

201027065A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業

神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 水澤 英洋

平成 23(2011)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 ----- 1

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 ----- 5

2. ALS 病態機構解明に向けた、ヒト TDP-43 発現カニクイザルの病理組織学的検索

木村 展之 ----- 9

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 水澤英洋 東京医科歯科大学 主任教授

研究要旨

- 1) 内在性リポ蛋白をベクターとして生体内で short-interfering RNA (siRNA) を in vivo デリバリーすることで脳血管内皮細胞における遺伝子発現を抑制する方法を開発し、脳血管内皮細胞が病態形成に関わる Alzheimer 病、脳梗塞、多発性硬化症といった様々な疾患に対する新たな遺伝子治療として臨床応用しうる大きな可能性を明らかにした。
- 2) 遺伝性筋疾患の遺伝子治療のための基礎実験として、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) と shRNA を用いて骨格筋における標的遺伝子抑制を検討した結果、AAV9 型ベクターで胎児マウスの腹腔内に shRNA を投与する方法は、明らかな副作用を生じることなく、骨格筋で標的遺伝子を抑制できた。このことは先天性筋疾患での遺伝子治療の大きな可能性を示した。
- 3) 遺伝子治療の検証に必要な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のサルモデルを作製して、神経病理学的にブニナ小体様の顆粒状 cystatin-c 陽性像を確認した。

研究分担者氏名

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

木村 展之 独立行政法人医薬基盤研究所
霊長類医学研究センター
研究員

A. 目的

siRNA/shRNA を用いた神経変性疾患、免疫性神経疾患、脳血管障害、筋疾患の新たな遺伝子治療法を開発する。

B. 研究方法

1) 脳血管内皮細胞への siRNA デリバリー

脳内では脳血管内皮細胞にのみ発現する organic anion transporter (OAT3) を標的遺伝子としたセンス鎖 21 塩基、アンチセンス鎖 23 塩基の siRNA を設計し、センス鎖の 3' 末端に cholesterol を共有結合させた (Chol-siOAT3)。Cy3 標識した Chol-siOAT3 (10mg/kg) を HDL に包含させてマウス尾静脈から 6 時間毎に 3 回投与し、24 時間後に脳を摘出して微小血管分画を分離し、脳血管内皮細胞で OAT3 遺伝子抑制効果を検証した。

2) AAV ベクター作製法

anti-TTR short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクタープラスミド、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。

3) 骨格筋への siRNA デリバリー

新生児マウス腹腔内に SOD1 を標的とした 1x10E11vg の shRNA 発現 AAV9 を投与して 4 週間後、肝臓、心筋、骨格筋 (大腿四頭筋、ハムストリング) の病理検索と SOD1 のウエスタンブロット、RT-PCR、ノザンブロットを行いその効果を判定した。

3) ALS サルモデル作製

Flag で標識したヒト TDP-43 発現 AAV9 をカニクイザルの頸髄 C6 に接種し、脊髄組織を病理組織学的に検索した。カニクイザル脊髄組織切片を作成し、anti-cystatin-c (CysC) rabbit polyclonal antibody (DAKO) を用いて免疫組織化学的検索を行った。

C. 研究結果、D. 考察

1) 脳血管内皮細胞への siRNA デリバリー

組織学的評価において、Chol-siOAT3 を単独でまたは LDL 分画と混合して投与した場合には脳血管内皮細胞に微弱なシグナルが見られるのみであったのに対し、HDL 分画と混合して投与したときにはこのシグナルが強く観察された (Fig. 1)。なお、血液脳関門を越えて神経細胞やグリア細胞に到達したことを示唆する結果は得られなかった。Northern blotting では、Chol-siOAT3 を単独でまたは LDL と混合して投与した場合と比較して、HDL と混合した

場合には約 10 倍の density を示す 21 塩基長のバンドが観察され、脳血管内皮細胞における Chol-siOAT3 のプロセッシングが示唆された。以上より、Chol-siOAT3 は HDL に包含された状態において脳血管内皮細胞に多くデリバリーされると考えられた。

Chol-siOAT3 を単独でまたは LDL と混合して投与した場合には有意な遺伝子発現抑制を認めなかったが、HDL と混合して投与した場合には Chol-siOAT3 の総投与量が 10mg/kg のときに 20~30%、30mg/kg のときに 50~60% という用量依存性の OAT3 mRNA の発現低下を認めた (Fig. 2a, b)。他の遺伝子を標的とした cholesterol 結合 siRNA の投与では、遺伝子発現抑制は得られなかった (Fig. 2b)。

欠損マウスを用いた組織学的評価では、ApoE 欠損マウスから採取した HDL に Cy3 標識 Chol-siOAT3 を包含させて ApoE 欠損マウスに投与した場合や、野生型マウスから採取した HDL に Cy3 標識 Chol-siOAT3 を包含させて LDLR 欠損マウスに投与した場合において、脳血管内皮細胞の Cy3 シグナルは著しく減少していた (Fig. 3 a, b)。以上より、Chol-siOAT3 を包含した HDL の脳血管内皮細胞への取り込みには、ApoE が主要なリガンドとして、また LDLR が主要な受容体として介在していることが示された。

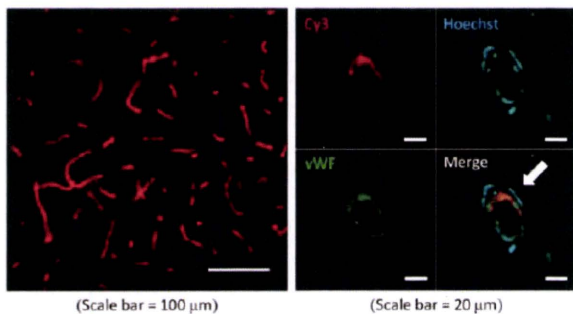


Fig.1 Cy3 標識 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を HDL と混合して静脈内投与した 1 時間後における線条体の組織所見 von Willebrand (vWF) 因子抗体で示された脳血管内皮細胞の細胞質に一致した Cy3 シグナルを認めた。

