

—特集 [遺伝子治療 update : 日本医科大学の遺伝子治療研究 (6)]—

異染性白質ジストロフィー (MLD) に対する遺伝子治療



三宅 紀子

日本医科大学 生化学・分子生物学 (分子遺伝学)

Gene Therapy for Metachromatic Leukodystrophy; MLD

Noriko Miyake

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

Abstract

Lysosomal storage diseases (LSDs) are a heterogeneous group of diseases caused by genetically determined defects in lysosomal enzymes. Specific molecular mechanisms and disease phenotypes depend on the type of storage material affected. Current treatments for LSDs include enzyme replacement therapy (ERT) and hematopoietic cell transplantation (HCT) from allogeneic healthy individuals. However, those approaches are applicable only to a limited number of LSDs and lack efficacy for some clinical conditions. Hematopoietic stem cell gene therapy (HSC-GT) incorporating lentiviral vectors has shown strong clinical efficacy when administered to patients with metachromatic leukodystrophy (MLD) and is now registered as a pharmaceutical product. More recently, HSC-GT has also shown promising results in patients with Hurler's syndrome. Here, we report on the treatment for MLD currently being used in clinical practice and the gene therapy for MLD being studied at Nippon Medical School.

(日本医科大学医学会雑誌 2023; 19: 224-228)

Key words: hematopoietic stem cell transplantation, blood-brain barrier, adeno-associated virus vector, neonatal gene therapy, intrathecal administration

はじめに

異染性白質ジストロフィー (metachromatic leukodystrophy; MLD) は、リソソーム酵素であるアリルスルファターゼ A (arylsulfatase A; ARSA) の欠損により発症する常染色体劣性遺伝の先天代謝異常症である。酵素の欠損が神経および内臓組織にスルファチドの蓄積をもたらし、中枢・末梢神経障害を呈する。中枢神経病変の遺伝子治療において問題となるのは、治療用遺伝子を運ぶベクターがいかに血液脳関門 (blood brain barrier; BBB) を通過させるかということである。われわれは BBB 通過可能で、中枢神

経細胞に高率に遺伝子導入が可能なアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus; AAV) ベクターを用いた中枢神経病変の遺伝子治療法の開発を行っている。本稿では現在行われている MLD の治療と共に当教室で研究されている AAV ベクターを使用した中枢神経病変の遺伝子治療のアプローチを紹介する。

1. 異染性白質ジストロフィー

MLD は、ライソソーム蓄積症 (lysosomal storage diseases; LSDs) の一疾患で ARSA の欠損により、脳白質、中枢・末梢神経、腎臓、肝臓などにスルファチ

Correspondence to Noriko Miyake, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: noriko@nms.ac.jp

Journal Website (<https://www.nms.ac.jp/sh/jmanms/>)

ドが蓄積し、特にミエリン形成細胞である、中枢（オリゴデンドロサイト）および末梢（シュワン細胞）の障害により脱髄を引き起こし、中枢・末梢神経障害を呈する。発症頻度は4万～16万人に1人¹で、発症時期と臨床経過により、乳児型、若年型、成人型に分類される。乳児型は2歳までに発症し、筋緊張低下、深部腱反射消失、歩行障害を呈し全体の50～60%を占め、最も重症化しやすく予後不良である。若年型は4～6歳頃に発症し、視神経萎縮、知能障害、痙性麻痺などを呈し、成人型は10代後半以降に情緒障害、言語障害、痴呆、精神症状などで発症し、5～10年の経過で進行する。

2. MLD の治療法

MLD の治療で重要なのは、いかに中枢神経系の障害を治療するかということであり、それに当たり治療用タンパク（または遺伝子）をいかにBBBを通過させ、中枢神経障害を治療するかが鍵となっている。

(1) 酵素補充療法 (enzyme replacement therapy ; ERT)

