

200935042A

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 水澤 英洋

平成 22(2010)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

神経・筋疾患のRNAiを用いた画期的治療法の開発

水澤 英洋

II. 分担研究報告

1. 神経・筋疾患のRNAiを用いた画期的治療法の開発

横田 隆徳

2. AAVベクターを用いたヒトTDP-43発現モデルサル
の病理組織学的検索

木村 展之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

研究代表者	水澤英洋	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	主任教授
研究分担者	横田隆徳	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	教授
研究分担者	木村展之	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究員

研究要旨

1) 肝臓で産生される変異 transthyretin(TTR)が末梢神経に沈着して発症する家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)に対し、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)8型をベクターとして TTR を抑制する shRNA による遺伝子治療の基礎実験として、shRNA 発現 AAV8 の静脈投与でカニクイザルの肝臓の内因性 SOD1 の発現を顕著にかつ安全に抑制することに成功し、shRNA の FAP への臨床応用に大きな可能性を示した。

2) 孤発性 ALS の遺伝子治療のための基礎実験として、カニクイザルの頸髄前角細胞に AAV1 型ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させ、進行性の前肢運動麻痺と電気生理学的に正中神経の運動神経軸索興奮を消失させることに成功した。さらに神経病理学的に外因性ヒト TDP-43 が前角細胞の細胞質に異常局在して、リン酸化されていることが明らかとなり孤発性 ALS のサルモデルの作製の可能性を示した。

A. 目的：

siRNA を用いて遺伝性の神経変性疾患、免疫性神経疾患、脳血管障害の siRNA/shRNA による遺伝子治療を行う。

B. 研究方法

1) AAV ベクター作製法：

U6 プロモーター 下 anti-SOD1 short hairpin RNA(shRNA)発現配列や、CMV プロモーター 下完全長 human TDP-43 cDNA の N 末端を flag で標識した AAV2 の ITR を持つ発現プラスミドを作製して、パッケージングプラスミド、アデノヘルパープラスミドの 3 種類のプラスミドを HEK293 細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収、凍結・融解法によってベクター粒子を含む細胞溶解液を調整した。そこから塩析さらに iodexanol を用いた密度勾配超遠心法、HPLC 法によって AAV ベクターを分離・精製した。ウイルス力価は、AAV ベクターより DNA を抽出し、TaqMan PCR 法にとりベクター粒子数を決定した。

2) カニクイザルへの AAV ベクター投与と評価：

A) カニクイザル対し anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターを 1×10^{12} (n=3)、 1×10^{13} v.g./kg (n=1) の用量で経静脈的に全身性に投与し、4 週後に解剖を施行した。肝臓における SOD1 の発現抑制効果を評価するために、肝臓から total RNA を抽出しカニクイザル

SOD1 に対する特異的プローブを用いた TaqMan qRT-PCR を施行した。また、蛋白レベルでの発現抑制効果を評価するために、肝臓から蛋白を抽出し、抗ヒト SOD1 抗体を用いた Western blotting を行った。

副作用の評価は血液検査（血算・生化学）を経時的に行うとともに、解剖後、肝臓、心臓を中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作製、HE 染色を施行した。

B) カニクイザル（6-7 歳♂）に対してイソフルレンによる吸入麻酔（1.0~1.5%）下、椎弓切除術を行い、第 6 頸髄の利き手側の前角細胞付近にハミルトンシリンジ 30 G 針を用いて直接注入した。AAV の量は 5 μ l、濃度は high dose 群で 1×10^{13} vg/ml (n=1)、low dose 群で 3×10^{12} vg/ml (n=4) とした。また、コントロールとして、AAV のみを同様の方法で注入した (n=3)。近位筋（上腕二頭筋）の評価として、上柵への握まり行動をビデオ映像を元に解析し評価した。また、遠位筋（拇指球筋）の評価としてアップルテストを行った。

末梢神経伝導検査は、両側の正中神経を手関節部及び肘部で電気刺激（0.2 msec）し、拇指球筋より Belly-tendon 法により、複合筋活動電位を MEB 2000 筋電計（日本光電）で記録した。免疫組織化学的検索は脊髄を中性緩衝ホルマリンによる固定の後、定法に従いパラフィン包埋ブロックを作製し、4 μ m に薄切したものを用いた。組織切片は脱パラフィン後、1%過ヨウ素酸処理によって内因性ペルオキシダーゼ

を不活化し、続いてオートクレーブ法 (121°C5 分) によって抗原賦活化処理を行った後に 5% スキムミルク Buffer にてブロッキングを行い、免疫染色および免疫蛍光二重染色を行った。

すべての動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会と医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターの動物実験委員会の承認を得て行ない、動物の苦痛を除く最大限の努力をした。

C. 研究結果、D. 考察

1) カニクイザルの肝臓の内因性遺伝子の siRNA 発現 AAV8 による遺伝子治療

anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターを投与した個体において、肝臓の定量的 RT-PCR により、投与量 $1 \times 10^{12}/\text{kg}$ では mRNA レベルで 88%、 $1 \times 10^{13}/\text{kg}$ では 98% という標的遺伝子 SOD1 の顕著な抑制効果が得られた。Western blotting でも同様に投与量依存性に抑制効果が得られ、その抑制率は mRNA レベルにほぼ相関していた。

副作用の評価を血算・生化学検査および心臓、肝臓組織学的検査で行い、血液では肝機能を含め異常値は認められず、組織学的にも異常を認めなかった。

2) 孤発性 ALS のサルモデルの作製

TDP-43 の過剰発現による神経症状の出現

TDP-43 を過剰発現させた個体 (n=3) では、すべての個体で AAV 注入後約 2 週から注入側の前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4 週間には上腕は中等度の運動麻痺、手指は完全麻痺となった。TDP-43 high dose 個体では注入側では挙上困難となり、反対側でも程度は軽いものの明らかな運動麻痺がみられた。TDP-43 low dose 個体 (n=4) でも、注入側は high dose 個体とほぼ同様の経過を辿ったが、術後 4 週まで注入側近位筋や反対側上肢の機能は保たれた。一方、コントロール (n=3) では、注入側、反対側ともに術後 4 週までに score の低下はみられなかった。

アップルテストによる遠位筋の評価では、TDP-43 high dose 個体では術後 1 週、TDP-43 low dose 個体では術後 2~3 週にかけて利き手の交代が見られ始め、徐々にそれが顕著になり、最終的に使用する手がほぼ逆転した。また、注入側ではリングを掴んだ手をケージ内に引き込むまでの所要時間が増加していた。コントロールでは、利き手を使用する頻度、所要時間に変化はなかった。

TDP-43 を過剰発現させた個体では、術後 4 週において注入側で複合筋活動電位が誘発さ

れなかった。一方、コントロールの注入側では手術前後で複合筋活動電位が誘発された。TDP-43 を過剰発現させた個体、コントロールともに反対側では、手術前後で複合筋活動電位が誘発された。

神経病理所見では、TDP-43 の発現が C3-Th2 広範な脊髄前角細胞に確認され、その内約 20-60% の神経細胞で TDP-43 の核から細胞質への局在の変化と核での内因性サル TDP-43 の染色性が低下し、核や細胞質の一部には微細な TDP-43 陽性凝集体形成が見られ、その多くはリン酸化されていた。また、一部の前角細胞体は形態異常を示し、軸索は腫大して TDP-43 の凝集物を含んでいた。