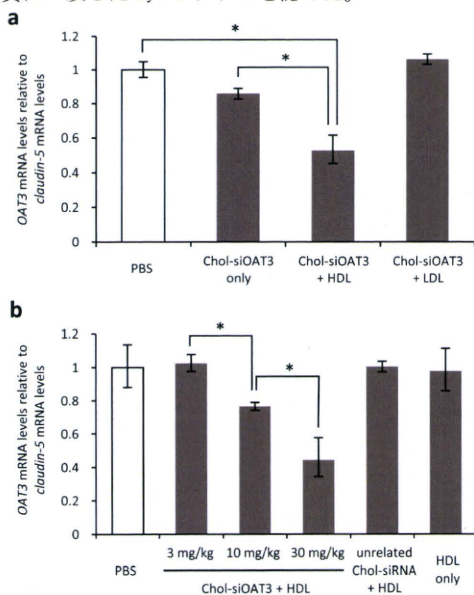


Fig.2 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を単独でまたはリポ蛋白と混合して 12 時間おきに 3 回静脈内投与し、最終投与から 6 時間後に採取した全脳における OAT3 mRNA の RT-PCR (a) HDL と混合して投与した場合のみ、約 50% の OAT3 mRNA の reduction が見られた。(b) HDL と混合して投与した場合には容量依存性の効果が得られ、unrelated Chol-siRNA を HDL と混合して投与した場合には効果が得られなかった。

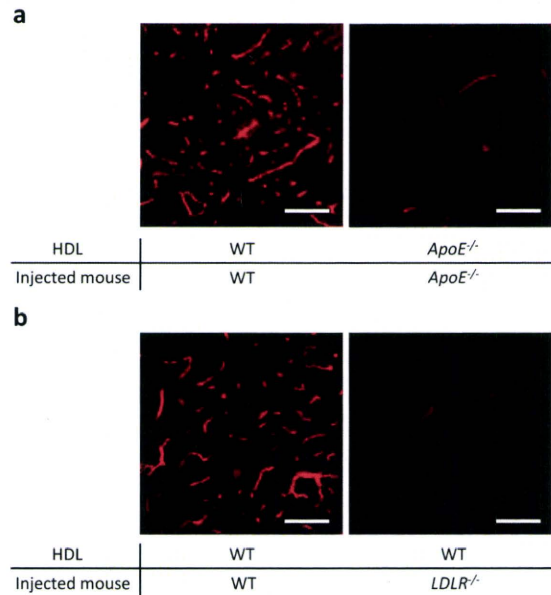


Fig.3 Cy3 標識 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を HDL と混合して静脈内投与した 1 時間後における ApoE 欠損マウスおよび LDLR 欠損マウスの線条体の組織所見 (a) ApoE 欠損マウスの血清から抽出した HDL と混合して ApoE 欠損マウスに投与した場合には、ほとんど Cy3 シグナルを認めなかった。(b) 野生型マウスの血清から抽出した HDL と混合して LDLR 欠損マウスに投与した場合には、ほとんど Cy3 シグナルを認めなかった。

2) 骨格筋における標的遺伝子抑制

これまででも遺伝性筋疾患を遺伝子治療で治そうとする研究は行われてきたが、十分な効果を示す方法は確立していない。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療も欠損タンパクを補う研究が中心に行われている一方で、short hairpin RNA (shRNA) を用いて *in vivo* で標的遺伝子発現を骨格筋で有意に抑制できた報告はないため、AAV を用いて骨格筋での遺伝子発現を抑制できる系の確立を目指した。

成体マウスへ shRNA 発現 AAV9 を尾静脈から投与すると、投与 4 週後の肝臓では 90% 以上の SOD mRNA 抑制率を認めたが、骨格筋での抑制率は 30~40% にとどまり、さらに高濃度の AAV を投与すると重篤な肝機能障害が生じた。一方、新生児マウス腹腔内に AAV9 を投与して 4 週後、肝臓での SOD1 抑制率は低かったが、骨格筋 (ハムストリング) では RNA, タンパクレベルともに約 70% 抑制できた (Fig. 4)。

さらに副作用については、新生児マウス腹腔内投与では発育に異常なく、血清学および病理学的にも肝臓、心筋、骨格筋に異常を認めなかった。

SOD1-siRNA の発現を調べたところ、心筋と骨格筋では siRNA が発現していたのに対し、肝臓では siRNA の発現がほとんど認められなかった。肝臓で siRNA の発現が低い理由は生後肝臓が分裂してウイルスゲノムが希釈されることが考えられた。

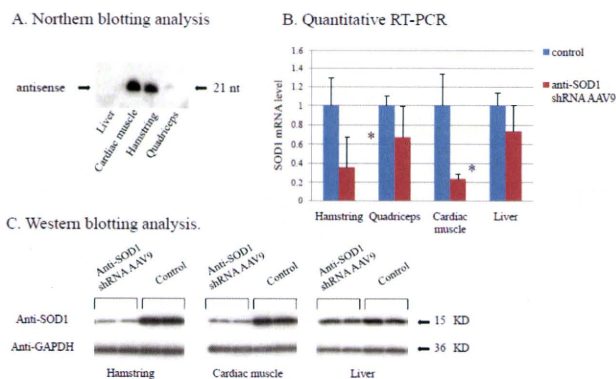


Fig. 4 AAV9-shRNA を新生児腹腔内投与行って 4 週後の解析。心筋と骨格筋で siRNA は発現しているが、肝臓での発現は著明に低下している (A)。siRNA が発現している心筋と骨格筋で抑制効率が良かった (B, C)。

AAV9 に shRNA を組み込んで新生児マウス腹腔内投与を行う方法は、心筋と骨格筋で有意に標的遺伝子発現を抑制ができた初めての系と思われる。今後はこの系を使って先天性筋疾患の治療法の確立を目指す。

3) ALS サルモデル作製

ALS 患者の神経細胞では、ブニナ小体と呼ばれる疾患特異的な細胞内顆粒状病変が確認され、その構成因子の 1 つが CysC である。そこで、CysC 抗体を用いて検索を行ったところ、脊髄前角神経細胞にて、細胞質内に顆粒状の CysC 陽性像が確認され、Flag 抗体および TDP 抗体との二重蛍光染色を行ったところ、ヒト TDP-43 を発現する神経細胞に一致して CysC 陽性顆粒が認められることが明らかとなった。ブニナ小体は ALS の神経病理学的なマーカーとされ、サルモデルにブニナ小体様の CysC 陽性顆粒像が確認されたことから、本研究計画の成果によって我々が作出したヒト TDP-43 発現カニクイザルは、非常に優れた ALS モデル動物であると思われた。

