

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460501

研究課題名(和文) 血管内投与型AAVベクターによるてんかんの遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene therapy for epilepsy by intravascular administration of Adeno-associated virus

研究代表者

小黑 恵司 (OGURO, KEIJI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90231232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物、外科治療のいずれも無効の難治性てんかん患者の新たな治療法の開発を目的とした。従来型の、侵襲性を伴うてんかん抑制物質の海馬への定位的投与ではなく、脳血液関門を通過する血管内投与型のアデノ随伴ウイルスベクターに抑制系GABAシナプスの形成増強に関わるシナプス関連分子Neuroigin2を搭載し、てんかんモデル動物ELマウスの血管内に投与した。この結果、脳全体へのNeuroigin2の発現およびてんかん抑制効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to develop a new therapy for the intractable epilepsy patients resistant to the conventional therapies including medication and surgery. We developed a new gene therapy using Adeno Associated Virus (AAV) vector pass through the blood brain barrier (BBB) which enables us to intravascular administration. We performed intracardiac injection of AAV-Neuroigin2 on epileptic EL mice. Neuroigin2 is a synapse related molecule which is known to induce or accelerate the formation of GABAergic synapses. We found that administrated AAV-Neuroigin2 is expressed over the brain including cortex and hippocampus and successfully suppress the seizure.

研究分野：脳神経外科

キーワード：てんかん 遺伝子治療 ELマウス

1. 研究開始当初の背景

日本には約100万人と多くてんかん患者がいると推定される。乳児重症ミオクロニーてんかんなど、一部のてんかんで原因となる遺伝子異常が特定されつつあるが、多くのてんかんは原因不明である。通常は抗てんかん薬により治療されるが、全患者の20-30%は薬物抵抗性であり、難治性てんかんと呼ばれる。発作コントロールが不良の場合、小児であれば精神運動発達障害を来し、要監視・介護状態、就学困難となり、家庭的・社会的に数十年単位での大きな負担となる。成人であれば、進学、就職、結婚、妊娠、運転等が制限され、人生の大きな障害となる。外科的治療により発作が消失する場合もあるが、小児のてんかん性脳症や特発性全般てんかんなどは手術適応も限られ、発達予後、発作予後共に不良である。新皮質てんかんや多焦点の発作など外科手術を行っても発作予後が不良の場合も多い。外科的治療を含めた全てのてんかん治療に対して難治性であり、発作に苦しんでいる患者数は20万人程度と推定され、これらの人々に対し、さらに新たな治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

てんかん遺伝子治療 – パーキンソン病遺伝子治療実績から –

変性疾患であるパーキンソン病においては薬物、外科的手術 DBS(Deep brain stimulation)に次ぐ第3の治療として、遺伝子治療が既に実施され、長期有効性が確認されている。この臨床応用は、本邦で唯一本学にて行われた (Muramatsu S, et al, Mol Ther 18, 1731-1735)。AAV をベクターとし、ドパミン合成酵素の1つである芳香族-L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC=aromatic L-amino acid decarboxylase) が定位的に両側線状体に導入された。AAV は一本鎖 DNA をもつ非病原性ウイルスで、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどヘルパーウイルスが存在しなければ自己増殖しない。遺伝子治療には導入効率のよい、2型 AAV が用いられた。AAV ベクターを管理・運用したのは共同研究者の村松であり、種々の遺伝子対し、AAV によるベクター作成が可能である。本学では基礎的実験から臨床応用まで、遺伝子治療開発の環境が整っており、本研究は AAV によるてんかん遺伝子治療の開発を目的とする。

血管内投与型 AAV ベクターの使用

これまで、てんかんモデル動物に対して行われてきた遺伝子の導入は、遺伝子を組み込んだ AAV やレンチウイルス (RV=Rentivirus) ベクターを定位脳手術により海馬や脳室内に直接注入する方法であった。しかしながら、本法は遺伝子導入に侵襲的手術が必要となり、脳内出血や頭蓋内感染の危険性を伴う。また、ヒトでの臨床応用を考えた場合、

