

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2023

課題番号：18KK0465

研究課題名（和文）AAVベクターとsmall RNAを用いた神経疾患の遺伝子治療開発研究

研究課題名（英文）Research on the Development of Gene Therapy for Neurological Diseases Using AAV Vectors and Small RNAs

研究代表者

小島 華林 (Kojima, Karin)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00468331

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,900,000円

渡航期間： 20ヶ月

研究成果の概要（和文）：small RNAとAAV遺伝子治療を組み合わせ発現調整可能な遺伝子治療法を開発することを目指している。Rett症候群及びMECP2重複症候群に対する遺伝子治療として、AAVを用いCRISPR-dead Casシステムを応用したベクターの開発を行った。また、小児中枢神経疾患におけるmicroRNAの病因への関与の解析と遺伝子治療による研究として、microRNA302欠損マウスにおける胎児期の神経管閉鎖障害発症の病態解明、及び、神経膠腫に対するmicroRNAの発癌プロセスへの影響の解析を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AAVベクターを用いた遺伝性神経疾患に対する遺伝子置き換え療法としての遺伝子治療は世界的に進展している。しかし、神経細胞への導入効率が低く、および導入遺伝子の発現量調節ができない点が課題である。遺伝子発現調節を可能とする新たな遺伝子治療法の開発は、発現量が厳密にコントロールされている遺伝子疾患の治療に有用である。microRNA302ノックアウトマウスは神経管閉鎖障害のモデルであり、神経管閉鎖障害を持つ胚のSingle cell RNA解析で解糖系遺伝子が顕著に増加し、質量分析では解糖代謝物が増加していた。妊娠中の糖代謝と神経管閉鎖との関連を示唆する結果であった。

研究成果の概要（英文）：We are developing new gene therapy that can regulate gene expression by combining small RNAs and AAV vectors. As a gene therapy for Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome, we are developing a vector utilizing the CRISPR-dead Cas system with AAV. Additionally, in research on the involvement of microRNA in the pathogenesis of pediatric neurological diseases, we investigated the pathogenesis of neural tube closure defects during the fetal period in microRNA302-KO mice and analyzed the impact of microRNAs on the carcinogenesis process in gliomas.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：AAV 小児神経 miRNA small RNA

1. 研究開始当初の背景

我々は小児神経難病 AADC 欠損症に対し、正常 AADC 遺伝子搭載したアデノ随伴ウイルス (AAV)2 型ベクターを被殻に注入する遺伝子治療を 8 名に施行し、全例で運動機能の改善を得た(Kojima, et al. Brain 2019)。他にも、これまで治療法がなかった小児神経難病である脊髄性筋萎縮症 (SMA) に対しては AAV9 を用いた遺伝子治療は保険適応され、自然歴では寝たきり・人工呼吸器管理となっていた児がほぼ正常発達を得られるようになってきている。神経移行が良い AAV を用いた遺伝子治療は、遺伝子異常による神経疾患の根本的治療法として更なる開発が期待されている。

AAV ベクターを用いた遺伝性神経疾患に対する遺伝子治療法開発は世界的に進展しているが、全ての神経細胞への導入および発現量の調節ができない点が課題である。MECP2 遺伝子の異常により発症する疾患に、Rett 症候群と MECP2 重複症候群がある。Rett 症候群は MECP2 遺伝子の発現低下により発症し、MECP2 の過剰により MECP2 重複症候群が発症する。MECP2 遺伝子は生体内で発現量が厳密にコントロールされており、多すぎても少なすぎても疾患を引き起こす。これらの疾患の遺伝子治療開発には、発現量調整が必要となるが、発現量調節が可能な遺伝子治療は未だ開発されていない。

多くの小児神経疾患の治療法として AAV や small RNA を用いた遺伝子治療法を開発をする。

2. 研究の目的

海外共同研究者が得意とする small RNA 関連技術・知識と、我々が得意とする AAV 遺伝子治療を組み合わせ、新たな遺伝子治療法を開発することを目指している。また、microRNA が神経疾患発症にどのように関与しているかを解明し、治療法開発の基礎データとする事が重要である。