E. 結論

1) 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞へ

の効果的な siRNA のデリバリー法を初めて開発した。脳血管内皮細胞が病態形成に関わる Alzheimer 病、脳梗塞、多発性硬化症といった様々な疾患に対して、新たな遺伝子治療として応用できることが期待される。

2) shRNA を AAV9 に組み込み新生児マウスの腹腔内投与することで、骨格筋で有意な標的遺伝子抑制に成功し、遺伝性筋疾患に対する shRNA 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

論文発表

1) Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H, Yokota T. HDL facilitates in vivo delivery of a-tocopherol-conjugated siRNA to the brain. *Hum Gene Ther*, 2011 (EPub)

2) Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T, Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T. Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles. *Biochem Bioph Res Commun* 405: 204-209, 2011

3) Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In Vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Hum Gene Ther* 22: 27-34, 2011

4) Okabayashi S, Kimura N. LGI3 interacts with flotillin-1 to mediate APP trafficking and exosome formation. *Neuroreport* 21: 606-610, 2010

5) Oikawa N, Kimura N, Yanagisawa K. Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition. *Brain Res* 1315: 137-149, 2010

6) 久保寺隆行, 仁科一隆, 横田隆徳. 神経筋疾患の RNAi 治療の展望. *Annual Review 神経* 2011. 中外医学社, 42-52, 2011.

学会発表

1) Nishina K, Yoshida K, Uno Y, Kuwahara H, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Efficient in

vivo delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the liver using endogenous chylomicron remnant. The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy. 5.20, 2010, Washington, USA
2) Yokota T, et al. Chylomicron-mediated vitamin E-conjugated siRNA delivery from the intestine to the liver. PacificChem 2010. 12.16, 2010, Honolulu, USA

3) 朴 文英, 宇野佳孝, 仁科一隆, 水澤英洋, 横田隆徳. 神経細胞への siRNA の in vivo デリバリー方法の開発. 第 51 回日本神経学会総会. 5.20, 2010, 東京

4) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 宇野佳孝, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. リポ蛋白ベクターを用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー法の開発. 第 51 回日本神経学会総会. 5.20, 2010, 東京

5) 久保寺隆行, 水澤英洋, 横田隆徳. siRNA 発現アデノ随伴ウィルスベクターを用いた FAP の遺伝子治療-カニクイザルでの検討. 第 51 回日本神経学会総会. 5.20, 2010, 東京

6) 仁科一隆, 吉田規恵, 桑原宏哉, 宇野佳孝, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いたコレステロール結合 siRNA の肝臓へのデリバリー. 第 2 回日本 RNAi 研究会. 8.26, 2010, 広島

7) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー法の開発. 第 2 回日本 RNAi 研究会. 8.26, 2010, 広島

8) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー. 第 20 回アンチセンスシンポジウム. 12.2, 2010, 神戸

9) 吉田規恵, 仁科一隆, 桑原宏哉, 朴 文英, 宇野佳孝, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた肝臓へのコレステロール結合 siRNA のデリバリー方法の検討. 第 20 回アンチセンスシンポジウム. 12.2, 2010, 神戸

10) 宇野 佳孝, 朴 文英, 仁科 一隆, 水澤 英洋, 横田 隆徳, HDL をベクターとした中枢神経系への siRNA デリバリー. 第 20 回アンチセンスシンポジウム. 12.3, 2010, 神戸

11) 横田隆徳. RNA 干渉を用いた神経疾患の遺伝子治療. 京都神経フォーラム(招待講演). 4.23, 2010, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録:

[知的財産]

【特願 2010-185501】

特許の名称: 経大腸吸収用医薬組成物

発明人: 横田隆徳、他

出願人: 東京医科歯科大学

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

平成 22 年度 総括研究報告書

研究分担者 横田隆徳 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

- 1) 内在性リポ蛋白をベクターとして生体内で short-interfering RNA (siRNA) を in vivo デリバリーすることで脳血管内皮細胞における遺伝子発現を抑制する方法を開発し、脳血管内皮細胞が病態形成に関わる Alzheimer 病、脳梗塞、多発性硬化症といった様々な疾患に対する新たな遺伝子治療として臨床応用しうる大きな可能性を明らかにした。
- 2) 遺伝性筋疾患の遺伝子治療のための基礎実験として、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) と shRNA を用いて骨格筋における標的遺伝子抑制を検討した結果、AAV9 型ベクターで胎児マウスの腹腔内に shRNA を投与する方法は、明らかな副作用を生じることなく、骨格筋で標的遺伝子を抑制できた。このことは先天性筋疾患での遺伝子治療の大きな可能性を示した。

A. 目的

siRNA/shRNA を用いた神経変性疾患、免疫性神経疾患、脳血管障害、筋疾患の新たな遺伝子治療法を開発する。

B. 研究方法

1) 脳血管内皮細胞への siRNA デリバリー

脳内では脳血管内皮細胞にのみ発現する organic anion transporter (OAT3) を標的遺伝子としたセンス鎖 21 塩基、アンチセンス鎖 23 塩基の siRNA を設計し、センス鎖の 3' 末端に cholesterol を共有結合させた (Chol-siOAT3)。Cy3 標識した Chol-siOAT3 (10mg/kg) を HDL に包含させてマウス尾静脈から 6 時間毎に 3 回投与し、24 時間後に脳を摘出して微小血管分画を分離し、脳血管内皮細胞で OAT3 遺伝子抑制効果を検証した。

2) AAV ベクター作製法

anti-TTR short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクタープラスミド、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。

3) 骨格筋への siRNA デリバリー

新生児マウス腹腔内に SOD1 を標的とした 1x10¹¹vg の shRNA 発現 AAV9 を投与して 4 週後、肝臓、心筋、骨格筋（大腿四頭筋、ハムストリング）の病理検索と SOD1 のウエスタンブロット、RT-PCR、ノザンブロットを行いその効