本実験系は孤発性 ALS のサルモデル (non-human primate model) となる可能性があり、TDP-43 を標的に siRNA/shRNA による遺伝子治療が効奏するかを今後検証していきたい。

E. 結論

- 1) カニクイザルにおいて anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターの経静脈的投与で肝臓の内因性遺伝子である SOD1 の発現を顕著かつ安全に抑制することに成功し、FAP に対する shRNA 遺伝子治療の有用性を明らかにした。
- 2) 野生型 TDP-43 過剰発現による孤発性 ALS のサルモデルを作製し、TDP-43 を標的にした siRNA/shRNA による遺伝子治療の検証を可能とした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida Y, Ito S, Ohtsuki S, Yamamoto N, Takahashi T, Iwata N, Jishage K, Yamada H, Sasaguri H, Yokota S, Piao W, Tomimitsu H, Saido TC, Yanagisawa K, Terasaki T, Mizusawa H, Yokota T. Depletion of vitamin E increases amyloid beta accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284:33400-33408, 2009
- 2) Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. *FEBS Lett* 583: 213-218, 2009
- 3) 横田隆徳: siRNA による神経変性疾患の遺伝子治療. *Bio Clinica* 24: 44-49, 2009

- 4) 横田隆徳：RNAi を用いた神経疾患の遺伝子治療。神経治療学 26:709-714、2009。
- 5) 横田隆徳：RNA 干渉による ALS の治療戦略。臨床神経学 49: 821-829、2009。
- 6) Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F, Negishi T. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. J Biol Chem. 284(45): 31291-31302. 2009.
- 7) Kimura N. Endocytic dysfunction and Alzheimer's diseases. Endocytosis (Book). In Press.

2. 学会発表

- 1) 桑原宏哉, 宇野佳孝, 朴文英, 横田隆徳, 水澤英洋. 脳血管内皮細胞への siRNA のデリバリー法の検討. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台. 2009.5.20.
- 2) Piao W, Uno Y, Kuwahara H, Nishina K, Mizusawa H, Yokota T. Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver and brain by conjugation of alpha-tocopherol. 第 15 回日本遺伝子治療学会. 大阪. 2009.7.9-11.
- 3) 宇野佳孝, 朴文英, 仁科一隆, 水澤英洋, 横田隆徳. Efficient in vivo delivery of siRNA to the brain by conjugation of alpha-tocopherol. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜. 2009.12.9-12.
- 4) 桑原宏哉, 齊藤由香里, 仁科一隆, 宇野佳孝, 朴文英, 吉田規恵, 水澤英洋, 横田隆徳. Efficient delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the brain endothelial cells in mice. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜. 2009.12.9-12.
- 5) 吉田規恵, 仁科一隆, 海野敏紀, 宇野佳孝, 桑原宏哉, 朴文英, 水澤英洋, 横田隆徳. Efficient in vivo delivery of α -tocopherol-bound siRNA to liver. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜. 2009.12.9-12.
- 6) 横田隆徳. RNA 干渉を用いた遺伝子治療。第 82 回日本薬理学会年会。2009.3.18、横浜
- 7) 横田隆徳. RNA 干渉による ALS の遺伝子治療。第 50 回日本神経学会総会。2009.5.21、仙台
- 8) 横田隆徳. RNA 干渉の医療への臨床応用。日本薬剤学会第 24 年会。2009.5.23、静岡
- 9) 横田隆徳. RNA 干渉を用いた遺伝子治療の現状。第 82 回日本生化学大会。2009.10.24、神戸
- 10) Kimura N, Yanagisawa K. Immunohistochemical analyses of GM1-ganglioside-bound amyloid β -protein in various aged cynomolgus monkey brains. 2009.

Vienna (Austria). July 11th - 16th, 2009.

- 11) 木村展之, 井上誠, 岡林佐知, 小野文子, 根岸隆之. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by increased Rab GTPases. 第 28 回日本認知症学会. 宮城県仙台市. 2009 年 11 月 20 日～22 日.
- 12) 岡林佐知, 木村展之. LGI3 is involved in A β uptake by astrocytes and endocytosis in neural cells. 第 28 回日本認知症学会. 宮城県仙台市. 2009 年 11 月 20 日～22 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録：

横田隆徳、松村隆介、水澤英洋：変異 MJD 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA。
(特許 4463608 号) 平成 22 年 2 月 26 日

II. 分担研究報告

神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

研究分担者 横田隆徳 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

- 1) 肝臓で産生される変異 transthyretin(TTR)が末梢神経に沈着して発症する家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)に対し、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)8型をベクターとして TTR を抑制する shRNA による遺伝子治療を行う基礎実験として、shRNA 発現 AAV8 の静脈投与でカニクイザルの肝臓の内因性 SOD1 の発現を顕著にかつ安全に抑制することに成功し、shRNA の FAP への臨床応用に大きな可能性を示した。
- 2) 孤発性 ALS の遺伝子治療のための基礎実験として、カニクイザルの頸髄前角細胞に AAV1 型ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させ、進行性の前肢運動麻痺と電気生理学的に正中神経の運動神経軸索興奮を消失させることに成功し、孤発性 ALS のサルモデルの作製の可能性を示した。

A. 目的：

siRNA を用いて遺伝性の神経変性疾患、免疫性神経疾患、脳血管障害の siRNA/shRNA による遺伝子治療を行う。

B. 研究方法

1) AAV ベクター作製法：

U6 プロモーター 下 anti-SOD1 short hairpin RNA(shRNA)発現配列や、CMV プロモーター 下完全長 human TDP-43 cDNA の N 末端を flag で標識した AAV2 の ITR を持つ発現プラスミドを作製して、パッケージングプラスミド、アデノヘルパープラスミドの3種類のプラスミドを HEK293 細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収、凍結・融解法によってベクター粒子を含む細胞溶解液を調整した。そこから塩析さらに iodexanol を用いた密度勾配超遠心法、HPLC 方法によって AAV ベクターを分離・精製した。ウイルス力価は、AAV ベクターより DNA を抽出し、TaqMan PCR 法によりベクター粒子数を決定した。

2) カニクイザルへの AAV ベクター投与と評価：

A) カニクイザルに対し anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターを 1×10^{12} (n=3)、 1×10^{13} v.g./kg (n=1) の用量で経静脈的に全身性に投与し、4 週後に解剖を施行した。肝臓における SOD1 の発現抑制効果を評価するために、肝臓から total RNA を抽出しカニクイザル SOD1 に対する特異的プローブを用いた TaqMan qRT-PCR を施行した。また、蛋白レベルでの発現抑制効果を評価するために、肝臓から蛋白を抽出し、抗ヒト SOD1 抗体を用いた

Western blotting を行った。

副作用の評価は血液検査（血算・生化学）を経時的に行うとともに、解剖後、肝臓、心臓を中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋標本作製、病理学的検索を施行した。

