

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293213

研究課題名(和文) 改変型AAVベクターによる神経変性疾患の遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene therapy for neurodegenerative diseases using modified AAV vectors.

研究代表者

村松 慎一 (MURAMATSU, Shin-ichi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10239543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：改変型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを応用して、神経変性疾患の病態の解明と新規遺伝子治療の開発を目標に研究を実施した。脊髄小脳失調症6型では、CACNA1A遺伝子のIRES下流にある転写因子 1ACTの遺伝子にpolyglutamine配列の異常伸長がある。1ACTの翻訳を選択的に抑制するmiR-3191-5pを搭載したAAVベクターを脳室内に投与することにより、モデルマウスのPurkinje細胞の脱落が抑制され運動機能が改善した。Parkinson病の遺伝子治療では、2000年に酵素遺伝子を脳内に導入したサルの組織解析を行い遺伝子が神経細胞で15年以上発現していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Using modified adeno-associated virus (AAV) vectors that can deliver therapeutic genes to neurons in broad areas of the central nervous system, we have developed gene therapy for neurodegenerative diseases. Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) is caused by a polyglutamine repeat expansion within a second CACNA1A gene product, 1ACT. As a potential therapy, the complete silencing of CACNA1A gene expression would be lethal, although the selective elimination of 1ACT protein could be a viable strategy. AAV vector-mediated delivery of miR-3191-5p into the ventricles protected from the Purkinje cell degeneration and ataxia in a mouse model that was made by intraventricular infusion of AAV vector expressing expanded polyglutamine repeats in the 1ACT gene. We also confirmed that transgenes were expressed even after 15 years in a monkey model of Parkinson disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：遺伝子治療 脊髄小脳失調症 パーキンソン病 AAVベクター

1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患に対する遺伝子治療用ベクターとして、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの有用性が認知されている。AAV ベクターは、炎症・免疫反応をほとんど惹起することなく、脳内に導入した遺伝子を長期間 (10 年以上) 発現する。これまで一貫して AAV ベクターの研究を行ってきた。基礎研究としては、3 型 AAV の感染性クローンの作製をはじめ、Cre recombinase を発現する AAV ベクターにより目標遺伝子を選択的に除去する方法を応用して海馬や黒質の機能解析を行ってきた。遺伝子治療用ベクターとして、Parkinson 病と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対して神経栄養因子の遺伝子導入により神経細胞の脱落を抑制する方法や、Alzheimer 病に対してアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) の分解酵素 neprilysin の遺伝子を導入する方法を開発した。とくに Parkinson 病に対しては芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の遺伝子を搭載した AAV ベクターを被殻に注入する遺伝子治療の臨床研究を実施し、運動機能の改善効果を報告した (*Mol Ther* 2010)。

従来、ベクターの投与には定位脳手術が必要で、中枢神経の広範な領域に遺伝子導入することは困難であった。そこで、申請者は、AAV のゲノム構築とカプシド蛋白の改変を行い、血管内あるいは髄腔内投与によって脳と脊髄の広範な領域の神経細胞に遺伝子導入可能な AAV ベクターの開発に成功した (国際特許出願)。このベクターは、血管内投与では新生仔に限り神経細胞に遺伝子導入可能な通常の 9 型 AAV (AAV9) と異なり、成体動物でも神経細胞に効率よく遺伝子導入可能である。また、搭載可能な遺伝子が 1 kb 程度に制限される二本鎖 AAV ベクターと異なり、3 kb 程度の遺伝子も発現させることができる。

2. 研究の目的

独自に開発した、血液脳関門、髄液脳関門を透過し中枢神経系の広範な領域の神経細胞に目的の遺伝子を送達可能な改良型 AAV ベクターを応用して、認知症、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄小脳失調症の病態の解明と新規遺伝子治療法を開発する。