酵素補充療法で第I/II相臨床試験が行われている。しかしながら静脈注射では酵素はBBBを越えないためこの臨床試験ではくも膜下腔内薬物送達デバイス（酵素を分泌するデバイス）を手術にて埋めこんで、recombinant human ARSA (rhARSA) を dose escalation study (10, 30, 100 mg) で髄腔内投与 (NCT01510028) が行われている²。結果としてrhARSA 関連の重篤な有害事象 (serious adverse events ; SAEs) は観察されていないが、患者の25%が髄腔内装置または薬物送達方法に関連するSAEsを経験。脳脊髄液 (cerebrospinal fluid ; CSF) のスルファチドおよびリゾスルファチドレベルは、治療後100 mgを投与した群で正常範囲内に低下した。低用量投与では時間の経過とともに運動機能の一般的な低下があったが、100 mgを投与された患者ではそれほど目立たない低下に向かう傾向であった。

(2) 遺伝子治療

1) 脳内直接投与

AAVの新しい血清型のうち、霊長類のAAVrh.10は、AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8型よりも脳内注射部位から効率よく拡散する^{3,4}。ARSA発現AAVrh.10 (AAVrh.10-ARSA) ベクターを直接脳内に投与する方法で第I/II相臨床試験 (NCT01801709) が行われ、発症前または発症初期の4人の患者に対して

脳内の12カ所に 1×10^{12} or 4×10^{12} vector genomes (vg) を年齢に応じて投与された。治療前には検出されなかった髄液中のARSA活性は有意に（最後の評価で対照値の20～70%に達した）上がったものの、症状の初期段階の患者では症状が悪化し続け、無症候性の経過の患者では症状が発現したため、疾患の自然経過と有意な差を認めなかった。その結果、有効性の欠如により研究は終了した⁵。

2) 造血幹細胞移植 (HSC transplantation ; HSCT)

現在、MLDのGold standardと呼ばれているのが、イタリアのグループによって行われている、レンチウイルスを用いて造血幹細胞にARSAを大量に発現させ骨髄移植する方法である⁶。この試験で対象となった患者は29名で、16名が後期乳児型、13名が初期若年型で、発症前または発症初期の患者である。この治療法はMLDにおいて、中枢・末梢神経系疾患の進行を抑制・遅延させることが初めて証明された治療法である。しかしながら症状が出る前か、または初期症状の患者にしか行われていないこと、また症状が出る前にブスルファンによる骨髄破壊が行われ、これによるSAEsが出ていること、29人中4人の患者にARSA抗体ができたことなどの問題点がみられた。この治療法は大変有望ではあるが、病気を遅らせているのか、止めているのか詳細は不明である。2022年の4月にLibmedly[®]という商品名で医薬品（再生医療等製品）として販売されている。

(3) 現治療法の問題点と課題

以上述べてきた通り現状の治療法の問題点と課題として、ERTでは、rhARSA関連の重篤なSAEsは観察されていないが、患者の25%は、髄腔内装置または薬物送達法に関連するSAEsがみられた。また、MLDに対する髄腔内ERTは有望であるが、ARSAの半減期は4日であり、患者の生涯にわたって毎週または隔週でhARSAを投与する必要がある。遺伝子治療では直接脳内に投与する方法では治療効果がなく中止となっており、造血幹細胞遺伝子治療では発症前または発症初期の段階で治療する必要がある。この戦略は、以前に特定されたMLD患者の兄弟姉妹に限られているという問題点がある。

3. 日本医科大学（当教室）での

MLDの遺伝子治療研究

当教室ではMLDモデルマウスを用いた遺伝子治療研究を行ってきており、今までにレトロウイルスベクターを用いた骨髄移植、レンチウイルスベクターによ

表1 当教室におけるMLDの遺伝子治療研究

動物種	投与時期	ベクター	投与型路	論文発表
MLDモデルマウス	8W	Lenti	脳内(細胞治療)	Brain Res. 2006; 1094: 13-23.
	8W	AAV1	脳内(海馬)	Mol Ther. 2007; 15: 38-43
	8W	AAV1	髄腔内	J Gene Med. 2009; 11: 498-505.
	12W	Retro	骨髄移植	Mol Ther. 2010; 18: 1373-8.
	P1(新生児)	AAV9	静脈内	Gene Ther. 2014; 21: 427-33
	12W	AAV1	脳室内	Sci Rep. 2014; 4: 5506.
	18W	scAAV1	脳室内	Sci Rep. 2015; 5: 13104.
	6W, 12M	AAV9	髄腔内	Sci Rep. 2021; 11: 20513

