンパ芽球から抽出したgenomic DNAを用いて、*SLC2A1*の全10エクソンおよびその近傍についてPCRで増幅した。各エクソンのプライマー配列およびアニーリング温度(Tm)を表1に、PCR反応組成液を表2に示す。TaqはTaKaRa TaqおよびTaKaRa LA Taq (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用いた。

Exon	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')	Tm. (°C)
1	AAGAGGCAAGAGGTAGCAACAGC	AGACCGGAGGTTTCATCTCAACC	58
2	TGAACACAGAACTTGCCAGTCC	TGCCACCCTGATTCCAAAGC	58
3	AACTCCAACCCCTTGTTTCTCG	ACAGGCAGATAAGTCTCCCCTACC	58
4	AGGGGAGACTTATCTGCCTGTTCC	CATCTTGCTGTCAACTGGGAGG	63
5	CCTTGTTCATTGTCTCTCCAGC	TGCCGACTCTCTTCTTCATCTC	63
6	ATCAACCGCAACGAGGAGAACC	GCTTGGGGTCTAAAGGGAAACTTC	58
7	AACAACAGATACGCCTCTGCCG	CTTGCCCTCAAGAGCTGAGAAAGTC	65
8	CAGCCTGTGTATGCCACCATTG	GGAGCAAGTTCAAGAGAGGATGTG	58
9	TGTTCCGATGAGGAAACTTAGGC	GGAGTTGAGGTCAGCATTCTTGG	58
10	ATGATAGCATCCCTGGGTAGGTGG	GTCAGGTTTGAAGTCTCATCCAG	58

表1 ヒト*SLC2A1*遺伝子プライマー配列およびアニーリング温度

Exon 1		Exon 2~10	
TaKaRa LA Taq (5U/μl)	0.1 μl	TaKaRa Taq (5U/μl)	0.1 μl
2.5mM dNTP	1.6 μl	2.5mM dNTP	1.6 μl
2 x GC buffer I	10.0 μl	10 x PCR buffer	2.0 μl
Forward primer (20 pmol/μl)	1.0 μl	Forward primer (20 pmol/μl)	1.0 μl
Reverse primer (20 pmol/μl)	1.0 μl	Reverse primer (20 pmol/μl)	1.0 μl
DDW	5.3 μl	DDW	13.3 μl
DNA (50ng/μl)	1.0 μl	DNA (50ng/μl)	1.0 μl
Total	20.0 μl	Total	20.0 μl

表2 ヒト*SLC2A1*遺伝子 PCR 反応条件

PCR反応はGeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使い、エクソン1については94°C 3分反応後、94°C 1分、アニーリング温

度 1分、72°C 1分を35サイクルで行った後、72°C 10分で伸長反応を行った。エクソン2~10については、94°C 3分反応後、94°C 30秒、アニーリング温度 30秒、72°C 30秒を35サイクル行った後、72°C 10分で伸長反応を行った。PCR産物は Biomek 2000 (Beckman Coulter, Brea, CA) で脱塩精製後、Bigdye処理、再脱塩後、3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) で解析した。

## 2.2 変異体 *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターの発現評価および機能評価

### 2.2.1 新規 *SLC2A1* 遺伝子変異のクローニング

2.1.1 の患者 1 において、新規 *SLC2A1* 遺伝子変異が検出された。以下の方法で変異遺伝子を単離した。

#### 1) RNA 抽出

患者リンパ芽球に 1ml の TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を加えピペッティングした後、氷上で 15 分留置した。氷上留置後、200µl のクロロホルムを追加し振盪後、12,000rpm、4 °C、15 分で遠心した。水相に等量のイソプロパノールを加え混和し 10 分静置後、12,000rpm、4 °C、10 分で遠心した。遠心後 RNA ペレットをエタノールで 1 回洗浄し、得られた RNA ペレットを DEPC (Diethylpyrocarbonate) 処理水で溶解した。total RNA 濃度測定には、NanoDrop 2000 を用いた。

#### 2) cDNA 合成

2)で抽出した RNA 2.5µg を使用し、cDNA 合成を行った。cDNA 合成には

SuperScript<sup>®</sup> VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。

### 3) TA cloning

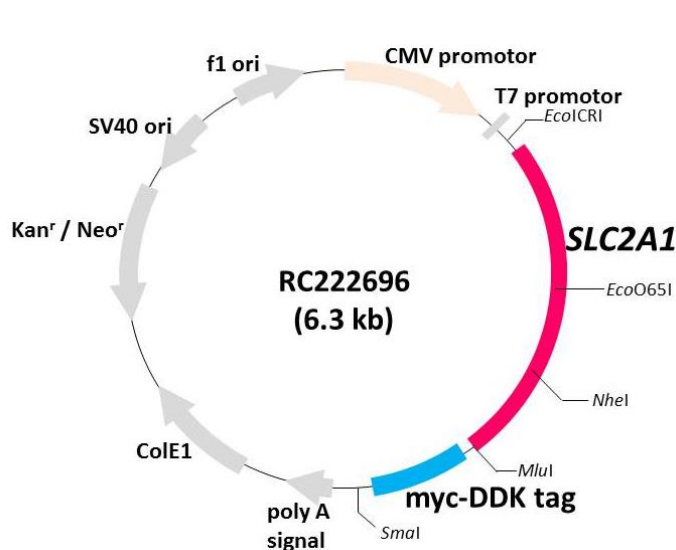
患者検体から合成した cDNA を用い、以下の方法でクローニングを行った；

2.1.1 の患者に検出された遺伝子変異部位を含むプライマーを設計した。プライマー配列を以下に示す； Forward primer； 5'-AGATGAAGGAAGAGAGTCGG-3'， Reverse primer； 5'-CACAGTGAAGATGATGAAGACG-3'。PCR 反応液は、cDNA 1μl に TaKaRa Taq (5U/μl) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 0.1μl、2.5mM dNTP 1.6μl、10x PCR buffer 2μl、Forward primer および Reverse primer (20pmol/μl) 1μl、DDW を加え total 20μl とした。PCR 反応は GeneAmp<sup>®</sup>PCR System 9700 を用い、94°C 3 分反応後、94°C 30 秒、アニーリング温度 (56 °C) 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル行った後、72°C 10 分で伸長反応を行った。PCR 産物のクローニングには、Mighty TA-cloning Kit ((TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用いた。PCR 産物 1μl、pMD20-T vector 1μl と DDW を加え total 5μl としたものに Ligation Mighty Mix 5μl を混合し、16 °C、30 分でライゲーション反応を行った。次に、ライゲーション反応液全量をコンピテントセル (*E. coli* JM109 Competent Cells; TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 100μl に加えて形質転換を行った。形質転換後の大腸菌混濁液は、アンピシリン 50μg/ml を含む LB 寒天培地に 0.1M IPTG 25μl と 2% X-Gal 50μl を塗布した 10cm dish に塗布した。37 °C で一晩培養後、青/白判定で白コロニーを候補とした。白コロニーについて、確認 PCR を Forward primer； 5'-AGATGAAGGAAGAGAGTCGG-3'， Reverse primer； 5'-CACAGTGAAGATGATGAAGACG-3'を用いて上記と同様に PCR 反応を行い、

PCR 産物（予測サイズ; 589bp）をアガロースゲル電気泳動で確認の上、LB 液体培地で培養し、プラスミド精製を行った。プラスミド精製は、Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて付属のプロトコールに従い行った。プラスミド精製後はダイレクトシーケンスで塩基配列を確認した。

## 2.2.2 変異体 *SLC2A1* 遺伝子; 軽症 (A405D), 中等症 (R333W), および重症 (V303fs) 発現ベクターの作製

正常型ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターとして、myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクター (RC222696; Origene Technologies; Rockville, MD) を用いた



(図 2)。

(図 2) 正常型ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターの構造 (Origene 社 website から改変)

ヒト *SLC2A1* cDNA 配列の 3'末端に myc-DDK タグ配列が挿入されている。

myc-DDK; myelocytomatosis-DDK (same sequences as FLAG), epitope tag. CMV promoter; Cytomegalovirus promoter. Kan<sup>r</sup> / Neo<sup>r</sup>; Kanamycin / Neomycin resistance. ColE1; Colicin E1. SV40 ori; Simian Virus 40 origin. f1 ori; class I filamentous phage origin.

変異体 *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターを作製するにあたり、既に報告されている *SLC2A1* 遺伝子変異解析から、軽症例変異として c.1214C>A (p.Ala405Asp; A405D) を、中等症例変異として c.997C>T (p.Arg333Trp; R333W) を選択した [11, 12]。重症例変異として、2.1.1 の患者 1 で検出された新規 *SLC2A1* 遺伝子変異 (c.906\_907insG, p.Val303Glyfs\*77; V303fs) を用いた。軽症および中等症はミスセンス変異、重症はフレームシフト変異となる。

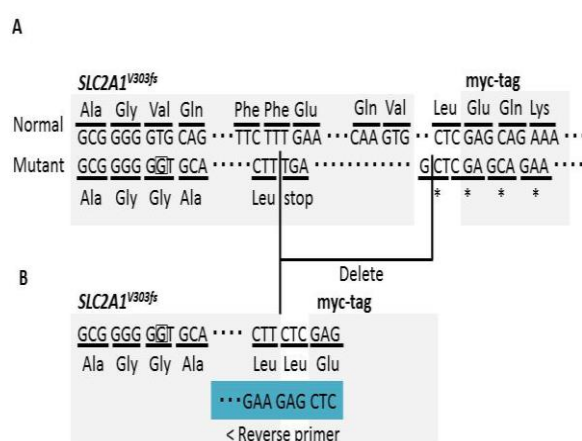
軽症 (A405D) および中等症 (R333W) の遺伝子変異部位は、人工遺伝子を Eurofins Genomics 社に委託し合成した。人工遺伝子として、A405D は、ヒト *SLC2A1* cDNA の塩基配列 1062 番から終末の、1214 番の C を A に変換した配列を合成した。R333W は、ヒト *SLC2A1* cDNA の塩基配列 461 番から 1067 番の、997 番の C を T に変換した配列を合成した。重症型 (V303fs) については 2.2.1 の 3) TA cloning の際に作製した患者変異挿入プラスミドを用いた。myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクター (RC222696; Origene Technologies; Rockville, MD) および患者変異挿入プラスミド、人工遺伝子について、A405D および V303fs は制限酵素 *NheI/MluI* で、R333W は制限酵素 *EcoO65I/NheI* で切断した後ライゲーションし、遺伝子変異配列を myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターに組み込んだ。ライゲーション反応液はコンピテントセル (*E. coli* JM109 Competent Cells; TAKARA BIO INC, Ohtsu, Japan) 100 $\mu$ l に加えて形質転換した。形質転換後の大腸菌混濁液は、カナマイシン 25 $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地 (10cm dish) に塗布した。37 °C で一晩培養後、確認 PCR を Forward primer; 5'-AGATGAAGGAAGAGAGTCGG-3', Reverse primer; 5'-CACAGTGAAGATGATGAAGACG-3'を用いて PCR 反応を行い、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認の上、LB 液体培地で培養し、プラスミド精製を行った。プラスミド精製後はダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を確認した。

### 2.2.3 終止コドンの影響を排除した重症発現ベクター (V303fs without stop codon) の作製

患者 *SLC2A1* 遺伝子変異 (c.906\_907insG, p.Val303Glyfs\*77; V303fs) から作製し

た重症発現ベクターは、一塩基挿入によりフレームシフト変異がおこり、77番目のアミノ酸の後が終止コドン (TGA) となる。タグ蛋白配列は *SLC2A1* cDNA 配列の 3' 末端に挿入しているため、終止コドンの影響を排除するため、終止コドンの前とタグ蛋白配列をつないだベクター (V303fs without stop codon) を作製し、蛋白発現を確認した。V303fs without stop codon は以下の方法で作製した; 2.2.2 で作製した重症 (V303fs) 発現ベクターを制限酵素 *EcoO65I* / *MluI* で切断した後、切断後の断片を Forward primer (*EcoO65I* 切断配列を含む);

5'-GGTCACCATCCTGGAGCTGTTC-3', Reverse primer (終止コドンの前の塩基配列とタグ蛋白配列を含む); 5'-CTCGAGAAGAAGGCCACAAAGCCAAAG-3' で PCR 反応を行った。PCR 反応液は、ベクター 1μl に TaKaRa LA Taq (5U/μl) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 0.1μl、2.5mM dNTP 1.6μl、2x GC buffer I 10μl、Forward primer および Reverse primer (20pmol/μl) 1μl、DDW を加え total 20μl とした。PCR 反応は GeneAmp® PCR System 9700 を用い、94°C 3分反応後、94°C 1分、アニーリング温度 (63 °C) 1分、72°C 1分を 15 サイクル行った後、72°C 10分 で伸長反応を行った。この PCR 反応により、*SLC2A1* の終止コドンが削除され、タグ遺伝子が付加した領域が増幅された (図 3)。



(図 3) V303fs without stop codon の作製

2.2.1 で作製した重症ベクター (A; Mutant) では、フレームシフトにより終止コドンが現れ、タグ蛋白配列部分が翻訳されていない可能性があるため、*SLC2A1* の終止コドンを削除し、タグ遺伝子が付加した領域を増幅させた (B)。

次に、Mighty TA-cloning Kit (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用いて pMD20-T vector に PCR 反応で増幅した配列を組み込んだ。PCR 産物 1 $\mu$ l、pMD20-T vector 1 $\mu$ l と DDW を加え total 5 $\mu$ l としたものに Ligation Mighty Mix 5 $\mu$ l を混合し、16 °C、30 分でライゲーション反応した。次に、ライゲーション反応液全量をコンピテントセル (*E. coli* JM109 Competent Cells; TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 100 $\mu$ l に加えて形質転換した。形質転換後の大腸菌混濁液は、アンピシリン 50 $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地に 0.1M IPTG 25 $\mu$ l と 2% X-Gal 50 $\mu$ l を塗布した 10cm dich に塗布した。37 °C で一晩培養後、青/白判定で白コロニーを候補とした。白コロニーについて、確認 PCR を Forward primer; 5'-ACAGGAAACAGCTATGACCA-3', Reverse primer; 5'-GGTTTTCCAGTCACGACGT-3'を用いて行った。PCR 産物 (予測サイズ; 551bp) をアガロースゲル電気泳動で確認の上、LB 液体培地で培養し、プラスミド精製を行った。プラスミド精製後、ダイレクトシーケンスで塩基配列を解析した。

作製したプラスミドおよび myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクター (RC222696; Origene Technologies; Rockville, MD) は、それぞれ制限酵素 *Eco*O65I / *Xho*I で切断した後ライゲーションし、遺伝子変異配列を myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターに組み込んだ。ライゲーション反応液はコンピテントセル (*E. coli* JM109 Competent Cells; TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 100 $\mu$ l に加えて形質転換した。形質転換後の大腸菌混濁液は、カナマイシン 25 $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地 (10cm dich) に塗布した。37 °C で一晩培養後、確認 PCR を Forward primer; 5'-ACTGTCGTGTCGCTGTTTG-3', Reverse primer; 5'-ATTAGGACAAGGCTGGTG-3'を用いて PCR 反応を行い、PCR 産物をアガロ