1) 脊髄小脳変性症 6 型 (SCA6) は、日本では優性遺伝 SCA の 20~30% を占め SCA3 に次いで多く、中年以降に発症し、歩行時にふらつく、呂律が回らないなどの症状が増悪する。電位依存性 Ca チャネル $\alpha 1A$ サブユニットの遺伝子 *CACNA1A* 上にある CAG 配列が異常に伸長しているリピート病である。2013 年に、シカゴ大学のグループは、*CACNA1A* 遺伝子は $\alpha 1A$ だけでなく、転写因子の $\alpha 1ACT$ もコードしており、異常に伸長した CAG リピート配列を含む $\alpha 1ACT$ が神経細胞に障害を起

こす原因であることを報告していた。このシカゴ大学のグループとの共同研究により、 $\alpha 1ACT$ を標的とした新規の遺伝子治療法を開発する。

2) パーキンソン病に対する遺伝子治療において、AAV ベクターにより霊長類の脳内に導入した治療用遺伝子の長期安全性を確認する。

3. 研究の方法

1) 神経細胞特異的 Synapsin I プロモーターを搭載した改変型 AAV ベクターを使用する。Internal Ribosome Entry (IRES) 下流に伸長した polyglutamine (Q) repeat 配列を挿入した AAV ベクターと、対象として伸長のない polyQ repeat 配列を挿入した AAV ベクターを作製した。これらのベクターを C57/BL6J マウスの脳室内に投与し、SCA6 のモデル動物を作製した。次に IRES 下流の $\alpha 1ACT2$ の発現のみを抑制する microRNA を miRNA_Targets program を予測し、miR-3191-5p を見出した。そこで、miR-3191-5p を発現する AAV ベクターを作製し、SCA6 モデルマウスの脳室内に投与し、その効果を解析した。

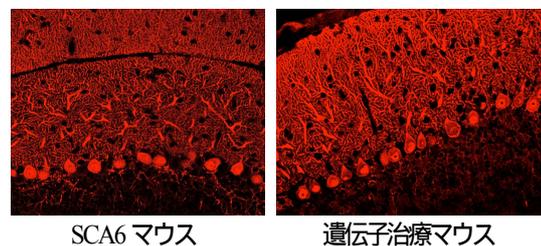
(2) ドパミン合成に必要なチロシン水酸化酵素、AADC、GCH をそれぞれ発現する三種の AAV ベクターを、2000 年に左側の被殻に注入し、その後、長期観察していたカニクイサルの組織解析を行った。

4. 研究成果

(1) SCA6 の遺伝子治療

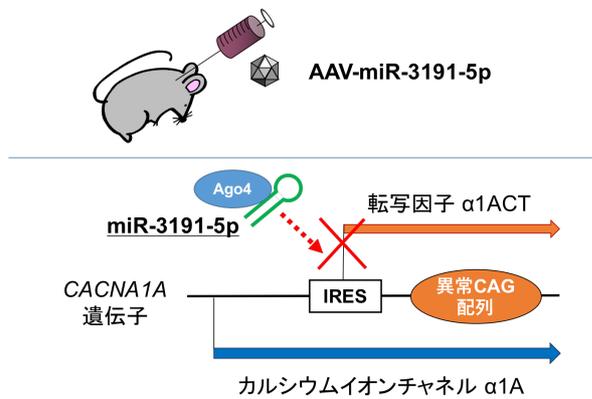
$\alpha 1A$ と $\alpha 1ACT$ が *CACNA1A* 遺伝子のメッセンジャー RNA から翻訳される際に、 $\alpha 1ACT$ だけの翻訳を選択的に抑制する miR-3191-5p を見出した。伸長した CAG リピート配列を含む $\alpha 1ACT$ 遺伝子を搭載した AAV ベクターをマウスの脳室内に注入すると、小脳の Purkinje 細胞の 75% 以上に導入され、運動失調を示す SCA6 モデルマウスが作製できた。次に、このマウスに miR-3191-5p を発現する AAV ベクターを同時に投与すると、小脳の Purkinje 細胞の脱落が減少し運動機能が改善した。