る細胞治療や AAV ベクターによる静脈内、脳室内、髄腔内投与にて有効性を検討してきた。われわれが現在までに行ってきた MLD の遺伝子治療研究を表 1 にまとめた。

(1) *Ex vivo* 遺伝子治療

1) 造血幹細胞移植 (HSCT)

LSDs では HSCT が一般的に広く行われている。われわれは MLD モデルマウスを使用し、移植細胞に造血幹細胞を増殖させる機能を持つ HoxB4 (Homeobox B4) 遺伝子^{7,8}を導入することにより、移植率の向上、脳内への移植細胞の増加に成功しており、脳神経症状の改善も認めている⁹。また、HoxB4 を発現させることにより、脳内においてオリゴデンドロサイトへの分化も認めている。もちろん詳細な副作用の検討は必要であるが、骨髄移植を用いた脳神経障害の遺伝子治療に有用性が期待される。

(2) *In vivo* 遺伝子治療

1) 脳室内投与

ARSA 発現 1 型 AAV (AAV1-ARSA) ベクターを側脳室に投与すると、脳室表面の上皮細胞や脈絡叢に高率に遺伝子導入された¹⁰。これらの細胞はウイルスベクターに感受性があり、脳全体を循環する CSF に継続的に放出される治療タンパク質の貯蔵庫として機能する可能性があるため、いくつかの遺伝子治療研究で標的となっている^{11,12}。AAV1-ARSA ベクターを脳室内へ 1 回の投与で上皮細胞に導入遺伝子の発現が誘導され、1 年以上持続すること、ARSA の血漿中での長期発現 (>56 w)、CSF 中への分泌 (>12 w) が確認された。

2) 静脈内投与

i) 新生児期の全身投与

MLD の治療で重要なのは、いかに中枢神経系の障害を治療するかということであり、よって遺伝子治療

を行うにおいて問題となるのは、治療用遺伝子をいかに BBB を通過させるかということである。われわれは脳神経組織に親和性の高い 9 型 AAV (AAV9) ベクターを新生児期に投与することにより脳神経組織に広範囲に遺伝子導入が可能であることを報告しており (図 1)¹³、この研究成果を踏まえ、中枢神経症状を伴う新生児期 MLD モデルマウスの治療法¹⁴に成功している。

新生児期に投与することの利点として 1) BBB が未発達なため、治療用ベクター・蛋白が BBB を通過し、脳神経組織の治療が可能である。2) 少量のベクター量での治療が可能であり、コスト面、安全性において利点を持つ。3) 早期に治療することにより、病状の軽症時での治療が可能であり、病気の進展も防げ、より効果的な治療効果が期待できる。われわれは生後 1 日目の MLD モデルマウスに ARSA 発現 AAV9 型 (AAV9-ARSA) ベクター静脈注射し、脳全体にわたり遺伝子導入されていることを認め、また投与後 1 年半に渡り導入遺伝子が発現していることを確認した。このように AAV9 を用いた新生児期での全身投与は脳神経症状を伴う遺伝性疾患に有用であると考えられた。そのためには病気発生のリスクがある家族における早期発見が重要であり、新生児検診システムの導入に向けた法整備等も望まれる。

ii) 成体時期の全身投与

成体の神経症状の新規治療法の確立において、静脈注射は脳指向性の高い AAV9-ARSA ベクターを用いても効率が良くないために、self-complementary (sc) AAV9 型ベクター¹⁵を使用して成体 MLD モデルマウスに静脈内投与した。これにより成体マウスにおいても中枢神経組織で発現を認め、スルファチド蓄積の抑制を確認し、行動実験においても改善を認めた。

