

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	伊藤 健太郎
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論文題目			
<p>A splice-switching oligonucleotide treatment ameliorates glycogen storage disease type 1a in mice with <i>G6PC</i> c.648G&gt;T  （スプライススイッチオリゴヌクレオチド治療は <i>G6PC</i> c.648G&gt;T を有する糖原病 1a 型マウスの病態を改善する）</p>			
論文審査担当者			
主査	教授 田代 聡	印	
審査委員	教授 浅野 知一郎		
審査委員	講師 大野 晴也		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>糖原病 1a 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-<math>\alpha</math>、遺伝子名：<i>G6PC</i>）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。</p> <p>糖原病 1a 型を引き起こす <i>G6PC</i> 遺伝子の変異は、人種ごとの好発変異が存在し、c.648G&gt;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-<math>\alpha</math> の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-<math>\alpha</math> に翻訳され、糖原病 1a 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、著者は糖原病 1a 型の新たな治療法として <i>G6PC</i> c.648G&gt;T に対する SSO 療法の可能性を検討した。</p> <p>まず、<i>G6PC</i> c.648G&gt;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、<i>G6PC</i> c.648G&gt;T + intron 4 発現プラスミドと共にヒト細胞株にトランスフェクションした。DS-4108b の不添加条件で認められる <i>G6PC</i> 異常スプライシングと G6Pase 活性低下は、DS-4108b の添加により用量依存的に改善された。これにより、DS-4108b がスプライシング是正を介して <i>G6PC</i> c.648G&gt;T variant から G6Pase 活性を回復することヒト細胞において示した。</p> <p>次に、DS-4108b の生体での有効性を評価可能な遺伝子改変マウスを作出し、検証を行った。遺伝子改変マウスは、ヒト野生型 <i>G6PC</i> の coding sequence（CDS）と c.648G&gt;T を含む <i>G6PC</i> CDS 及び <i>G6PC</i> intron 4（<i>G6PC</i> c.648G&gt;T + intron 4）をカ</p>			

セットとしてマウス G6pc 遺伝子座にノックインをしたマウスで、薬剤処置によりヒト野生型 *G6PC* CDS から *G6PC* c.648G>T + intron 4 に全身で遺伝子発現が切り替わるように設計された。薬剤処置により *G6PC* c.648G>T + intron 4 を発現したマウス (cKI-Mut マウス) では、肝臓において *G6PC* 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、肝グリコーゲン蓄積、肝腫大など、*G6PC* c.648G>T を伴う糖原病 1a 型様の病態を認めた。cKI-Mut マウスに対する DS-4108b の週 1 回の皮下投与は、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した。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、肝臓中の DS-4108b の薬物濃度推移と概ね相関していた。G6Pase 活性の回復の程度は最大で正常対照比 10%程度まで改善しており、数%の残存 G6Pase 活性で食事管理無しに低血糖発作の経験がない症例を踏まえ、DS-4108b は糖原病 1a 型患者の空腹時低血糖の予防や肝腫大等の改善できる可能性が示唆された。

更に、DS-4108b の野生型マウス及びサルを用いて薬物動態 (PK) 及び安全性を評価し、臨床応用の可能性を検証した。DS-4108b の野生型マウスの PK プロファイルは、cKI-Mut マウスの PK プロファイルと同等で、糖原病 1a 型の病態が薬物動態に与える影響が軽微であることが示唆された。また、野生型サルの PK プロファイルは、マウスより 3-10 倍少ない用量でマウスと同等で、臨床で良好な有効性・持続性を示した化学的同クラスの核酸医薬と同様のプロファイルであった。これらの結果をもとに計画した野生型マウスとサルを用いた 3 か月間の安全性試験で、安全性を懸念する所見は検出されなかった。これらの結果から、DS-4108b は耐用量の月 1 回程度の投与頻度で、上記有効性を達成できる可能性が示唆された。

本研究は、新規 SSO が *G6PC* c.648G>T を有する糖原病 1a 型患者に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を検証した研究であり、この研究成果は臨床応用が期待される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。