機能的に重要な部位には投与出来ず、発作焦点が明らかでない場合 (特発性全般てんかんなど) や発作焦点が複数ある場合も治療困難となる。村松は血管内投与型 AAV ベクターを開発し、既に球脊髄性筋萎縮症モデルマウスにおいて有効性を確認している (Miyazaki, Muramatsu et.al, Nat Med 18:1136-1141, 2012)。本ベクターは脳血管閥門を通過し、脳内に分布することが確認されている。申請者らは血管内投与型 AAV ベクターを使用し、局所投与型に比べ、治療手技が簡便かつ安全な遺伝子導入を目指す。

導入遺伝子の選択

てんかんに対する遺伝子治療には、①特定の遺伝子の異常 (欠損) が明らかになった患者に対し欠損した特定の遺伝子を導入する特異的方法と②一般的な抑制系神経伝達物質 (GABA(γ -aminobutyric acid) など) を強化したり興奮系神経伝達物質 (グルタミン酸など) を抑制する非特異的遺伝子を導入する方法とが考えられる。前者は特定の患者のみに有効で、対象患者が限定される。後者は、原因そのものを治療するわけではないが、普遍的な方法であり、全てのてんかん患者が対象になり得る。本研究では後者の遺伝子として抑制系 GABA シナプスの形成増強に関わるシナプス関連分子 Neuroligin2 (NL2) を導入する。

導入動物: EL マウスを使用した血管内投与による遺伝子治療

てんかんモデル動物として知られる EL マウスは「放り投げること」が刺激になるてんかん自然発症マウスとして 1954 年に Imaizumi らにより最初に報告された。当初は ep マウス、その後は EL マウスと呼ばれていたが 1992 年からは EL マウスを正式名とする。EL マウスは、10 週齢前後から加速度刺激に対して強直間代性痙攣を起こすようになり、ヒトてんかんと同様の相溶性も高く、てんかん研究モデルとして極めて有用と考えられる。本マウスは遺伝的素因に加え、発作誘発と発作履歴という後天的素因が加わることによりてんかん原性や発作原性を獲得する。EL マウスでは薬物投与モデルのような形態学的変化が認められず、二次的影響も考慮しなくてよいため、よりヒトてんかん (特に特発性全般てんかん) に近いと言える。本研究では実験的てんかん治療の有効性判定に有用性が高い EL マウスを使用する。

3. 研究の方法

8 週齢 EL マウスに NL-2 搭載アデノ随伴ウイルスベクター (AAV9-Syn I FLAG NL-2) を心腔内投与した (n=10)。同週齢 EL マウスに NL-2 の代わりに蛍光色素 GFP を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター AAV9-Syn I AeGFP を心腔内投与した群 (n=17) と生食を投与した群 (Wild EL, n=14) を対照とした。

EL マウスは幼少時より 1 週間毎に尾を持つ

て回転刺激（加速度刺激）を与え、発作を誘発することにより、発作が維持される。ベクター投与後も1週間毎の回転刺激付与は継続した。

（組織解析）

脳標本作成：ペントバルビタールで深麻酔し、左心室からの4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸バッファー（pH7.4）注入し灌流固定した。固定後、脳を取り出して灌流固定液での半日の浸漬固定後15%ショ糖を含む0.1Mリン酸バッファー（pH7.4）に移して冷蔵庫で組織化学実験まで保存した。:

蛍光免疫染色：40 μ mの矢状断切片を作成してFLAG（DDDDK）抗体染色により導入遺伝子NL2発現を確認した。Alexafluor 488付き2次抗体を用いた画像処理により蛍光顕微鏡で発現を確認した。

（回転加速度刺激による評価）

ベクター等投与後、22週齢に至るまで1週間毎に、尻尾を持ってマウスを一定数回転させ（8回転）、行動をビデオ記録した。後にビデオ上で発作の有無、発作を起こした場合の持続時間、強度を観察した。

発作強度を

- 1点：発作なし
- 2点：尻尾を挙げる、または体を震わせるのみ
- 3点：明らかな発作だが、倒れずに姿勢を保つ
- 4点：激しい発作で、姿勢を保てず、横に倒れる

