

表 題 AAV ベクターを用いた Niemann-Pick 病 C 型の遺伝子治療の開発

論文の区分 博士課程

著 者 名 黒川 愛恵

担当指導教員氏名 山形 崇倫 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学 専攻
生殖・発達医学 分野
成育医学

目次

1. はじめに	1
2. 対象と方法	6
(1) 対象	6
(2) 方法	6
1) 遺伝子組み換えの AAV ベクター作製	6
2) <i>Npc1</i> 欠失マウスと遺伝子型判定	7
3) AAV- <i>hNPC1</i> ベクター投与経路の確立	8
4) AAV- <i>hNPC1</i> ベクターの投与	9
5) qPCR を用いた AAV- <i>hNPC1</i> 投与後のベクターゲノム量分析	10
6) 逆転写 (RT)-PCR を用いた外因性 <i>hNPC1</i> と内因性 <i>mNpc1</i> の mRNA 発現解析	12
7) Kaplan-Meier 曲線による生存曲線および体重変化の解析	13
8) Rotarod テスト	13
9) 組織学的解析	13
10) 統計学的解析	14
11) 動物実験	14
3. 結果	15
(1) AAV-GFP ベクター投与後の脳での GFP 発現	15
(2) ベクターゲノム DNA の検出	17

(3) <i>hNPC1</i> と <i>mNpc1</i> の mRNA 発現	-----
(4) 生存解析	-----20
(5) 体重変化	-----22
(6) Rotarod テスト	-----22
(7) 行動解析	-----23
(8) 組織学的解析	-----24
4. 考察	-----26
5. おわりに	-----31
6. 参考文献	-----32
7. 謝辞	-----38

略語

【英語】 アルファベット順

AADC: aromatic-amino acid decarboxylase

AAV: adeno-associated virus

BBB: blood brain barrier

CaMK II: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

CMV: cytomegalovirus

CNS: central nervous system

EF1 α : elongation factor 1-alpha

ITR: inverted terminal repeat

NFTs: neurofibrillary tangles

NPC1: Niemann-Pick disease type C1

NPC2: Niemann-Pick disease type C2

PBS: phosphate buffered saline

SV40: simian virus 40

Syn I: Synapsin I

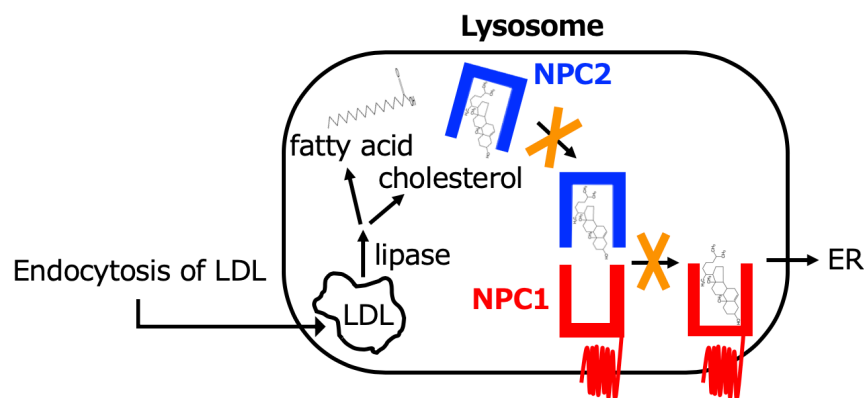
1. はじめに

ライソゾームは細胞内小器官の一つで、高分子化合物の加水分解に加え栄養素の感知、代謝適応、蛋白や細胞小器官の品質管理といった栄養素依存シグナル伝達の役割を担っている [1]。このライソゾームに関わる酵素等の異常による代謝経路の基質の蓄積により、さまざまな臓器に障害を引き起こす遺伝性疾患群の総称をライソゾーム病という。ライソゾーム病はそれぞれの病因により、① 酵素活性の低下、② 酵素活性制御蛋白質の異常、③ 酵素蛋白質の翻訳後修飾の障害、④ ライソゾーム膜の異常、の4つに分類される。

ニーマンピック病 C 型 (Niemann-Pick disease type C) は、ライソゾーム膜蛋白 NPC1 をコードする *NPC1* (Niemann-Pick disease type C1) またはライソゾーム分泌蛋白 NPC2 をコードする *NPC2* (Niemann-Pick disease type C2) 遺伝子の変異が原因で発症し [2, 3]、患者の約 95% は *NPC1* 遺伝子変異が原因である [4]。ニーマンピック病 C1 型 (Niemann-Pick disease type C1; NPC1; OMIM #257220) は、18q11 に存在する *NPC1* 遺伝子の変異により発症する常染色体潜性遺伝の脂質蓄積病である。NPC1 の発症率は 1:100,000 を超えると報告されており [5]、日本人患者は 34 例 (2015 年 12 月時点) 報告されている [6]。NPC1 遺伝子は 24 のエクソンからなり、mRNA は 3.8kb (開始コ

ドンから終始コドン； 3837 bp) で、300 種以上の病原性変異が報告されている [7]。

NPC1 蛋白は後期エンドソームまたはライソゾームから膜へのコレステロール輸送において主要な役割を持ち (図 1) [8]、NPC の機能障害によりライソゾーム内、細胞内にコレステロールが蓄積する。それによりライソゾーム内酵素の機能が低下し、他のスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質といったスフィンゴ脂質が蓄積し、中枢神経系 (CNS) における神経変性、特に小脳での Purkinje 細胞の脱落をきたす [9]。



(図 1) ライソゾーム内に存在する NPC1 および NPC2

NPC2 蛋白はライソゾーム内で遊離型コレステロールと結合し、13 回膜貫通蛋白である NPC1 に受け渡しコレステロールの共役輸送を有している [3, 8]。

NPC1 は全身性の進行性の疾患で、主要症状は神経症状と肝臓の機能不全に起因し、およそその発症年齢と症状は相関する [10]。内臓-神経変性型として乳児早期型 (生後 3 か月齢～2 歳未満発症)、神経変性型として乳児後期型 (2 歳以上～6 歳未満発症) と若年期型 (6 歳以上～15 歳未満発症)、そして精神-神経変性型として青

年期/成人期型 (15 歳以上発症)、と神経症状の発現時期により 4 つに分類される。

乳児早期型では、精神運動発達の遅滞・退行や筋緊張低下で発症し、5 年以内に

95% 以上が死亡する [11]。乳児後期型では、進行性の運動失調、言語発達遅滞、不

器用さ、垂直性核上性注視麻痺を生じ、てんかんを有する頻度も高い。若年期型は

学習困難などの認知機能障害や進行性の失調歩行などの協調運動障害、そして垂直

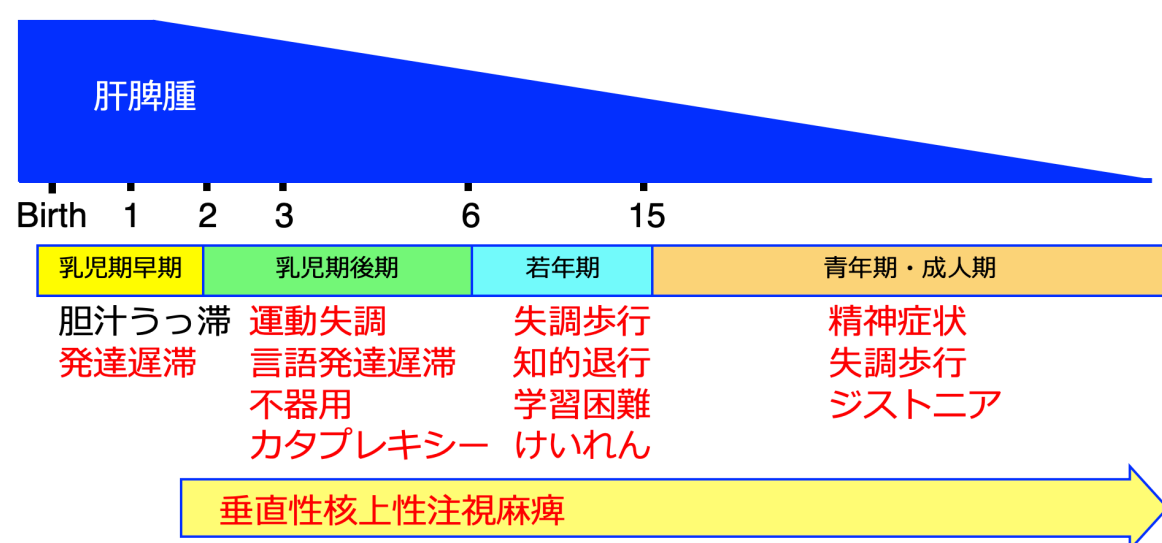
性核上性注視麻痺を生じる。一方、青年期/成人期型では精神症状が先行し、神経症

状の進行は緩徐なことが多く、診断の遅れも珍しくない。これらに加え、出生前/新

生児期（生後 3 か月未満）に発症することもあり、その場合は胎児水腫や肝脾腫、

長期胆汁うっ滞を生じて 8-9% の症例では急速に肝不全や多臓器不全を呈し 6 か月以

内に死亡する (図 2) [12, 13]。



(図 2) NPC の臨床症状と経過

NPC は臨床経過から乳児早期型、乳児後期型、若年期型、青年期/成人期型に分類

される。肝脾腫は乳児期に見られやすく、その後目立たなくなることが多い。

NPC1 は、乳児期の肝脾腫を伴う重症肝不全や上記神経症状等の臨床症状から疑われる。臨床診断には、症状の組み合わせから評価する NPC Suspicion Index が用いられ [14]、骨髓検査でコレステロールが蓄積した白血球である泡沫細胞の検出と、白血球や線維芽細胞での非エステル化コレステロールの蓄積を検出する filipin 染色が診断に有用で、遺伝解析によって確定診断される [12]。診断、スクリーニングのマーカーとして、異常胆汁酸、オキシステロール、リゾスフィンゴミエリンなども挙げられている [10]。神経病理所見として、特に大脳・小脳の白質、脳幹、脊髄後索といった脳全体での神経細胞や軸索の腫大・変性を示し [15]、糸屑状構造物 (neuropil threads) を伴う神経原線維変化 (neurofibrillary tangles; NFTs) や Lewy 小体も見られることは特徴的である。NFTs の構成蛋白質はタウであり、NPC1 の若年期型および青年期/成人期型、そして乳児後期型の一部で、タウの蓄積が見られている [16]。また、Lewy 小体の構成蛋白質は α シヌクレインと同定されており、NPC1 患者の 75% で観察されたことが報告されている [17]。高度の脱髄が生じた報告もあり [18]、疾患末期には神経細胞の脱落により大脳も小脳も萎縮し [4]、特に前頭葉や側頭葉での萎縮が著しかったという報告もある [19, 20]。

