

令和元年6月14日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09604

研究課題名(和文) 脳神経病変を標的とした成体リソゾーム病の新規遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development a novel gene therapy for Lysosomal disease with neurological disorders

研究代表者

三宅 紀子 (MIYAKE, NORIKO)

日本医科大学・医学部・テクニカルスタッフ

研究者番号：00421206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経症状を伴うリソゾーム病では、血液脳関門(BBB)の存在が大きな障害となり有効な治療法がない。本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う、異染性白質ジストロフィー(MLD)を対象として、既にBBBが構築されている成体MLDモデルマウスの脳神経組織に対する長期の酵素補充療法を開発した。MLDの治療蛋白であるASAを発現する self-complementary AAV 9型(scAAV9/ASA)を静脈投与し治療効果を検討した結果、BBBを通過し脳全体の遺伝子導入に成功、蓄積物質であるスルファチドの減少、行動実験においても有意に改善を認め神経症状を抑えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う、異染性白質ジストロフィーをモデルとし、非侵襲的かつ安全で脳神経組織に長期の酵素補充療法が出来る治療法の開発を行った。self-complementary AAV 9型を用いることで、脳組織の治療が可能になり、リソゾーム病のみならず、ALS、アルツハイマー病などの様々な脳神経病変を伴う疾患に応用が可能になると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a lysosomal storage disease caused by the deficiency of arylsulfatase A (ASA) and characterized by neurological symptoms. To treat adult MLD mice, we generated self-complementary type 9 AAV vector expressing ASA (scAAV9/ASA), which could cross the BBB, and examined the feasibility of scAAV9/ASA mediated gene therapy for MLD. After scAAV9/ASA injection, immunohistochemical analysis showed efficient ASA expression was detected in systemic organs and brain. Alcian blue staining and quantitative analysis of sulfatide showed decrease of the amount of stored sulfatide in scAAV9/ASA treated MLD mouse. In the behavior test, scAAV9/ASA treated mice showed a significant improvement in their ability to traverse narrow balance beams as compared to non-treated MLD mice. These data indicate that IV injection of scAAV9/ASA is effective for suppression of sulfatide storage in brain and this therapeutic approach may be useful for gene therapy of adult MLD patients.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 異染性白質ジストロフィー アデノ随伴ウイルス リソゾーム病 脳神経病変

## 1. 研究開始当初の背景

リソゾーム酵素欠損症(以下リソゾーム病)は、リソゾーム内の加水分解酵素が遺伝的に欠損しているため糖脂質が蓄積する先天性代謝異常症である。1型(非神経型)ゴーシェ病やファブリー病など神経症状を伴わないリソゾーム病に対しては精製した欠損酵素を定期的に静脈注射する酵素補充療法の有効性が確認されている。しかし、アリルスルファターゼ A(arylsulfatase A:ASA)の欠損症である異染色性白質ジストロフィー (metachromatic leukodystrophy:MLD)のような神経変性を伴う疾患に対しては、血液脳関門 (blood brain barrier:BBB)の存在が大きな障害となり、有効な治療戦略が立てられていない。よって神経変性疾患を治療するためには BBB の壁を越える新しいアプローチが必要である。

我々は現在までに中枢神経症状を伴う MLD モデルマウスを対象に中枢神経症状を治療する方法として治療用蛋白を発現する Adeno-associated-virus (AAV)ベクターの脳内直接注入(Kurai et al., Mol.Ther.2006)、髄腔内投与 (Iwamoto et al., J.Gene Med. 2009)を試みてきたが、直接注入法で脳全体を治療するためには広い領域に頻回のベクター注入が必要であり、技術的にも倫理的にも臨床応用の可能性は低く、髄腔内投与では治療に十分な遺伝子導入効率を得るのは困難であった。近年我々は AAV ベクターを新生児期に投与することにより脳神経組織に広範囲に遺伝子導入が可能であることを報告(Miyake et al., Brain Res.2011)しており、この研究成果を踏まえ、中枢神経症状を伴う新生児期 MLD モデルマウスの治療法の確立(Miyake et al., Gene Ther.2013)に成功した。しかしながら、成体マウスでの治療には BBB が大きな障害となり未だ治療法が確立していない。近年、人への臨床応用において欠損酵素を発現する骨髄細胞を移植する骨髄幹細胞遺伝子治療(Biffi et al., Science. 2013)も報告されているが、これは未発症の患者への治療であるため、神経症状の抑制、改善が明らかでない。本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う MLD を対象モデルとして、非侵襲的かつ安全な、脳神経組織に対する新しい治療法の開発を目的とする。