以上の観点から、下記 2 点を本研究の目的とした。

- (1) 小児中枢神経疾患における microRNA の病因への関与の解析と遺伝子治療による研究。
microRNA302 欠損マウスにおける胎児期の神経管閉鎖障害発症の病態解明。
神経膠腫に対する microRNA の発癌プロセスへの影響の解析及び治療法開発。
- (2) AAV ベクターを用い、遺伝子発現量調整が可能な遺伝子治療の開発。
Rett 症候群に対する遺伝子治療法開発。
MECP2 重複症候群に対する遺伝子治療法開発。

3. 研究の方法

- (1) 中枢神経疾患における microRNA の病因への関与の解析と遺伝子治療による介入研究。
microRNA302 欠損マウスにおける胎児期の神経管閉鎖障害発症の病態解明。
microRNA302 欠損マウスは、二分脊椎等の神経管閉鎖障害を高頻度に発症する。このマウスを神経管閉鎖障害モデルとし、マウスの神経管形成中に炭水化物、脂質、ビタミン、抗酸化物質の代謝に関与する遺伝子の発現を single cell mRNA シーケンシングを用いて解析した。
神経膠腫に対する microRNA の発癌プロセスへの影響の解析及び治療法開発。
正常マウス及び microRNA302 ノックアウトマウスの胎児に、脳室にプラスミドを子宮内胎児エレクトロポレーション法にて導入し神経膠腫を作成する。出生後の仔マウス・成マウスの脳を解析する。
- (2) AAV を用い、遺伝子発現量調整が可能な遺伝子治療の開発。
Rett 症候群に対する遺伝子治療法開発。
MECP2 重複症候群に対する遺伝子治療法開発。
両疾患に対し、AAV を用い CRISPR-dead Cas システムを応用した遺伝子治療用ベクターをデザインする。また、両疾患患者 iPS から、大脳皮質オルガノイドを作成し、脳モデルとする

4. 研究成果

- (1) 中枢神経疾患における microRNA の病因への関与の解析と遺伝子治療による介入研究。
microRNA302 欠損マウスにおける胎児期の神経管閉鎖障害発症の病態解明。

胎児期の神経管閉鎖は中枢神経発達において重要な初期段階であり、正確な代謝制御が必要である。この過程では、細胞の増殖と分化が適切に行われる必要がある。マウスの神経管形成の代謝経路調節の解明のために、炭素、脂質、ビタミン、抗酸化物質の代謝に関与する遺伝子の発現を single cell mRNA シーケンシングを用いて解析し、解糖系と細胞増殖の連携が神経管閉鎖を確実にを行うために必要であることを明らかにした (Keuls, Kojima, et al. Int J Mol Sci 2020)。

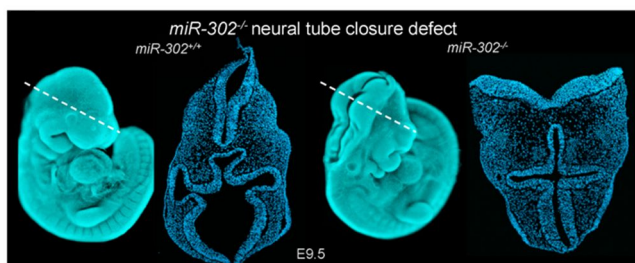


図1 神経管閉鎖障害を発症した microRNA302 欠損マウス (E9.5)。
左: 正常マウス、右: miR302 欠損マウス。
(Keuls, Kojima, et al. Int J Mol Sci 2020)

系と細胞増殖の連携が神経管閉鎖を確実にを行うために必要であることを明らかにした (Keuls, Kojima, et al. Int J Mol Sci 2020)。microRNA302 欠損マウスは、神経管閉鎖障害を高頻度に発症する (図1)。miRNA302 欠損マウスを神経管閉鎖障害の遺伝子モデルとして使用した。神経管閉鎖障害を持つ胚において解糖系遺伝子が顕著に増加し、質量分析では解糖代謝物の増加し、脂質代謝物の減少が確認された。予測された miRNA302 のターゲットである Pfkfb3、Hk1 は神経管閉鎖障害の際に顕著に上昇し、細胞周期の短縮、細胞増殖の増加が見られた。miR-302 が、神経管閉鎖の代謝環境を調整する上で重要な役割があることを確認した。

