

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02521

研究課題名(和文) 血液脳関門透過AAVベクターを用いたレット症候群の遺伝子治療とMeCP2機能解析

研究課題名(英文) Gene therapy against Rett syndrome and functional analysis of MeCP2, using blood-brain barrier-penetrating AAV vectors

研究代表者

平井 宏和 (HIRAI, HIROKAZU)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70291086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症やてんかんなどを特徴とするレット症候群とMeCP2重複症候群はMeCP2という遺伝子の変異によって起こる。MeCP2はニューロンとアストロサイトの両方で、脳の発達に重要な役割を果たす。本研究では成熟マウスにおいてニューロン、あるいはアストロサイトのどちらのMeCP2が脳機能に重要なのか調べた。成熟マウスのアストロサイト特異的なMeCP2過剰発現では異常は見られなかったが、ニューロン特異的な過剰発現では、社会行動に障害が生じることがわかった。また成熟マウスの小脳ニューロン特異的にMeCP2をノックアウトすることにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MeCP2はニューロンとアストロサイトの両方で、脳の発達に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、MeCP2は成熟後も脳で発現し続けるが、成熟脳における役割はほとんど明らかになっていない。本研究で、成熟マウスのニューロンにMeCP2を過剰発現させると他のマウスにあまり関心を示さなくなった。すなわち、ニューロンに発現するMeCP2は他者とコミュニケーションをとる社会行動に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome and MeCP2 duplication syndrome, which are characterized by various manifestations such as autism and epilepsy, are caused by mutation of MeCP2 gene. MeCP2 is critical for brain development in both neurons and astrocytes. In this study, we examined which MeCP2 in neurons or in astrocytes is critical for brain function of mature mice. We found that overexpression of MeCP2 in astrocytes caused no abnormal phenotypes, while overexpression in neurons induced impaired social behavior. In addition, we succeeded to knockout MeCP2 gene from mature mouse cerebellar neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉症 MeCP2 AAV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レット症候群は自閉症やてんかん、失調性歩行、特有の手もみ動作を主徴とする X 連鎖顕性(優性) 遺伝性の精神神経疾患である。生後しばらくは正常発達を遂げるが、6 ヶ月ごろから異常に気づかれ、以後進行性の経過を示す。X 染色体上の *MECP2* (methyl-CpG binding protein 2) 遺伝子の変異が原因である。MeCP2 タンパク質はメチル化されたゲノムのプロモーター領域に結合し、その遺伝子の働きを抑制、あるいは促進する働きがある。以上より、変異 MeCP2 による遺伝子発現の調節不全が本疾患の原因であると考えられている。

プルキンエ細胞は出生直後から MeCP2 タンパク質を発現しており、生後 3~4 週から顆粒細胞、介在ニューロンで急激に産生されはじめる。さらにバグマングリアにも発現している。したがって、MeCP2 は小脳の発達と機能制御に密接に関与していると推測できる。

過去 10 年以上にわたり本研究者らはウイルスベクターに最適化した細胞種特異的プロモーター[プルキンエ細胞、バグマングリア(アストロサイト)、介在ニューロン、ニューロン全般、抑制性ニューロン]を開発して来た。これらの細胞種特異的プロモーター制御下で MeCP2 遺伝子を制御する分子 (Cre や miRNA) を発現する AAV-PHP.B を、野生型マウスや flox マウスに静脈投与することで、細胞種特異的、かつ時期特異的な遺伝子過剰発現やノックアウト (KO) /ノックダウン (KD) が可能になった。また KO マウスに対して、細胞種・時期特異的なレスキューも可能となる。MeCP2 は小脳に加えて、脳の広い領域でニューロンとグリアに発現しており、その変異によるレット症候群の患者は、自閉症を含む多彩な症状を示すが、本研究者らの技術を使えば、各細胞種の各時期における MeCP2 の役割、小脳と精神機能の関連、さらに静脈投与による治療の可能性について、効率的に実験を進めることができ、分子・細胞レベルから明確な答えが得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究者らは、AAV ベクターを静脈投与するだけで、全脳、あるいは小脳の特定細胞群における遺伝子発現を、極めて効率的に制御する技術を確認した。成熟したマウスにおいて、細胞種特異的に MeCP2 発減量を増減させることで、異常なフェノタイプが見られるか調べることを目的とした。遺伝子 KO は、成熟後の *MECP2* の flox マウスに、細胞種 (プルキンエ細胞、バグマングリアなど) 特異的に Cre を発現する AAV ベクターを投与する。また、MeCP2 を欠損し自閉症様行動や運動失調を示すレット症候群モデルマウスに、開発した MeCP2 発現 AAV ベクターを一度静脈投与するだけで、症状を回復できるかを目的とした。