ースゲル電気泳動で確認の上、LB 液体培地で培養し、プラスミド精製を行った。プラスミド精製後はダイレクトシーケンスで塩基配列を確認した。

#### 2.2.4 Empty vector の作製

Empty vector は、myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターから *SLC2A1* およびタグ配列を除き作製した。myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクター (RC222696; Origene Technologies; Rockville, MD) を制限酵素 *Eco*ICRI/*Sma*I で切断し、セルフライゲーションした。ライゲーション反応液はコンピテントセル (*E. coli* JM109 Competent Cells; TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 100 $\mu$ l に加えて形質転換した。形質転換後の大腸菌混濁液は、カナマイシン 25 $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地 (10cm dish) に塗布した。37 °C で一晩培養後、コロニーを採取し確認 PCR を行った; Forward primer; 5'-GGACTTTCCAAAATGTCG-3'、Reverse primer; 5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGGG-3'、PCR 反応液は、TaKaRa Taq (5U/ $\mu$ l) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 0.1 $\mu$ l、2.5mM dNTP 1.6 $\mu$ l、10x PCR buffer 2 $\mu$ l、Forward primer および Reverse primer (20pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l、DDW を加え total 20 $\mu$ l とし、採取したコロニーを懸濁した。PCR 反応は GeneAmp<sup>®</sup>PCR System 9700 を使い、94°C 3 分反応後、94°C 30 秒、アニーリング温度 (58 °C) 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル行った後、72°C 10 分で伸長反応を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認 (169bp) の上、LB 液体培地で培養し、プラスミド精製を行った。プラスミド精製後はダイレクトシーケンスで塩基配列を確認した。

#### 2.2.5 HEK293 細胞に対する正常型/変異体 *SLC2A1* 遺伝子発現・機能評価

## 1) 培養細胞

培養細胞は、遺伝子導入効率が良好である HEK293 細胞 (Human Embryonic Kidney; ヒト胎児腎細胞) を選択した。HEK293 細胞 (EC85120602-G0; DS Pharma Biomedical Co. Ltd, Osaka, Japan) は非動化した 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) と 1% NEAA (Non Essential Amino Acids) を加えた EMEM (Eagle's minimal essential medium) 培地 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) を使用し 5% CO<sub>2</sub> 下、37℃で培養した。

## 2) Western blot analysis

HEK293 細胞は、遺伝子導入 1 日前に、35mm dish (9cm<sup>2</sup>/well) に 1 x 10<sup>6</sup> cells を播種した。遺伝子導入 1 時間前に Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) に培地交換した。myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターおよび変異体 *SLC2A1* 遺伝子ベクター、Empty vector 各 2.5μg を Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) 7.5μl に混合し室温に 20 分静置した上で、35mm dish に DNA-lipid 複合体溶液を播種した。遺伝子導入 6 時間後に、通常の培地に交換し培養継続した。遺伝子導入 48 時間後に、培地除去し、PBS (-) で 3 回洗浄後、TNE buffer (20mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA) 0.2ml/ dish で細胞を回収した。細胞回収後は超音波破碎し、上清 50μl を 2x SDS サンプルバッファー 50μl (最終濃度が 0.125M Tris-HCl (pH6.8)、10% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、0.01% ブロモフェノールブルー、40% グリセオールとなるよう調整) と混合し、95℃ 3 分で熱処理した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、DRC ERICA MP 電気泳動槽 (XV PANTERA MP SYSTEM; DRC CO. LTD.,

Tokyo, Japan) で行った。熱処理後の細胞溶解液は、各 well に 8 $\mu$ l を XV PANTERA MP Gel (ゲル濃度 10%) (丸幸商会) にアプライし、300V、12 分間の SDS-PAGE 電気泳動し、その後 45V、22 分間で Polyvinylidene Difluoride (PVDF) メンブレン (Immun-Blot PVDF; Bio-Rad) に蛋白転写した。蛋白転写後のメンブレンを用いて、immunoblot analysis を行った。メンブレンは、5% スキムミルク、0.1% Tween20 を含む PBS (PBST) で室温、1 時間でブロッキングし、一次抗体として mouse monoclonal c-myc 抗体 (sc-40; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:100 を用いて 4 °C 一晩反応させた。PBST で 3 回洗浄後、二次抗体は goat anti-mouse IgG Horse Radish Peroxidase (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:2000 を用いて室温、1 時間で反応させた。PBST で 3 回洗浄後、HRP Substrate (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) で 2 分反応させ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare UK Ltd. Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, England) を用いて蛍光検出した。

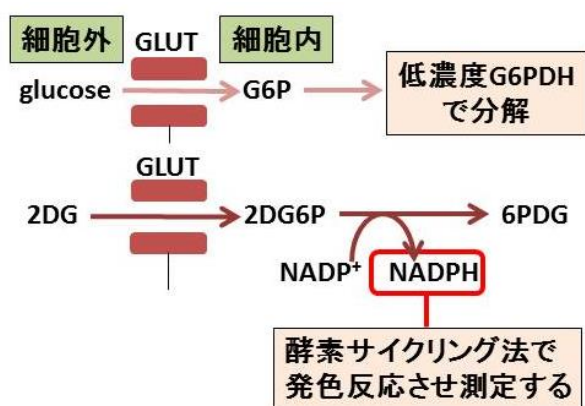
### 3) 細胞免疫染色

HEK293 細胞は、遺伝子導入 1 日前に、8 well chamber slide (0.8cm<sup>2</sup> /well; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) に 5 x 10<sup>4</sup> cells を播種した。遺伝子導入 1 時間前に Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) に培地交換した。myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターおよび変異体 *SLC2A1* 遺伝子ベクター、Empty vector 各 400ng を Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) 1 $\mu$ l に混合し室温に 20 分静置した上で、各 well に DNA-lipid 複合体溶液を播種した。遺伝子導入 6 時間後に、通常の培

地に交換し培養継続した。遺伝子導入 48 時間後に、培地除去し、無血清培地で 2 回洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。細胞固定後、1 x PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングバッファー（4%ヤギ血清、0.1% TritonX100 含有 PBS）で 1 時間、室温でインキュベートした。一次抗体は、mouse monoclonal c-myc 抗体（sc-40; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）1:150 および rabbit polyclonal GLUT1 (N-term) 抗体（TA301678; OriGene Technologies, Rockville, MD）1:100 を用いて 4 °C 一晩反応させた。一次抗体除去後は、0.1%TritonX100 含有 PBS で 3 回洗浄後、二次抗体として goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594 および goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1:250 を用いて 2 時間室温で反応させた。二次抗体除去後、0.1%TritonX100 含有 PBS で 3 回洗浄および 1 x PBS で 1 回洗浄の後、核染色として Hoechst33342 1:5000 を用いて 37 °C、15 分間反応させた。作成した標本は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

#### 4) 2-deoxyglucose (2DG) を用いた糖取込機能評価

遺伝子導入後の HEK293 細胞における糖取込機能評価として、2DG 代謝速度測定キット（COSMO BIO, Tokyo, Japan）を用いた（図 4）。



(図 4) 2DG 取込試験の原理

2DG 取込試験は、予め細胞内外に存在しているグルコース代謝産物を分解させた上で、外因性 2DG を GLUT を介して取り込ませ、2DG 代謝の過程で産生される NADPH を酵素サイクリング法で発色反応させ測定する [27]。

HEK293 細胞は、遺伝子導入 1 日前に、35mm dish (9cm<sup>2</sup> /well) に 1 x 10<sup>6</sup> cells を播種した。遺伝子導入 1 時間前に Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) に培地交換した。myc-DDK タグ付ヒト *SLC2A1* 遺伝子発現ベクターおよび変異体 *SLC2A1* 遺伝子ベクター、Empty vector 各 2.5μg を Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) 7.5μl に混合し室温に 20 分静置した上で、35mm dish に DNA-lipid 複合体溶液を播種した。遺伝子導入 6 時間後に、通常の培地に交換し培養継続した。2DG 取込試験の前日夜に無血清培地 (EMEM) に交換し一晚培養の上、遺伝子導入 48 時間後から以下の方法で 2DG 取込試験を行った。各 dish を Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES (4-(2-HydroxyEthyl)-1-Piperazine Ethane Sulfonic acid)(KRPH) バッファー (1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3mM CaCl<sub>2</sub>, 118mM NaCl, 5mM KCl, 30mM HEPES, pH7.5) で 3 回洗浄後、2%BSA 含有 KRPH バッファー 2ml/well で 37 °C、40 分培養した。培養後、2DG 溶液を 1mM/well となるよう添加し、37 °C、20 分培養した。2DG 反応後は冷却した 200μM フロレチン含有 PBS で 3 回洗浄し 2DG 反応を停止させた。細胞は 10mM Tris-HCl (pH8.0) を 2ml/well 加えて回収し、超音波破碎した後に 80 °C、15 分間熱処理した。熱処理後、4 °C、15,000G、20 分で遠心分離し、回収した上清を次の反応に用いた。回収した上清は附属のプロトコールに従い酵素サイクリング反応を行った。上清を附属の検体希釈液で 10 倍希釈した上で、低濃度 G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 溶液を加え室温一晚放置しグルコース代謝産物 (glucose, G6P) を分解した。分解時に産生された NADH は 1M HCl を加え 38 °C、1 時間で除去した。HCl は 1M NaOH、50mM Tris-HCl で中和した。次に、細胞内に取り込まれた 2DG が 2-Deoxyglucose

6-phosphate (2DG6P)となり残存しているため、高濃度 G6PDH 溶液を加え 38 °C、1 時間で酸化させると同時に NADPH が産生されるため、産生された NADPH を酵素サイクリング法で発色させ Benchmark Plus Microplate Reader (Bio Rad, Hercules, CA) で 420nm 波長における吸光度変化を 0~30 分後まで 10 分毎に測定した。各検体について 3 回解析し、発色反応 30 分後の平均値および標準誤差をグラフに示した。

## 2.3 ヒト *SLC2A1* 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h*SLC2A1*) による、ヒト培養細胞および疾患モデルマウスへの発現評価・機能評価

### 2.3.1 ヒト *SLC2A1* 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h*SLC2A1*) の作製

ヒト *SLC2A1* 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h*SLC2A1*) は、本学東洋医学講座にて作製された。AAV-h*SLC2A1* は、表面のチロシン残基を変異させた 9 型 AAV ベクターの外殻蛋白質を含む、チロシン変異型 AAV9/3 ベクターである。以下に具体的な作製方法を示す；AAV ベクターは、ニューロン発現特異性を有するシナプシン I プロモーターの下流に、ヒト *SLC2A1* cDNA 配列および myc-DDK (FLAG®) タグ配列 (myc: 5'-GAGCAGAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG-3', DDK; 5'-GATTACAAGGATGACGACGATAAG-3')、woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE)、simian virus 40 ポリアデニル化構造を連結した発現カセットを含んでいる。この発現カセットは、3 型 AAV の ITR 配列間に挿入した。9 型 AAV (AAV9) の外被蛋白質をコードする viral capsid proteins (VP) 部分の DNA は、既報と同様に、1337 番のチミジンをアデニンに変換して合成した [28]。この塩基置換により、446 番のアミノ酸がチロシンからフェニルアラニ

ンに置換されている。組換え AAV ベクターは、HEK293 細胞に、①*SLC2A1* 遺伝子発現カセットを含む AAV ベクタープラスミド、②AAV3 の related nonstructural proteins (Rep) と AAV9 の VP を発現させるプラスミド、③アデノウイルスヘルパープラスミド pHelper (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を同時に遺伝子導入することで作製した。組換え AAV ベクターは CsCl 密度勾配法による超遠心法で精製し、力価を定量 PCR で測定した (図 5a)。最終的な臨床応用を想定し、タグ蛋白配列を除いた AAV-h*SLC2A1* (untagged AAV-h*SLC2A1*) も同様に作製した (図 5b)。



(図 5) AAV-h*SLC2A1* の構造

神経細胞発現効率を上げるため、ニューロン特異的プロモーターであるシナプシン 1 プロモーターをヒト *SLC2A1* cDNA 配列の 5'側に挿入した。

ITR: inverted terminal repeat; WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; SV40 polyA: simian virus 40 poly A.

### 2.3.2 SH-SY5Y 細胞に対する AAV-h*SLC2A1* を用いた遺伝子発現評価

AAV-h*SLC2A1* を用いた感染実験の第一段階として、ヒト神経系培養細胞への感染および蛋白発現確認を行った。

#### 1) 培養細胞

ヒト神経系培養細胞への発現確認を目的として、培養細胞はヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y 細胞を選択した。SH-SY5Y 細胞 (EC94030304-F0; DS Pharma Biomedical Co. Ltd, Osaka, Japan) は、非動化した 15% (v/v) FBS と 1%NEAA を

加えた Ham's F12/EMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) を使用し 5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で培養した。

## 2) 細胞免疫染色

SH-SY5Y 細胞は、感染実験 1 日前に、8 well chamber slide (0.8cm<sup>2</sup>/well; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) に 1 x 10<sup>5</sup> cells を播種した。5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で 24 時間培養後、無血清培地 (Ham's F12/EMEM) に交換し、AAV-h*SLC2A1* を 3.7 x 10<sup>4</sup>/cell で播種した。感染実験 3 時間後に、通常の培地に交換し培養継続した。感染実験 40 時間後に、培地除去し、無血清培地で 2 回洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。細胞固定後、1 x PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングバッファー (4%ヤギ血清、0.1% TritonX100 含有 PBS) で 1 時間、室温にてインキュベートした。一次抗体は、mouse monoclonal c-myc 抗体 (sc-40; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:150 および rabbit polyclonal GLUT1 (N-term) 抗体 (TA301678; OriGene Technologies, Rockville, MD) 1:100 を用いて 4 °C 一晩反応させた。一次抗体除去後は、0.1%TritonX100 含有 PBS で 3 回洗浄後、二次抗体として goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594 および goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1:250 を用いて 2 時間室温で反応させた。二次抗体除去後、0.1%TritonX100 含有 PBS で 3 回洗浄および 1 x PBS で 1 回洗浄の後、核染色として Hoechst33342 1:5000 を用いて 37 °C、15 分間反応させた。作成した標本は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