図 1: 小脳 Purkinje 細胞の脱落を抑制した。



miR-3191-5p は、Argonaute 4 と結合し、翻訳開始因子の eIF4AII と eIF4GII により *CACNA1A* から $\alpha 1ACT$ が翻訳されるのを妨げることも明らかにした。Ca チャネル $\alpha 1A$ サブユニットの発現は抑制されなかった

図2 :miR-3191-5p は 1ACTの発現を選択的に抑制する。



2) 2000年にAAVベクターにより酵素遺伝子を脳内に導入したカニクイサルの組織解析を行い、炎症反応などを伴わず挿入した遺伝子が神経細胞で15年以上経ても発現していることを確認した。

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15件)

1. Kanazawa M, Ohba H, Harada N, Kakiuchi T, Muramatsu S and Tsukada H: Evaluation of 6-¹¹C-methyl-*m*-tyrosine as a PET probe for presynaptic dopaminergic activity: a comparison PET study with β-¹¹C-L-DOPA and ¹⁸F-FDOPA in Parkinson disease monkeys. *J Nucl Med*, 57(2):303-308, 2016.
2. Ono S, Sato T and Muramatsu S: Freezing of gait in Parkinson's disease is associated with reduced 6-[¹⁸F]fluoro-L-*m*-tyrosine uptake in the locus coeruleus. *Parkinsons Dis*, 2016: Article ID 5430920, 5 pages, 2016.
3. Igarashi H, Koizumi K, Kaneko R, Ikeda K, Egawa R, Yanagawa Y, Muramatsu S, Onimaru H, Ishizuka T and Yawo H: A Novel Reporter Rat Strain That Conditionally Expresses the Bright Red Fluorescent Protein tdTomato. *PLoS One*, 11(5): e 0155687, 2016.
4. Higashida H, Yokoyama S, Tsuji C and Muramatsu S: Neurotransmitter release: vacuolar ATPase V0 sector c-subunits in possible gene or cell therapies for Parkinson's, Alzheimer's, and psychiatric diseases. *J Physiol Sci*, 67(1):11-17, 2016.
5. Miyazaki Y, Du X, Muramatsu S and Gomez C M: A miRNA-mediated therapy for SCA6 blocks IRES-driven translation of the CACNA1A second cistron. *Sci Transl Med*, 8(347):347ra94, 2016.
6. Taniguchi JB, Kondo K, Fujita K, Chen X, Homma H, Sudo T, Mao Y, Watase K, Tanaka T, Tagawa K, Tamura T, Muramatsu S and Okazawa H: RpA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair. *Hum Mol Genet*, 25(20):4432-4447, 2016.
7. Sumi K, Uno K, Matsumura S, Miyamoto Y, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T and Nitta A: Induction of neuronal axon outgrowth by Shati/Nat81 by energy metabolism in mice cultured neurons. *Neuroreport*, 9; 26(13):740-746, 2015.
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 and Hoshi M: Na, K-ATPase α3 is a death target of Alzheimer patient amyloid-β assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11;112(32):E4465-E4474, 2015.
9. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF and Yamagata T: Mutational and functional analysis of Glucose transporter I deficiency syndrome. *Mol Genet Metab*, 116(3):157-162, 2015.
10. Lee NC, Muramatsu S, Chien YH, Liu WS, Wang WH, Cheng CH, Hu MK, Chen PW, Tzen KY, Byrne BJ and Hwu WL: Benefits of neuronal preferential systemic gene therapy for neurotransmitter deficiency. *Mol Ther*, 23(10):1572-1581, 2015.
11. Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints SGM, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu S, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker EE, Richi T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer VM and Okazawa H: In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry*, 20(4), 459-471, 2015.
12. Kakegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo Y H, Kohda K, Motohashi J, Takahashi, A, Nagao S, Muramatsu S, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu A R and Yuzaki M: Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron*, 85: 316-329, 2015.
13. Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, Shimizu J, Shimizu S,

- Tamura T, Muramatsu S and Okazawa H: HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med*, 7(1):78-101, 2014.
14. Miyamoto Y, Iida A, Sato K, Muramatsu S, and Nitta A: Knockdown of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens core suppresses methamphetamine-induced behaviors and signal transduction in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 18(4) :1-7, 2014.
 15. Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17:1283-1294, 2014.

