

氏名	飯田麻子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第470号
学位授与年月日	平成27年3月18日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 尾仲達史 (委員) 教授 水上浩明 講師 佐藤正章

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

中枢神経の広範な領域に病巣のある Alzheimer 病などの疾患に対する遺伝子治療用のベクターとしてアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus, AAV)由来のベクターが期待されている。これまで、霊長類の種々の型の AAV を使用して、血管内投与により中枢神経に効率よく遺伝子導入可能な AAV ベクターの作製が試みられてきた。自己相補性 9 型 AAV (self-complementary AAV9, scAAV9)ベクターを使用すると、血液脳関門(blood brain barrier, BBB)を超えて中枢神経に遺伝子を送達可能であることが報告されているが、scAAV9 は搭載できる配列が短く、この点が本研究の目的には合致しなかった。また、強力な CMV/CAG プロモーターを使用すると成体動物で遺伝子発現する細胞の大部分がグリア細胞であるという難点がある。本研究では、これらの問題点を解決する成体の大型動物においても広範な中枢神経領域の神経細胞に特異的に遺伝子導入できる AAV ベクターを開発することを目的とする。

### 2 研究方法

#### 1)血管内投与型 AAV ベクターの作製

ベクターのバックボーンには 3 型 AAV を使用し、8 型または 9 型 AAV の外被蛋白質のアミノ酸を数か所置換した。神経細胞または希突起膠細胞特異的な遺伝子発現を実現するため、Synapsin I(SynI)プロモーターを使用し、マーカー遺伝子の緑色蛍光蛋白質 GFP や AADC の miRNA を搭載したベクターを作製した。

#### 2) 小動物を使用したスクリーニング

6 週齢以上の成体マウス (C56BL/J) を使用した。1. で作製した GFP や AADC の miRNA を発現するチロシン変異型 AAV ベクター(yfAAV ベクター)を心腔内投与し、中枢神経の広範な領域でこれらの分子を過剰発現させた。投与後組織解析を行い、大型動物への遺伝子導入に最も有力なベクターを選別した。

#### 3) カニクイサル・ブタへの投与

成体のカニクイサル 6 頭、成体のブタ 5 頭をそれぞれ使用し、2. で選択した yfAAV ベクターを髄腔内投与した。投与後組織解析を行った。

#### 4)組織解析

ベクター投与 4 週間後に 4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、脳を摘出し、切片を製作した。種々の抗体を使用して ABC 法また蛍光免疫染色法により組織染色を行った。

### 3 研究成果

CAG プロモーターまたは SynI プロモーターにより GFP を発現する yfAAV9/3-CAG-GFP、yfAAV9/3-SynI-GFP を成体マウスの心腔内に投与し、両者を比較した。CAG プロモーターでは、脳の広い範囲で遺伝子発現が観察されたが、GFP 陽性細胞のほとんどがグリア細胞様の形態を示し、そのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)を発現していた。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。SynI プロモーターでは、脳の広範な領域で GFP の発現が認められ、ほぼ全ての GFP 陽性細胞が神経細胞のマーカーである NeuN 陽性であった。その個数は CAG プロモーターの約 4 倍であった。脊髄でも、前角の choline acetyl transferase (ChAT)陽性細胞で GFP の発現が認められた。末梢組織での GFP 発現は神経様の形態を示す細胞に限局しており、実質細胞では観察されなかった。

プルキンエ細胞特異的な L7 プロモーターを搭載した場合には、プルキンエ細胞選択的に GFP の発現を認めた。

また、SynI プロモーターにより AADC の miRNA を発現させると、黒質緻密部の神経細胞において AADC の発現が選択的に阻害されることが示唆された。

yfAAV9/3-SynI-GFP をカニクイサルの脊髄腔内に投与すると、脊髄の運動神経領域に多数の GFP 陽性細胞が認められた。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。ブタにおいても、脳と脊髄の広範な領域において多数の GFP 陽性細胞が認められた。

### 4 考察

中枢神経の広範な領域に病変のある疾患に対する遺伝子治療を実現する際、BBB は大きな障害となる。血管内投与した AAV8 ベクターが BBB を通過し、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導入されることが報告されて以来、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 AAV ベクターの開発を目指してきた。自己相補性 9 型 AAV (self-complementary AAV9, scAAV9)ベクターは血管内投与によりマウス・ネコ・サル・ブタの 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が、scAAV9 ベクターは挿入できる配列が短く、大きい遺伝子やプロモーター等を搭載できない。さらに、成体のマウス、サルでは 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。これらの点が本研究の目的には合致せず、新たな AAV ベクターの開発が必要と考えた。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 AAV ベクターの全身投与または髄腔内投与によって、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 が核内へ輸送されやすくなる。AAV2 ベクターでは 6 か所ある Y を F へ置換した種々の組み合わせのうち、3 重変異ベクター(Y444, 500, 730F)が培養細胞とマウスの肝臓において最も高い遺伝子導入効率を示すことが報告されている。本研究において、野生型 AAV9 では AAV2 の 500 番に相当する 501 番

のアミノ酸が元々フェニルアラニンだったため、2重変異型ベクター(Y446F, Y731F)を作製した。CAGプロモーターは強力な転写活性を示すが、中枢神経に限らず全身の種々の組織で外来遺伝子を発現させる。抗原提示細胞において外来遺伝子が発現すると、中枢神経においても細胞性免疫反応が引き起こされる可能性がある。SynIプロモーターを利用すれば、神経細胞で選択的に遺伝子を発現させ、免疫反応を抑制することができる。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。

AADCのmiRNAを発現するyfAAV9/3ベクターにより、黒質緻密部においてAADCの発現が選択的に抑制されることが示唆された。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 結論

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し、神経細胞特異的プロモーターを搭載することによって、大型成体動物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可能なAAVベクターを開発した。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。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、3型AAVのinverted terminal repeats配列間に、①プロモーター配列、②GFP配列、あるいはGFPと芳香族アミノ酸脱炭酸酵素のmiRNAの配列、③2か所のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したAAV9の外被蛋白質の配列、を入れたベクターを作製した。プロモーターとしては、CAGプロモーター、あるいは神経特異的プロモーターのsynapsin Iプロモーター、あるいはプルキンエ細胞特異的L7プロモーターを用いている。このベクターを、マウスの心腔内、あるいは、カニクイザルとブタの脊髄腔内に投与した。その結果、synapsin Iプロモーターを用いると、脳の広範の領域のNeuN陽性細胞がGFPを発現していることを見出した。さらに、脊髄前角においてcholine acetyl transferase陽性細胞がGFPを発現していた。プルキンエ細胞特異的L7プロモーターを用いた場合は、小脳プルキンエ細胞がGFPを発現していた。synapsin Iプロモーター下にGFPと芳香族アミノ酸脱炭酸酵素のmiRNAの配列を入れたベクターを使用すると、チロシン水酸化酵素陽性細胞のうちGFP陽性細胞においては芳香族アミノ酸脱炭酸酵素が陰性であることが観察された。

また、synapsin Iプロモーター下にGFPの配列を入れたベクターを、カニクイザルの脊髄腔内に投与すると、脊髄の前角において多数の細胞がGFP陽性となった。これらのデータは、AAV3/9ベクターを利用し適切なプロモーターを用いると、心腔内あるいは脊髄腔内に投与することで神経細胞に遺伝子を導入できることを示唆している。

研究の目的が理解しやすいよう学位論文の導入部分を改訂し、一部の表現を訂正したうえで、学位論文としてふさわしいと審査員全員一致で認められた。

## 最終試験の結果の要旨

学位論文の内容に沿って発表が行われた。発表に対し、実験の目的、AAV3/9を用いる根拠とその新規性、ベクターの投与量の算出法、投与ベクターの比重、AAV9の外被蛋白質のチロシンをフェニルアラニンに置換すると発現が上昇する機構、CAGプロモーターを用いると発現するニューロン数が少ないことの説明、グラフの縦軸の単位、発現している細胞がニューロンであるという証拠、を含む様々な質問が提出された。これらの質問に対し、申請者は真摯な態度で適切に答えた。申請者は、本研究領域に関して十分な知識と見識を備えており、審査員全員一致で、申請者は学位を授与するに値すると判断した。