

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14316

研究課題名（和文）ウイルスベクターを利用した霊長類の全脳的遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel technique for widespread gene transduction into neurons throughout the primate brain by the use of viral vectors.

研究代表者

井上 謙一（Kenichi, Inoue）

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：90455395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトに近縁なモデル動物であり、感覚・運動・認知などの様々な脳機能や、それらを支える神経回路に関する知見が集積されているサル類において、新規のウイルスベクターの開発により全脳的なニューロンへの遺伝子導入手法を実現し、それらを実用的なレベルで確立するための、ベクター開発および導入法の検討を行なった。その結果、AAV9ベースのキャプシド改変ベクターをマカクサル新生児へ静脈内導入することにより、従来型を利用した場合と異なり、全脳的なニューロンおよびグリアへの遺伝子導入が実現出来ることを見いだした。また、成体への遺伝子導入法の確立を目指し、幼弱サルを用いて注入法などの検討を行った。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel experimental technique that realize widespread gene transduction into neurons throughout the primate brain by the use of viral vectors. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors constitute a powerful tool for delivering target genes into the brain. Previous studies reported that AAV9 was able to cross the blood-brain barrier, and that systemic application of a self-complementary AAV9 vector to neonatal mice, rats, and cats yielded efficient gene transduction into neurons. However, gene transduction into neurons of neonatal non-human primates has not yet been performed successfully. In this study, we find that intravascular administration of a capsid-modified AAV9 vector to neonatal macaques resulted in widespread gene transduction into neurons throughout the brain. The present data indicate that this technique is useful in creating genetically manipulated primate models of neuropsychiatric disorders and developing their gene therapeutic approaches.

研究分野：神経科学、ウイルス学

キーワード：神経科学 脳・神経 バイオテクノロジー ウイルスベクター 霊長類

1. 研究開始当初の背景

1980年代に遺伝子改変動物の作製技術や遺伝子変異体の解析技術の開発が進み、特定の遺伝子を人為的に変異・欠失させたモデル動物を用いた脳研究が急速に進展した。このような研究手法は、遺伝子改変モデルにおける表現型を行動学的、電気生理学的、あるいは組織学的に解析することにより、当該遺伝子の機能異常や欠損がさまざまな脳の働きに与える影響を解明できるという点できわめて強力であり、実際に多数の遺伝子が脳機能(神経活動制御)に関与することがこれまで明らかにされてきた。また、同様の手法を用いて、疾患関連遺伝子に変異を加えた多数の疾患動物モデルが開発され、その表現系が解析されてきた。

他方、霊長類は侵襲的な実験に使用される動物の中で進化的に最もヒトに近縁であり、身体の構造や機能もヒトに類似しているため、医学・生命科学の研究にきわめて重要な役割を果たしている。例えば、エイズウイルスや肝炎ウイルス等、霊長類のみで感染が成立する感染症の病因を解明し、治療法や予防法を研究する上でサル類を用いた実験は欠くことができない。また、ヒトでは大脳運動皮質から脊髄へ投射する皮質脊髄路の多くは脊髄前角へ投射して脊髄運動ニューロンと直接結合しており、この構造が手指運動の巧緻性を支えていると考えられているが、同様の解剖学的特徴を持つのはマカク属など一部の霊長類のみである。さらに、特にマカク属は高度な認知課題を学習・遂行する能力に優れており、高次脳機能の解明とその障害を引き起こす精神・神経疾患の病態解明、さらに画期的な治療法の確立には霊長類を用いた研究は欠かせない。しかしながら、霊長類における遺伝子操作手法の適用は、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスなどの小型モデル動物と比べると大きく遅れている。近年、新世界ザルであるマーモセットにおいて、発生工学的手法を用いてトランスジェニック動物が作出されて、系統化が可能であることが示され(Sasaki et al., Nature, 2009)、特に神経変性疾患モデルの作出などへの発展が期待されている。一方で、感覚・運動機能だけでなく、学習・記憶や認知などの様々な高次脳機能や、それらを支える神経回路に関する解剖学的、生理学的知見がかなり集積されているマカク属における発生工学的手法の適用は未だ困難である(Yang et al., Nature, 2008)。そのため、霊長類(特にマカク属)において分子から細胞、システム、さらに病態に至る多面的な研究を展開するために、霊長類で遺伝子操作を実現する独自の手法が必要とされているといえる。

