

## 論文審査の結果の要旨

### Treatment of hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatase via self-complementary AAV8 vector

8型アデノ随伴ウイルスベクターによる骨親和性アルカリホスファターゼの筋特異的発現を応用した低ホスファターゼ症に対する遺伝子治療

日本医科大学大学院医学研究科 分子遺伝医学分野  
大学院生 高橋 有希

Molecular Therapy - Methods & Clinical Development 3, Article number: 15059 (2016) 掲載  
doi:10.1038/mtm.2015.59

低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia, HPP) 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等の硬組織の石灰化障害を主徴とする遺伝性疾患である。これまで HPP には有効な治療法がなかったが、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 治療薬として販売承認された。しかし、酵素補充療法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く、胎児治療も困難である。このため従来、様々なウイルスベクターを応用した酵素補充療法が検討され、ベクターの単回投与により、HPP モデルマウス (*Akp2*<sup>-/-</sup>マウス) における治療効果が報告されてきた。ただし、組織非特異的プロモーターを搭載したウイルスベクターでは、多くの臓器で治療遺伝子が過剰発現するため、安全面で懸念があった。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 (MCK) プロモーター制御下に TNALP-D10 を発現する 8 型アデノ随伴ウイルス (AAV8) ベクターを構築し、HPP に対する遺伝子治療の有効性と安全性を検討した。

生後 1 日齢の *Akp2*<sup>-/-</sup> 新生仔マウス左右大腿四頭筋に self-complementary 型のゲノム構造を有する AAV8-MCK-TNALP-D10 ( $2.5 \times 10^{12}$  v. g. / 個体、総量各  $15 \mu$ l) を筋肉内投与し、3 ヶ月後に安楽殺を行った (n=10)。そして、血中アルカリホスファターゼ (ALP) 濃度の推移、行動量、ベクター分布および各臓器中 ALP 活性に関して検討した。骨状態に関しては X 線撮影、マイクロ CT 撮影、および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。

その結果、治療マウス群の血中 ALP は、3 ヶ月に渡り 1.0 U/ml 以上の活性が維持され、これとともに有意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、活動量の改善がみられた (n=5-7,  $p=0.14$ )。ベクター分布の検証では、骨格筋以外にも心臓や肝臓にベクターが導入されていたが、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制御され、骨格筋で効率良く発現していた。以上から、安全性を重視し筋特異的プロモーターを用いて骨格筋以外での発現を制御した条件でも、従来の組織非特異的プロモーターによる遺伝子導入と同様の治療効果が得られることが明らかとなった。

第二次審査では上記内容に加え、骨の治癒不全に関して考察した。また、今後の研究目標として、骨の治癒不全の改善に向けて、免疫寛容誘導やコドン至適化、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、より安全で有効性が高い HPP 治療法の開発を検討していく旨を発表した。さらに、従来の遺伝子治療との比較、骨の治癒不全に関しての改善方法、胎児治療の可能性、今回の治療法の問題点等、本研究に関する考察について広く質疑が行われ、いずれも適切な回答がなされた。