3. 研究の方法

細胞種特異的な MeCP2 重複症候群モデルマウスの作出と解析

MeCP2 はメチル化された DNA に結合して転写制御を行っているタンパク質であり、発現量が多い場合は MeCP2 重複症候群を発症することが知られている。本研究ではマウスの血液脳関門を効率的に透過する AAV ベクター (AAV-PHP.B) を用いて、野生型の成熟マウス脳内でニューロン特異的、あるいはアストロサイト特異的に MeCP2 を過剰発現させる。ニューロン特異的発現には NSE プロモーター、またアストロサイト特異的発現には GFAP プロモーターを用いる。その後、自閉症様の行動が見られるか、行動実験により確認する。

細胞種特異的なレット症候群モデルマウスの作出と解析

a) CRISPR/Cas9 システムを用いたレット症候群モデルマウスの作出

成熟後に AAV-PHP.B の静脈投与により細胞種特異的に CRISPR/Cas9 システムを発現させて MeCP2 遺伝子の KO を行い、KO 効率を免疫染色で評価するとともに行動障害についても調べる。

b) 細胞種特異的 MeCP2 KO マウスの作出と解析

成熟後に細胞種特異的に MeCP2 を欠損させるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて MeCP2 flox マウスを作出する。アストロサイト特異的、あるいはニューロン特異的 Cre 発現 AAV-PHP.B を MeCP2 flox マウスに静脈投与しアストロサイト、あるいはニューロン特異的な MeCP2 マウスを作出する。

MeCP2 欠損マウスの作出

レット症候群の遺伝子治療が可能であるのかを検証するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて MeCP2 欠損マウスを作出する。

MeCP2 は発達期および、成熟後の小脳において、各細胞で何をしているのか?

MeCP2 flox マウスの小脳に、プルキンエ細胞または、バグマングリア特異的 Cre (と GFP) を発現 AAV-PHP.B を静脈投与することで、細胞種特異的 MeCP2 欠損マウスを作成する。その後、行

