

【背景と目的】

異染性白質ジストロフィー(MLD)はライソゾーム酵素の一つであるアシルスルファターゼ A (hASA)の欠損により、その基質であるスルファチドが脳白質や腎などの臓器に蓄積する先天性代謝異常疾患である。ライソゾーム酵素は血液脳関門を通過できないため、中枢神経系に hASA を届ける手段として、現在 MLD 患者に対する脳脊髄液(CSF)への hASA 酵素補充療法の治験が行われている。我々はこれまで、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを脳室内に投与して脳内細胞への遺伝子導入を行い、hASA を CSF 中に持続的に分泌させる方法を研究してきた。遺伝子導入により MLD 患者の脳内に hASA の供給源を設置できれば、治療に際して患者の負担を大きく軽減できる。

今回我々は、脳室内投与による遺伝子導入効率が高い AAV ベクターを選定すべく、1) ゲノムパッケージング様式の異なる二つの AAV ベクター(single-stranded AAV (ssAAV) vs self-complementary AAV (scAAV))、および、2)血清型の異なる二つの AAV ベクター(1 型 AAV (AAV1) vs 9 型 AAV (AAV9))で比較を行った。その結果、最も遺伝子導入効率が高いと判断した scAAV1 ベクターを用いて MLD モデルマウスの治療実験を行った。

【方法と結果】

1) scAAV1 と ssAAV1 の比較実験

MLD モデルマウス(8 週齢)の右側脳室に hASA 遺伝子を搭載した scAAV1 ベクター(scAAV1-hASA (n = 6))、または、ssAAV1 ベクター(ssAAV1-hASA (n = 7))を、それぞれ 2.3×10^{11} vg/20 μ l 注入した。2 週間後に脳および CSF を回収し、抗体染色による hASA 遺伝子発現部位の観察および ELISA による hASA 濃度測定を行った。組織の抗体染色では脈絡叢および脳室上衣細胞に hASA の発現を認め、発現強度は scAAV1 投与群の方が ssAAV1 投与群よりも高かった。同様に、CSF 中の hASA 濃度は scAAV1 投与群の方が ssAAV1 投与群よりも有意に高かった(52.8 ± 16.3 vs 7.7 ± 1.4 ng/ml; $p < 0.01$)。以上の実験結果を元に、以降の実験では scAAV ベクターを用いることに決定した。

2) scAAV1 と scAAV9 の比較実験

野生型マウス(8~9 週齢)の右側脳室に scAAV1-hASA (n = 6)、または、scAAV9-hASA (n = 6)をそれぞれ 1.1×10^{11} vg/20 μ l 注入し、2 週間後に 1)の実験と同様の解析を行った。組織の抗体染色では脈絡叢および脳室上衣細胞に hASA の発現を認め、発現強度は scAAV1 投与群の方が scAAV9 投与群よりも高かった。同様に、CSF 中の hASA 濃度は scAAV1 投与群の方が scAAV9 投与群よりも有意に高かった(77.3 ± 17.1 vs 9.6 ± 2.3 ng/ml; $p < 0.01$)。以上の実験結果を元に、治療実験に用いるベクターは scAAV1-hASA を選択した。

3) scAAV1 による MLD マウスの治療実験

免疫寛容化処置（生後 2 日目及び 5 日目に hASA 10 µg を腹腔内投与）を行った MLD マウス(18 週齢)の右側脳室に 2.3×10^{11} vg/20 µl の scAAV1-hASA (n = 21)、または、scAAV1-EGFP (n = 3)を投与した。免疫寛容化処置後にも関わらず、ベクター投与 2 週間後には scAAV1-hASA 投与群（治療群）の血中に抗 hASA 抗体が出現し、抗体価は徐々に上昇した。それとともに、CSF 中の hASA 濃度は徐々に低下し、12 週間後には検出されなくなった。

投与から 12 週間後に、治療群と scAAV1-EGFP 投与群（対照群）、および同週齢の未処置 MLD マウス（未治療群; n = 12）の脳内のスルファチド濃度を測定して比較した。治療群と対照群との比較では、右大脳半球(11.4 ± 2.5 vs 15.0 ± 1.4 µg/mg protein; $p < 0.05$)および小脳・脳幹(36.1 ± 5.3 vs 43.6 ± 2.0 µg/mg protein; $p < 0.05$)において、治療群のスルファチド濃度は対照群に比べて有意に低かった。また、治療群と未治療群との比較では、小脳・脳幹(36.1 ± 5.3 vs 44.0 ± 11.2 µg/mg protein; $p < 0.05$)において治療群のスルファチド濃度が有意に低かった。

[考察]

治療群では、CSF 中に短期間しか hASA が検出されなかったにも関わらず、投与 12 週間後の脳内のスルファチド濃度は未治療群及び対照群よりも軽度減少していた。従って、免疫をコントロールし hASA 分泌を長期間維持することができれば、AAV ベクターの脳室内投与による酵素補充療法はさらに有効な治療法になると考える。