神経膠腫に対する microRNA の発癌プロセスへの影響の解析及び治療法開発。
正常マウス及び microRNA302 ノックアウトマウスの胎児に、脳室にプラスミドを子宮内胎児エレクトロポレーション法にて導入し神経膠腫を作成した。出生後 30 日、60 日、90 日の脳を解析した。正常マウス内では、神経膠腫内に microRNA302 が発現していることを確認した。(現在、論文作成中。)

- (2) AAV を用い、遺伝子発現量調整が可能な遺伝子治療の開発。

Rett 症候群に対する遺伝子治療法開発。

CRISPR-dead Cas システムを応用した AAV 遺伝子治療用ベクターをデザインした。AAV に搭載可能な小型 Cas、発現調整遺伝子 X、gRNA を選定した。HEK293 細胞を用いて、発現量の確認を行なった。
Rett 症候群患者 iPS 細胞を樹立した。

MECP2 重複症候群に対する遺伝子治療法開発。

CRISPR-dead Cas システムを応用した AAV 遺伝子治療用ベクターをデザインした。AAV に搭載可能な小型 Cas、発現調整遺伝子 X・Y 及び gRNA を選定した。
MECP2 重複症候群患者から iPS 細胞を樹立し、大脳皮質オルガノイドを作成した。培養 35 日から半年までの神経発達過程を解析するために、single cell RNA シーケンシングを行い、発達過程での遺伝子発現変化を同定した。

作成したベクターの効果を、患者 iPS 細胞由来の大脳皮質オルガノイドをヒト脳モデルとし、評価する系を確立した。

遺伝子発現量調整が可能な AAV 遺伝子治療法開発は、今後も継続し取り組んでいく。
(課題継続のため新たな研究費を獲得した。)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kojima Karin, Wada Takahito, Shimbo Hiroko, Ikeda Takahiro, Jimbo Eriko F., Saito Hiroto, Matsumoto Naomichi, Yamagata Takanori	4. 巻 9
2. 論文標題 The ATRX splicing variant c.21-1G>A is asymptomatic	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 1 - 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-022-00212-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 -
1. 著者名 小島華林	4. 巻 84
2. 論文標題 【小児遺伝子疾患事典】代謝疾患 DDC(関連疾患:芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素<ADC>欠損症).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 1520-1523
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 該当する
1. 著者名 Keuls Rachel A., Kojima Karin, Lozzi Brittney, Steele John W., Chen Qiuying, Gross Steven S., Finnell Richard H., Parchem Ronald J.	4. 巻 21
2. 論文標題 MiR-302 Regulates Glycolysis to Control Cell-Cycle during Neural Tube Closure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7534 ~ 7534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207534	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 渡邊知佳, 小島華林, 黒川愛恵・他	4. 巻 31
2. 論文標題 芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症診断のための乾燥血液濾紙によるスクリーニング検査法と血漿AADC酵素活性測定系の開発.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本マススクリーニング学会誌	6. 最初と最後の頁 27-35
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 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小島 華林、宮内 彰彦、池田 尚広、黒川 愛恵、大貫 良幸、中嶋 剛、平井 真洋、村松 一洋、小坂 仁、村松 慎一、山形 崇倫
2. 発表標題 AADC欠損症遺伝子治療の長期効果
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Karin Kojima
2. 発表標題 Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency in Japan improved the motor and mental function of patients with various phenotypes.
3. 学会等名 12th International Collaborative Forum of Human Gene Therapy for Genetic Diseases (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
	パーチェム ロナルド (PARCHEM RONALD)	バイラー医科大学・Center for Cell and Gene Therapy・Associate Professor	

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			
米国	ペイラー医科大学			