B) カニクイザル（6-7 歳♂）に対してインフルレンによる吸入麻酔（1.0~1.5%）下、椎弓切除術を行い、第 6 頸髄の利き手側の前角細胞付近にハミルトンシリッジ 30 G 針を用いて直接注入した。AAV の量は 5 μ l、濃度は high dose 群で 1×10^{13} vg/ml (n=1)、low dose 群で 3×10^{12} vg/ml (n=4) とした。また、コントロールとして、AAV のみを同様の方法で注入した (n=3)。近位筋（上腕二頭筋）の評価として、上柵への掴まり行動をビデオ映像を元に解析し評価した。また、遠位筋（拇指球筋）の評価としてアップルテストを行った。

末梢神経伝導検査は、両側の正中神経を手関節部及び肘部で電気刺激（0.2 msec）し、拇指球筋より Belly-tendon 法により、複合筋活動電位を MEB 2000 筋電計（日本光電）で記録した。

ウイルス注入 4 週間後に、カニクイザルはバルビタール（25mg/kg）の筋肉注射により深麻酔し、頸髄、筋肉（上腕二頭筋、拇指球筋）を採取した。筋肉は液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し、組織化学的に検討した。

すべての動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会と医薬基盤研究所・霊長類医学研究センターの動物実験委員会の承認を得て行ない、動物の苦痛を除く最大限の努力をした。

C. 研究結果、D. 考察

1) カニクイザルの肝臓の内因性遺伝子の siRNA 発現 AAV8 による遺伝子治療

anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターを投与した個体において、肝臓の定量的 RT-PCR により、投与量 1×10^{12} /kg では mRNA レベルで 88%、 1×10^{13} /kg では 98% という標的遺伝子 SOD1 の顕著な抑制効果が得られた (Fig. 1A)。Western blotting でも同様に投与量依存性に抑制効果が得られ、その抑制率は mRNA レベルにほぼ相関していた (Fig. 1B)。

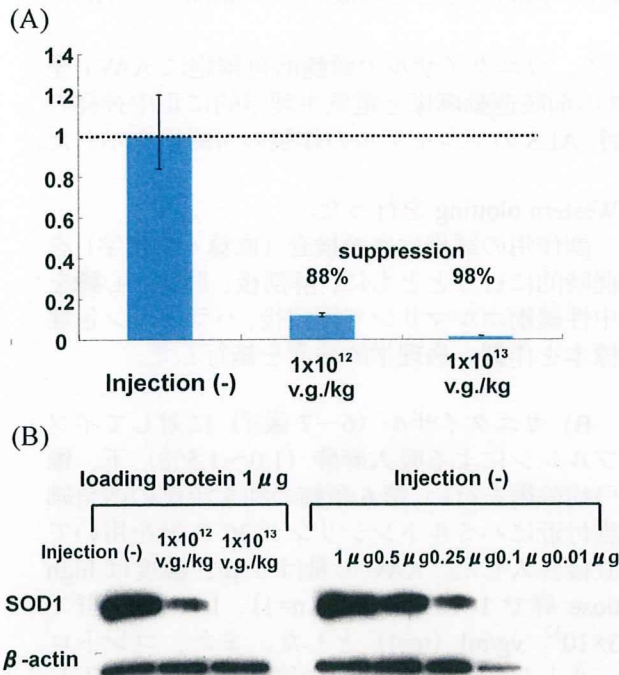


Fig.1 anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターの肝臓における有効性

(A) カニクイザル SOD1 に対する TaqMan プローブを用いた定量的 RT-PCR により、肝臓において標的遺伝子 SOD1 の著大な抑制効果を認めた。(B) ヒト SOD1 に対する抗体を用いた Western blotting で、mRNA レベルにほぼ相関する SOD1 の抑制効果を認めた。

副作用の評価を血算・生化学検査および肝臓組織学的検査で行い、血液では肝機能を含め異常値は認められず (表)、組織学的にも肝細胞壊死・炎症細胞浸潤などの異常を認めなかった (Fig. 2)。心臓の SOD1 も 80% 程度の抑制が認められたが、組織学的に心筋細胞壊死・炎症細胞浸潤などの異常を認めず、心電図異常、胸部レントゲン上の心拡大、肺うっ血などの副作用を認めなかった。

表：投与 4 週後の血算・生化学検査

	1×10^{12} v.g./kg	1×10^{13} v.g./kg
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	593 ± 27	545 ± 5
Hb (g/dl)	11.4 ± 0.4	11.4 ± 0.6
WBC (μl)	9833 ± 5103	7600 ± 3020
PLT ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	35 ± 10	30 ± 6
TP (g/dl)	6.5 ± 0.6	6.1 ± 0.4
AST (IU/l)	20 ± 5	37 ± 6
ALT (IU/l)	22 ± 5	56 ± 20
CPK (IU/l)	119 ± 13	303 ± 102
CRP (mg/dl)	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.05

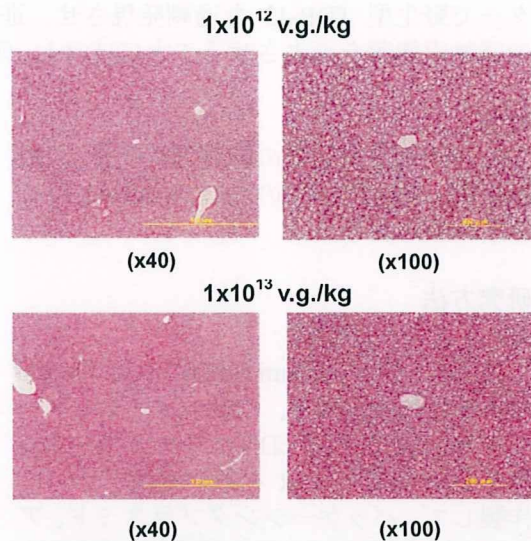


Fig.2 anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターの副作用の評価 (A)。 1×10^{12} /kg、 1×10^{13} /kg の用量とも有意な異常所見は認めなかった。(B) 解剖後の肝臓パラフィン包埋切片 HE 染色で、肝細胞壊死・炎症細胞浸潤などの異常は認めなかった。

2) 孤発性 ALS のサルモデルの作製

TDP-43 の過剰発現による神経症状の出現

TDP-43 を過剰発現させた個体 ($n=3$) では、すべての個体で AAV 注入後約 2 週から注入側の前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4 週後には上腕は中等度の運動麻痺、手指は完全麻痺となった。TDP-43 high dose 個体では注入側では挙上困難となり、反対側でも程度は軽いものの明らかな運動麻痺がみられた。TDP-43 low dose 個体 ($n=4$) でも、注入側は high dose 個体とほぼ同様の経過を辿ったが、術後 4 週まで注入側近位筋や反対側上肢の機能は保たれた。一方、コントロール ($n=3$) では、注入側、反対側ともに術後 4 週までに score の低下はみられなかった。

アップルテストによる遠位筋の評価では、TDP-43 high dose 個体では術後 1 週、TDP-43

low dose 個体では術後 2~3 週にかけて利き手の交代が見られ始め、徐々にそれが顕著になり、最終的に使用する手がほぼ逆転した。また、注入側ではリングを掴んだ手をケージ内に引き込むまでの所要時間が増加していた。コントロールでは、利き手を使用する頻度、所要時間に変化はなかった。

TDP-43 を過剰発現させた個体では、術後 4 週において注入側で複合筋活動電位が誘発されなかった (Fig.3-A(左))。一方、コントロールの注入側では手術前後で複合筋活動電位が誘発された (Fig.3-A(右))。TDP-43 を過剰発現させた個体、コントロールともに反対側では、手術前後で複合筋活動電位が誘発された

