

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22606

研究課題名(和文)人工miRNA搭載AAVを用いたCMT1Aの革新的遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文)Gene therapy for CMT1A using AAV harboring artificial microRNAs

研究代表者

井上 健(Inoue, Ken)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部・室長

研究者番号：30392418

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)：シャルコー・マリー・トゥース病1A型(CMT1A)の遺伝子治療を可能にするためにシュワン細胞特異的にPMP22遺伝子の発現抑制ができる人工miRNAを搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)を開発し、その有効性を実証する。我々は本研究期間中にシュワン細胞特異的プロモーターを構築したが、効果的な遺伝子治療に実現に必要な転写活性が得られていないため、今後さらに改良を加え、これをすでに設計された人工miRNAカセットと組み合わせて、治療用AAVを構築していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、人工マイクロRNAを用いて特定の遺伝子の発現を抑制することによって根本的な治療のない遺伝性疾患、特にゲノム重複などによる遺伝子過剰発現が原因である疾患に対する遺伝子治療法の可能性を切り開くものである。特に神経疾患については、安全に遺伝子治療用のベクターを標的となる細胞に送り届けるための技術開発が必須であり、本研究は特に遺伝性ニューロパチーであるシャルコー・マリー・トゥース病1A型の治療法開発を目指している。

研究成果の概要(英文)：To enable gene therapy for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A), we are developing an adeno-associated virus (AAV) equipped with an artificial miRNA that can suppress the expression of the PMP22 gene specifically in Schwann cells, and demonstrate its effectiveness. We constructed a Schwann cell-specific promoter during the study period, which has not reached the transcriptional activity enough for effective gene therapy. Therefore, we will make further improvements on this promoter in the future and combine it with the artificial miRNA cassettes that have already been designed for building a therapeutic AAV.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：ゲノム重複変異 Charcot-Marie-Tooth病1A型 PMP22 人工miRNA アデノ随伴ウイルス(AAV) 遺伝子発現抑制 遺伝子治療法

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

これまでにシュワン細胞を対象とした AAV 治療法の研究は極めて少ない。これはシュワン細胞がオリゴデンドロサイトと同様に、通常の方法では AAV の導入と遺伝子発現が非常に困難であるからである。実際に CAG や U6 など高効率全般性発現プロモーターを用いた系では、シュワン細胞やオリゴデンドロサイトへの導入効率は数%と極めて低く、現状では臨床応用可能な治療効果は期待できない。また遺伝子補充ではなく、遺伝子抑制による治療は、依然開発途上にある。従って、シュワン細胞において *PMP22* を特異的に発現抑制することにより CMT1A を治療するための AAV 遺伝子治療もこれまで報告はない。

2. 研究の目的

我々は *PLP1* 遺伝子の重複が原因でおこる PMD の遺伝子治療法の開発を行い、これらの問題をオリゴデンドロサイトにおいて、細胞特異的高発現プロモーターと人工 miRNA の組み合わせにより解決し、*PLP1* 重複変異における PMD の根治療法開発の基盤となる AAV ベクターを開発した。そこで本申請では、オリゴデンドロサイトで成功した細胞特異的高発現プロモーターと人工 miRNA の組み合わせを応用し、シュワン細胞特異的に *PMP22* 遺伝子発現を抑制する人工 miRNA 搭載 AAV を作成し、これを用いて野生型および CMT1A モデルマウス (*PMP22*-Tg マウス) での有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. シュワン細胞特異的高効率発現プロモーターの設計

種間ゲノム比較法を用いてヒト *MPZ* プロモーターを構築し、さらにイントロン 1 にある特異的エンハンサー配列をその 5' 端に結合することにより、改変ヒト *MPZ* プロモーターを構築する。不死化シュワン細胞株 IMS32 あるいは IFRS1 を用いたルシフェラーゼ・レポーターアッセイにより最も転写活性が高い配列を選択する。

2. ヒト *PMP22* 特異的人工 miRNA の設計・選択・scAAV の構築

人工 miRNA は、shRNA を miRNA 発現カセットに組み込み、任意の遺伝子の 3' UTR から発現できる技術である (図 1)。ヒト *PMP22* を標的とした人工 miRNA 配列を専用ソフトで複数候補を設計し、HeLa 細胞を用いたアッセイ系にて遺伝子発現抑制効率 80% 以上の配列を選択した後、上記のシュワン細胞特異的プロモーターを搭載した AAV プラスミドに組換え、不死化シュワン細胞株を用いて内在性 *PMP22* の抑制効果を検証し、70% 以上の発現抑制効果が得られた配列をさらに選択する。これらを AAV-HEK293 細胞に導入して培養し、AAV を精製する。血清型は AAV2、AAV1/2 ハイブリッド、AAV8、AAV9 を使用する。

3. 野生型マウスを用いた導入効率、遺伝子抑制効果の検証

作成した AAV が、マウス個体レベルでシュワン細胞特異的に導入遺伝子 GFP を発現すること、その導入効率が十分に高いこと、30-50% 程度の *PMP22* の発現抑制効果を得られることを確認する。成体マウスの坐骨神経に上記で精製した *PMP22* 標的 AAV あるいはコントロール AAV を直接投与し、1-2 週間後にシュワン細胞マーカー (MBP、*MPZ* など) と GFP の共発現の割合を検証する。また定量的 PCR、ウェスタンブロットにより *PMP22* 遺伝子抑制効率を検証する。