## 2. 研究の目的

リソゾーム病では、一般的に酵素補充療法の有効性が期待できるが神経変性を伴う疾患に対しては BBB の存在が大きな障害となり、有効な治療戦略が立てられていない。本研究では脳全体の広範な神経変性を伴う MLD を対象モデルとして、臨床応用を目的とし、非侵襲的かつ安全で、脳神経組織に対する長期の酵素補充療法が出来る革新的な治療法の開発を目的とする。具体的には、BBB を効率よく通過すると言われている self-complementary AAV (scAAV)に治療用蛋白を組み込み、成体 MLD モデルマウスに静脈投与することにより神経症状の改善を確立する。

## 3. 研究の方法

成体ではすでに BBB が形成されているために、既存のベクターの全身投与では神経症状を改善させる事は困難と考えられるので以下のような改良を行う。

- (1) 治療用 AAV ベクターの改良: BBB を通過可能な血清型の検索、scAAV ベクターの使用。脳神経組織に高率に遺伝子導入が可能と言われている血清 1,8,9 型の scAAV ベクターを用いて中枢神経組織に一番遺伝子導入可能なタイプを決定する。
- (2) 成体マウス治療法の確立: 強力に発現できるプロモーターを用いて、治療用蛋白である ASA 発現 AAV ベクターを作製し、成体 MLD モデルマウスに静脈投与を行い、治療効果判定を行う。

治療効果判定として以下の項目を検討する。

抗体染色による神経細胞での ASA の発現

Alcian Blue 染色によるスルファチドの蓄積の確認

Thin-layer chromatography assay によるスルファチドの定量

Balance Beam テストによる行動実験

## 4 . 研究成果

### (1) 治療用 AAV ベクターの改良

血清 1,8,9 型の GFP 発現 single-strand AAV (ssAAV) および scAAV ベクターを作製し、成体 (8w-10w) マウスに尾静脈より投与し、4 週間後にどの血清型が脳内での発現が高いか調べた結果、9 型の scAAV が一番導入効率が高いことが判明した。よって 9 型の scAAV ベクターに、治療用蛋白である ASA を導入し、ASA 発現ベクターを作製した。また長期に、強力に発現させるため CAG プロモーターを搭載した。

### (2) 成体マウス治療法の確立 : ASA 発現治療用 scAAV ベクター (9 型) を成体 (8-10w) の MLD モデルマウスに $2 \times 10^{12}$ vector genome を尾静脈より投与し、15 ヶ月後に以下の解析を行った。

#### 1) 脳神経組織への導入効率、ASA 発現効率の ASA 抗体による免疫染色解析

静脈投与後 15 ヶ月においても、脳内の広範囲 (嗅球、大脳皮質、海馬、視床、脳幹) に、ASA が発現していることを確認した。

#### 2) 蓄積物質であるスルファチドの染色、定量

スルファチドを Alcian Blue 染色により確認をした結果、未治療群に比べ蓄積が抑えられていることを確認した。また、thin-layer chromatography assay にてスルファチドの定量を行った結果、治療群において有意にスルファチドの蓄積抑制が確認された ( $0.44 \pm 0.09$  vs.  $0.92 \pm 0.16$ ,  $p < 0.001$ )。

#### 3) Balance beam test による行動実験

行動実験において、治療群が未治療群に比べ有意に改善を認めた (Latency:  $8.1 \pm 1.1$  vs.  $13.9 \pm 2.4$  sec,  $p < 0.05$ ; Slips:  $1.9 \pm 0.6$  vs.  $6.2 \pm 0.1.3$  times,  $p < 0.05$ )。

以上の結果より成体 MLD マウスに ASA 発現 9 型 scAAV ベクターを投与することで、広範囲の脳へ遺伝子導入することが可能であり、治療効果があることを確認した。

このことより、MLD のみならず神経症状を呈する Krabbe 等の遺伝病の治療に有効であると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Sakai A, Saitow F, Maruyama M, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Okada T, Suzuki H. (2017) MicroRNA cluster miR-17-92 regulates multiple functionally related voltage-gated potassium channels in chronic neuropathic pain. Nat Commun. 5; 8:16079. doi: 10.1038/ncomms16079.
2. Omori I, Yamaguchi H, Miyake K, Miyake N, Kitano T, Inokuchi K. (2017) D816V mutation in the KIT gene activation loop has greater cell-proliferative and anti-apoptotic ability than N822K mutation in core-binding factor acute myeloid leukemia. Exp Hematol. 52:56-64.e4. doi: 10.1016/j.exphem.2017.05.003.
3. Takahashi K, Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Yaguchi C, Iijima O, Yamazaki Y, Katakai Y, Miyake N, Kameya S, Shimada T, Takahashi H, Okada T. (2017) Improved Intravitreal AAV-Mediated Inner Retinal Gene Transduction after Surgical Internal Limiting Membrane Peeling

in Cynomolgus Monkeys. *Mol Ther.* 25(1):296-302. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.10.008.

4. Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Kameya S, Fujimoto C, Nakamoto K, Takahashi H, Igarashi T, Miyake N, Iijima O, Hirai Y, Shimada T, Okada T, Takahashi H. (2016) Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation. *Mol Vis.* 16; 22:816-826.
5. Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Iijima O, Miyake N, Adachi K, Nitahara-Kasahara Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán JL, Shimada T, Okada T. (2016) Treatment of hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatase via self-complementary AAV8 vector. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 3; 3:15059. doi: 10.1038/mtm.2015.59.
6. Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Miyake N, Igarashi T, Kanokoda C, Nakamura-Takahashi A, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán JL, Okada T, Shimada T. (2015) Prevention of Lethal Murine Hypophosphatasia by Neonatal Ex Vivo Gene Therapy Using Lentivirally Transduced Bone Marrow Cells. *Hum Gene Ther.* 26(12):801-812. doi: 10.1089/hum.2015.078.
7. Hironaka K, Yamazaki Y, Hirai Y, Yamamoto M, Miyake N, Miyake K, Okada T, Morita A, Shimada T. (2015) Enzyme replacement in the CSF to treat metachromatic leukodystrophy in mouse model using single intracerebroventricular injection of self-complementary AAV1 vector. *Sci Rep.* 18; 5:13104. doi: 10.1038/srep13104.

〔学会発表〕(計 19件)

(国内学会)

1. Noriko Miyake, Koichi Miyake, Motoko Yamamoto, Takashi Shimada, Takashi Okada: Direct comparison between single-stranded and self-complementary type 9 AAV vector to treat adult MLD model mice by intravenous injection. The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (東京), 2018年7月26-28日
2. Tsutomu Igarashi<sup>1</sup>, Kazuhisa Takahashi, Koichi Miyake, Maika Kobayashi, Chiemi Yaguchi, Noriko Miyake, Shuhei Kameya, Hiroshi Takahashi, Takashi Okada: Intravitreal injection of AAV vector in cynomolgus monkeys affects neutralizing antibody titer against AAV in the serum  
The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (東京), 2018年7月26-28日
3. Kazuki Terada, Hiroki Yamaguchi, Koichi Miyake, Noriko Miyake, Yoshiki Osaki, Takashi Okada, Seiji Kojima, Etsuro Ito, Koiti InTouch: Importance of functional analysis of TERT gene mutations in the diagnosis of dyskeratosis congenital. 第79回日本血液学会 (東京) 2017年10月20-22日
4. 高橋和久, 五十嵐勉, 三宅弘一, 小林舞香, 矢口智恵美, 飯島修, 山崎吉之, 三宅紀子, 亀谷修平, 島田隆, 高橋浩, 岡田尚巳: サルに対する内境界膜剝離併用硝子体手術による遺伝子導入法の開発. 第28回日本緑内障学会 (広島) 2017年9月29日-10月1日
5. Noriko Miyake, Koichi Miyake, Motoko Yamamoto, Takashi Shimada, Takashi Okada: Why are scAAV9 vectors able to transduce the CNS but not ssAAV9? ; The difference between the ssAAV9 and scAAV9 vector in transduction of CNS by intravenous injection. The 23th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (岡山), 2017年7月20-22日
6. Kazuhisa Takahashi, Tsutomu Igarashi, Koichi Miyake, Maika Kobayashi, Chiemi Yaguchi, Osamu Iijima, Yoshiyuki Yamazaki, Noriko Miyake, Shuhei Kameya, Takashi Shimada, Hiroshi Takahashi, Takashi Okada: Transduction at anterior chamber is not affected by vitrectomy before AAV vector injection into vitreous. The 23th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (岡山),

