

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700394

研究課題名(和文)抗体提示型ウイルスベクターを用いた平行線維・登上線維選択的遺伝子導入法の確立

研究課題名(英文) Selective transduction into parallel fiber or climbing fiber using antibody-displaying viral vector

研究代表者

今野 歩 (Konno, Ayumu)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40509048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗体提示型ウイルスベクターによって、マウス小脳の平行線維終末と登上線維終末特異的に遺伝子導入する方法の確立を目指して研究を実施した。この目的のために、シナプス小胞の小胞膜内腔側に結合するVGluT1抗体およびVGluT2抗体を新規に作成した。また、本抗体を結合させたレンチウイルスベクターをマウス小脳に投与したが、期待される感染結果は得られなかった。以上の結果から、当初の計画で予定していた研究をおおよそ遂行したものの、期待した遺伝子導入法の確立には至らなかった。今後、現在進行しているアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入法などを用い、本手法の確立を目指したい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to establish the method for a selective transduction into parallel fiber or climbing fiber in a mouse cerebellum using an antibody-displaying viral vector. To achieve this aim, we made new antibodies against luminal domain of VGluT1 or VGluT2. We injected the lentiviral vectors displaying these antibodies into mice cerebellum. However, these vectors could not infect specific cells that were expected. To achieve this aim, we need a different approaches such as adeno-associated virus vector.

研究分野：神経科学

キーワード：ウイルスベクター 小脳

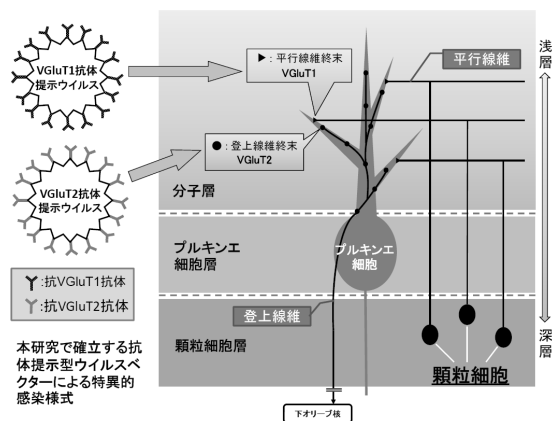
1. 研究開始当初の背景

抗体提示型ウイルスベクターは、ウイルス膜表面に Protein A 由来のイムノグロブリン結合部位を導入したベクターであり、表面に提示させた抗体の結合を介して、細胞特異的な遺伝子導入が可能なウイルスベクターである。本手法は遺伝子治療の分野での研究が盛んであったが、研究代表者らは中枢神経系での実験に適用し、細胞特異的な遺伝子導入に成功した (Konno et al., Neurosci Res, 2011)。

2. 研究の目的

ウイルスベクターを用いた小脳顆粒細胞に対する、特異的かつ効率的な外来遺伝子導入法は確立されていない。研究代表者は、抗体提示型ウイルスベクターの抗原-抗体反応による指向性を利用し、顆粒細胞に効率的に遺伝子を導入できると考えた。具体的には、平行線維終末に存在している小胞グルタミン酸トランスポーター-VGluT1 に対する抗体を提示させたレンチウイルスベクターを用いて、特異的な遺伝子導入を行う。また、VGluT2 の抗体を提示させることにより、登上線維終末から下オリブ核の登上線維ニューロンへの遺伝子導入も同様に可能である (下図参照)。

すなわち、本研究の目的は、平行線維終末と登上線維終末のマーカである VGluT1 と VGluT2 の抗体をそれぞれ提示させたレンチウイルスベクターを用いることにより、それぞれに個別に外来遺伝子を導入し、発現させる技術を確認することである。



3. 研究の方法

以下の3項目を遂行することにより研究を実施する。

- (1) 抗体提示型レンチウイルスの作成
- (2) 抗 VGluT1 と VGluT2 抗体の作成
- (3) マウス小脳への感染実験

4. 研究成果

- (1) 抗体提示型レンチウイルスの作成]

抗体提示型ウイルスベクターの作成は、過去に報告のある方法 (Morizono et al., Nat

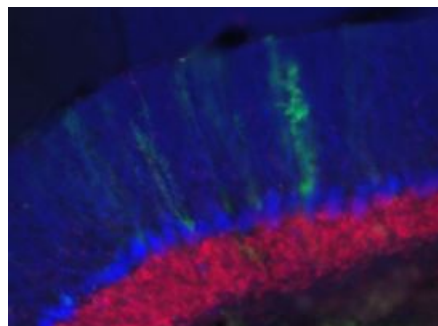
Med, 2005) に倣って、293T 細胞に対する 4重トランスフェクション法で行った。また、新規に購入した液体クロマトグラフィー AKTA Prime を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrapQ HP を使用) により、精製が可能であることを確認した。

- (2) 抗 VGluT1 と VGluT2 抗体の作成]

VGluT1 と VGluT2 のシナプス小胞の小胞膜内腔 (ルーメン) 側に結合する抗体を受託合成により作成した。RGGHVVVQKAQFN (VGluT1)、RGGKVIKEKAKFN (VGluT2) をペプチド抗原として、合成を依頼し、作成自体は順調に完了した。作成した抗体を用いて、マウス小脳に対する免疫組織染色を行った。ポジティブコントロールとして、市販されている抗体 (ルーメン側に結合する抗体ではないため、抗体を介した感染に用いることが不可能) との共有性が期待したものと異なっていた。

