

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430102

研究課題名(和文)超音波血液脳関門開放とAAVベクターを用いた成体マーモセットてんかんモデルの開発

研究課題名(英文) Development of rAAV-mediated brain transduction with transient ultrasound-mediated modulation of the blood-brain interface in adult common marmoset toward modeling epilepsy

研究代表者

岡田 浩典 (Okada, Hironori)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80416271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：超音波照射による血液脳関門開放技術とアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて成体の脳神経細胞に優性阻害変異体遺伝子を導入することで、成体のコモンマーモセットにてんかんの病態を誘導することを目指し、基礎的な検討を進めた。マイクロバブルのボラス投与直後に超音波照射することで、海馬などの一部の領域で直径10-50 $\mu$ mの血管に血液脳関門の開放が見られ、少なくとも照射後2日までに修復されていると考えられた。また、病態を誘導するため、ドラベ症候群の原因であるナトリウムイオンチャンネル遺伝子(SCN1AおよびSCN2A)の優性阻害変異体を発現するAAV9ベクターの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The common marmoset could provide an appropriate model for neuromuscular diseases because of its higher brain function and physiological resemblance to human. An adeno-associated virus (AAV) vector has great advantages to induce pathology in the aged animals. However, fully matured blood-brain barrier (BBB) significantly limits passive rAAV transport from circulation to the brain. We investigated microbubble(MB)-assisted transcranial ultrasound irradiation (TCUI) BBB opening technology in the adult marmoset. TCUI immediately after bolus injection of MB resulted in the BBB opening in blood vessels in some areas including the hippocampus, and it seemed to be repaired by at least 2 days after TCUI. In parallel, we constructed self-complementary AAV2 vector proviral plasmids expressing dominant negative mutants of sodium ion channel genes (SCN1A or SCN2A), which causes Dravet syndrome. The vector genomes could be packaged into the AAV9 capsid and purified by conventional method.

研究分野：実験動物

キーワード：AAVベクター てんかん マーモセット 超音波 血液脳関門 疾患モデル 成体

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターによる遺伝子導入やゲノム編集技術の発生工学への応用により、サル類においてもトランスジェニック動物、および遺伝子ノックアウト動物の founder 作出が報告されている。しかし、サル類におけるゲノム改変動物作出の難しさは、遺伝子の挿入や欠失がモザイクになっている founder から多数の子を産ませ、あるいは何世代もかけて絞り込みを行い、期待する表現型が出るのを祈るばかりの状況になることである。性成熟、妊娠の期間を考慮すると1世代が進むために3-5年かかり、これが数世代進んだ時点から、仮に高齢で発症する疾患の病態が出るのを待つとなると、さらに数十年待つ必要がある。また、サル類であるため近交係数が高くならないよう、大きめのコロニーとして維持する必要もある。これらを勘案すると、その間に施設や人員にかかるコストは莫大であり、発症時期や遺伝形式なども考慮したうえで極めて限定された疾患で試みざるをえない。

一方で、より多くの疾患においてもサル類の疾患モデルを利用するためのアプローチとして、すでに存在している正常の個体に対して、アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)を用いて遺伝子の機能阻害を行い、病態を誘導する方法がある。この場合、病態を誘導する成体のみを必要とし、また、高齢で発症する疾患でも高齢個体に対して病態を誘導することで、数十年待つ必要性を回避しうる。しかし、rAAVにより成体の脳全体へ病態を誘導するには、血液脳関門が障壁となる。

### 2. 研究の目的

血液脳関門は血液と脳・脊髄の組織液との間で物質交換を制限し、細菌やウイルスの侵入を防ぐ毛細血管内皮細胞による障壁である。薬剤やウイルスベクターの送達において血液脳関門は共通の課題である。その解決法として、高圧力ガスを封入した微細なバブルリポソームを血中投与し、超音波照射により毛細血管中でバブルを弾けさせ、その衝撃により瞬間的にタイトジャンクションを切断して血液脳関門にわずかな隙間を作る技術が開発されて来た。この血液脳関門開放技術とアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)を用いて成体の脳神経細胞に優性阻害変異体遺伝子を導入することで、コモンマーモセット脳に病態(てんかん)を誘導することを目的とする。

### 3. 研究の方法

血液脳関門開放技術とアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)を用いて成体の脳神経細胞に優性阻害変異体遺伝子を導入することで、コモンマーモセットにてんかんの病態を誘導することを目標とする。そのために、血液脳関門を開放したコモンマーモセット脳における rAAV による遺伝子導入様式の把

握、てんかんを誘導するための rAAV の構築(てんかんの原因遺伝子のマーモセットにおけるオーソログの同定)、てんかんの病態を誘導し得る rAAV の投与量の検討、の3項目について検討する。

### 4. 研究成果

#### マーモセット脳における血液脳関門開放

##### 1. 免疫組織化学的解析

マーモセット脳における血液脳関門開放の詳細について、免疫組織化学による解析を進めた。その結果、少なくとも海馬において、主に 10-50  $\mu\text{m}$  の血管で開放が起こることが確認された。