### 2.3.3 GLUT1DS モデル動物に対する AAV-h*SLC2A1* 投与



## 1) GLUT1DS モデル動物

GLUT1DS モデル動物として、マウス *Glut1* 遺伝子ノックアウトマウスのヘテロ体 (GLUT1<sup>+/-</sup>マウス) を用いた。GLUT1<sup>+/-</sup>マウスは東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野で作製した凍結受精卵を譲与され、本学で繁殖した。*Glut1* 遺伝子ノックアウトマウスは、マウス *Glut1* 遺伝子のイントロン 1 に neomycin resistance (*neo*)、ポリアデニル化構造、マウス phosphoglycerate kinase (*Pgk*) プロモーター、マウス Bruton's tyrosine kinase (*Btk*) 遺伝子を組み込み、*Glut1* 遺伝子が無効化している [25]。*Glut1* 遺伝子ノックアウトマウスのホモ体 (GLUT1<sup>-/-</sup>マウス) は胎生致死となる。GLUT1<sup>+/-</sup>マウスは、小頭、髄液糖低下、運動機能障害、脳波異常、positron emission tomography (PET) スキャンによる糖取込低下が確認されており、ヒト GLUT1DS の典型例と症状が類似しているため、GLUT1DS モデルマウスに用いた [25, 26]。正常表現型モデル動物として、C57BL/6J マウスを用いた。すべての動物実験は、本学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号 16-192)。

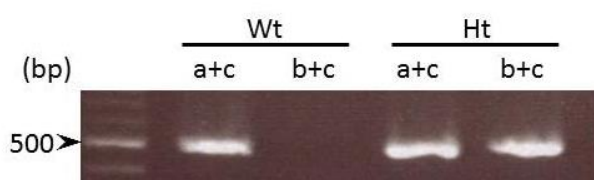
## 2) *Glut1* 遺伝子ノックアウトマウスの遺伝型検定

マウスの尾を採取後、50 $\mu$ l の DDW を加え 95 $^{\circ}$ C 10 分加熱し、液温が室温まで低下したのを確認後、proteinase K (2mg/ $\mu$ l) 12.5 $\mu$ l を加え、55 $^{\circ}$ C 120 分インキュベーションし、95 $^{\circ}$ C 10 分加熱させ反応を停止させ DNA を抽出した。

遺伝型検定用プライマーは、*Glut1* 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列上に設定した Forward primer (a)、*Btk* 遺伝子の塩基配列上に設定した Forward primer (b)、primer a,b の 3'端の *Glut1* イントロン 1 の塩基配列上に設定した Reverse primer (c) の 3 種類を作成した。GLUT1<sup>+/+</sup>マウス (wild type マウス) では primer a+c の

み PCR で増幅され、GLUT1<sup>+/-</sup>マウスは primer a+c, b+c で PCR 増幅される。各プライマー配列を以下に示す； Forward primer (a); 5'-GGGCCACAGTGATAGAGATAGAATG-3', Forward primer (b); 5'-AAATGGCGTTACTTAAGCTAGCTTGC-3', Reverse primer (c); 5'-GTGTGACTTTAGGAAACTTACTTCCC-3'。

PCR 反応組成液は、primer a+c, b+c とともに、DNA 3μl に、TaKaRa Ex Taq (5U/μl) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 0.1μl、2.5mM dNTP 1μl、10× Ex Taq buffer 1.2μl、Forward primer (50pmol/μl) 0.075μl、Reverse primer (50pmol/μl) 0.075μl、DDW を加え、total 12μl にした。PCR 反応は GeneAmp®PCR System 9700 を用い、94°C 3 分反応後、94°C 30 秒、アニーリング温度 (60 °C) 30 秒、72°C 1 分を 40 サイクル行った後、72°C 10 分で伸長反応を行った。PCR 産物は、primer a+c が 488bp、primer b+c が 504bp となる。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した (図 6)。



(図 6) Glut1 遺伝子ノックアウトマウスの遺伝型検定

a+c; 488bp, b+c; 504bp  
Wt; GLUT1<sup>+/+</sup>マウス  
Ht; GLUT1<sup>+/-</sup>マウス

### 3) GLUT1<sup>+/-</sup>マウスに対する AAV-hSLC2A1 投与

AAV-hSLC2A1 投与経路は、全身投与として腹腔内投与および局所投与として脳室内投与を選択した。

腹腔内投与群は、日齢 7 に AAV-hSLC2A1 1.85 x 10<sup>11</sup> vg (マウス 1 匹あたり 50μl) を投与した。腹腔内投与時期としては、中枢神経系の非可逆的障害がない新生児早期、投与量は腹腔内投与できる最大容量とした。

脳室内投与群は、6 週齢に AAV-h*SLC2A1* 合計  $1.85 \times 10^{10}$  vg (マウス 1 匹あたり 5 $\mu$ l) を両側側脳室に投与した。GLUT1DS は、Ito らの報告では平均 8.4 歳で診断されており[3]、一般的には乳児期から学童期に診断されるため、診断後治療を想定し、6 週齢の若年マウスに脳室内投与した。以下に脳室内投与の具体的方法を示す；

GLUT1<sup>+/-</sup>マウスは CO<sub>2</sub> 麻酔し、麻酔後、マウス用脳定位固定装置に頭部固定した。頭蓋骨を露出させ、bregma 縫合の後方 0.5mm、矢状縫合から 1mm の位置で骨を切削し、脳電気生理用ガラス管電極を深さ 1.75mm の深さに進めた。投与するベクターは予めガラス管電極に充填しておき、シリンジポンプを用いて 0.25 $\mu$ l/分の速度で投与した。コントロール群として、6 週齢の GLUT1<sup>+/-</sup>マウスに、マウス 1 匹あたり合計 5 $\mu$ l の生理食塩水を両側側脳室に投与した。各マウスについて、治療前のマウス体重および治療後脳採取時のマウス体重、脳重量を測定した。

#### 2.3.4 AAV-h*SLC2A1* 投与後の内因性および外因性 *GLUT1* mRNA 発現評価

##### 1) RT-PCR

AAV-h*SLC2A1* 投与 2 か月後にマウスは CO<sub>2</sub> 麻酔下で安楽死させ、脳採取した。脳採取後、大腦を分離し RNA 抽出した。大腦組織 25~40mg あたり 1ml の TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を加えピペッティングした後、氷上で 15 分留置した。氷上留置後、200 $\mu$ l のクロロホルムを追加し振盪後、12,000rpm、4 °C、15 分で遠心した。水相に等量のイソプロパノールを加え混和し 10 分静置後、12,000rpm、4 °C、10 分で遠心した。遠心後 RNA ペレットをエタノールで 1 回洗浄し、得られた RNA ペレットを DEPC 処理水で溶解した。RNA 抽出後は、NanoDrop 2000 で RNA 濃度測定した。得られた RNA 1 検体あたり 2.5 $\mu$ g を使用し、SuperScript® VILO

cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、付属のプロトコールに従い cDNA 合成した。以下の RT-PCR では、各反応に cDNA 1 $\mu$ l を使用した。

外因性 *GLUT1* mRNA 発現を確認するため、ベクター特異的 RT-PCR を行った。ベクター特異的 RT-PCR は、reverse primer を myc 配列上に設定した。以下に PCR 条件を示す; Forward primer; 5'-ACTGTCGTGTCGCTGTTTG-3'、Reverse primer; 5'-TGCTGCCAGATCCTCTTCTG-3'、PCR 反応液は、TaKaRa Taq (5U/ $\mu$ l) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 0.1 $\mu$ l、2.5mM dNTP 1.6 $\mu$ l、10x PCR buffer 2 $\mu$ l、Forward primer および Reverse primer (20pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l、DDW を加え total 20 $\mu$ l とした。PCR 反応は GeneAmp®PCR System 9700 を用い、94°C 3 分反応後、94°C 30 秒、アニーリング温度 (58 °C) 30 秒、72°C 30 秒を 27 サイクル行った後、72°C 10 分で伸長反応を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認 (570bp) した。同時に、内因性および外因性 *GLUT1* mRNA 発現を確認した。プライマーはヒト *SLC2A1* およびマウス *Slc2a1* 配列が一致している塩基配列に設定した。以下に PCR 条件を示す; Forward primer; 5'-AACTGGGCAAGTCCTTTG-3'、Reverse primer; 5'-TTCTTCTCCCGCATCATCTG-3'、PCR 反応液は、TaKaRa Taq (5U/ $\mu$ l) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 0.1 $\mu$ l、2.5mM dNTP 1.6 $\mu$ l、10x PCR buffer 2 $\mu$ l、Forward primer および Reverse primer (20pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l、DDW を加え total 20 $\mu$ l とした。PCR 反応は GeneAmp®PCR System 9700 を用い、94°C 3 分反応後、94°C 30 秒、アニーリング温度 (54 °C) 30 秒、72°C 30 秒を 25 サイクル行った後、72°C 10 分で伸長反応を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認 (427bp) した。RT-PCR 解析における定量的コントロールとしてヒト・マウス・ラット共通 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) primer

(TOYOBO, Osaka, Japan) を用いた; Forward primer;

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'、Reverse primer;

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'、PCR 反応液は、TaKaRa Taq (5U/μl)

(TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) 0.1μl、2.5mM dNTP 1.6μl、10x PCR buffer 2μl、

Forward / Reverse primer (50pmol/μl) 0.4μl、DDW を加え total 20μl とした。PCR

反応は GeneAmp®PCR System 9700 を用い、94°C 3 分反応後、94°C 30 秒、ア

ニリング温度 (58 °C) 30 秒、72°C 30 秒を 25 サイクル行った後、72°C 10 分

で伸長反応を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認 (452bp) した。

## 2) リアルタイム PCR

マウス脳から抽出した RNA 2.5μg から cDNA 合成を行い、合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。外因性 *GLUT1* mRNA 定量では、reverse primer を myc 配列上に設定した。以下に primer および蛍光色素 (FAM / TAMRA) でラベルされた probe の塩基配列を示す; Forward primer;

5'-TTCGATGAGATCGCTTCCG-3'、Reverse primer;

5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTCTGC-3'、The dual fluorescently-labeled

(FAM/TAMRA) probe; 5'-TGGAACAGCTCCTCGGGTGTCTTGTCACCTTG-3'。外

因性および内因性 *GLUT1* mRNA 定量では、primer はヒト *SLC2A1* およびマウス

*Slc2a1* 配列が一致している塩基配列に設定した。以下に primer および蛍光色素

(FAM / TAMRA) でラベルされた probe の塩基配列を示す; Forward primer;

5'-AAGTCCTTTGAGATGCTGATCC-3'、Reverse primer;

5'-CCCACATACATGGGCAC-3'、The dual fluorescently-labeled (FAM/TAMRA)

probe; 5'-TCAGGCCGCAGTACACACCGATGATGAA-3'。内在性コントロールは TaqMan® Gene Expression Assays のマウス *Gapdh* プライマー・プローブセット (Mm00484668\_m1; Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いた。反応液は、cDNA 1μl に 2× TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 10μl、primers および probe を加え total 20μl とした。Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、95°C 20 秒 反応後、95°C 3 秒、60°C 30 秒を 40 サイクルで定量 PCR 反応を行った。

### 2.3.4 AAV-h*SLC2A1* 投与後の内因性および外因性 GLUT1 蛋白発現評価

#### 1) 組織免疫染色

AAV-h*SLC2A1* 投与 3 か月後に、マウスは CO<sub>2</sub> 麻酔下で安楽死させ、脳採取した。脳組織は 4%パラホルムアルデヒドで 4 °C 一晩固定後、10-30%スクロース溶液で置換した。Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) で包埋し-80 °C で凍結し、クリオスタットで厚さ 10μm の矢状断の凍結切片を作製した。凍結切片は 1 x PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングバッファー (4%ヤギ血清又は 1%ウシ血清アルブミンおよび 0.1% TritonX100 含有 PBS) で 30 分、室温にてインキュベートした。ブロッキング後、以下の一次抗体を使用した; rabbit polyclonal anti-myc-tag (1:250) (562; MBL, Nagoya, Japan)、rabbit polyclonal anti-GLUT1 (N-terminus) (1:100) (TA301678; OriGene Technologies, Rockville, MD)、chicken polyclonal anti-beta III tubulin (1:3000) (ab107216; Abcam Plc., Cambridge, UK)、goat polyclonal anti-PLP1 (1:50) (sc-18529; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、goat polyclonal anti-GFAP (1:50) (sc-6170; Santa Cruz Biotechnology, Santa

Cruz, CA)、goat polyclonal anti-CD31/PECAM-1 (1:45) (AF3628; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)。一次抗体は 4 °C 一晩反応させた。一次抗体除去後は、0.1%TritonX100 含有 PBS で 3 回洗浄後、以下の二次抗体を使用した; goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:250)、donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:250)、donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594 (1:250)、goat anti-chicken IgY Alexa Fluor 594 (1:250) (Invitrogen, Carlsbad, CA)。二次抗体は 37°C、1 時間で反応させた。二次抗体除去後、0.1%TritonX100 含有 PBS で 3 回洗浄および 1 x PBS で 1 回洗浄の後、核染色として Hoechst33342 (1:5000) (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて 37 °C、15 分間反応させた。作成した標本は蛍光顕微鏡 AX70 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

## 2) Western blot analysis

AAV-h*SLC2A1* 投与 2 か月後にマウスは CO<sub>2</sub> 麻酔下で安楽死させ、脳採取した。大脳を分離し、脳重量の 5 倍の蛋白抽出液を使用した。蛋白抽出液の組成を以下に示す; 50 mM NaF、5 mM EDTA (pH 7.4)、1 protease inhibitor tablet (SigmaFAST™; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、1mM PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、1% Triton X-100 含有 PBS。脳組織は超音波破碎し、氷上で 30 分静置した。その後、4 °C、20,600 x g、30 分遠心分離し、上清の一部を用いて Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) で蛋白質濃度測定した。上清は、2x SDS サンプルバッファー(最終濃度が 0.125M Tris-HCl (pH6.8), 10% 2-メルカプトエタノール, 4%SDS, 0.01%ブロモフェノールブルー, 40%グリセオールとなるよう調整)と混合し、最終蛋白濃度が 2µg/µl となるよう調整し、95 °C 、3 分

熱処理した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、DRC ERICA MP 電気泳動槽 (XV PANTERA MP SYSTEM; DRC CO. LTD., Tokyo, Japan) で行った。熱処理後の細胞溶解液は、各 well に 5 $\mu$ l (総蛋白量 10 $\mu$ g) を XV PANTERA MP Gel (ゲル濃度 10%) (丸幸商会) にアプライし、300V、12 分間の SDS-PAGE 電気泳動を行い、その後 45V、22 分間で PVDF メンブレンに蛋白転写した。蛋白転写後のメンブレンを用いて、immunoblot analysis を行った。メンブレンは、5% スキムミルク、0.1%Tween20 を含む PBS (PBST) で室温、1 時間でブロッキングし、一次抗体として以下を用いた; rabbit polyclonal anti-GLUT1 (N-terminus) (1:500) (TA301678; OriGene Technologies, Rockville, MD)、mouse monoclonal anti-beta-actin (1:2000) (A1978; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。一次抗体は 4 $^{\circ}$ C、一晩反応させた。PBST で 3 回洗浄後、二次抗体は goat anti-mouse IgG Horse Radish Peroxidase (1:2000) (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) および anti-mouse IgG HRP (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いて室温、1 時間で反応させた。PBST で 3 回洗浄後、HRP Substrate (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) で 2 分反応させ、ImageQuant LAS 4000 で蛍光検出した。