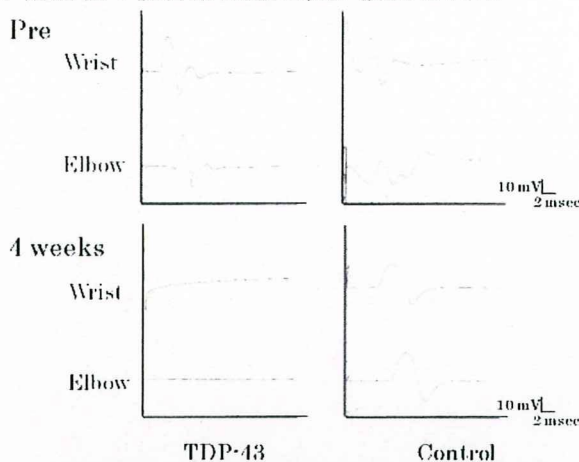


Fig. 3 野生型 TDP-43 過剰発現サルにおける生理学的変化
(A)野生型 TDP-43 を過剰発現させた個体(左)とコントロール(右)の複合筋活動電位。TDP-43 を過剰発現させた個体の注入側は、術後 4 週では電位が誘発されなくなっている。コントロールの注入側は手術前後で電位が誘発されている

上腕二頭筋の組織化学的検索で、野生型 TDP-43 を過剰発現させた個体の注入側では、type1、type2 線維ともに小角化線維が散在しており、神経原性変化を示していた(Fig.

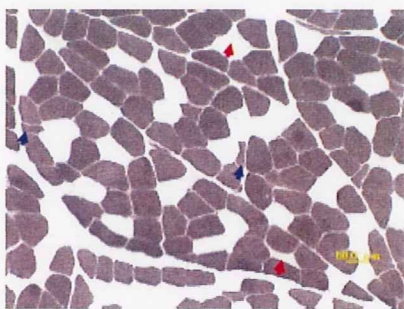


Fig. 4 野生型 TDP-43 過剰発現サルの上腕二頭筋における病理学的変化
(注入側上腕二頭筋の ATPase 活性(pH10.6)。急性の神経原性変化を示唆する小角化線維が type1(赤矢印)、type2(青矢印)線維ともにみられる

カニクイザルに野生型 TDP-43 を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と電気

生理学的異常を認め、前角細胞で TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成及び核の染色性低下という孤発性 ALS 類似の神経病理的病変の再現に成功した(木村分担研究者の報告参照)。本実験系は孤発性 ALS のサルモデル(non-human primate model)となる可能性があり、TDP-43 を標的に siRNA/shRNA による遺伝子治療が効奏するかを今後検証する予定である。

E. 結論

- 1) カニクイザルにおいて anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 型ベクターの経静脈的投与で肝臓の内因性遺伝子である SOD1 の発現を顕著かつ安全に抑制することに成功し、FAP に対する shRNA 遺伝子治療の有用性を明らかにした。
- 2) 野生型 TDP-43 過剰発現による孤発性 ALS のサルモデルを作製し、TDP-43 を標的にした siRNA/shRNA による遺伝子治療の可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida Y, Ito S, Ohtsuki S, Yamamoto N, Takahashi T, Iwata N, Jishage K, Yamada H, Sasaguri H, Yokota S, Piao W, Tomimitsu H, Saido TC, Yanagisawa K, Terasaki T, Mizusawa H, Yokota T. Depletion of vitamin E increases amyloid beta accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284:33400-33408, 2009
- 2) Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. *FEBS lett* 583: 213-218, 2009
- 3) 横田隆徳: siRNA による神経変性疾患の遺伝子治療。 *Bio Clinica* 24: 44-49, 2009
- 4) 横田隆徳: RNAi を用いた神経疾患の遺伝子治療。 *神経治療学* 26:709-714, 2009.
- 5) 横田隆徳: RNA 干渉による ALS の治療戦略。 *臨床神経学* 49: 821-829, 2009.

2. 学会発表(シンポジウムのみ)

- 1) 横田隆徳. RNA 干渉を用いた遺伝子治療。第 82 回日本薬理学会年会。2009.3.18、横浜
- 2) 横田隆徳. RNA 干渉による ALS の遺伝子治療。第 50 回日本神経学会総会。2009.5.21、

仙台

3) 横田隆徳。RNA 干渉の医療への臨床応用。
日本薬剤学会第 24 年会。2009.5.23、
静岡

4) 横田隆徳。RNA 干渉を用いた遺伝子治療の
現状。第 82 回日本生化学大会。2009.10.24、
神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録：

横田隆徳、松村隆介、水澤英洋：変異 MJD 遺
伝子の発現を特異的に抑制する siRNA。
(特許 4463608 号) 平成 22 年 2 月 26 日

AAV ベクターを用いたヒト TDP-43 発現モデルサル の病理組織学的検索

分担研究者 木村 展之

研究要旨：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、未だ病態メカニズムの全容が難治性疾患の1つであり、同疾患の克服に向けた研究活動は我が国においても重要性を増しつつある。近年、ALS 患者の脳組織で確認されるユビキチン陽性封入体の構成蛋白として TAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）が同定され、同因子の遺伝子変異が ALS 患者で広く確認されたことから、TDP-43 病態に注目した研究活動が世界的規模で行われている。一方、ALS の新規診断法・治療法を開発するには *in vivo* での評価系を構築することが必須であるが、残念ながら遺伝子導入マウスを含めた既存のモデル動物では TDP-43 病態の再現性が確認されておらず、新規モデル動物の開発が期待されている。

前年度の成果により、ヒトに近縁な霊長類であるカニクイザルでは、加齢性に TDP-43 の局在やリン酸化状態が変化することが明らかとなり、ALS モデル動物となりうる可能性が示唆された。そこで本研究では、脊髄にヒト TDP-43 を遺伝子導入したカニクイザルの病理組織学的検索を行い、ALS モデル動物としての評価検討を行った。その結果、ALS 様運動疾患を発症したヒト TDP-43 遺伝子導入カニクイザルの脊髄神経細胞では、外因性ヒト TDP-43 の大部分がリン酸化されていることが明らかとなり、TDP-43 のリン酸化が ALS 発症メカニズムに関与している可能性が大いに示唆された。

A. 研究目的：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの変性によって筋繊維の萎縮と筋力低下が引き起こされる神経変性疾患であり、非常に致死性の高い（発症後3～5年で死に至る）疾患である。

ALS 患者脳組織では一部の家族性 ALS（FALS）を除き、タウ陰性ユビキチン陽性封入体の形成という病理組織学的変化が確認されており、その分布は海馬歯状回や大脳皮質神経細胞、脊髄など実に広範に渡っている。また、このユビキチン陽性封入体は前頭側頭葉変性症患者の一部（FTLD-U）やアルツハイマー病患者の一部でも確認されており、新たな proteinopathy としての注目を集めている。近年、この封入体の構成成分として TAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）が同定され、FALS のみならず孤発性 ALS（SALS）患者の脳組織からも TDP-43 の遺伝子変異が確認されたことから、同因子の機能不全または獲得毒性が ALS 病態機構に関与している可能性が非常に高いと考えられる。