##### 2. PET を用いた Live imaging

アルブミンに結合するプローブである炭素 11 で標識した  $\beta$ -アミノイソ酪酸(11C-AIB)を用いて超音波照射前および直後を PET 撮像した。超音波は左頭頂部より脳の中心方向に向けて照射した。その結果、前部帯状回、基底核、扁桃核、上側頭回、海馬付近にアルブミンの漏れが認められた。

##### 3. rAAV の分布

超音波照射時に、マイクロバブルおよび [11C]AIB に加えて、EGFP の cDNA 配列を AAV ベクターゲノムに含む rAAV1(rAAV1-EGFP)を尾静脈よりボラス投与し、その 48 時間後、同様に DsRed2 の cDNA 配列を持つ rAAV1(rAAV1-DsRed2)を静脈内投与し、照射から 1 週間後の脳組織中の EGFP または DsRed2 をコードする rAAV1 の分布を調べたところ、超音波照射の直後に投与した rAAV1-EGFP が照射した側の海馬に強く導入されたが、照射後 48 時間に投与した rAAV1-DsRed2 については他の領域と差異が認められなかった。

#### てんかんの誘導 rAAV の調製

てんかんの病態を誘導するために、乳児重症ミオクロニーてんかん(ドラベ症候群)の原因として、ナトリウムチャンネル遺伝子の優性阻害変異体(hSCN1A R222X または hSCN2A R102X)を候補として選定した。同遺伝子を CAG プロモーター下に発現する Self-complementary AAV ベクターを rAAV を作製した。

### 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3件)

1. Taro Tomono, Yukihiko Hirai, Hironori Okada, Kumi Adachi, Akiko Ishii, Takashi Shimada, Masafumi Onodera, Akira Tamaoka, and Takashi Okada, Ultracentrifugation-free

- chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1), *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 査読有, 3巻, 2016, 15058, DOI: 10.1038/mtm.2015.58
2. Hiromi Hayashita-Kinoh, Naoko Yugeta, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Takashi Okada and Shin'ichi Takeda, Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance, *Molecular Therapy*, 査読有, 23巻, 2015, 627-37, DOI: 10.1038/mt.2015.5
  3. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Akiyo Nishiyama, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada, Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10, *Human Molecular Genetics*, 査読有, 23巻, 2014, 3990-4000, DOI: 10.1093/hmg/ddu113
- [学会発表](計24件)
1. Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Chiaki Masuda, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Yuko Endo-Takahashi, Koichi Kato, Yoichi Negishi, Shin'ichi Takeda, Takashi Okada, Transient Ultrasound-Mediated Microbubble-Assisted Modulation of Blood-Brain Interface in Adult Common Marmoset to Improve rAAV-Mediated Brain Transduction, The American Society of Gene & Cell Therapy 19th Annual meeting, 2016, Washington DC, USA
  2. Hiromi Hayashita-Kinoh, Hironori Okada, Yuko N. Kasahara, Tomoko Chiyo, Kiwamu Imagawa, Katsuhiko Tachibana, Shin'ichi Takeda, Takashi Okada, Improved Transduction of Canine X-Linked Muscular Dystrophy with rAAV9-Microdystrophin by Introducing Immune Tolerance, The American Society of Gene & Cell Therapy 19th Annual meeting, 2016, Washington DC, USA
  3. Taro Tomono, Yukihiko Hirai, Hironori Okada, Kumi Adachi, Akiko Ishii, Takashi Shimada, Masafumi Onodera, Akira Tamaoka, Takashi Okada, Ultracentrifugation-Free Chromatography-Mediated Large-Scale Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 1 (rAAV1) and rAAV9 from the Serum-Free Culture Supernatant, The American Society of Gene & Cell Therapy 19th Annual meeting, 2016, Washington DC, USA
  4. Okada H., Tomono T., Adachi K., Hirai Y., Okada T., Feasibility of large-scale rAAV production from suspension HEK293 cell line using flow electroporation system, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016, 東京
  5. Nitahara-Kasahara Y., Kuraoka M., Hayashita-Kinoh H., Nakamura-Takahashi A., Masuda C., Imagawa K., Tachibana K., Takeda S., Okada T., Cell therapeutic approach using dental pulp stromal cells for Duchenne muscular dystrophy, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016, 東京
  6. Hayashita-Kinoh H., Nitahara-Kasahara Y., Kuraoka M., Okada H., Imagawa K., Tachibana K., Takeda S., Okada T., Systemic administration of rAAV9-microdystrophin with MSCs pre-treatment improves transgene expression and phenotype in CXMD<sub>J</sub>, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016, 東京
  7. Tomono T., Hirai Y., Okada H., Adachi K., Sakamoto S., Kawano Y., Chono H., Mineno J., Ishii A., Shimada T., Onodera M., Tamaoka A., Okada T., Simple and effective ultracentrifugation-free large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 9 (rAAV9), The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016, 東京
  8. Ishii A., Okada H., Hayashita-Kinoh H., Shin J. H., Okada T., Takeda S. Effective microdystrophin expression in non-human primate muscle with AAV type 8 vectors under immune

