

先天性 GPI 欠損症モデルマウスの確立と遺伝子治療に関する研究

大阪大学微生物病研究所 蘆本難病解明寄附研究部門

桑山 良子

1. 諸言

哺乳細胞には GPI アンカーという共通の糖脂質で細胞表面につながれている GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) が 150 種以上知られており、アルカリホスファターゼなどの酵素、受容体や接着因子として重要な働きをしている。最近、生合成経路で未同定だった GlcNPI (グルコサミン-ホスファチジルイノシトール) を小胞体の細胞質側から内腔にフリップさせるタンパク質 (スクランブラーゼ) CLPTM1L が所属研究室で同定され¹⁾、GPI-AP の生合成に関わる遺伝子として現在までに 30 個の遺伝子が知られている。これらの遺伝子の変異により、それぞれがコードするタンパク質の発現や活性の低下が起こり、細胞膜表面の GPI-AP の発現低下や構造異常をきたすことにより、先天性 GPI 欠損症 (IGD) を発症する (図 1)。主な症状は、知的障害、運動発達の遅れ、てんかんであり、その他の症状として、高アルカリホスファターゼ血症、末節骨の短縮、爪の低形成などの手指・足趾の異常、難聴、ヒルシュスプルング病、肛門・直腸の奇形、水腎症などがある²⁾。現在までに、24 個の遺伝子変異による先天性 GPI 欠損症が報告されている。GPI 生合成遺伝子の完全欠損では胎生致死となるため、ほとんどの患者は活性が低下した部分欠損症である。GPI アンカーの合成不全により様々な GPI-AP が影響を受けるので、本疾患の主症状である知的障害や運動発達遅滞、てんかんなどの神経症状が主にどの GPI-AP に起因するのか不明であり、病因については解明されていない点も多く、根本的な治療法はない。

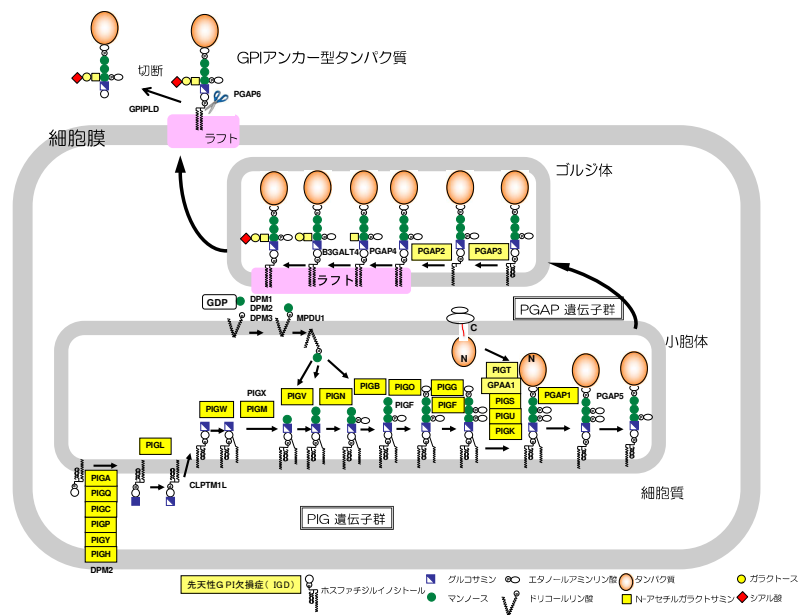


図1 GPI アンカー型タンパク質の生合成と輸送

2.方法³⁾

昨年度の報告に詳細を記載しているが、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集により、PIGO 欠損症患者と同様の変異を持つ3種類のノックインマウス (A-line : p.R119W、B-line : p.T130N、C-line : p.K1051E) を作製した。最も重症度の高い T130N 変異を持つホモ接合のノックインマウス群 (KI homo) と複合ヘテロ接合のノックイン/ノックアウトマウス (KIKO) 群では、体重増加不良、けいれん、振戦を認め、また野生型マウスと比較して、血漿中アルカリホスファターゼ (ALP) の上昇、顆粒球表面の GPI アンカー型タンパク質である Gr-1 の発現低下が有意であることが判明している。これらの表現型は IGD の症状を反映しており、モデルマウスとして有用であることを示している。今年度は B-line のマウスを用い、マウスで感染効率の高い、アデノ随伴ウイルス (AAV) PHPeB ベクターと homology-independent targeted integration (HITI)⁴⁾ システムによるゲノム編集を使った遺伝子治療 HITI-TE (HITI assisted by a low level of transgene expression) (図2) の効果を解析した。KI homo 群、KIKO 群に対し、生直後に AAV donor と AAVCas9 を 10^{11} vg/mouse ずつ静脈内投与し、体重増加、振戦の程度、筋力低下、Gr-1 の発現、血漿中アルカリホスファターゼ値について評価した。また、今回遺伝子治療を行ったマウスについて脳および肝臓においてゲノム編集が正しく起こった割合と off-target 組換えの割合を、各組織からメッセージを抽出し、5'RACE 法により解析した。また遅れて投与した場合の効果についても検討した。さらに早期の実用化も考え、すでに他の疾患で使用されている AAV9 ベクターを用いたゲノム編集を伴わない遺伝子治療の効果についても、IGD モデルマウスを使って上記の項目について検討している。

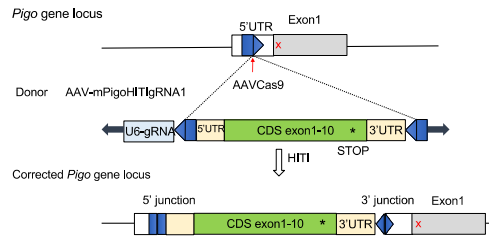


図2 HITI-TE法によるゲノム編集

AAVCas と Donor を感染させ、Pigo の 5'UTR のターゲットサイトに Pigo の全長を挿入する。正しく挿入されれば、内在性のプロモーターにより正常の Pigo が発現し、終始コドンにより変異の入った(x)エクソン 1 は発現しない。一方、Donor ベクターの ITR 配列はプロモーター活性があり、ゲノムに挿入されなくても Pigo が発現するので、HITI に加えて Donor からの発現の両者の効果が見込まれることから HITI-TE (homology-independent targeted integration assisted by a low level of transgene expression) と名付けた。

3.結果

3.1 各パラメータによる評価

顆粒球上の GPI-AP である Gr-1 の発現は KI homo、KIKO 両者において有意な低下がみられていたが、HITI-TE により改善傾向はみられたものの有意差はなかった (図 3a)。血清 ALP 値も両者で有意に高値であったが、KIKO において治療により有意な低下が認められた (図 3b)。体重については KI homo、KIKO 両者において、オス、メスともに有意な成長の回復がみられた (図 3c)。一方筋力、協調運動をみる hanging テストでは KI homo で著明な回復がみられた

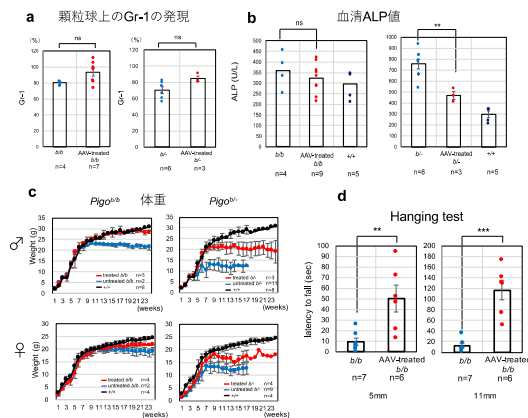


図3 AAV投与前後の各パラメーターの比較

3.2 正しいゲノム編集と off-target の頻度

各組織から RNA を抽出し、5'RACE を行って AAV donor の挿入部位の配列を網羅的に解

析したところ、正しく挿入されていたのは全体の2%~5%、挿入されずに AAV donor から発現していたものが2%~8%、off-target は脳では確認できず、肝臓で9%にみられた。残りはもとの変異遺伝子からの発現であった(図4)。正常 Pigo の発現は合わせて最大で13%と低い結果であったが、3-1 に示すように明らかな治療効果がみられた。

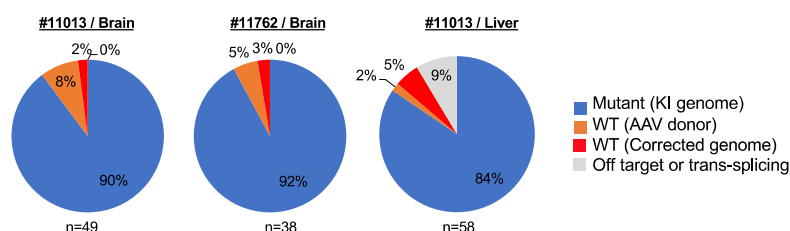


図4 治療後のマウスの各組織における正常なゲノム編集と off-target の頻度

3.3 AAV donor の ITR (Inverted Terminal Repeat) のプロモーター活性について

図2のように HITI-TE 法は、AAVCas9 と Pigo の全長を入れた AAV donor を同時に感染させ、Pigo cDNA を内在性プロモーターの下流に挿入して正常 Pigo の発現を得ると同時に、エピゾームとして存在する AAV donor の ITR プロモーター活性により発現する Pigo の効果も期待できる。ITR のプロモーター活性と内在性の Pigo のプロモーター活性を比較した。図5に示すように、Pigo の全長を入れた AAV donor を3匹の野生型マウス(1-3)に静注したのちに、それぞれの脳から RNA とゲノム DNA を抽出し、AAV 由来のメッセージと Pigo ゲノムを qPCR で定量した。同様に、未処理のマウス3匹(C1-C3)から Pigo のメッセージと Pigo 遺伝子を定量し、ゲノムあたりの Pigo の発現量を比較したところ、ITR のプロモーター活性はほぼ Pigo の内在性のプロモーター活性に匹敵することがわかった(図5c, e)。

