

## 【背景と目的】

低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia; HPP) とは、組織非特異的アルカリホスファターゼ (Tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNALP) の活性低下により骨や歯牙等の硬組織の石灰化障害を主徴とする先天性遺伝疾患である。主症状として、硬組織の石灰化不全、痙攣発作、呼吸困難、乳歯の早期脱落がみられるが、病型は様々で致死性のもから軽症の歯限局型のものまで幅広く認められる。これまで HPP には有効な治療法がないとされてきたが、近年骨親和型 TNALP (bone-targeted TNALP with deca-aspartates at the C terminus; TNALP-D10) を使用した酵素補充療法の有効性が認められ、2015 年本邦にて HPP 治療薬が承認された。しかし、酵素補充療法で治療効果を得るためには長期間反復投与が必要であり、HPP 患者の殆どが低年齢であることを考えると負担が大きい。従来我々の研究室では、様々なウイルスベクターを使い単回投与により酵素を補充することで HPP モデルマウス (*Akp2*<sup>-/-</sup>マウス) の治療実験を行って来たが、これら組織非特異的プロモーターによるウイルスベクターでの酵素補充は、多くの臓器で治療遺伝子が過剰発現するため、安全面で課題が残る。そこで本研究では、筋特異的プロモーターである筋肉クレアチンキナーゼプロモーター (MCK プロモーター) 制御下にて TNALP-D10 を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを構築し、HPP に対する遺伝子治療の有効性、安全性の検討を行うことを目的とした。

## 【方法】

遺伝子導入効率および発現効率を改善するため、治療用ベクターとしてゲノムパッケージング様式は self-complementary (sc) を血清型は 8 型 AAV (AAV8) を選択し、MCK プロモーター制御下に TNALP-D10 を発現する scAAV8-MCK-TNALP-D10 を作製した。生後 1 日の *Akp2*<sup>-/-</sup> 新生児仔マウスに scAAV8-MCK-TNALP-D10 ( $2.5 \times 10^{12}$  v. g. / 個体、総量各  $15 \mu\text{l}$ ) を左右大腿四頭筋に筋肉内投与し、3 ヶ月後に安楽殺を行った (n=10)。そして、長期安定に血中アルカリホスファターゼ (ALP) 濃度の維持が可能か否か、行動量、ベクターの分布および各臓器中の ALP 活性に関して検討した。骨状態に関してはレントゲン撮影、マイクロ CT 撮影、そして、組織学的解析としてアルシアンブルー染色、H&E 染色、ALP 染色を行い、治療効果を検討した。

## 【結果】

治療マウス群の血中 ALP 活性は 3 ヶ月に渡り、 $1.0 \text{ U/ml}$  以上の濃度が維持され、明らかな延命効果を認めた (n=9/10,  $p < 0.001$ )。1 ヶ月齢における行動量解析では、治療マウス群は正常マウス群と同程度まで、活動量改善がみられた (n=5-7,  $p=0.14$ )。ベクター分

布を調べたところ、骨格筋以外にも心臓や肝臓にベクターが導入されたが、各臓器の ALP 活性を検討したところ、心臓や肝臓での発現は著しく抑制され、骨格筋で顕著に発現していることがわかった。しかし、骨の伸長に関しては治癒不全が認められ、大腿骨長径は正常マウス群と比べ治療マウス群では明らかに低値であった ( $n=5-9, p < 0.001$ )。尾椎骨間距離に関しても、同様に治療マウス群で低値であった ( $n=5-9, p < 0.01$ )。さらに、マイクロ CT にて大腿骨成長板部の横断像を解析したところ、治療マウス群では皮質骨の欠如や骨梁配列の不整が認められ、骨密度も有意に低かった ( $n=3, p < 0.005$ )。組織染色にて、同部位を確認した結果、治療マウス群は成長板軟骨細胞の異常増殖、変性および変性類骨様組織を認めた。ALP 染色では、限局的に染色されたが、正常個体に比べ弱く不十分であることがわかった。

#### **【考察】**

今回、血中 ALP 活性の維持、延命効果、行動量の正常化に関してはほぼ完治出来た。よって、筋特異的プロモーターを用い骨格筋以外での発現を抑制した条件でも従来の組織非特異的プロモーター下での遺伝子治療と同様の効果が得られることが明らかとなった。ただし、HPP 遺伝子治療マウスでの骨状態に関し、治癒不全が残ることが示唆され、骨局所の ALP 分布量が不十分であることが原因と考えられた。今後、骨の治癒不全の改善に向けて、免疫寛容誘導やコドン最適化、さらに活性が高い筋特異的プロモーターである spc5-12、CK8、CK9 などを使用し、AAV ベクターによる発現量を高め、骨局所 ALP 分布量を改善させることにより、安全で有効性が高い HPP 治療法の開発が期待される。