

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19454

研究課題名（和文）新規ウイルスベクターを用いた全脳的遺伝子導入技術による神経疾患モデル霊長類の開発

研究課題名（英文）Development of primate models for neurological disorders by means of brain-wide gene transfer technique with novel viral vectors

研究代表者

高田 昌彦（Takada, Masahiko）

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：00236233

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ヒトに近縁なサル類において、全脳的なニューロンへの外来遺伝子導入を実現するような新規ウイルスベクターを開発し、それを用いて神経疾患の遺伝子改変モデルを作出するため、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの改良とベクター注入法の検討をおこなった。その結果、2型と9型のモザイクキャプシドを利用した改変AAVベクターがマカクザルやマーモセットの新生児への静脈内投与により全脳的な遺伝子導入が可能であることを見出すとともに、血液脳関門（BBB）が閉鎖する幼弱期以降において、経頭蓋集束超音波照射によるBBBの一過性開放技術を導入し、AAVベクターの脳内移行率を向上させる開発研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全脳的な遺伝子導入をウイルスベクターの血管内投与により実現するという遺伝子導入法は、斬新で画期的な手法であるだけでなく、先端的技術として幅広い応用が可能である。例えば、RNAi技術やゲノム編集技術と組み合わせることによりターゲット遺伝子を比較的容易に操作できると考えられる。本研究の成果は、これまで困難であった遺伝子改変疾患モデル霊長類の作出という観点から、特に神経疾患の病態解明と新規治療法の開発に大きく寄与すると考える。また、本研究の成果そのものが全ニューロンレベルでの遺伝子治療に重要な知見を与えるものであり、特に広く遺伝子欠損疾患の治療法に関する開発研究にも将来的に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：The present research project aims at developing novel viral vectors for achieving brain-wide transfer of foreign genes into neurons of nonhuman primates, and at producing genetically modified models of neurological disorders by means of such vectors. To this end, we attempted to improve adeno-associated viral (AAV) vectors and explore an effective approach to vector injections. Consequently, we not only have found that AAV vectors modified with mosaic capsid that is derived from serotypes 2 and 9 allow whole-brain level gene transfer in macaque and marmoset neonates via intravenous administration, but also have been developing a transient blood brain barrier (BBB) opening technique by the aid of transcranial focused ultrasound surgery in young adult and adult monkeys of which BBB is closed, thereby increasing the efficiency of intracranial transfer of the AAV vectors.

研究分野：神経科学

キーワード：ウイルスベクター アデノ随伴ウイルス 遺伝子導入 血液脳関門 マカクザル マーモセット 神経疾患 霊長類モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

霊長類動物、特にサル類は侵襲的な実験に使用される動物のなかで進化的に最もヒトに近縁であり、身体の構造や機能がヒトに類似しているため、これまでの医学・生命科学の研究にきわめて重要な役割を果たしてきた。しかしながら、サル類への遺伝子操作技術の適用については、マウスなどの小型動物と比較して大きく立ち遅れている。近年、マーマセットやカニクイザルにおいて、発生工学的手法を用いたトランスジェニック動物が作出され (Sasaki et al., Nature, 2009; Liu et al., Nature, 2016) 精神・神経疾患モデルの開発に応用されている。今後は、感覚・運動機能だけでなく、学習・記憶・認知など、さまざまな高次機能や、その基盤となる神経回路に関する解剖学および生理学的知見が集積されているマカクザル (アカゲザルやニホンザル) に対して発生工学的手法を適用することは、産仔数や性成熟に関わる時間効率とコストの問題から未だ困難である。サル類を用いて分子から細胞、システム、更に病態に至る多面的な研究を展開するためには、サル類で遺伝子操作を実現する技術革新が必要とされる。

他方、遺伝子治療研究分野では、遺伝性神経疾患などの治療に向けて、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に期待が集まっており、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) を通過するような遺伝子導入ベクターの開発が精力的に進められてきた。特に近年、アデノ随伴ウイルス (AAV) 9 型ベクターが BBB を越えて脳内に外来遺伝子を導入できることが示され、新生児マウスでは血管内投与により全脳レベルでのニューロンへの遺伝子導入が可能であ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認されたが、サル類を用いた検討では、新生児においても成体においてもグリア細胞にしか外来遺伝子が導入されないことが報告され (Bevan et al., Mol Ther, 2011) 未だサル類におけるニューロンへの全脳的遺伝子導入には至っていない。