現在、変異型 TDP-43 に関する分子生物学的解析が世界的規模で開始されているが、その病態機構に応じた新たな診断法・治療法の確立には、モデル動物を用いた *in vivo* 応用開発研究が必須である。そこで本研究では、最終的な前

臨床試験への応用も視野に入れ、ヒトに近縁な霊長類であるカニクイザルを用いた ALS モデルの開発を目指す。

B. 研究対象および方法

前年度までの成果を基に開発されたヒト TDP-43 発現アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）をカニクイザルの脊髄に接種し、行動学的に異常が確認された時点において安楽殺剖検を行い、脊髄組織を病理組織学的に検索する。尚、対照群として GFP 発現 AAV 接種群を作出し、さらに無処置個体の脊髄組織とも比較検討を行う。

<免疫組織化学的検索>

Flag-TDP-43 発現 AAV 接種群（N=3）、GFP 発現 AAV 接種群（N=2）、および無処置群（N=2）に由来するカニクイザル脊髄組織切片を作成し、後述する抗体群を用いて免疫組織化学的検索を行った。

脊髄組織は中性緩衝ホルマリンによる固定の後、定法に従いパラフィン包埋ブロックを作成し、4μm に薄切したものをを用いた。

組織切片は脱パラフィン後、1%過ヨウ素酸処理によって内因性ペルオキシダーゼを不活化し、続いてオートクレーブ法（121℃5分）によって抗原賦活化処理を行った後に5%スキム

ミルク Buffer にてブロッキングを行い、免疫染色および免疫蛍光二重染色を行った。

検索抗体：

1. anti-TDP-43 rabbit polyclonal antibody (Proteintech Group)
2. anti-human specific TDP-43 mouse monoclonal antibody (Abnova)
3. anti-phosphorylated-TDP-43 (ps409/410-2) rabbit polyclonal antibody (COSMO BIO)
4. anti-Flag mouse monoclonal antibody (SIGMA)
5. anti-GFP rabbit polyclonal antibody (ABR)
6. anti-GFAP rabbit polyclonal antibody (Zymed)
7. anti-Olig-2 rabbit polyclonal antibody (IBL)
8. anti-GLUT5 rabbit polyclonal antibody (IBL)
9. anti-ubiquitin rabbit polyclonal antibody (DAKO)
10. anti-neurofilament mouse monoclonal antibody (DAKO)

C. 研究結果：

Flag 抗体および GFP 抗体を用いた検索の結果、ベクター接種部位である脊髄前核の神経細胞を中心にそれぞれ陽性反応が確認されたことから、今回使用した AAV ベクターは非常に効率よく神経細胞に感染していることが明らかとなった。カニクイザル内因性 TDP-43 を認識可能な汎 TDP-43 抗体 (Proteintech 社製抗体) を用いた染色の結果、神経系細胞全般の核内に陽性反応が確認されたほか、Flag-TDP-43 AAV ベクター接種群では、TDP-43 の凝集様染色像が細胞質辺縁部において確認された (Fig.1)。ヒト TDP-43 特異的抗体を用いた染色の結果、これら細胞質内陽性 TDP-43 は、外因性のヒト TDP-43 であることが確認された (Fig.2)。

ALS 病態に最も強く関与すると考えられている、アミノ酸 409 番目と 410 番目がリン酸化された P-TDP-43 を認識する抗体を用いて検索を行ったところ、上記細胞質内 TDP-43 がリン酸化されていることが明らかになったことのみならず、核内においてもリン酸化 TDP-43 抗体に陽性を示す神経細胞が少なからず確認された (Fig.2)。

一方、GFP 発現 AAV 接種群および無処置群では、リン酸化 TDP-43 の陽性反応は確認されなかった。

ALS 病態下では、神経細胞の変性のみならず、各種グリア細胞の変性・変質もまた重要であると考えられている。そこで、アストログリア (GFAP 抗体) およびミクログリア (GLUT5 抗体) に関する検索を行ったところ、Flag-TDP-43 発現 AAV 接種部位では、GFAP 陽

性アストログリアが若干減少している染色像が確認された。ミクログリアに関しては、際だった炎症反応は確認されず、対照群および無処置群との差は確認されなかった。

免疫二重染色による検証の結果、Flag 抗体およびヒト TDP-43 特異的抗体ともにリン酸化 TDP-43 特異的抗体との共陽性が確認されたことから、本接種群におけるリン酸化 TDP-43 は外因性ヒト TDP-43 であることが確認された (Fig.4)。一方、核内におけるヒト TDP-43 は、必ずしも全てがリン酸化されているわけではなかった (Fig.4)。

Flag 抗体と各種グリア細胞に対する抗体群を用いて二重染色を行ったところ、はっきりとした共陽性細胞は確認されなかった (Fig.4：(注) Olig-2 陽性細胞は、オリゴデンドログリア細胞である)。

この他、外因性のヒト TDP-43 はユビキチン抗体に対しても陽性を示し、Flag-TDP-43 発現 AAV 接種群では、肥大化した神経突起内における neurofilament の蓄積像が確認された。

D. 考察：

本研究の成果によって、外因性ヒト TDP-43 を遺伝子導入したカニクイザルが ALS モデル動物となる可能性が示唆されたとともに、TDP-43 が引き起こす ALS 病態について新たなメカニズム仮説が示唆された。

行動学的に運動疾患病態が確認されたカニクイザルの脊髄前核神経細胞において、AAV ベクターによって遺伝子導入されたヒト TDP-43 は必ずしも細胞質内封入体を形成しておらず、核内および細胞質辺縁部に局在していたことから、TDP-43 の細胞質内封入体形成が ALS 様運動疾患発症に不可欠ではないことが示唆された。一方、リン酸化 TDP-43 抗体を用いた検索により、遺伝子導入された外因性ヒト TDP-43 は核内においてもリン酸化を受けていることが明らかとなったことから、ALS 様運動疾患発症には封入体形成よりもむしろ、TDP-43 のリン酸化が関与している可能性が示唆された。

E. 結論：

本研究によって、AAV ベクターによるヒト TDP-43 遺伝子導入カニクイザルが ALS モデルとなりうる可能性が明らかとなった。

本研究で作出したヒト TDP-43 遺伝子導入カニクイザルは、ALS 様運動疾患を発症したものの、明確な TDP-43 の細胞質内封入体形成は確認されなかった。しかしながら、実際の ALS

患者の脳内では、細胞質のみならず核内や神経突起内など、様々な部位において TDP-43 の凝集体が確認されていることから、TDP-43 の細胞質内封入体形成が必ずしも ALS 発症に必須条件ではないという可能性が示唆される。これらのことから、TDP-43 変性による ALS 発症には、細胞質内封入体形成よりもむしろ、リン酸化による TDP-43 の性状変化に伴う機能不全が原因となっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, ono F, Negishi T. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by an increase in Rab GTPases: a potential mechanism underlying age-dependent endocytic dysfunction. J Biol Chem. 284(45): 31291-31302. 2009.

Kimura N. Endocytic dysfunction and Alzheimer's diseases. Endocytosis (Book). In Press.

2. 学会発表

Kimura N, Yanagisawa K. Immunohistochemical analyses of GM1-ganglioside-bound amyloid β -protein in various aged cynomolgus monkey brains. 2009. Vienna (Austria). July 11th - 16th, 2009.

木村展之, 井上誠, 岡林佐知, 小野文子, 根岸隆之. Dynein dysfunction induces endocytic pathology accompanied by increased Rab GTPases. 第 28 回日本認知症学会. 宮城県仙台市. 2009 年 11 月 20 日~22 日.

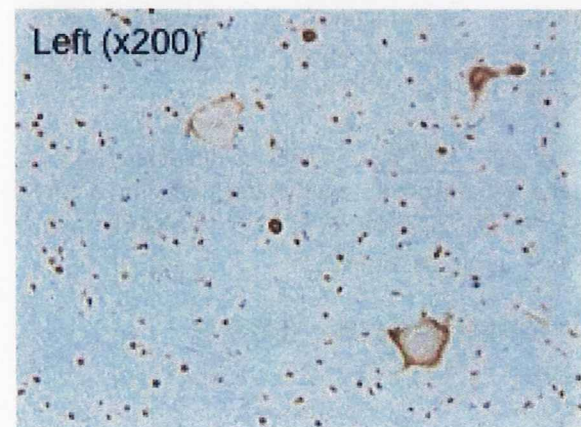
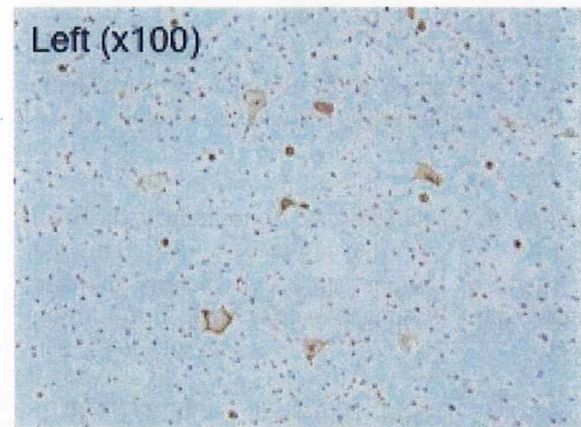
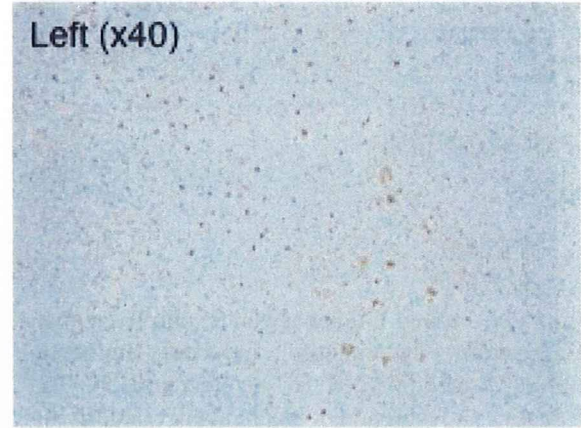
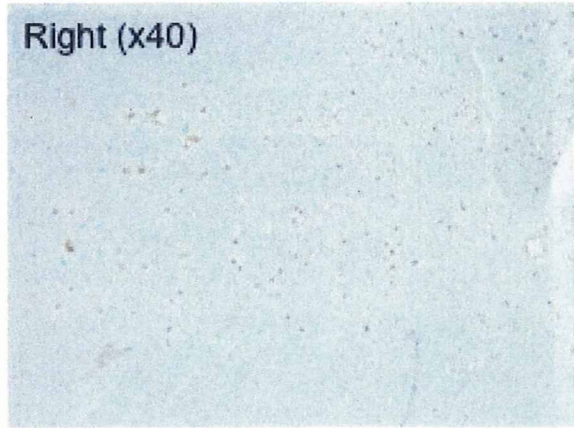
岡林佐知, 木村展之. LGI3 is involved in A β uptake by astrocytes and endocytosis in neural cells. 第 28 回日本認知症学会. 宮城県仙台市. 2009 年 11 月 20 日~22 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Fig.1

Pan-TDP



Right: GFP-vector injected side

Left: Flag-TDP43-vector injected side

Fig.2

Human-TDP

P-TDP

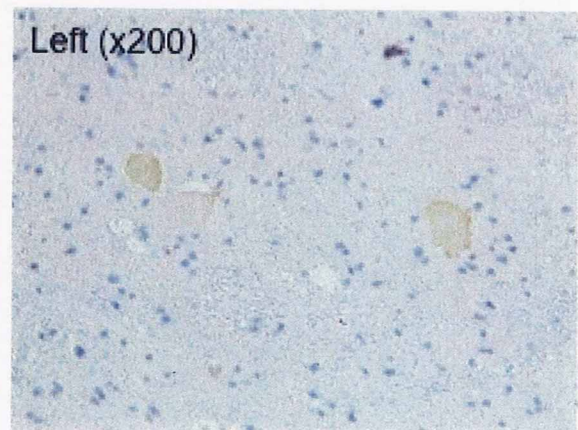
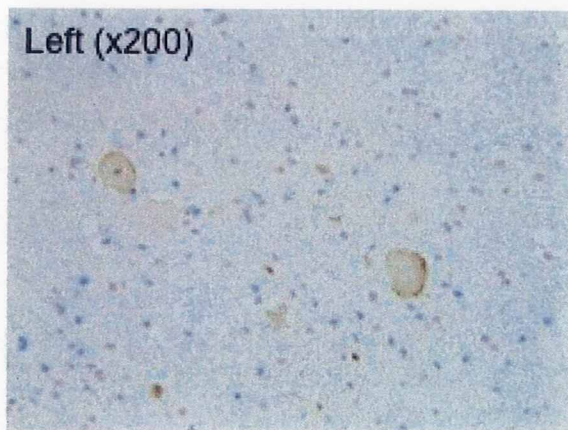
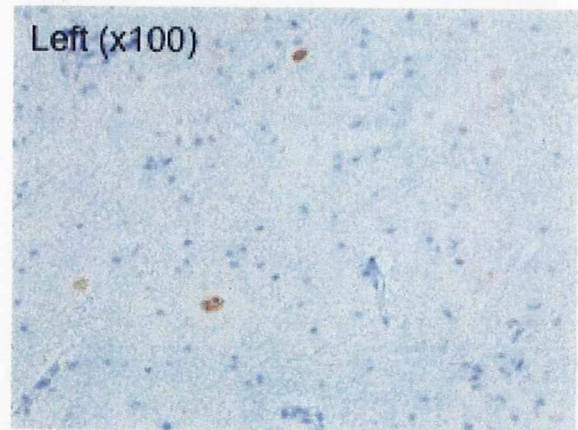
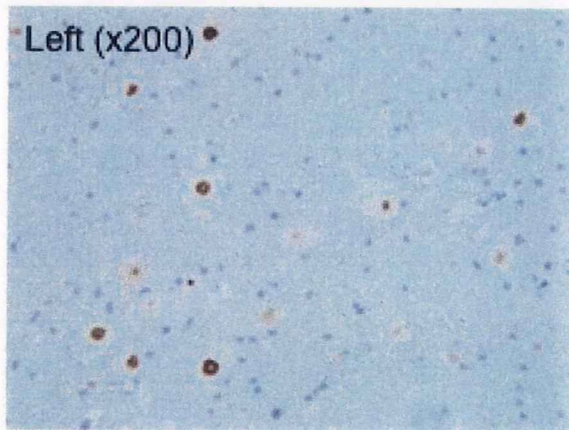
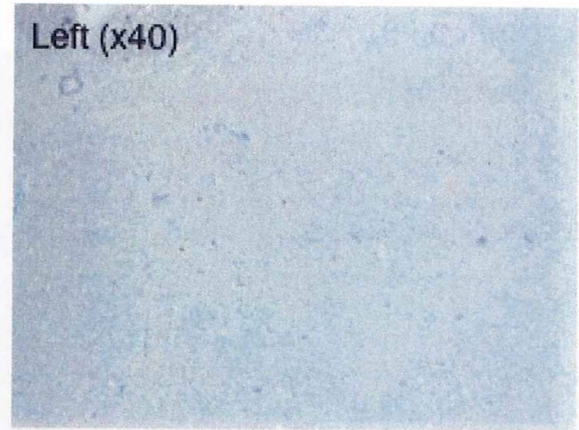
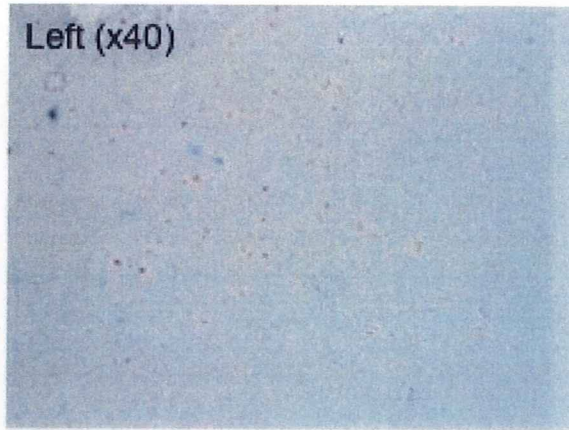


