

—特集 [遺伝子治療 update : 日本医科大学の遺伝子治療研究 (7)]—

低ホスファターゼ症モデルマウスにおける
遺伝子治療—臨床応用に向けて—

松本 多絵

日本医科大学多摩永山病院小児科

日本医科大学遺伝子治療学

Gene Therapy for Hypophosphatasia in *Alpl*^{-/-} mice (infantile HPP model)

—Toward Clinical Application

Tae Matsumoto

Department of Pediatrics, Nippon Medical School Tama Nagayama Hospital

Department of Gene Therapy, Nippon Medical School

Abstract

Hypophosphatasia (HPP) is an inherited bone disease resulting from a deficiency of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNALP). It is fatal in its severe perinatal and infantile forms. Asfotase alfa (Strensiq®) is an approved enzyme replacement therapy for HPP. Its use requires injections 3-6 times per week for all of the patient's life. Therefore, although this treatment is effective, it is also burdensome. We investigated the efficacy and safety of a gene therapy drug (TNALP-D10-expressing type 8 adeno-associated virus vector: ARU-2801) administered intramuscularly to *Alpl*^{-/-} mice (infantile HPP model) and non-human primates with the aim of developing a less burdensome treatment. After administration of 3.0×10^{11} vg/body (n=4/7) or 1.0×10^{12} vg/body (n=5/7) ARU-2801, treated mice maintained high plasma ALP activity and exhibited body weight gain and bone maturity similar to wild-type mice throughout their survival period, which was up to 18 months. Biodistribution of ARU-2801 was detected only in the intramuscular region on the administration side. There were no tumors or ectopic calcification detected at autopsy or histopathological examination. After administration of 1.0×10^{13} vg/body ARU-2801 to juvenile macaque monkeys, durable high plasma ALP levels were sustained for up to 38 weeks with no biochemical abnormalities detected in the blood. Radiological and histopathological examinations also showed no abnormality. The clinical chemistry parameters for ARU-2801-treated mice and macaques indicated that plasma ALP activity is maintained with no toxicities at levels that are potentially clinically efficacious. Thus, ARU-2801, which can be administered as a single dose, has the potential to improve the quality of life of HPP patients by eliminating the need for indefinitely repeated injections.

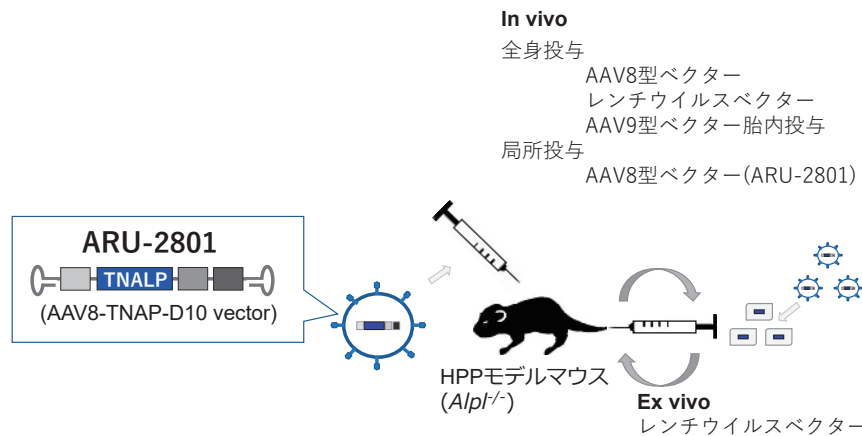
(日本医科大学医学会雑誌 2023; 19: 229-234)

Key words: hypophosphatasia, muscle injection, neonatal gene therapy, adeno-associated virus vector, tissue-nonspecific alkaline phosphatase

Correspondence to Tae Matsumoto, Department of Pediatrics, Department of Gene Therapy, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail : tae@nms.ac.jp