3) 髄腔内投与

MLD モデルマウスを用い、AAV1-ARSA ベクター¹⁶、または AAV9-ARSA ベクター¹⁷を髄腔内に注

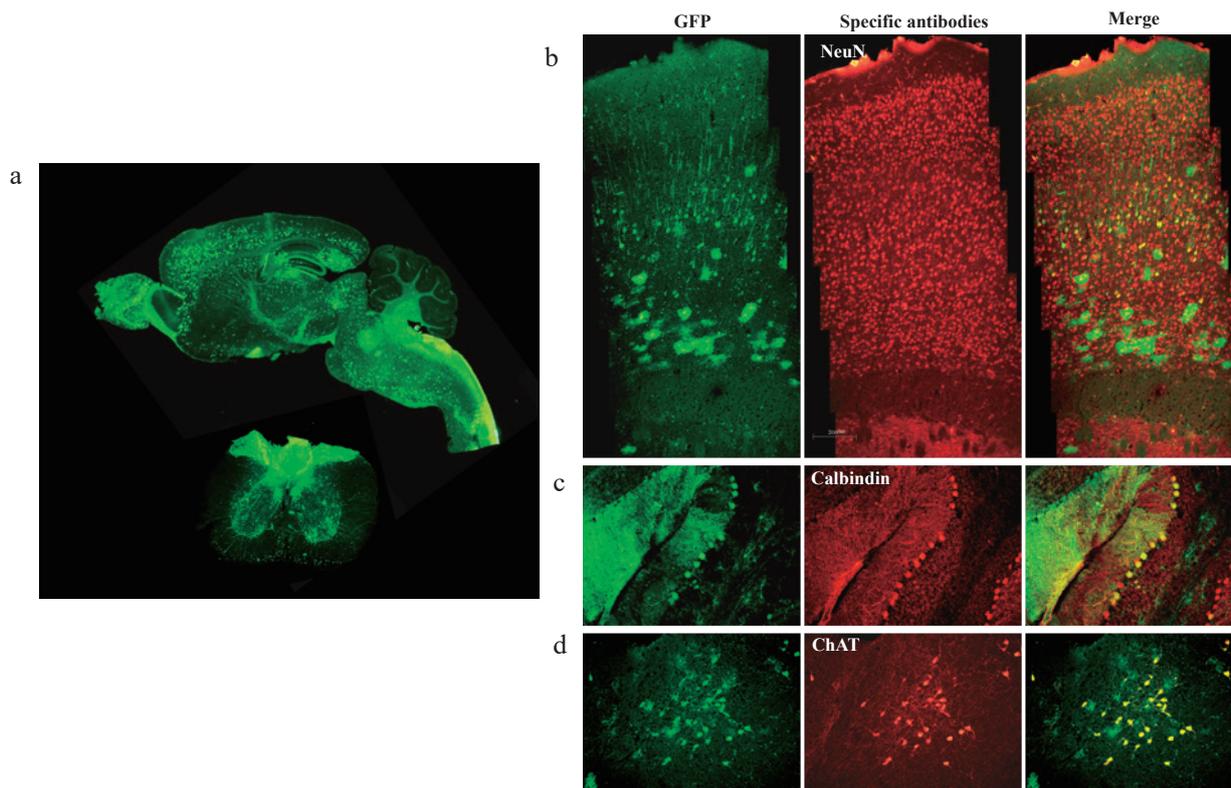


図1 GFP 発現 9 型 AAV ベクターの新生児期マウスへの静脈内投与
 新生児期のマウスへ GFP 発現 9 型 AAV ベクター (AAV9-GFP) を 1.5×10^{11} vg 静脈内注射し, 18 カ月後に免疫染色にて GFP の発現を検討した。
 a. 脳および脊髄での GFP 発現. b. 大脳皮質でニューロン, グリア細胞, c. プルキンエ細胞, d. 運動ニューロンに GFP の発現が認められた。
 NeuN (a neuron marker), Calbindin (a purkinje marker), ChAT (a motor neuron marker).