果を判定した。

C. 研究結果、D. 考察

1) 脳血管内皮細胞への siRNA デリバリー

組織学的評価において、Chol-siOAT3 を単独でまたは LDL 分画と混合して投与した場合には脳血管内皮細胞に微弱なシグナルが見られるのみであったのに対し、HDL 分画と混合して投与したときにはこのシグナルが強く観察された (Fig. 1)。なお、血液脳関門を越えて神経細胞やグリア細胞に到達したことを示唆する結果は得られなかった。Northern blotting では、Chol-siOAT3 を単独でまたは LDL と混合して投与した場合と比較して、HDL と混合した場合には約 10 倍の density を示す 21 塩基長のバンドが観察され、脳血管内皮細胞における Chol-siOAT3 のプロセッシングが示唆された。以上より、Chol-siOAT3 は HDL に包含された状態において脳血管内皮細胞に多くデリバリーされると考えられた。

Chol-siOAT3 を単独でまたは LDL と混合して投与した場合には有意な遺伝子発現抑制を認めなかったが、HDL と混合して投与した場合には Chol-siOAT3 の総投与量が 10mg/kg のときに 20~30%、30mg/kg のときに 50~60% という用量依存性の OAT3 mRNA の発現低下を認めた (Fig. 2a, b)。他の遺伝子を標的とした cholesterol 結合 siRNA の投与では、遺伝子発現抑制は得られなかった (Fig. 2b)。

欠損マウスを用いた組織学的評価では、ApoE 欠損マウスから採取した HDL に Cy3 標識 Chol-siOAT3 を包含させて ApoE 欠損マウスに投与した場合や、野生型マウスから採取した HDL に Cy3 標識 Chol-siOAT3 を包含させて LDLR

欠損マウスに投与した場合において、脳血管内皮細胞の Cy3 シグナルは著しく減少していた (Fig. 3 a, b)。以上より、Chol-siOAT3 を包含した HDL の脳血管内皮細胞への取り込みには、ApoE が主なリガンドとして、また LDLR が主な受容体として介在していることが示された。

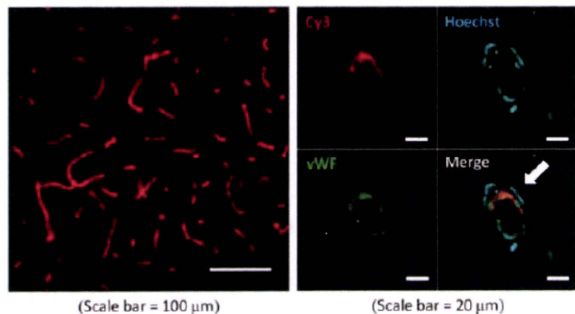


Fig. 1 Cy3 標識 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を HDL と混合して静脈内投与した 1 時間後における線条体の組織所見 von Willebrand (vWf) 因子抗体で示された脳血管内皮細胞の細胞質に一致した Cy3 シグナルを認めた。

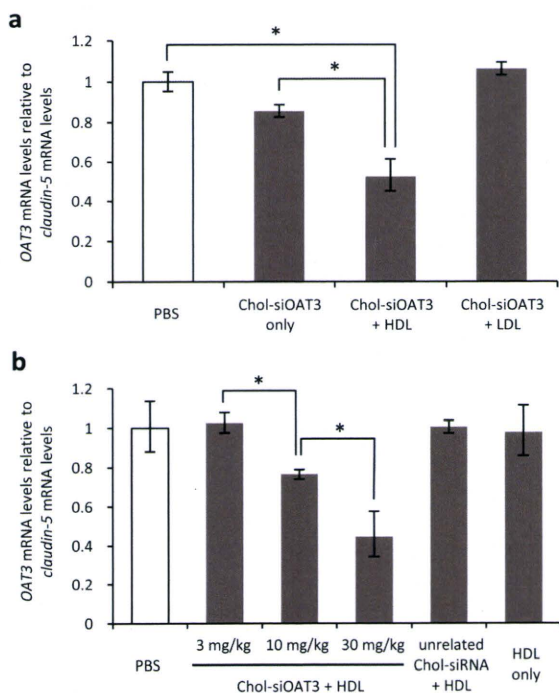


Fig. 2 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を単独またはリポ蛋白と混合して 12 時間おきに 3 回静脈内投与し、最終投与から 6 時間後に採取した全脳における OAT3 mRNA の RT-PCR (a) HDL と混合して投与した場合のみ、約 50% の OAT3 mRNA の reduction が見られた。(b) HDL と混合して投与した場合には容量依存性の効果が得られ、unrelated Chol-siRNA を HDL と混合して投与した場合には効果が得られなかった。

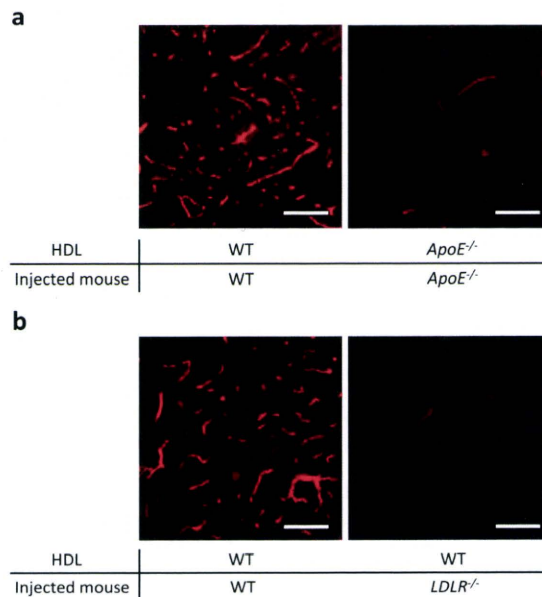


Fig. 3 Cy3 標識 Chol-siOAT3 (10 mg/kg) を HDL と混合して静脈内投与した 1 時間後における ApoE 欠損マウスおよび LDLR 欠損マウスの線条体の組織所見

(a) ApoE 欠損マウスの血清から抽出した HDL と混合して ApoE 欠損マウスに投与した場合には、ほとんど Cy3 シグナルを認めなかった。(b) 野生型マウスの血清から抽出した HDL と混合して LDLR 欠損マウスに投与した場合には、ほとんど Cy3 シグナルを認めなかった。