として得点化した。

発作の持続時間を

- 1点：発作なし
- 2点：1-10秒
- 3点：11-20秒
- 4点：21-30秒
- 5点：31-60秒
- 6点：61秒-

として得点化した。

各グループの発作出現率、平均発作時間、平均発作強度、平均発作時間×強度を週毎に評価した。

4. 研究成果

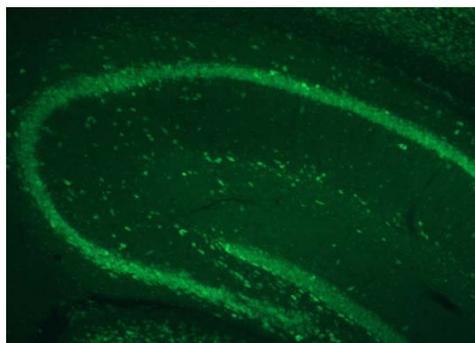
（NL2の脳内神経細胞への発現）

FLAG抗体を用いる染色によって、組織学的に脳内分布を観察した（図a, b, c）。図aに示すように、本発明のベクターの血管内投与によって海馬及び大脳皮質の神経細胞にFLAGタグ付NLGN2が広く発現していたため、rAAVによる遺伝子送達が良好であったことを確認できた。図b, cよりNL2投与群のみに特異的に発現していることがわかる。

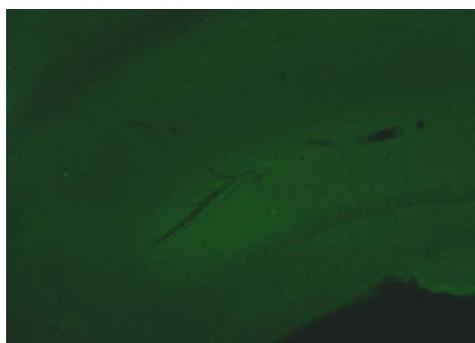
a)



b) NL2(+) GFP(+)

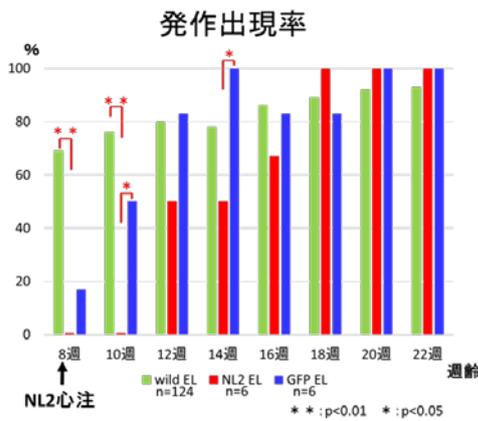


b) NL2(-) GFP(+)



(NL2 投与群のてんかん発作抑制効果)