### 2.3.6 AAV-hSLC2A1 投与後の運動機能評価

#### 1) rota-rod test

10 週齢 (AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 4 週後に一致) および 14 週齢 (AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 8 週後に一致) の C57BL/6J マウス (GLUT1<sup>+/+</sup>マウス) および GLUT1<sup>+/-</sup>マウスについて rota-rod test を行った。GLUT1<sup>+/-</sup>マウスについては、AAV-h*SLC2A1* 腹腔内投与群、AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与群、コントロール群として



の生理食塩水脳室内投与群について分類し検査を行った。使用機器は、直径 3cm の回転する円筒が付属するシングルレーンの加速型自動 rota-rod (O'Hara and Co., Tokyo, Japan and Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。回転速度は 5 分間で 4 revolutions per minute (rpm) から最大 40 rpm まで到達する設定とし、マウスは低速で回転開始すると同時に円筒の真上にのせ、円筒の回転に反して落下しないよう前進する習性を利用し、落下するまでの円筒滞在時間を記録した。以下に具体的な方法を示す; マウスは、1 個体毎に円筒にのせ、4-40 rpm の加速モードで 30 分毎 3 回、連続 2 日間訓練した後、2 日目訓練終了 30 分後における、4-40 rpm の加速モードでの円筒滞在時間を記録した。すべての訓練および記録は午前 9 時から 12 時の間に行った。マウスの性別については、過去の文献で GLUT1<sup>+/+</sup>マウス、GLUT1<sup>+/-</sup>マウスともに rota-rod test による運動機能検査に性差がないことが報告されていたため [26]、各群について雄雌混合で検査した。

## 2) footprint test

10 週齢 (AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 4 週後に一致) および 14 週齢 (AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 8 週後に一致) の C57BL/6J マウス (GLUT1<sup>+/+</sup>マウス) および GLUT1<sup>+/-</sup>マウスについて footprint test を行った。GLUT1<sup>+/-</sup>マウスについては、rota-rod test と同様に、AAV-h*SLC2A1* 腹腔内投与群、AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与群、コントロール群としての生理食塩水脳室内投与群について分類し検査を行った。長さ 50cm、幅 10cm、高さ 30cm で、両端のうち片側が暗くなる通路を使用し、各日 2 回、連続 2 日間訓練した後、後肢に墨汁を付着し走路を暗い方へ歩かせた。足跡は、stride length (cm); 進行方向に対する同側の足跡間の距離、inter-step

length (cm); 進行方向に対する右足と左足の間の距離、hindpaw base width (cm); 右足と左足の間の幅について、3 歩の平均値について解析に用いた。

### 2.3.7 AAV-h*SLC2A1* 投与後の髄液糖・血糖測定

14 週齢 (AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 8 週後に一致) の C57BL/6J マウス (GLUT1<sup>+/+</sup>マウス) および GLUT1<sup>+/-</sup>マウスについて、髄液糖測定および血糖測定を行った。GLUT1<sup>+/-</sup>マウスについては、AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与群と、無治療群について検査を行った。マウスは、一晩絶食後、CO<sub>2</sub> 麻酔した。麻酔後安静時に、外側尾静脈を剃刀で浅く切り血液採取し、簡易血糖測定器 ACCU CHECK Aviva (Roche Diagnostics K. K., Tokyo, Japan) で血糖測定した。髄液は、過去の文献の方法を一部改変し、マウス大槽から採取した [29]。採取時、明らかに trauma tap となった検体は除外した。採取した髄液糖濃度は、FUJI DRI-CHEM 3500V Chemistry Analyzer (FUJIFILM Holding Corporation, Tokyo, Japan) で測定した。

## 2.4 統計学的解析

得られたデータについて、二群間の比較についてはスチューデントの t 検定を、多群間比較については Dunnett 法による多重比較を行った。いずれの検定法についても、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

### 3. 結果

#### 3.1 GLUT1DS 疑い患者の *SLC2A1* 遺伝子変異解析

*SLC2A1* 遺伝子変異解析を行った GLUT1DS 疑い患者 2 名の内、重症型患者 1 名（患者 1）において *SLC2A1* 遺伝子の新規フレームシフト変異（c.906\_907insG, p.V303fs）を同定した（図 7）[30]。

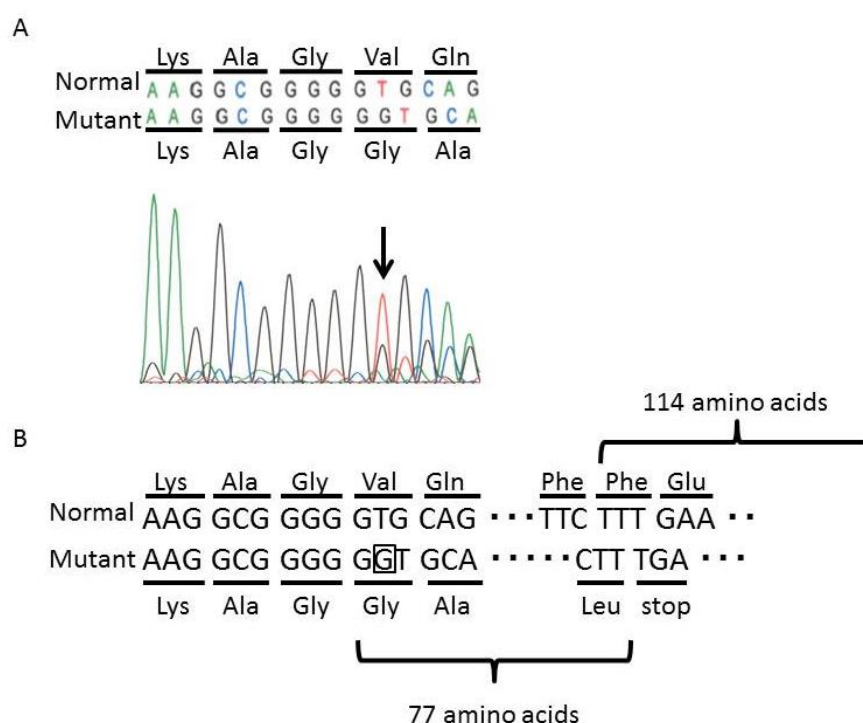


図 7 重症型 GLUT1DS 患者で同定された *SLC2A1* 遺伝子変異

A; 患者 1 のリンパ芽球から抽出した genomic DNA のダイレクトシーケンシング解析。一塩基挿入によるヘテロ接合性のフレームシフト変異（矢印; c.906\_907insG, p.V303Gfs\*77）を同定した。

B; 正常型と変異型 allele の塩基配列の模式図。一塩基挿入により 303 番目のアミノ酸がバリンからグリシンに変化する。その後、77 番目のアミノ酸の後に終止コドンが出現する。図は文献 [30] から一部改変した。

同定したフレームシフト変異は、6,500 exomes of the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project Exome Variant Server および database of common gene variations in the Japanese population (JSNP) において

登録がないことを確認した。患者 2 には変異が検出されなかった。

### 3.2 HEK293 細胞に対する正常型/変異体 *SLC2A1* 遺伝子導入および蛋白発現

*SLC2A1* 遺伝子変異による蛋白レベルの発現への影響を確認する目的で、3.1 で同定したフレームシフト変異（重症型）に加え、既に報告されている *SLC2A1* 遺伝子変異解析から、軽症として c.1214C>A (p.Ala405Asp; A405D) を、中等症として c.997C>T (p.Arg333Trp; R333W) を選択し、HEK293 細胞へ遺伝子導入し蛋白発現評価を行った [11, 12]。図 8 に GLUT1 二次構造および結晶構造における各変異の位置を示す。

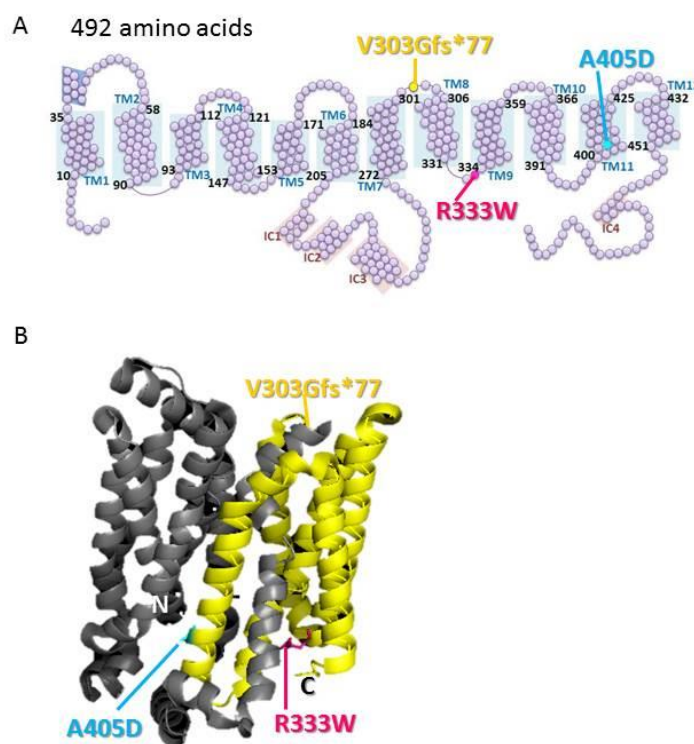
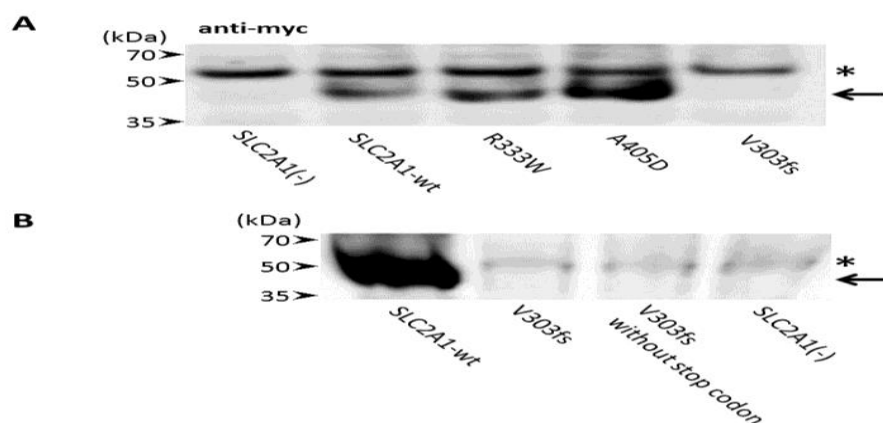


図 8 GLUT1 構造および各変異の位置

A; 二次構造、B; 結晶構造。GLUT1 は 12 回膜貫通型の、細胞膜に位置する蛋白で、N 端および C 端は細胞質側に位置する。重症 (V303Gfs\*77; 黄)、中等症 (R333W; 水色)、軽症 (A405D; マゼンダ) の位置を点で示す。重症のフレームシフト変異は、膜貫通構造の 7 番目と 8 番目の間の外側に位置し、以後のアミノ酸は正確に翻訳されない(B; 黄)。図は文献 [30] から転記した。

遺伝子導入後の蛋白発現は、ウェスタンブロット法および細胞免疫染色で評価した。

ウェスタンブロット法は、抗 myc 抗体を用いて、GLUT1-myc 融合蛋白の発現を確認した。正常型および変異体発現ベクターは、すべて *SLC2A1* の C 端に myc タグ蛋白配列が挿入されている。myc タグ蛋白は、ヒトの c-Myc 蛋白質の 410-419 番目のアミノ酸配列 (EQKLISEEDL) の合成ペプチドであり、分子量は約 1.2kDa であり HEK293 細胞に遺伝子導入した際の GLUT1-myc 融合蛋白は約 45kDa となる。正常型 *SLC2A1* およびミスセンス変異である R333W、A405D 挿入ベクターを用いて遺伝子導入した細胞蛋白抽出液からは対応するバンドが検出されたが、重症型のフレームシフト変異 (V303fs) 挿入ベクターや Empty vector を用いて遺伝子導入した細胞蛋白抽出液では蛋白発現を認めなかった (図 9A)。終止コドンの影響を排除した重症発現ベクター (V303fs without stop codon) を用いて遺伝子導入した細胞蛋白抽出液でも、同様に目標分子量の位置に蛋白発現はなかった (図 9B) [30]。



**図 9 HEK293 細胞に遺伝子導入後の GLUT1-myc 融合蛋白発現**

A; GLUT1-myc 融合蛋白は約 45kDa の分子量を示す (矢印)。正常型 (SLC2A1-wt) およびミスセンス変異型である軽症 (A405D)、中等症 (R333W) では、GLUT1-myc 蛋白発現を認めるが、フレームシフト変異型である重症 (V303fs; 予測された蛋白分子量 41kDa) は発現を認めない。SLC2A1 (-); Empty vector を遺伝子導入した細胞から蛋白抽出した陰性コントロール。\*; 非特異的バンド (内在性 myc)。

B; GLUT1-myc 融合蛋白は、終止コドンの影響を排除した重症発現ベクター (V303fs without stop codon) でも発現がないことを確認した。図は文献 [30] から転記した。

次に、細胞免疫染色で、遺伝子導入後の GLUT1 蛋白発現の有無および細胞内局在について確認した。抗 GLUT1 抗体を用いた細胞免疫染色では、正常型 *SLC2A1* および R333W、A405D 挿入ベクターを用いて遺伝子導入した HEK293 細胞では、細胞膜が染色されたが、V303fs 挿入ベクターや Empty vector を用いて遺伝子導入した HEK293 細胞では細胞膜に GLUT1 蛋白発現は認めなかった。抗 myc 抗体を用いた外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) 発現確認では、GLUT1 染色と同様に、正常型および R333W および A405D 変異導入細胞は細胞膜周辺が染色された (図 10、矢印)。終止コドンの影響を排除した重症発現ベクター (V303fs without stop codon) を用いて遺伝子導入した HEK293 細胞では、細胞膜は染色されず、核周辺の細胞質が淡く染色されることを確認した (図 10、黄矢印) [30]。