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



新生児期HPPモデル($Alpl^{-/-}$)マウスにTNALPを発現する遺伝子を導入した。経静脈的にAAV8型、レンチウイルス、局所にAAV8型、採取した骨髓細胞にレンチウイルスを用いて骨髓移植を行った。AAV9型では胎内投与を行った。

図1 HPPモデル ($Alpl^{-/-}$) マウスの遺伝子治療

はじめに

低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia: HPP) は、非特異的アルカリフォスファターゼ (Tissue nonspecific alkaline phosphatase: TNALP) をコードする *Alpl* 遺伝子の異常のために血清アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が低下して起こる遺伝性の骨疾患である¹。現在は6つに病型分類されその症状は多岐にわたるが、中でも日本で最も多い周産期重症型は、全身骨の低石灰化・長管骨の変形・骨幹端不整等が顕著で、徐々に骨の石灰化が消失して呼吸不全などで致死的な経過をたどる。かつては対症療法しかなかったが、2015年に酵素補充療法ストレンジック®が認可された²。不足する酵素を補充する治療が可能となったことで、これまで考えられなかった治療効果を得ている。一方で、酵素補充療法は生涯にわたる週3~6回の注射が必要であり、患者、家族への負担の少ない根治療法が求められている。

われわれは、これまでHPPに対する遺伝子治療法の研究を続けてきた。TNALPを発現するレンチウイルスベクター³、アデノウイルス随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) ベクター⁴を作成し、*Alpl* 遺伝子をノックアウトしたHPPモデル ($Alpl^{-/-}$) マウス⁵への静脈内投与で治療を成功させた。さらに、AAVベクターの筋肉内投与⁶、AAVベクターの胎内投与⁷、レンチウイルスベクターにより遺伝子導入した造血幹細胞移植⁸のすべてで $Alpl^{-/-}$ マウスの延命、骨、歯牙形成の改善⁹、重篤な副作用のないことを確認した (図1)。その中でも最も簡便で安全な方法として、AAV8型ベクターの筋肉内投与を用いてTNALPを発現させる遺伝子治療薬品 (ARU-2801) の開発を行っており、