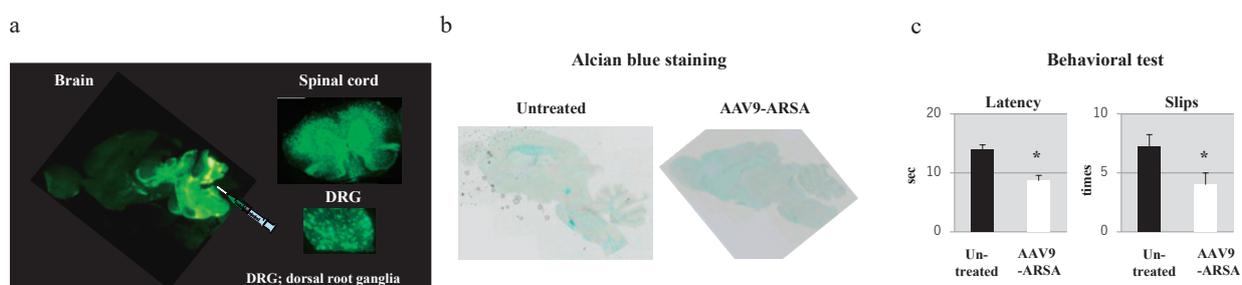


図2 成体 MLD モデルマウスへの 9 型 AAV ベクターの髄腔内投与後の遺伝子発現と治療効果
 a. AAV9-GFP (4.0×10^{11} vg) の髄腔内投与. 投与後 12 カ月, 小脳, 脳幹を中心に脊髄, DRG への高い発現効率を認めた。
 b. ARSA 発現 AAV9 の成体 MLD モデルマウスへの髄腔内投与. Alcian blue 染色による脳内でのスルファチド蓄積の抑制を確認。
 c. バランスビームテストによる行動実験で有意 (* $p < 0.05$) に改善を認めた。

入ることにより, 小脳, 脳幹を中心に脊髄, 後根神経節への高い発現効率を確認し, 脳内における広範囲な ARSA 活性を認めると共に蓄積産物であるスルファチドの減少を認めた (図 2). 髄腔内投与は脳内直接投与より非侵襲的であり, より実践的な方法であると考えられる。

おわりに

以上, MLD の現状の治療法および当教室にて行ってきた遺伝子治療研究を紹介した. ARSA 遺伝子を導入した骨髄細胞を移植することにより, MLD の脳神経症状の進行を抑えられたことは画期的なことであり, MLD のみならず脳神経症状を伴う疾患の遺伝子治療法として期待される一方で, 骨髄移植による ex

vivo 遺伝子治療では症状の発症前に限られているという制限がある⁶。よってすべての患者を治療するには AAV ベクターを用いた新生児遺伝子治療を含めた新しい MLD の遺伝子治療も開発されていくものと思われる。

今後、酵素を改変したり、より脳指向性の高いベクターを作製することで、少ない投与量で高い発現効率が得られるような安全なベクター開発が望まれている。

また、遺伝子組換え造血幹細胞の ICV 注入など、異なる送達方法を組み合わせたり、治療用 AAV ベクターの髄腔内投与に加え、脳室内投与の組み合わせなどにより中枢神経系への効果が改善され、より早く臨床効果が得られる可能性があり、より進行した病態の患者さんの治療も可能になるとと思われる。

この研究は日本医科大学動物実験委員会（承認番号：25-043, 26-064）および日本医科大学組換え DNA 実験安全委員会（承認番号：H22-3）が審査・承認したプロトコルに従って実施された。

