

氏 名	中 村 幸 恵
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 522 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教授 花 園 豊 (委 員) 教授 市 橋 光 講師 ト 部 匡 司

論文内容の要旨

1 研究目的

グルコーストランスポーター1 欠損症 (GLUT1DS) は、脳組織への糖輸送障害が原因で、難治性痙攣や知的障害、小脳失調や複合型運動機能障害をきたす疾患であり、GLUT1 をコードする *SLC2A1* 遺伝子のヘテロ接合性の変異に起因する。本研究では、GLUT1DS 患者に対する *SLC2A1* 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、根治治療のない GLUT1DS に対する新規治療を開発することを目的とした、アデノ随伴ウィルス (adeno-associated virus; AAV) ベクターを用いた GLUT1DS モデルマウス (GLUT1^{+/−}マウス) 治療を第二主題とした。

2 研究方法

①新規 GLUT1DS 患者リンパ芽球から抽出した DNA を用いて *SLC2A1* 遺伝子変異検索を行った。②3 種類の *SLC2A1* 遺伝子変異 (軽症; A405D, 中等症; R333W, 重症; V303fs) はヒト培養細胞 (HEK293 細胞) に遺伝子導入し、細胞免疫染色による外因性 GLUT1 蛋白発現評価および 2-deoxyglucose (2DG) 取込試験による糖取込機能評価を行った。③GLUT1DS の治療用ベクターとして、神経細胞特異的プロモーターであるシナプシン 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*) を作成した。全身投与群として新生児 GLUT1^{+/−}マウス (日齢 7) に AAV-h*SLC2A1* (1.85 x 10¹¹ vg) を腹腔内投与し、中枢神経系投与群として若年 GLUT1^{+/−}マウス (6 週齢) に AAV-h*SLC2A1* (合計 1.85 x 10¹⁰ vg) を脳室内投与した。投与後、大脳における外因性 *GLUT1* mRNA 発現評価、脳組織免疫染色による外因性 GLUT1 蛋白発現評価、および rota-rod test を用いた運動機能評価、一晚絶食後に採取した髄液糖・血糖測定を行った。

3 研究成果

① 重症 GLUT1DS 患者 1 名から、新規のフレームシフト変異 (c. 906_907insG, p. V303fs) を同定した。このフレームシフト変異を HEK293 細胞に遺伝子導入すると、本来発現するはずの細胞膜に GLUT1 蛋白発現を認めなかった。② 3 種類の *SLC2A1* 遺伝子変異 (軽症; A405D, 中等症; R333W, 重症; V303fs) を HEK293 細胞に遺伝子導入後、酵素サイクリング法による 2DG 取込試験を行うと、重症度に相関した結果が得られた。③GLUT1^{+/−}マウスに AAV-h*SLC2A1* を投与すると、腹腔内投与・脳室内投与群で大脳に外因性 *GLUT1* mRNA 発現を認めた。脳組織免疫

染色では、外因性 GLUT1 蛋白は主として神経細胞に、一部は血管内皮細胞およびオリゴデンドロサイトに発現していた。AAV-h*SLC2A1* 投与後の外因性 GLUT1 蛋白の脳組織における発現分布は、脳室内投与群は、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。腹腔内投与群は、脳室内投与群と比較し外因性 GLUT1 の発現率は低い、大脳皮質全体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 発現を認めた。AAV-h*SLC2A1* 投与後の運動機能検査 (rota-rod test) では、脳室内投与群・腹腔内投与群ともに運動機能改善傾向がみられた。特に AAV-h*SLC2A1* 脳室内投与では、治療後 4 週・8 週ともに有意な運動機能改善を認め (n=9, P<0.05)、髄液糖・血糖比についても無治療 GLUT1^{+/+} マウスと比較し有意差をもって改善が見られた。

4 考察

GLUT1DS の糖輸送機能評価としては、³H-2DG, ¹⁴C-2DG といった放射性同位元素を用いて測定する報告があり、薬物動態検査には有用であるものの、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は難しい。酵素サイクリング法による 2DG 取込試験は簡便で、かつ少数例ではあるが、*SLC2A1* 変異と臨床症状の重症度に相関した結果が得られたことから、GLUT1DS の機能評価や重症度予測に役立つことが推測される。

