

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591003

研究課題名（和文）新規アデノ随伴ウイルスベクターを応用した神経変性疾患の病態解析

研究課題名（英文） Studies on pathophysiology of neurodegenerative diseases using novel recombinant adeno-associated viral vectors.

研究代表者

村松 慎一 (MURAMATSU SHINICHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10239543

研究成果の概要：

神経細胞またはグリア細胞特異的に遺伝子を導入できるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを使用して神経変性疾患における病態を解析し新たな治療法を開発することを目標に研究を実施した。脳内の神経細胞特異的にアミロイド前駆体蛋白質を発現させてアルツハイマー病のモデルマウスを作製した。特定の変異型TDP-43を脳内で発現させたマウスでは行動異常が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：神経病態生化学

キーワード：(1) パーキンソン病 (2) アルツハイマー病 (3) 筋萎縮性側索硬化症  
(4) アデノ随伴ウイルス (5) (6)

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系への遺伝子導入用ベクターとして、アデノ随伴ウイルス adeno-associated virus (AAV)ベクターの有用性が認知されてきた。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

伝子を長期間発現させることができる。元来、遺伝子治療用のベクターとして開発が進められてきたが、神経科学研究において有力な tool としての応用が注目されている。私たちは、AAVの基礎研究とAAVベクターを応用した神経変性疾患の遺伝子治療の研究

を継続してきた。パーキンソン病の遺伝子治療研究では、モデルサル脳内に AAV ベクターによってドパミン合成系の酵素遺伝子を導入すると運動障害の改善効果が得られることを世界に先駆けて報告し(*Hum Gene Ther*, 2002)、臨床応用も開始している。筋萎縮性側索硬化症(ALS)の遺伝子治療として、AAV ベクターによって四肢の筋肉に GDNF を発現させる方法を開発し、ALS のモデル動物である SOD1 transgenic mice において、脊髄の運動神経細胞の変性脱落が抑制され、寿命が延長できることを報告した(*J Neurosci*, 2002; *Neurosci Res*, 2003)。アルツハイマー病の遺伝子治療として、アミロイド蛋白の分解酵素である neprilysin の遺伝子を AAV ベクターによって海馬の神経細胞に導入すると老人斑の形成が抑制されることをモデルマウスの実験で明らかにした(理化学研究所との共同研究; *J Neurosci*, 2004; *Ann Neurol*, 2005)。より安全なベクターとして、合成エストロゲンであるタモキシフェンを投与することにより導入した遺伝子の発現レベルを誘導的に調節できる AAV ベクターを開発した(フランス IGBMC との共同研究; *Mol Ther* 2006)。上記 AAV ベクターの研究の他に、霊長類(カニクイサルおよびヒト)の embryonic stem (ES) cell を使用した分化誘導および遺伝子導入実験を行っている(*J Gene Med*, 2003; *Stem Cell*, 2006)。

## 2. 研究の目的

新規に開発した神経細胞またはグリア細胞特異的に遺伝子導入可能な AAV ベクターを使用して神経変性疾患の病態解析を行う。アルツハイマー病患者の脳内に老人斑として蓄積する  $\beta$  アミロイドによる細胞変性の機序を、 $\beta$  アミロイドの前駆体蛋白質(APP)を長期間継続して過剰発現させることが可能な

AAV ベクターを使用した実験系で解析する。初代培養細胞・ES 細胞を使用した *in vitro* の実験に加えて、マウス・ラット・カニクイサルにおける病態モデルを作製する。また、家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)および前頭側頭葉型認知症の脳内に蓄積していることが見いだされ、その病態解析が急がれる TDP-43 を発現する AAV ベクターを使用して病態モデルを作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) AAV ベクターの作製

神経細胞またはグリア細胞選択的に遺伝子導入可能な AAV ベクターを開発する。ベクターに搭載する発現調節配列を遺伝子工学的手法により改変し、細胞特異的な遺伝子発現を実現する。申請者らが開発した AAV3 由来のベクター (Li et al., *Mol Ther*, 2006) をはじめ、AAV8 などの新しい AAV 由来のベクターを使用する。 $\beta$  アミロイドの前駆体蛋白質である amyloid precursor protein (APP) および TDP-43 を発現するベクターを作製する。