- (3) マウス小脳への感染実験

作成した抗体を結合させたレンチウイルスベクター (CMV-GFP) をマウス小脳虫部に投与し、8 週後の小脳切片を観察した。その結果、VGluT1 (顆粒細胞への発現を期待) と VGluT2 (下オリブ核ニューロンへの発現を期待) のいずれを結合したものにおいても、期待した発現は得られなかった (下図は VGluT1 抗体結合レンチウイルスの発現例; 主にバークマングリアへの感染が観察される)。



以上の結果から、当初の計画で予定していた研究をおおよそ遂行したものの、期待した遺伝子導入法の確立には至らなかった。

この最も大きな原因となっている点は、新規に作成した抗体の特異性が十分に高くなかった点が最も大きいと考えられる。抗体提示型ウイルスで使用する抗体は生きた細胞表面に結合する必要があるため、最低でも免疫組織染色に使用できるグレードの抗体であることが要求される。しかしながら、今回作成した抗体は免疫組織染色において、適切な染色パターンを示さなかった。抗体はロットによって大きく特性が異なるため、今後さらに異なるロットの抗体を作成することにより、本手法の確立にいたる可能性がある。

一方、本研究と同時並行で実施していたアデノ随伴ウイルスベクターを用いた研究において 2 報の論文、ゲノム組み込み欠損型レ

ンチウイルスを用いた遺伝子治療に関する論文の計3報をこれとは別に報告している。

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3件)

Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H (2014) Distinct transduction profiles in the CNS via 3 injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 1, Article number: 14032. DOI: 10.1038/mtm.2014.32 (査読有)

Saida H, Matsuzaki Y, Takayama K, Iizuka A, Konno A, Yanagi S, and Hirai H. (2014) One-year follow-up of gene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice. *Gene Therapy*, 21:820-827. DOI: 10.1038/gt.2014.60 (査読有)

Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H. (2014) Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells. *The Cerebellum*, 13(1):29-41. DOI:10.1007/s12311-013-0516-5 (査読有)

[学会発表](計10件)

Ayumu Konno, Yasunori Matsuzaki & Hirokazu Hirai "Producing animal models of spinocerebellar ataxia type 3 via a viral vector-mediated gene delivery", International Society of Radiation Neurobiology 5th Conference, 21 February 2015, Takasaki City Gallery, Takasaki, Gunma, Japan

今野歩、松崎泰教、平井宏和、アデノ随伴ウイルスによる小脳全域への遺伝子導入を介した脊髄小脳変性症3型モデル動物の作出、2014年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のワークショップ、東京ガーデンパレス・東京都、2014年12月12日

Ayumu Konno, Yasunori Matsuzaki, Naoya Ohta, Hirokazu Hirai, "Production of animal models of spinocerebellar ataxia type 3 by a

viral vector-mediated gene delivery" 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (GUMI&AMDE2014), 5 December 2014, Kiryu City Performing Arts Center, Kiryu, Gunma, Japan

Ayumu Konno, Hirokazu Hirai、AAV9 vector-mediated production of animal models of spinocerebellar ataxia type 3、第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜・神奈川県横浜市、2014年9月13日

KONNO, A. N. SHUVAEV, S. YANAGI, H. HIRAI "Perturbation of mGluR signaling in SCA3 model mice expressing mutant ataxin-3 and the rescue by intravascular administration of AAV9", Neuroscience2013, 9-13 (10) November 2013, San Diego Convention Center, San Diego, California, USA

KONNO, A. N. SHUVAEV, S. YANAGI, H. HIRAI "Disruption of mGluR signaling in SCA3 model mice expressing mutant ataxin-3 and the partial restoration via intravenous administration of AAV9", 23rd Neuropharmacology Conference, 7-8 (7) November 2013, Sheraton San Diego Hotel and Marina, San Diego, California, USA

Ayumu Konno, Anton N. Shuvaev, Noriko Miyake, Koichi Miyake, Shigeru Yanagi, Takashi Shimada, Hirokazu Hirai、DISRUPTION OF METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR SIGNALING AND RESCUE THROUGH INTRAVASCULAR ADMINISTRATION OF AAV9 IN A MOUSE MODEL OF SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE 3、第19回日本遺伝子治療学会学術集会、岡山コンベンションセンター・岡山県岡山市、2013年7月5日

今野歩、Anton N Shuvaev、三宅紀子、三宅弘一、柳茂、島田隆、平井宏和、Deficient metabotropic glutamate receptor signaling and rescue through intravascular administration of AAV9 in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3、Neuro2013 (第36回日本神経科学大会)、国立京都国際会館・京都府京都市、2013年6月20日

今野歩、Anton N Shuvaev、三宅紀子、三宅弘一、柳茂、島田隆、平井宏和、Gene therapy for spinocerebellar ataxia type-3 using trans-blood-brain barrier gene delivery by AAV9 (AAV9の静脈注射による脊髄小脳変性症3型モデルマウスへの遺伝子治療の試み)、第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場・愛知県名古屋市、2012年9月19日

今野 歩、本城 達也、内田 敦、石塚 徹、
八尾 寛、抗体提示型シンドビスウイル
スベクターによる抗体依存的な遺伝子
導入技術の評価、2011 年度包括型脳科学
研究推進支援ネットワーク夏のワーク
ショップ、神戸国際会議場、2011 年 8
月 21 日（日）～24 日（水）

〔その他〕

ホームページ等

<http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

今野 歩 (KONNO, Ayumu)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40509048