

論文内容要旨

A splice-switching oligonucleotide treatment
ameliorates glycogen storage disease type 1a in
mice with *G6PC* c.648G>T

(スプライススイッチオリゴヌクレオチド治療は
G6PC c.648G>T を有する糖原病 1a 型マウスの病態
を改善する)

Journal of Clinical Investigation, 2023, in press.

指導教員：岡田 賢 教授
(医系科学研究科 小児科学)

伊藤 健太郎

【序論】

糖原病 Ia 型は、肝臓・腎臓に主に発現するグルコース 6 リン酸脱リン酸酵素 (G6Pase- α 、遺伝子名: *G6PC*) が遺伝子変異により機能欠損することで、低血糖やグリコーゲン蓄積による肝腫大・腎障害を示す常染色体潜性遺伝の先天代謝異常症である。低血糖発作を予防するための食事療法 (数時間毎のコーンスターチ摂取や特殊ミルクの頻回摂取) の導入により予後は改善したが、低血糖に対する不安や食事管理の患者家族の負担が大きい上、肝腫大・肝腺腫など管理困難な症状も多い。現在、本症に対する治療開発として、AAV 遺伝子治療や mRNA 治療の臨床試験が行われている。しかし AAV 遺伝子治療は現状複数回投与ができないために有効期間が限られており、mRNA 治療は頻回静脈注射が必要かつ投与間の血糖値管理が煩雑であるため、治療介入が困難な症状の改善と長期的に安定した疾患管理を可能にする薬剤が求められている。

糖原病 Ia 型を引き起こす *G6PC* 遺伝子の変異は、人種ごとにホットスポットが存在し、c.648G>T は東アジア (日本、韓国、中国) の患者の大部分で検出され (本邦患者アレル頻度: 約 90%)、エクソン 5 の先頭 91 塩基が欠失する異常スプライシングにより G6Pase 機能欠損を呈する変異である。本変異はアミノ酸置換を伴わない (p.Leu216=) ため、異常スプライシングが是正されれば正常 G6Pase に翻訳され、糖原病 Ia 型の様々な症状の改善が期待できる。近年、スプライシングを制御する技術としてスプライススイッチングオリゴヌクレオチド (SSO) 療法が注目されている。SSO は、pre-mRNA に結合し代替スプライシングを誘導することで機能的なタンパクを産生するアンチセンスで、既にデュシェンヌ型筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症などを対象とした複数の SSO が薬事承認されている。またアンチセンスは、肝臓に長期間安定局在を可能にする化学修飾や送達技術が臨床で実証されるまでに進展している。以上を踏まえ、糖原病 Ia 型の新たな治療法として *G6PC* c.648G>T に対する SSO 療法の可能性を検討した。

【方法】

G6PC c.648G>T の異常スプライシングを是正可能で肝臓で長期間安定局在可能な化学修飾を付与した SSO として DS-4108b をデザインした。*G6PC* c.648G>T variant の coding sequence (CDS) 及び *G6PC* intron 4 (*G6PC* c.648G>T + intron 4) をカセットとして発現するヒト細胞及び遺伝子改変マウスを作製し、DS-4108b の作用を検証した。更に、DS-4108b の野生型マウス及びサルを用いて薬物動態及び安全性を評価し、臨床応用の可能性を検証した。

【結果・考察】

G6PC c.648G>T + intron 4 発現プラスミドをヒト胎児腎臓細胞株 (293A 細胞) にトランスフェクションした結果、患者で報告されるエクソン 5 の先頭 91 塩基の欠失による異常スプライシングと G6Pase の機能欠損が確認された。DS-4108b の添加により、これらの現象が用量依存的に改善されたことから、DS-4108b はヒト細胞においてスプライシング是正を介して *G6PC* c.648G>T variant から G6Pase 活性を回復すること示された。

G6PC c.648G>T + intron 4 カセットを薬剤誘導性に発現するようにマウス *G6pc* 遺伝子座

にノックインしたマウス (cKI-Mut マウス) では、肝臓において異常スプライシングと G6Pase 活性の消失が観察され、絶食時の低血糖、肝腫大、G6Pase 活性欠乏を反映する代謝物の変化など、G6PC c.648G>T を伴う糖原病 1a 型様の病態を認めた。cKI-Mut マウスに対し DS-4108b を週 1 回の頻度で皮下投与したところ、肝臓における正常型スプライシングの増加、G6Pase 活性の回復を認め、絶食時低血糖、肝腫大、その他代謝異常も改善された。この病態改善効果は DS-4108b 単回皮下投与でも認められ、投与 4 週後をピークに 12 週以上持続した。DS-4108b の薬物動態は、cKI-Mut マウスと野生型マウスで同等であり、野生型マウス及びサルにおける薬物動態プロファイルは臨床で月一回の投与頻度で有効性を示した同クラスのアンチセンスと同等であった。これらの結果から、DS-4108b は月一回程度の投与頻度で、糖原病 1a 型患者の空腹時低血糖の予防や肝腫大等の従来治療介入困難だった症状の改善を達成できる可能性が示唆された。

野生型マウスとサルを用いた 3 か月間の安全性試験及び DS-4108b の配列依存的なオフターゲット候補遺伝子の *in silico* 解析では、安全性を懸念する所見や留意すべきオフターゲット候補遺伝子は検出されなかった。そのため、DS-4108b は臨床試験に進むに値する良好な安全性プロファイルを有していると考えられた。

【結語】

本研究から G6PC c.648G>T によって引き起こされる糖原病 1a 型患者の治療において、SSO 療法は従来の食事療法で達成し得ない治療ベネフィットを提供しうることが示唆された。