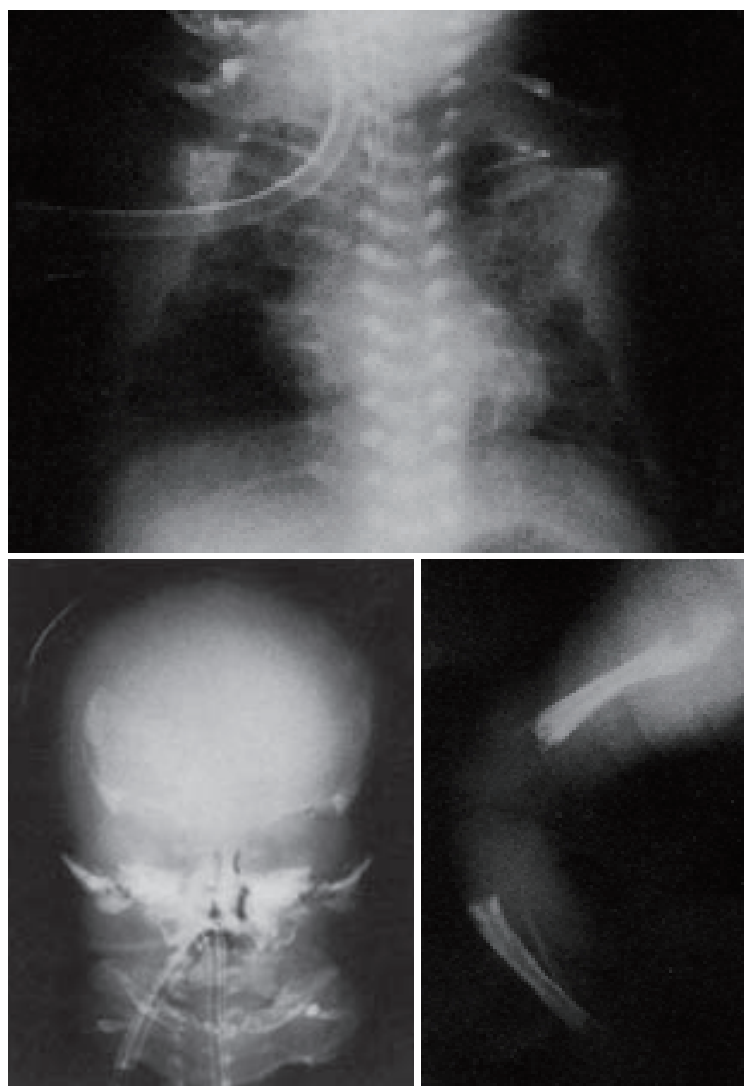
こちらについて紹介する。

1. 低ホスファターゼ症

(1) 原因と病態

非特異的アルカリフォスファターゼ (Tissue nonspecific alkaline phosphatase: TNALP) をコードする *Alp* 遺伝子に異常が起こると血清アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が低下する。*Alpl* 遺伝子は第1染色体短腕の1p36.12に存在し、これまでに約400種類の異常が報告されているが、genotypeとphenotypeは必ずしも一致しないため、同じgenotypeを持つ兄弟間でも症状が異なることがある¹⁰。低ホスファターゼ症 (HPP) は、現在は発症時期と症状から周産期型、周産期良性型、乳児型、小児型、成人型、歯限局型の6つに病型分類され、その症状は多岐にわたる。また、歯限局型と考えられていた病型が経過とともに歯以外の症状を呈して、小児型、成人型と診断が変化していくこともある。周産期型、乳児型ではALP活性の極度の不足のため骨形成が脆弱となり、骨性胸郭形成が未熟となる。生下時からの呼吸補助を要し、致死的である (図2)^{2,11}。

骨の石灰化は、骨芽細胞が骨基質として細胞外に類骨を分泌するとそこにリン酸カルシウム的一种であるハイドロキシアパタイトが沈着することで起こる。ただし無機ピロリン酸 (PPI) がハイドロキシアパタイトに結合して石灰化を阻害するので、骨が石灰化するためにはPPIを分解する必要がある。ALPがPPIを分解することで無機リン酸 (Pi) が生成し、Piとカルシウムが結合してハイドロキシアパタイトとなりコラーゲンI型を主成分とする類骨に沈着して骨が形成され



上段:胸郭,
下段左:頭蓋骨, 下段右:下肢

図2 HPP 周産期型レントゲン写真

平山恒憲: 目で見える小児科 乳児型低ホスファターゼ症. 小児科 1993 ; 34 : 巻頭より転載

る。つまり ALP が欠乏すると骨形成が阻害される。

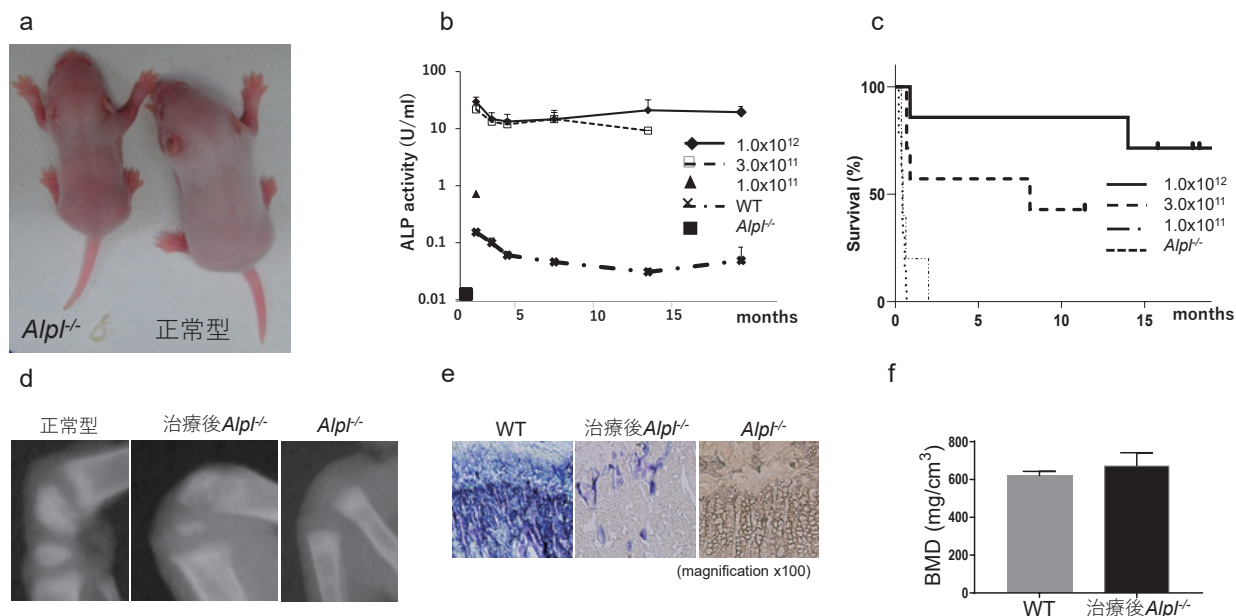
また、中枢神経では ALP が血液中のピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) を分解してピリドキサル (ビタミン B6) にすることでビタミン B は脳血管関門を初めて通過可能となる。その後脳内で再度リン酸化を受けてピリドキサル-5'-リン酸となって GABA, ドーパミン, セロトニンなどの神経伝達物質の合成に関与する。このため、血中の ALP が極度に不足する重症型では、ビタミン B6 依存性けいれんを起こす。

HPP 周産期型、乳児型は主に常染色体潜性遺伝、成人型、歯限局型は主に常染色体顕性遺伝とされ、通常小児以降で発症する HPP は軽症と考えられる。しか

し、小児型、歯限局型では幼児期からの乳歯脱落で義歯を要し、歯が脆弱なため齲蝕が増悪しやすい。日常生活動作でも、下肢痛、歩行耐用能の低さなどを認める。また、成人型では易骨折や、骨折の治癒遷延などを来し、生命にはかかわらなくても QOL の低下を来す。

(2) これまでの治療

かつては対症療法しかなく、周産期型の高カルシウム血症に対して低カルシウムミルクの投与、ビタミン B6 依存性けいれんに対してビタミン B6 の投与、胸郭形成不全、肋骨骨折による呼吸不全に対しての呼吸器



a. 生後6日目の同腹マウス b, c. 新生児期にARU-2801を筋注した d. 生後10日に未治療と治療Alpl^{-/-}マウスのレントゲン写真を比較した e. 生後18カ月に骨のALP活性染色を行った f. 生後18カ月に骨密度を測定した. b, c, e, fは文献6より引用改変

図3 ARU-2801により Alpl^{-/-}マウスの延命と骨形成を認めた

補助などを行うのみだった。乳歯脱落、齲歯、骨折にも対症療法を行うのみだった。しかし、2015年に酵素補充療法ストレンジック®が認可され、不足する酵素を補充する治療が可能となったことで、延命、運動機能の改善、難治だった骨折の治癒などの治療効果を得ている。特にこれまで致死的とされていた周産期重症型の患児が救命できるばかりか、これまで経口摂取など考えられなかった重症型で柔らかいものを経口摂取できるようになる、歩行可能になるなど、生活が広がっている。また、成人型では、一般的な骨折治療の固定では治癒しなかった骨折が酵素補充療法で治癒するようになったことも報告されている^{2,12}。一方で、週3~6回の皮下注射を自宅で、小児期には保護者が行うことの心理的、物理的な負担、局所の腫脹や発赤、疼痛などの反応など、まだ解決すべき問題が残り、根治療法が切望されている¹³。

2. 遺伝子治療

(1) ARU-2801の開発

まず、TNALPの石灰化能についてAAVベクターを用いてTNALPを発現させた場合の条件をin vitroで検討した。膜結合型タンパクであるヒトTNALPをそのまま発現させるTNALP-wild, 膜との結合部分を除去して可溶性タンパクとして体中で発現するTNALP-flag, 可溶性となったヒトTNALPの触媒ドメインに骨親和性を持つ10個のアスパラギン酸残基

を結合させたTNALP-D10の3種の石灰化能について細胞を用いて比較し、TNALP-D10が最も効率よく石灰化を起こすことを確認した⁴。そこでTNALP-D10を選択し、Alpl^{-/-}マウスの筋肉内投与において、全身投与に劣らずHPPの治療に有効であることを、局所投与であるためより安全であることを確認し、ARU-2801として筋肉への遺伝子導入を行う遺伝子治療薬としての臨床応用を目指すことにした。

(2) これまでのAAV治療

AAVはヒトにも動物にも広く見られるウイルスで、野生型AAVはヒトに対して非病原性であり、単独では複製されないことから安全性が高い。本来野生型であれば宿主の19番染色体に組み込まれるという特徴を持つが、ベクターとして改変されたAAVベクターはそれに必要なrep遺伝子を欠くため、ゲノムが核に移行した後ベクターは染色体外に長期的に安定して存在するという特徴を持つ。また、神経や筋肉のような非分裂細胞にも導入されること、AAVの血清型により組織向性が異なり特定の組織への導入を目指すことができるなどの特徴から遺伝子治療のベクターとして研究されてきた。生殖細胞への染色体の遺伝子組み込みリスクはヒト以外の霊長類への投与で組み込み頻度は10⁻⁴~10⁻⁵とされる。一方で、導入できる遺伝子のサイズが4.7 kb前後と小さいので導入できる遺伝子が限られるという欠点を持つ¹⁴。

このように利点の多い AAV ベクターではあるが、遺伝子治療の臨床応用が進むにつれて全身投与下での副作用の報告もみられる。血友病に対する AAV ベクターを使用した全身投与による治療では、凝固因子活性の上昇とともに肝機能が悪化し、低下とともに改善するが、その原因は今のところわかっていない。また、AAV のカプシドタンパクに対してインターフェロンガンマ (IFN γ) が検出されることが分かっており、臨床的にはステロイド、免疫抑制剤で IFN γ による症状を抑制して治療を継続している^{15,16}。

細胞障害性 T 細胞による肝機能異常は多数の報告があり、脊髄性筋萎縮症 (SMA) に対しては AAV9 型ベクターを全身投与した際、全投与例の 1/3 で肝障害が報告された。そして、X 連鎖性ミオチューブラーミオパチーでは高用量を投与した患者のうち 3 人が肝不全で死亡するという事例があった¹⁵。

血友病、SMA に対する治療は全身投与であるが、上記の副作用の事例を考えると、局所投与でベクターが局所にとどまれば肝臓への影響を避けることができ、より安全と考えられる。また、仮に AAV に対する反応を認めて体内から AAV ベクターを除去したいと考えた時、ベクターの存在する局所を外科的に切除することが可能である。つまり、全身投与と異なり可逆性のある投与方法と言える。

(3) ARU-2801 の有効性

ARU-2801 は、1 回の筋肉注射により骨親和性のある TNALP-D10 を長期に血清中に発現することで骨形成を促す。

まず、*Alpl* 遺伝子が欠損した HPP のモデルマウスを使用して ARU-2801 の有効性を確認した。*Alpl*^{-/-}マウスはヒトの乳児型 HPP のモデルであり、出生時には外見上異常なく他のマウスと変わらないが、出生数日後に骨化不全、成長障害が目立ち育成不良となる (図 3a)。特に介入しないと生後 7 日以内に VB6 依存性のけいれんを起こし、約 3 週間で死亡する⁵。この *Alpl*^{-/-}マウスに、生後 1~3 日の新生仔期に ARU-2801 を 1 回大腿四頭筋に筋肉注射し、生存期間、血清 ALP 活性、骨形成の改善、副作用の有無を 18 カ月にわたり検討した。1 \times 10¹¹ vectorgenom (vg)/body, 3 \times 10¹¹ vg/body, 1 \times 10¹² vg/body と投与量に傾斜をつけて投与したところ、1 \times 10¹² vg/body で治療した *Alpl*^{-/-}マウスでは、血中 ALP 活性は正常型に対して 100 倍程度の活性を長期に維持し、マウスの寿命が 2 年間程度であるのに対して観察期間である 18 カ月までの生存期間の延長を認めた (図 3b, c)。3 \times 10¹¹ vg/body の投

与でも 1 \times 10¹² vg/body より個体数は少ないものの寿命の延長を認めた。また、未治療の *Alpl*^{-/-}マウスには確認できない骨端核が、治療マウスでは生後 10 日で確認でき (図 3d)、長期に観察した治療マウスでは骨密度、体重も正常型と有意差なく成長し (図 3e)、病理学的にも骨での ALP 活性発現を認めた (図 3f)。同様に ARU-2801 の筋肉内投与で歯槽骨の骨化の改善も *Alpl*^{-/-}マウスの治療実験で示されており、歯根局型の治療に対しても有効と考えられた⁹。

霊長類ではモデル動物は存在しないため、健常カンクイザルを用いて霊長類に対する ARU-2801 の効果を検討した。ARU-2801 を 1 \times 10¹³ vg/body を 1 回外側広筋に筋肉内投与したところ、一過性に ALP 活性が上昇した後正常値に戻り、その後再上昇して、観察期間の 38 週間の間、正常値の約 2~3 倍の高値を維持した。一過性に抗 ALP 抗体が検出されたが、その低下とともに ALP 活性は再上昇した。以上より、霊長類でも血中 ALP 活性が長期に維持できることが示唆された。また、1 \times 10¹³ vg/body を外側広筋の 4 カ所に投与した別のカンクイザルでも同様の結果を得た。

(4) ARU-2801 の安全性

ARU-2801 投与により、体内では非生理的な高値の ALP 活性が長期にわたって維持されることになる。また、AAV ベクターの全身投与による遺伝子治療でこれまでに肝機能障害、血管障害などが報告されているため、臨床応用に向けて ARU-2801 の筋肉内投与での安全性を確認した。

Alpl^{-/-}マウス、カンクイザルに ARU-2801 を投与した後、血液検査で肝機能、腎機能、カルシウム、リン値の異常がないか、また画像、病理検査で異所性石灰化の有無、腫瘍形成の有無を検討した。生後 1~3 日の新生仔 *Alpl*^{-/-}マウスに ARU-2801 を 1 回大腿四頭筋に筋肉注射した後、観察期間中に肝機能、腎機能、カルシウム、リンの値に異常を認めなかった。また、外表観察、全身骨レントゲン写真でも異所性石灰化を認めず、剖検後の von Kossa 染色で大動脈を含めて臓器にも異所性石灰化を認めないことを確認した。腫瘍形成も認めなかった。さらに、投与した ARU-2801 が投与した局所以外に分布していないかを確認するため各臓器の定量 PCR を行ったところ、カンクイザルの ARU-2801 の 1 \times 10¹³ vg/body 1 回大腿筋肉内投与では各臓器からは定量 PCR で ARU-2801 は検出されなかった。ARU-2801 の 1 \times 10¹³ vg/body 4 回投与の個体でも、投与部位の皮膚と筋肉で ARU-2801 が検出され、肝からは微量に検出された。以上より、ARU-2801 の筋肉内