唯一承認されている治療薬ミグルスタットは、グルコシルセラミド合成酵素阻害薬で、疾患の進行を遅らせることのみできる [21]。分子シャペロンの機能を強化し変異した NPC 蛋白構造を小胞体内で改善する、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるポリノスタット [22]や、膜でのコレステロール輸送動態を改善する 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP β CD) [23, 24] 等の他のいくつかの治療も研究されている。シクロデキストリン/アロプレグナノロンとミグルスタットを組み合わせた治療で、マウスの小脳のニューロンの数の増加と共に運動機能の改善が報告されている [25, 26]。しかし、これらの治療法ではわずかな改善効果しか見られていない。

近年、アデノ随伴ウイルス (AAV) 9 ベクターを用いた遺伝子治療が NPC1 のモデルマウスを用いて開発されている [27, 28, 29]。サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを用いマウスの左心室投与、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMK II) プロモーターを用い後眼窩静脈叢投与、伸長因子 (EF1 α) プロモーターを用い後眼窩静脈叢投与、シナプシン I (Syn I) プロモーターを用い両側脳室投与、等の方法が取られている。これらの遺伝子治療では、生存期間の延長、神経変性や行動解析の改善が得られたが、生存期間は最長が EF1 α プロモーターを用いた治療ベクターを全身投与した報告での 97 日間の延長である。我々は、先行研究より良

い効果を得るためには、CNS における広範囲での遺伝子導入が重要であると考え、

Npc1 のノックアウトマウスにおける左側脳室と大槽への投与の組み合わせによる治

療を行った。

2. 対象と方法

(1) 対象

モデル動物

NPC1 モデル動物として、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より自然突然変異由来の FVB.C-*Npc1*^{m1N}/J (Stock#021755、*Npc1* 欠失マウス) のヘテロ欠失型マウスを購入し、交配させてホモ欠失型 (*Npc1*^{-/-}) マウスを得た [30]。

(2) 方法

1) 遺伝子組み換えの AAV ベクター作製

AAV ベクタープラスミドは、AAV3 ゲノムの末端逆位反復配列 (ITR) の間にサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、目的遺伝子、シミアンウイルス 40 (SV40) のポリアデニル化シグナル (polyA) から成る発現カセットを組み込んだ。AAV.Rep/VP プラスミドは、AAV3 の rep 蛋白質と AAV9 の VP1 蛋白質を発現する。VP1 配列は、1337 のチミジンをアデニンに置換することにより、446 のアミノ酸をチロシンからフェニルアラニンに変換した。AAV ベクタープラスミド、AAV.Rep/VP プラスミド、

およびアデノウイルスヘルパープラスミド pHelper (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) の三種類のプラスミドを HEK293 細胞へトランスフェクションし、組み換え AAV ベクターを産生した [31]。組み換えウイルスは CsCl 勾配による超遠心分離により精製した。ウイルス力価は qPCR により測定した。

目的遺伝子としては、緑色蛍光蛋白質 (GFP) またはヒト NPC1 遺伝子 (AAV-*hNPC1*, GenBank, AB209048.1) の cDNA を組み込み、チロシン変異型 AAV9/3-CMV-GFP ベクター (AAV-GFP) およびチロシン変異型 AAV9/3-CMV-*hNPC1* ベクター (AAV-*hNPC1*) を作製した。

2) *Npc1* 欠失マウスと遺伝子型判定

生後 2-3 日の仔マウスの尾 (先端 1 mm) を採取し、ゲノム DNA を抽出し、PCR (95°C で 30 秒間の DNA 変性、58°C で 45 秒間のアニーリング、72°C で 45 秒間の伸長を計 47 サイクル) を行い、遺伝型を決定した。マウスの同定に用いたプライマーは、野生型アレルおよび欠失型アレルのフォワードに 5'-GGTGCTGGACAGCCAAGTA-3'、リバース配列は野生型に 5'-CGATGGCAGATGAGCTACAG-3'、欠失型に 5'-TGAGCCCAAGCATAACTTCC-3'を使用した。

マウスには標準的なマウス用の餌 (RodentDiet CE-2, CLEA Japan, Shimizu, Japan) を与えた。さらに、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスが上記の標準的な硬い餌を摂食出来なくなる生後 9 週から、マウス全群にゼリー状の餌 (DietGel® 76A and DietGel® Recovery; Clear H₂O®, Portland, ME, USA) を加えた。DietGel® 76A は日々の餌として、DietGel® Recovery は週に 1 回補助食として与えた。

マウスを下記 5 つのグループに分けた。a グループ：AAV 治療群 *Npc1*^{+/+} マウス、ゼリー状の餌あり、b グループ：AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウス、ゼリー状の餌あり、c グループ：生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-} マウス、ゼリー状の餌あり、d グループ：無治療群 *Npc1*^{-/-} マウス、ゼリー状の餌あり、e グループ：無治療群 *Npc1*^{-/-} マウス、ゼリー状の餌なし。マウスの数は、a グループは 11 匹、b グループは 12 匹、c グループは 11 匹、d グループは 6 匹、そして e グループは 6 匹とした (表 1)。

(表 1) マウスのグループ分け

グループ	ゲル餌給餌	治療	n
a AAV 治療群 <i>Npc1</i> ^{+/+}	+	AAV-hNPC1	11
b AAV 治療群 <i>Npc1</i> ^{-/-}	+	AAV-hNPC1	12
c 生理食塩水投与群 <i>Npc1</i> ^{-/-}	+	生理食塩水	11
d 無治療群 <i>Npc1</i> ^{-/-}	+	—	6
e 無治療群 <i>Npc1</i> ^{-/-}	—	—	6

3) AAV-hNPC1 ベクター投与経路の確立

小脳を含む脳全体に AAV ベクター発現させるより良い投与経路を確立するために、AAV-GFP ベクターを用いて導入方法を検討した。まず、力価 2.6×10^{10} vg/ μ L の AAV-GFP ベクターをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 倍希釈し、生後 4-5 日のマウスの左側脳室に 5 μ L を注入した。投与部位は、ラムダ縫合から 0.75 mm 鼻側、正中線から 0.25 mm 左側、深さ 2 mm とした。次に、大槽 (頭蓋骨の最下部点、深さ 2 mm) へ AAV-GFP ベクター 10 μ L を投与した。AAV-GFP ベクターを *Npc1*^{-/-} マウス 6 匹の左側脳室と大槽に、*Npc1*^{-/-} マウス 3 匹の左側脳室に投与した。投与 3 週間後に、マウスから脳を摘出し、実体顕微鏡 (M165 FC Leica, Wetzlar, Germany) を用いて GFP の発現を評価した。脳の摘出後、4% パラホルムアルデヒドに 3 日間浸して固定し、15% sucrose に置換して 3 日後、30% sucrose に 3 日間浸した。その脳組織を O.C.T.コンパウンド (Sakura Finetek Co., Ltd., Tokyo, Japan) で包埋して凍結させ、厚さ 30 μ m の切片として、蛍光顕微鏡 (BZ-X810, Keyence, Osaka, Japan) で GFP を検出した。また、Hoechst 染色 (1 : 5000、Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) を行い、共焦点顕微鏡 (FluoView™ FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

4) AAV-*hNPC1* ベクターの投与

力価： 1.8×10^{10} vg/ μ L の AAV-*hNPC1* ベクターを PBS で 2 倍希釈し、頭部を覆う毛が生える前の生後 4-5 日のマウスの左側脳室に 5 μ L と大槽に 10 μ L、マウス 1 匹当たり計 15 μ L (1.35×10^{11} vg) を投与した。コントロール群のマウスには、生理食塩水を同部位に同量投与した。投与前には冷却麻酔を行い、氷上に乗せたビニールシートにマウスを乗せ、動作停止後固定機器へと移動させた。AAV-*hNPC1* 投与後は、マウスを 37°C のホットプレートの上に乗せ、温めてから母マウスのケージへ戻した。

5) qPCR を用いた AAV-*hNPC1* 投与後のベクターゲノム量分析

AAV-*hNPC1* 投与 10 週後、マウスを CO₂ 麻酔で sacrifice し組織を摘出した。その後 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) を用いて脳、小脳、脳幹、脊髄、肝臓からゲノム DNA を抽出した。qPCR はゲノム DNA 100 ng を用い実施した。AAV ベクターゲノムの量測定のため、スタンダード曲線は 1 μ L の AAV-*hNPC1* 溶液を濃度 10^2 - 10^7 vg/ μ L の範囲でテンプレートとして使用した。製造業者のプロトコールに従って、2x TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA) とゲノム DNA、プライマー、AAV-*hNPC1* の特異的配列に位置する

dual fluorescently-labeled (FAM/MGB) プローブと共に Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、quantitative real-time PCR を実施した。プライマー配列およびプローブの配列は表 2 に記載する。