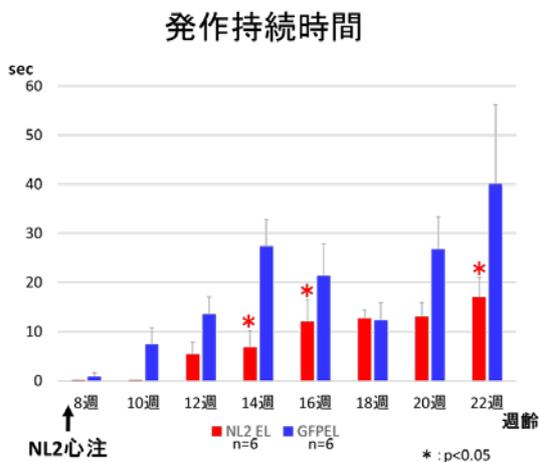
1. てんかん発作出現率



いずれの群も週齢と共に発作出現率は増加する傾向であった。

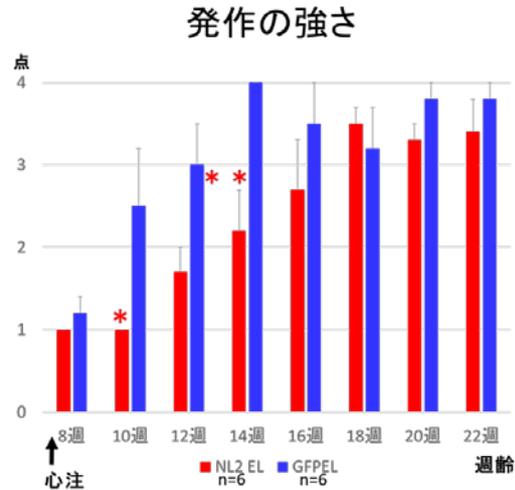
NL-2 投与 EL マウスは 16 週齢（投与後 2 ヶ月）まで、wild EL、GFP 投与対照 EL の両群に対し、発作頻度の少ない傾向にあった。Wild EL に対しては 8（投与 4 日目）、10 週齢で、GFP に対しては 10,14 週齢で有意に発作が少なかった。GFP 対照群も wild EL に対し、10 週齢まで出現率が少ない傾向にあったが、有意差は認めなかった。

2. てんかん発作持続時間



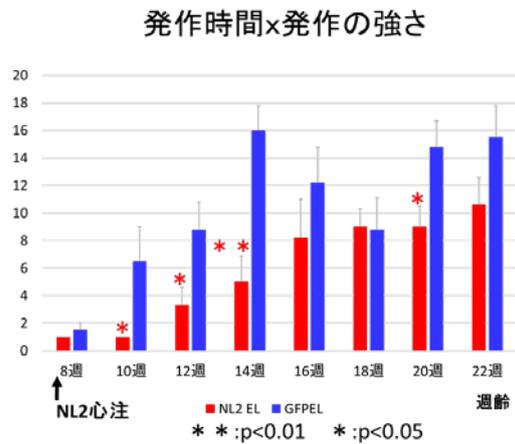
発作持続時間は両群とも週齢と共に増加傾向であった。ほとんどの週齢において、NL-2 投与群が対照群に比し発作が短い傾向であった。14, 16, 22 週齢で対照群に比し、有意に短かった。

3. てんかん発作の強さ



発作の強さも両群共に週齢と共に増加する傾向であった。ほとんどの週齢において NL-2 投与群の発作が弱い傾向にあった。特に 16 週齢目頃までが顕著であった。10, 14 週齢で有意差を認めた。

4. 発作時速時間と強さを合わせた評価



てんかん発作の時間的要素と発作の強さの要素を合わせた、いわばてんかん発作の程度を表現すると考えられる指標の推移をみたものである。両群とも週齢と共に増加（発作がひどくなる）傾向を認めた。各週齢において、NL-2 投与が群対照群に比し、てんかん発作の程度がより軽い傾向がより明確になった。10,12,14,20 週で有意差を認めた。

(まとめ)

血管内投与型 AAV ベクターにより標的分子が脳全体のニューロンに供給され、本分子の興奮抑制作用がてんかん発作を抑制した。治療方法として非侵襲的で有益なてんかん遺伝子治療の可能性が示唆された。

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 10 件)