2017年7月20-22日

7. 廣中浩平, 山崎吉之, 平井幸彦, 山本基子, 三宅紀子, 三宅弘一, 島田隆, 岡田尚巳, 喜多村孝幸, 森田明夫: アデノ随伴ウイルスベクターの脳室内注入による異染性白質ジストロフィーモデルマウスの脳脊髄液中への酵素補充療法 (Enzyme replacement in the CSF to treat metachromatic leukodystrophy in mouse model using single intracerebroventricular injection of adeno-associated virus vector.) 第75回脳神経外科学会学術総会 (福岡) 2016年9月29-10月1日
8. Noriko Miyake, Koichi Miyake, Motoko Yamamoto, Takashi Shimada, Takashi Okada: ssAAV vectors are able to pass through the BBB as same as dsAAV. The 22th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (東京), 2016年7月28-30日
9. 坂井敦, 三宅紀子, 丸山基世, 三宅弘一, 島田隆, 岡田尚巳, 鈴木秀典: miR-17-92 クラスターによる神経障害性疼痛及び軸索伸長の調節(miR-17-92 cluster modulates neuropathic pain and neurite outgrowth) 第89回日本薬理学会年会(横浜), 2016年3月9-11日
10. 坂井敦, 三宅紀子, 丸山基世, 三宅弘一, 島田隆, 岡田尚巳, 鈴木秀典: 神経傷害に伴う疼痛及び軸索伸長における miR-17-92 クラスターの機能解析(Functional analysis of miR-17-92 cluster in chronic pain and neurite outgrowth following nerve injury) BMB2015 第38日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会 合同大会 (神戸), 2015年12月1-4日
11. 廣中浩平, 山崎吉之, 平井幸彦, 山本基子, 三宅紀子, 三宅弘一, 森田明夫, 島田隆, 岡田尚巳: アデノ随伴ウイルスベクターの脳室内注入による異染性白色ジストロフィーモデルマウスの遺伝子治療 第20回日本ライソゾーム病研究 (東京), 2015年10月2-3日
12. 三宅紀子, 三宅弘一, 山本基子, 島田隆, 岡田尚巳: 異染性白質ジストロフィー(MLD)の遺伝子治療基盤研究 第20回日本ライソゾーム病研究会 (東京), 2015年10月2-3日
13. Noriko Miyake, Koichi Miyake, Motoko Yamamoto, Takashi Shimada, Takashi Okada: Successful treatment of neonatal metachromatic leukodystrophy model mice by intravenous injection of self-complementary AAV type 9 vector expressing ASA. The 21th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (大阪), 2015年7月24-26日
14. Aki Nakamura, Koichi Miyake, Atsushi Watanabe, Yukihiko Hirai, Noriko Miyake, Osamu Iijima, Kumi Adachi, Hideaki Kinoshita, Taku Noguchi, Shinichi Abe, Takashi Shimada, Takashi Okada: Gene therapy to rescue lethal hypophosphatasia model mice by adeno-associated virus-mediated muscle transduction of bone-targeted alkaline phosphatase. The 21th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (大阪), 2015年7月24-26日
15. 坂井敦, 三宅紀子, 三宅弘一, 島田隆, 鈴木秀典: 神経障害性疼痛及び軸索伸長に対する miR-17-92 クラスターの関与(Involvement of miR-17-92 cluster in the neuropathic pain and axonal growth.) 第88回日本薬理学会年会 (名古屋), 2015年3月

#### (国際学会)

1. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Shimada T, Okada T: Why are scAAV9 vectors able to pass through the BBB but not ssAAV9?; The difference between the ssAAV9 and scAAV9 vector in transduction of CNS by intravenous injection. 20th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (Washington DC) 2017 May 10-13
2. Kobayashi M, Igarashi T, Miyake K, Miyake N, Nakamoto K, Hirai Y, Takahashi H, Okada T: Tyrosine-mutated AAV2 (Y730, 500, 444F) mediated BDNF rescued inner retina in rat retinal

- ischemic injury model. The European Society of Gene and Cell Therapy (Florence) 2016 Oct 18-21
3. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Shimada T, Okada T: Successful treatment of neonatal metachromatic leukodystrophy model mice by low dose of self-complementary AAV type 9 vector expressing ASA. 19th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (Washington DC) 2016 May 4-7
  4. Nakamura A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Miyake N, Iijima O, Adachi K, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Shimada T, Okada T: Prolonged survival and improved phenotypes of lethal hypophosphatasia model mice by adeno-associated virus-mediated muscle transduction of bone-targeted alkaline phosphatase. 18th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (New Orleans) 2015 May13-16

〔図書〕(計 2件)

1. Miyake K, Miyake N, Shimada T : Gene Delivery into the Central Nervous System (CNS) Using AAV Vectors. (Edited by Doaa Hashad, Published by InTech) p105-117, 2015. DOI: 10.5772/59824
2. Miyake K, Miyake N, Shimada T : Neonatal Gene Therapy for Inherited Disorders. Selected Topics in Neonatal Care. (Edited by R. Mauricio Barria, Published by InTech) p191-199, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.69218

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三宅 弘一

ローマ字氏名：MIYAKE KOICHI

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90267211

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。