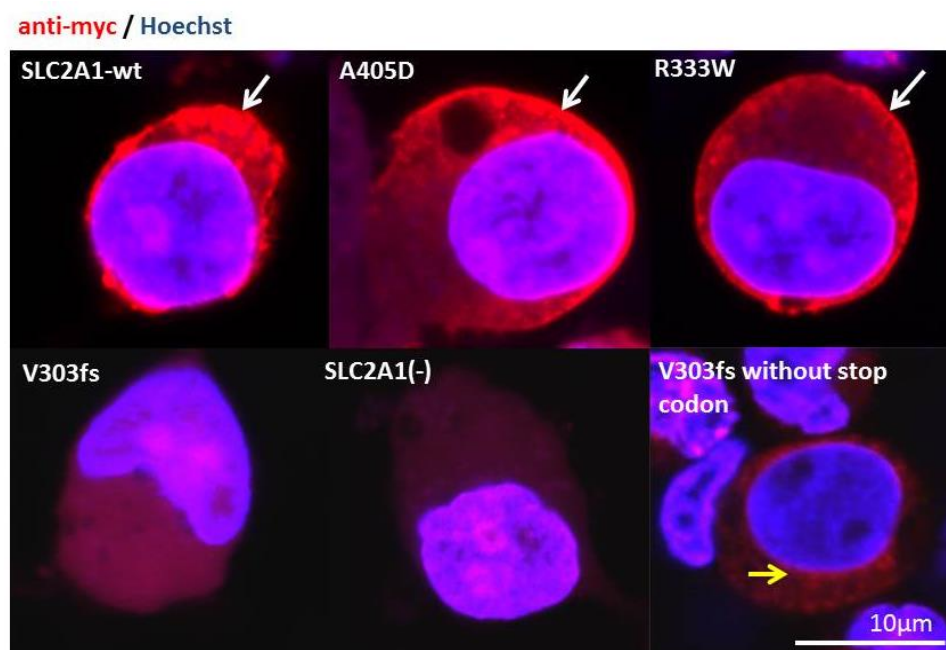


図 10 外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) 蛋白の細胞内局在

正常型および A405D, R333W 変異導入後の HEK293 細胞では、GLUT1-myc 蛋白が細胞膜近傍に発現した (矢印) が、V303fs, Empty vector 導入後細胞では細胞膜における GLUT1-myc 蛋白発現は見られない。終止コドンの影響を排除した重症発現ベクター (V303fs without stop codon) では、細胞膜に蛋白発現せず、核近傍の細胞質が淡く染色されるのみ (黄矢印) となる。図は文献 [30] から一部改変した。

### 3.3 HEK293 細胞に対する正常型/変異体 *SLC2A1* 遺伝子導入後の糖取込機能

遺伝子導入後の細胞内への糖取込機能評価目的に、酵素サイクリング法による 2DG 取込試験を行った。2DG 取込試験は、グルコーストランスポーターによる糖取込機能を評価するため、GLUT1 以外のグルコーストランスポーターの影響を排除する目的で、Empty vector 導入後の HEK293 細胞の糖取込機能との比を評価した。糖取込機能は正常型>A405D>R333W>V303fs と重症度に相関した結果となった (図 11) [30]。

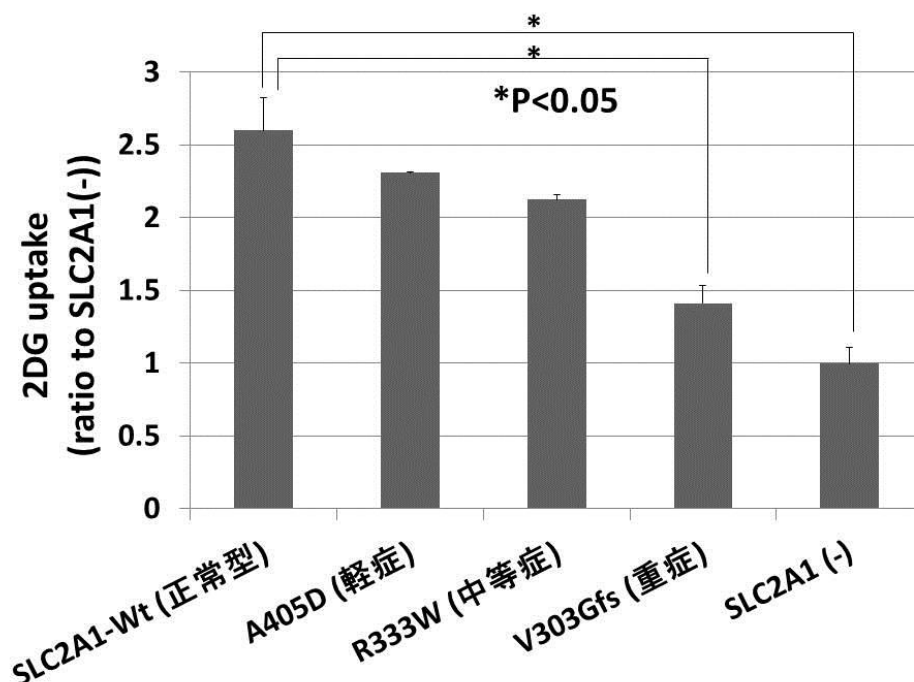


図 11 GLUT を介した細胞内糖取込機能評価

2DG 取込試験では、GLUT ファミリーによる細胞内への糖取込機能を反映するため、GLUT1 以外による糖取込の影響を排除する目的で、Empty vector 導入後の HEK293 細胞による糖取込機能 (SLC2A1(-)) との比を比較した。各検体について 3 回解析し、平均値を棒グラフに示し、エラーバーは標準誤差を示した。SLC2A1(-) および重症型フレームシフト変異導入後細胞 (V303Gfs) の糖取込機能と比較し、正常型 *SLC2A1* 導入後細胞 (SLC2A1-Wt) の糖取込機能は有意に上昇していた ( $P<0.05$ )。A405D (軽症) および R333W (中等症) 導入後細胞の糖取込機能は、SLC2A1(-) と比較し軽度上昇していた。図は文献 [30] から一部改変した。



### 3.4 ヒト *SLC2A1* 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h*SLC2A1*) を用いた SH-SY5Y 細胞への *SLC2A1* 遺伝子導入および蛋白発現

GLUT1DS に対する新規治療として、AAV ベクターを用いた遺伝子治療を想定し、ヒト *SLC2A1* 遺伝子導入 AAV ベクター (AAV-h*SLC2A1*) を作成した。GLUT1DS モデルマウス治療の前段階として、ヒト神経系培養細胞である SH-SY5Y 細胞への *SLC2A1* 遺伝子導入および蛋白発現を評価した。

AAV-h*SLC2A1* 感染後、SH-SY5Y 細胞における GLUT1 発現および細胞内局在を評価する目的で、抗 GLUT1 抗体および抗 myc 抗体を用いた細胞免疫染色を行った。外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) は、細胞膜およびその近傍の細胞質に発現していた (図 12A; 矢印)。抗 GLUT1 抗体を用いた細胞免疫染色でも、細胞膜およびその近傍の細胞質が染色され、抗 myc 抗体で確認した細胞内局在と一致していた (図 12B; 矢印)。

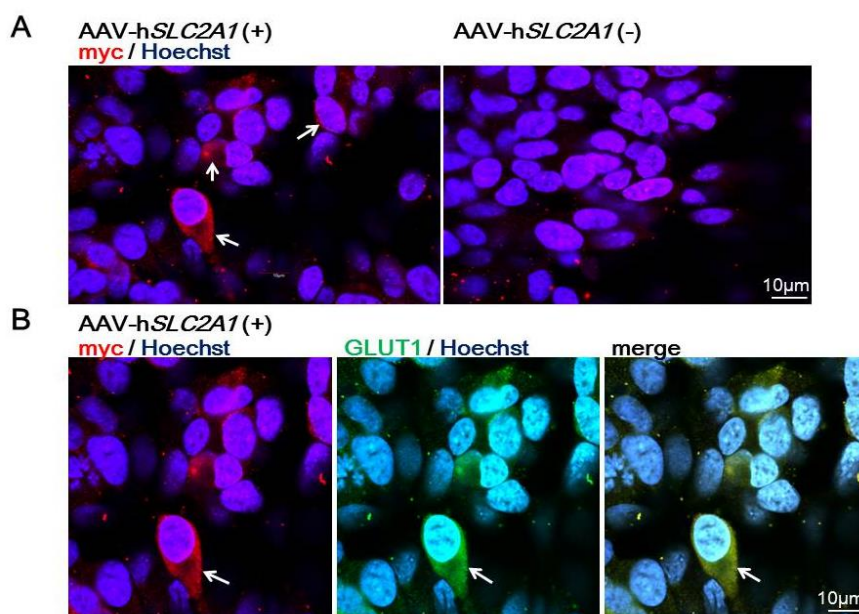
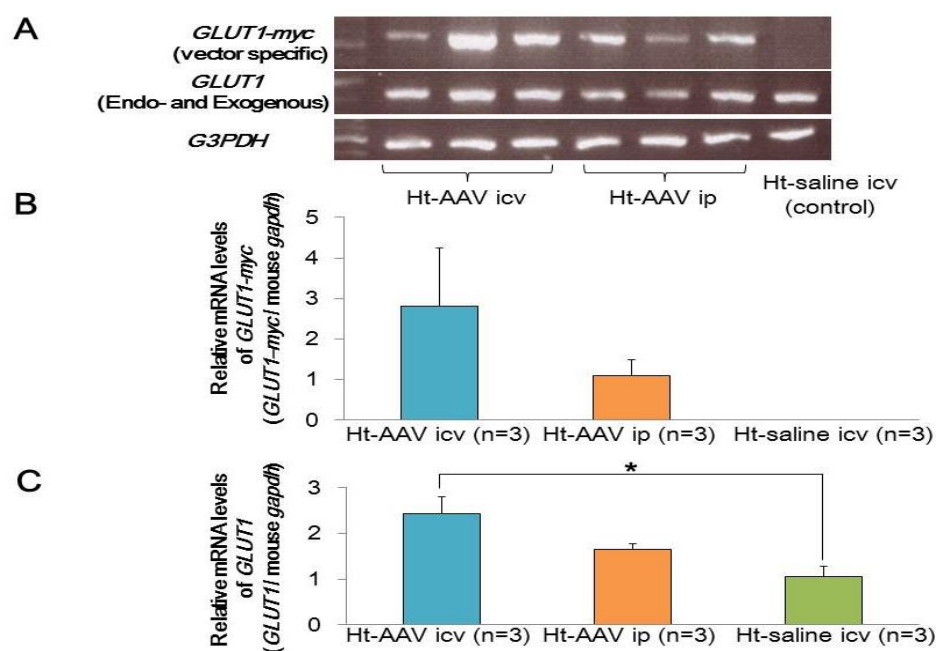


図 12 AAV-h*SLC2A1* 感染後 SH-SY5Y 細胞における GLUT1 蛋白発現  
A; 外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) 発現を抗 myc 抗体による細胞免疫染色で確認した。外因性 GLUT1 は細胞膜および近傍の細胞質に発現していた (矢印)。B; 抗 myc 抗体および抗 GLUT1 抗体による陽性部位は細胞膜およびその近傍で一致していた。



### 3.5 GLUT1DS モデル動物に対する AAV-hSLC2A1 投与後の GLUT1 発現

GLUT1DS モデル動物として、GLUT1<sup>+/-</sup>マウスを用いた。GLUT1<sup>+/-</sup>マウスに対し、AAV-hSLC2A1 を脳室内投与および腹腔内投与後の *GLUT1* mRNA および GLUT1 蛋白発現評価を行った。*GLUT1* mRNA 発現は、AAV-hSLC2A1 投与 2 か月後に、マウス大脳から抽出した RNA を用いて RT-PCR およびリアルタイム PCR を行い確認した。外因性 *GLUT1-myc* mRNA の発現を脳室内・腹腔内投与の両者で確認した (図 13A, B)。リアルタイム PCR では、対照群である生理食塩水を脳室内投与した GLUT1<sup>+/-</sup>マウス群に対し、AAV-hSLC2A1 腹腔内投与群では 1.6 倍、AAV-hSLC2A1 脳室内投与群では 2.4 倍の *GLUT1* mRNA を検出した (図 13C)。



**図 13 AAV-hSLC2A1 投与後の GLUT1<sup>+/-</sup>マウス大脳における *GLUT1* mRNA 発現**  
A; Vector-specific RT-PCR. *GLUT1-myc* は脳室内投与群、腹腔内投与群いずれも検出された。B; リアルタイム PCR による *GLUT1-myc* 定量、C; リアルタイム PCR による *GLUT1* 定量。*GLUT1-myc* の相対的発現量は脳室内投与群が腹腔内投与群と比較し高値となり、対照群では検出されない。*GLUT1* の相対的発現量は、対照群と比較し脳室内投与群は 2.4 倍 (\*p<0.05)、腹腔内投与群は 1.6 倍検出された。Ht; GLUT1<sup>+/-</sup>, icv; intra-cerebroventricular injection, ip; intraperitoneal injection, Ht-saline icv; 対照群 (GLUT1<sup>+/-</sup>マウスに生理食塩水を脳室内投与した群)。B,C ともにグラフは平均値を、エラーバーは標準誤差を示した。

AAV-h*SLC2A1* 投与後の GLUT1<sup>+/-</sup>マウスにおける GLUT1 蛋白発現を評価する前に、GLUT1<sup>+/-</sup>マウスにおける内在性 GLUT1 発現を、抗 GLUT1 抗体を用いた脳組織免疫染色で評価した。既報と同様、神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、血管内皮細胞が GLUT1 陽性であった [7, 8]。次に、AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 3 か月後の GLUT1<sup>+/-</sup>マウス脳組織における外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) 発現を抗 myc 抗体および各種細胞マーカーによる多重染色で評価したところ、外因性 GLUT1 は主に神経細胞に発現し、一部のオリゴデンドロサイトおよび血管内皮細胞にも発現していた (図 14)。

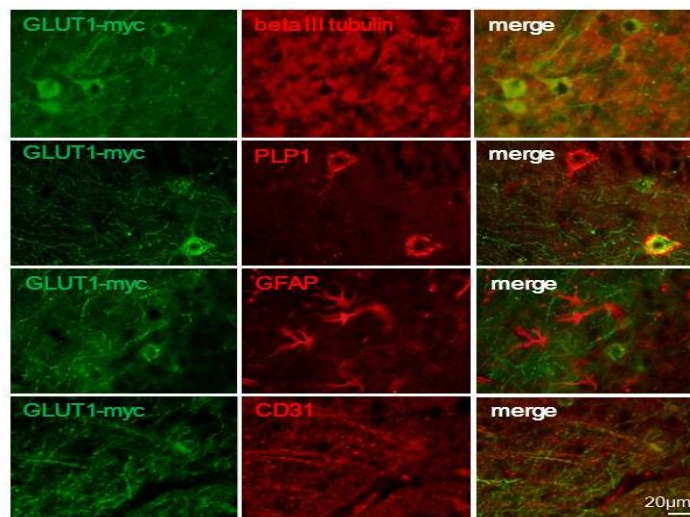


図 14 外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) 陽性細胞の種類

AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウスの脳組織を、抗 myc 抗体と抗  $\beta$ -III tubulin 抗体 (神経細胞特異的マーカー)、抗 myelin proteolipid protein 1 (PLP1) 抗体 (オリゴデンドロサイトマーカー)、抗 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 抗体 (アストロサイトマーカー)、抗 CD31 抗体 (血管内皮細胞特異的マーカー) で共染色した。外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) は、主に  $\beta$ -III tubulin 陽性であり、一部 PLP, CD31 と merge しており、主に神経細胞に発現し、一部オリゴデンドロサイト、血管内皮細胞に発現することが確認できた。