- suppression, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016, 東京
9. Tomono T, Hirai Y, Okada H, Chiyo T, Shimada T, Onodera M, Okada T, Efficient Scalable Purification of rAAV1 Using Ion-Exchange and Gel-Filtration Chromatography To Avoid Ultracentrifugation Procedure, 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, 2015, New Orleans, LA, USA
  10. Okada H, Ishibashi H, Masuda C, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Endo-Takahashi Y, Kato K, Negishi Y, Takeda S, Okada T, Blood-Brain Interface Opening By Ultrasound in Adult Common Marmoset To Induce Brain Pathology With rAAV, 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, 2015, New Orleans, LA, USA
  11. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T, Improved Transduction of Canine X-Linked Muscular Dystrophy With rAAV9-Microdystrophin By Using MSCs Pretreatment, 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, 2015, New Orleans, LA, USA
  12. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Kuraoka M, Chiyo T, Okada H, Tsumita N, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T, Mesenchymal Stromal Cells Can Ameliorate the Progressive Phenotype of Dog With Duchenne Muscular Dystrophy, 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, 2015, New Orleans, LA, USA
  13. Okada H, Ishibashi H, Masuda C, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Endo-Takahashi Y, Kato K, Negishi Y, Takeda S, Okada T, Ultrasound-mediated transient modulation of blood-brain interface in adult common marmoset to induce brain pathology with rAAV, The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2015, 大阪
  14. Kasahara Y, Kinoh H, Kuraoka M, Chiyo T, Okada H, Tsumita N, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T, Mesenchymal stromal cells ameliorate progressive phenotype of Duchenne muscular dystrophy in dog, The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2015, 大阪
  15. Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin J, Okada T, Takeda S, Feasible gene transduction in non-human primate muscle with recombinant AAV following immunomodulation, The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2015, 大阪
  16. Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Okada H, Chiyo T, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T, Improved transduction of canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9- microdystrophin by MSCs pretreatment Improved transduction of canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9- microdystrophin by MSCs pretreatment, The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2015, 大阪
  17. Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Chiyo T, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T, The large-scale purification of rAAV1 from the serum-free cultured medium by ion-exchange and gel-filtration chromatography-steps with ultracentrifugation-free technique, The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2015, 大阪
  18. Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Masuda C, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Okada T, Induction of Local OPMD Histopathology in Common Marmoset By rAAV1 and 8-Mediated Transduction, American society of gene & cell therapy 17th Annual meeting, 2014, Washington DC, USA
  19. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Okada H, Takeda S, Okada T, Skeletal Muscle Engraftment of Mesenchymal Stromal Cells Is Augmented By IL-10, American society of gene & cell therapy 17th Annual meeting, 2014, Washington DC, USA
  20. Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Okada H, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S, Immune Tolerance Induction in Canine X-Linked Muscular

Dystrophy With rAAV9-Microdystrophin Transduction, American society of gene & cell therapy 17th Annual meeting, 2014, Washington DC, USA

21. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Tsumita N, Chiyo T, Okada H, Takeda S, Okada T, Engraftment of mesenchymal stromal cells is effectively associated by IL-10 in skeletal muscle, 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2014, 東京
22. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S, Immune tolerance induction of canine X-linked muscular dystrophy with fetal rAAV-microdystrophin transduction, 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2014, 東京
23. Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Okada T, rAAV1 and 8-mediated induction of local OPMD histopathology in common marmoset, 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2014, 東京
24. 笠原優子, 喜納裕美, 千代智子, 岡田浩典, 武田伸一, 岡田尚巳, IL-10 強制発現による機能強化型 MSCs の作製と生存解析, 第 35 回日本炎症・再生医学会, 2014, 沖縄

〔図書〕(計 2 件)

1. 岡田 浩典, 伴野 太郎, 岡田 尚巳, 医薬ジャーナル社, 血液フロンティア: ゲノム編集技術を用いる遺伝子治療, 2015, 666-678
2. 伴野 太郎, 岡田 浩典, 岡田 尚巳, Pharma Medica: 遺伝子導入用ウイルスベクターの特徴と作成法, 2015, 15-22

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 浩典 (OKADA, Hironori)  
日本医科大学・大学院医学研究科 研究員  
研究者番号: 80416271

(2)連携研究者

岡田 尚巳 (OKADA, Takashi)  
日本医科大学・大学院医学研究科  
研究者番号: 00326828 大学院教授

(3)研究協力者

武田 伸一 (TAKEDA, Shinichi)  
国立精神・神経医療研究センター・  
神経研究所 所長  
研究者番号: 90171644

喜納 裕美 (KINOH, Hiromi)  
日本医科大学・医学部 助教  
研究者番号: 60532728

笠原 優子 (KASAHARA, Yuko)  
日本医科大学・大学院医学研究科 助教  
研究者番号: 90391911