GLUT1DS に対する新規治療法として、シナプシン I プロモーター下流に human *SLC2A1* cDNA 配列を組み込んだ AAV ベクターを作成し、GLUT1DS モデルマウス (GLUT1^{+/+} マウス) に投与し GLUT1 蛋白発現および運動機能、髄液糖値について検討した。今回、治療用ベクターとして、血液脳関門を透過し脳内への組織分布が良好で、かつ成マウスでも神経細胞を含む脳組織や脊髄に広範囲に分布することが報告されている、チロシン変異型 AAV9/3 を採用し、かつ神経細胞特異的なプロモーターである、シナプシン I プロモーターを組み込み、中枢神経系への発現効率を良好にし、治療効果を上げられるか検討した。この治療用ベクターを 6 週齢の若年マウスに脳室内投与することにより、脳組織の主に神経細胞や一部の血管内皮細胞、オリゴデンドロサイトにおいて外因性 GLUT1 発現を確認し、かつ運動機能の有意な改善や髄液糖値の改善を認めた。この結果は、GLUT1DS の診断時期である、乳児期から学童期以降に治療しても機能改善が得られる可能性を示し、新規治療法として画期的な結果と言える。しかしながら、臨床応用を想定すると、プロモーターおよび投与経路について、より治療効果を上げるために更なる検討が必要となる。

第一に、プロモーターについては、シナプシン I プロモーターでは、主として GLUT1 が発現する血管内皮細胞やアストロサイトの発現効率は悪いことが問題点として挙げられる。そのため、ヒト内在性 GLUT1 プロモーターの最重要領域の塩基配列を推定し、AAV に組み込んだ新規治療用ベクターを開発した上で、GLUT1 蛋白発現について研究を進めている。第二に、投与経路については、全身投与より、中枢神経系局所への治療、すなわち脳室内投与で有効な結果が得られたが、より低侵襲である髄腔内投与の検討や、髄腔内投与と全身投与の併用等も比較する必要がある、今後の課題と考える。

5 結論

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

予測に有用となる可能性を示唆した。

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^{+/-}マウス) に腹腔内および脳室内投与を行った。AAV-h*SLC2A1* 治療後に GLUT1^{+/-}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る可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

「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イルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発」と題される本論文は、二部構成となっている。前半は、同疾患(GLUT1DS)の重症度を予測するための *in vitro* 検査法の開発、後半は同疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療モデルの提示である。前半を要約すれば、重症 GLUT1DS 患者の原因変異遺伝子を HEK293 細胞に導入し、2DG 取込み試験を行うと、その結果は重症度に相関する、ということであった。後半を要約すれば、GLUT1DS の新規治療として、当該正常遺伝子をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに搭載し、同疾患のモデルマウスの脳室内に投与すると運動機能の改善および髄液糖質値の改善を認めた、ということであった。

前半、後半とも新規の知見である。前半は、すでに論文化された(Molecular Genetics and Metabolism 2015; 116: 157-162)。申請者は、分子生物学的、組織学的、機能生理学的な種々の手法を駆使しながら、*in vitro* からマウス *in vivo* へと実験を進めた。各実験はしっかりした計画のもと実施され、得られたデータは適切に処理され、論文はわかりやすく明快に記載されている。GLUT1DS モデルマウスの遺伝子治療では有意な効果が得られており、本研究成果の臨床応用が期待される。

最終試験の結果の要旨

学位審査会では、審査委員から数々の質問やコメントが出され、活発な討議が行われた。

主たる論点を上げると、まず、遺伝形式について。本疾患は常染色体優性遺伝だから基本的に軽症例が多くなる。モデルマウスは、ホモ(-/-)が胎生致死のためヘテロ(+/-)を使わざるを得ず、ヘテロマウスは一見正常で表現型の指標があまりない点、苦勞したと思われる。しかし、ヘテロマウスの運動機能や髄液中の糖値などで治療改善データを出せたのはよかった。もっとも臨床例では、ヘテロでも重篤な神経症状を呈することがあるそうである。

また、AAV ベクターが神経細胞に感染したことを示しているが、治療効果が本当に神経細胞における正常遺伝子発現を介して得られているのかどうかは、今回の研究では明らかになっていない。といって、これが本論文の意義を損なうものではない。本来、本遺伝子は血管内皮細胞における発現を介して作用すると考えられている。したがって、今回の治療効果も AAV ベクターの内皮細胞への感染を介して効いている可能性は否定できない。これに関して、申請者は当該遺伝子の内因性プロモーターを使うことによってより生理的な作用機序に近づけたい、とのことであった。

本研究では、9 型 AAV ベクターを利用しているが、これは経静脈投与によって血液脳関門を通過するベクターである。モデルマウスへの経静脈投与実験から確かに本ベクターの中樞神経細胞への感染が認められており、興味深い。

発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、学位を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。