

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590473

研究課題名(和文)血管内投与型 AAV ベクターによる神経変性症の遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene therapy for neurodegenerative diseases using adeno-associated viral vectors that can cross the blood-brain barriers.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：血管内投与により広範な中枢神経領域の神経細胞に効率よく遺伝子を導入できるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを応用して、神経変性疾患に対する新規遺伝子治療法を開発した。球脊髄性筋萎縮症(SBMA)のモデルマウスでは、脊髄運動神経細胞でmiR-196aを発現させることにより異常アンドロゲン受容体蛋白が減少し症状が改善した。Alzheimer病モデルマウスでは、脳内の広範な領域でAβ分解酵素のNephrilysinを発現させることにより認知機能の改善効果を得た。ALSのモデルマウスでは、脊髄運動神経細胞でRNA編集酵素のADAR2を発現させることにより症状の進行を抑制した。

研究成果の概要(英文)：We recently developed AAV vectors that can cross the blood-brain or meningeal-brain barriers. Using these AAV vectors, we have shown beneficial effects in mouse models of neurodegenerative diseases. The early intervention of miR-196a delivered by an AAV vector ameliorated the phenotypes in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. A single intracardiac administration of the vector carrying neprilysin gene in a mice model of Alzheimer disease reduced Aβ oligomers, with concurrent alleviation of abnormal learning and memory function. Gene delivery of the RNA-editing enzyme, adenosine deaminase 2, which acts on RNA 2 (ADAR2) in conditional ADAR2 knockout mice prevented progressive motor dysfunction. These AAV vectors may provide a novel platform for treating neurodegenerative diseases, especially where global transduction of a therapeutic gene into the brain is necessary.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経変性疾患 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患に対する遺伝子治療用ベクターとして、アデノ随伴ウイルス (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する。

申請者は、一貫して AAV ベクターの研究を行ってきた。パーキンソン病および筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対してグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)を発現させることにより神経細胞の脱落を抑制する方法、アルツハイマー病の遺伝子治療としてアミロイド蛋白( $\beta$ )の分解酵素 neprilysin の遺伝子を導入する方法などを開発してきた。パーキンソン病に対しては 2007 年から芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の遺伝子を搭載した AAV ベクターを両側の被殻に定位脳手術により注入する遺伝子治療の臨床応用を開始し、運動機能の改善効果が得られている。また、AADC に対するリガンド FMT を使用した positron emission tomography (PET)で AADC 遺伝子の発現が 2 年後にも持続していることを確認した (*Mol Ther* 2010)。

AAV ベクターは、遺伝子治療以外に神経系への遺伝子導入における優れた特性を活かし、optogenetics など基礎研究への応用が普及してきた。申請者は Cre recombinase を発現する AAV ベクターを作製し、目標遺伝子を loxP 配列の間に含むトランスジェニックマウスの脳の特定位点に注入することにより、当該遺伝子を選択的に除去する方法を応用した機能解析を行っている。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発した血管内投与により広範な中枢神経領域の神経細胞に効率よく遺伝子を導入できるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを応用し、Alzheimer 病、ALS などの神経変性疾患に対する新規の遺伝子治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

3 型 AAV(AAV3)を利用した。ゲノム両端の inverted terminal repeat 配列の間に神経細胞特異的プロモーター、治療用分子 DNA または miRNA, SV40 poly (A) 配列からなる発現カセットを搭載した。9 型 AAV(AAV9)を基本として、外被蛋白のアミノ酸配列を改変した変異型 pseudotype ベクターを作製した。これらのベクターを球脊髄性筋萎縮症(SBMA)、Alzheimer 病、ALS などの病態モデルマウスの血管内に投与し病態の改善効果を行動実験、免疫組織化学などにより解析した。

## 4. 研究成果

SBMA モデルマウスでは、脊髄の運動神経細胞で miR-196a を発現させることにより異常アンドロゲン受容体蛋白が減少し、症状の改善が得られた(名古屋大学との共同研究)。

Alzheimer 病モデルマウスでは、脳内の広範な領域で  $\beta$  分解酵素の Neprilysin を発現させることにより認知機能の改善効果を得た(長崎大学・理化学研究所との共同研究)。

ALS モデルマウスでは、脊髄の運動神経細胞で RNA 編集酵素の ADAR2 を発現させることにより症状の進行を抑制した(東京大学との共同研究)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Hwu WL, Lee NC, Chien YH, Muramatsu S, Ichinose H: AADC deficiency: occurring in humans, modeled in rodents. *Adv Pharmacol*, 68:273-84, 2013. 査読有

doi: 10.1016/B978-0-12-411512-5.00013-0.

Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med*, 5(11):1710-1719, 2013. 査読有

doi: 10.1002/emmm.201302935.

Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K, Muramatsu S: Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Bio Med Res Int*, 2013;974819, 2013. 査読有

doi: 10.1155/2013/974819.

Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S, Saido TC: Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep*, 3:1472, 2013. 査読有

doi: 10.1038/srep01472.

Lee N-C, Shieh Y-D, Chien Y-H, Tzen K-Y, Yu I-S, Chen P-W, Hu M-H, Hu M-k, Muramatsu S, Ichinose H, Hwu W-L: Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurobiol Dis*, 52:177-190, 2013. 査読有

doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.005.

Yan Y, Miyamoto Y, Nitta A, Muramatsu S, Ozawa K, Yamada K, Nabeshima T: Intrastriatal gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int JNP*, 16:1559-1567, 2013. 査読有

doi:10.1017/S1461145712001575.

Popiel H A, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, Muramatsu S, Toda T, Wada K, Nagai Y: Hsp40 gene therapy exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS ONE*, 7(11):e51069, 2012. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0051069.

Nakamura K, Ota M, Kawata A, Isozaki E, Muramatsu S, Matsubara S: Careful clinical observation is essential for diagnosis of Huntington disease. *Arq Neuropsiquiatr*, 70(8):646, 2012. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X201200800021>

Jin D, Muramatsu S, Shimizu N, Yokoyama S, Hirai H, Yamada K, Liu HX, Higashida C, Hashii M, Higashida A, Asano M, Ohkuma S, Higashida H: Dopamine release via the vacuolar ATPase V0 sector c-subunit, confirmed in N18 neuroblastoma cells, results in behavioral recovery in hemiparkinsonian mice. *Neurochem Int*, 61 ( 6 ) : 907-912 , 2012. 査読有 doi:10.1016/j.neuint.2011.12.021.

Hwu WL, Muramatsu S, Tseng SH, Tzen KY, Lee NC, Chien YH, Snyder RO, Brne BJ, Tai CH, Wu RM: Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med*, 4:134-161, 2012. 査読有 doi: 10.1126/scitranslmed.3003640.

Miyazaki M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G: Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med*, 18(7):1136-1141, 2012. 査読有 doi: 10.1038/nm.2791.

Miyamoto M, Miyamoto T, Iwanami M, Muramatsu S, Asari S, Nakano I, Hirata K: Preclinical substantia nigra dysfunction in rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Sleep Med*, 13(1):102-106, 2012. 査読有 doi:10.1016/j.sleep.2011.03.024.

Tokuoka H, Muramatsu S, Ichinose C, Sakane H, Kojima M, Aso Y, Nomura T, Metzger D, Ichinose H: Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection. *J Biol Chem*, 286(50):43549-43558, 2011. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.284729.

Asari S, Fujimoto K, Miyauchi A, Sato T, Nakano I, Muramatsu S: Subregional 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-m-tyrosine uptake in the striatum in Parkinson's disease. *BMC Neurol*, 11-35, 2011. 査読有 doi: 10.1186/1471-2377-11-35.

[学会発表](計 35 件)

- 1 Iida A, Takino N, Miyauchi H, Itoh M, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread transduction of brain and spinal neurons following intra-thecal injection of AAV9/3 vectors in nonhuman primates and pigs. International symposium “New Frontier of Molecular Neuropathology 2014”, March 17, 2014, Tokyo.
- 2 村松慎二: Parkinson 病に対する遺伝子治療の現状と課題. 第 53 回日本定位・機能神経外科学会 シンポジウム, 2014 年 2 月 7 日, 大阪.
- 3 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 村松慎二, 中野今治: 多系統萎縮症(NSA-P)の FMT-PET 解析. Movement Disorder Society Japan 第 7 回学術集会, 2013 年 10 月 11 日, 東京.
- 4 Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Muramatsu S and Saido TC: Global and effective gene delivery of neprilysin to the brain via intravascular administration of AAV vector in alzheimer's disease mice. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 5, 2013, Okayama.
- 5 Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread neuronal transduction in the primate brain via intrathecal administration of adeno-associated virus vectors. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 4, 2013, Okayama.
- 6 Nitta A, Ishikawa Y, Iegaki Y, Sumi K, Hurukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Miyamoto Y: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in mice nucleus accumbens and dorsal striatum. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
- 7 Iwashita Y, Tokuoka H, Munezane H, Muramatsu S and Ichinose H: Distinct regulation mechanism of the dopamine content in the striatum from that in the midbrain. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
- 8 Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread transduction of neurons in the primate brain using intrathecal injection of AAV vectors. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
- 9 Miyamoto Y, Iegaki N, Sumi K, Ishikawa Y, Furuta T, Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of shati/nat8l in the dorsal striatum affects emotional behaviors via dysfunction of

- serotonergic neuronal system in mice. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
- 10 Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Advances and challenges. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
  - 11 村松慎一: パーキンソン病の AADC 遺伝子治療: 長期効果遺伝子発現の検証. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, 東京.
  - 12 Muramatsu S: Gene therapy clinical trial update for AADC. Cell and Gene Therapies for Inherited Metabolic Disease, April 17, 2013, London.
  - 13 Muramatsu S: New frontiers in gene therapy of Parkinson Disease. Nuove frontiere nella terapia del Parkinson, Feb 22, 2013, Italy.
  - 14 村松慎一: Parkinson 病遺伝子治療の長期効果. Long-term outcomes of gene therapy for Parkinson disease. 第 52 回日本定位・機能神経外科学会, 2013 年 1 月 19 日, 岡山.
  - 15 村松慎一: AAV ベクターによる神経疾患の遺伝子治療. 日本薬学界北陸支部 特別講演会, 2012 年 11 月 12 日, 富山.
  - 16 村松慎一: AADC 欠損症の遺伝子治療. 日本人類遺伝学会 第 57 回大会, 2012 年 10 月 26 日, 東京.
  - 17 浅利さやか, 中村優子, 川上忠孝, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一, 福嶋敬宣, 藤本健一, 中野今治: パーキンソン病の遺伝子治療における AADC 遺伝子長期発現. Movement Disorder Society Japan 第 6 回学術集会, 2012 年 10 月 13 日, 京都.
  - 18 Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Progress and current challenges. 2012 Annual meeting of Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease, Oct 9, 2012, Seoul.
  - 19 Sumi K, Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Muramatsu S, Hibi Y, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: The differences of the action of shati between the nucleus accumbens and dorsal striatum on the methamphetamine-induced addictive behaviors in mice. The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Oct 2, 2012, Kobe.
  - 20 村松慎一: Parkinson 病の遺伝子治療. 第 11 回日本再生医療学会総会 パネルディスカッション, 2012 年 6 月 12 日, 横浜.
  - 21 浅利さやか, 村松慎一, 藤本健一, 齋藤順一, 佐藤俊彦, 中野今治: パーキンソン病のすくみ足と青斑核の FMT-PET 解析. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京.
  - 22 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease. 第 53 回日本神経学会総会シンポジウム, 2012 年 5 月 24 日, 東京.
  - 23 Muramatsu S: AADC Gene therapy for Parkinson's disease: results of 3-5 years of follow up. The 15th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, May 16, 2012, Philadelphia.
  - 24 Muramatsu S: Gene therapy: the state of the art. 6<sup>th</sup> International Expert Meeting on the Treatment of Parkinson's disease, Oct 30, 2011, Tokyo.
  - 25 Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Four years follow-up. The 8th Nikko International Symposium 2011, Oct 21, 2011, Tochigi.
  - 26 Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: four years of follow-up. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Sep 17, 2011, Yokohama.
  - 27 村松慎一, 浅利さやか, 川上忠孝, 池口邦彦, 中野今治, 水上浩明, 卜部匡司, 久米晃啓, 小澤敬也, 加藤正哉, 渡辺英寿, 佐藤俊彦: パーキンソン病の遺伝子治療. 平成 23 年度 第 10 回自治医科大学シンポジウム, 2011 年 9 月 2 日, 自治医科大学 地域医療情報研修センター.
  - 28 Muramatsu S: In vivo imaging in cell and gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 17, 2011, Fukuoka.
  - 29 Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: Four years of follow-up. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Best Presentation, Jul 15, 2011, Fukuoka.
  - 30 Muramatsu S: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, 2<sup>nd</sup> Takara Bio Award Lecture, Jul 15, 2011, Fukuoka.
  - 31 Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategies for the local production of dopamine. The Federation of European Biochemical Societies 36<sup>th</sup> FEBS Congress, Jun 30, 2011, Torino.
  - 32 Asari S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Watanabe E, Sato T, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S: PET assessment of the aromatic L-amino acid decarboxylase gene expression in a phase I gene therapy study for Parkinson's disease. 15th International Congress of Parkinson's Disease and

- Movement Disorders, Jun 9, 2011, Toronto.
- 33 浅利さやか, 村松慎一, 藤本健一, 齋藤順一, 佐藤俊彦, 中野今治: パーキンソン病 (PD) の遺伝子治療における AADC 遺伝子の長期発現. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 19 日, 名古屋.
- 34 村松慎一, 奈良優子, 浅利さやか, 宮内ひとみ, 綾部啓子, 滝野直美, 中野今治, 嶋崎久仁子: 血管内投与型 AAV ベクターによる乏突起膠細胞への遺伝子導入. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日, 名古屋.
- 35 ポピエルヘレナ明子, 藤田寛美, 山本和弘, 武内敏秀, 村松慎一, 戸田達史, 和田圭司, 永井義隆: 凝集阻害分子の遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスに対する治療効果. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日, 名古屋.

〔図書〕(計 10 件)

Kondo Y, Okuno T, Asari S and Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. In Human Fetal Tissue Transplantation (editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag, London, 193-203, 2013.

村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療・細胞移植, アクチュアル 脳・神経疾患の臨床 パーキンソン病と運動異常, 辻省次 壮編集, 高橋良輔 専門編集, 中山書店, 東京, 384-391, 2013.

Muramatsu S, Asari S: Assessment of dopaminergic function in Parkinson's disease by SPECT/PET. Horizons in Neuroscience Research Volume 7 (editors: Andres Costa and Eugenio Villalba), Nova Publishers, 219-224, 2012.

Muramatsu S: Gene therapy for continuous dopamine production in Parkinson's disease. Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects (editors: Endo Kudo and Yuriko Fujii), Nova Publishers, 283-286, 2012.

村松慎一: パーキンソン病の A A D C 遺伝子治療, Parkinson's Disease 2012, 山本光利 編, アルタ出版, 東京, 115-120, 2012.

村松慎一: 神経難病の治療のトピックス 遺伝子治療・細胞治療, 神経難病のリハビリテーション-症例を通して学ぶ Journal of Clinical Rehabilitation 別冊, 江藤文夫, 中馬孝容, 葛原茂樹 監修, 医歯薬出版株式会社, 東京, 15-20, 2012.

奈良優子, 村松慎一: 神経疾患②パーキンソン病, つまづき症例で学ぶ 薬の処方徹底トレーニング, 藤村昭夫 編, 羊土社, 東京, 264-274, 2011.

村松慎一: その他の治療法, ガイドラインサポートハンドブック パーキンソン病, 武田篤 編, 医薬ジャーナル社, 大阪, 196-206, 2011.

遺伝子治療は症状改善に有用か, パーキ

ンソン病治療ガイドライン 2011, 日本神経学会 監修, 「パーキンソン病治療ガイドライン」作成委員会 編, 医学書院, 東京, 197-198, 2011.

村松慎一: 細胞移植は症状改善に有用か, パーキンソン病治療ガイドライン 2011, 日本神経学会 監修, 「パーキンソン病治療ガイドライン」作成委員会 編, 医学書院, 東京, 195-196, 2011.

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)