本研究は JSPS 科研費 JP15K09604, JP18K07859 の助成を受けたものです。

文 献

- Gomez-Ospina N: in GeneReviews ((R)) (M. P. Adam et al., eds) 1993.
- I' Dali C, Sevin C, Krägeloh, et al.: Safety of intrathecal delivery of recombinant human arylsulfatase A in children with metachromatic leukodystrophy: Results from a phase 1/2 clinical trial. *Mol Genet Metab* 2020; 131: 235-244. doi: 10.1016/j.yimgme.2020.07.002.
- Rosenberg JB, Sondhi D, Rubin DG, et al.: Comparative efficacy and safety of multiple routes of direct CNS administration of adeno-associated virus gene transfer vector serotype rh.10 expressing the human arylsulfatase A cDNA to nonhuman primates. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2014; 25: 164-177. doi: 10.1089/humc.2013.239.
- Piguet F, Sondhi D, Piraud M, et al.: Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice. *Hum Gene Ther* 2012; 23: 903-914. doi: 10.1089/hum.2012.015.
- Sevin C, Roujeau T, Cartier N, et al.: Intracerebral gene therapy in children with metachromatic leukodystrophy. *Mol Genet Metab* 2018; 123: S129. doi: 10.1016/j.yimgme.2017.12.352.
- Fumagalli F, Calbi V, Natali Sora MG, et al.: Lentiviral haematopoietic stem-cell gene therapy for early-onset metachromatic leukodystrophy: long-term results from a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial and expanded access. *The Lancet* 2022; 399: 372-383. doi: 10.1016/s0140-6736 (21) 02017-1.
- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK: HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell* 2002; 109: 39-45. doi: 10.1016/s0092-8674 (02) 00697-9.
- Miyake N, Burn AC, Magnusson M, Miyake K, Scadden DT, Karlsson S, HOXB4-induced self-renewal of hematopoietic stem cells is significantly enhanced by p21 deficiency. *Stem Cells* 2006; 24: 653-661. doi: 10.1634/stemcells.2005-0328.
- Miyake N, Miyake K, Karlsson S, Shimada T: Successful treatment of metachromatic leukodystrophy using bone marrow transplantation of HoxB4 overexpressing cells. *Mol Ther* 2010; 18: 1373-1378. doi: 10.1038/mt.2010.74.
- Yamazaki Y, Hirai Y, Miyake K, Shimada T: Targeted gene transfer into ependymal cells through intraventricular injection of AAV1 vector and long-term enzyme replacement via the CSF. *Sci Rep* 2014; 4: 5506. doi: 10.1038/srep05506.
- Herenu CB, Sonntag WE, Morel GR, Portiansky EL, Goya RG: The ependymal route for insulin-like growth factor-1 gene therapy in the brain. *Neuroscience* 2009; 163: 442-447. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.024.
- Liu G, Martins I, Wemmie JA, Chiorini JA, Davidson BL: Functional correction of CNS phenotypes in a lysosomal storage disease model using adeno-associated virus type 4 vectors. *J Neurosci* 2005; 25: 9321-9327. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2936-05.2005.
- Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Hirai Y, Shimada T: Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. *Brain Res* 2011; 1389: 19-26. doi: 10.1016/j.brainres.2011.03.014.
- Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Yamamoto M, Shimada T: Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector. *Gene Ther* 2014; 21: 427-433. doi: 10.1038/gt.2014.17.
- Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, Yadav S, Ojeda SR, Samulski RJ: Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol Ther* 2011; 19: 1058-1069. doi: 10.1038/mt.2011.72.
- Iwamoto N, Watanabe A, Yamamoto M, et al.: Global diffuse distribution in the brain and efficient gene delivery to the dorsal root ganglia by intrathecal injection of adeno-associated viral vector serotype 1. *J Gene Med* 2009; 11: 498-505. doi: 10.1002/jgm.1325.
- Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Suzuki H, Shimada T: Treatment of adult metachromatic leukodystrophy model mice using intrathecal administration of type 9 AAV vector encoding arylsulfatase A. *Sci Rep* 2021; 11: 20513. doi: 10.1038/s41598-021-99979-2.

(受付：2023年5月2日)

(受理：2023年7月3日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。