### (2) 培養細胞における解析

カニクイサルの ES 細胞から分化誘導した神経細胞を使用する。1) で作製した各種の AAV ベクターをこれらの細胞に感染させて、細胞毒性の発現機序を生化学的および免疫細胞化学により解析する。ES 細胞からの神経細胞の分化誘導に際しては、グリア細胞の条件培地を使用した浮遊培養法を使用し、高純度の神経細胞を得る。

### (3) 小動物での解析

マウスの脳内に、1) で作製した各種の

AAV ベクターを定位脳手術によって注入し病態モデルを作製する。

#### (4) モデルサルの作製

カニクイサルの脳内に、1) で作製した各種の AAV ベクターを定位脳手術によって注入し病態モデルを作製する。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経細胞特異的 AAV ベクターの作製

3 型 AAV の両端 inverted terminal repeats (ITR) 配列の間にアミロイド前駆体蛋白質 APP の遺伝子を組み込み、3 型と 8 型の各カプシドを持つ pseudotype AAV ベクターを作製した。Sy 神経細胞特異的発現を得るため Synapsin 1 (SynI) プロモーターを使用した。Sweden 型変異 (K670N, M671L) APP (APPsw) についても AAV ベクターを作製した。

#### (2) APP 発現モデル動物の作製

(1) で作製した各種の AAV ベクターをマウスの脳 (海馬および線条体) へ定位脳手術により注入し、APP 遺伝子を強制発現させた。SynI プロモーターにより神経細胞特異的に APPsw を発現させたマウスでは、抗アミロイド  $\beta$  (Ab) 抗体 6E10 による免疫組織染色で、注入側の海馬および線条体の広範な領域で陽性反応が認められた (図1)。

図1: マウス脳組織の免疫組織染色

成体マウス (C57BL/6J, ♂, 4週齢) の片側半球の線条体と海馬に AAV3-APPsw ベクターを注入した。2週間後に 4%PFA で灌流固定し、Ab 抗体 6E10 で染色した。注入側 (図の左) の海馬で広範な発現が認められる。



カニクイサルにも大脳皮質・海馬に AAV-APPsw を注入し、現在経過観察中である。

#### (3) ES 細胞における解析

カニクイサル ES 細胞からグリア細胞の条件培地を使用して神経細胞を分化誘導した。この神経細胞に AAV-APPsw により APP を発現すると神経細胞死を誘導するアミロイド凝集体が検出された。(三菱生命科学研究所 星美奈子チームリーダーとの共同研究。論文投稿中)

#### (4) TDP-43 発現モデルの作製 (詳細は論文準備中のため未公開)

変異型 TDP-43 を発現する AAV ベクターを作製しマウスの脳内に注入した結果、特異な行動異常を呈するモデルを作製できた。

### 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 6 件)

- ① Tanaka Y, Ikeda T, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu S, Kondo Y, Takahashi K, Yamanaka S and Hanazono Y : ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. Cell Transplant, in press. 査読有
- ② Muramatsu S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y and Tsukada H : Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation

of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Synapse*, 63:541-548, 2009. 査読有

- ③ Kishi Y, Tanaka Y, Shibata H, Nakamura S, Takeuchi K, Masuda S, Ikeda T, Muramatsu S, and Hanazono Y : Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of nonhuman primate ES cells into immunodeficient mice. *Cell Transplant*, 17:1095-1102, 2008. 査読有
- ④ Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykhholeslami K, Nomoto T, Muramatsu S, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K and Ozawa K : Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol. Ther.* 16(3) : 474-480, 2008. 査読有
- ⑤ Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, Sakagami J, Ukai Y, Ono M, Kanbe D, Muramatsu S, Kobayashi K, Iwatsubo T and Yoshimoto M : Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human  $\alpha$ -synuclein in mice. *Neurobiol. Aging*. 29(4) : 574-585, 2008. 査読有
- ⑥ Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T and Sawada M : Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *J. Neurosci. Res.* 85(8) : 1752-1761, 2007. 査読有

[学会発表] (計18件)

- ① Muramatsu S : Gene therapy for Parkinson's disease. 2<sup>nd</sup> Korean Neurological Association and Japanese Society of Neurology joint symposium. Busan, October 10, 2008.
- ② 浅利さやか, 村松慎一, 藤本健一, 中野今治, 齋藤順一, 佐藤俊彦 : FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断. *Movement Disorder Society Japan* 第2回学術集会, 京都, 2008年10月3日.
- ③ Muramatsu S, Asari S, Terao K, Ozawa K, Nakano I and Tsukada H : PET Assessment of transgene-mediated dopamine synthesis in a primate model of Parkinson's disease. *World Molecular Imaging Congress*. Nice, September 11, 2008.
- ④ Muramatsu S : Recombinant AAV vectors as a valuable tool for neuroscience.