PCR の条件は、95°C で 20 秒間加熱後、アニーリングは 95°C で 3 秒間、エクステンションは 60°C で 30 秒間を 40 サイクル行った。それぞれの実験は 3 回行い、その平均±データを標準誤差 (SEM) を用いて示した。

(表 2) ベクターゲノム DNA と外因性 *hNPC1* および内因性 *mNpc1* の mRNA の発現を検出するためのプライマーおよびプローブの配列

Target	Product Size (bp)	Primer	Annealing Temperature (°C)
Vector	(F)	5'-GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA-3'	
	(R)	5'-GTCGACGGATCCGAATTCG-3'	60
	(P)	5'-FAM-ACCGGTTCGAAGCGA-MGB-3'	
<i>hNPC1-1</i>	(F)	5'-GTGTACGGTGGGAGGTCTAT-3'	62

	(R)	5'-TGTCTGAAGCTGCCGAACAT-3'	
<i>hNPC1-2</i>	(F)	5'-CGGTGGGAGGTCTATATAAGCA-3'	
	263		62
	(R)	5'-TTTGGCAATGGTTTTGGTGGG-3'	
<i>hNPC1-3</i>	(F)	5'-GTATGCCGATTACCACACG-3'	
	246		62
	(R)	5'-AACTCTTTTTTCCCAGGCCTG-3'	
<i>mNpc1</i>	(F)	5'-CTACGCTGATTACCACACAC-3'	
	247		64
	(R)	5'-AAACTCTTTCTCCCAGGCC-3'	
mGAPDH	(F)	5'-CGGGGCCCCACTTGAAGG-3'	
	440		64
	(R)	5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3'	

mNpc1: murine Npc1, hNPC1: human NPC1, mGAPDH: murine GAPDH,
F: forward, R: reverse, P: probe

6) 逆転写 (RT) -PCR を用いた外因性 *hNPC1* と内因性 *mNpc1* の mRNA 発現解析

外因性 *hNPC1* と内因性 *mNpc1* の発現を確認するため、AAV-*hNPC1* 投与 10 週間後の AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウス、そして同週齢の無治療群 *Npc1*^{+/+}、*Npc1*^{-/-} マウスそれぞれから脳、肝臓、肺、心臓を摘出し RT - PCR を実施した。マウス組織から抽出した全 RNA を用いた RT - PCR は、既報告と同様に実施した [32]。マニュアルプロトコ

ルに従い、液体窒素下に粉碎した凍結組織から TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。その total RNA 1µg を SuperScript™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により逆転写して cDNA を作製した。cDNA 1 µL をテンプレートとして TaKaRa rTaq™ DNA Polymerase (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) を用いた PCR 増幅を行った。それぞれのプライマー (表 2) を用い、94°Cで 2 分間加熱後、94°Cで 15 秒間・62 または 64°Cで 30 秒間・72°Cで 1 分間を 30 サイクル、そして 72°Cで 7 分間追加伸長を行った。内部コントロールとして、マウスのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) も同じ PCR 条件を用い、それぞれの組織サンプルで測定した。脳は大脳皮質を使用した。

RT-PCR 後 1.5 % アガロースを用いてゲル電気泳動し、Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) でバンドのシグナル強度を各臓器とポジティブコントロール (AAV-plasmid) DNA とを比較して解析した。

加えて、ベクターゲノム DNA の検出を避けるため、total RNA を Invitrogen™ ezDNase™ Enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で処理をした後、*hNPC1-3* のプライマーセットを用いて同様の解析を実施した。

7) Kaplan-Meier 曲線による生存曲線および体重変化の解析

各マウスの生存を Kaplan-Meier 曲線にプロットした。マウスそれぞれの体重変化は、生後 5 週から毎週体重測定を行いグラフにプロットした。

8) Rotarod テスト

各グループでの運動機能を比較するために、Rotarod テストを実施した。マウスを加速する車輪 (Rotarod; O'HARA & CO., LTD., Tokyo, Japan) の上に乗せ、その車輪から落ちるまでの時間を測定した。既報告の通り、回転するバーは直径 30 mm で 4-40 rpm の速度で回転させた [33]。

9) 組織学的解析

生後 11 週のマウスから前述の通り各組織を摘出後に処理し、脳の厚さ 30 μm の切片を作製し、後述の抗体を使用し免疫組織学的解析を行った。一次抗体として抗カルビンジン抗体 1:1500 (c9848, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)、二次抗体としてヤギ抗マウス IgG H&L Alexa Fluor[®] 594 1:300 (ab150116; Abcam) を希釈して使用した。画像は BZ-X810 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan) と共焦点画像を FluoView[™] FV1000 confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan) を用い取得した。

Filipin 染色は、肝臓を厚さ 10 μm の切片にし、PBS で 3 回の洗浄後、室温で 1.5 mg/mL のグリシン/PBS で 10 分間インキュベートした。その後、filipin from *Streptomyces filipinensis* (F9765; Sigma-Aldrich Co.) を 25 mg/mL になるように DMSO で希釈した stock solution 2 μL と 10% FBS/PBS 1 mL を混ぜて製成した filipin ワーキングソリューションにより暗所で 2 時間染色をした。さらに PBS で 3 回の洗浄後に、BZ-X810 fluorescence microscope を用いて肝臓標本の組織画像を得た。

10) 統計学的解析

GraphPad Prism 8 ソフトウェアプログラム (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、グラフ作成やベクターゲノム DNA qPCR や生存、rotarod テストのデータの統計学的解析を行った。生存率は Kaplan-Meier 曲線を使って判定した。3 グループ間における rotarod 上の時間の比較には、Wilcoxon's signed-rank test を使用した。

11) 動物実験

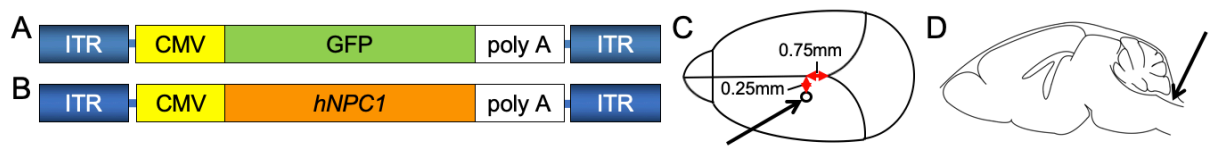
動物実験は、自治医科大学の動物実験委員会により承認を得て実施した。(承認番号, 17213-02)

3. 結果

(1) AAV-GFP ベクター投与後の脳での GFP 発現

前述した AAV-GFP (図 3. A) を生後 4-5 日のマウスの左側脳室 (図 3. C) と大槽 (図 3. D) に投与し、3 週間後の脳全体の GFP の分布は実体顕微鏡で観察した。AAV-GFP を左側脳室と大槽に投与した *Npc1*^{-/-} マウスは、全 6 匹で小脳を含む脳全体で GFP の発現を呈した (図 4. A)。これに対して、左側脳室のみに AAV-GFP を投与した *Npc1*^{-/-} マウス 3 匹では左半球の中心部に限局して GFP の発現が見られた (図 4. B)。

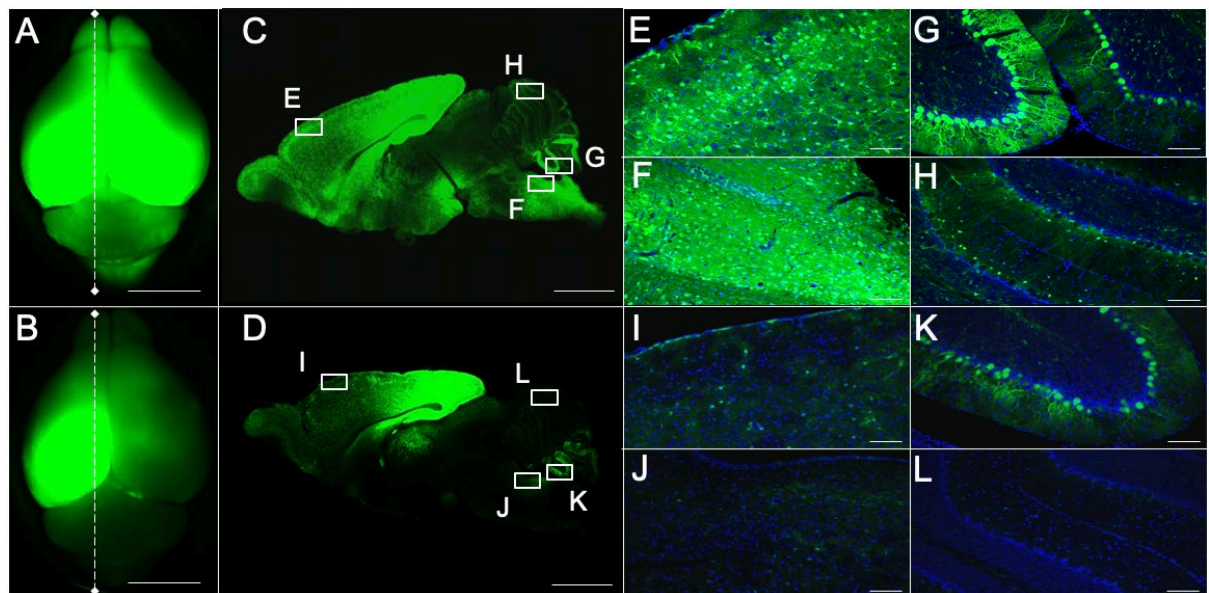
組織学的解析で、左側脳室および大槽投与で GFP の広汎な発現を確認した。左側脳室および大槽投与後の脳全体の矢状断切片で、大脳で高度の、小脳で軽度のシグナルを検出した (図 4. C)。特に、前頭皮質 (図 4. E)、脳幹 (図 4. F) そして小脳の下部領域 (図 4. G) で強いシグナルを検出した。しかし、小脳の上部 (図 4. H) のシグナルは弱かった。一方、左側脳室のみに投与したマウスの脳では、左頭頂葉のみで高いシグナルが検出された (図 4. D, I-L)。