2) 骨格筋における標的遺伝子抑制

これまでも遺伝性筋疾患を遺伝子治療で治そうとする研究は行われてきたが、十分な効果を示す方法は確立していない。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療も欠損タンパクを補う研究が中心に行われている一方で、short hairpin RNA (shRNA) を用いて *in vivo* で標的遺伝子発現を骨格筋で有意に抑制できた報告はないため、AAV を用いて骨格筋での遺伝子発現を抑制できる系の確立を目指した。

成体マウスへ shRNA 発現 AAV9 を尾静脈から投与すると、投与 4 週後の肝臓では 90% 以上の SOD mRNA 抑制率を認めたが、骨格筋での抑制率は 30~40% にとどまり、さらに高濃度の AAV を投与すると重篤な肝機能障害が生じた。一方、新生児マウス腹腔内に AAV9 を投与して 4 週後、肝臓での SOD1 抑制率は低かったが、骨格筋 (ハムストリング) では RNA, タンパクレベルともに約 70% 抑制できた (Fig. 4)。さらに副作用については、新生児マウス腹腔内投与では発育に異常なく、血清学のおよび病理学的にも肝臓、心筋、骨格筋に異常を認めなかった。

SOD1-siRNA の発現を調べたところ、心筋と骨格筋では siRNA が発現していたのに対し、肝

臓では siRNA の発現がほとんど認められなかった。肝臓で siRNA の発現が低い理由は生後肝臓が分裂してウイルスゲノムが希釈されることが考えられた。

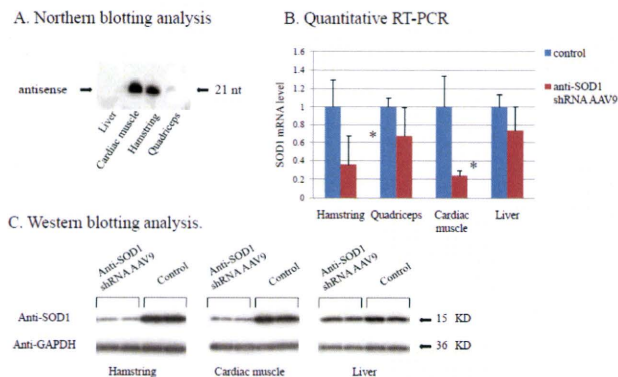


Fig. 4 AAV9-shRNA を新生児腹腔内投与行って 4 週後の解析。心筋と骨格筋で siRNA は発現しているが、肝臓での発現は著明に低下している (A)。siRNA が発現している心筋と骨格筋で抑制効率が高かった (B, C)。

AAV9 に shRNA を組み込んで新生児マウス腹腔内投与を行う方法は、心筋と骨格筋で有意に標的遺伝子発現を抑制ができた初めての系と思われる。今後はこの系を使って先天性筋疾患の治療法の確立を目指す。

E. 結論

- 1) 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への効果的な siRNA のデリバリー法を初めて開発した。脳血管内皮細胞が病態形成に関わる Alzheimer 病、脳梗塞、多発性硬化症といった様々な疾患に対して、新たな遺伝子治療として応用できることが期待される。
- 2) shRNA を AAV9 に組み込み新生児マウスの腹腔内投与することで、骨格筋で有意な標的遺伝子抑制に成功し、遺伝性筋疾患に対する shRNA 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

論文発表

- 1) Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H, Yokota T. HDL facilitates in vivo delivery of α -tocopherol-conjugated siRNA to the brain. *Hum Gene Ther*, 2011 (EPub)
- 2) Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T, Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, Hirai Y,

Shimada T, Mizusawa H, Yokota T. Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles. *Biochem Bioph Res Commun* 405: 204-209, 2011

3) Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In Vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Hum Gene Ther* 22: 27-34, 2011

4) 久保寺隆行, 仁科一隆, 横田隆徳. 神経筋疾患の RNAi 治療の展望. *Annual Review 神経* 2011. 中外医学社, 42-52, 2011.

学会発表

- 1) Nishina K, Yoshida K, Uno Y, Kuwahara H, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Efficient in vivo delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the liver using endogenous chylomicron remnant. The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy. 5. 20, 2010, Washington, USA
- 2) Yokota T, et al. Chylomicron-mediated vitamin E-conjugated siRNA delivery from the intestine to the liver. *PacificChem* 2010. 12. 16, 2010, Honolulu, USA
- 3) 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
- 4) 朴 文英, 宇野佳孝, 仁科一隆, 水澤英洋, 横田隆徳. 神経細胞への siRNA の in vivo デリバリー方法の開発. 第 51 回日本神経学会総会. 5. 20, 2010, 東京
- 5) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 宇野佳孝, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. リポ蛋白ベクターを用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー方法の開発. 第 51 回日本神経学会総会. 5. 20, 2010, 東京
- 6) 久保寺隆行, 水澤英洋, 横田隆徳. siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた FAP の遺伝子治療-カニクイザルでの検討. 第 51 回日本神経学会総会. 5. 20, 2010, 東京
- 7) 仁科一隆, 吉田規恵, 桑原宏哉, 宇野佳孝, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いたコレステロール結合 siRNA の肝臓へのデリバリー. 第 2 回日本 RNAi 研究会. 8. 26, 2010, 広島
- 8) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋

白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー法の開発. 第2回日本 RNAi 研究会. 8.26, 2010, 広島

9) 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴 文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー. 第20回アンチセンスシンポジウム. 12.2, 2010, 神戸

10) 吉田規恵, 仁科一隆, 桑原宏哉, 朴 文英, 宇野佳孝, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた肝臓へのコレステロール結合 siRNA のデリバリー方法の検討. 第20回アンチセンスシンポジウム. 12.2, 2010, 神戸

11) 宇野 佳孝, 朴 文英, 仁科 一隆, 水澤 英洋, 横田 隆徳, HDL をベクターとした中枢神経系への siRNA デリバリー. 第20回アンチセンスシンポジウム. 12.3, 2010, 神戸

12) 横田隆徳. RNA 干渉を用いた神経疾患の遺伝子治療. 京都神経フォーラム(招待講演). 4.23, 2010, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録:

[知的財産]