4. CMT1A モデルマウスを用いた治療効果の検証

上記で作成したシュワン細胞特異的に *PMP22* 標的人工 miRNA を CMT1A モデルマウスである *PMP22* トランスジェニック (Tg) マウス Tg*PMP22*-C3 に投与し、その治療効果の検証を行う。成体マウスの坐骨神経に AAV を直接投与し、2 週間後から 2 ヶ月後まで継続的にロタロッドテストなどの行動学的解析を実施した後に、坐骨神経の神経伝導速度を測定し、さらに電子顕微鏡による髄鞘の超微形態を含めた組織学的解析、髄鞘関連遺伝子の発現変化を検証する。さらに広範囲高効率の AAV 導入を目指し、適切な AAV 投与方法の開発、血清型の最適化を行う。これらの多面的な表現型解析により我々のシュワン細胞特異的 *PMP22* 標的人工 miRNA 搭載 AAV の有効性に関する POC を確立する。

4. 研究成果

まずシュワン細胞特異的高効率発現プロモーターの設計を行った。*PMP22* は、シュワン細胞の成熟と髄鞘化開始に伴って発現が上昇する髄鞘膜蛋白質をコードするため、その発現パターンに合わせたプロモーターの使用が必要である。そこで我々は、成熟シュワン細胞での特異的発

現が知られているラット MPZ 遺伝子プロモーターの配列情報をもとに種間の塩基配列保存度の高いプロモーター領域をヒト MPZ 遺伝子から抽出し、さらにイントロン 1 にある特異的エンハンサー配列をその 5' 端に結合することにより、改変ヒト MPZ プロモーターを構築し、シュワン細胞特異的高効率発現プロモーターカセットを作成した。このプロモーターカセットは HeLa 細胞を用いたルシフェラーゼ・レポーターアッセイでは全く転写活性を示さなかった。一方で、不死化シュワン細胞株 IMS32 あるいは IFRS1 を用いたルシフェラーゼ・レポーターアッセイでは、転写活性を認めたことから、本プロモーターのシュワン細胞特異性が明らかになった。複数のコンストラクトを作成し、十分高い転写活性を有する配列を選択するべく、解析を実施したが、その転写活性は先行して開発したオリゴデンドロサイト特異的プロモーターの活性よりはるかに低値で、遺伝子発現抑制治療に必要な転写活性が得られないことが判明した。また文献的にも高い転写活性を有するシュワン細胞特異的プロモーターの報告はなかった。これらの問題を解決するために、ウィルス由来のエンハンサー配列を追加し、転写活性を高めるためのプロモーターの再設計を実施しており、今後、これを用いた AAV の作成を進める予定である。またヒト PMP22 を標的とした人工 miRNA 配列の設計は終了しており、上記のプロモーターの作成が終了次第、これを GFPcNDA 下流に人工 miRNA カセットとして AAV ベクターに組み込み、不死化細胞を用いた PMP22 遺伝子抑制効率を検証し、最も抑制効果の高いものを選択し、AAV の培養精製を行う計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li Heng, Okada Hironori, Suzuki Sadafumi, Sakai Kazuhisa, Izumi Hitomi, Matsushima Yukiko, Ichinohe Noritaka, Goto Yu-ichi, Okada Takashi, Inoue Ken	4. 巻 4
2. 論文標題 Gene suppressing therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial microRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e125052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.125052	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 Kashiki Hitoshi, Li Heng, Miyamoto Sachiko, Ueno Hiroe, Tsurusaki Yoshinori, Ikeda Chizuru, Kurata Hirofumi, Okada Takumi, Shimazu Tomoyuki, Imamura Hoseki, Enomoto Yumi, Takanashi Jun-ichi, Kurosawa Kenji, Saitsu Hirotomo, Inoue Ken	4. 巻 6
2. 論文標題 POLR1C variants dysregulate splicing and cause hypomyelinating leukodystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology Genetics	6. 最初と最後の頁 e524 ~ e524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXG.0000000000000524	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Inoue K, Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Ichinohe N, Goto Y, Okada T.
2. 発表標題 Gene suppressing therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial miRNA.
3. 学会等名 第64回人類遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李コウ, 岡田浩典, 鈴木禎史, 境和久, 泉仁美, 松島由紀子, 一戸紀孝, 岡田尚巳, 後藤雄一, 井上 健
2. 発表標題 Pelizaeus-Merzbacher病におけるPLP1遺伝子重複を標的としたAAVによるartificial miRNA遺伝子治療
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue K, Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Ichinohe N, Goto Y, Okada T.
2. 発表標題 PLP1 gene suppression therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial miRNA
3. 学会等名 The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 健
2. 発表標題 Pelizaeus-Merzbacher病に対する遺伝子治療
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue K
2. 発表標題 Developing molecular therapies for childhood white matter diseases: Pelizaeus-Merzbacher disease
3. 学会等名 15th Asian Oceanian Congress of Child Neurology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Ichinohe N, Goto Y, Okada T, Inoue K.
2. 発表標題 Gene suppressing therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using AAV harboring PLP1-targeting artificial miRNA.
3. 学会等名 American society of gene & cell therapy 23rd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------