一方、遺伝子治療研究分野では、遺伝性神経疾患の治療の為に、ウイルスベクターの血管内投与による全脳的な遺伝子導入手法に期待が集まっており、血管内投与の場合にウ

イルスベクターの脳への移行を妨げる血液脳関門(Blood-Brain Barrier; BBB)を越えることが出来る遺伝子導入手法の開発が精力的に進められてきた。その中で近年、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター9型がBBBを越えて脳内に遺伝子を導入出来ることが示され、マウス新生児にはAAV9型の血管内投与で全脳的なニューロンへの遺伝子導入が実現されるが、成体マウスには同様の方法だとグリアのみに遺伝子導入されることが報告された(Foust et al, Nat Biotech, 2009)。その後ラット、ネコ、ブタなどで同様の現象が確かめられたが、サル(マカクサル)を用いた検討では、新生児でも成体でもグリアにしか遺伝子導入されない、ということが報告され(Bevan et al., Mol Ther, 2011)、未だ霊長類における全脳的なニューロンへの遺伝子導入には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らのこれまでの事前検討実験の結果をベースに、遺伝子治療研究分野で開発が進んできた、血液脳関門(BBB)を通過する能力を持つアデノ随伴ウイルスベクター(9型)のキャプシドにさらに改変を加え、また注入法を最適化することにより、霊長類において全脳的なニューロンへの遺伝子導入を実現するという、発生工学とは異なる方法により遺伝子改変霊長類を作出する技術の確立を目的とした。具体的には、キャプシドタンパクのアミノ酸置換やモザイクキャプシドの開発、あるいは注入法の検討などを行うことにより、BBB通過性を保持しつつ、マカク脳においてニューロン親和性の高いAAVベクターを開発し、霊長類において効率的かつ全脳的なニューロンへの遺伝子操作を可能とする手法の確立を目指した。

ニホンザルは、皮質脊髄路の多くが脊髄運動ニューロンと直接結合しているなど、神経解剖学的なヒトとの相関性が高く、それに対応するように精微な運動や、高度な認知課題を遂行する能力を持つため、高次脳機能の障害としての精神・神経疾患を系統的に理解する為に、遺伝子改変モデルの作出が極めて重要であるため、本研究にはニホンザルを対象とした。

3. 研究の方法

キャプシドタンパクのアミノ酸置換やモザイクキャプシドの作成などのキャプシド改変を加えたAAVベクターのサル新生児への血管内投与を行い、全脳的なニューロンへの遺伝子導入に適したパラメータを探り、マカクサルにおいて効率良く全脳のニューロンに遺伝子導入することの出来る遺伝子導入手法を確立することを試みた。

実験には所内で生まれるマカクサルを用いた。育児放棄個体などを優先的に使用したため、人工保育を行った。

本研究では、感染様式を検討するためにユビキタな発現を特徴とする CMV プロモーターを用い、また GFP 遺伝子を発現マーカーとして利用した。注入から 4 週を目処に灌流固定を行い、脳や脊髄における GFP 遺伝子導入細胞の分布を解析した。具体的には、ニューロンのマーカーである NeuN などの抗体との共染色を行い、ステレオロジカルな手法を用いて脳の各領域におけるニューロンへの遺伝子導入効率を算出した。また、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどのグリア細胞の細胞種マーカー遺伝子や、Calbindin などのニューロン種マーカー遺伝子などの共染色を行い、遺伝子導入パターンを調べた。

また、成体期においても効率の良いニューロンへの全脳的遺伝子導入を実現することは、精神・神経疾患のモデル動物の作成において遺伝子異常が大きく影響する時期を決定出来る点で極めて重要であり、また遺伝子疾患の遺伝子治療法の開発面における意義も大きい。そのため、本研究ではマカクサル成体期において高効率に全脳的なニューロンへの遺伝子導入を行いうる遺伝子導入手法の開発を試みた。成体期においては新生児期より BBB が強固になっておりウイルスベクターの BBB 通過がより阻まれると考えられるため、ベクターの BBB 通過を助ける薬剤等の利用を検討した。上記実験と同様に、本研究では GFP 遺伝子をマーカーとして利用し、注入から 4 週を目処に灌流固定を行い、脳や脊髄における GFP 遺伝子導入細胞の分布を解析した。

4. 研究成果

AAV9 をベースとしたキャプシド改変型の AAV ベクターをマカクサルの新生児の皮静脈から投与した。AAV ベクターの投与がサルの発育に影響を与えるとその後の応用に問題になるため、導入後の成長曲線を調べた結果、非投与サルとの相違は認められなかった。

抗 GFP 染色を行い GFP 陽性細胞の分布を解析した結果、脳の全ての部位において、改変 AAV ベクターの投与により高効率な GFP の発現が認められた。この結果を受け、GFP 陽性細胞の細胞種や導入率を調べた結果、その結果、大脳皮質では、運動系皮質の方が効率が良いなど領域間で違いはあったものの、どの領域においてもニューロンおよびグリアにラベルが認められたが、ニューロンへの導入効率はおよそ 1 割未満と高いものではなかった。皮質下においても皮質同様にどの領域においても GFP 陽性ニューロンが認められ、視床や黒質など一部の領域ではおおむね数割のニューロンが GFP 陽性となる高い導入効率を示し、これらの領域では皮質よりも高い神経親和性が確認された。また、小脳に関しては、極めて多くのラベルが認められ、プルキンエ細胞のマーカーであるカルビンディンとの共染色を行った結果、この手法により

大多数のプルキンエ細胞に遺伝子導入を行うことが可能であることが示されたが、顆粒細胞への導入効率は極めて低かった。

これらの結果から、AAV9 のマカクサル新生児への静脈内導入により、脳の広範な部位におけるニューロンへの遺伝子導入が可能であることが示されたと考えられる。

また、幼若サルにおいて同様の実験を行った。しかしながら新生児の実験と全く同じ条件で投与を行った場合、ごく僅かにラベルが認められるものの、ニューロン、グリア共に導入効率が大幅に低下する、という結果を得たため、注入法などの検討を行った。その結果、幼若個体における導入効率増強を実現するパラメータが得られつつある。さらに、良好な結果を得たベクターをげっし類にも適用した結果、げっし類においても全脳的な遺伝子発現を誘導できることを確認した。

これまでげっし類や猫などの小型動物において新生児の皮静脈から AAV ベクターを投与することにより全脳的なニューロンへの遺伝子導入が実現出来ることが示されてきたが、霊長類において同様の結果を得た例は無かった。本研究成果はキャプシド改変 AAV ベクターのマカクサル新生児への静脈内導入により、小型動物における報告と遜色ないレベルで脳の広範な部位におけるニューロンへの遺伝子導入が可能であることを示したものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 7 件)

1. Tanabe S, *Inoue K, Tsuge H, Uezono S, Nagaya K, Fujiwara M, Kato S, Kobayashi K, *Takada M (in press) The use of an optimized chimeric envelope glycoprotein enhances the efficiency of retrograde gene transfer of a pseudotyped lentiviral vector in the primate brain. *Neurosci Res* 査読有 DOI: 10.1016/j.neures.2017.02.007
2. *Saga Y, Nakayama Y, Inoue K, Yamagata T, Hashimoto M, Tremblay L, Takada M, Hoshi E (in press) Visuomotor signals for reaching movements in the rostro-dorsal sector of the monkey thalamic reticular nucleus. *Eur J Neurosci* 査読有 DOI: 10.1111/ejn.13421
3. Nagai Y, Kikuchi E, Lerchner W, Inoue K, Ji B, Eldridge MAG, Kaneko H, Kimura Y, Oh-Nishi A, Hori Y, Kato Y, Kumata K, Zhang M-R, Aoki I, Sahara T, Takada M, Higuchi M, Richmond BJ, Minamimoto T (2016) PET imaging-guided chemogenetic silencing reveals a critical role of the rostromedial caudate in reward

- evaluation in monkeys. *Nat Commun* 査読有 Vol.7, pp.13605
DOI: 10.1038/ncomms13605
4. Kimura K, Inoue K, Kuroiwa Y, Tanaka F, Takada M (2016) Propagated but Topologically Distributed Forebrain Neurons Expressing Alpha-Synuclein in Aged Macaque. *PLoS ONE* 査読有 Vol.11, pp.e0166861
DOI: 10.1371/journal.pone.0166861
 5. Ishida H, Inoue K, Takada M, Hoshi E (2016) Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to the forelimb region of the ventral premotor cortex in macaque monkeys. *Eur J Neurosci* 査読有 Vol.43, pp.258-269
DOI: 10.1111/ejn.13127.
 6. Ito T, Inoue K, Takada M (2015) Distributions of glutamatergic, GABAergic, and glycinergic neurons in the auditory pathways of macaque monkeys. *Neuroscience* 査読有 Vol.310, pp.128-151
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.041.
 7. Inoue K, Takada M, Matsumoto M (2015) Neuronal and behavioral modulations by pathway-selective optogenetic stimulation of the primate oculomotor system. *Nat Commun* 査読有 Vol.6, pp.8378
DOI: 10.1038/ncomms9378
- [学会発表](計 28 件)
1. 上園志織、柘植仁美、田辺創思、藤原真紀、長屋七奈、長屋清美、井上謙一、高田昌彦 "狂犬病ウイルスベクターを用いた逆行性越シナプスのラベル法によるマーマセット帯状皮質への入力様式の解明:大脳基底核からの入力について" 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2017/03/29) 長崎大学、長崎
 2. Inoue K, Miyachi S, Nishi K, Okado H, Nagai Y, Minamimoto T, Nambu A, Takada M "Prevention of MPTP-induced parkinsonism by recruitment of calbindin into nigral dopamine neurons." the 12th International Basal Ganglia Society Meeting・IBAGS 2017. (2017/03/27-2017/03/29) Merida, Mexico
 3. 井上謙一 "ウイルスベクターを利用した霊長類における神経ネットワーク操作" 第 6 回 生理研-霊長研-脳研 合同シンポジウム (2017/03/10) 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター, 新潟
 4. Sugawara M, Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K "Differences in efficiency of retrograde gene transfer and cytotoxicity between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains." 第 6 回マーマセット研究会 (2016/12/12) 東京大学, 東京
 5. Tsuge H, Uezono S, Tanabe S, Fujiwara M, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M "The lentiviral vector pseudotyped with FuG-E glycoprotein is more suitable, compared with FuG-B2, for retrograde gene transfer in the cortical input system of primate brains." 第 6 回マーマセット研究会 (2016/12/12) 東京大学, 東京
 6. Inoue K "Studying the structure and function of primate brain by using viral vectors" The 7th International Neural Microcircuit Conference (2016/12/08) 自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎
 7. Fujiwara M, Tanabe S, Tsuge H, Uezono S, Nagaya K, Sugawara M, Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Takada M "Use of an optimized chimeric envelope glycoprotein enhances the efficiency of retrograde gene transfer of a pseudotyped lentiviral vector in the primate brain." *Neuroscience* 2016 (2016/11/16) Sun Diego, USA
 8. Ishida H, Inoue K, Takada M, Hoshi E "Multisynaptic projections from the basal nucleus of the amygdala to the ventral premotor cortex in macaque monkeys." *Neuroscience* 2016 (2016/11/12) Sun Diego, USA
 9. 井上謙一 "霊長類におけるウイルスベクターを利用した神経回路の光操作" ルミノジェネティクス研究会 (2016/07/23-2016/07/24) KKR ホテル熱海, 熱海市
 10. Kudo M, S Wupuer, Inoue K, Takada M, Seki K "Differential adeno-associated virus mediated gene transfer to dorsal root ganglion neurons with different size in common marmosets." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/22) パシフィコ横浜, 横浜
 11. Seki K, S Wupuer, Umeda T, Inoue K, Kudo M, Takada M "In vivo electrophysiological evaluation of channelrhodopsin-2-expressed dorsal root ganglion neurons in adults rats." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/22) パシフィコ横浜, 横浜
 12. Inoue K, Tanabe S, Tsuge H, Ueno T, Nagaya K, Fujiwara M, Sugawara M, Kato S, Kobayashi K, Takada M "Use of an optimized chimeric envelope

- glycoprotein for enhancement of the efficiency of retrograde gene transfer of a pseudotyped lentiviral vector in the primate brain." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/22) パシフィコ横浜 横浜
13. Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Nagaya K, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M "Comparison of the efficiency of retrograde gene transfer between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains: Striatal input system." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/22) パシフィコ横浜, 横浜
 14. Tsuge H, Uezono S, Tanabe S, Fujiwara M, Nagaya K, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M "Comparison of efficiency of retrograde gene transfer between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains: Cortical input system." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/22) パシフィコ横浜, 横浜
 15. K.W. McCairn, Ninomiya T, Nagai Y, Go Y, Inoue K, Kimura K, Matsumoto M, Minamimoto M, Isoda M, Takada M "Investigations of spontaneously naturally emerging parkinsonism-cerebellar syndrome in an aged Japanese macaque (Macaca fuscata yakui): a potential analogue of multiple system atrophy." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/21) パシフィコ横浜, 横浜
 16. Ishida M, Inoue K, Takada M, Hoshi E "Origin of multisynaptic projections from the amygdala to the forelimb region of the ventral premotor cortex in macaque monkeys." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/21) パシフィコ横浜, 横浜
 17. Suzuki M, Inoue K, Nakagawa H, Takada M, Isa T, Nishimura Y "Motivation center in the ventral midbrain directly activates the descending motor pathways via the primary motor cortex." 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/21) パシフィコ横浜, 横浜
 18. Inoue K "Primate models for elucidating the circuit pathology of nigrostriatal dopamine system" 第 39 回日本神経科学大会 サライト シンポジウム: 大脳基底核の機能と疾患: 基礎と臨床 (2016/07/19) パシフィコ横浜, 横浜
 19. Inoue K, Takada M, Matsumoto M "Neuronal and behavioral modulations by pathway-selective optogenetic stimulation of the primate oculomotor system." International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2016 (2016/03/03-2016/03/04) 同志社大学寒梅館、京都
 20. 井上謙一 "霊長類における光遺伝学を利用した神経回路の選択的操作" 新潟大学脳研究所-生理研合同シンポジウム (2016/03/01-2016/03/02) 自然科学研究機構、岡崎
 21. Inoue K "Manipulation of primate neural networks by means of modified viral vectors." 5th NIPS-CIN Joint Symposium (2015/11/05-2015/11/06) 生理学研究所、岡崎
 22. Yasukochi R, Inoue K, Takada M "Development in a novel maze-task device for macaques to explore the neural mechanisms underlying motor skill learning." Neuroscience 2015 (2015/10/21) Chicago, USA
 23. Inoue K, Takada M, Matsumoto M "Optogenetic stimulation of the pathway from the frontal eye field to the superior colliculus evokes neuronal and behavioral modulations in monkeys." Neuroscience 2015 (2015/10/19) Chicago, USA
 24. K.W. McCairn, Nagai Y, Kimura K, Go Y, Inoue K, Isoda M, Minamimoto T, Matsumoto M, Ninomiya T, Takada M "Spontaneously emerging Parkinsonism-cerebellar syndrome in a subspecies of Japanese macaque (Macaca fuscata yakui): a potential analogue of multiple system atrophy." Neuroscience 2015 (2015/10/19) Chicago, USA
 25. Takada M, Inoue K, Miyachi S "Recruitment of calbindin into nigral dopaminergic neurons prevents from MPTP-induced parkinsonism." 2nd World Congress on NeuroTherapeutics (2015/09/03-2015/09/06) Prague, Czech Republic
 26. Ishida H, Inoue K, Takada M, Hoshi E "Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to the ventral premotor cortex in macaque monkeys." 第 38 回日本神経科学大会 (2015/07/30) 神戸国際会議場、神戸
 27. Inoue K, Fujiwara M, Yasukochi R, Nagaya K, Takada M, Matsumoto M "Oculomotor manipulations by pathway-selective optogenetics in nonhuman primates." 第 38 回日本神経科学大会 (2015/07/29) 神戸国際会議場、神戸
 28. Yasukochi R, Inoue K, Takada M "Development of a novel device for elucidating the neural mechanisms of

motor skill learning in macaques." 第
38 回日本神経科学大会 (2015/07/29) 神
戸国際会議場、神戸

〔図書〕(計 1 件)

1. Kobayashi K, Kato S, Inoue K, Takada M,
Kobayashi K (2016) Altering entry site
preference of lentiviral vectors into
neuronal cells by pseudotyping with
envelope glycoproteins., Springer,
"Gene Therapy for Neurological
Disorders: Methods and Protocols,
Methods in Molecular Biology, vol 1382
(Manfredsson FP, ed)" 175-186.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

京都大学霊長類研究所
統合脳システム分野 ホームページ
[http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/s
ystems_neuroscience/index.html](http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems_neuroscience/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 謙一 (INOUE KEN-ICHI)
京都大学・霊長類研究所・助教
研究者番号: 90455395

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高田 昌彦 (MASAHIKO TAKADA)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号: 00236233

松本 正幸 (MATSUMOTO MASAYUKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 50577864

井上 智 (INOUE SATOSHI)

国立感染症研究所・獣医科学部・室長

研究者番号: 90213157

(4) 研究協力者

なし