(図 3) AAV-GFP および AAV-*hNPC1* ベクターと投与経路

(A, B); CMV プロモーターを使用し作製したチロシン変異型 AAV9/3 ベクター。

発現カセットには、ITR (inverted terminal repeat) の間に CMV (cytomegalovirus) プロモーター、*GFP* (green florescent protein) (A) またはヒト *hNPC1* (Niemann Pick type C1 遺伝子の cDNA) (B)、SV40 の polyA を組み込んだ。カプシドはチロシン変異型 AAV9 を使用した。(C) ラムダ縫合から 0.75 mm 前方、0.25 mm 左側で深さ 2 mm を投与位置として設定し、AAV-GFP ベクター 5 μ L を左側脳室に投与した。(D) 大槽には AAV-GFP ベクター 10 μ L を投与した。矢印はそれぞれの投与部位を示す。



(図 4) 中枢神経系での AAV-GFP ベクターの発現

(A-L); AAV-GFP ベクター投与 3 週間後のマウスの脳における GFP ベクターの発現分布解析を示す。(A, C); 大槽および左側脳室投与。(B, D); 左室脳室内投与。(A, B); 実体顕微鏡で得た脳全体の GFP 蛍光画像 (C と D はそれぞれ A と B の矢状断切片画像である)。(E-H, I-L); 共焦点

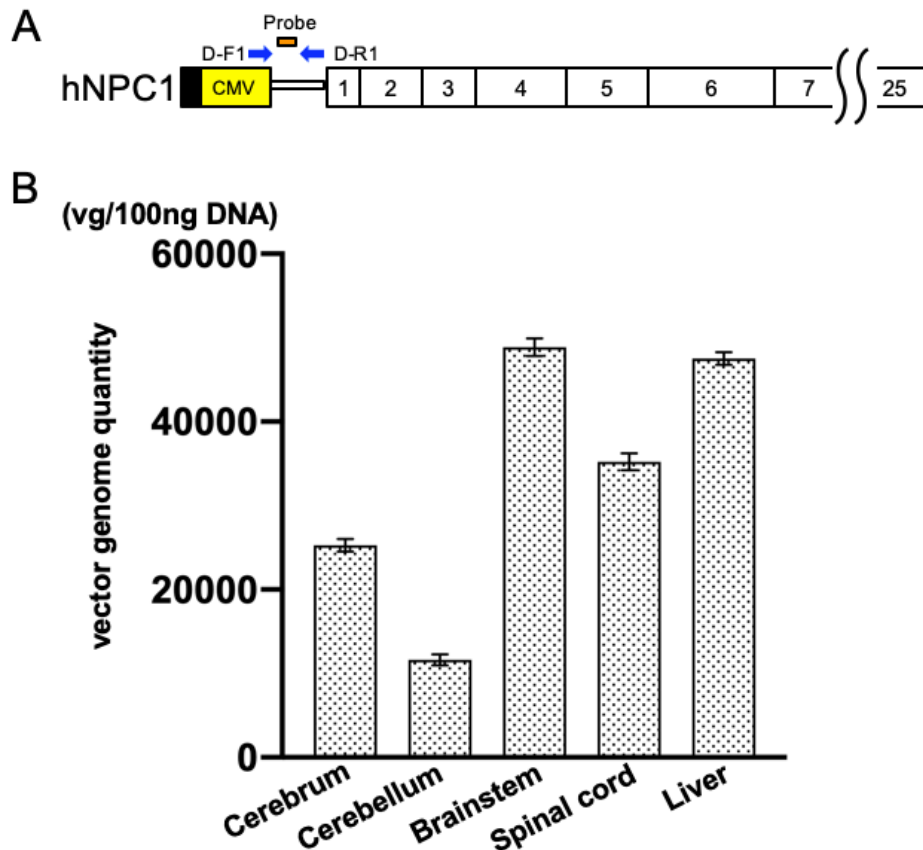
顕

微鏡を用いた強拡大画像。前頭葉 (E, I), 脳幹 (F, J), 小脳下部 (G, K), そして小脳上部 (H, L)を示す。蛍光は大腦皮質で強く発現し、小脳・脳幹でもシグナルが検出された(A, C)。大腦左半球に強い蛍光、右半球にわずかな蛍光を観察したが、小脳・脳幹の蛍光はごくわずかしき認められなかった(B, D)。大槽投与を併用した E-H では左側脳室のみに投与した I-L より強い染色性を認めた。

Scale bar = 5 mm (A, B), 2 mm (C, D), 100 μ m (E-L, I-L)

(2) ベクターゲノム DNA の検出

AAV-*hNPC1* におけるプローブとプライマーの位置は図 5. A に示す。ベクターゲノム DNA を D-F1 と D-R1 のプライマーセットを用いて増幅した結果、ベクターゲノムは中枢神経系の広い領域で検出され、特に脳幹 (100 ng DNA 当たりの平均ベクターゲノム : 48867.2) と脊髄 (35218.5) で高値だった (図 5. B)。また肝臓 (47525.2)、大腦 (25265.9) でも検出され、大腦に比較し低値だが小脳 (11623.4) でも検出された (図 5. B)。



(図 5) ベクターゲノム DNA の発現分布

(A) ベクターに導入した *hNPC1* cDNA の構造、プライマーとプローブの位置を示す。数字はエクソン番号を表す。ベクターゲノム DNA は D-F1 と D-R1 のプライマーセットを用いて増幅した。(B) qPCR によるベクターゲノム DNA の定量化。ベクターゲノムは脳幹と脊髄を含む中枢神経系で広範囲に検出した。

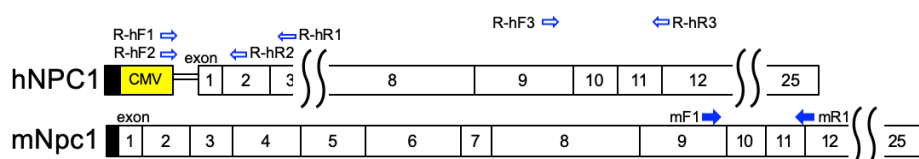
hNPC1: ヒト Niemann-Pick 病 C1 型、vg/100 ng DNA: 100 ng DNA 当たりのベクターゲノム、M: 分子マーカー、Control: cDNA テンプレートを含まないネガティブコントロール

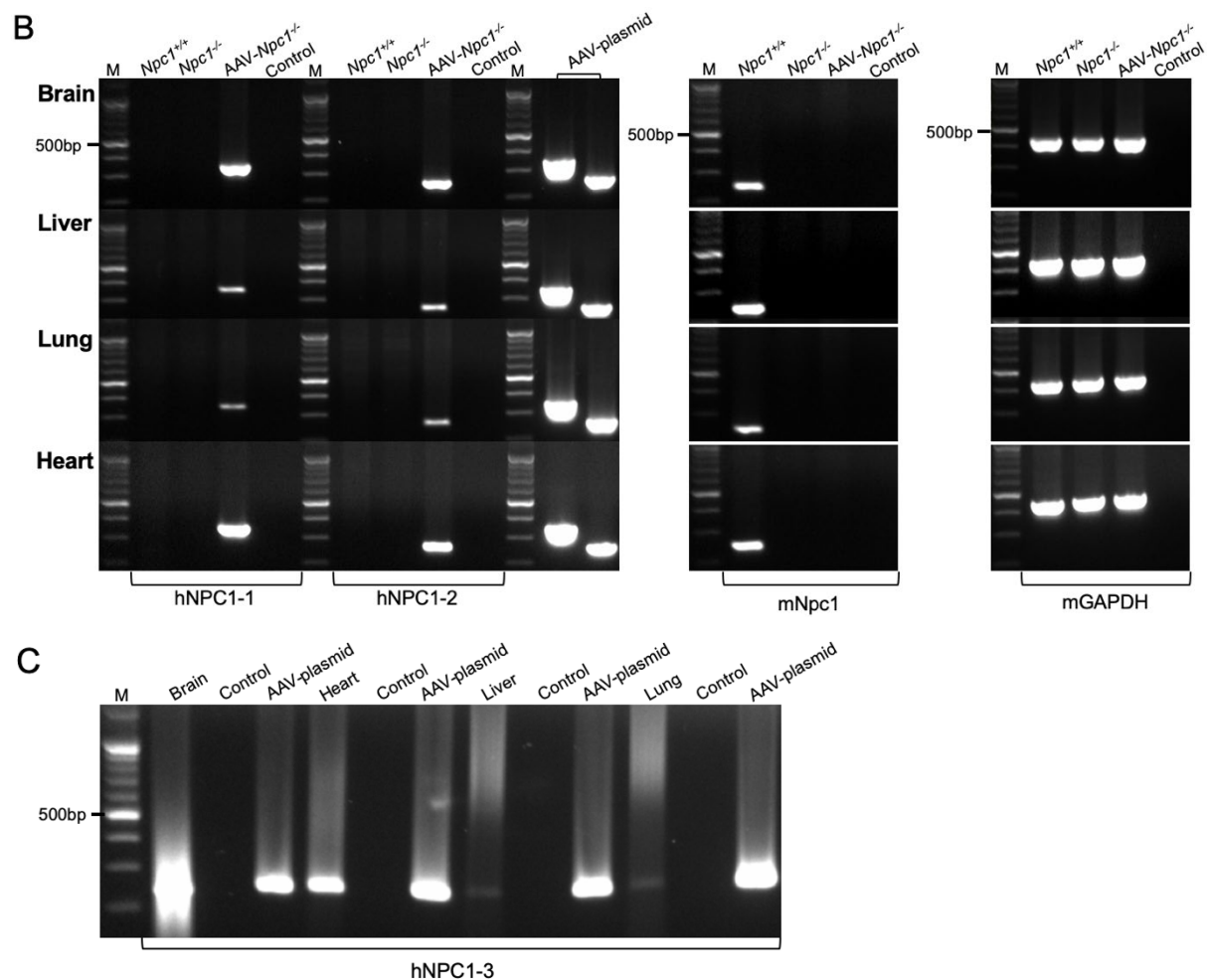
(3) *hNPC1* と *mNpc1* の mRNA 発現

AAV-*hNPC1* ベクターの発現を検出するため、*hNPC1* mRNA の発現を検出するプライマー2セット;*hNPC1*-1 (R-hF1 と R-hR1)と *hNPC1*-2 (R-hF2 と R-hR2)を用いて RT-PCRを行った (図 6. A)。いずれのプライマーセットを用いても AAV 治療群 *Npc1*^{-/-}マウス

の脳では *hNPC1* の発現が検出され、無治療群 *Npc1*^{+/+} および *Npc1*^{-/-} マウスの脳では検出されなかった (図 6. B)。*hNPC1* の発現は、中枢神経系に加えて肝臓、肺、心臓でも検出された。ポジティブコントロールとして AAV-plasmid をテンプレートとして用いた場合と比較して *hNPC1* RNA の発現比を脳、肝臓、肺、心臓それぞれで解析した。得られたバンドの強度を、ポジティブコントロールの AAV-plasmid をそれぞれ 1 として比較した際、*hNPC1*-1 のプライマーセットでは、脳、肝臓、肺、心臓の数値はそれぞれ 0.31, 0.09, 0.05, 0.50 で、*hNPC1*-2 のプライマーセットではそれぞれ順番に 0.45, 0.16, 0.09, 0.55 だった (表 3)。マウスの *Npc1* (*mNpc1*) RNA は無治療群 *Npc1*^{+/+} マウスでは検出されたが、無治療群および AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは検出されなかった (図 6. B)。更に、ベクターゲノム DNA の検出の可能性を考慮して DNase 処理を加え、プライマーの位置も *hNPC1* 遺伝子内に設計したプライマーセット *hNPC1*-3 (R-hF3 と R-hR3)でも RT-PCR を実施した。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの脳と心臓では *hNPC1* の発現が明確に検出され、肝臓と肺ではシグナルが弱い同部位にバンドの検出を認めた (図 6. C)。

A





(図 6) *hNPC1* および *mNpc1* mRNA の発現

(A) プライマーの位置を示す。長方形はそれぞれコードされているエクソン領域を表した。
hNPC1 の mRNA は、R-hF1 と R-hR1、R-hF2 と R-hR2、R-hF3 と R-hR3 の 3 つのプライマーセットを用いて増幅した。(B) 大脳皮質、肝臓、肺、心臓における導入遺伝子特異的 mRNA の検出。導入遺伝子に特異的な *hNPC1* は AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでのみ検出され、無治療群 *Npc1*^{+/+}, *Npc1*^{-/-} マウスでは検出されなかった。AAV9/3-CMV-*hNPC1* プラスミドをポジティブコントロールとして用いた。また、*mNpc1* の mRNA は無治療群 *Npc1*^{+/+} でのみ検出され、AAV 治療群および無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは検出されなかった。mGAPDH はいずれのマウスでも検出することを確認した。(C) total RNA を DNase 処理後に R-hF3 と R-hR3 のプライマーセットを用いて増幅し、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの大脳、心臓、肝臓、肺における *hNPC1* の mRNA を検出した。

hNPC1: ヒト Niemann-Pick 病 C1 型遺伝子、*mNpc1*: マウス Niemann-Pick 病 C1 型遺伝子、

M: 分子マーカー、Control: cDNA テンプレートを含まないネガティブコントロール

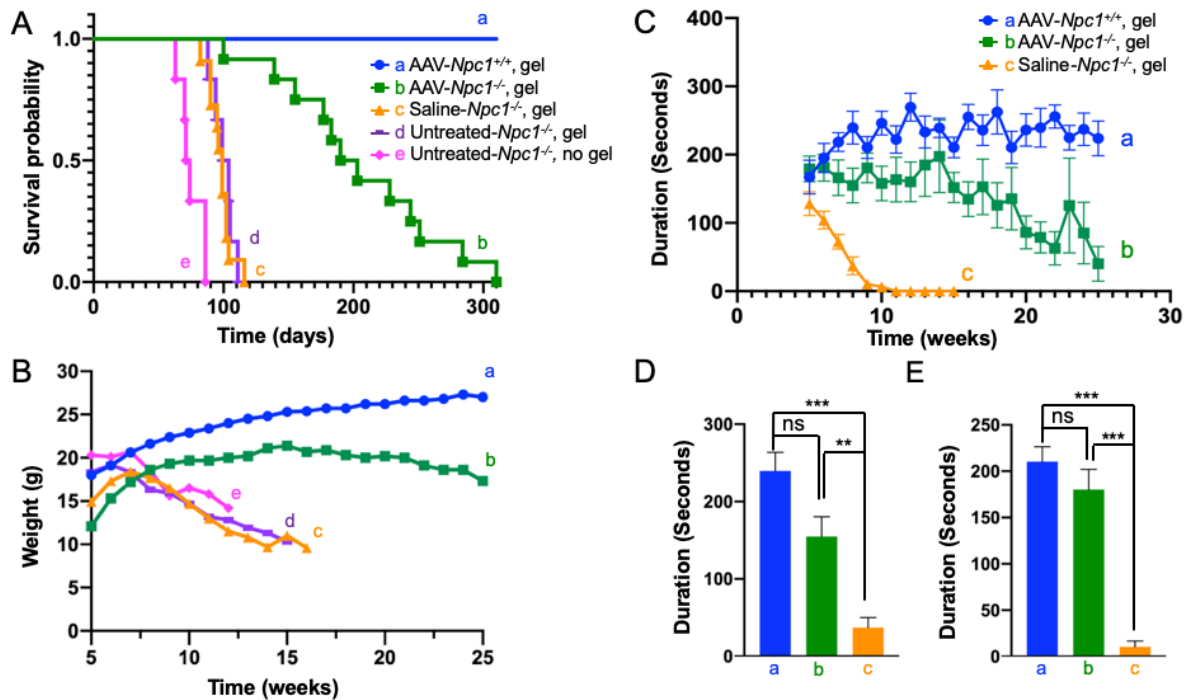
(表 3) *hNPC1* mRNA の発現解析

Tissue/AAV-plasmid	Primer	
	<i>hNPC1</i> -1	<i>hNPC1</i> -2
Brain	0.31	0.45
Liver	0.09	0.16
Lung	0.05	0.09
Heart	0.50	0.55

hNPC1; human *NPC1*

(4) 生存解析

無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスは 63-86 日間生存し (図 7. Ae)、生後 9 週以降にゼリータイプの餌を与えることで生存期間は 20-25 日間延長した (図 7. Ac, Ad)、しかし、全ての無治療群または生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-} マウスは生後 13 週以内に死亡した。生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-} マウスの平均生存期間は 98 日間 (範囲は 82-116 日間) (図 7. Ac) だったが、一方で AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの平均生存期間は 205 日間であり、約 105 日間の延長が得られた。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの最長生存期間は 310 日間だった (図 7. Ab)。



(図 7) AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの生存期間、体重、rotarod テストの改善

(A) Kaplan-Meier 生存率曲線を示す。ゼリー状の餌を給餌しなかった無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでの平均生存期間は 75 日間 (63-86 日間) だったが、ゼリー状の餌を給餌した無治療群と生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-} マウスではそれぞれ平均 100 日間 (88-111 日間) と 98 日間 (82-116 日間) に延長した。ゼリー状の餌で平均生存期間は約 25 日間延長した。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスは平均して 205 日間 (100-310 日間) 生存し、ゼリー状の餌を給餌した無治療群および生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-} マウスより約 105 日間長かった。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの最長生存は 310 日間だった。(B) 体重変化を示す。生後 5 週から 25 週まで毎週全てのマウスの体重を測定し、グラフに平均体重を描いた。測定開始時点で各グループの平均体重に差があったが、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの 3 グループではいずれも生後 5-7 週以降死亡するまで急激に体重減少が少し、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは生後 15 週まで持続的に体重増加しその後緩徐に減少した。(C-E) 野生型および AAV 治療群と生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-} マウスでの Rotarod テスト結果を示す。(C) 各グループでの rotarod の成績 (回転棒の上に留まれた平均時間) をグラフに描いた。生理食塩水投与群ホモ型 (*Npc1*^{-/-}) マウスの平均時間は生後 5 週の測定開始時点から急速に悪化し、生後 11 週には 0 秒間になった。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスではより長く成績を維持し、生後 11 週の時点で 0 秒間だったマウスはなかった。しかし、時間経過で徐々に維持時間は減少していった。D と E はそれぞれ生後 8 週と 9 週での成績の統計学的解析結果

を示している。(D), (E) 回転棒の上に留まれた時間は、AAV 治療群 $Npc1^{+/+}$ と $Npc1^{-/-}$ では有意差がなく、AAC 治療群および無治療群 $Npc1^{-/-}$ マウスでは有意差を認めた。

ns: 有意差なし; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$

(5) 体重変化

無治療群 $Npc1^{-/-}$ マウスは、生後 7 週頃から体重が減少した (図 7. B-c, d, e)。AAV 治療群 $Npc1^{-/-}$ マウス (図 7. Bb) は体重測定を開始した生後 5 週時点で他の全ての群より平均体重は少なかった (図 7. Ba) が、その後生後 15 週まで体重は増加した後、緩やかに減少した。