投与でも大量投与では筋肉から血中に漏れ出て、AAV8の親和性のある肝臓にも分布したと考えられた。定期的に採血を行ったが、肝機能、腎機能、カルシウム、リンの異常値を認めなかった。定期的なレントゲン写真、CT検査、また剖検時の von Kossa 染色を含む病理学的検査でも異所性石灰化、腫瘍発生を認めなかった。

以上より ARU-2801 の筋肉内への1回投与は安全であることが示唆された。

おわりに

これまでわれわれは、胎児期、新生児期の *Alpl*^{-/-}マウスに対して、ウイルスベクターを介した酵素補充療養を行ってきた。この方法は、持続的に酵素を体内で発現して、1回の治療で HPP モデルである *Alpl*^{-/-}マウスを治療可能であった。さらに、全身投与のみならず、局所投与でも治療可能であることが示されたことで、より安全性が担保された。また、霊長類でも持続的に血中 ALP 活性の高値を維持し、さらに治療量で副作用のないことを示せた。このことでヒトへの臨床応用の可能性がより高まったと考えており、今後とも治験に向けて引き続き研究を続けていく予定である。本治療は低ホスファターゼ症の延命効果のみならず、ADL、QOL の改善につながる有用な治療と考えており、早期に臨床応用できることを願っている。

この研究は日本医科大学動物実験委員会（承認番号：21-081, 2021-048）および日本医科大学組換え DNA 実験安全委員会（承認番号：H17-18, 2020-5）が審査・承認したプロトコルに従って実施された。

Conflict of Interest : Aruvant Sciences

文 献

- Mornet E: Hypophosphatasia. Orphanet J Rare Dis 2007; 2: 40.
- Asfotase Alfa (Strensiq). 2017
- Yamamoto S, Orimo H, Matsumoto T, et al.: Prolonged survival and phenotypic correction of *Akp2*^{-/-} hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy. J Bone Miner Res 2011; 26: 135-142.
- Matsumoto T, Miyake K, Yamamoto S, et al.: Rescue of severe infantile hypophosphatasia mice by AAV-mediated sustained expression of soluble alkaline phosphatase. Hum Gene Ther 2011; 22: 1355-1364.
- Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL: Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. Dev Dyn 1997; 208: 432-446.
- Matsumoto T, Miyake K, Miyake N, et al.: Treatment with bone maturation and average lifespan of HPP model mice by AAV8-mediated neonatal gene therapy via single muscle injection. Mol Ther Methods Clin Dev 2021; 22: 330-337.
- Sugano H, Matsumoto T, Miyake K, et al.: Successful gene therapy in utero for lethal murine hypophosphatasia. Hum Gene Ther 2012; 23: 399-406.
- Iijima O, Miyake K, Watanabe A, et al.: Prevention of Lethal Murine Hypophosphatasia by Neonatal Ex Vivo Gene Therapy Using Lentivirally Transduced Bone Marrow Cells. Hum Gene Ther 2015; 26: 801-812.
- Kinoshita Y, Mohamed FF, Amadeu de Oliveira F, et al.: Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Serotype 8 Encoding TNAP-D (10) Improves the Skeletal and Dentoalveolar Phenotypes in *Alpl*^{-/-} Mice. J Bone Miner Res 2021; 36: 1835-1849.
- Hypophosphatasia https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=436&lng=EN.
- Millán JL, Whyte MP: Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. Calcif Tissue Int 2016; 98: 398-416.
- Salles JP: Hypophosphatasia: Biological and Clinical Aspects, Avenues for Therapy. Clin Biochem Rev 2020; 41: 13-27.
- HPP HOPE. 2022. <https://www.hpphope.org/>.
- Balakrishnan B, Jayandharan GR: Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. Curr Gene Ther 2014; 14: 86-100.
- Leebeek FWG, Miesbach W: Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues. Blood 2021; 138: 923-931.
- Lindsey AG: Systemic AAV: Clinical Findings of Hepatotoxicity. Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee September 2021; 2-3, 2021 Meeting Presentation <https://www.fda.gov/media/151964/download>.

(受付：2023年4月24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。