【特願 2010-185501】

特許の名称: 経大腸吸収用医薬組成物

発明人: 横田隆徳、他

出願人: 東京医科歯科大学

ALS 病態機構解明に向けた、ヒト TDP-43 発現カニクイザルの病理組織学的検索

平成 22 年度 総括研究報告書

分担研究者 木村 展之

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は原因不明の神経難病であり、一刻も早い病態メカニズムの全容解明が望まれている。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 患者で確認されたことから、TDP-43 病態に関する研究活動が大きく注目されるようになった。しかしながら、遺伝子導入マウスを含めた既存のモデル動物では実際の ALS 患者で確認されるような TDP-43 の病理組織学的変化が再現されておらず、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、我々はヒトに近縁な霊長類であるカニクイザルを用いたヒト TDP-43 発現モデルの作出に成功した。同モデルでは、ALS 様運動疾患を発症するとともに、細胞質内での TDP-43 蓄積病変が確認されており、実際の ALS 患者の病態を忠実に再現するモデルであると考えられる。そこで本研究では、ALS 病態メカニズムの解明を目指し、運動疾患発症前（または初期）のモデルサルを用いて、病理組織学的検索を行った。この結果、モデルサルの脊髄では著しいニューロフィラメントの蓄積が確認され、ALS 病態初期における軸索輸送障害の存在が強く示唆された。また、これら蓄積したニューロフィラメントの大部分がリン酸化を受けていたことから、前年度報告した TDP-43 のみならずリン酸化が 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。またこの他、ヒト TDP-43 を発現させた神経細胞では、プニナ小体様の肥大化 cystatin-c 陽性顆粒蓄積像が確認された。

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。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。

昨年度の研究成果により、我々はヒトに

近縁なカニクイザルを用いたヒト TDP-43 発現モデルの作出に成功し、同モデルにおいて運動疾患の発症と TDP-43 病変の形成を確認した。そこで本研究では、ALS の病態メカニズム解明を目指し、臨床症状が出現する以前（または初期）のモデルサルを用いて病理組織学的検索を行う。

B. 研究対象および方法

前年度において確立された、ヒト TDP-43 発現アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）をカニクイザルに接種し、行動学的に異常が確認される以前の時点（半期）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。

またこの他、前年度作成した満期モデルサルの病理組織切片を用いて、ALS 患者の神経細胞で確認されるプニナ小体

(cystatin-c (CysC) 陽性細胞内蓄積顆粒) の検索を行った。

<免疫組織化学的検索>

Flag-TDP-43 発現 AAV 接種群 (満期および半期; N=3)、GFP 発現 AAV 接種群 (満期および半期; 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、4 μ m 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°C 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-neurofilament (NF) mouse monoclonal antibody (DAKO)
2. anti-phosphorylated-neurofilament (P-NF) mouse monoclonal antibody (Sternberger Monoclonals Incorporated)
3. anti-cystatin-c (CysC) rabbit polyclonal antibody (DAKO)
4. anti-Flag mouse monoclonal antibody (SIGMA)
5. anti-human TDP-43 (hTDP) mouse monoclonal antibody (Abnova)
6. anti-phosphorylated-TDP-43 (P-TDP) rabbit polyclonal antibody (COSMO BIO)
7. anti-GFAP rabbit polyclonal antibody (Zymed)
8. anti-GLUT5 rabbit polyclonal antibody (IBL)

C. 研究結果

Flag 抗体および hTDP 抗体を用いた検索の結果、半期安楽殺群においてもヒト TDP-43 は効果的にカニクイザル脊髄神経に感染しており、有意な導入遺伝子の発現が確認された (Fig. 1)。しかしながら、半期安楽殺群の脊髄神経細胞は満期安楽殺群と異なり、リン酸化 TDP-43 (P-TDP) の陽

性像がほとんど確認されなかった。

近年、ALS を含む運動神経変性疾患と、軸索輸送障害との関連が指摘されている。神経細胞特異的中間系フィラメントであるニューロフィラメント (NF) は、軸索輸送によって輸送される蛋白質の一つであり、神経突起および細胞質中での蓄積が軸索輸送障害の大きな指標となっている。そこで、NF およびリン酸化 NF (P-NF) に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、半期安楽殺群の脊髄神経細胞では著しい NF の蓄積像が確認され、それら細胞内に蓄積した NF の大部分がリン酸化を受けていることが明らかとなった (Fig. 2)。一方、興味深いことに、満期安楽殺群の神経細胞では NF の細胞内蓄積はさほど確認されなかった。

ALS 患者の神経細胞では、プニナ小体と呼ばれる細胞内顆粒蓄積病変が確認され、その構成因子が CysC である。そこで、CysC 抗体を用いて検索を行ったところ、満期安楽殺群の脊髄神経細胞にて、CysC 陽性顆粒の細胞内蓄積像が確認され (Fig. 3)、Flag 抗体および hTDP 抗体との二重蛍光染色を行ったところ、ヒト TDP-43 を発現する神経細胞に一致して CysC 陽性顆粒の蓄積が生じていることが明らかとなった (Fig. 4)。

この他、アストログリアとミクログリアに対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、半期安楽殺群では上記グリア細胞による著しい炎症反応は確認されなかった。

D. 考察

本研究の成果によって、ALS 病態下では神経細胞の軸索輸送障害が初期病態メカニズムとして存在することが明らかとなり、TDP-43 のリン酸化は後期病変である可能性が示唆された。近年、軸索輸送モーター蛋白の機能調節因子である dynactin の遺伝子変異が一部の ALS 患者で確認されていることから、軸索輸送障害と ALS 病態との関連性が注目を浴びようになっている。本研究の成果はまさに両者の関係性を *in vivo* で証明しており、軸索輸送障害のメカニズムが今後の大きな研究対象となりうる可能性が大いに示唆された。

一方、P-TDP の出現は後期病変である可能性が示唆されたものの、脊髄神経細胞に

蓄積した NF の大部分がリン酸化を受けていたことから、やはり蛋白質のリン酸化もまた、ALS 病態メカニズムにおいて非常に重要なファクターの1つであることが示唆された。

また、ヒト TDP-43 を発現する神経細胞内にてプニナ小体様の CysC 陽性顆粒の蓄積像が確認されたことから、我々が作出したカニクイザルモデルは非常に優れた ALS モデル動物であることが大いに示された。

E. 結論

本研究によって、ALS 病態メカニズムの初期に軸索輸送障害が関与しており、TDP-43 のリン酸化は比較的後期の病変であるという可能性が示唆された。このことから、加齢に伴う軸索輸送の障害メカニズムを明らかにすることで、ALS の発症メカニズムの解明に繋がる可能性が期待できる。また、プニナ小体様の CysC 陽性顆粒蓄積像が確認されたことから、本研究計画の成果によって我々が作出したヒト TDP-43 発現カニクイザルは、非常に優れた ALS モデル動物であることが実証された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1) Okabayashi S, Kimura N. LGI3 interacts with flotillin-1 to mediate APP trafficking and exosome formation. *Neuroreport* 21: 606-610, 2010

2) Oikawa N, Kimura N, Yanagisawa K. Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid depositio. *Brain Res* 1315: 137-149, 2010

学会発表

1) Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F, Negishi T. Dynein dysfunction induces multi-endocytic pathology and endosomal accumulation of APP leading to beta-site cleavage. International Conference of Alzheimer's Disease and Related

Disorders (ICAD) 2010, 6.10, 2010, Hawaii, USA

2) Kimura N, Inoue M, Okabayashi S, Ono F, Negishi T. Dynein dysfunction causes intracellular A β accumulation via endocytic disturbance such as endosomal accumulation of APP. International Conference on Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease (ADPD) 2011, 3.9, 2011, Barcelona, Spain

3) 木村展之, 井上誠, 岡林佐知, 小野文子, 根岸隆之. Traffic jam hypothesis: dynein dysfunction causes endocytic pathology leading to intracellular A β accumulation. 第 53 回日本神経化学会 (Neuro2010), 9.2, 2010, 兵庫

4) 岡林佐知, 木村展之. LGI3 is involved in A β uptake by astrocytes and endocytosis in neural cells. 第 53 回日本神経化学会 (Neuro2010). 9.2, 2010, 兵庫

5) 木村展之, 岡林佐知, 小野文子. Dynein dysfunction causes the disturbance in anterograde transport of synaptic vesicles via axonal swelling. 第 29 回日本認知症学会. 11.5, 2010, 愛知

6) 岡林佐知, 木村展之. LGI3 interacts with flotillin-1 to mediate APP trafficking and exosome formation. 第 29 回日本認知症学会. 11.5, 2010, 愛知

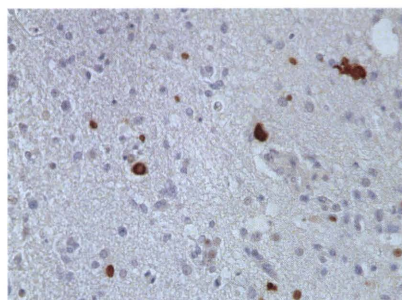
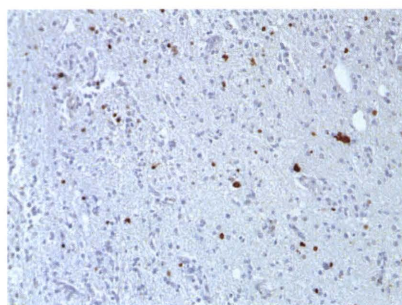
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Fig.1

Immunohistochemistry with anti-Flag antibody

半期安樂殺群
(2wks after AAV injection)



満期安樂殺群
(4wks after AAV injection)

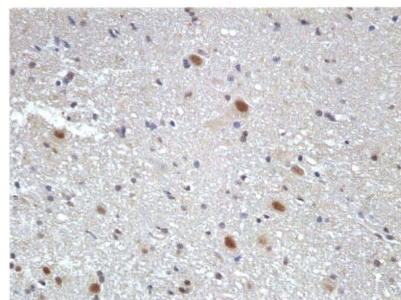
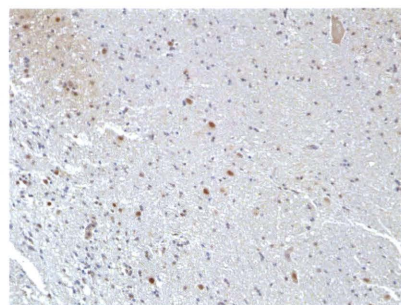
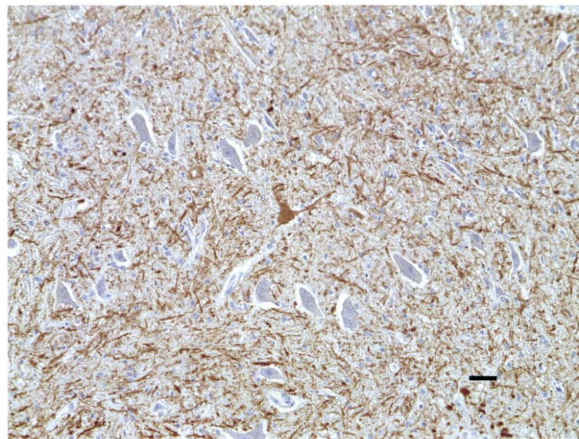


