

令和元年6月3日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14929

研究課題名(和文) 超効率血管脳移行AAVベクターによるマーモセットでのin vivoノックアウト

研究課題名(英文) Development of the in vivo knockout system in the marmoset brain using AAV-PHP.B

研究代表者

松崎 泰教 (Matsuzaki, Yasunori)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50738200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：予備実験ではAAV-PHP.Bを静脈注射することでアダルトマーモセットのBBBを超効率で突破し、全脳的な遺伝子発現誘導の可能性を示唆していたが、本実験ではそうではないことが判明した。さらにAAV-PHP.BはラットBBBも効率的に通れず、近交系マウスにおいても系統差があることを明らかにした。そこでAAV9からAAV-PHP.Bを作製したCREATE法を用いてマーモセットBBBを突破する新たなAAVベクターの開発を試みたが、現在までに得られなかった。本研究によりAAV-PHP.Bの新たな特性が明らかになったが、マーモセットへのin vivo KOは行うことが出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マーモセットへのin vivo knock-outまでは出来なかったが、AAV-PHP.BがマーモセットやラットではBBBを超効率的に透過できず、マウス系統においても限られた系統でのみ可能であることを明らかにすることが出来た。AAV-PHP.Bに限られた動物種でしか期待される効果が得られないという情報は研究者の実験の効率化に繋がるとともに、使用動物数の削減に繋がるとともに、その成果の意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was the generation of a gene knock-out marmoset in vivo using CRISPR-Cas9 system and AAV-PHP.B which is the blood-brain barrier (BBB) high-permeable AAV vector. My preliminary experiment indicated that AAV-PHP.B drastically permeate the BBB of marmoset. However, I concluded that the permeability of AAV-PHP.B across marmoset BBB was as same as AAV9. Furthermore, I found that AAV-PHP.B cannot permeate efficiently the BBB of outbred rat and some inbred strains of mouse. I examined to obtained a new AAV vector which can significantly cross the BBB of marmoset using the CREATE method, but I had not ever discovered it. I found a new characteristics of AAV-PHP.B, whereas I could not perform the in vivo knock-out experiment targeting a gene of marmoset brain.

研究分野：神経科学

キーワード：アデノ随伴ウイルスベクター AAV マーモセット CRISPR-Cas9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の ZFN、TALEN, Platinum TALEN, CRISPR/Cas9 に代表されるゲノム編集技術の急速な進展には目を見張るものがある。同様に目覚ましい進歩を遂げるウイルスベクター技術と組み合わせたり、ゲノム編集は初代培養細胞からげっ歯類へと応用されはじめている。遺伝子改変マウスを作成することで、生命科学は大きな発展を遂げて来たが、マウスの脳はヒトと大きく異なる点も多い。例えばヒトで精神障害を引き起こすと考えられる領域、前頭前皮質をマウスは持っておらず、精神疾患や高次脳機能障害などの研究では非ヒト霊長類の遺伝子改変の重要性はきわめて高いと考えられる。

このように非ヒト霊長類の遺伝子改変は多くの研究者の興味を集めるインパクトの高い研究ではあるが、これまで発表された成果は今までのところ過剰発現 (トランスジェニック ; Tg) に留まる (Yang et al. Nature 2008, Sasaki et al. Nature 2009, Qi et al. Nature 2016)。ゲノム編集技術の急速な進歩に、非ヒト霊長類遺伝子改変が追いついていけないことが一因と考えられる。マカクザルの場合、成体になるまで 4 年、マーモセットでも 1 年半かかり、さらに子どもが生まれるまで半年程度かかるため、統計的解析に必要な数を得るまでにかかなりの年月を要する。加えて複数のラインを飼育し、その中から優れたラインをスクリーニングする必要もある。このように遺伝子改変非ヒト霊長類の開発には莫大な時間、費用と飼育スペースが不可欠であるため、研究を加速させる何らかのブレークスルーが待ち望まれている。応募者は 2010 年からマーモセットを飼育し、レンチウイルスベクターを用いて受精卵に遺伝子導入することで、2012 年に異常伸張ポリグルタミン鎖をもつ Ataxin-1 を発現する脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) モデルマーモセットを 3 ライン得た。2 ラインは生後 1 週間以内に死亡し、残る 1 ラインも発現量が低いためか 4 年経った現在も症状は出ていない。そこで AAV ベクターを用い成熟マーモセットに遺伝子導入してモデルを作成する研究を開始した。まず神経細胞特異的発現を可能にするプロモーターを開発し (Matsuzaki et al. J Neurosci Meth. 2014)、そのプロモーター制御下で変異 Ataxin-1 を発現する AAV ベクターをマウス小脳に投与することで、進行性の運動失調を示す SCA1 モデルマウスの作成に成功した (Huda et al. Mol Ther. 2014)。この方法をマーモセットに応用するために、AAV ベクターの投与方法を検討し、改良ステレオ装置固定下でのマーモセット小脳実質投与方法、大槽投与方法を確立した (Matsuzaki et al. Mol Neurobiol. 2016)。