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 大貫良幸, 小野さやか, 中嶋剛, 小島華林, 斎藤順一, 多賀直行, 渡辺英寿, 小澤敬也, 佐藤俊彦, 平井真洋, 小坂仁, 川合健介, 山形崇倫, 村松慎一 : FMT-PET による芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症に対する定位脳遺伝子治療の評価. 第 56 回日本定位・機能神経外科学会, 2017 年 1 月 28 日, 大阪.
2. Muramatsu S: Gene therapy for neurodegenerative diseases. European Society of Gene & Therapy, October 19, 2016, Florence.
3. 村松慎一: パーキンソン病にウイルスベクターを用いた遺伝子治療は可能か - YES. 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2016 年 10 月 7 日, 京都.
4. Muramatsu S: Gene therapy for central nervous system disorders. The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, Jul 29, 2016, Tokyo.
5. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Takino N, Aoki S, FJimbo E, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T and Yamagata T: Gene therapy for a mouse model of glucose transporter-1 deficiency syndrome. The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, Jul 28, 2016, Tokyo.
6. Kojima K, Miyauchi A, Nakajima T, Asari-Ono S, Saga Y, Mizukami H, Sato T, Muramatsu S, Osaka H and Yamagata T: Improved motor and cognitive function of Aromatic L-Amino acid Decarboxylase (AADC) deficient patients following gene therapy using the AAV2 vector. The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, Jul 28, 2016, Tokyo.
7. Yamagata T, Kojima K, Nakajima T, Miyauchi A, Mizukami H, Osaka H and Muramatsu S: Development and clinical application of gene therapy using AAV for child neurological diseases. The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, Jul 28, 2016, Tokyo.
8. Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Tseng SH, Muramatsu S and Byrne B: Gene therapy for AADC deficiency: toward a standard therapy. The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, Jul 28, 2016, Tokyo.
9. 村松慎一: 神経疾患の遺伝子治療. 平成 28 年度日本生化学会関東支部例会, 2016 年 6 月 11 日, 自治医科大学. (ミニシンポジウム)
10. Ando Y, Asari-Ono S, Nakajima T, Watanabe K, Saga Y, Mizukami H, Watanabe E, Sato T, Ozawa K and Muramatsu S : The second clinical study on AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 19, 2016, Kobe.
11. Muramatsu S : In vivo monitoring of AADC gene delivery by PET., 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 19, 2016, Kobe.
12. Asari-Ono S, Nakajima T, Kojima K, Miyauchi A, Saitou J, Saga Y, Mizukami H, Taga N, Takeuchi M, Watanabe E, Ozawa K, Sato T, Kato M, Osaka H, Yamagata T and Muramatsu S : FMT-PET analysis in gene therapy for AADC deficiency., 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 18, 2016, Kobe.
13. Muramatsu S : Gene Therapy for AADC Deficiency – clinical study in Japan., 3rd International AADC 2-day Medical & Scientific Conference, May 14, 2016, London.
14. 山形崇倫, 小島華林, 宮内彰彦, 多賀直行, 小野さやか, 斎藤順一, 嵯峨泰, 水上浩明, 加藤光広, 中嶋剛, 小坂仁, 村松慎一: AADC 欠損症に対する遺伝子治療. 第 15 回日本再生医療学会総会 シンポジウム, 2016 年 3 月 18 日, 大阪.
15. 小島華林, 村松慎一, 宮内彰彦, 小野さやか, 多賀直行, 水上浩明, 小坂仁, 山形崇倫, 中嶋剛: 定位的脳手術を用いた AADC 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究-遺伝子工学と機能神経外科の融合-. 第 55 回日本定位・機能神経外科学会, 2016 年 1 月 23 日, 仙台.
16. Muramatsu S : Gene therapy for Neurodegenerative Diseases. The 21th

- Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 25, 2015, Osaka.
17. 村松慎一: 神経疾患の遺伝子治療. 第 57 回日本先天代謝異常学会総会, 2015 年 11 月 12 日, 大阪. (特別講演)
 18. 小野さやか, 藤本健一, 川合耕一郎, 齋藤順一, 佐藤俊彦, 村松慎一: パーキンソン病における軽度認知機能障害と線条体 AADC 機能解析. 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015 年 5 月 23 日, 新潟.
 19. 村松慎一: Parkinson 病の細胞移植-歴史. 第 56 回日本神経学会学術大会 教育講演, 2015 年 5 月 21 日, 新潟.
 20. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一: FMT-PET による Parkinson 病の病態解析. 第 54 回日本定位・機能神経外科学会, 2015 年 1 月 17 日, 東京.
 21. 村松慎一: AAV ベクターによる遺伝子治療. 第 54 回日本定位・機能神経外科学会, 2015 年 1 月 16 日, 東京.
 22. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Current status and challenges. The First Asian Symposium on AADC Deficiency, Dec 21, 2014, Taipei. (招待講演)
 23. 村松慎一: Parkinson 病の遺伝子治療. 第 32 回日本神経治療学会総会, 2014 年 11 月 22 日, 東京. (特別講演)
 24. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一: FMT-PET によるパーキンソン病のすくみ足の病態解析. 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス, 2014 年 10 月 4 日, 京都.
 25. 村松慎一: 遺伝子治療と細胞治療. 神経変性の制御をめざして, 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス, 2014 年 10 月 3 日, 京都.
 26. 村松慎一, 新田淳美: パーキンソン病の遺伝子治療. AAV ベクターを応用した神経・精神疾患の病態解明～基礎から臨床まで～, 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 10 月 1 日, 奈良.
 27. 飯田麻子, 滝野直美, 嶋崎久仁子, 伊藤美加, 村松慎一: 大型動物の広範な中枢神経領域に遺伝子導入可能なアデノ随伴ウイルスベクターの開発. 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 9 月 29 日, 奈良.
 28. 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease in Japan: Current status and problems. 第 55 回日本神経学会学術大会シンポジウム, 2014 年 5 月 22 日, 福岡.

〔図書〕(計 2 件)

1. 村松慎一: 神経疾患の遺伝子治療の現状と展望. 神経疾患最新の治療 2015-2017, 小林祥泰, 水澤英洋, 山口修平 編, 南江堂, 東京, 2015, pp4-6.
2. 村松慎一: Parkinson 病. 神経疾患と遺伝

子治療 今, 着実に実り始めた遺伝子治療 - 最新研究と今後の展開, 遺伝子医学 MOOK 30, 金田安史 編, メディカルドゥ, 大阪, 2016, pp248-251.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: グルコーストランスポーター1 発現用アデノ随伴ウイルスベクター

発明者: 小坂仁, 山形崇倫, 村松慎一

権利者: 学校法人自治医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2016 - 1697

出願年月日: 2016 年 1 月 7 日

国内外の別: 国内

名称: てんかん治療のためのアデノ随伴ウイルスベクター用アデノ随伴ウイルスベクター

発明者: 村松慎一, 小黒恵司, 嶋崎久仁子

権利者: 学校法人自治医科大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/1048

出願年月日: 2016 年 1 月 6 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

U-Tokyo Research

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/a-microRNA-mediated-gene-therapy-for-spinocerebellar-ataxia.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

自治医科大学・医学部・教授

村松 慎一 (MURAMATSU, Shin-ichi)

研究者番号: 10239543