

【8】

氏 名 (本籍)	八 <sup>や</sup> 木 <sup>ぎ</sup> 洋 <sup>ひろ</sup> 也 <sup>や</sup> (東 京 都)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5883 号		
学位授与年月日	平成 23 年 4 月 30 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	<b>Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector</b> (自己相補型アデノ随伴ウイルスベクターを用いた、フェニルケトン尿症マウスにおけるフェニルアラニン酸化の完全な回復)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	須磨崎 亮
副 査	筑波大学教授	医学博士	有 波 忠 雄
副 査	筑波大学教授	医学博士	千 葉 滋
副 査	筑波大学准教授	博士 (医学)	佐 藤 正 樹

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

古典的フェニルケトン尿症 (PKU) は常染色体劣性の代謝疾患で、肝臓内のフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) の欠損によって引き起こされる。PAH はフェニルアラニン (Phe) をチロシン (Tyr) に変換する作用を担っており、PAH 欠損下で通常の食事を摂ると過量の Phe が蓄積して脳の発達が障害される。PKU 患者では、新生児マススクリーニングによる早期発見が重要で、乳幼児期からの Phe 制限食による治療が行われる。しかし治療食はまずく高価であり、これを一生継続することは患者や家族にとって大きな負担になっており、PKU の新たな治療法の開発が切望されている。その方法の一つとして、私たちはウイルスベクターを用いた PKU 遺伝子治療を研究してきた。もっとも直接的な方法は、PAH 酵素が通常発現している肝臓へ、PAH 遺伝子を導入することである。多くの前臨床試験において、ヒトの PKU と同様の形質を示す PKU モデルマウス (BTBR をバックグラウンドに開発された *Pah<sup>tm2</sup>* strain) が治療効果の判定に使われている。これまでの研究では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが PKU マウスの高フェニルアラニン血症を是正するのに、最も有効であった。臨床応用への障壁として、治療効果をあげるために大量の AAV ベクター量が必要な事と肝臓をターゲットにした AAV ベクターを用いると雌で治療効果が減弱する事がある。本研究ではこれらの問題を解決するために、新規ベクターを作成し、PKU マウスを用いて治療効果を検証した。

### (対象と方法)

肝臓への組織特異性の高い AAV8 型を用い、さらに宿主細胞内で安定した二本鎖 DNA を形成させるために自己でアニーリングできる自己相補型 AAV (self-complementary AAV: scAAV) を用いて、新規ベクターを作成した。PKU マウスの腹腔内へこのベクターを投与した。血中 Phe 濃度は酵素蛍光分析法により定期的に計測した。In vivo Phe 酸化能は [1-13C] Phe を用いた非侵襲性の呼吸テストにより評価した。ベクターを投与した PKU マウスの細胞内のベクターコピー数は定量的 PCR にて評価した。

#### (結果)

scAAV8 ベクター  $1 \times 10^{11} \sim 3 \times 10^{12}$  ベクターパーティクルの単回投与により、1 年間にわたり血中 Phe は正常、あるいは正常に近いレベルまで改善した。治療マウスの Phe 酸化能は生理的範囲まで上昇した。雌雄共に PKU マウスの肝細胞内に 1 コピー以上のベクター DNA が存在していれば、血中 Phe は正常範囲に保たれていた。

#### (考察)

観察時期を短期と長期とで比較することで、雌雄に関係なく、肝細胞内に導入ベクター DNA が 1 コピー以上存在していれば治療効果が継続することが判明した。従来のデータで雌 PKU マウスを治療するためには雄より多くの治療ベクターウイルスが必要とされたが、これは雌マウスの肝細胞内で導入遺伝子の発現が弱いだけでなく、雌では遺伝子導入の効率が低いためであることが判明した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

八木洋也氏は、新規のアデノ随伴ウイルスベクターを作成し、このベクターを用いてフェニルケトン尿症モデルマウスで治療効果を検定したところ、従来のベクターより  $10^2$  以上少ない量で、有効性が発揮できることを見いだした。この成果は、フェニルケトン尿症患者に遺伝子治療を行う上で有用な知見であり、将来性を有する研究であると評価される。

平成 23 年 3 月 1 日、博士（医学）学位論文審査委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。