Fig.2

Immunohistochemistry with anti-NF antibody

2wks after AAV injection



Immunohistochemistry with anti-P-NF antibody

2wks after AAV injection

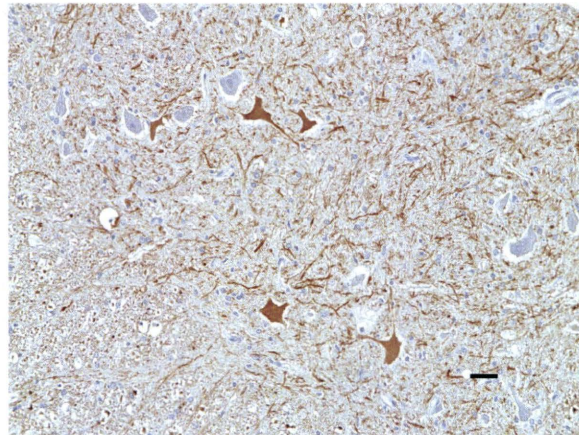


Fig.3

Immunohistochemistry with anti-CysC antibody

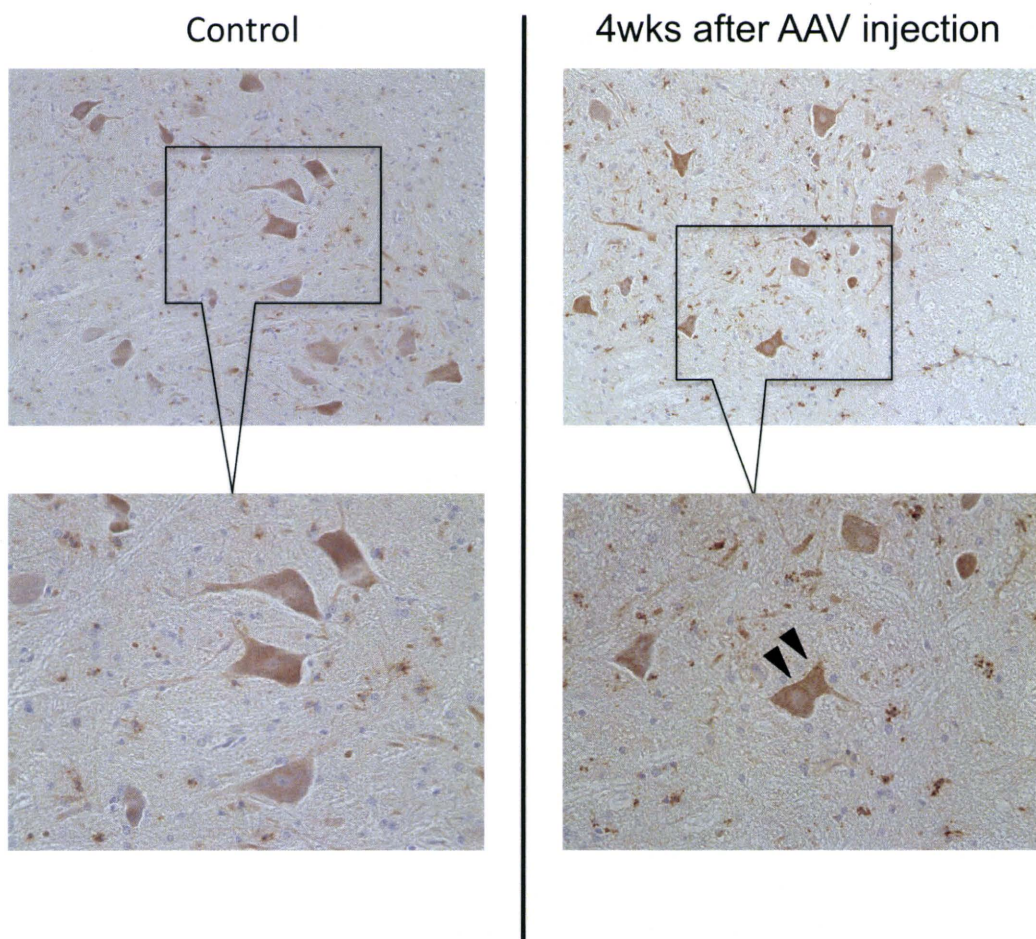
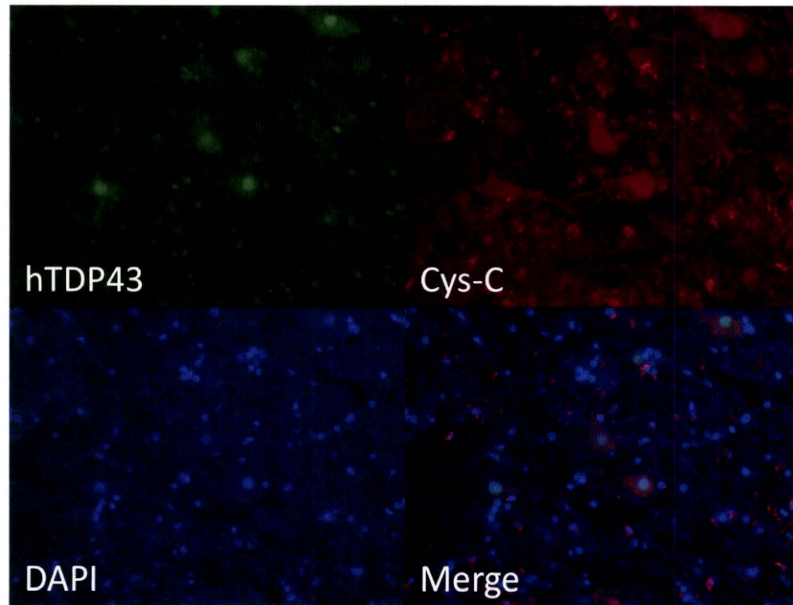
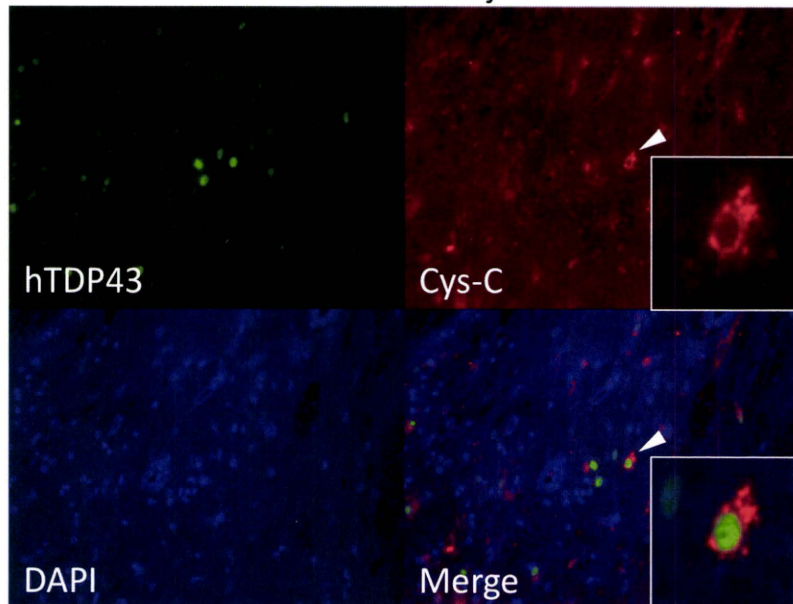


Fig.4 Double immunohistochemistry
with anti-hTDP antibody and anti-CysC antibody
Control



4wks after AAV injection



III. 研究成果の刊行に関する一覧表