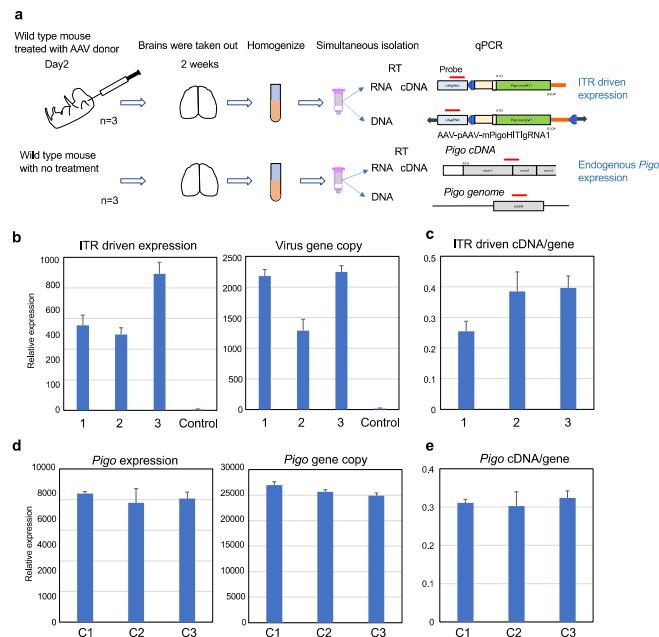


図5 ITR と Pigo の内在性プロモーター活性の比較

(a) 野生型マウスに AAV ドナーを iv にて投与し、2 週後に脳を取り出して RNA とゲノム DNA を抽出し、AAV 由来の Pigo 転写産物とウイルスゲノムを qPCR で定量した (b)。一方、AAV 処理をしないマウスの脳の RNA、ゲノム DNA を用いて、Pigo 転写産物と Pigo 遺伝子を qPCR で定量した (d)。ゲノムあたりの Pigo の発現量を比較した (c, e)。

3.4 生後 4 週での遺伝子治療の効果

生後 4 週に、上記と同様に尾静脈から HITI-TE による治療を KI homo マウス、KIKO マウスにおいて行ったところ、成長曲線、hanging テスト、振戦の程度など、生直後に投与した場合よりは劣るものの、無治療のマウスに比べて有意に改善していた。

3.5 ゲノム編集を伴わない遺伝子治療の効果

上述で使った、マウスで感染効率が高い AAVPHPeB とヒトの遺伝子治療で使われる AAV9 ベクターによる治療効果を上記の HITI-TE と比較したところ、AAVPHPeBPIGO の投与ではほぼ HITI-TE に匹敵する効果がみられた。一方 AAV9PIGO 投与群については成長曲線と振戦の程度については有意な改善がみられたが、hanging テストでは効果がみられなかった。

4.考察

HITI-TE による遺伝子治療で著明な効果がみられたにもかかわらず、ゲノム編集の割合や

AAV donor から転写される Pigo の割合は最大 13%と低かった。GPI アンカー型タンパク質は、発現している細胞から発現していない細胞に転移されることが知られており、そのような現象が神経組織で起こって、症状の改善をもたらした可能性がある。

5. 結語

モデルマウスの重篤な神経症状が、AAVPHPeB ベクターと HITI-TE 法を使った遺伝子治療により著明に改善したことから、IGD の神経症状が、生後早期に治療すれば可逆的であることを示している。今後、ゲノム編集を伴わない AAV9 による治療法で安全性と効果を示し、ヒトでの実用化を目指したいと考えている。AAV9 はマウスに比べてヒトでの感染効率が良いことが知られており、効果が期待できる。

6. 文献

- 1) Wang Y, Menon AK, Maki Y, Liu YS, Iwasaki Y, Fujita M, Guerrero PA, Varón Silva D, Seeberger PH, Murakami Y, Kinoshita T. Genome-wide CRISPR screen reveals CLPTM1L as a lipid scramblase required for efficient glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(14):e2115083119.
- 2) Baratang NV, Jimenez Cruz DA, Ajeawung NF, Nguyen TTM, Pacheco-Cuellar G, Campeau PM. Inherited glycoposphatidylinositol deficiency variant database and analysis of pathogenic variants. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(7):e00743.
- 3) Kuwayama R, Suzuki K, Nakamura J, Aizawa E, Yoshioka Y, Ikawa M, Nabatame S, Inoue I, Shimmyo Y, Ozono K, Kinoshita T, Murakami Y. Establishment of mouse model of inherited PIGO deficiency and therapeutic potential of AAV-based gene therapy. *Nat Commun*. 2022;13(1):3107. (図 2～5 はこの論文からの転載)

7. 成果発表

雑誌論文（上記 3）