以上の準備を経て、SCA1 モデルマウス作成に使用した変異 Ataxin-1 を発現する AAV ベクターをマーモセットの小脳に投与したところ、進行性の運動失調を示すマーモセットが得られた (Konno, Matsuzaki et al. 論文投稿中)。しかしマーモセット小脳へ直接 AAV ベクターを投与する方法は、技術が必要であり、麻酔下で筋肉をかき分け、頭蓋骨に穴を開けて投与するためマーモセットへの負担も大きい。またベクターを投与したニードル周囲の遺伝子発現量が高く、遠ざかるに従って発現量が低くなる。さらにマーモセットの頭蓋骨の個体差により、ベクター投与部位がずれると遺伝子発現範囲も変化し、結果として個体間で遺伝子発現パターンと症状の強さがかなりばらつくことも分かっている。また、両側大脳皮質や基底核などへの広範かつ一様な発現もベクターの直接投与では困難である。

これらの問題を解決するため、応募者はごく最近報告された超効率血管脳移行 AAV ベクター (AAV-PHP.B) を利用することにした (Deverman, Nat Biotechnol. 2016)。すなわち、マーモセットの静脈内へ超効率血管脳移行ベクターを投与し、静脈経由で遺伝子を広く脳組織へ効率的に到達させた上で、発現部位を細胞種特異的プロモーターを使用して制限することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

近年 RNA 干渉によるノックダウンや CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト/ノックインなどの遺伝子改変技術は驚異的な発展を遂げている。これらの技術と Cre-loxP、Tet-ON/OFF システムや細胞種特異的プロモーターが組み合わせられて多くの遺伝子改変動物が作られ、様々な掛け合わせが行われている。このような研究手法は極めてパワフルではあるが、使用する時間、飼育スペース、費用は莫大である。マーモセットのような非ヒト霊長類を用いる場合はなおさらであり、効率的に研究を進める何らかのブレークスルーが強く待ち望まれている。本研究ではこの問題解決のため、申請者らが独自に開発した細胞種特異的プロモーターを搭載した超効率血管脳移行 AAV ベクターを用いて、受精卵からではなく、成熟マーモセットを用いた遺伝子改変に挑戦する。

3. 研究の方法

超効率血管脳移行 AAV ベクターのマーモセットの静脈投与により以下の 4 点を解析する。

小脳や大脳皮質、海馬、基底核など様々な領域で、どの細胞にどの程度の効率で遺伝子発現が誘導されるのか、免疫染色を行い網羅的に調べる。

細胞種特異的プロモーターと組み合わせ、中枢神経系全域で広く特異性が保たれているのかを検証する。

細胞種特異的プロモーターと CRISPR/Cas9 システムを組み合わせ、ニューロン特異的な mGluR1 のノックアウトを試みる。さらに mGluR1 ノックアウトマーモセットのプルキンエ細胞特異的に mGluR1 をレスキューすることで、運動失調が回復するのか検証する。

4. 研究成果

予備実験では、constitutive プロモーターである CBh プロモーターによって EGFP 遺伝子をドライブする AAV-PHP.B を少量、静脈注射（静注）することによってマーマセット脳内への遺伝子導入が観察できた。そのため、本実験として 1.6 歳のリッターメイトの雌個体と 7.2 歳の雄個体へ AAV-PHP.B とコントロールとして AAV9 をそれぞれ計 4 頭へ静注した。力価はマウスにおいて十分に脳内で強発現する 5.0×10^{13} vg/kg（体重）とした。この結果、AAV-PHP.B のマーマセット BBB 突破効率は AAV9 とほぼ変わらないことが分かった（図、Matsuzaki et al. *Neurosci Lett.* 2018）。脳内での GFP 細胞発現を調べると、神経細胞での発現率は 2% 未満であった。原著論文によるとマウスの場合、神経細胞への導入効率はほとんどの脳部位で 70% 以上であるため、大きな差がある。この結果より、マーマセット BBB を超効率的に突破可能な新規 AAV ベクターを開発することへと目的を変更した。

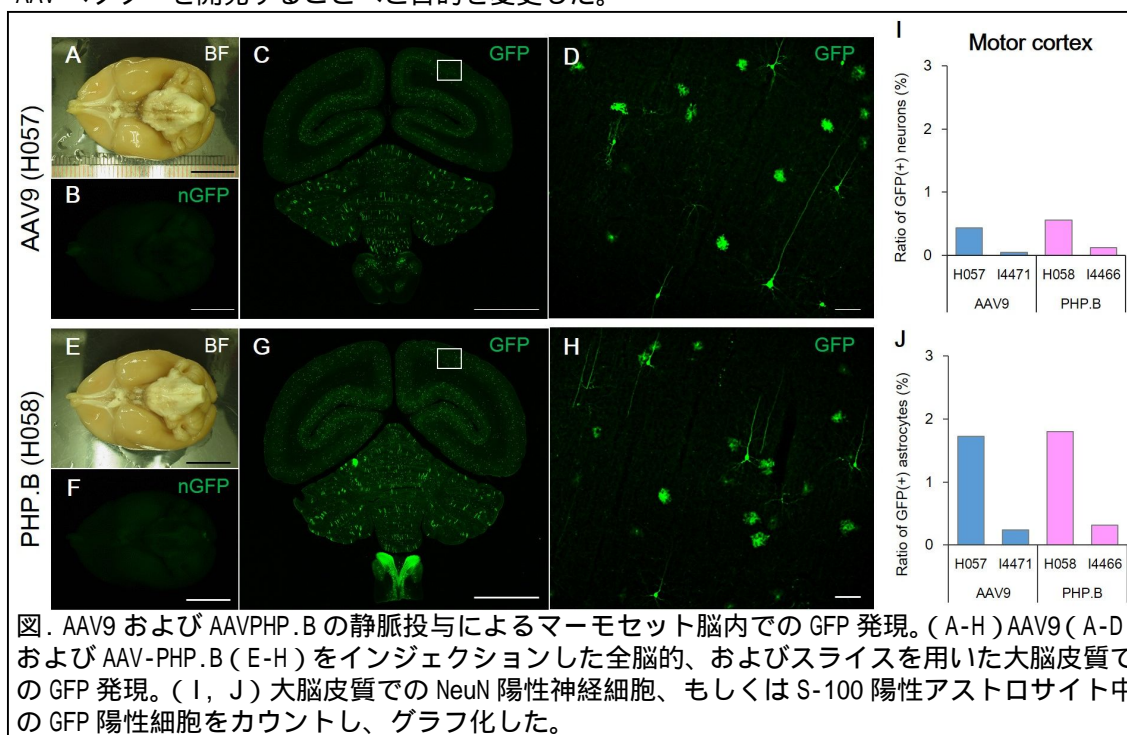


図. AAV9 および AAV-PHP.B の静脈投与によるマーマセット脳内での GFP 発現。(A-H) AAV9 (A-D) および AAV-PHP.B (E-H) をインジェクションした全脳的、およびスライスを用いた大脳皮質での GFP 発現。(I, J) 大脳皮質での NeuN 陽性神経細胞、もしくは S-100 陽性アストロサイト中の GFP 陽性細胞をカウントし、グラフ化した。

AAV-PHP.B は AAV9 のカプシド配列の Q588 と A589 の間へ 7 アミノ酸のランダム変異を入れたライブラリーを作り、それをマウスへ静注してセクションをかけることで開発された (CREATE 法)。その手法を用いて 7 アミノ酸のランダム変異が挿入されたライブラリーを作製し、マーマセットを用いたスクリーニングを行った。しかし、ランダムな 7 アミノ酸の挿入ではマーマセット BBB を高効率に突破する AAV ベクターは得られなかった。そこで 5 アミノ酸や 10 アミノ酸へ長さを変更したライブラリーも作りマーマセットにインジェクションしたが、これらのライブラリーを用いても目的の AAV ベクターは得られなかった。CREATE 法を用いた方法ではマーマセット BBB を高効率に突破できる AAV ベクターは作製出来なかった。

2016 年に開発された AAV-PHP.B はその特性に不明な点が多くあった。開発は C57BL/6J マウスを用いて行われたが、マーマセットでは BBB を超効率的に突破できないことが判明し、それはラットにおいても同様であることも私の実験から明らかとなった (Shinohara et al. *Mol Neurobio.* 2018)。また、Hordeaux らにより、AAV-PHP.B の特性は近交系マウスの中でも BALB/c では観られず、C57BL/6 マウスに限られる可能性が提示された (Hordeaux et al. *Mol Ther.* 2018)。そこで、多くの種類の近交系マウスを用意し、AAV-PHP.B をインジェクションして BBB の透過性を調べた。その結果、C57BL/6 以外にも DBA/2、FVB/N、SJL/J といった近交系マウス BBB も超効率的に突破することが明らかとなった (Matsuzaki et al. *Mol Ther.* 2019)。一方、BALB/c をはじめ、CBA、C3H/He、A/JJ といったマウスでは BBB を透過出来なかった (9th FAOPS にて発表)。当研究成果により、AAV-PHP.B が C57BL/6 系統以外の複数系統のマウスに用いることが可能であることが示された。

AAV-PHP.B、CRISPR/Cas9、神経細胞特異的プロモーターを用いたマウス中枢神経系のノックアウトは現在でも報告されていない。そこで、AAV-PHP.B、小脳プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーターと triple-CRISPR/Cas9 システムを組み合わせたノックアウトシステム系を構築し、マウス小脳で働くか検討した。ターゲット遺伝子は *in vivo* ノックアウトでも症状が出ると考えられる mGluR1 をコードしている *Grm-1* 遺伝子とした。ロータロッドテストの結果、運動失調は確認できなかった。さらにそれらのマウスをサクリファイスし、発現を調べた結果、導入遺伝子の発現は観察できたが、*Grm-1* のノックアウトは観察出来なかった。AAV-PHP.B を用いて *in vivo* ノックアウトを行うには、さらなる gRNA の選定、Cas9 タンパク質の選定、コンストラクトの選定など、より AAV-PHP.B に適合したシステムへ変更する必要があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Minimal Purkinje Cell-Specific PCP2/L7 Promoter Virally Available for Rodents and Non-human Primates.

Nitta K, Matsuzaki Y, Konno A, Hirai H

Molecular therapy. Methods & clinical development 6 159-170 2017年9月 [査読有り]

Regulatory connection between the expression level of classical protein kinase C and pruning of climbing fibers from cerebellar Purkinje cells.

Takahashi N, Shuvaev AN, Konno A, Matsuzaki Y, Watanave M, Hirai H

Journal of neurochemistry 143(6) 660-670 2017年12月 [査読有り]

Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain.

Matsuzaki Y, Konno A, Mochizuki R, Shinohara Y, Nitta K, Okada Y, Hirai H

Neuroscience letters 665 182-188 2018年2月 [査読有り]

Effects of Neutralizing Antibody Production on AAV-PHP.B-Mediated Transduction of the Mouse Central Nervous System.

Shinohara Y, Konno A, Nitta K, Matsuzaki Y, Yasui H, Suwa J, Hiromura K, Hirai H

Molecular neurobiology 2018年10月 [査読有り]

Contribution of Thyrotropin-Releasing Hormone to Cerebellar Long-Term Depression and Motor Learning.

Watanave M, Matsuzaki Y, Nakajima Y, Ozawa A, Yamada M, Hirai H

Frontiers in cellular neuroscience 12 490 2018年 [査読有り]

Pharmacological enhancement of retinoid-related orphan receptor α function mitigates spinocerebellar ataxia type 3 pathology.

Watanave M, Hoshino C, Konno A, Fukuzaki Y, Matsuzaki Y, Ishitani T, Hirai H

Neurobiology of disease 121 263-273 2018年10月 [査読有り]

Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Shared among Diverse Inbred Strains of Mice.

Matsuzaki Y, Tanaka M, Hakoda S, Masuda T, Miyata R, Konno A, Hirai H

Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 2019年2月 [査読有り]

〔学会発表〕(計 3 件)

アデノ随伴ウイルスベクター血清型 9(AAV9)および血液脳関門突破型 AAV ベクター (AAV-PHP.B)のマーモセット静脈内投与および中枢神経系での発現比較

松崎 泰教

第7回日本マーモセット研究会大会 2018年1月17日

Minimal Purkinje Cell-Specific L7 Promoter Virally Available for Rodents and Non-human Primates

松崎 泰教

第9回国際小脳学会シンポジウム 2018年5月17日

Mouse strain-dependent BBB (blood-brain barrier) permeability of AAV-PHP.B

松崎 泰教

第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 (9th FAOPS) 2019年3月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(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。