Fig.3

Fig.3

P-TDP

Human-TDP

GFAP

Right (x40)

Left (x40)

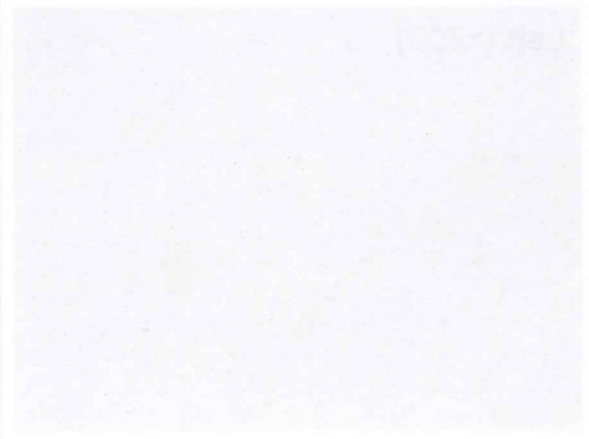
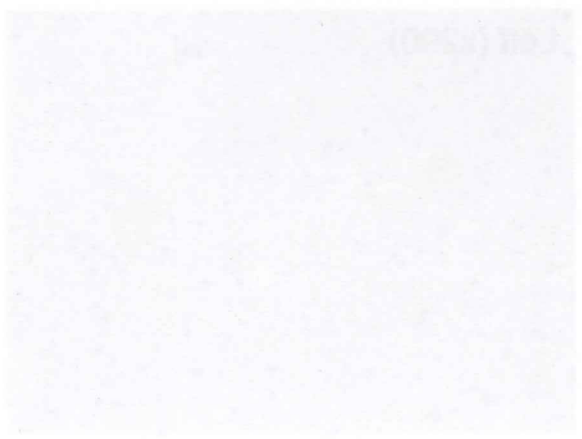
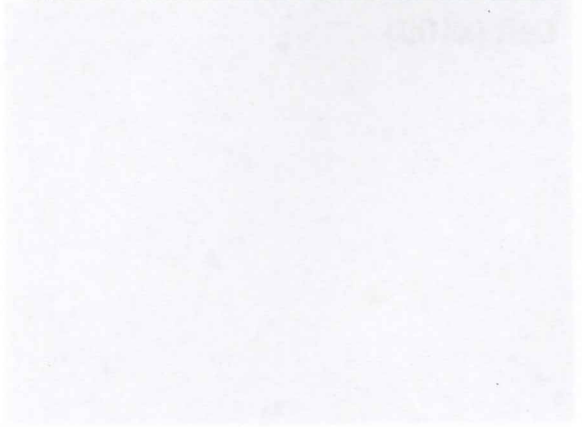
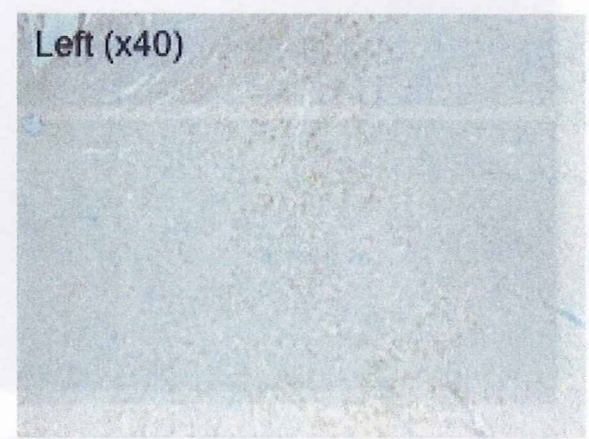
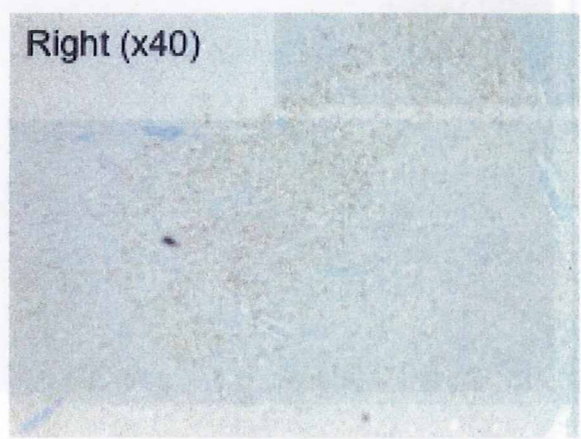
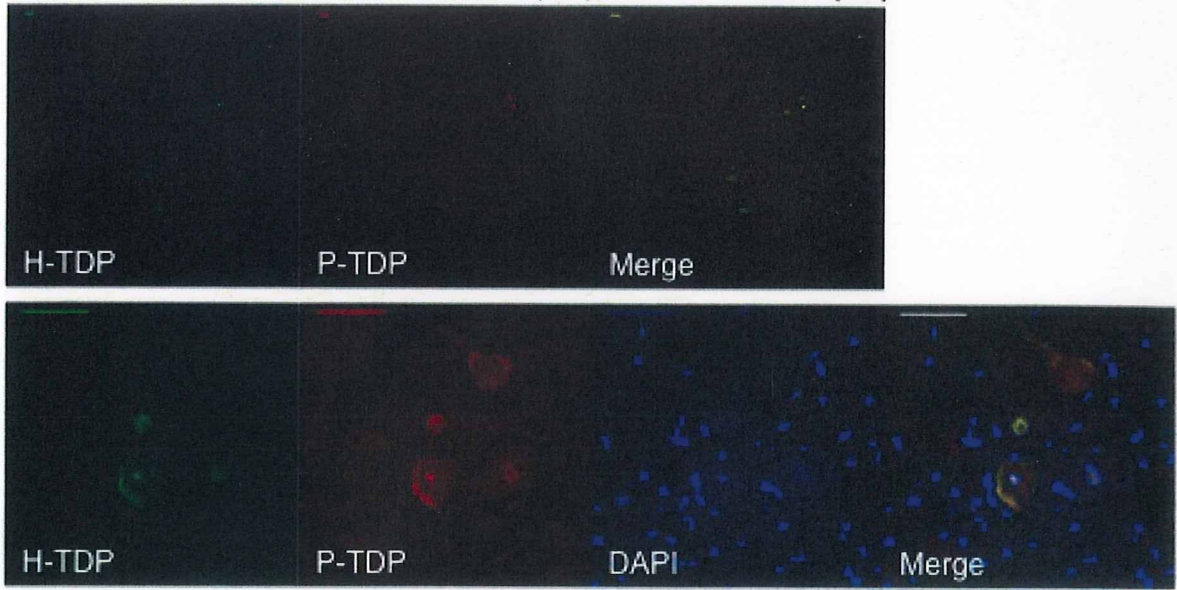
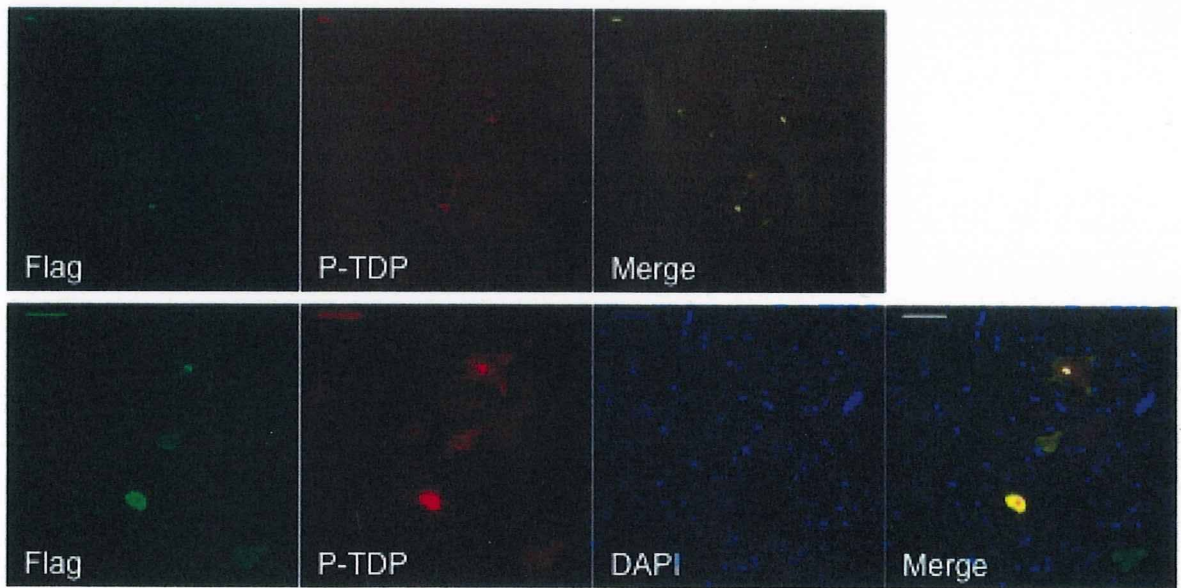


Fig.4

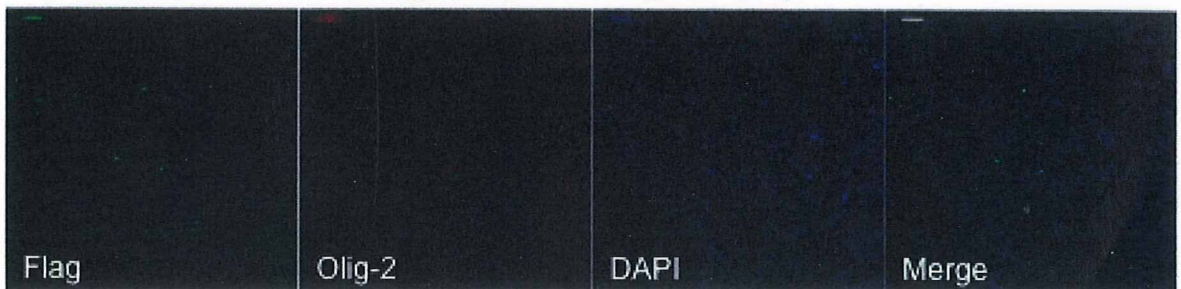
Human-TDP (G) & P-TDP (R)



Flag (G) & P-TDP (R)



Flag (G) & Olig-2 (R)



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

原 著

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻 号	ページ	出版年
Sun L, Kuroiwa T, Ishibashi S, Miki K, Li S, Xu H, Endo S, Mizusawa H	Two region-dependent pathways of eosinophilic neuronal death after transient cerebral ischemia	Neuropathology	29	45-54	2009
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Machida A, Goto J, Yokota O, Miake H, Watabiki S, Taki K, Ishizu H, Haga C, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H	Metastatic CNS Lymphoma presenting with periventricular dissemination-MRI and neuropathological findings in an autopsy case	J. Neurol. Sci.	277	109-113	2009
Miki K, Ishibashi S, Sun L, Xu H, Ohashi W, Kuroiwa T, Mizusawa H	Intensity of Chronic Cerebral Hypoperfusion Determines White/Gray Matter Injury and Cognitive/Motor Dysfunction in Mice	J. Neuroscience Research	87(5)	1270-1281	2009
Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T	Silencing efficiency differs among tissues and endogenous microRNA pathway is preserved in short hairpin RNA transgenic mice	FEBS Letters	583	213-218	2009
赤座実穂, 常深泰司, 三條伸夫, 脇本浩明, 小林大輔, 水澤英洋	左三叉神経障害にて発症したと思われる悪性リンパ腫の1例	臨床神経学別冊	49(7)		2009
Yokote H, Miyake S, J Ludovic Croxford, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T	NKT Cell-Dependent Amelioration of a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering Gut Flora	The American Journal of Pathology	173(6)	1714-1723	2008
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Yokota O, Haga C, Arai T, Akiyama H, Kotera M, Mizusawa H	Japanese encephalitis-serial CT findings and neuropathology in an autopsy case	Clinical Neurophysiology	28(6)	422-429	2009
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Uchihara T, Nakamura A, Haga C, Yokoya O, Ishizu H, Taki K, Akiyama H, Mizusawa H	Short communication Interactable hiccup caused by medulla oblongata lesions: A study of an autopsy patient with possible neuromyelitis optica	J. Neurol. Sci.	285	241-245	2009
齊藤陽子, 佐久間尚子, 石井賢二, 水澤英洋	歌の認知における詞とメロディの役割—歌の認知はなぜ速いのか?—	心理学研究(日本心理学会)	80(5)	405-407	2009