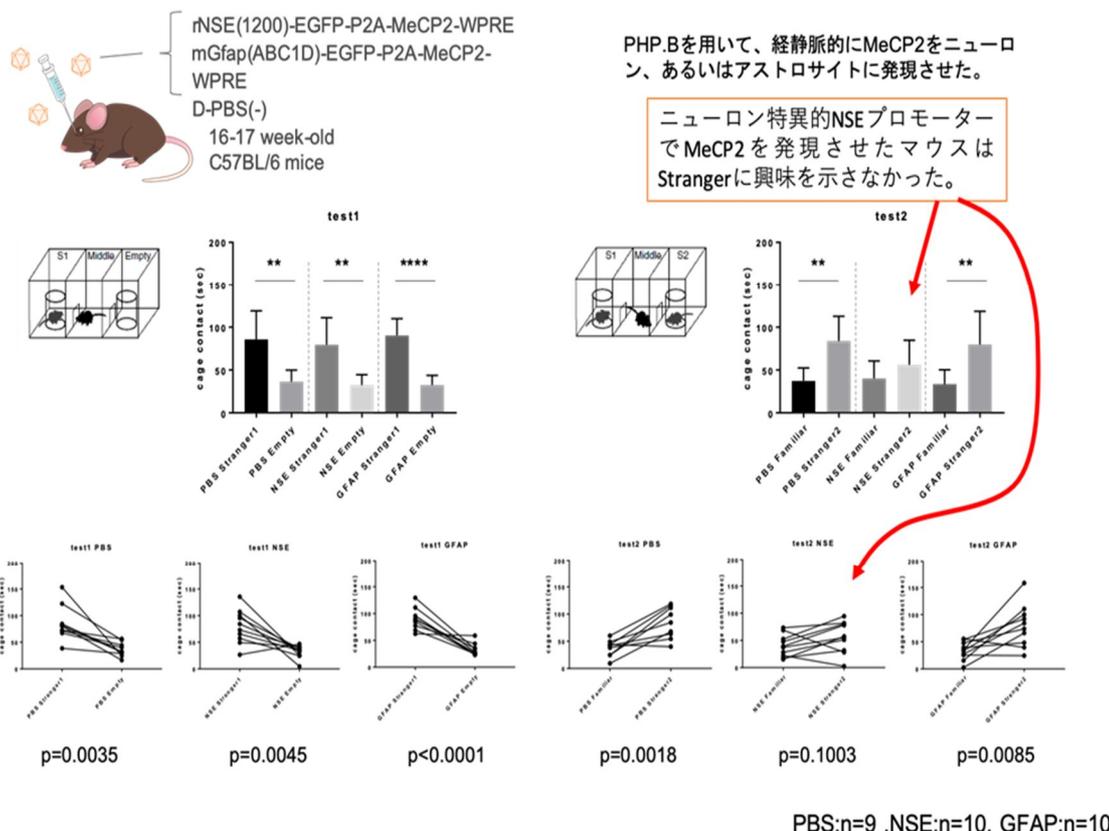
動実験などフェノタイプの解析を行う。

4. 研究成果

細胞種特異的な MeCP2 重複症候群モデルマウスの作出と解析

MeCP2 のニューロン特異的過剰発現により、社会行動の障害が見られた

マウスの血液脳関門を効率的に透過する AAV ベクター (AAV-PHP.B) を用いて、野生型の成熟マウス脳内でニューロン特異的、あるいはアストロサイト特異的に MeCP2 を過剰発現させた。ニューロン特異的発現には NSE プロモーター、またアストロサイト特異的発現には GFAP プロモーターを用いた。AAV-PHP.B は成熟マウスの眼窩静脈叢から投与した。ニューロン特異的及びアストロサイト特異的の両群において、投与 6 週間後の運動機能には明らかな異常は見られなかった。しかし、投与 11 週後に社会行動を評価したところ、ニューロン特異的発現群で社会行動に異常が見られた (下図参照)。



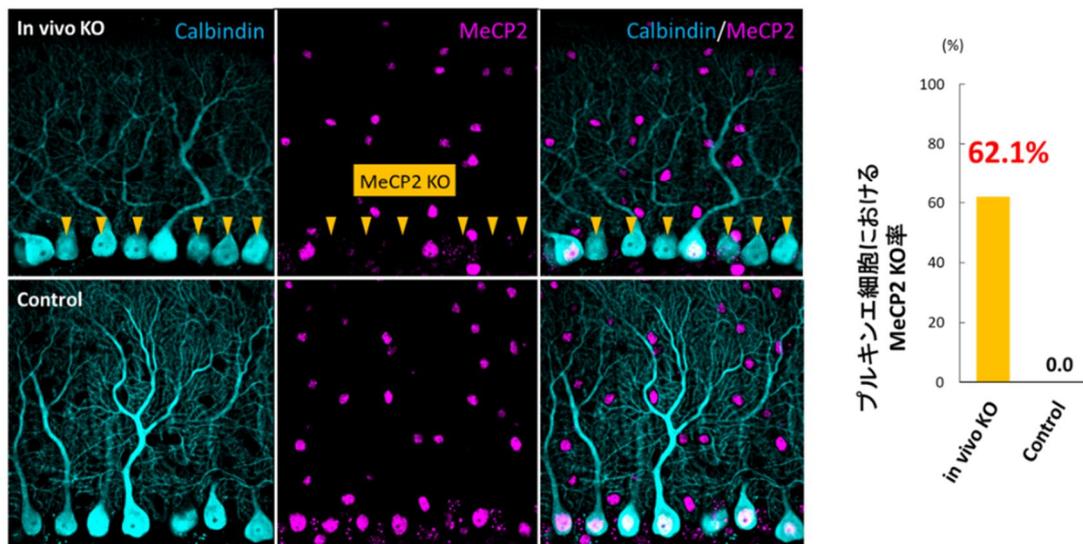
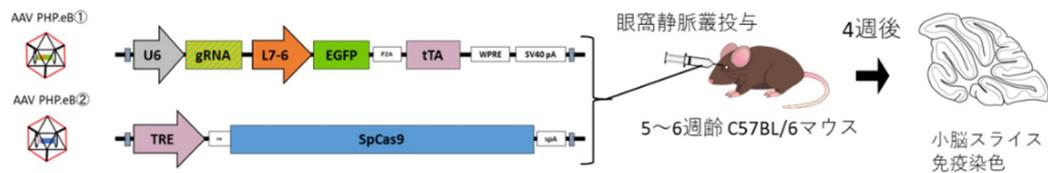
一方、アストロサイト特異的発現群では異常は見られなかった。このことから成熟後の正常ニューロンにおいて MeCP2 の発現量が増加すると、社会行動に異常が見られることが示された。

細胞種特異的なレット症候群モデルマウスの作出と解析

MeCP2 がゲノム上から欠失すると、自閉症スペクトラム障害の一つであるレット症候群を発症することが知られている。MeCP2 欠損マウスは顕著な運動障害と発育障害を示し、オスは特に早く死亡する。しかし、成熟後に細胞種特異的に MeCP2 を欠損させると、どのような症状が発現するのかは不明である。そこで成熟マウスのニューロン、アストロサイト、あるいは小脳プルキンエ細胞特異的に MeCP2 を欠損させるとどのような症状が出現するのかを明らかにすることを目的とした。また成熟後の MeCP2 欠損マウスへ AAV-PHP.B 静脈投与を介して、全脳的に MeCP2 を発現させることで症状の改善ができるか、すなわちレット症候群の遺伝子治療が可能であるのかを検証することを目的とした。

a) 小脳プルキンエ細胞特異的 MeCP2 ノックアウトマウスの作出

成熟後に AAV-PHP.B の静脈投与により細胞種特異的に CRISPR/Cas9 システムを発現させて MeCP2 遺伝子のノックアウトを試みた。その結果、60%を超えるプルキンエ細胞に対して細胞種特異的なノックアウトが起きていることが確認された (下図)。しかし、明らかな運動失調は見られなかった。



b) 細胞種特異的 MeCP2 KO マウスの作出と解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて MeCP2 flox マウスを作出した。成熟後の MeCP2 flox マウスに、アストロサイト特異的 Cre 発現 AAV-PHP.B を静脈投与した。4 週後にサクリフェイスして観察したところ、アストロサイトに限局した KO は観察されたが、効率はかなり低かった。また、AAV 投与 4 週後では行動に顕著な異常は観察されなかった。これは細胞の核内に存在する MeCP2 タンパク質のターンオーバーが予想よりはるかに遅いためと推測された。さらに AAV ベクター投与後、長い間隔をおいて検討する必要がある、マウスの飼育を継続することにした。