- ① Saito T, Tsuzuki D, Yokota H, Oguro K, Yamamoto T, Dan I, Watanabe E, Evoked potential mapping of the rostral region by framelsss navigation system in Mexican hairless pig. *J Neurosci Methods* 査読あり 212: 100-105, 2013/doi: 10.1016/j.neumeth. 2012.09.027. Epub2012 Oct1
- ② Dan H, Dan I, Sano T, Kyutoku Y, Oguro K, Yokota H, Tsuzuki D, Watanabe E, Language-specific cortical activation patterns for verbal fluency tasks in Japanese as assessed by multichannel functional near-infrared apectroscopy. *Brain Lang* 査読あり 126:208-216, 2013 doi:10.1016/j.band.2013.05.007. Epub2013 Jun22
- ③ Otabe H, Nibuya M, Shimazaki K, Toda H, Suzuki G, Nomura S, Shimizu K. Electroconvulsive seizures enhance autophagy signaling in rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 査読あり 2014 3;50:37-43. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.11.012. Epub 2013 Dec 4.
- ④ Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K, Muramatsu S, Systemic Delivery of Tyrosine-Mutant AAV Vectors Results in Robust Transduction of Neurons in Adult Mice. *BioMed Research International* 査読あり 2013, Article ID 974819, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/974819>
- ⑤ Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints SG, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu SI, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker EE, Rich T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer VM, Okazawa H. In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry*. 査読あり 2015 Apr;20(4):459-71. doi:10.1038/mp.2014.69. Epub 2014 Jul 29.
- ⑥ Uga M, Saito T, Sano T, Yokota H, Oguro K, Rizki EE, Mizutani T, Katura T, Dan I, Watanabe E, Direct cortical hemodynamic mapping of

somatotopy of pig nostril sensation by functional near-infrared cortical imaging (fNCI) *Neuroimage* 査読あり 91:138-145, 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage. 2013.12.062. Epub2014 Jan11

- ⑦ Rizki EE, Uga M, Dan I, Tsuzuki D, Mizutani T, Sano T, Yokota H, Oguro K, Watanabe E. Determination of epileptic focus side in mesial temporal lobe epilepsy using long-term non-invasive fNIRS/EEG monitoring for presurgical evaluation. *Neurophotonics* 査読あり 025003-1-13, 2015 Doi:10.1117/1.NPh2.2.025003. Epub 2015 May 20
- ⑧ Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, Kitamura Y, Hiroaki H, Fukazawa Y, Kii I, Nishiyama T, Kakita A, Takeda H, Takeuchi A, Arai Y, Ito A, Komura H, Hirao H, Satomura K, Inoue M, Muramatsu S, Matsui K, Tada M, Sato M, Saijo E, Shigemitsu Y, Sakai S, Umetsu Y, Goda N, Takino N, Takahashi H, Hagiwara M, Sawasaki T, Iwasaki G, Nakamura Y, Nabeshima Y, Teplow DB, Hoshi M. Na, K-ATPase $\alpha 3$ is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読あり 2015 Aug 11;112(32):E4465-74. doi: 10.1073/pnas.1421182112. Epub 2015 Jul 29.
- ⑨ Lee NC, Muramatsu S, Chien YH, Liu WS, Wang WH, Cheng CH, Hu MK, Chen PW, Tzen KY, Byrne BJ, Hwu WL. Benefits of Neuronal Preferential Systemic Gene Therapy for Neurotransmitter Deficiency. *Mol Ther*. 査読あり 2015 Oct;23(10):1572-81. doi: 10.1038/mt.2015.122. Epub 2015 Jul 3.
- ⑩ Kakegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu S, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzai M. Anterograde Clq11 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron*. 査読あり 2015 Jan 21;85(2):316-29. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.020.
- [学会発表] (計 1 件)
- ① 小黒恵司、島崎久仁子、横田英典、アリフ・ダハ、村松善也、渡辺英寿、EL マウスにおける血管内投与型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによるてんかんの遺伝子治療、第49回日本てんかん学会、2015年10月30、31日、長崎ブリックホール(長崎)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：てんかん治療のためのアデノ随伴ウイルスベリオン

発明者：村松慎一、小黒恵司、島崎久仁子

権利者：村松慎一、小黒恵司、島崎久仁子

種類：特許

番号：特許願 2016-006191 号

出願年月日：平成 28 年 1 月 15 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小黒恵司 (OGURO Keiji)

自治医科大学脳神経外科准教授

研究者番号：90231232

(2) 研究分担者

島崎久仁子 (SHIMAZAKI Kuniko)

自治医科大学脳神経外科非常勤講師

研究者番号：40142153

横田英典 (YOKOTA Hidenori)

自治医科大学脳神経外科講師

研究者番号：90254929

(3) 連携研究者

村松慎一 (MURAMATSU Shinichi)

自治医科大学神経内科教授

研究者番号：10239543