研究代表者らはこれまで、新生児サルへの血管内投与により、AAV ベクターのキャプシド改変がベクターのニューロン親和性を修飾し、これまで困難であったサル類における全脳レベルでの遺伝子導入を可能にすることを確認している。本研究では、これを発展させ、キャプシド蛋白の更なる改変 (アミノ酸の追加・置換) やベクター投与法の検討 (マイクロバブルを利用したソニケーションの導入) をおこなうことによって、サル類の各発達ステージ (新生児期・幼弱期・成体期) においてより効率的な全脳レベルでのニューロンへの遺伝子操作を実現する技術の確立を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトに近縁なモデル動物であり、感覚・運動・認知などのさまざまな脳機能や、その基盤とな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、全脳レベルでのニューロンへの外来遺伝子導入を実現するような新規ウイルスベクターを開発し、それを利用して特に神経疾患にフォーカスした遺伝子改変霊長類モデルを作出することを目的とする。具体的には、研究代表者らがこれまで新生児サルへの血管内投与によりニューロンへの全脳的遺伝子導入が可能であることを確認している、キャプシド改変型の AAV ベクターの更なる改良をとおして、BBB 通過性を有し、かつサル脳においてニューロン特異性の高い AAV ベクターを開発するとともに、ソニケーションを利用したより効果的なベクター投与法の検討をおこなうことによって、より効率的なニューロンへの全脳的遺伝子操作をサル類の各発達ステージ (新生児期・幼弱期・成体期) において実現する技術の確立を目指す。さらに、プロモータ制御による細胞種特異的導入法の開発を試み、最終的にはこれらの技術を駆使した遺伝子改変神経疾患モデル霊長類の作出を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究には、ニホンザルとマーマセットを用いる。ニホンザルは季節性繁殖をおこなうため、ニホンザルについては春～夏に新生児への血管内投与実験を、夏～冬に幼弱個体への血管内投与実験を実施する。また、マーマセットについては通年で成体への投与実験を実施する。研究代表者らのこれまでの研究で良好な結果が得られた、モザイクキャプシド AAV ベクターを基にして、モザイクキャプシドの組み合わせ変更やアミノ酸の追加・置換などの改変をおこない、血管内投与により脳内移行率が高く、かつニューロンへの感染親和性の高い新規 AAV ベクターを開発する。このようにして、開発されたベクターの新生児に対する血管内投与により全脳的かつ高効率なニューロンへの遺伝子導入を実現する。また、同様の手法を幼弱個体に適用し、ベクターの更なる改変や注入法の検討 (マイクロバブルを利用したソニケーションの導入) をおこなうことによって、ニューロンへの高効率な遺伝子導入技術を確認する。同様にして、ニホンザルやマーマセットの成体に対する遺伝子導入を実施するとともに、プロモータによる発現制御を付与した細胞種特異的な遺伝子操作技術の開発を試み、最終的には神経疾患モデル霊長類の作出を試みる。本研究では、まず症状を捉えやすい遺伝性運動疾患であるジストニアモデル (GAG 欠失変異型 TorsinA 遺伝子過剰発現モデル) の作製に取り組む。また、研究の進捗状況に応じて、タウ遺伝子などの神経変性関連遺伝子の過剰発現モデルの開発を検討する。

平成 29 年度から平成 30 年度の 2 ヶ年において、以下の 2 つの研究計画を遂行した：( 1 ) 改変 AAV ベクターの新生児サルへの投与による全ニューロンレベルでの遺伝子導入；( 2 ) 幼弱個体および成体への血管内投与によるニューロンへの全脳的遺伝子導入。

#### ( 1 ) 改変 AAV ベクターの新生児サルへの投与による全ニューロンレベルでの遺伝子導入

これまでに開発した改変 AAV ベクターを基にして、モザイクキャプシドの組み合わせの検討やキャプシド蛋白のアミノ酸の追加・置換 (Deverman et al., Nat Biotech, 2016) などのキャプシド改変を加えた AAV ベクターの新生児サルへの血管内投与をおこない、全脳かつ全ニューロンレベルでの遺伝子導入に適したパラメータを探索した。まず、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 プロモータを用いるとともに、GFP 遺伝子を発現マーカーとして利用した。ベクター注入から 4 週間を目処に灌流固定をおこない、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 との共免疫染色をおこない、ステレオロジカルな手法を用いて脳のさまざまな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、必要に応じてアストロサイト、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や、カルビンディン、コリンアセチルトランスフェラーゼなどのニューロン種マーカーとの共免疫染色をおこない、遺伝子導入パターンを解析した。

#### ( 2 ) 幼弱個体および成体への血管内投与によるニューロンへの全脳的遺伝子導入

新生児期、幼弱期、成体期のいずれにおいても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製において遺伝子異常が強く影響する時期を決定できる点で極めて重要であり、また、遺伝性疾患に対する遺伝子治療法の開発においても意義が大きい。そのため、ニホンザルおよびマーモセットの幼弱期や成体期に効率的なニューロンへの全脳的遺伝子導入を可能にする遺伝子導入技術の開発を目指した研究計画を遂行した。これまでの予備実験において、少なくともニホンザルに関しては「幼弱期ではモザイクキャプシド AAV ベクターの脳内移行率が新生児期より低下する」という結果を得ているため、マウスで成体への導入効率が向上するようなキャプシド改変や、マイクロバブルを利用したソニケーションの導入などをおこない、AAV ベクターの BBB 通過率を向上させる手法の確立を進めている。

### 4 . 研究成果

研究代表者らは、これまでの研究により、AAV ベクターの 2 型と 9 型のモザイクキャプシドを利用した改変ベクターが、従来の AAV 9 型ベクターと異なり、マカクザルやマーモセット (特に新生児) への静脈内投与により全脳的なニューロンへの遺伝子導入が可能であることを見出している。当該ベクターは、小脳皮質や視床においてニューロンへの極めて高い導入効率 (50% 以上) を示すのに対して、大脳皮質や線条体ではニューロン特異性は高いものの導入効率が 10% 程度であり、未だ改善の余地がある。そのため、モザイクキャプシドの組み合わせの検討やキャプシド蛋白のアミノ酸の追加・置換など、更なるキャプシド改変を加えた AAV ベクターを作製し、全脳かつ全ニューロンレベルでの遺伝子導入に適したパラメータを探索することによって、より高い導入効率を示す新規ベクターの開発に成功した。また、BBB が閉鎖する幼弱期以降では AAV ベクターの脳内移行率が新生児期よりも低下するため、幼弱期や成体期での遺伝子導入に適したキャプシド改変を試みるとともに、マイクロバブルを用いた経頭蓋集束超音波照射による BBB の一過性開放技術 (ソニケーション法) を導入してベクターの BBB 通過率を向上させる開発研究を進めている。併せて、当該ウイルスベクターを利用し、神経疾患にフォーカスした遺伝子改変霊長類モデル、特に著名な大脳基底核疾患であるジストニアモデルの作出に着手した。

### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 15 件 )

Kawai T, Yamada H, Sato N, Takada M, Matsumoto M (2019) Preferential representation of past outcome information and future choice behavior by putative inhibitory interneurons rather than putative pyramidal neurons in the primate dorsal anterior cingulate cortex. *Cereb Cortex*, in press. 査読有

DOI: 10.1093/cercor/bhy103

Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Miwa M, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M (2019) A note on retrograde gene transfer efficiency and inflammatory response of lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E vs. FuG-B2

glycoproteins. *Sci Rep* 9:3567. 査読有

DOI: 10.1038/s41598-019-39535-1

Inoue K, Miyachi S, Nishi K, Okado H, Nagai Y, Minamimoto T, Nambu A, Takada M (2019) Recruitment of calbindin into nigral dopamine neurons protects against MPTP-induced parkinsonism. *Movement Disorders* 34:200-209. 査読有

DOI: 10.1002/mds.107

Nakagawa H, Ninomiya T, Yamashita T, Takada M (2019) Treatment with the neutralizing antibody against repulsive guidance molecule-a promotes recovery from impaired manual dexterity in a primate model of spinal cord injury. *Cereb Cortex* 29:561-572. 査読有

DOI: 10.1093/cercor/bhx338

Kato S, Sugawara M, Kobayashi K, Kimura K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K (2019) Enhancement of the transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene delivery through the point mutation of fusion glycoprotein type E. *J Neurosci Methods* 311:147-155. 査読有

DOI: 10.1016/j.jneumeth.2018.10.023

Ogasawara T, Nejime M, Takada M, Matsumoto M (2018) Primate nigrostriatal dopamine system regulates saccadic response inhibition. *Neuron* 100:1513-1526. 査読有

DOI: 10.1016/j.neuron.2018.10.025

Ishida H, Inoue K, Takada M (2018) Multisynaptic projections from the amygdala to the ventral premotor cortex in macaque monkeys: Anatomical substrate for feeding behaviour. *Front Neuroanat* 12:3. 査読有

DOI: 10.3389/fnana.2018.00003

Ichinose H, Inoue K, Arakawa S, Watanabe Y, Kurosaki H, Koshiha S, Hustad E, Takada M, Aasly JO (2017) Alterations in the reduced pteridine contents in the cerebrospinal fluids of LRRK2 mutation carriers and patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 125:45-52. 査読有

DOI: 10.1007/s00702-017-1784-x

Oh Y-M, Karube F, Takahashi S, Kobayashi K, Takada M, Uchigashima M, Watanabe M, Nishizawa K, Kobayashi K, Fujiyama F (2017) Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations. *Brain Struct Funct* 222:2359-2378. 査読有

DOI: 10.1007/s00429-016-1346-2

Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Wascheck JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H (2017) High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates. *Neuron* 94:1085-1100. 査読有

DOI: 10.1016/j.neuron.2017.05.017

Tanabe S, Inoue K, Tsuge H, Uezono S, Nagaya K, Fujiwara M, Kato S, Kobayashi K, Takada M (2017) 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* 120:45-52. 査読有

DOI: 10.1016/j.neures.2017.02.007

Saga Y, Nakayama Y, Inoue K, Yamagata T, Hashimoto M, Tremblay L, Takada M, Hoshi E (2017) Visuomotor signals for reaching movements in the rostro-dorsal sector of the monkey thalamic reticular nucleus. *Eur J Neurosci* 45:1186-1199. 査読有

DOI: 10.1111/ejn.13421

Nagai Y, Kikuchi E, Lerchner W, Inoue K, Ji B, Eldridge MAG, Kaneko H, Kimura Y, Oh-Nishi A, Hori Y, Kato Y, Hirabayashi T, Fujimoto A, Kumata K, Zhang M-R, Aoki I, Sahara T, Higuchi M, Takada M, Richmond BJ, Minamimoto T (2016) PET imaging-guided chemogenetic silencing reveals a critical role of primate rostromedial caudate in reward evaluation. *Nat Commun* 7:13605. 査読有

DOI: 10.1038/ncomms13605

Kimura K, Inoue K, Kuroiwa Y, Tanaka F, Takada M (2016) Propagated but topologically distributed forebrain neurons expressing alpha-synuclein in aged macaques. *PLoS ONE* 11:e0166861. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0166861

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* 43:258-269. 査読有

DOI: 10.1111/ejn.13127

〔学会発表〕(計 60 件)

Kimura K, Tanabe S, Fujiwara M, Nakano M, Nagai Y, Minamimoto T, Inoue K, Takada M (2018) Neuron-specific efficient gene transduction in the primate brain with modified AAV vectors. 第 41 回日本神経科学大会

Inoue K, Fujiwara M, Uezono S, Tanabe S, Ishida H, Hoshi E, Takada M (2017) Arrangement of multisynaptic inputs from the basal ganglia to the dorsal and ventral premotor cortical areas in macaques: retrograde transneuronal double labeling with fluorescent rabies viral vectors. *Neuroscience* 2017

〔図書〕(計 10 件)

高田昌彦 (2019) パーキンソン病の発症・進行を抑える新たな治療法の開発. 歯界月報「生涯研修コード」, 810, 兵庫県歯科医師会

高田昌彦 (2018) 抗体治療による脊髄損傷からの機能回復. バイオインダストリー「BIO REVIEW」, 35:13-18, シーエムシー出版

Matsumoto M, Inoue K, Takada M (2018) Causal role of neural signals transmitted from the frontal eye field to the superior colliculus in saccade generation. *Front Neural Circuits* 12:69

Nakagawa H, Takada M (2018) Promoting functional recovery by inhibition of repulsive guidance molecule-a after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 13:981-982

高田昌彦, 井上謙一, 松本正幸 (2018) 霊長類眼球運動制御. *Clinical Neuroscience* 「メインテーマ 光が拓く神経科学の未来 オプトジェネティクスと光イメージング」,

36:914-915, 中外医学社

Kobayashi K, Inoue K, Tanabe S, Kato S, Takada M, Kobayashi K (2017) Pseudotyped lentiviral vectors for retrograde gene delivery into target brain regions. Front Neuroanat 11:65

高田昌彦、永井裕司、井上謙一、南本敬史 (2017) 脳内のやる気スイッチを操作：霊長類の生体脳における人工受容体の画像化．医学のあゆみ「TOPICS」, 263:866-868, 医歯薬出版

高田昌彦、井上謙一、松本正幸 (2017) 光による霊長類脳機能制御：神経路選択的光操作技術 生体の科学 増大特集 細胞多様性解明に資する光技術 見て 動かす」, 68:488-489, 医学書院

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. In: Gene Therapy for Neurological Disorders: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol 1382 (Manfredsson FP, ed), pp 175-186. Springer: New York

高田昌彦、井上謙一、松本正幸 (2016) 霊長類の脳神経回路を光で操作．自動車技術「超の世界」, 70:106-107, (公社)自動車技術会

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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/systems\\_neuroscience/index.html](http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems_neuroscience/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。