*Neurosci Res*, 61(1) : S9, Tokyo, July 9, 2008.

- ⑤ Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I : Aromatic L-amino acid decarboxylase gene transfer for parkinson's disease : preliminary results of an open-label safety study. The Japan society of gene therapy's 14<sup>th</sup> annual meeting. Sapporo, June 12, 2008.
- ⑥ Muramatsu S, Ono F, Takino N, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K and Nakano I : Long-term behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease with persistent gene expression of dopamine-synthesizing enzymes. The American society of gene therapy's 11<sup>th</sup> annual meeting. Boston, May 31, 2008.
- ⑦ 浅利さやか, 村松慎一, 藤本健一, 中野今治, 大西理文, 永嶋聖治, 佐藤俊彦 : FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 2008年5月17日.
- ⑧ 村松慎一, 浅利さやか, 池口邦彦, 藤本健一, 小野文子, 寺尾恵治, 塚田秀夫, 中野今治 : パーキンソン病モデルサルにおける遺伝子治療の長期効果. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 2008年5月16日.
- ⑨ 大西理文, 佐藤俊彦, 村松慎一, 中野今治, 泉田龍男 : FMT-PET によるパーキンソン病の画像診断及び解析について. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台, 2007年11月6日.
- ⑩ Muramatsu S, and Nakano I : Gene therapy for Parkinson's disease. JMU 21st Century COE Program The 4<sup>th</sup> Nikko International Symposium, Nikko, September 29, 2007.
- ⑪ 村松慎一, 浅利さやか, 藤本健一, 中野今治, 大西理文, 永嶋聖治, 佐藤俊彦, 村田寿, 泉田龍男, 塚田秀夫 : パーキンソン病遺伝治療における PET の応用. 第23回ブレイン・ファンクション・イメージング・カンファレンス, 神戸, 2007年9月22日.
- ⑫ 浅利さやか, 西田紘子, 奈良優子, 滝野直美, 古寺美加, Xiao W-Z., 佐々木康郎, 菊地哲, 松下卓, 岡田尚巳, 星美奈子, 小澤敬也, 中野今治, 村松慎一 : 8型 AAV ベクターによる乏突起細胞へ高効率遺伝子導入. 第30回日本神経科学大会, 横浜, 2007年9月11日.
- ⑬ 村松慎一, 小野文子, 滝野直美, 西田紘子, 浅利さやか, 池口邦彦, 藤本健一,

塚田秀夫, 寺尾恵治, 小澤敬也, 中野今治: パーキンソン病モデルサルにおけるドパミン合成系酵素遺伝子導入の長期効果. 第30回日本神経科学大会, 横浜, 2007年9月11日.

- ⑭ 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 第15回九州・山口機能神経外科セミナー・特別講演, 福岡, 2007年9月2日.
- ⑮ 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 日本病院薬剤師会関東ブロック第37回学術大会, 宇都宮, 2007年8月26日.
- ⑯ Muramatsu S, Ono F, Takino N, Nishida H, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K and Nakano I: Long-term behavioral recovery in a primate model of parkinson's disease after gene transfer of dopamine-synthesizing enzymes. The Japan society of gene therapy's 13<sup>th</sup> annual meeting. Nagoya, June 29, 2007.
- ⑰ 浅利さやか, 村松慎一, 西田絃子, 奈良優子, 滝野直美, Xiao W-Z., 岡田尚巳, 松下卓, 小澤敬也, 中野今治: Oligodendrocyte を標的とした AAV ベクターの開発. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007年5月18日.
- ⑱ 村松慎一, 古寺美加, 奈良優子, 滝野直美, 西田絃子, 中野今治, 奥野剛, 小西奈依, 道端英雄, 鈴木豊, 近藤靖, 仁藤新治: 自殺遺伝子を導入したより安全な移植用 ES 細胞の開発. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007年5月17日.

[図書] (計1件)

- ① Muramatsu S: AAV vectors provide a valuable tool for neuroscience, Genetic vectors research focus, Pablo S. Ruiz (Ed.), Nova Publishers, 2007, pp 31-34.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村松 慎一 (MURAMATSU SHINICHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10239543

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし