

大型動物の広範な中枢神経領域に遺伝子導入可能な
AAV ベクターの開発

博士課程

著者名： 飯田 麻子

指導教官： 村松 慎一 教授

自治医科大学大学院医学研究科

地域医療学系 精神・神経・筋骨格疾患学 臨床神経学

2015年1月9日申請の学位論文

目次

大型動物の広範な中枢神経領域に遺伝子導入可能な

AAV ベクターの開発

	ページ番号
1. はじめに	1
2. 方法	4
3. 結果	8
4. 考察	16
5. 結語	19
6. 共同研究者	20
7. 謝辞	20
8. 引用文献	21

1. はじめに

これまで中枢神経に影響を及ぼす疾患に対する遺伝子治療の前臨床研究において、様々な遺伝子導入方法が試されてきた。それらの結果を総合すると、安全性と効率の良さからアデノ随伴ウイルス (AAV) 由来のベクターが臨床応用に最も適している¹⁻³。組換え AAV ベクターを定位脳手術により標的とする脳領域に投与することにより、導入遺伝子の継続的かつ長期的な発現を得ることができる^{4,5}。Parkinson 病に対する遺伝子治療の第 I / II 相臨床研究では、遺伝子を被殻または視床下核に導入し、良好な臨床的効果が報告されている⁵⁻⁸。しかし、Alzheimer 病、脂質蓄積症、多発性硬化症のように広範な中枢神経領域に病変が存在する場合、ベクターを局所的に投与しても十分な効果は期待できない。

現在、霊長類の AAV には 100 以上の遺伝子型が分離されている。このうちいくつかの型では血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) や血液脳脊髄液関門 (blood-cerebrospinal fluid barrier, BCSFB) を透過できることが明らかになってきた。BBB と BCSFB は各々血管内皮細胞と脈絡叢上皮細胞から形成される。これらの関門は、血液や髄液から有害な物質を脳内に侵入させない役割と、必要不可欠な栄養やイオン、老廃物等を輸送する役割を持っている⁹。これらの関門を透過できるベクターとして特に近年、9 型 AAV (AAV9) 由来のベクターが注目されている¹⁰⁻¹⁵。AAV9 ベクターを血管内投与すると脊髄の運動神経細胞に遺伝子導入可能なことが、マウス、ネコ、ブタで報告されている^{10-14, 16, 17}。しかし、血液脳関門が未成熟の胎仔や新生仔では神経細胞にも遺伝子導入されるものの、成体動物では遺伝子導入される細胞のほとんどがアストロサイトである^{10, 15, 17}。そのため成体動物において、中枢神経の広範囲の神経細胞に遺伝子を導入することは困難である。

AAV9 ベクターを全身投与により中枢神経へ導入する方法に関する報告では、自己複製型 AAV (self-complementary AAV, scAAV) ベクターが使用されている。このベクターは 2 本鎖 DNA を搭載することにより核内の転写過程を促進し、従来の 1 本鎖 AAV ベクターの 20~100 倍の遺伝子導入効率をもつとされる¹⁸。しかし、挿入できる遺伝子の大きさが短い (2.2kb) ことは、臨床応用に際して大きな欠点となる¹⁹。そこで本研究では、AAV9 の血液脳関門を通過する特性を保持し、1 本鎖 AAV と同様の長さの遺伝子を搭載可能なベクターの開発を目標とした。

これまでの報告では cytomegalovirus (CMV) プロモーターを搭載した AAV9 ベクターが使用されている。脳内の抗原提示細胞で外来遺伝子が発現すると免疫反応が惹起され、重篤な脳組織損傷を生じる可能性があり²⁰、中枢神経疾患の遺伝子治療に AAV9 ベクターを使用する際の障害となる。神経細胞特異的プロモーターを使用すればこの反応を回避できる。しかし、一般的に、組織・細胞型特異的プロモーターは遺伝子発現が弱いという難点がある²¹。

AAV では、外被蛋白質の表面に出ているチロシン残基がベクターの感染には重要な役割を果たしている。これらのチロシン残基が酸化されると、外被蛋白質の N 末端部分が表面に露出しなくなる²²。表面に露出しているチロシン (Y) をフェニルアラニン (F) へと変えることにより、外被蛋白質がユビキチン化されるのを防ぎ、AAV が核へ細胞内輸送されやすくなる²³。AAV2、AAV8、AAV9 の外被蛋白質の 1 か所の Y を変換したベクターを全身投与するとマウスで網膜や脊髄への遺伝子導入を促進できるが^{24,25,26}、一方で AAV8 や AAV9 の外被蛋白質の Y を 1 か所変換しただけでは骨格筋や心臓における遺伝子発現を促進することはできない²⁷。6 か所ある Y を F へ変換したものの組み合わせを AAV2 ベクターで分析した結果では、3 重変異ベクター (Y444, 500, 730F) が培養細胞²⁸

とマウスの肝臓²⁹の両方で最も強力で一定の導入遺伝子発現を示したと報告されている。当研究室では野生型 AAV9 では 501 番にあるアミノ酸 (AAV2 では 500 番)は元々フェニルアラニンであるため、AAV9 の 2 重変異型ベクター (Y446F, Y731F)を作製した^{24, 27, 28, 30-33}。

本研究では、神経特異的プロモーターを搭載したチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを全身投与することによって、成体マウスとサルの中枢神経の広範な領域の神経細胞に効率よく遺伝子導入できることを示した。次にこの改良型ベクターはマウスだけでなくサルやブタでも脳と脊髄の広範な領域に効率良く遺伝子を導入できることを報告する。

2. 方法

2. 1. ベクターの作製

AAV ベクタープラスミドは、プロモーターの下流に Green fluorescence protein (GFP)または後述の miRNA、woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE)をつないだ発現カセットを含む。この発現カセットは 3 型 AAV (AAV3)の inverted terminal repeats (ITR)配列間に挿入した。プロモーターには次の 3 種類を使用した。ヒト cytomegalovirus immediate early enhancer and chicken β -actin (CAG) promoter、神経細胞特異的 synapsin I (SynI) promoter (Gene Bank, M55300.1)³⁴、プルキンエ細胞特異的 L7 promoter (Gene Bank, S40022.1)³⁵。ヒト芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)の miRNA をコードする 2 本鎖 DNA は、以下の配列を合成した。

5'-TGCTGAATTCAGGACAGATAAAGGCAGTTTTGGCCACTGACTGACTGCCTTTATGTCCTGAATT-3'。9 型 AAV (AAV9)の外被蛋白質をコードする *vp* 部分の DNA は、1337 番と 2192 番のチミチンをアデニンへと変換して合成した³⁶。チミチンからアデニンへ変換することにより、コードされる 446 番と 731 番のアミノ酸がチロシンからフェニルアラニンへと変わった。組換え AAV ベクターは、HEK293 細胞に以下の 3 つのプラスミドを同時にトランスフェクションすることで作製した³⁷。AAV ベクタープラスミド、AAV3 の *rep* と AAV9 の *vp* を発現するプラスミド、アデノウィルスの E2A、E4、VA RNAs を含むヘルパープラスミド pHelper (Agilent Technologies)。組換え AAV ベクターは CsCl 密度勾配法による超遠心で精製し、力価を定量 PCR により測定した。

2. 2. 動物実験

全ての動物実験は自治医科大学の動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. 2. (1) マウスへのベクター投与

9-10 週齢の雄マウス (C57BL/6, 日本 SLC)24 匹を使用した。マウスはプラスチックケージで飼育し食物と水は自由に摂れるようにした。12/12 時間の明暗サイクルを維持した。AAV ベクターはリン酸緩衝液 (PBS) で 10^{12} vector genome/100 μ l の濃度になるように希釈した。ペントバルビタール (50 mg/kg, ip) で麻酔し、29 ゲージの針を装着した 0.5 ml シリンジを使用して 100 μ l の AAV ベクター溶液を心腔内に投与した。ベクター投与から 4~8 週間後、4%パラホルムアルデヒドで組織を灌流固定した。PBS で溶解した 10% - 30%のシュクロース溶液で抗凍結処理をした後、ミクロトームで厚さ 40 μ m の切片を作製した。

2. 2. (2) カニクイサルへのベクター投与

医薬基盤研究所筑波霊長類医科学研究センターで飼育している 10 - 14 歳齢のカニクイサル 6 頭 (体重 3~4 kg, 雌)を使用した。全身麻酔下で腰椎穿刺により、 6.3×10^{12} vector genome/200 μ l の GFP 発現 AAV ベクターを髄腔内投与した。投与 4 週後に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳、脊髄、心臓、肝臓、腎臓をそれぞれ採取した。PBS で溶解した 10% - 30%のシュクロース溶液で抗凍結処理をした後、ミクロトームで厚さ 40 μ m の切片を作製した。

2. 2. (3) ブタへのベクター投与

自治医科大学先端医療技術開発センターで飼育している 1 歳齢の Mexican Hairless Pig 5 頭 (体重 24~36kg, 雄 3 頭, 雌 2 頭)を使用した。全身麻酔下で腰椎穿刺により、 5.4×10^{13} vector genome/500 μ l の GFP 発現 AAV ベクターを髄腔内投与した。投与 4 週後に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳と脊髄をそ

それぞれ採取した。PBS で溶解した 10% - 30% のシュクロース溶液で抗凍結処理をした後、ミクロトームで厚さ 40 μm の切片を作製した。

2. 2. (4) 組織解析

組織切片は正常ヤギ血清で 30 分間 blocking 後、一次抗体を添加し 4°C で一晩反応させ、翌日二次抗体で 1 時間、さらに avidin-biotinylated peroxidase complex solution (ABC solution, VECTASTAIN ABC kit, VECTOR) で 30 分間反応させ、3-3'-diaminobenzidine 液 (DAB 液, DAB 基質キット, VECTOR) で発色させた。その後室温で乾燥、カナダバルサムで封入した。

蛍光免疫染色はヤギ血清で組織切片を 1 時間 blocking 後、一次抗体を添加し 4°C で一晩反応させ、翌日二次抗体で 1 時間反応させて ProLong Gold (ProLong Gold antifade reagent, Life Technologies) で封入した。

使用した一次抗体は GFP (chicken, Abcam, 1:1,000–1:10,000; rabbit, Abcam, 1:1000)、tyrosine hydroxylase (TH) (mouse, DiaSorin, 1:800)、AADC (rabbit, 1:5000, 藤田保健衛生大学 永津郁子教授より供与)、神経細胞のマーカーである NeuN (mouse, Millipore, 1:100)、アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) (rabbit, Covance, 1:100)、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) (mouse, CHEMICON, 1:200)、プルキンエ細胞マーカーである calbindin (mouse, SIGMA, 1:1000) の各抗体を使用した。二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-chicken IgG (1:1000; Invitrogen)、Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (1:1000; Invitrogen)、Alexa Fluor 405 goat anti-mouse IgG (1 : 200; Invitrogen)、Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen)、Anti-rabbit IgG (H+L) (1:200; VECTOR)、Anti-chicken IgG (H+L) (1:200; VECTOR) を使用した。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i; Olympus, Tokyo) を使用して検出した。

2. 2. (5) 遺伝子を発現している細胞数の測定

脳内の GFP/NeuN 両陽性細胞数を立体解析ソフト(Stereo Investigator, MBF Bioscience)を使用して数えた。まず始めに 4×対物レンズを使用して組織の輪郭を囲むと、100×100 μm の格子で組織が体系的かつランダムに分割される。その後 20×対物レンズで拡大し、3次元光学的解像機構 (25×25 μm)内に存在する GFP/NeuN 両陽性細胞の数を数えた。ベクターを投与したマウスの前頭皮質、海馬、あるいは扁桃体を含む冠状断切片を 5 枚に 1 枚の割合で数えた。細胞計数は対象とする各領域につき計 8 切片について行った。異なる焦点を取ることで厚さのある組織中の全ての細胞を視覚化した。

3. 結果

3. 1. より効率の良いチロシン変異型 AAV9/3 ベクターの作製

今回作製したベクターは、AAV9 の外被蛋白質の表面の 2 か所のチロシンをフェニルアラニンに変換 (Y446F, Y731F) し、ゲノム両端に AAV3 の ITR を持つ pseudotype AAV9/3 である。Synapsin I プロモーターにより GFP を発現するこのチロシン変異型 AAV9/3 ベクターと野生型 AAV9 ベクターを成体マウスの心腔内に投与し (10^{11} vector genome/100 μ l)、その発現を比較した。その結果、野生型 AAV9 ベクターでは脳内のごく少数の神経様の形態を示す細胞に GFP の発現が認められるが、チロシン変異型 AAV9/3 ベクターでは多数の神経様の形態を示す細胞に GFP が発現していた (図 1)。

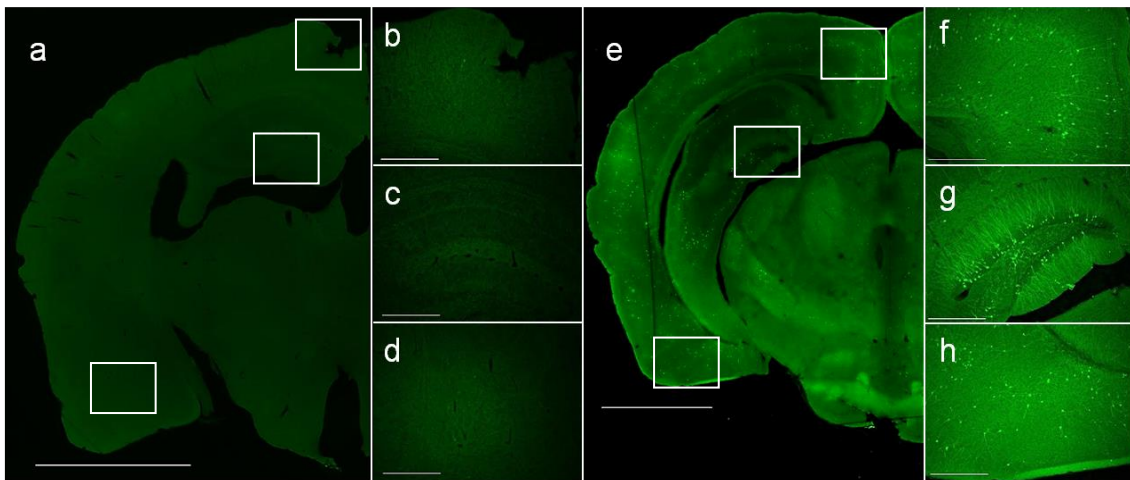


図 1. チロシン変異型 AAV9/3 ベクターは野生型 AAV9 ベクターに比べ効率良く遺伝子導入が可能である (a)–(d) Synapsin I (SynI) プロモーターにより GFP を発現する野生型 AAV9 ベクター、(e)–(h) SynI プロモーターにより GFP を発現するチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを各々使用した。ベクター投与 7 週間後の脳組織冠状断像、抗 GFP 抗体免疫染色。各ベクターを投与した場合のマウス脳 ((a), (e))、皮質 ((b), (f))、海馬 ((c), (g))、扁桃核 ((d), (h)) における遺伝子発現の比較。チロシン変異型 AAV9/3 ベクターは、従来の野生型 AAV9 ベクターに比べ効率良く遺伝子導入された。Scale bar ; (a)・(e) 2 mm、(b)–(d)・(f)–(h) 400 μ m

3. 2. チロシン変異型 AAV9/3 ベクターによる広範な CNS 領域への遺伝子導入

次いで CAG プロモーターにより GFP が発現するこのチロシン変異型ベクター (yfAAV9/3-CAG-GFP) をマウスの心腔内に投与 (1.2×10^{11} vector genome/100 μ l) したところ、4 週間後に脳の広い範囲で遺伝子発現が観察された (図 2 (a) - (d))。免疫組織化学では、GFP 陽性細胞のほとんどがグリア細胞様の形態を示し、グリア細胞のマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) を発現していた (図 2 (f))。また、心臓、肝臓、腎臓などの末梢組織の実質細胞でも GFP の発現が観察された (図 2 (g) - (i))。

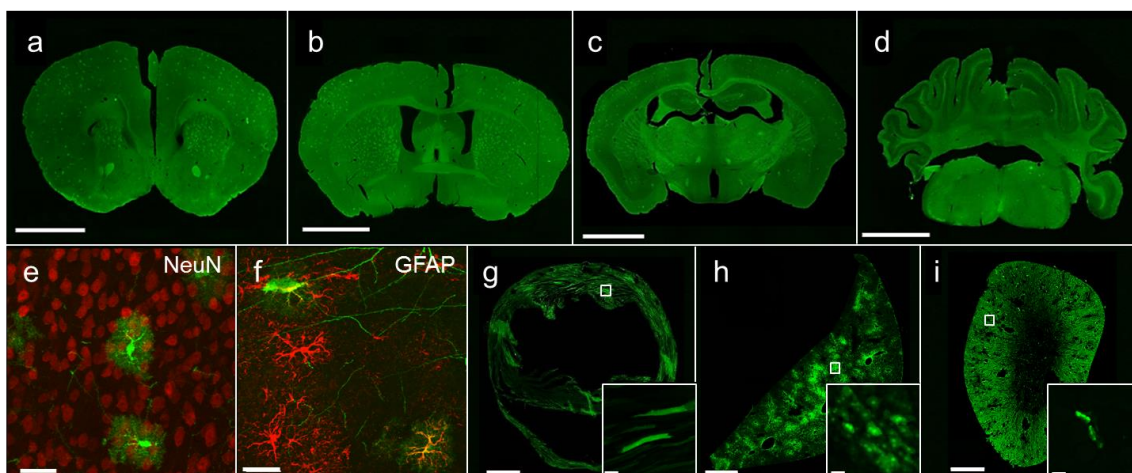


図 2. CAG プロモーターを搭載したチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを心腔内投与すると、脳の広い範囲でグリア細胞に遺伝子導入が見られる。cytomegalovirus immediate-early enhancer and chicken β -actin (CAG)プロモーターにより GFP を発現するチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを使用した。(a) - (d) ベクター投与 8 週間後の脳組織冠状断像、抗 GFP 抗体免疫染色。切片の位置は Bregma から (a) +1.34 mm、(b) +0.14 mm、(c) -0.17 mm、(d) -6.24 mm。(e) - (f) 二重染色の融合画像。ほとんどの遺伝子導入細胞はグリア細胞様形態を示し、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性、NeuN 陰性であった。(e) GFP (緑)、NeuN (赤)、(f) GFP (緑)、GFAP (赤)。(g) - (i) 末梢組織での GFP 発現解析。心臓、肝臓、腎臓の広い範囲に遺伝子発現が認められた(g) - (i)。Scale bar ; (a) - (d) 2 mm、(e) - (f) inset of (g) - (i) 30 μ m、(g) - (i) 1 mm。

3. 3. 神経細胞特異的プロモーターによる神経細胞での選択的遺伝子発現

神経細胞特異的 synapsin I プロモーターにより GFP を発現するチロシン変異型 AAV9/3 ベクター (yfAAV9/3-SynI-GFP) を作製し、成体マウスの心腔内に投与した (1.2×10^{11} vector genome/100 μ l)。6 週間後に脳の広範な領域で GFP の発現が認められた (図 3 (a) - (d))。二重蛍光染色により、ほぼ全ての GFP 陽性細胞が神経細胞のマーカである NeuN 陽性であった (図 3 (e))。末梢組織における GFP の発現は神経様の形態を示す細胞に局限しており、末梢組織の実質細胞では観察されなかった (図 3 (g) - (i))。

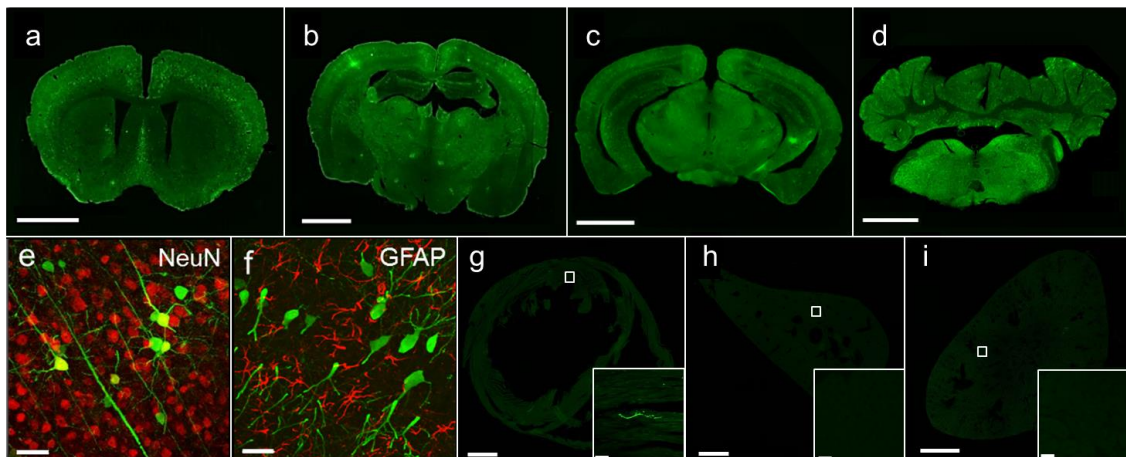


図 3. 神経細胞特異的プロモーターを搭載したチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを心腔内投与すると、効率よく神経細胞に遺伝子導入される Synapsin I プロモーターにより GFP を発現させた。(a) - (d) ベクター投与 6 週間後の脳組織冠状断像、抗 GFP 抗体染色。切片の位置は Bregma から (a) +0.74 mm、(b) -1.82 mm、(c) -2.92 mm、(d) -6.12 mm。(e) - (f) 二重染色の融合画像。ほぼ全ての遺伝子導入細胞が NeuN に免疫反応を示し、GFAP には示さなかった。(e) GFP (緑)、NeuN (赤)、(f) GFP (緑)、GFAP (赤)。(g) - (i) 末梢組織では心臓、肝臓、腎臓の実質細胞に GFP の発現は認めなかった(g) - (i)。Scale bar ; (a) - (d) 2 mm、(e)・(f) inset of (g) - (i) 30 μ m、(g) - (i) 1 mm。

前頭葉皮質、海馬、扁桃体の各領域において、yfAAV9/3-SynI-GFP ベクターを投与したマウスと yfAAV9/3-CAG-GFP ベクターを投与したマウスで GFP/NeuN 両

陽性細胞の数を比較した。yfAAV9/3-SynI-GFP ベクターでは、NeuN 陰性の非神経細胞に GFP の発現は認められず、yfAAV9/3-CAG-GFP ベクターの約 4 倍の NeuN 陽性神経様形態細胞に GFP が発現していた (図 4)。

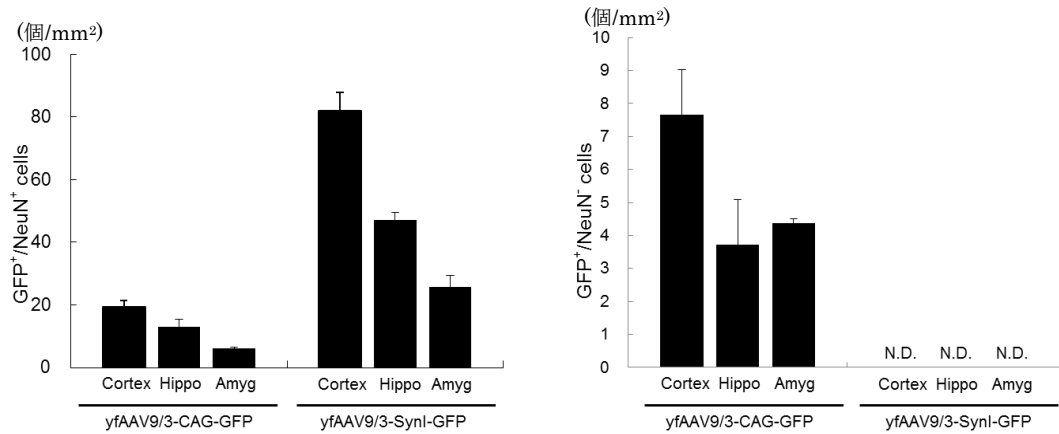


図 4. 神経細胞への遺伝子導入の定量分析 GFP⁺/NeuN⁺ (神経細胞) と GFP⁺/NeuN⁻ (非神経細胞) を、yfAAV9/3-CAG-GFP 投与マウスと yfAAV9/3-SynI-GFP 投与マウス (n = 6) 間で比較した。対象領域は前頭葉皮質、海馬、扁桃体。yfAAV9/3-SynI-GFP ベクターを投与したマウスでは yfAAV9/3-CAG-GFP ベクターを投与したマウスに比べ、これらの領域における NeuN 陽性の神経細胞の数が約 4 倍となった。各領域の分析範囲は $0.04 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ であった。各領域で各々計 8 切片を分析した。N. D. ; not detected、Hippo ; hippocampus、Amyg ; amygdala。

脊髓の蛍光染色では、脊髓前角において運動神経細胞のマーカーである choline acetyl transferase (ChAT) 陽性の細胞でも GFP の発現が認められた (図 5)。

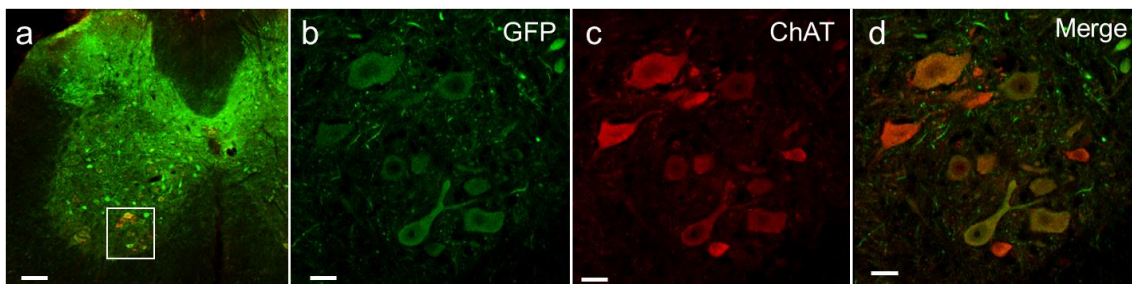


図 5. 脊髄運動神経細胞への遺伝子導入 yfAAV9/3-SynI-GFP ベクターを心腔内投与したマウスの脊髄切片。GFP と運動神経のマーカである choline acetyl transferase (ChAT) に対する免疫組織染色。(a) 水平断面。GFP と ChAT の両方とも陽性となる細胞が認められる。(b)–(d) (a)の白枠部分を強拡大したもの。(b) GFP 陽性細胞 (緑)、(c) ChAT 陽性細胞 (赤)、(d) (b)、(c)の merge 画像。Scale bars ; (a) 100 μ m、(b)–(d) 20 μ m。

神経細胞特異的な遺伝子発現が他のプロモーターでも実現できるかどうかを調べるため、小脳プルキンエ細胞特異的な L7 プロモーターにより GFP を発現する yfAAV9/3 ベクター (yfAAV9/3-L7-GFP) を作製した³⁸。成体マウスの心腔内に投与 (1.2×10^{11} vector genome/100 μ l) したところ、6 週間後の組織解析で一部のプルキンエ細胞に特異的な GFP の発現を認めた (図 6)。プルキンエ細胞は形態と Calbindin 発現により同定した。

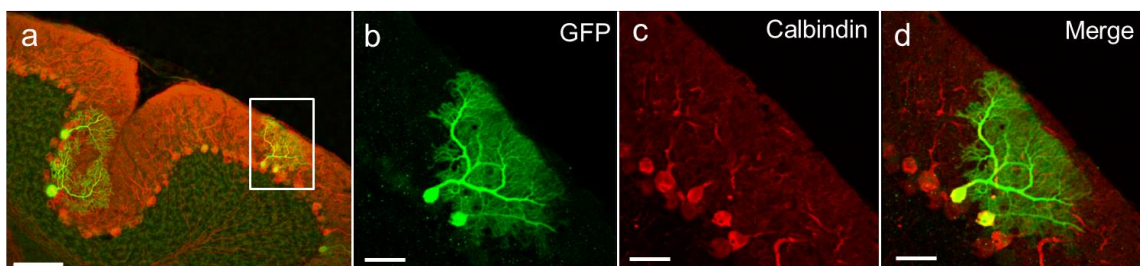


図 6. 小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入 yfAAV9/3-L7-GFP ベクターを心腔内投与したマウスの小脳。GFP とプルキンエ細胞マーカである calbindin による免疫組織染色。(a) 軸方向断面において、小脳皮質が GFP と calbindin の両方で標識された。(b)–(d) (a)の白枠部分を強拡大したもの。(b) GFP 陽性細胞 (緑)、(c) calbindin 陽性細胞 (赤)、(d) (b)、(c)の merge 画像。Scale bars ; (a) 100 μ m、(b)–(d) 30 μ m。

3. 4. miRNA の黒質への送達

ベクターの心腔内投与により、miRNA を成体マウスの脳で発現させることが可能かどうか検討した。Synapsin I プロモーターにより GFP と AADC の pre-miRNA を搭載した yfAAV9/3-SynI-GFP-miR-AADC ベクターを作製し (図 7

(a)、マウスの心腔内に投与した (8.5×10^{12} vectors genome/100 μ l)。投与 8 週後に灌流固定し、免疫組織染色により黒質緻密部 (SNc) の AADC、TH、GFP の発現を調べた。SNc において多数の GFP 陽性細胞が認められた (図 7 (b), 7 (c))。GFP/TH 共陽性の細胞では AADC の陽性反応は見られず (図 7 (g), 矢印)、TH 陽性/GFP 陰性の細胞では AADC 陽性であった (図 7 (g), 矢じり)。観察した切片で強く GFP を発現していたドパミン神経細胞において AADC の発現が選択的に阻害された。

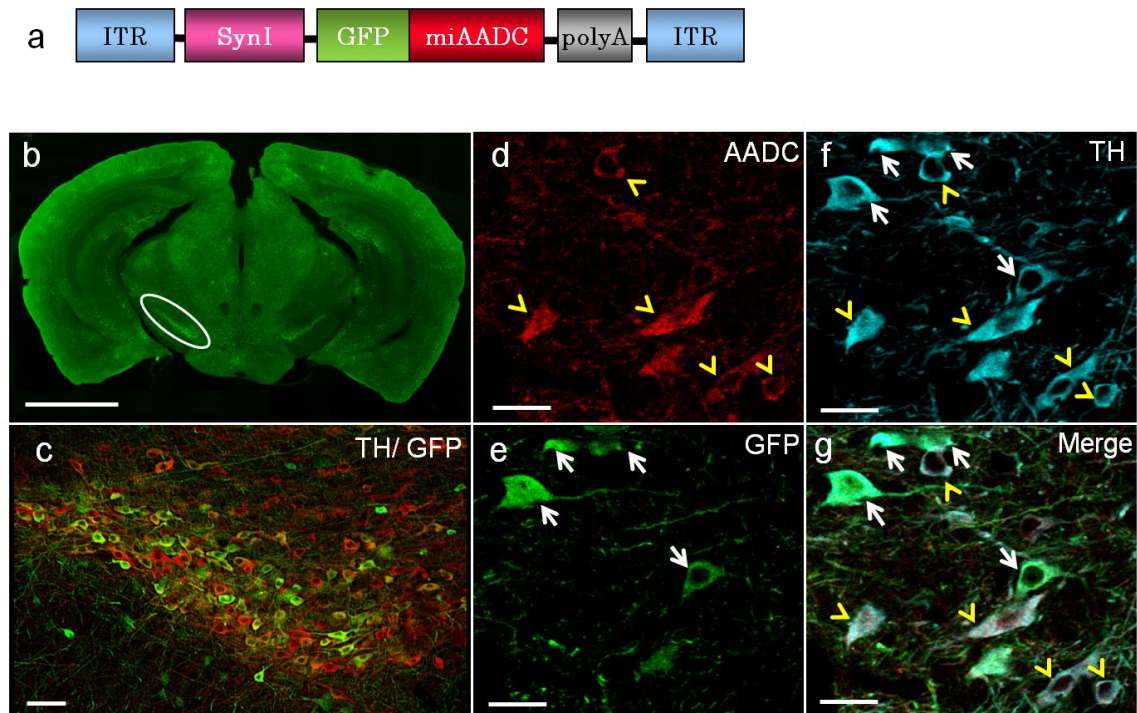


図 7. ベクターの心腔内投与による黒質へ miRNA の送達 (a) ベクター構成の模式図。芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) に対する miRNA 配列を GFP と SV40 poly(A) の配列の間に挿入した。ITR ; inverted terminal repeat、SynI ; synapsin I promoter。 (b) マウス脳の冠状断弱拡大画像。黒質緻密部 (SNc, 白丸部分) に GFP 陽性細胞が密集している。(c) 二重免疫染色した SNc の拡大図。GFP 陽性細胞 (緑) とチロシン水酸化酵素 (TH-) 陽性細胞 (赤) が共局在している。(d) - (g) SNc の神経細胞における AADC 発現が選択的に抑制された。AADC の免疫反応 (赤) が GFP (緑) と TH (青) 両陽性の細胞では検出されなかった (白矢印)。TH 陽性/GFP 陰性の細胞は AADC 免疫反応を示した (矢じり)。Scale bars ; (b) 2 mm、(c) 100 μ m、(d) - (g) 20 μ m。

3. 5. 大型動物の中枢神経への遺伝子導入

神経細胞特異的 SynI プロモーターにより、GFP を発現するチロシン変異型 AAV ベクター (yfAAV9/3-SynI-GFP) をカニクイサルの脊髄腔内に投与した (6.8×10^{12} vector genome/200 μ l)。その結果、脊髄の運動神経領域に多数の GFP 陽性細胞が認められた (図 8 (a)–(c))。また、脳の対角帯、扁桃核、小脳などにも GFP 陽性細胞が確認された (図 8 (d)–(g))。

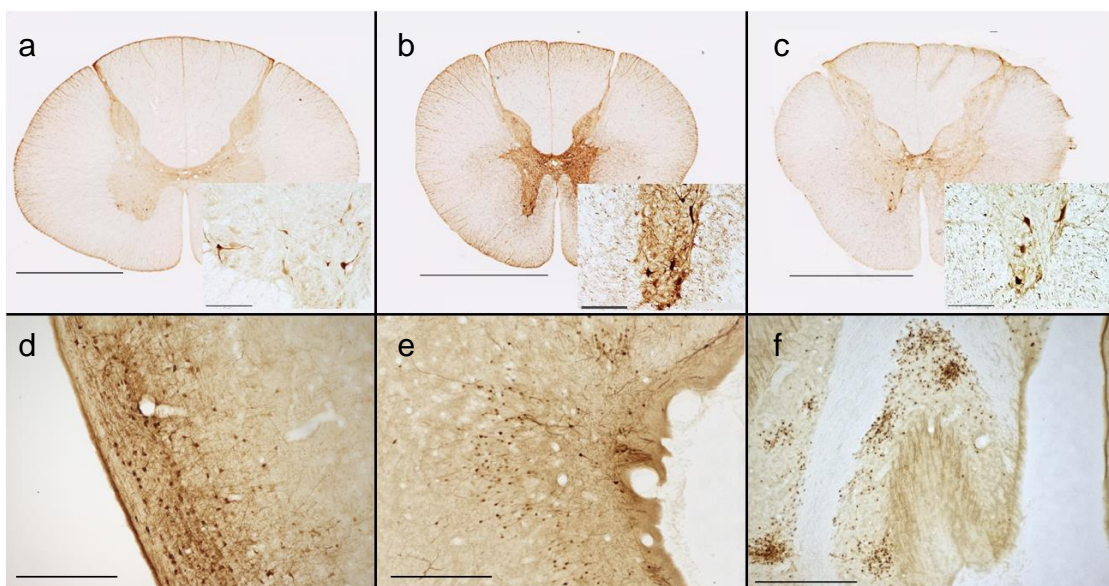


図 8. カニクイサルの広範な中枢神経領域の神経細胞への遺伝子導入

yfAAV9/3-SynI-GFP ベクターを髄腔内投与した。(a)–(c) (a) 頸髄、(b) 胸髄、(c) 腰髄の各前角運動神経細胞領域において多数の細胞に GFP が発現した。(d)–(f) 脳においても (d) 対角帯、(e) 扁桃核、(f) 小脳などで GFP 発現が確認された。Scale bars ; (a)–(c) 1 mm、inset of (a)–(c) 200 μ m、(d)–(f) 400 μ m。

同様にブタでも yfAAV9/3 ベクターを髄腔内投与し、脳と脊髄の広範な領域で GFP 陽性細胞が認められた (図 9)。

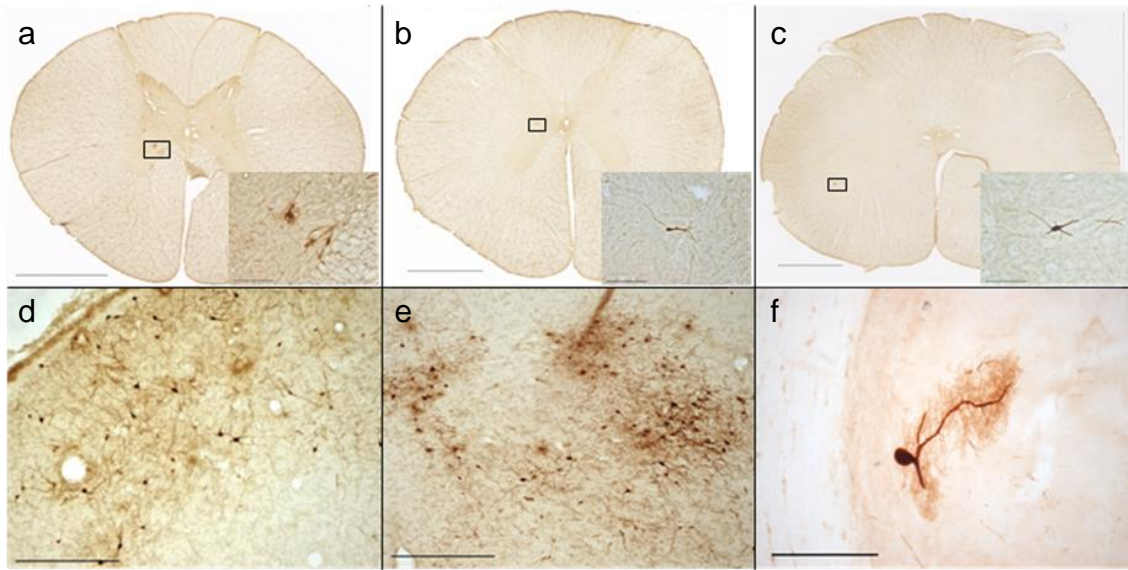


図 9. ブタの広範な中枢神経領域の神経細胞への遺伝子導入 yfAAV9/3-SynI-GFP ベクターを髄腔内投与した。(a)–(c) (a) 頸髄、(b) 胸髄、(c) 腰髄の各前角運動神経細胞領域において多数の細胞に GFP が発現した。(d)–(f) 脳においても(d) 皮質、(e) 線条体、(f) 小脳などで GFP 発現が確認された。Scale bars ; (a)–(c) 2 mm、inset of (a)–(c) 200 μm、(d)・(e) 400 μm、(f) 200 μm。

4. 考察

BBB は中枢神経の広範な領域に影響を及ぼすような疾患に対する遺伝子治療を実現する際に大きな障害となる。Nakai らは、血管内投与した AAV8 ベクターは BBB を透過し、成体マウスの脳において神経細胞とグリア細胞の両方に遺伝子が導入されることを 2005 年に報告した³⁹。以来、多くの研究者が全身投与によって中枢神経の広い範囲に治療用遺伝子を運搬できる効率的で安全な AAV ベクターの開発に重点を置いてきた。2 本鎖の自己複製型 AAV9 (self-complementary AAV9, scAAV9) ベクターは血管内投与によりマウス^{14, 17, 19}、ネコ¹¹、サル^{10, 15, 19}、ブタ¹²の BBB を通過し、中枢神経に遺伝子導入できることが明らかになってきた。しかし scAAV9 は挿入できる遺伝子が小さく、大きい遺伝子やプロモーター、調節配列等を搭載できない⁴⁰。さらに、成体のマウス^{13, 41}、サル¹⁹では scAAV9 ベクターにより遺伝子導入される細胞はほとんどがアストロサイトである。アストロサイトへの遺伝子導入は、アストロサイトが病態の形成に関与する筋萎縮性側索硬化症、Parkinson 病などの特定の神経疾患の治療には有用である^{42, 43}。しかし多くの神経疾患の遺伝子治療では、神経細胞へ治療用の遺伝子を送達する必要がある。scAAV ベクターはこの点で本研究の目的に合致しないため、挿入する遺伝子が大きくても効率良く、神経特異的に遺伝子を導入できるベクターを作製する必要がある。

本研究では、神経特異的プロモーターを搭載したチロシン変異型 AAV9/3 ベクターを全身投与または髄腔内投与することによって、成体マウスとサルの中枢神経の広範な領域の神経細胞に効率よく遺伝子導入できることを示した。AAV では、外被蛋白質の表面に出ているチロシン残基がベクターの感染には重要な役割を果たしている。これらのチロシン残基が酸化されると、外被蛋白質の N 末端部分が表面に露出しなくなる²²。表面に露出しているチロシン (Y) を

フェニルアラニン (F) へと変えることにより、外被蛋白質がユビキチン化されるのを防ぎ、AAV が核へ細胞内輸送されやすくなる²³。AAV2、AAV8、AAV9 の外被蛋白質の 1 か所の Y を変換したベクターを全身投与するとマウスで網膜や脊髄への遺伝子導入を促進できるが^{24,25,26}、一方で AAV8 や AAV9 の外被蛋白質の Y を 1 か所変換しただけでは骨格筋や心臓における遺伝子発現を促進することはできない²⁷。6 か所ある Y を F へ変換したものの組み合わせを AAV2 ベクターで分析した結果では、3 重変異ベクター (Y444, 500, 730F) が培養細胞²⁸とマウスの肝臓²⁹の両方で最も強力で一定の導入遺伝子発現を示したと報告されている。野生型 AAV9 では 501 番にあるアミノ酸 (AAV2 では 500 番) は元々フェニルアラニンだったため、AAV9 の 2 重変異型ベクター (Y446F, Y731F) を作製した³²。これらの変異は集合活性化蛋白質 (assembly activating protein, AAP) 遺伝子の配列は変えることはなく⁴⁴、変異型の外被蛋白質を持つベクターの力価は、野生型の外被蛋白質をもつベクターと同等であった。

CAG プロモーターは強力な転写活性を示すが、中枢神経に限局せず全身の種々の組織で外来遺伝子を発現させてしまう。中枢神経においても抗体生産細胞に遺伝子が導入されると強い細胞性免疫反応が引き起こされる可能性がある。神経細胞特異的プロモーターを搭載した AAV ベクターを利用すれば、神経細胞で選択的に治療遺伝子を発現させ、免疫反応も抑制できる。本研究では、SynI プロモーターと L7 プロモーターで選択的な発現を確認した。

yfAAV9/3 ベクターで機能的な miRNA を送達することができるかどうかを、黒質緻密部 (SNc) を標的として検討した。SNc の神経細胞は、ドパミン合成に必要な TH と AADC の両方を発現している。AADC に対する miRNA を発現する AAV ベクターを全身投与することにより、SNc において AADC の発現が選択的

に抑制されたことが示唆された。この結果は、大脳基底核機能の研究において成体動物に応用可能な miRNA 送達技術を提供するものである。

5. 結語

大型成体動物の中樞神経の広範な領域の神経細胞に効率よく遺伝子導入可能な AAV ベクターを開発した。AAV9 ベクターの外被蛋白のチロシンをフェニルアラニンに変換することにより血液脳関門の通過性を損なうことなく発現レベルを増強した。また、神経細胞特異的プロモーターを搭載し、神経細胞選択的な遺伝子発現を実現した。このベクターは神経変性疾患のモデル動物作製や遺伝子治療への応用が期待できる。

6. 共同研究者

自治医科大学

神経内科学；滝野直美、宮内ひとみ、伊藤美加

先端医療技術開発センター；菱川修司、牧村幸敏、國田智

脳神経外科；島崎久仁子、小黒恵司

麻酔科；五十嵐孝

医薬基盤研究所筑波霊長類医科学研究センター

小野文子、片貝祐子、柴田宏昭

7. 謝辞

AAV ベクター作製に際し協力して下さった綾部啓子氏に感謝の意を表します。この研究は日本学術振興会の科学研究費 (23590473)、厚生労働省の中樞神経変性疾患研究班からの補助金、文部科学省の革新的領域における科学的研究 (Synapse Neurocircuit Pathology) からの補助金、さらには上原記念生命科学財団によるサポートにより行った。

8. 引用文献

- [1] W. J. Bowers, X. O. Breakefield, and M. Sena-Esteves, “Genetic therapy for the nervous system,” *Human Molecular Genetics*, vol. 20, no. R1, pp. R28–R41, 2011.
BioMed Research International 7
- [2] K. A. High and P. Aubourg, “rAAV human trial experience,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 807, pp. 429–457, 2011.
- [3] M. S. Weinberg, R. J. Samulski, and T. J. McCown, “Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease,” *Neuropharmacology*, vol. 69, pp. 82 - 88, 2013.
- [4] P. Hadaczek, J. L. Eberling, P. Pivrotto, J. Bringas, J. Forsayeth, and K. S. Bankiewicz, “Eight years of clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV2-hAADC,” *Molecular Therapy*, vol. 18, no. 8, pp. 1458–1461, 2010.
- [5] S. Muramatsu, K. Fujimoto, S., Kato, S., Mizukami, H., Asari, S., Ikeguchi, K., Urabe, M., Kume, A., Sato, T., Watanabe, E., Ozawa, K., and Nakano, I., “A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson’s disease,” *Molecular Therapy*, vol. 18, no. 9, pp. 1731–1735, 2010.
- [6] R. T. Bartus, T. L. Baumann, L. Brown, B. R. Kruegel, J. M. Ostrove, and C. D. Herzog, “Advancing neurotrophic factors as treatments for age-related neurodegenerative diseases: developing and demonstrating, “clinical proof-of-concept” for AAV-neurturin (CERE-120) in Parkinson’s disease,” *Neurobiology of Aging*, vol. 34, no. 1, pp. 35–61, 2012.
- [7] C.W. Christine, P. A. Starr, P. S. Larson, J. L. Eberling, W. J. Jagust, R. A. Hawkins, H. F. VanBrocklin, J. F. Wright, K. S. Bankiewicz, and M. J. Aminoff, “Safety and

tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease,” *Neurology*, vol. 73, no. 20, pp. 1662–1669, 2009.

[8] P. A. LeWitt, A. R. Rezai, M. A. Leehey, M. A. Leehey, S. G. Ojemann, A. W. Flaherty, E. N. Eskandar, S. K. Kostyk, K. Thomas, A. Sarkar, M. S. Siddiqui, S. B. Tatter, J. M. Schwalb, K. L. Poston, J. M. Henderson, R. M. Kurlan, I. H. Richard, L. Van Meter, C. V. Sapan, M. J. Doring, M. G. Kaplitt, and A. Feigin, “AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson’s disease: a double-blind, shamsurgery controlled, randomized trial.” *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 4, pp. 309–319, 2011.

[9] Zoran Redzic, “Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences,” *BioMed Central*, 8:3, 2011.

[10] A. K. Bevan, S. Duque, K. D. Foust, P. R. Morales, L. Braun, L. Schmelzer, C. M. Chan, M. McCrate, L. G. Chicoine, B. D. Coley, P. N. Porensky, S. J. Kolb, J. R. Mendell, A. H. Burghes, and B. K. Kaspar, “Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders,” *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 11, pp. 1971–1980, 2011.

[11] S. Duque, B. Joussemet, C. Riviere, T. Marais, L. Dubreil, A. M. Douar, J. Fyfe, P. Moullier, M. A. Colle, and M. Barkats, “Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons,” *Molecular Therapy*, vol. 17, no. 7, pp. 1187–1196, 2009.

[12] T. Federici, J. S. Taub, G. R. Baum, S. J. Gray, J. C. Grieger, K. A. Matthews, C. R. Handy, M. A. Passini, R. J. Samulski, and N. M. Boulis, “Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs,” *Gene Therapy*, vol. 19, no. 8, pp. 852–859, 2012.

- [13] K. D. Foust, E. Nurre, C. L. Montgomery, A. Hernandez, C. M. Chan, and B. K. Kaspar, "Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes," *Nature Biotechnology*, vol. 27, no. 1, pp. 59–65, 2009.
- [14] A. A. Rahim, A. M. Wong, K. Hoefler, S. M. Buckley, C. N. Mattar, S. H. Cheng, J. K. Chan, J. D. Cooper, and S. N. Waddington, "Intravenous administration of AAV2/9 to the fetal and neonatal mouse leads to differential targeting of CNS cell types and extensive transduction of the nervous system," *The FASEB Journal*, vol. 25, no. 10, pp. 3505–3518, 2011.
- [15] L. Samaranch, E. A. Salegio, W. San Sebastian, A. P. Kells, K. D. Foust, J. R. Bringas, C. Lamarre, J. Forsayeth, B. K. Kaspar, and K. S. Bankiewicz, "Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates," *Human Gene Therapy*, vol. 23, no. 4, pp. 382–389, 2012.
- [16] J. J. Glascock, E. Y. Osman, M. J. Wetz, M. M. Krogman, M. Shababi, and C. L. Lorson, "Decreasing disease severity in symptomatic, *Smn*($-/-$);*SMN2*($+/+$), spinal muscular atrophy mice following scAAV9-SMN delivery," *Human Gene Therapy*, vol. 23, no. 3, pp. 330–335, 2012.
- [17] K. D. Foust, X. Wang, V. L. McGovern, L. Braun, A. K. Bevan, A. M. Haidet, T. T. Le, P. R. Morales, M. M. Rich, A. H. Burghes, and B. K. Kaspar, "Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN," *Nature Biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 271–274, 2010.
- [18] D. M. McCarty, "Self-complementary AAV vectors; advances and applications," *Molecular Therapy*, vol. 16, no. 10, pp. 1648–1656, 2008.
- [19] S. J. Gray, V. Matagne, L. Bachaboina, S. Yadav, S. R. Ojeda, and R. J. Samulski, "Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a

comparative study of adult mice and nonhuman primates,” *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 6, pp. 1058–1069, 2011.

[20] A. Ciesielska, P. Hadaczek, G. Mittermeyer, S. Zhou, J. F. Wright, K. S. Bankiewicz, and J. Forsayeth, “Cerebral infusion of AAV9 vector-encoding non-self proteins can elicit cell-mediated immune responses,” *Molecular Therapy*, vol. 21, no. 1, pp. 158–166, 2012.

[21] A. Delzor, N. Dufour, F. Petit, M. Guillermier, D. Houitte, G. Auregan, E. Brouillet, P. Hantraye, and N. Déglon, “Restricted transgene expression in the brain with cell-type specific neuronal promoters,” *Human Gene Therapy Methods*, vol. 23, no. 4, pp. 242–254, 2012.

[22] E. D. Horowitz, M. G. Finn, and A. Asokan, “Tyrosine crosslinking reveals interfacial dynamics in adeno-associated viral capsids during infection,” *ACS Chemical Biology*, vol. 7, no. 6, pp. 1059–1066, 2012.

[23] L. Zhong, B. Li, C. S. Mah, L. Govindasamy, M. Agbandje-Mckenna, M. Cooper, R. W. Herzog, I. Zolotukhin, K. H. Warrington, Jr, K. A. Wegel-Van Aken, J. A. Hobbs, S. Zolotukhin, N. Muzyczka, and A. Srivastava, “Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 22, pp. 7827–7832, 2008.

[24] C. A. Ku, V. A. Chiodo, S. L. Boye, A. F. Goldberg, T. Li, W. W. Hauswirth, and V. Ramamurthy, “Gene therapy using self complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis,” *Human Molecular Genetics*, vol. 20, no. 23, pp. 4569–4581, 2011.

- [25] H. Petrs-Silva, A. Dinculescu, Q. Li, S. H. Min, V. Chiodo, J. J. Pang, L. Zhong, S. Zolotukhin, A. Srivastava, A. S. Lewin, and W. W. Hauswirth, “High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors,” *Molecular Therapy*, vol. 17, no. 3, pp. 463–471, 2009.
- [26] Y. Miyazaki, H. Adachi, M. Katsuno, M. Minamiyama, Y. M. Jiang, Z. Huang, H. Doi, S. Matsumoto, N. Kondo, M. Iida, G. Tohnai, F. Tanaka, S. Muramatsu, and G. Sobue, “Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2,” *Nature Medicine*, vol. 18, no. 7, pp. 1136–1141, 2012.
- [27] B. Cheng, C. Ling, Y. Dai, Y. Lu, L. G. Glushakova, S. W. Gee, K. E. McGoogan, G. V. Aslanidi, M. Park, P. W. Stacpoole, D. Siemann, C. Liu, A. Srivastava, and C. Ling, “Development of optimized AAV3 serotype vectors: mechanism of high-efficiency transduction of human liver cancer cells,” *Gene Therapy*, vol. 19, no. 4, pp. 375–384, 2012.
- [28] M. Li, G. R. Jayandharan, B. Li, C. Ling, W. Ma, A. Srivastava, and L. Zhong, “High-efficiency transduction of fibroblasts and mesenchymal stem cells by tyrosine-mutant AAV2 vectors for their potential use in cellular therapy,” *Human Gene Therapy*, vol. 21, no. 11, pp. 1527–1543, 2010.
- [29] D. M. Markusic, R. W. Herzog, G. V. Aslanidi, B. E. Hoffman, B. Li, M. Li, G. R. Jayandharan, C. Ling, I. Zolotukhin, W. Ma, S. Zolotukhin, A. Srivastava, and L. Zhong, “High efficiency transduction and correction of murine hemophilia B using AAV2 vectors devoid of multiple surface-exposed tyrosines,” *Molecular Therapy*, vol. 18, no. 12, pp. 2048–2056, 2010.
- [30] H. Petrs-Silva, A. Dinculescu, Q. Li, W. T. Deng, J. J. Pang, S. H. Min, V. Chiodo, A. W. Neeley, L. Govindasamy, A. Bennett, M. Agbandje-McKenna,

- L. Zhong, B. Li, G. R. Jayandharan, A. Srivastava, A. S. Lewin, and W. W. Hauswirth, “Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina,” *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 2, pp. 293–301, 2011.
- [31] C. Qiao, W. Zhang, Z. Yuan, J. H. Shin, J. Li, G. R. Jayandharan, L. Zhong, A. Srivastava, X. Xiao, and D. Duan, “Adeno-associated virus serotype 6 capsid tyrosine-to-phenylalanine mutations improve gene transfer to skeletal muscle,” *Human Gene Therapy*, vol. 21, no. 10, pp. 1343–1348, 2010.
- [32] D. Dalkara, L. C. Byrne, T. Lee, N. V. Hoffmann, D. V. Schaffer, and J. G. Flannery, “Enhanced gene delivery to the neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9,” *Gene Therapy*, vol. 19, no. 2, pp. 176– 181, 2012.
- [33] Y. Zhang and D. Duan, “Novel mini-dystrophin gene dual adeno-associated virus vectors restore neuronal nitric oxide synthase expression at the sarcolemma,” *Human Gene Therapy*, vol. 23, no. 1, pp. 98–103, 2012.
- [34] T. Dittgen, A. Nimmerjahn, S. Komai, P. Licznanski, J. Waters, T. W. Margrie, F. Helmchen, W. Denk, M. Brecht, and P. Osten, “Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring *in vivo*,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 52, pp. 18206–18211, 2004.
- [35] O. Meyuhas and A. Klein, “The mouse ribosomal protein L7 gene. Its primary structure and functional analysis of the promoter region,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 20, pp. 11465–11473, 1990.

- [36] G. Gao, L. H. Vandenberghe, M. R. Alvira, Y. Lu, R. Calcedo, X. Zhou, and J. M. Wilson, “Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues,” *Journal of Virology*, vol. 78, no. 12, pp. 6381–6388, 2004.
- [37] X. G. Li, T. Okada, M. Kodera, Nara Y, N. Takino, C. Muramatsu, K. Ikeguchi, F. Urano, H. Ichinose, D. Metzger, P. Chambon, I. Nakano, K. Ozawa, and S. Muramatsu, “Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease,” *Molecular Therapy*, vol. 13, no. 1, pp. 160–166, 2006.
- [38] W. Wagner, S. McCroskery, and J. A. Hammer III, “An efficient method for the long-term and specific expression of exogenous cDNAs in cultured Purkinje neurons,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 200, no. 2, pp. 95–105, 2011.
- [39] H. Nakai, S. Fuess, T. A. Storm, S. I. Muramatsu, Y. Nara, and M. A. Kay, “Unrestricted hepatocyte transduction with adenoassociated virus serotype 8 vectors in mice,” *Journal of Virology*, vol. 79, no. 1, pp. 214–224, 2005.
- [40] Y. Wang, C. Ling, L. Song, L. Wang, G. C. Aslanidi, M. Tan, C. Ling, and A. Srivastava, “Limitations of encapsidation of recombinant self-complementary adeno-associated viral genomes in different serotype capsids and their quantitation,” *Human Gene Therapy Methods*, vol. 23, no. 4, pp. 225–233, 2012.
- [41] H. Zhang, B. Yang, X. Mu, S. S. Ahmed, Q. Su, R. He, H. Wang, C. Mueller, M. Sena-Esteves, R. Brown, Z. Xu, and G. Gao. “Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system,” *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 8, pp. 1440–1448, 2011.
- [42] T. Philips and W. Robberecht, “Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease,” *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 3, pp. 253–263, 2011.

[43] P. M. Rappold and K. Tieu, “Astrocytes and therapeutics for Parkinson’s disease,” *Neurotherapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 413–423, 2010.

[44] M. Naumer, F. Sonntag, K. Schmidt, K. Nieto, C. Panke, N. E. Davey, R. Popa-Wagner, and J. A. Kleinschmidt. “Properties of the adeno-associated virus assembly activating protein,” *Journal of Virology*, vol. 86, no. 23, pp. 13038–13048, 2012.

[45] Skubis-Zegadlo, J., Stachurska, A. and Malecki, M. “Vectrology of adeno-associated viruses (AAV),” *Medycyna wieku rozwojowego*, 17, 202-206 2013.

[46] S. J. Gray, S. Nagabhushan Kalburgi, T. J. McCown, and R. Jude Samulski, “Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates,” *Gene Therapy*, 20, 450-459, 2013.