更に、AAV-h*SLC2A1* 投与後の、脳組織における外因性 GLUT1 発現の組織分布を評価した。

脳室内投与後、外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) は、側脳室周辺の大脳皮質や海馬に強発現していたが、穿刺部から離れた位置の大脳皮質や小脳には発現していなかった (図 15)。抗 GLUT1 抗体を用いて内因性および外因性 GLUT1 発現を確認したところ、GLUT1-myc と一致した位置の大脳皮質および海馬に強発現していた (図 16)。

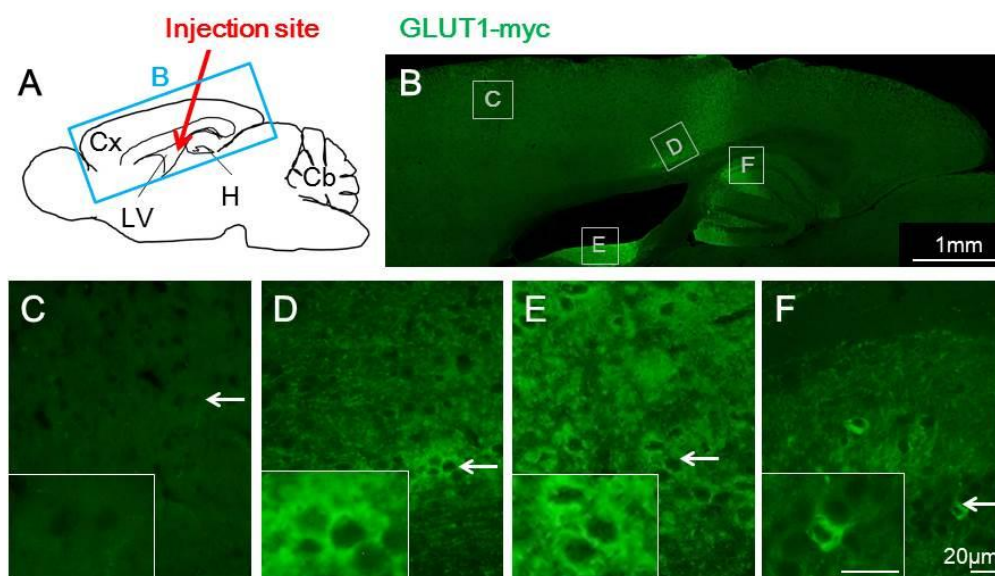


図 15 AAV-hSLC2A1 脳室内投与後の外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) 発現

A; 脳矢状断の模式図。脳室内投与部位を矢印で示す。Cx; cerebral cortex, LV; lateral ventricle, H; hippocampus, Cb; cerebellum. B; 脳矢状断の組織 myc 染色の弱拡大、C; 大脳皮質遠位部, D; 側脳室周辺の大脳皮質, E; 側脳室, F; 海馬, 矢印の位置を強拡大し枠内に示す。外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) は、側脳室周辺および海馬で強染色されるが、遠位部や小脳は染色されない。

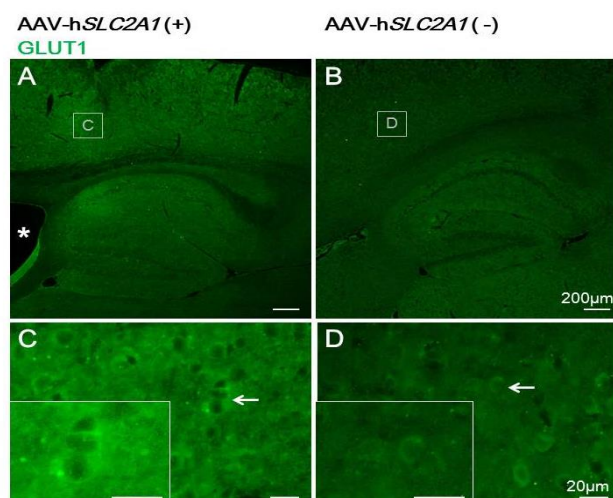


図 16 AAV-hSLC2A1 脳室内投与後の GLUT1 発現

A,C; AAV-hSLC2A1 投与後 GLUT1<sup>+/+</sup>マウスの脳組織 GLUT1 染色、B,D; 未投与 GLUT1<sup>+/+</sup>マウスの脳組織 GLUT1 染色。C,D の枠内に矢印の強拡大を示す。GLUT1<sup>+/+</sup>マウスでは、グリア細胞および血管内皮細胞、一部の神経細胞が GLUT1 陽性となる (B,D) が、AAV-hSLC2A1 脳室内投与後は投与周辺の大脳皮質および海馬の神経細胞が主に GLUT1 強染色となる (A,C)。\*; injection site

同様に、AAV-h*SLC2A1* 腹腔内投与 3 か月後の脳組織 GLUT1 発現を組織免疫染色で評価した。外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) は、脳室内投与と比較し発現率は低い、大脳皮質および海馬の神経細胞、小脳プルキンエ細胞にも発現し、より広範囲での外因性 GLUT1 発現を確認した (図 17)。

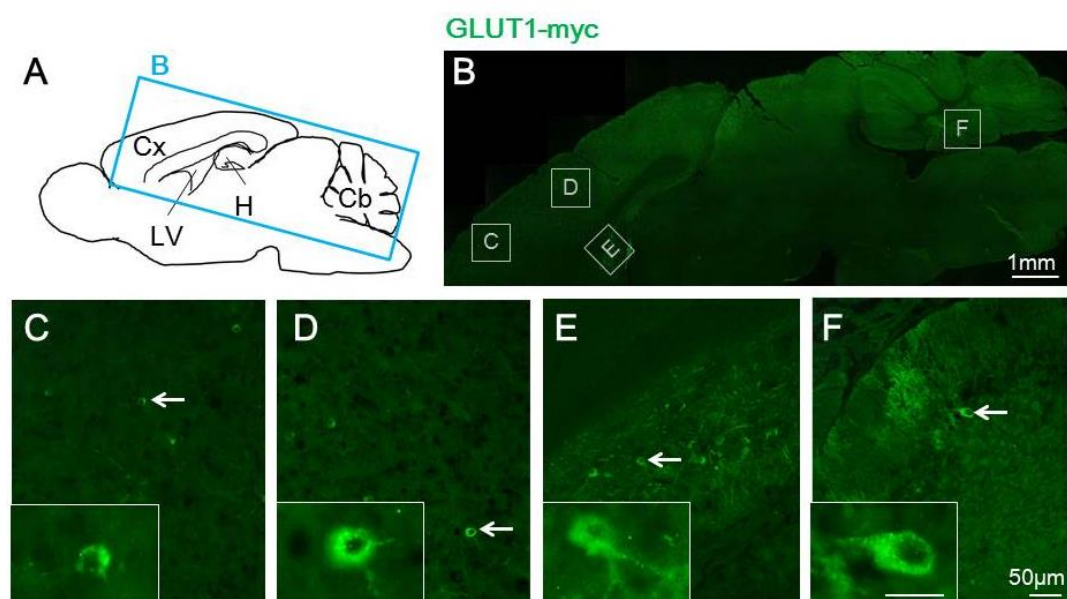


図 17 AAV-h*SLC2A1* 腹腔内投与後の外因性 GLUT1 (GLUT1-myc) 発現  
A; 脳矢状断の模式図。Cx; cerebral cortex, LV; lateral ventricle, H; hippocampus, Cb; cerebellum. B; 脳矢状断の組織 myc 染色の弱拡大、C; 大脳皮質遠位部, D; 側脳室近傍の大脳皮質, E; 海馬, F; 小脳。矢印の位置を強拡大し枠内に示す。大脳皮質、海馬および小脳プルキンエ細胞に myc 陽性細胞を確認した。枠内のスケールバーは 20μm を示す。

次に、臨床応用を想定し、タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* を作成し、脳室内投与後の *GLUT1* mRNA 発現および GLUT1 蛋白発現を評価した。*GLUT1* mRNA 発現は、対照群である生理食塩水を脳室内投与した GLUT1<sup>+/+</sup>マウス群の *GLUT1* mRNA 発現と比較し増加していた (図 18)。脳室内投与後 GLUT1 発現は、タグ有ベクターの結果と同様に、投与周辺の大脳皮質および海馬で強発現していた (図 19)。しかし、ウェスタンブロット法による、大脳全体から抽出した GLUT1 蛋白発現量の比較では、GLUT1 / β-actin のバンド定量は GLUT1<sup>+/+</sup>マウス群が  $0.453 \pm 0.034$  (n=3)



に対しタグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス群が 0.475±0.080 (n=3) であり、有意差は認めなかった (P=0.81)。AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 2 か月後の GLUT1<sup>+/-</sup>マウスは、無治療の GLUT1<sup>+/-</sup>マウスと比較し体重減少はなく、投与前後で大腦半球の脳重量に変化はなかった。

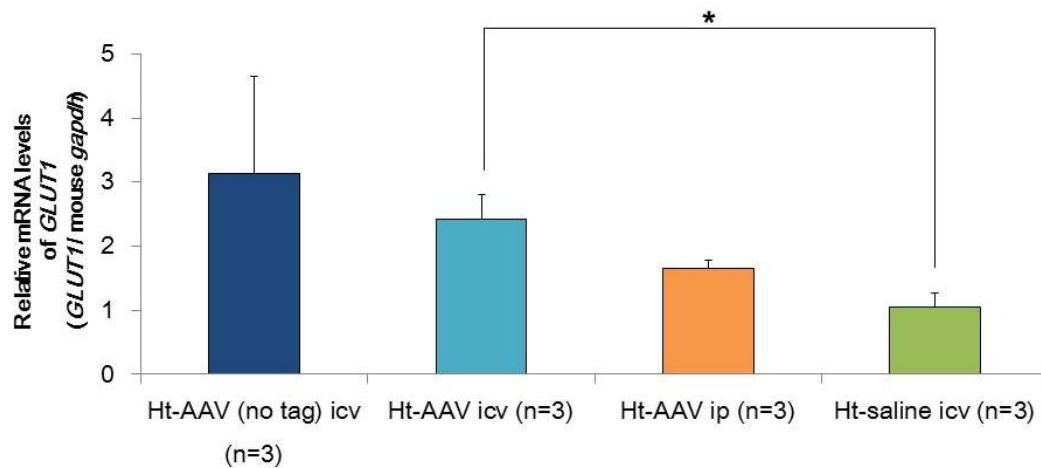


図 18 タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 投与後の GLUT1<sup>+/-</sup>マウス大腦における *GLUT1* mRNA 発現

タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 2 か月後の GLUT1<sup>+/-</sup>マウス大腦における *GLUT1* mRNA 発現をリアルタイム PCR で評価した。対照群である生理食塩水脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス群と比較した *GLUT1* mRNA 相対的発現量は、タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与群では 3.13±1.51 (n=3) と増加していた。Ht; GLUT1<sup>+/-</sup>, icv; intra-cerebroventricular injection, ip; intraperitoneal injection, Ht-AAV (no tag) icv; タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与群, Ht-saline icv; 対照群。グラフは平均値を、エラーバーは標準誤差を示した。\*; P<0.05。

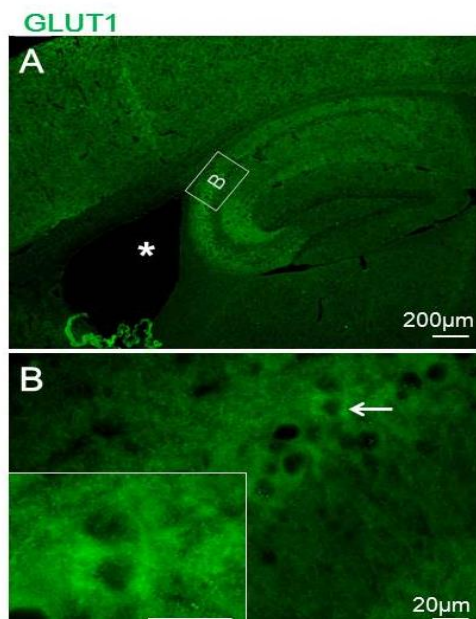


図 19 タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与後の GLUT1 発現

タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウスの脳組織 GLUT1 染色でも、図 15 と同様に、投与周辺の大脳皮質および海馬の神経細胞が主に GLUT1 強染色となることが確認できた。

\*; injection site。

B の枠内に矢印の強拡大を示す。枠内のスケールバーは 20μm を示す。

### 3.6 GLUT1DS モデル動物に対する AAV-h*SLC2A1* 投与後の運動機能および生化学的検査

AAV-h*SLC2A1* 投与後の運動機能評価として、rota-rod test および footprint test を施行した。Rota-rod test は、AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 4 週後および 8 週後に一致する 10 週齢および 14 週齢に施行した。GLUT1<sup>+/+</sup>マウス (Wt 群) および対照群である生理食塩水脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス (Ht-saline icv 群) の rota-rod 滞在時間は、10 週齢で Wt 群 190±14 秒 (n=14) に対し Ht-saline icv 群 116±26 秒 (n=6)、14 週齢で Wt 群 188±9 秒 (n=14) に対し Ht-saline icv 群 145±20 秒 (n=6) であり、対照群と比較し Wt 群は有意に滞在時間延長を認めた (p<0.05)。AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与、腹腔内投与とも対照群と比較し滞在時間延長したが、特にタグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与群 (Ht-AAV (no tag) icv 群) については 10 週齢で 209±8 秒 (n=9)、14 週齢で 199±13 秒 (n=9) と、対照群と比較し有意に滞在時間延長し (P<0.05)、運動機能改善を認めた (図 20)。Footprint test については、各群に差は見られなかった。

AAV-h*SLC2A1* 投与後の生化学的検査として、タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与 8 週後 (14 週齢) の GLUT1<sup>+/-</sup>マウス (Ht-AAV (no tag) icv 群) と、14 週齢の無治療 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス (Ht マウス)、14 週齢の GLUT1<sup>+/+</sup>マウス (Wt マウス) について、一晩絶食後に髄液糖および血糖値を測定し比較した。髄液糖は、Wt マウス群が 92±7 mg/dL (n=9) に対し Ht マウス群が 66±3 mg/dL (n=9)、髄液糖・血糖比は Wt マウス群が 0.71±0.05 (n=9) に対し Ht マウス群が 0.42±0.01 (n=9) であり、髄液糖値および髄液糖・血糖比は、過去の文献と同様に Wt マウス群と比較し Ht マウス群は有意に低下していた (p<0.05) [26]。ヒト GLUT1DS における髄液糖・血糖

比の診断基準は 0.45 未満であり、今回の Ht マウス群は GLUT1DS 診断基準値を満たしていた。Ht-AAV (no tag) icv マウス群について、髄液糖は  $87 \pm 12$  mg/dL (n=4)、髄液糖・血糖比は  $0.49 \pm 0.01$  (n=4) と、髄液糖・血糖比は無治療 Ht マウス群と比較し軽度回復した ( $p < 0.05$ ) (図 21)。

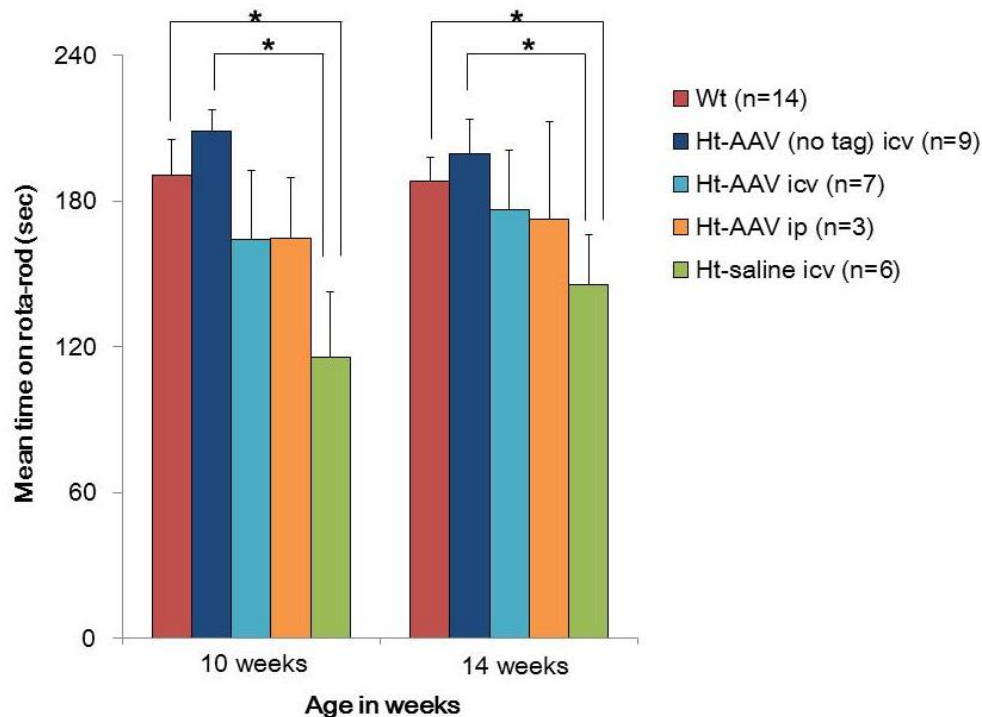
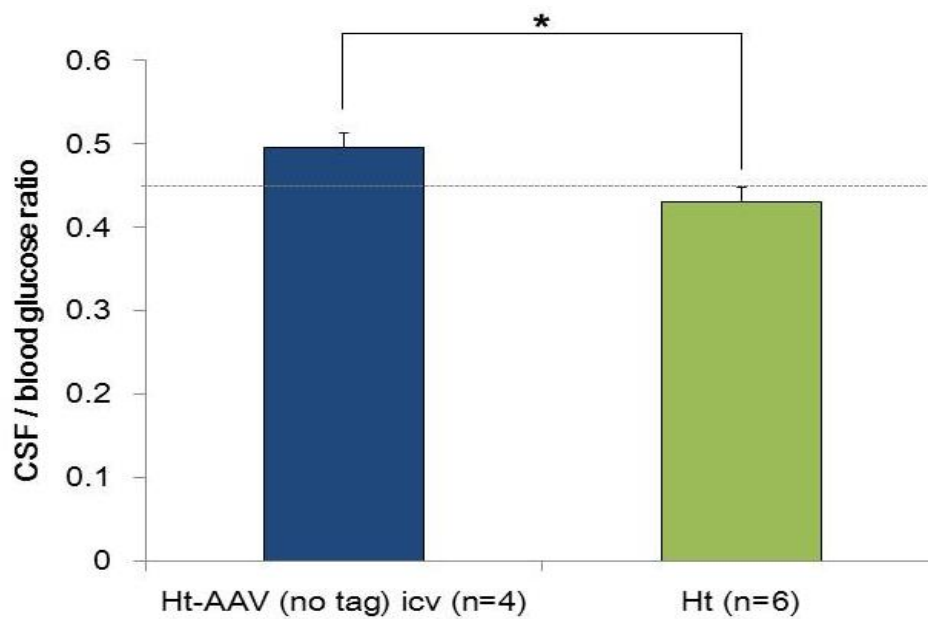


図 20 AAV-h*SLC2A1* 投与後の運動機能検査 (rota-rod test)

連続 2 日間訓練後の本試験における円筒滞在時間の平均値をグラフで、標準誤差をエラーバーで示す。GLUT1<sup>+/-</sup>マウスは GLUT1<sup>+/+</sup>マウスと比較し円筒滞在時間が短縮する [26]。今回、手術による影響を排除する目的で、生理食塩水を脳室内投与した後の GLUT1<sup>+/-</sup>マウスを対照群とした。タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウスは、対照群と比較し有意に運動機能改善が見られた。Wt; GLUT1<sup>+/+</sup>マウス、Ht; GLUT1<sup>+/-</sup>マウス、icv; intra-cerebroventricular injection、ip; intraperitoneal injection、Ht-AAV (no tag) icv; タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス、\*;  $P < 0.05$ 。



**図 21 AAV-h*SLC2A1* 投与後髄液糖・血糖比**

一晩絶食後、麻酔後安静時に髄液糖、血糖を測定し、髄液糖・血糖比の平均値をグラフで示した。点線は GLUT1DS 診断基準 (<0.45)。髄液採取時に **trauma tap** となった検体は除外した。無治療 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス群と比較し、AAV 脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス群では髄液糖・血糖比の部分的回復が見られた。Ht-AAV (no tag) icv; タグ配列を除去した AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与後 GLUT1<sup>+/-</sup>マウス、Ht; GLUT1<sup>+/-</sup>マウス。

\*;  $p < 0.05$ 。



## 4. 考察

### 4.1 GLUT1DS 患者における *SLC2A1* 遺伝子変異と GLUT1 発現

本研究では重症 GLUT1DS 患者から、原因遺伝子 *SLC2A1* のヘテロ接合型の新規フレームシフト変異 (V303fs) を同定した。GLUT は、12 回膜貫通型の細胞膜内在性蛋白質であるが [4, 5, 6]、このフレームシフト変異は、GLUT1 蛋白が本来発現するはずの細胞膜に発現せず、グルコーストランスポーターとしての機能発現がないことを明らかにした。

一方、同定された新規フレームシフト変異との比較として用いた、既知のミスセンス変異 2 種類 (A405D, R333W) は、変異遺伝子を導入した培養細胞で、正常型と同様に細胞膜に GLUT1 発現があり、GLUT1 蛋白発現が見られた。A405D は、痙攣発症が 3 歳、軽度精神遅滞を伴う軽症かつ late-onset 型であり [11]、R333W は複数報告例がある “hot-spot mutation” で、痙攣発症は乳児早期から 2 歳まで、精神遅滞は軽度から中等度で失調を伴う、中等症かつ early-onset 型である [3, 11, 12, 31, 32]。これら *SLC2A1*<sup>A405D</sup>, *SLC2A1*<sup>R333W</sup> では、細胞膜への GLUT1 蛋白輸送の障害はないが、アミノ酸変異により GLUT1 機能低下をきたし、GLUT1DS を発症すると予測される。

### 4.2 GLUT1DS 患者における機能評価系の確立

GLUT1DS の genotype と phenotype に関する比較については、複数の文献で検討されている [3, 10, 11, 12]。 *SLC2A1* 変異のうち、ナンセンス変異やフレームシフト変異、欠失を有する GLUT1DS 患者は、早期発症であり、知的障害等の症状が重

度となる傾向が指摘されている [3,10, 11, 12]。また、GLUT1DS 患者の検査所見について、髄液糖および髄液糖・血糖比の低下 [3, 10, 11]、GLUT1 が発現している赤血球における 3-OMG 取込試験の低下 [10, 12] は、臨床症状の重症度と検査所見の相関がみられる。3-OMG 取込試験は、糖取込機能評価法の一つであるが、60%をカットオフ値とすると、GLUT1DS 患者において感度 86%、特異度 97%を示し [33]、有用な検査であるため、GLUT1DS の確定診断に用いられている [3, 34]。しかし、薬物動態を評価する際に  $^{14}\text{C}$  標識の 3-OMG を使用するため、使用出来る施設や研究者が限定される。

これまで Ho らや Pascual らのグループが *SLC2A1* 変異を導入した培養細胞 [35]、および GLUT1DS モデルマウス [36] を用いて、 $^3\text{H}$ -2DG、 $^{14}\text{C}$ -2DG といった放射性同位元素で測定する 2DG 取込試験を用いた GLUT1DS の機能評価の検討を行ってきた。この従来の 2DG 取込試験は、3-OMG 試験と同様に、薬物動態検査には有用であることが示唆されているが、細胞外液に留まる核種を除外し、細胞内に取り込まれた糖代謝産物のみを評価することが難しい [35]。そこで、本研究では、主にインスリン応答性の GLUT4 が発現している脂肪組織の糖代謝を評価する目的で開発された、酵素サイクリング法を用いた 2DG 取込試験に注目した [4, 27, 37]。GLUT1DS の機能評価系として最適化するには、GLUT1 によって取り込まれた、外因性の糖代謝産物のみを測定する必要がある。酵素サイクリング法では、GLUT から取り込まれ、細胞内に留まる外因性の糖代謝産物のみを、簡便にかつ高感度で測定することが出来る。この方法のみでは、GLUT1 と、他の GLUT ファミリーを区別することは出来ないが、本研究では、Empty vector を導入した培養細胞の糖取込と比較することで、他の GLUT ファミリーによる影響を排除した。本研究では、少数例ではある

が、*SLC2A1* 変異と臨床症状の重症度に相関した結果が得られた [30]。酵素サイクリング法による 2DG 取込試験は、GLUT1DS におけるグルコーストランスポーターの機能評価や重症度予測に役立つものとする。

### 4.3 GLUT1DS の遺伝子治療法開発

項目 4.1 および 4.2 に先述したように、*SLC2A1* 変異により糖取込機能低下を引き起こすこと、糖取込機能低下が GLUT1DS の重症度に関連することを示した [30]。

GLUT1DS に対する遺伝子治療法を開発を考えた際、機能改善に十分な *SLC2A1* 発現量を得られる治療用ベクターやプロモーターの選択、有効な発現量を確保できる投与経路の選択が重要となる。本項目では、治療用ベクターとプロモーターの選択および投与経路の選択について分けて考察する。

#### 4.3.1 治療用ベクターとプロモーターの選択

GLUT1DS の古典的症状としては、乳児期早期発症の難治性痙攣や知的障害、小脳失調やジストニア、痙性麻痺といった様々な複合型運動機能障害であり、これらの症状は、GLUT1 機能異常によっておこる脳内の糖取込障害が原因とされ、非可逆的な神経障害に至る [1, 2, 3]。GLUT1DS に対しては、中枢神経系に良好に発現するベクターを遺伝子治療に用いることが望ましい。中枢神経系に良好に発現する AAV ベクターとして、近年、血液脳関門の透過性が良好である 9 型 AAV ベクターが注目されている。9 型 AAV ベクターを新生児マウスに経静脈的に投与すると、血液脳関門を通過し神経細胞を含む中枢神経系に広範囲に分布する。しかし成マウスに関しては、ほとんどがアストロサイトに分布する [22, 38]。そこで、成人期でも神経細胞に広範

囲に分布させるために、チロシン変異型 AAV9/3 ベクターが開発された [28]。このチロシン変異型 AAV9/3 ベクターは、全身投与により、新生児マウスや成マウスのみならず大型実験動物（実験用ブタ）でも脳および脊髄にわたる広範囲の分布が確認されている [28, 39]。GLUT1DS の治療には、症状が現れる乳児期から学童期以降に、グリア細胞のみでなく神経細胞を含む広範囲の中樞神経系に遺伝子発現し、糖取込機能が回復することが理想であるため、本研究ではチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを選択した。

本研究では、AAV ベクターに組込むプロモーターについては、神経細胞特異性があり、全身投与した際に他臓器への分布を抑え、中樞神経系に有効な発現量をもたらす利点があるシナプシン I プロモーターを選択した。シナプシン I プロモーターを組み込んだ AAV ベクターの導入によって、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた実験で、脳組織への良好な発現が得られている [40, 41]。

シナプシン I プロモーター組込み治療用ベクターを投与した後、GLUT1DS モデルマウス（GLUT1<sup>+/-</sup>マウス）の脳組織において GLUT1 蛋白発現分布を確認したところ、外因性 GLUT1 は、主に神経細胞に発現し、オリゴデンドロサイトや血管内皮細胞では一部に留まっていた。

中樞神経系の糖代謝は、主に GLUT1、GLUT3、MCT 1/2/3/4 の連携により血管内皮細胞ーアストロサイトー神経細胞経路で糖輸送が行われ、最終的には神経細胞内のグルコースが解糖系に入ることで行われる [25, 42, 43]。一般的に、シナプシン I プロモーターが標的とする神経細胞では、GLUT3 が主に発現することが知られている [4, 7, 8]。しかしながら、GLUT3 をコードする遺伝子（*SLC2A3*）の単独欠損患者は存在するが、失調や運動機能障害といった GLUT1DS と類似の臨床症状は示さない

ことや [42]、GLUT3 単独欠損のヘテロ体マウスでは脳内の糖取込が障害されないことから [44]、神経系細胞の糖代謝では GLUT1 の関与の重要性が示唆される。本研究で、シナプシン I プロモーターを用い、GLUT1DS モデルマウスの髄液糖値の上昇や運動機能改善が得られたことから、AAV ベクターで GLUT1DS は治療可能であることが示唆された。しかしながら、今回の結果は、神経細胞と血管内皮細胞のどちらに外因性 GLUT1 を発現させたことによる効果かは明確にされていない。そこで、今後は、ヒト内因性 GLUT1 プロモーターあるいはその最重要領域の塩基配列を AAV に組み込み、内在性 GLUT1 の発現パターンに類似させることで、効果的かつ神経毒性などの副作用の少ない遺伝子治療を可能にすると考え、現在研究を進行中である。