MeCP2 欠損マウスの作出

成熟後の MeCP2 欠損マウスへ AAV-PHP.B 静脈投与を介して、全脳的に MeCP2 を発現させることで症状の改善ができるか、すなわちレット症候群の遺伝子治療が可能であるのかを検証するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて MeCP2 欠損マウスを作出した。MeCP2 欠損マウスは顕著な運動失調を示した。メスは生後 100 日を超えても生存したが、オスは生後 10 週前後で死亡した。以上のように、血液脳関門透過型 AAV-PHP.B を用いて MeCP2 を発現させる遺伝子治療が可能かを解明する準備が整った。

MeCP2 は発達期および、成熟後の小脳において、各細胞で何をしているのか？

MECP2 flox マウスに、バグマングリアあるいはプルキンエ細胞特異的 Cre (と GFP) 発現 AAV を直接投与した。しかし小脳実質への Cre 発現 AAV ベクター投与では細胞種特異的な KO は観察されず、ほぼ全ての細胞種で KO されていた。ニューロン特異的プロモーターやアストロサイト特異的プロモーター制御下で Cre を発現する AAV-PHP.B を静脈投与した場合も、同様に細胞種特異性なく KO が観察された。

これは、目的とする細胞種以外においても、わずかに Cre が発現し、それにより組換えが起ってしまうためと考えられた。これは当初予想していなかった結果であり、Cre 発現 AAV ベクターによる細胞種特異的発現を行うに当たって大きな障害となった。本課題の残りの研究期間は、この問題を解決することに専念し、少なくともアストロサイト特異的発現系については解決策が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasui Hiroyuki, Matsuzaki Yasunori, Konno Ayumu, Hirai Hirokazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Global Knockdown of Retinoid-related Orphan Receptor in Mature Purkinje Cells Reveals Aberrant Cerebellar Phenotypes of Spinocerebellar Ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chao Owen Y., Marron Fernandez de Velasco Ezequiel, Pathak Salil Saurav, Maitra Swati, Zhang Hao, Duvick Lisa, Wickman Kevin, Orr Harry T., Hirai Hirokazu, Yang Yi-Mei	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting inhibitory cerebellar circuitry to alleviate behavioral deficits in a mouse model for studying idiopathic autism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41386-020-0656-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Oe Yuki, Wang Xiaowen, Patriarchi Tommaso, Konno Ayumu, Ozawa Katsuya, Yahagi Kazuko, Hirai Hirokazu, Tian Lin, McHugh Thomas J., Hirase Hajime	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct temporal integration of noradrenaline signaling by astrocytic second messengers during vigilance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14378-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsumoto Katsuhiko, Mitani Tomoki T., Horiguchi Shuhei A., Kaneshiro Junichi, Murakami Tatsuya C., Mano Tomoyuki, Fujishima Hiroshi, Konno Ayumu, Watanabe Tomonobu M., Hirai Hirokazu, Ueda Hiroki R.	4. 巻 14
2. 論文標題 Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 3506 ~ 3537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-019-0240-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Yasunori, Tanaka Masami, Hakoda Sachiko, Masuda Tatsuki, Miyata Ryota, Konno Ayumu, Hirai Hirokazu	4. 巻 27
2. 論文標題 Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Shared among Diverse Inbred Strains of Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 700 ~ 704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2019.02.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平井宏和	4. 巻 37
2. 論文標題 ウイルスベクター経静脈投与による脊髄小脳変性症動物モデルの作出	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 998-1002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara Y, Konno A, Nitta K, Matsuzaki Y, Yasui H, Suwa J, Hiromura K, Hirai H.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Effects of neutralizing antibody production on AAV-PHP.B-mediated transduction of the mouse central nervous system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-018-1366-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今野歩, 平井宏和	4. 巻 37
2. 論文標題 ウイルスベクターの静脈投与によるマウス脳全域への遺伝子導入	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 581-587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasunori Matsuzaki, Masami Tanaka, Sachiko Hakoda, Tatsuki Masuda, Ryota Miyata, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai
2. 発表標題 Mouse strain-dependent BBB (blood-brain barrier) permeability of AAV-PHP.B.
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学大学院医学系研究科 脳神経再生医学分野 https://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------