

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790759
 研究課題名（和文）乳児重症ミオクロニーてんかんモデルマウスを用いた遺伝子治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of gene therapy for SMEI using epilepsy model mouse.

研究代表者
 山形 哲司（Yamagata Tetsushi）
 独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・研究員
 研究者番号：00338766

研究成果の概要（和文）：

難治性てんかんである「乳児重症ミオクロニーてんかん（SMEI）」の治療法として、Shiらの報告した抗体修飾リポソームによるモデル動物への欠損遺伝子の導入を検討した。リポソーム作製法について、最適化と改良をおこなったが、現時点でのリポソームによる遺伝子の導入効率は、不十分だったため、モデル動物の治療には至らなかった。しかし、本研究においてリポソームの改良の可能性が得られており、今後の伸展によりモデルマウスの治療に必要な遺伝子の発現量を得ることは可能と考える。

研究成果の概要（英文）：

In this study, to develop gene therapy for severe myoclonic epilepsy in infancy model mice, pegylated immunoliposomes were investigated and improved. Whereas preparation steps of liposomes have been optimized, expression of transgene was not sufficient to apply the therapy to SMEI model mice. However, results of this study will lead to improvement of liposome that provides enough gene expression in the target tissue. Thus the gene therapy for SMEI model mice may be possible in near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・小児科学

キーワード：乳児重症ミオクロニーてんかん, 抗体修飾リポソーム, 遺伝子治療, SCN1A

1. 研究開始当初の背景

全般てんかん熱性けいれんプラス（GEFS+）と乳児重症ミオクロニーてんかんは、乳児期に発症するてんかんである。

GEFS+ は、乳児期の熱性けいれん、幼児期の無熱性全般てんかんを特徴とし、比較的予後が良好である。一方、SMEI は乳児期の熱性けいれんを最初の発作とするが、発症後、難治の強直間代発作と

ミオクロニー発作へ進行するとともに重度の精神発達障害を起こす。多くの研究グループが、多数の電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ 型サブユニット (SCN1A) 遺伝子の突然変異を GEFS+ と SMEI の患者に見いだしているが、突然変異チャンネル分子の機能解析まで行っているのは申請者の所属する研究チームを含む少数グループのみであった。

申請者の所属する研究チームでは、189例の SMEI 患者の SCN1A 遺伝子について変異解析を行い、104例 (55%) で SCN1A 遺伝子の突然変異を見出していた (Sugawara *et al.* 2002; Fujiwara *et al.* 2003)。さらに、ヒト疾患のモデルとなるように SMEI 患者と同じナンセンス変異を SCN1A 遺伝子に導入した遺伝子改変マウスを作製し、その表現型が SMEI に類似していることを見出した (Ogiwara *et al.* 2007)。この遺伝子改変マウスでは、ナンセンス変異によって生じるはずの短縮した SCN1A の遺伝子産物が検出されず、疾患の原因が SCN1A 遺伝子産物の量的変化であることが示唆された。この仮説は、米国ワシントン大学の Catterall 博士の研究グループが報告した SCN1A 欠損マウスの表現型 (Yu *et al.*, 2006) が、上述の変異型 SCN1A 導入したマウスとほぼ一致していることから支持される。

申請者は、SMEI が電位依存性ナトリウムチャンネルを構成する SCN1A の発現量低下で引き起されるならば、外部から SCN1A 遺伝子を中枢神経系に導入する遺伝子治療によって SMEI の症状を改善できると考えた。生体への遺伝子導入の手段としては、米国カリフォルニア大学の Pardrige 博士の研究グループが開発した抗体修飾リポソーム法を用いた。このリポソームは、血液脳関門を通過して脳組織に目的遺伝子を導入できる (Shi *et al.* 2001)。さらに、マウスへの投与実験において成体の脳だけでなく、胎盤を経由した胎児-新生児期の脳への遺伝子導入やタンパク分子の封入も可能なことが示されていた。この点は、ホモ接合体の SMEI モデルマウスは、実験処置の困難な生後14日前後に死亡するので、抗体修飾リポソームによる

遺伝子導入は、本研究に適していた。また、抗体修飾リポソームは、免疫応答や病原性などを回避できるので、*in vivo*への遺伝子導入法として優れた特徴がある。

申請者の所属研究で作製された変異型 SCN1A マウスが SMEI に似た症状を示したことは、SMEI と SCN1A 遺伝子の因果関係を個体レベルで明確にした点で重要な進展であった。さらに、このヒト SMEI と同じ発症機序を持つ疾患モデルマウスでは、遺伝子産物の絶対量が低下していたため、抗体修飾リポソームによる SCN1A 遺伝子の導入によって回復が可能ではないかと考えた。

参考文献

- Sugawara T *et al.*, Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology* 2002, 58:1122-4,
- Fujiwara T *et al.*, Mutations of sodium channel alpha type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 2003, 126:531-46.
- Ogiwara I *et al.*, Na(v)1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J Neurosci.* 2007, 30;27(22):5903-14.
- Yu FH *et al.*, Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci.* 2006, 9(9): 1142-9.
- Shi N *et al.*, Brain-specific expression of an exogenous gene after *i.v.* administration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 23;98(22):12754-9.
- Kim DY *et al.*, BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol.* 2007, 9(7):755-64.

2. 研究の目的

SMEI 患者に見出される突然変異の半数以上は、ナンセンスまたは、フレームシフト変異である。すなわち、モデルマウスで示された電位依存性ナトリウムチャンネルの量的不足が生じていると考えられる、したがって、脳内で適切に SCN1A 遺伝子の発現を回復させることで SMEI モデルマウスの治療が可能であれば、その成果は、現時点で

有効な治療法のない SMEI の発症機序の理解と治療法の開発にとり重要な意義があり、将来的には臨床応用へと発展しうる課題でもあると考えた。本研究では、SCN1A遺伝子の導入法によるモデル動物の病態の改善を試みた。

3. 研究の方法

本申請の研究計画は、SMEIモデルマウスへの遺伝子導入法と遺伝子発現の確立、および遺伝子発現の評価で構成された。遺伝子導入法については、リポソームによって導入される遺伝子の発現効率がウイルスベクターに比して低いので、SMEI モデルマウスに本来のNaV 1.1の発現量を回復するために、発現ベクターや発現効率を向上させる添加剤を検討して抗体修飾リポソームの改良に取り組んだ。また、外部からSCN1Aを補う以外の方法として、内在性 SCN1A 遺伝子の転写・翻訳を活性化する $\beta 2$ -ICD による NaV 1.1の発現量回復を検討した。リポソームにより遺伝子を導入したマウスについては、脳内での遺伝子発現をルシフェラーゼアッセイとウェスタンブロットにて確認した。

抗体修飾リポソームの調製

申請者は、カリフォルニア大学の Cornford 教授の研究室へ出向して習得した抗体修飾リポソームの作製と投与技術を基本にして、発現効率の向上に取り組んだ。レポーター遺伝子（ルシフェラーゼまたは、緑色蛍光タンパク：EGFP）を指標として、導入遺伝子の発現を検討した。リポソームは、Kim et al. (2004) の方法に基づいて POPC, DDAB, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000-maleimide の4種の脂質を用いて形成した。リポソームに結合させる抗体は、抗トランスフェリン受容体抗体 (RI7-217) を使用した。

導入遺伝子と発現ベクター (in vivo 用)

導入効率の指標とするため、緑色蛍光タンパクを発現する pEGFP および、ルシフ

ェラーゼ遺伝子を組込んだ発現ベクター pGL4 を用いた。マウス *Scn1a* 遺伝子 (6kb) は、クローン化して発現ベクター pCR-DEST40 へ組込んだ。各発現ベクターを構築後、抗体修飾リポソームによってマウスへ導入した。

Kim et al. (2007) によって SCN1A 遺伝子の発現を上昇させることが報告された $\beta 2$ -ICD 遺伝子 (121bp) は、クローン化して発現ベクターを構築し、in vitro での活性を検討した。

また、In vivo における発現ベクターとして、EBN1A/OriP を利用した Episomal ベクター (pREP4) を基礎に転写領域にイントロン (pCI-neo 由来) と mRNA 安定化配列である WPRE 配列を加えた新規ベクター構築を試みた。

抗体修飾リポソームの投与

生後1~2ヶ月あるいは、妊娠 16~17日目の SMEI マウス (+/-) に麻酔下で尾部の血管（または、頸部や大腿部の血管）より、個体あたり 5-25ug DNA に相当するリポソーム液を注入した。

$\beta 2$ -ICD のクローン化と発現実験

pCAG-GSベクターへ マウス *Scn2b* 遺伝子の細胞内ドメイン ($\beta 2$ -ICD) と IRES+EGFP を加えてクローン化した。活性については、培養細胞 SH-SY5 に導入後に免疫細胞染色法により内在性 *Scn1a* 遺伝子の発現を指標として検討した。

SMEIモデルマウスの飼育

Scn1a 変異マウスはホモ接合体になると離乳前（生後14-20日前後）に全て死亡するため、正常マウス (C57BL/6J) と戻し交配してヘテロ接合体の状態ですべて系統維持を行った。

4. 研究成果

従来の抗体修飾リポソームの作製法において、リポソームへ結合させる抗体の処理・精製法と修飾後のリポソームの精製法を変更することにより、調製開始から投与まで3日を要した作製時間を2日に短縮した。この再検討の過程において、リポソーム作製時の各パラメータを任意に変更することが可能になった。

リポソームによる遺伝子の導入を確認するため、リポソーム投与後のマウスの組織より全 DNA を回収して PCR を行った。ベクターDNAは、脳、脾臓、精巣などに送達されていることが確認された。導入された遺伝子の発現を調べる為にマウス個体または、培養細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入してルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、作製したリポソームによる遺伝子の導入効率は、極めて低いことが判明した。特にマウスの脳組織では、検出限界に近いレベルであった。また、レポーター遺伝子として EGFP を使用した場合、蛍光顕微鏡下でマウス脳内の発現細胞を識別することは困難であった。検討の結果、リポソームの導入効率は、リポソームの粒径とリポソーム上の修飾タンパクの量に影響されることが判明した。リポソームの粒径は、通常 100 nm で作製されていたが、粒径がより小さい方が取り込み効率は良い傾向があった。しかしながら、より小さい粒径のリポソームでは、内包出来る DNA 量も減少するため、50 nm のリポソームの最適な調製は、まだ出来ていない。粒径を 80nm にすることにより、内包する DNA 量を劇的に減少させずに、遺伝子の発現量を培養細胞において約1.7倍に上昇させることが出来た。また、市販の遺伝子導入試薬 ExGen500 を用いて遺伝子をマウスに導入した際には、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓の各臓器に発現が見られた。特に全活性の約97%が肺に導入されている点が顕特徴的であった。脳への導入は、全活性の0.05-0.01%程度であった。抗体修飾リポソームでは、ExGen500 と同様の臓器で、導入した遺伝子の発現が検出されたが、特定臓器への極端な集積はなかった。脳への導入効率を抗体修飾リポソームと比較すると発現自体は、ExGen500の方が数-10倍高いが、全活性に対する割合は、約4%でリポソームの方が高かった。

実際に SMEI モデルマウスへの治療を行う際の導入遺伝子の候補として、in vivo 実験において内在性SCN1A の発現量を数倍

上昇させる活性が報告された *Scn2b* の細胞内ドメイン ($\beta 2$ -ICD)に注目した。この $\beta 2$ -ICD による遺伝子の発現調節を確認する為に、SH-SY-5Y細胞に $\beta 2$ -ICDを発現させ、免疫染色によりSCN1A遺伝子の発現を調べた。しかしながら、 $\beta 2$ -ICD の核移行が不十分で、*Scn1a* 遺伝子の発現上昇は認められなかった。核移行シグナルを付加した場合でも同様の結果となり、現時点では $\beta 2$ -ICD による *Scn1a* 遺伝子の発現誘導は困難であると判断した。

導入遺伝子の発現を改善するため発現ベクターのプロモーターに SV40, CMV, CAG プロモーターを用いた。現時点では、確定的ではないが、マウス脳内へ導入した場合、CAG プロモーターによる発現が最も適していると考えている。また、mRNA の安定化配列である WPRE の付加も行った。治療に使用する発現ベクターは現在構築中である。

変異マウスの維持については、C57BL/6 との戻し交配を継続した結果、*Scn1a* 変異マウスは、12世代を超えたことにより、完全コンジェニックとなった。これにより、より均質な遺伝的背景のマウスを用いた実験が可能になった。

現時点でのリポソームによる遺伝子導入効率は、最高で市販試薬の約4割であった。しかしながら、脳以外への組織特異性が強く、脳への遺伝子導入法としては十分ではなかった。結論としては、現時点でのリポソームによる遺伝子の導入は、得られる遺伝子発現が不十分であるため各要素の改良がさらに必要ではあるが、本研究においてリポソームの物性を明らかにしたことによって改良の可能性が得られた。これまではモデル動物の治療には至らなかったが、SMEI モデルマウスにおいては、てんかんを発症する主な原因が特定の細胞における SCN1A 遺伝子の欠損が主な原因となることが判明してきており、今後は特定の細胞に対する遺伝子導入と発現制御が課題となると予想される。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 哲司 (Yamagata Tetsushi)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チ

ーム・研究員

研究者番号：00338766