#### 4.3.2 治療用ベクターの投与経路

治療用ベクターの投与経路として、本研究では腹腔内投与（全身投与）と脳室内投与（中枢神経系投与）を比較した。脳組織免疫染色で確認した外因性 GLUT1 蛋白発現は、腹腔内投与群では、発現率は低いものの、大脳全体および小脳プルキンエ細胞にも発現を認めた。一方、脳室内投与群では、脳室内周囲の大脳皮質や海馬といった投与周辺部に強発現することが確認された。

他グループによる、投与経路の比較検討については、マウスおよびカニクイザルについて既に報告されている [45, 46]。マウスについては、GFP を付加したシナプシン I プロモーター組込み 9 型 AAV ベクターを用い、小脳皮質投与では、小脳のみに限局的に強発現し、大槽（髄腔内に準ずる）投与では、大脳全体と大槽に近い脊髄や小脳小葉に中等度の発現がみられ、浅側頭静脈投与では大脳および脊髄に軽度の発現がみられた [45]。カニクイザルに対しては、chicken beta-actin hybrid promoter 組

込み 9 型 AAV ベクターを用い、大槽および内頸動脈への投与が行われた。各投与経路の投与量は、大槽投与では一頭あたり  $1.8 \times 10^{13}$  vg、内頸動脈投与では  $3.0 \times 10^{13}$  vg としたところ、内頸動脈投与では脳組織への発現率が大槽投与と比較し低く、かつ抗 AAV 抗体が検出された個体を認めたのに対し、大槽投与では脳組織の広範囲で強く発現が見られた [46]。既知の報告および本研究の結果を合わせると、全身投与では、脳組織全体に発現が期待できるものの、発現率が低いために、機能改善に十分な発現量を得る為には、カニクイザルで体重あたり  $10^{13} \sim 10^{15}$  vg といった莫大なベクター力価を必要とする [22]。それに対して、中枢神経系投与では、全身投与より少ないベクター力価で脳内に高発現が期待できるものの、発現する範囲が限定的である欠点があると言える [19, 22, 45, 46]。GLUT1 が、脳内の様々な細胞に発現し脳内糖輸送に関与していることを考えると、脳組織全体に、機能改善しうる程度の発現量が得られる投与方法を選択することが理想的である。全身投与については、血液脳関門が脆弱な新生児期に全身投与出来る場合は、成人期投与と比較し、脳組織で高発現が期待できるかもしれない。しかしながら、GLUT1DS と診断されるのは主に乳児期から学童期（平均 8.4 歳）であり、新生児期の診断確定は困難である [3]。また本研究では、マウスの腹腔内投与については、日齢 7 に体格的に投与可能な最大量 (50 $\mu$ l; 力価  $1.85 \times 10^{11}$  vg) で投与したのにかかわらず、わずかに運動機能改善傾向が見られた程度にとどまった。以上より全身投与のみで遺伝子治療を行うのであれば、より新生児期に、かつ高力価のベクターを作成して投与する必要があると推察される。その一方で、診断時期に類似した 6 週齢の若年マウスに対して、腹腔内投与の 1/10 量であっても、脳室内投与では、運動機能の有意な改善と髄液糖値の増加を確認した。

これらの結果を踏まえ、ヒトへの応用を考慮すると、全身投与より、中枢局所への

治療、すなわち脳室内投与や大槽投与が治療効率の面から実際的と考える。より低侵襲である髄腔内投与も今後の検討課題である。また合わせて治療効果を上げる髄腔内投与と全身投与の併用など、今回の研究で行ったマウスでの治療の検討を踏まえ、人への投与法の検討を今後行っていきたい。

## 5. おわりに

重症 GLUT1DS 患者から、新規のフレームシフト変異を同定した。また、酵素サイクリング法による 2DG 取込試験は、GLUT1DS におけるグルコーストランスポーターの機能評価や重症度予測に役立つ可能性がある [30]。

GLUT1DS の新規治療法として、シナプシン I プロモーター下流に human *SLC2A1* cDNA を組み込んだ、チロシン変異型 AAV9/3 ベクター (AAV-h*SLC2A1*) を GLUT1DS モデルマウス (GLUT1<sup>+/-</sup>マウス) に投与し、腹腔内投与および脳室内投与を行った。AAV-h*SLC2A1* 治療後に GLUT1<sup>+/-</sup>マウス脳組織において外因性 GLUT1 蛋白の発現を確認した。特に AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与群では、有意な運動機能改善および髄液糖値の上昇を認めた。AAV ベクターを用いた遺伝子治療は、GLUT1DS に対し、有効な新規治療法となりうる。



## 6. 参考文献

- [1] Klepper J, Leidencker B. GLUT1 deficiency syndrome--2007 update. *Dev Med Child Neurol.* 49: 707-16, 2007.
- [2] De Giorgis V, Veggiotti P. GLUT1 deficiency syndrome 2013: current state of the art. *Seizure.* 22: 803-11, 2013.
- [3] Ito Y, Takahashi S, Kagitani-Shimono K, Natsume J, Yanagihara K, Fujii T, Oguni H. Nationwide survey of glucose transporter-1 deficiency syndrome (GLUT-1DS) in Japan. *Brain Dev.* 37: 780-9, 2015.
- [4] Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298: E141-5, 2010.
- [5] Sun L, Zeng X, Yan C, Sun X, Gong X, Rao Y, Yan N. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature.* 490: 361-6, 2012.
- [6] Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature.* 510: 121-5, 2014.
- [7] Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 8: 1003-11, 1994.
- [8] Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 21: 2-21, 1997.
- [9] Leen WG, Taher M, Verbeek MM, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BP, Willemsen MA. GLUT1 deficiency syndrome into adulthood: a follow-up study. *J Neurol.* 261: 589-99, 2014.
- [10] Yang H, Wang D, Engelstad K, Bagay L, Wei Y, Rotstein M, Aggarwal V, Levy

- B, Ma L, Chung WK, De Vivo DC. Glut1 deficiency syndrome and erythrocyte glucose uptake assay. *Ann Neurol*. 70: 996-1005, 2011.
- [11] Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG, Wevers RA, Arthur T, Bahi-Buisson N, Ballhausen D, Bekhof J, van Bogaert P, Carrilho I, Chabrol B, Champion MP, Coldwell J, Clayton P, Donner E, Evangeliou A, Ebinger F, Farrell K, Forsyth RJ, de Goede CG, Gross S, Grunewald S, Holthausen H, Jayawant S, Lachlan K, Laugel V, Leppig K, Lim MJ, Mancini G, Marina AD, Martorell L, McMenamin J, Meuwissen ME, Mundy H, Nilsson NO, Panzer A, Poll-The BT, Rauscher C, Rouselle CM, Sandvig I, Scheffner T, Sheridan E, Simpson N, Sykora P, Tomlinson R, Trounce J, Webb D, Weschke B, Scheffer H, Willemsen MA. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain*. 133: 655-70, 2010.
- [12] Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Jhung S, Sun RP, De Vivo DC. Glut-1 deficiency syndrome: clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann Neurol*. 57: 111-8, 2005.
- [13] Klepper J. Glucose transporter deficiency syndrome (GLUT1DS) and the ketogenic diet. *Epilepsia*. 49 Suppl 8: 46-9, 2008.
- [14] Fujii T, Ito Y, Takahashi S, Shimono K, Natsume J, Yanagihara K, Oguni H. Outcome of ketogenic diets in GLUT1 deficiency syndrome in Japan: A nationwide survey. *Brain Dev*. 38: 628-37, 2016.
- [15] Ito Y, Oguni H, Ito S, Oguni M, Osawa M. A modified Atkins diet is promising as a treatment for glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 53: 658-63, 2011.

- [16] Kwiterovich PO Jr, Vining EP, Pyzik P, Skolasky R Jr, Freeman JM. Effect of a high-fat ketogenic diet on plasma levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in children. *JAMA*. 290: 912-20, 2003.
- [17] Mochel F, Hainque E, Gras D, Adanyeguh IM, Caillet S, Héron B, Roubertie A, Kaphan E, Valabregue R, Rinaldi D, Vuillaumier S, Schiffmann R, Ottolenghi C, Hogrel JY, Servais L, Roze E. Triheptanoin dramatically reduces paroxysmal motor disorder in patients with GLUT1 deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 87: 550-3, 2016.
- [18] 小澤 敬也. AAV を利用した遺伝子治療. ウィルス. 57: 47-56, 2007.
- [19] Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S, Cartier N. Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Hum Gene Ther*. 27: 478-96, 2016.
- [20] Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 11854-9, 2002.
- [21] 中井浩之. 【組換えウイルスキャリア 遺伝子治療・ワクチン応用への新展開】急速に進化をつづけるアデノ随伴ウイルスベクター カスタムメイドベクターによる遺伝子治療の可能性. *Drug Delivery System* 24: 582-591, 2009.
- [22] Saraiva J, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J Control Release*. 241: 94-109, 2016.
- [23] Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I. A

- phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther.* 18:1731-5, 2010.
- [24] Hwu WL, Muramatsu S, Tseng SH, Tzen KY, Lee NC, Chien YH, Snyder RO, Byrne BJ, Tai CH, Wu RM. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med.* 4: 134ra61, 2012.
- [25] Ohtsuki S, Kikkawa T, Hori S, Terasaki T. Modulation and compensation of the mRNA expression of energy related transporters in the brain of glucose transporter 1-deficient mice. *Biol Pharm Bull.* 29: 1587-91, 2006.
- [26] Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, Yoo J, Noebels JL, De Vivo DC. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet.* 15: 1169-79, 2006.
- [27] Saito K, Lee S, Shiuchi T, Toda C, Kamijo M, Inagaki-Ohara K, Okamoto S, Minokoshi Y. An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Anal Biochem.* 412: 9-17, 2011.
- [28] Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K, Muramatsu S. Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Biomed Res Int.* 2013: 974819, 2013.
- [29] DeMattos RB, Bales KR, Parsadanian M, O'Dell MA, Foss EM, Paul SM, Holtzman DM. Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (A $\beta$ ) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 81: 229-36, 2002.

- [30] Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T. Mutational and functional analysis of Glucose transporter I deficiency syndrome. *Mol Genet Metab.* 116: 157-62, 2015.
- [31] Fujii T, Ho YY, Wang D, De Vivo DC, Miyajima T, Wong HY, Tsang PT, Shirasaka Y, Kudo T, Ito M. Three Japanese patients with glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Brain Dev.* 29: 92-7, 2007.
- [32] Takahashi S, Ohinata J, Suzuki N, Amamiya S, Kajihama A, Sugai R, Araki A, Fujieda K, Tanaka H. Molecular analysis and anticonvulsant therapy in two patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome: a successful use of zonisamide for controlling the seizures. *Epilepsy Res.* 80: 18-22, 2008.
- [33] Klepper J, Garcia-Alvarez M, O'Driscoll KR, Parides MK, Wang D, Ho YY, De Vivo DC. Erythrocyte 3-O-methyl-D-glucose uptake assay for diagnosis of glucose-transporter-protein syndrome. *J Clin Lab Anal.* 13: 116-21, 1999.
- [34] 小国弘量. グルコーストランスポーター1欠損症症候群の実態と診断治療指針に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） グルコーストランスポーター1欠損症症候群の実態と診断治療指針に関する研究. 平成23年度総括・分担研究報告書: 1-7, 2012.
- [35] Wong HY, Law PY, Ho YY. Disease-associated Glut1 single amino acid substitute mutations S66F, R126C, and T295M constitute Glut1-deficiency states in vitro. *Mol Genet Metab.* 90: 193-8, 2007.
- [36] Marin-Valencia I, Good LB, Ma Q, Duarte J, Bottiglieri T, Sinton CM, Heilig CW, Pascual JM. Glut1 deficiency (G1D): epilepsy and metabolic dysfunction in a mouse model of the most common human phenotype. *Neurobiol Dis.* 48: 92-101, 2012.

- [37] Hellwig B, Joost HG. Differentiation of erythrocyte-(GLUT1), liver-(GLUT2), and adipocyte-type (GLUT4) glucose transporters by binding of the inhibitory ligands cytochalasin B, forskolin, dipyridamole, and isobutylmethylxanthine. *Mol Pharmacol.* 40: 383-9, 1991.
- [38] Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol.* 27: 59-65, 2009.
- [39] 飯田 麻子. 大型動物の広範な中枢神経領域へ遺伝子導入可能な AAV ベクターの開発. 自治医科大学紀要. 37: 57, 2015.
- [40] Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S, Saido TC. Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep.* 3: 1472, 2013.
- [41] Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, Kwak S. Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med.* 5: 1710-9, 2013.
- [42] Hildebrand MS, Damiano JA, Mullen SA, Bellows ST, Oliver KL, Dahl HH, Scheffer IE, Berkovic SF. Glucose metabolism transporters and epilepsy: only GLUT1 has an established role. *Epilepsia.* 55: e18-21, 2014.
- [43] Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol.* 558(Pt 1): 5-30, 2004.

- [44] Stuart CA, Ross IR, Howell ME, McCurry MP, Wood TG, Ceci JD, Kennel SJ, Wall J. Brain glucose transporter (Glut3) haploinsufficiency does not impair mouse brain glucose uptake. *Brain Res.* 1384: 15-22, 2011.
- [45] Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Distinct transduction profiles in the CNS via three injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 1: 14032, 2014.
- [46] Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, Kells AP, Foust KD, Bringas JR, Lamarre C, Forsayeth J, Kaspar BK, Bankiewicz KS. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Hum Gene Ther.* 23: 382-9, 2012.

## 7. 謝辞

本研究の遂行、論文作成にあたり自治医科大学小児科学主任教授 山形崇倫先生、小児科学教授 小坂 仁先生、小児科学講師 神保恵理子先生にご指導いただきました。自治医科大学内科学・神経内科学部門 特命教授 兼 地域医療学センター東洋医学講座教授 村松慎一先生には、本研究の遂行、論文作成に加え、AAV ベクター全般の最近の知見や作製方法についてもご指導いただきました。また、小児科学研究補助員 青木志保様には研究全般を補助していただきました。

GLUT1DS モデルマウスは、熊本大学大学院生命科学研究部微生物薬学分野 大槻純男先生、東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 寺崎哲也先生が開発され、本研究の為に譲与されました。

治療用 AAV ベクターの作製には、自治医科大学地域医療学センター 東洋医学部門 滝野直美様、伊藤美加様にご尽力いただきました。マウス脳室内投与については、自治医科大学脳神経外科学講座 島崎久仁子先生に、マウス運動機能検査については、自治医科大学医学部生理学講座 神経脳生理学部門教授 尾仲達史先生に、それぞれご指導賜りました。

様々な分野の先生方にご指導ご尽力いただき、本研究が遂行出来ましたことを、ここに感謝申し上げます。

本研究の一部は、平成 26 年度自治医科大学大学院若手スタートアップ研究費および平成 27 年度自治医科大学大学院研究奨励賞により遂行しました。