(6) Rotarod テスト

無治療群 $Npc1^{-/-}$ マウス (グループ c, d, e) の結果に有意な差異は認めなかったため、生理食塩水投与群 $Npc1^{-/-}$ マウスをコントロール群として設定した。Rotarod テストでは、測定開始の生後 5 週時点で、 $Npc1^{+/+}$ マウスが概ね 200-250 秒間だった (図 7. Ca) のに対し、生理食塩水投与群 $Npc1^{-/-}$ マウスでは、生後 5 週時点で 120 秒間であったが、その後急速に成績が低下し生後 10 週時点では 0 秒間になった (図 7. Cc)。AAV 治療群 $Npc1^{-/-}$ マウスでは、測定開始時点で $Npc1^{+/+}$ マウスとほぼ同値の成績だった。 $Npc1^{+/+}$ マウスでは成長とともに落下までの時間は延長した。AAV 治療群

Npc1^{-/-} マウスでは、生後 14 週まで成績は伸び、その後徐々に低下した (図 7. Cb)。

生後 8 および 9 週時点でのデータをそれぞれ図 7D と 7E グラフに記す。いずれの時

点でも、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスは生理食塩水投与群 *Npc1*^{-/-} マウス

と比較して有意に長く、*Npc1*^{+/+} マウスと同様の値を記録した。

(7) 行動解析

無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスは徐々に運動機能が低下し、摂食が困難になった。生後 8-

9 週時点で運動失調性歩行が見られ、体位を維持するために跳び続けなければいけ

ない状態になった。生後 10-11 週では麻痺のため滑らかな動作や後脚での立位が困

難になった。それらの症状が悪化するにつれ、四足での立位を維持することも不可

能になった。この時点で、通常の硬いマウスの餌を摂食することもできなくなって

おり、生後 10-12 週で死亡した。この状態になっても、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスはゼ

リー状の餌を食べることは可能で、それにより 12-16 週まで生存期間が延長した。

これと比較して、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスは生後 20 週頃まで問題なく歩行が可能

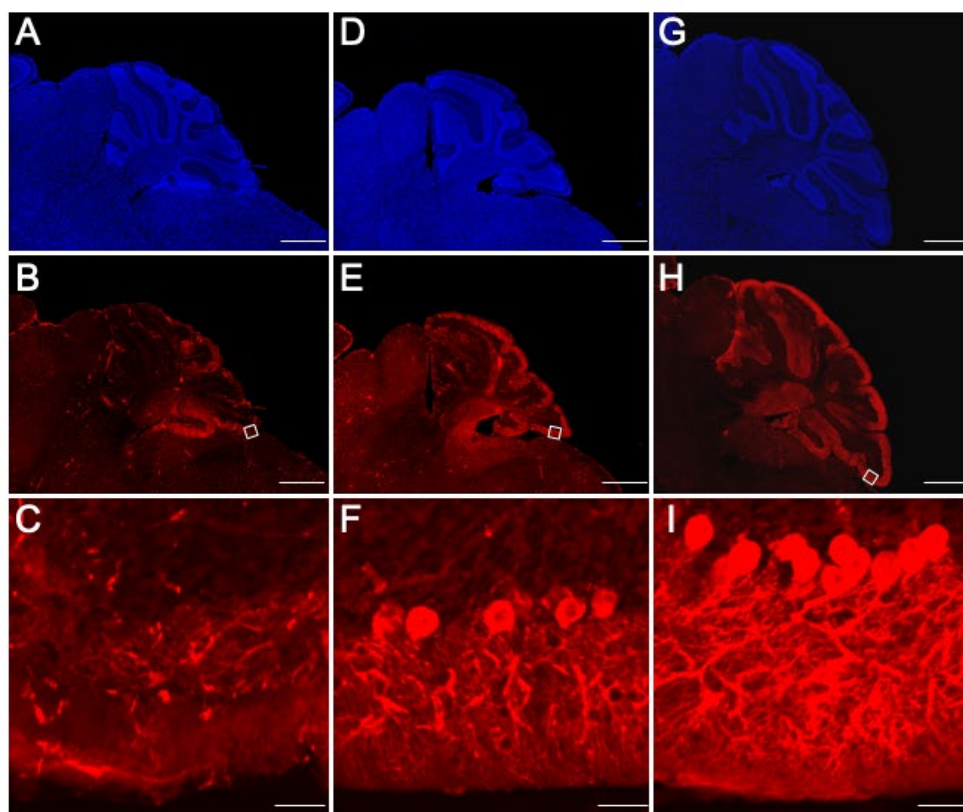
で、そのうちの何匹かは生後 35 週まで運動および摂食機能が保たれた。しかし、

AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスも徐々に痙性歩行や広い歩幅の歩行と運動失調が見られて

から死亡した。

(8) 組織学的解析

無治療群 *Npc1*^{+/+}、*Npc1*^{-/-}、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの生後 11 週時点での小脳を抗カルビンジン抗体と hoechst で染色した (図 8. A-I)。無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの小脳で Purkinje 細胞はほとんど脱落していたが、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは多くの Purkinje 細胞が残存していた。加えて、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの小脳では顆粒細胞や線維も脱落していたが、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは維持されていた。

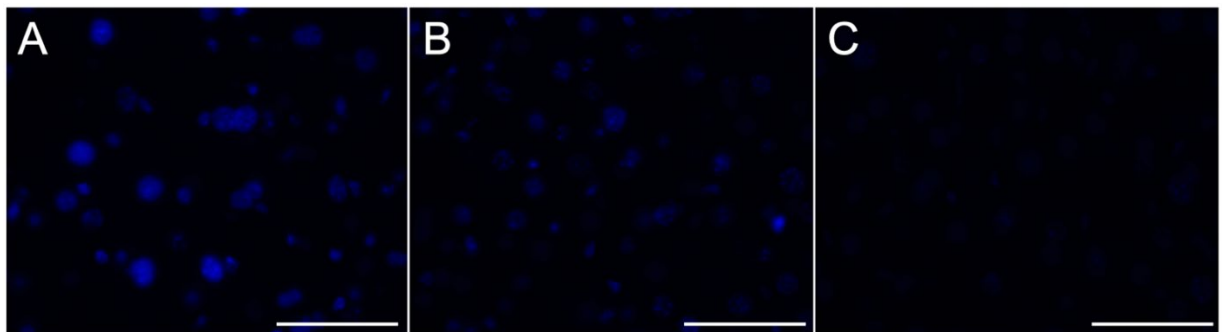


(図 8) 小脳の免疫組織学的解析

生後 11 週の無治療群 *Npc1*^{-/-} マウス (A-C), AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウス (D-F), 無治療群 *Npc1*^{+/+} マウス (G-I) 小脳の hoechst で染色 (A,D,G) と抗カルビンジン抗体を用いた免疫組織染色 (弱拡大 B,E,H と高拡大 C,F,I) 無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの小脳にはほとんど Purkinje 細胞が残存していないが、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは多くの Purkinje 細胞が残存していた。

Scale bar=500 μ m (A, B, D, E, G, H), 50 μ m (C, F, I)

無治療群 *Npc1*^{+/+}、*Npc1*^{-/-}、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの肝臓の filipin 染色の結果、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの肝臓では filipin 染色陽性となる非エステル化コレステロールの蓄積が見られたが、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの肝臓では染色強度が弱まっていた (図 9. A-C)。



(図 9) 肝臓の filipin 染色

非エステル化コレステロールの蓄積は無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの肝臓で検出された (A) が、AAV 治療群 *Npc1*^{+/-} マウスでは見られなかった (C)。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの肝臓でも filipin 染色は陽性だったが、無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの肝臓より弱く染まっていた。

Scale bar = 50 μ m (A-C)

4. 考察

NPC1 のマウスモデルにおいてチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを大槽と側脳室に同時に投与することで、小脳を含む広範な中枢神経領域に導入されることを示した。本遺伝子治療により、*Npc1* 欠失マウスの生存期間は平均 105 日間延長し、最長 310 日間にまで到達した。体重も維持され、rotarod テストの成績が改善され長時間維持できた。これらの結果は、既報告 [27-29] のいずれよりも治療効果が高かった。

ライソゾーム酵素は細胞から分泌され、他の細胞のライソゾーム内へ取り込まれる (Samie MA, et al. J Lipid Res.2014)。脳内への酵素導入、あるいは複数のライソゾーム病に対する遺伝子治療の研究で示されたように、多くのライソゾーム蓄積病は脳内の一部の細胞に遺伝子発現させることにより治療効果をもたらす [34, 35]。一方、NPC1 は細胞から分泌される蛋白ではないため [36]、原則的には、全細胞への遺伝子導入が求められる。よって、NPC1 の治療効果を上げるためには、特に小脳と脳幹を含む広範囲な中枢神経系にベクターを送達させ、できる限り多くの細胞に NPC1 遺伝子を導入することが重要である。遺伝子治療の開発においては、ベクターの選択、投与経路をどうするか、対象組織で発現させるためのプロモーターの選択が重要な課題である。ベクターの選択においては、AAV ベクターの中で、特に AAV9 ベ

クターは、血液脳関門 (BBB) を通るため、中枢神経の治療開発に広く用いられている。全身投与した場合でもニューロンとアストロサイトの双方を主なターゲットとして脳全域に広がる能力があることも知られている。本研究では、中枢神経系への遺伝子導入が著しく強化されたことが報告されているチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを用いた [31, 37]。ベクターを脳へ導入する投与経路として、静脈注射による全身投与で脳に到達させる、脳室内、大槽、腰椎穿刺、脳実質への直接注入等の方法がある。その中で、ベクターの大槽内 (ICM) 投与により、広範囲へのベクター送達を可能にするとの報告がある [38]。また大槽内投与は、側脳室投与や腰椎投与よりも優れていたと考察している報告もあり [39-41]、治療経路として有望である。しかし、脳の中心部への導入はやや低くなっているという報告もある [42]。今回、我々は広い分布を得るために、大槽と左側脳室への投与を同時に実施した。AAV-GFP を用いて、大槽と左側脳室への同時投与により大脳皮質、海馬、小脳、脳幹を含む脳全体での発現を確認した。脳幹と大脳皮質での広い分布は、ベクターゲノム DNA の qPCR でも確認しており、それが今回のマウスでの生存延長に反映されていることが示唆される。小脳での発現量は他の中枢神経系領域より低かったが、Purkinje 細胞は維持されていた。

現時点ではニューロンのみの治療で十分であるか、ニューロンとグリアの両方を治療することが必要であるかは不明確である。NPC1 の患者では脱髓を呈することが報告されているため [18]、オリゴデンドログリアを含めたグリアへの治療も必要かもしれない。NPC1 蛋白なしで定比重リポ蛋白質 (LDL) 受容体が存在する限り、細胞内のコレステロール輸送機能の喪失はコレステロール蓄積を来す。ミクログリアにおける細胞内非エステル化コレステロールレベルの著しい増加は、*Npc1*^{-/-}マウスの出生時から検出され [43]、それは中枢神経以外の肝臓や脾臓等の他臓器でも同様である。従って、NPC1 を治療するためには全身性疾患であることを考慮し CMV や EF1 α のような全身性に多くの種類の細胞に導入遺伝子の発現をもたらすプロモーターの選択が望ましいと考えられる。

これまでに、*Npc1* 欠失マウスでの AAV9 ベクターを用いた NPC1 に対する遺伝子治療についての既報告がある [27-29]。Xie らは CMV プロモーターを用いて左心室に 2.5×10^{11} vg を投与し、平均生存期間は 23 日間延長した。Chandler らは CaMK II または EF1 α プロモーターを用いて、ベクターを後眼窩静脈叢に投与した。EF1 α プロモーターを用いたベクター 1.3×10^{12} vg を投与した *Npc1* 欠失マウスでは、無治療群より 97 日間の生存期間の延長を得た。Hughes らは Syn I プロモーターを用いたベクター 2.5×10^{11} vg を両側脳室へ投与し、83 日間の生存期間の延長を得た。全身投与では

CNS に導入するためには高容量のベクター量を要するため、Xie らの 2.5×10^{11} vg や Chandler らの 1.3×10^{12} vg は、最大効果を得るためには十分量ではなかったのかもしれない。

本研究では 1.35×10^{11} vg 投与したが、Hughes らの 2.5×10^{11} vg より少ない。本研究での投与量が約半分であるにも関わらず、生存期間は Hughes らの報告より延長した。その理由の一つとして、投与経路を左側脳室と大槽としたことでベクターのより広い分布が獲得されたことが考えられる。あるいは、この違いは Hughes らがニューロン特異的な Syn I プロモーターを使用したのに対して、我々はグリア細胞や全身でも発現する CMV プロモーターを使用したことにあるのかもしれない。グリア細胞や肝、肺でも治療効果が得られて、生命予後がさらに延長した可能性も推定できる。これらの点については、更なる分析的検討が必要である。

我々の AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスは、他の無治療群よりも長期間に生存したが、*Npc1*^{+/-} の自然寿命には到達していない。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの小脳で多くの Purkinje 細胞が維持されたが、脱落は見られた。そのため、CNS での治療を改善するためには、さらに多くの細胞に遺伝子導入する方法の開発が必要である。

無治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの死因として、rotarod テストでの成績低下や痙性麻痺からも CNS 障害が最も考えられる。AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスもまた CNS 障害が死因とな

っていることが考えられる。NPC1 の患者にとって、主要な死因は神経障害に関連しているため CNS 治療は重要である。しかしながら、特に黄疸を伴う重症な肝障害や肺障害を呈する周産期の患児で、肝機能障害や肺障害などを中心とした多臓器不全もまた死因として可能性がある。我々の AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスでは、死亡する数週間前から体重減少が始まり、これらの多臓器不全を説明しうるが、肝機能検査等の生化学的検査は実施しておらず、確認出来ていない。RT-PCR では、*hNPC1* の mRNA の発現は肝臓、肺、心臓でも検出された。脳内に投与したベクターが BBB を通過して血流を介して、全身に広がって、治療効果を示したと考えられる。特に、ベクター投与したのが生後 4-5 日のマウスであり、BBB が未成熟でより多くが BBB を通過した可能性も考えられる。加えて、ベクター刺入部からの漏れが関与している可能性も否定できない。しかし、AAV 治療群 *Npc1*^{-/-} マウスの肝臓と肺での *hNPC1* の発現量は脳よりも少なく、肝臓での filipin 染色で非エステル化コレステロールの蓄積が完全には解消されていなかった。これらの所見から考えると、CNS への治療は、神経症状が主体で肝障害は軽度である若年型や成人型では治療効果が得られると考えられるが、特に周産期・乳児期発症の患者は重度の肝障害を呈するため、全身性障害を治療するには十分でなく、全身投与の追加が必要になるかもしれない。

更なる改善が要求されるが、本研究結果は患者への治療として将来有望である。

AAV ベクターにより運ばれたゲノムは、ニューロンの様な個々の細胞で長期に維持されると考えられる。実際に、パーキンソン病モデルの非ヒト霊長目モデルで、脳での導入遺伝子の発現は 15 年間に渡り確認されている [44]。従って、細胞機能を維持するために十分な遺伝子導入が出来れば、治療した患者が自然寿命を全うすることとを期待できる。

より良い成果を成すために、側脳室と大槽、さらに全身投与を加える等の投与経路の最適化が必要である。また細胞死する前の早期診断・治療も重要であり、NPC1 のスクリーニング検査の開発も将来的に取り組む必要がある。

5. おわりに

Npc1 欠失モデルマウスに対する遺伝子治療として、CMV プロモーターを用いたチロシン変異型 AAV9/3-CMV-*hNPC1* ベクターを治療用ベクターとして作製し、生後 4-5 日のマウスの左側脳室と大槽に注入した。その結果、広範囲の中枢神経および肝臓等の全身臓器に遺伝子が導入され、生存期間の延長、体重の維持、rotarod 試験の成績改善、小脳 Purkinje 細胞の維持、そして肝臓での非エステル化コレステロール蓄積に改善を得た。根本的治療法のない NPC 患者に対して AAV9 ベクターを用いた遺伝子治療が今後新しい治療法として有望である。

6. 参考文献

- [1] Perera RM, Zoncu R. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 32: 223-53, 2016.
- [2] Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 277: 228-231, 1997.
- [3] Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, Deisenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, Infante RE. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell.* 137: 1213-24, 2009.
- [4] Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 5: 16, 2010.
- [5] Wassif CA, Cross JL, Iben J, Sanchez-Pulido L, Cougnoux A, Platt FM, Ory DS, Ponting CP, Bailey-Wilson JE, Biesecker LG, Porter FD. High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Genet Med.* 18: 41-8, 2016.
- [6] 大野耕策. Niemann-Pick 病 C 型 (NPC) 病態と診断・治療のポイント. 脳と発達. 48: 81-8, 2016.
- [7] Millat G, Marçais C, Rafi MA, Yamamoto T, Morris JA, Pentchev PG, Ohno K, Wenger DA, Vanier MT. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T

- substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet.* 65: 1321-9, 1999.
- [8] Winkler MBL, Kidmose RT, Szomek M, Thaysen K, Rawson S, Muench SP, Wüstner D, Pedersen BP. Structural Insight into Eukaryotic Sterol Transport through Niemann-Pick Type C Proteins. *Cell.* 179: 485-97, 2019.
 - [9] Bräuer AU, Kuhla A, Holzmann C, Wree A, Witt M. Current Challenges in Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms in Niemann-Pick Disease Type C1. *Int J Mol Sci.* 20: 4392, 2019.
 - [10] Sobrido MJ, Bauer P, de Koning T, Klopstock T, Nadjar Y, Patterson MC, Synofzik M, Hendriksz CJ. Recommendations for patient screening in ultra-rare inherited metabolic diseases: what have we learned from Niemann-Pick disease type C? *Orphanet J Rare Dis.* 14: 20, 2019.
 - [11] Walterfang M, Chien YH, Imrie J, Rushton D, Schubiger D, Patterson MC. Dysphagia as a risk factor for mortality in Niemann-Pick disease type C: systematic literature review and evidence from studies with miglustat. *Orphanet J Rare Dis.* 7: 76, 2012.
 - [12] Geberhiwot T, Moro A, Dardis A, Ramaswami U, Sirrs S, Marfa MP, Vanier MT, Walterfang M, Bolton S, Dawson C, Héron B, Stampfer M, Imrie J, Hendriksz C, Gissen P, Crushell E, Coll MJ, Nadjar Y, Klünemann H, Mengel E, Hrebicek M, Jones SA, Ory D, Bembi B, Patterson M; International Niemann-Pick Disease Registry (INPDR). Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 13: 50, 2018.
 - [13] Sitarska D, Ługowska A. Laboratory diagnosis of the Niemann-Pick type C disease: an inherited neurodegenerative disorder of cholesterol metabolism. *Metab Brain Dis.* 34: 1253-60, 2019.
 - [14] Wijburg FA, Sedel F, Pineda M, Hendriksz CJ, Fahey M, Walterfang M, Patterson MC, Wraith JE, Kolb SA. *Neurology.* 78: 1560-1567, 2012.

- [15] Walkley SU, Suzuki K. Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim Biophys Acta*. 1685: 48-62, 2004.
- [16] Suzuki K, Parker CC, Pentchev PG, Katz D, Ghetti B, D'Agostino AN, Carstea ED. Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C . *Acta Neuropathol*. 89: 227-38, 1995.
- [17] Saito Y, Suzuki K, Hulette CM, Murayama S. Aberrant phosphorylation of alpha-synuclein in human Niemann-Pick type C1 disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 63: 323-8, 2004.
- [18] Kodachi T, Matsumoto S, Mizuguchi M, Osaka H, Kanai N, Nanba E, Ohno K, Yamagata T. Severe demyelination in a patient with a late infantile form of Niemann-Pick disease type C. *Neuropathology*. 37 : 426-30, 2017.
- [19] Klünemann HH, Elleder M, Kaminski WE, Snow K, Peyser JM, O'Brien JF, Munoz D, Schmitz G, Klein HE, Pendlebury WW. Frontal lobe atrophy due to a mutation in the cholesterol binding protein HE1/NPC2. *Ann Neurol*. 52: 743-49, 2002.
- [20] Chiba Y, Komori H, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Kawamura N, Adachi K, Nanba E, Hosokawa M, Enokido Y, Kouchi Z, Yoshida F, Shimada A. Niemann-Pick disease type C1 predominantly involving the frontotemporal region, with cortical and brainstem Lewy bodies: an autopsy case. *Neuropathology*. 34: 49-57, 2014.
- [21] Pineda M, Walterfang M, Patterson MC. Miglustat in Niemann-Pick disease type C patients: a review. *Orphanet J Rare Dis*. 13: 140, 2018.
- [22] Helquist P, Maxfield FR, Wiech NL, Wiest O. Treatment of Niemann--pick type C disease by histone deacetylase inhibitors. *Neurotherapeutics*. 10: 688-97, 2013.
- [23] Davidson CD, Ali NF, Micsenyi MC, Stephney G, Renault S, Dobrenis K, Ory DS, Vanier MT, Walkley SU. Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS One*. 4: e6951, 2009.

- [24] Ory DS, Ottinger EA, Farhat NY, King KA, Jiang X, Weissfeld L, Berry-Kravis E, Davidson CD, Bianconi S, Keener LA, Rao R, Soldatos A, Sidhu R, Walters KA, Xu X, Thurm A, Solomon B, Pavan WJ, Machielse BN, Kao M, Silber SA, McKew JC, Brewer CC, Vite CH, Walkley SU, Austin CP, Porter FD. Intrathecal 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1–2 trial. *The Lancet*. 390: 1758-68, 2017.
- [25] Maass F, Petersen J, Hovakimyan M, Schmitt O, Witt M, Hawlitschka A, Lukas J, Rolfs A, Wree A. Reduced cerebellar neurodegeneration after combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat in NPC1: a mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. *J Neurosci Res*. 93: 433-42, 2015.
- [26] Hovakimyan M, Maass F, Petersen J, Holzmann C, Witt M, Lukas J, Frech MJ, Hübner R, Rolfs A, Wree A. Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice. *Neuroscience*. 252: 201-11, 2013.
- [27] Xie C, Gong XM, Luo J, Li BL, Song BL. AAV9-NPC1 significantly ameliorates Purkinje cell death and behavioral abnormalities in mouse NPC disease. *J Lipid Res*. 58: 512-8, 2017.
- [28] Chandler RJ, Williams IM, Gibson AL, Davidson CD, Incao AA, Hubbard BT, Porter FD, Pavan WJ, Venditti CP. Systemic AAV9 gene therapy improves the lifespan of mice with Niemann-Pick disease, type C1. *Hum Mol Genet*. 26: 52-64, 2017.
- [29] Hughes MP, Smith DA, Morris L, Fletcher C, Colaco A, Huebecker M, Tordo J, Palomar N, Massaro G, Henckaerts E, Waddington SN, Platt FM, Rahim AA. AAV9 intracerebroventricular gene therapy improves lifespan, locomotor function and pathology in a mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. *Hum Mol Genet*. 27: 3079-98, 2018.

- [30] Lopez ME, Klein AD, Dimbil UJ, Scott MP. Anatomically defined neuron-based rescue of neurodegenerative Niemann-Pick type C disorder. *J Neurosci.* 31: 4367-78, 2011.
- [31] 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. *Biomed Res Int.* 2013: 974819, 2013.
- [32] Muramatsu K, Chikahisa S, Shimizu N, Séi H, Inoue Y. Rotigotine suppresses sleep-related muscle activity augmented by injection of dialysis patients' sera in a mouse model of restless legs syndrome. *Sci Rep.* 9: 16344, 2019.
- [33] Hung YH, Walterfang M, Churilov L, Bray L, Jacobson LH, Barnham KJ, Jones NC, O'Brien TJ, Velakoulis D, Bush AI. Neurological Dysfunction in Early Maturity of a Model for Niemann-Pick C1 Carrier Status. *Neurotherapeutics.* 13: 614-22, 2016.
- [34] Tardieu M, Zérah M, Husson B, de Bournonville S, Deiva K, Adamsbaum C, Vincent F, Hocquemiller M, Broissand C, Furlan V, Ballabio A, Fraldi A, Crystal RG, Baugnon T, Roujeau T, Heard JM, Danos O. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther.* 25: 506-16, 2014.
- [35] Tardieu M, Zérah M, Gougeon ML, Ausseil J, de Bournonville S, Husson B, Zafeiriou D, Parenti G, Bourget P, Poirier B, Furlan V, Artaud C, Baugnon T, Roujeau T, Crystal RG, Meyer C, Deiva K, Heard JM. Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. *Lancet Neurol.* 16: 712-20, 2017.
- [36] Marques ARA, Saftig P. Lysosomal storage disorders - challenges, concepts and avenues for therapy: beyond rare diseases. *J Cell Sci.* 132, 2019.

- [37] Dalkara D, Byrne LC, Lee T, Hoffmann NV, Schaffer DV, Flannery JG. Enhanced gene delivery to the neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9. *Gene Ther.* 19: 176-81, 2012.
- [38] Samaranch L, Pérez-Cañamás A, Soto-Huelin B, Sudhakar V, Jurado-Arjona J, Hadaczek P, Ávila J, Bringas JR, Casas J, Chen H, He X, Schuchman EH, Cheng SH, Forsayeth J, Bankiewicz KS, Ledesma MD. Adeno-associated viral vector serotype 9-based gene therapy for Niemann-Pick disease type A. *Sci Transl Med.* 11: eaat3738, 2019.
- [39] Bucher T, Colle MA, Wakeling E, Dubreil L, Fyfe J, Briot-Nivard D, Maquigneau M, Raoul S, Cherel Y, Astord S, Duque S, Marais T, Voit T, Moullier P, Barkats M, Joussemet B. scAAV9 intracisternal delivery results in efficient gene transfer to the central nervous system of a feline model of motor neuron disease. *Hum Gene Ther.* 24: 670-82, 2013.
- [40] Hinderer C, Bell P, Vite CH, Louboutin JP, Grant R, Bote E, Yu H, Pukenas B, Hurst R, Wilson JM. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 1: 14051, 2014.
- [41] Hordeaux J, Hinderer C, Goode T, Buza EL, Bell P, Calcedo R, Richman LK, Wilson JM. Toxicology Study of Intra-Cisterna Magna Adeno-Associated Virus 9 Expressing Iduronate-2-Sulfatase in Rhesus Macaques. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 10: 68-78, 2018.
- [42] Nakamura S, Osaka H, Muramatsu SI, Takino N, Ito M, Jimbo EF, Watanabe C, Hishikawa S, Nakajima T, Yamagata T. Intra-cisterna magna delivery of an AAV vector with the GLUT1 promoter in a pig recapitulates the physiological expression of SLC2A1. *Gene Ther.* Online ahead of print, 2020.
- [43] Cougnoux A, Drummond RA, Collar AL, Iben JR, Salman A, Westgarth H, Wassif CA, Cawley NX, Farhat NY, Ozato K, Lionakis MS, Porter FD. Microglia activation in Niemann-Pick disease, type C1 is amendable to therapeutic intervention. *Hum Mol Genet.* 27: 2076-89, 2018.

- [44] Sehara Y, Fujimoto KI, Ikeguchi K, Katakai Y, Ono F, Takino N, Ito M, Ozawa K, Muramatsu SI. Persistent Expression of Dopamine-Synthesizing Enzymes 15 Years After Gene Transfer in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 28: 74-79, 2017.

7. 謝辞

本研究の遂行、論文作成にあたり自治医科大学小児科学 山形 崇倫主任教授、小児科学 小坂 仁教授、小児科学 村松 一洋 准教授、小児科学 神保 恵理子講師には多大なご指導を賜り深謝致します。また、自治医科大学神経遺伝子治療部門 村松 慎一教授には、本研究の遂行、論文作成に加え、AAV ベクター全般の最近の知見や作製についてのご指導・ご支援頂き、謹んで御礼申し上げます。また、小児科 中村 幸恵先生、小児科学研究補助員 大美賀 成実様および青木 志保様には研究全般を補助して頂きましたこと、ここに感謝の意を表します。

さらに、治療用 AAV ベクター作製には、自治医科大学神経遺伝子治療部門 滝野 直美様、伊藤 美加様にご尽力いただき、マウス行動解析については神経脳生理学講座 尾仲 達史教授、高柳 友紀講師にご指導賜り感謝申し上げます。

本研究の一部は、2019 年度自治医科大学大学院医学研究科 若手スタートアップ研究費および 2020 年度自治医科大学大学院医学研究科研究奨励賞により遂行致しました。