

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591529

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

研究課題名(英文)Development of novel gene therapy for CNS disorders of lysosomal diseases

## 研究代表者

三宅 紀子(MIYAKE, NORIKO)

日本医科大学・医学部・その他

研究者番号：00421206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経病変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。本研究では非侵襲的で安全な中枢神経病変の治療法の開発を目的とし、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、BBBの幼弱な新生児期の治療法を検討した。MLDの治療蛋白であるASA発現9型アデノ随伴ウイルスベクターを新生児期の静脈内投与にて治療効果を検討した結果、脳全体の遺伝子導入に成功し、蓄積物質であるスルファチドの減少ならびに行動実験においても有意に改善を認めた。9型アデノ随伴ウイルスベクターの新生児期の静脈内投与は中枢神経病変の治療法に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the feasibility of adeno-associated viral serotype-9 (AAV9)-mediated systemic neonatal gene therapy of metachromatic leukodystrophy (MLD) mice to treat central nervous system (CNS) disorders. AAV9 vector expressing human arylsulfatase A (AAV9/ASA) was injected into the jugular vein of newborn MLD mice. Global gene transfer into the brain, across the blood brain barrier, and long-term ASA expression in the CNS were detected in treated mice. Significant inhibition of the accumulation of sulfatide (Sulf) in the brain was confirmed by Alcian blue staining and biochemical analysis of the Sulf content. In a behavior test, treated mice showed a greater ability to traverse narrow balance beams than untreated mice. These data clearly demonstrate that MLD mice can be effectively treated through neonatal systemic injection of AAV9/ASA. Thus, AAV9 mediated systemic neonatal gene therapy is useful to treat various CNS disorders.

研究分野：医歯薬学

キーワード：異染性白質ジストロフィー 遺伝子治療 アデノ随伴ウイルス 中枢神経病変

## 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、アシルスルファターゼ A (arylsulfatase A: ASA) の欠損症である異染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 マウスを対象に中枢神経症状を治療する方法として欠損酵素を発現する 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ついて多数・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。また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も報告されている (Biffi *et al.*, Nature Med. 2004, J. Clin. Invest. 2006) が、人への臨床応用においては遺伝子導入細胞の移植率・生着率が悪いために治療効果が発揮されない可能性が高い。我々も遺伝子導入細胞の移植率・生着率を向上させる目的で Homeobox transcriptional factor B4 (HoxB4) を強発現させた骨髄細胞を MLD マウスに移植する事により十分な治療効果を得るのに成功している (Miyake *et al.*, Mol. Ther. 2010) が、人の臨床応用には安全性の問題がある。

以上の背景を基に本研究ではこれまでの研究成果を踏まえ、臨床応用を目的とした、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。近年申請者らは 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た①新生児期の治療法の確立、及び BBB を効率よく通過するための画期的な方法による②成体の神経症状の新規治療法の確立を行っていく。本研究は国内では当教室のみであり、海外でも前述の脳内直接注入及び骨髄移植はあるものの、十分な効果は認められて

おらず、本研究が初めての試みである。

## 2. 研究の目的

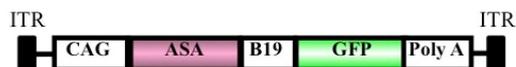
本研究では脳全体の広範囲神経変性を伴う、MLD をモデルとして、①新生児期の治療法の確立、及び BBB を効率よく通過するための画期的な方法による②成体の神経症状の新規治療法の確立を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) AAV ベクターの作製

ASA 発現 9 型 AAV ベクターは 3 種類のプラスミド (ASA 及び GFP 発現 AAV ベクタープラスミド (図 1)、9 型パッケージングプラスミドおよびヘルパープラスミド) を 293 細胞にトリプル・トランスフェクションして作製する。大量の細胞溶解液から硫酸分画と iodixanol による密度勾配遠心法を組み合わせ高濃度のベクターを調整する。

図 1 AAV ベクタープラスミドの構造



### (2) 新生児期治療法の確立

ASA 発現治療用 AAV ベクター (9 型) を新生児期 (生後 48 時間以内) の MLD マウスに  $1 \times 10^{12}$  vector genome 静脈内投与。15 ヶ月後に

- 1) 脳神経組織への導入効率、ASA 発現効率を GFP, ASA 抗体により免疫染色し解析
- 2) 蓄積物質であるスルファチドの染色及び定量
- 3) Balance beam test による行動実験により治療効果判定を行う。

### (3) 成体の神経症状の新規治療法の確立

治療用 AAV ベクターの改良 (BBB を通過可能な血清型、self-complementary AAV (scAAV)) を行い、脳神経組織治療に最良のベクターの選択を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 新生児期治療法の確立：

- 1) 生後 48 時間以内に静脈投与し 15 ヶ月後に解析を行った結果、脳内で導入遺伝子 (治療蛋白) が長期にわたり発現していることを確認した (図 2)。

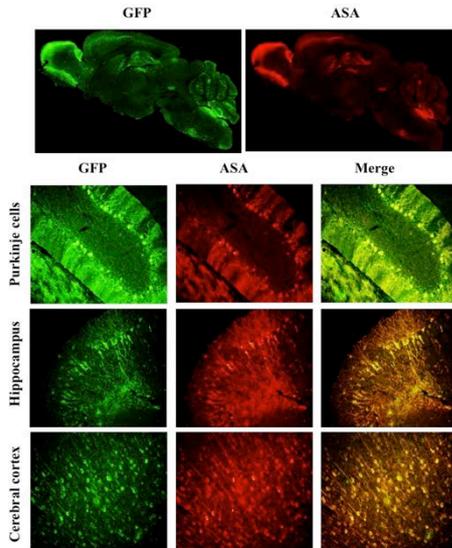


図2 GFP, ASA抗体による免疫染色

- 2) MLDマウスの脳内にスルファチドが蓄積することで神経症状を呈する。この原因物質であるスルファチドをAlcian blue染色により確認をした結果、未治療群に比べ脳全体で蓄積が抑えられていることを確認した(図3)。

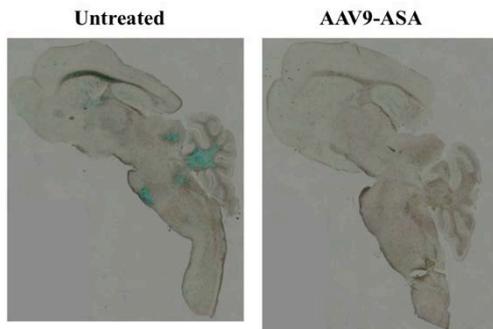


図3 Alcian blue染色

また、thin-layer chromatography assayにて脳内の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認められwild typeと同程度まで改善を認めた(図4)。

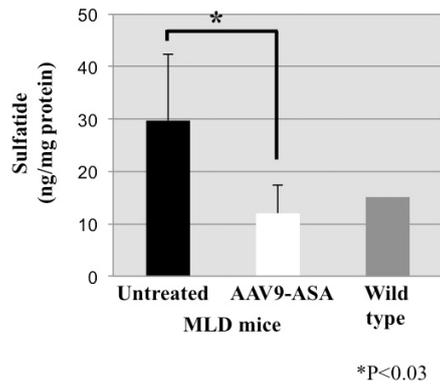


図4 スルファチドの定量

- 3) Balance beamテストによる行動実験 (マウスが棒の橋から黒い箱まで移動する時間(Latency)及び踏み外した回数(Slip)を測定) において、未治療群と比較してAAV投与群が有意に改善を認めた(図5)。

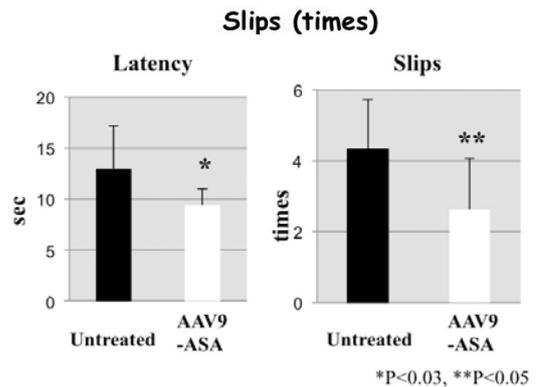


図5 Balance beamテスト

以上の結果より新生児期にAAV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出来、治療効果があることを確認した。このことより、AAV9の新生児期での全身投与は神経症状を呈する、MLDのみならずKrabbe等の中枢神経病変を伴う遺伝病の治療に有効であると考えられる。

## (2) 成体の神経症状の新規治療法の確立

成体においても BBB を通過し遺伝子導入を可能とするために scAAV9/GFP ベクターを作製 (近年 scAAV が従来我々が使用していた single strand AAV (ssAAV) より 20-100 倍高い効率であるといわれている) し、ssAAV9/GFP ベクターと比較検討したところ、scAAV9 ベクター投与により成体でも脳全体に遺伝子導入が可能であった(図 6)。

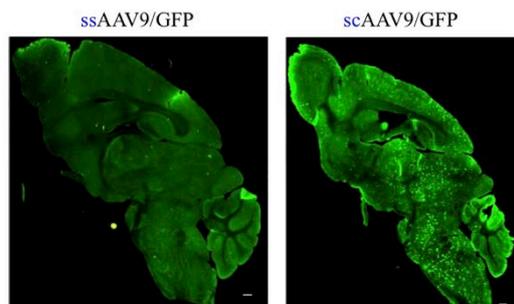


図 6 GFP 抗体による免疫染色

今後 scAAV9 を使用し成体の MLD マウスが治療可能か検討を行う。

### 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 14 件)

1. Igarashi T, Miyake N, Fujimoto C, Yaguchi C, Iijima O, Shimada T, Takahashi H, Miyake K. (2014) Adeno-associated virus type 8 vector-mediated expression of siRNA targeting vascular endothelial growth factor efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. *Mol Vis*. 11:488-496. (査読・有)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24744609>
2. Yamazaki Y, Hirai Y, Miyake K, Shimada T. (2014) Targeted gene transfer into ependymal cells through intraventricular injection of AAV1 vector and long-term enzyme replacement via the CSF. *Sci.Rep*. 4:5506 (査読・有) doi: 10.1038/srep05506.
3. Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Shimada T, Dan K, Inokuchi K. (2014) Inhibition of S100A6 induces GVL effects in MLL/AF4-positive ALL in human PBMC-SCID mice. *Bone Marrow Transplant*. 49:699-703. (査読・有) doi: 10.1038/bmt.2014.18.
4. Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Yamamoto M, Shimada T. (2014) Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector. *Gene Ther*. 21:427-433. (査読・有) doi: 10.1038/gt.2014.17.
5. Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H. (2014) Mutant ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar purkinje cells. *Cerebellum*. 13:29-41. (査読・有) doi: 10.1007/s12311-013-0516-5.
6. Komiyama H, Miyake K, Asai K, Mizuno K, Shimada T. (2014) Cyclical mechanical stretch enhances degranulation and IL-4 secretion in RBL-2H3 mast cells. *Cell Biochem Funct*. 32:70-76. (査読・有) doi: 10.1002/cbf.2973.
7. Sakai A, Saitow F, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Suzuki H. (2013) miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*. 136:2738-2750. (査読・有) doi: 10.1093/brain/awt191.
8. Terasaki Y, Terasaki M, Urushiyama H, Nagasaka S, Takahashi M, Kunugi S, Ishikawa A, Wakamatsu K, Kuwahara N, Miyake K, Fukuda Y. (2013) Role of survivin in acute lung injury: epithelial cells of mice and humans. *Lab Invest*. 93:1147-1163. (査読・有) doi: 10.1038/labinvest.2013.103.
9. Igarashi T, Miyake K, Asakawa N, Miyake N, Shimada T, Takahashi H. (2013) Direct comparison of administration routes for AAV8-mediated ocular gene therapy. *Curr Eye Res*. 38:569-577. (査読・有) doi: 10.3109/02713683.2013.779720.
10. Fujikura T, Takeshita T, Homma H, Adachi K, Miyake K, Kudo M, Takizawa T, Nagayama H, Hirakawa K. (2013) Team-based Learning Using an Audience Response System: A Possible New Strategy for Interactive Medical Education. *J Nippon Med Sch*. 80:63-69, (査読・有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470808>
11. Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada

- T, Hirai Y. (2012) Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *J Nippon Med Sch.* 79: 394-402. (査読・有)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnms/79/6/79\\_394/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnms/79/6/79_394/_article)
12. Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, Wada R, Katsumata Y, Kaneda R, Nakade K, Kurihara C, Obata Y, Miyake K, Fukuda K, Ieda M. (2012) Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of gata4, mef2c, and tbx5. *Circ Res.* 111:1147-1156. (査読・有)  
 doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271148.
  13. Sugano H, Matsumoto T, Miyake K, Watanabe A, Iijima O, Migita M, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T. (2012) Successful gene therapy in utero for lethal murine hypophosphatasia. *Hum Gene Ther.* 23:399-406. (査読・有)  
 doi: 10.1089/hum.2011.148.
  14. Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T. (2012) AAV-8 vector expressing IL-24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice. *Blood.* 119:64-71. (査読・有)  
 doi: 10.1182/blood-2011-05-354050.
- [学会発表] (計 24 件)
1. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Okada T, Shimada T. Trans-BBB gene therapy for metachromatic leukodystrophy using self-complementary type 9 AAV vector. 第 20 日本遺伝子治療学会, 2014.8. 東京慈恵医科大学 (東京)
  2. Yamazaki Y, Hironaka K, Miyake N, Hirai Y, Miyake K, Okada T and Shimada T. Long-term enzyme supplementation into the CSF to treat metachromatic leukodystrophy by intraventricular injection of AAV1 vector. 第 20 日本遺伝子治療学会, 2014.8. 東京慈恵医科大学 (東京)
  3. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M and Shimada T. Successful Treatment of Adult MLD Model Mice By Intravenous Injection of Self-Complementary Type 9 AAV Vector Expressing ASA. 17th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (Washington DC). May, 2014.
  4. Miyake N, Miyake K, and Shimada T. Minimally invasive gene therapy of MLD model mice by intrathecal and intravenous injection of AAV9 vector. 10th WORLD Symposium™ (San Diego, CA). Feb, 2014.
  5. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M and Shimada T. Tolerance induction to arylsulfatase A by AAV mediated neonatal gene transfer into MLD model mice. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 2013.7. 岡山コンベンションセンター (岡山)
  6. Igarashi T, Miyake N, Iijima O, Yaguchi C, Shimada T, Takahashi H and Miyake K. : siRNA Targeting Vascular Endothelial Growth Factor by adeno-associated vector (type 8) efficiently inhibits Neovascularization in a Murine Choroidal Neovascularization Model. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 2013.7. 岡山コンベンションセンター (岡山)
  7. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M and Shimada T. Long-Term Secretion of Arylsulfatase A without Antibody Formation after AAV Mediated Neonatal Gene Transfer into MLD Model Mice. 16th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (Salt Lake City, Utah). May, 2013.
  8. Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, Shimada T. Gene therapy of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. 第4回国際ライソゾーム病フォーラム・第17回日本ライソゾーム病研究会 2012.10. 東京プリンスホテル (東京)
  9. Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, and Shimada T. AAV9 mediated gene therapy of MLD model mice. 20th Annual Meeting of the European Society of Gene & Cell Therapy. (Versailles, France) October, 2012.
  10. Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, Shimada T. Successful treatment of adult MLD model mice by intrathecal administration of AAV9 vector. 第 18 回日本遺伝子治療学会 2012.6. ホテル熊本テルサ (熊本)
  11. Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, and Shimada T. Gene therapy of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. 15th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy.

(Philadelphia, Pennsylvania). May, 2012.

〔図書〕 (計 2 件)

1. Miyake K, Shimada T : Development of Muscle-Directed Systemic Cancer Gene Therapy. Novel Gene Therapy Approaches (Edited by Ming Wei and David Good, Published by InTech) 119-127, 2013.
2. Miyake K, Shimada T : Development and Application of HIV Vectors Pseudotyped with HIV Envelopes. Viral Gene Therapy (Edited by Ke Xu, Published by InTech) 355-370, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

三宅 弘一 (MIYAKE KOICHI)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 90267211

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :