

B. 対象・方法 (概要)

対象 ; 4 才女児。ADDC 欠損症の原因遺伝子である DDC に c. 315G>C, p. W105C (母親由来) および c. 385C>T, p. P91S (父親由来) を認めている。

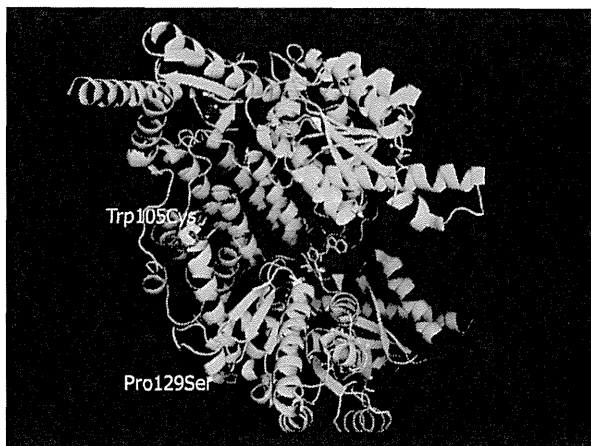


図 3 本症例に認めたアミノ酸変異。中心部の側鎖を示すアミノ酸が酵素活性中心部位

報告されている、結晶構造 (Giardina et al., PNAS 2011) からは、変異アミノ酸は活性中心から離れており、活性に大きな影響をあたえることは考えにくい (図 3)。

髄液中モノアミン値は、L-DOPA 83.5 (正常値 <25 nmol/l)、3-O-MD437.7 (<50)、5-HTP110.3 (<10) と著増し、5-HIAA ; 43. (105-299), HVA ; 75.0 (211-871) と減少しており、AADC 活性低下に合致している。また血漿中 AADC 酵素活性値測定は、チューリッヒ大学小児病院に依頼し、3.62 pmol/min/ml (正常値 36-129) と下限値の約 10% であり、診断が確定している。患者より、同意を得た後、2ml 採血し血液を分離し活性測定に用いた。

方法 ; 血清 150 μ l に 0.7mM Pyridoxal-5-phosphate 15 μ l と 167mM Phosphate buffer (pH7.0) 900 μ l を混合し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし基質として 20mM L-dopa 300 μ l を加えた。37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし Perchloric acid 120 μ l を加え反応を停止し、内部コントロールとして 100ng/ml DHBA (internal standard) を 100 μ l 加え、3500rpm にて 5 分間遠心し、カテコラミン抽出キット (Thermo Fisher Scientific Inc, MA) を用い、カテコラミンを抽出し、Acclaim 120 C18 Reversed-Phase LC Column (4.6X150mm) を接続した HPLC (日本分光、LC-2000) を用い、電気化学検出器 (Thermo Fisher Scientific Inc, Couochem II) にて検出し、DHBA を内部標

準として正常コントロールに対する比として算出した。

(倫理面への配慮)

研究実施にあたって、自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会、自治医科大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。

対象患者は未成年であり、かつ発語がないために意志の確認はできない。よって、患者の保護者に十分に効果とリスクを説明した上で、文書でのインフォームドコンセントを得て実施する。

C. 結果

AADC 活性患者 / 正常対照は 0.242 ± 0.061 (Mean+SEM) となり、ほぼ正常活性の 24% 低下を確認できた。

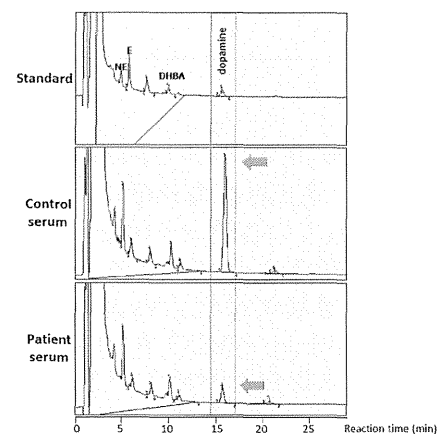


図 4 血漿中の AADC による L-DOPA の Dopamine への分解。⇒が Dopamine に対応するピークであり、面積比 (患者 / 正常コントロール) が非活性を示す。E, Epinephrine; NE, Norepinephrine; DHBA, 3,4-dihydroxybenzylaminehydrobromine

D. 考察

現在 AADC 欠損症は臨床症状で疑われ、一部の髄液化合物検査と、AADC 遺伝子検査にて行われているが、遺伝子変異が証明されない例が存在するため、これらの症例に対して酵素活性測定による確定診断が重要である。また機能的評価としての酵素活性診断は、重症度、予後、治療選択に需要である。今回国内における、血清を用いた AADC 活性測定の系を立ち上げることができた。

E. 結論および今後の展開

AADC 欠損症患者の、示す症状は非特異的であり、今後遺伝子治療を標準治療と確立するためには、平行して早期診断のシステムを整える必

要がある。エクソームシーケンスにより、診断される症例が今後も拡大する可能性はあるが、費用的にも高額なため当面は限られた症例となると考えられる。発達遅滞や、低緊張のような、比較的高頻度に認められる症状に対して、一次スクリーニングを行い、それらの中で可能性が高い症例に関して、二次スクリーニングとして、遺伝子検査や今回確立した AADC の酵素活性は確定診断に重症度予測、薬物治療と遺伝子治療の選択に有効である。また 3-O-MD は髄液のみならず、血漿中でも増加しており、質量分析計を用いたスクリーニングの報告があり、国内での整備が待たれる。この検査法はハイスループット化が可能であり (Chen et al., CCA, 2014)、一次スクリーニングに適しており、次年度の課題である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? Hum Genet 2014 ; 133 : 225-34

2)Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. JIMD Rep. 2014 ; 12 : 65-9

3)Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. Pediatr Neurol. 2014; 50: 417-20

4)Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. Mol Genet Metab Report, 2014; 1:133-138.

5)Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K,

Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. Pediatr Neurol. 2014;50:99-100.

6)Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. J Hum Genet. 2014;59:471-4.

7)Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. Neurology. 2014;82:2230-7.

8)Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. Neurology. 2014;82:1587-96.

9)van de Kamp J, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren S, Mancini G, Steinberg S, Salomons G. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. Clin Genet in press.

10)Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. J Neurol. 2014;261:752-8.

11)Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. Epilepsia. 2014;55:e13-7.

12) Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports*. 2014;2:648-61.

13) Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Brain Dev*. In press.

14) Koderu H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. *J Hum Genet*. In press.

15) Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Creeleukoencephalopathy. *Brain Dev*. In press.

16) Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada T, Saitsu H, Imai Y. Intracranial Hemorrhage and Tortuosity of Veins Detected on Susceptibility-weighted Imaging of a Child with a Type IV Collagen $\alpha 1$ Mutation and Schizencephaly. *Magn Reson Med Sci*. in press.

2. 学会発表

1) Osaka H, Shimbo H, Murayama K, Ohtake A, Noriko Aida N. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mitochondrial Medicine 2014: Pittsburgh, PA June 4-7, 2014*.

1) 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子, 奥田美津子, 露崎悠, 高野亨子, 井合瑞江, 中村和幸, 才津浩智, 小坂仁, 山下純正: 重度精神遅滞, 難治性てんかんの臨床像を示し, PIGO 遺伝子変異が同定された1例. 56回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

2) Osaka H, Tsuyusaka Y, Iai M, Yamashita S, Shimozawa N, Eto Y, Hiroto Saito H: Whole exome sequencing reveals molecular basis of childhood cerebellar atrophy. 第56回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

3) Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T.: Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome. 第64回アメリカ人類遺伝学会 2014. 10. 18-22 サンディエゴ

4) 露崎悠, 井合瑞江, 安西里恵, 佐藤睦美, 高木真理子, 奥田美津子, 高野亨子, 小坂仁, 山下純正, 才津浩智: 治療可能な小脳失調: Cerebral Folate Transport Deficiencyの同胞例. 第56回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

5) 宮内彰彦, 門田行史, 池田尚広, 川原勇太, 長嶋雅子, 小坂仁, 杉江秀夫, 森本哲, 渡辺浩史, 下泉秀夫, 下澤伸行, 山形崇倫: 当院における副腎白質ジストロフィー6例の臨床的検討. 第56回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

H. 知的所有権の取得状況

なし。

AADC 欠損症の遺伝子診断

研究分担者 加藤 光広 山形大学医学部附属病院 小児科講師

研究協力者 久保田 哲夫 安城更生病院 小児科

研究要旨

AADC 欠損症は眼球回転発作とジストニア発作が特徴的であり臨床的に疑うことができるが、診断には特殊な髄液検査と遺伝子解析が必要であり、国内における AADC 欠損症診断例は 3 家系 4 例のみであった。乳児期から臨床的に AADC 欠損症が疑われ、遺伝子解析で DDC の変異を認め、国内 5 例目となる AADC 欠損症を新たに診断した。症例は 1 歳、男児。生後 3 か月から眼球偏位とジストニア発作をきたし、生後 9 か月に髄液検査で 5-HIAA, HVA, MHPG の低下、L-DOPA の上昇を認めた。Sanger 法による遺伝子解析の結果、複合ヘテロ接合性ミスセンス変異 (p.Tyr79Cys, p.Asp252Gly) を認めた。AADC 欠損症の確定診断には DDC 全領域の解析が必要であり、特徴的な臨床症状を周知する必要がある。

A. 研究目的

AADC 欠損症は、DDC 遺伝子変異による常染色体劣性遺伝の先天性代謝異常症であり、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) の機能低下が原因である。AADC の酵素作用によって、5 水酸化トリプトファンがセロトニンに、L-DOPA がドパミンに変換されるため、AADC 欠損症ではセロトニンとドパミンの 2 系統のモノアミン系神経伝達物質の産生が著明に低下する。症状としては、発達遅滞、ジストニアを主体とする錐体外路徴候、発作性異常眼球運動、発汗や皮膚発赤などの自律神経症状、神経過敏、睡眠障害など難治性の多様な神経症状をきたし、多くは重度の発達障害を示し、座位も不能なことが多い。AADC 欠損症の症状の特徴として日内変動が認められる。これは、睡眠によってジストニアや異常眼球運動などの発作症状が改善し、覚醒時間が長くなると発作が起きてくる。診断のためには髄液のモノアミン代謝物質の測定が必要であり、通常的一般検査では診断されないため国内での確定診断例はこれまでのところ 3 家系 4 例のみであった。今回、ジストニア発作と異常眼球運動を契機に AADC 欠損症が疑われ、髄液検査と遺伝子解析で国内 5 例目となる AADC 欠損症の確定診断を行ったので報告する。

B. 研究方法

症例：1 歳男児。血族婚ではない健常両親の第一子。在胎 37 週 5 日帝王切開で出生。仮死なし。出生時体重 2006 g、身長 45.5 cm、頭囲 32.0 cm。生後 3 か月から異常眼球運動（眼球偏位）が出現。易刺激性が強く、刺激後に四肢・体幹を過伸展させるジストニア発作が 1-4 時間持続し、左右差を認めることもあった。脳波は発作間欠期には背景活動は正常で、てんかん性異常波は認められず、ジストニア発作時には左後頭から 9-11Hz の波形が持続した。頭部 MRI にも明らかな異常は認められなかった。当初、非定型的ながらも小児交互性片麻痺やびっくり病／過剰驚愕症が疑われたが、クロナゼパムとクロバザムは無効だった。しだいに異常眼球運動が目立ちはじめ、AADC 欠損症が疑われ、生後 9 か月の髄液検査では、5-HIAA <1.0 ng/ml (21.8-64.2), HVA 1.4 ng/ml (53.7-169.8), MHPG <1.0 ng/ml (9.4-20.6), L-DOPA 32.0 ng/ml (<2.0) と特徴的变化を示し、AADC 欠損症と臨床的に診断された。生後 10 か月の身長は 72.0 cm、体重 7.9 kg、頭囲 42.5 cm で胸腹部に異常を認めず、外表奇形もなかった。1 歳でも追視・固視はなく、未頸定で寝返りも不能であり、数日に 1 回のジストニア発作を繰り返す。

遺伝子解析：両親の同意を得て、患児および両親から採血し、ゲノム DNA を抽出した。DDC 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 14 までの

全コード領域と近傍イントロンをPCRで増幅後にサンガー法による直接塩基配列解析を行ない、野生型と比較した。変異を認めたエクソンについては、両親の解析を追加し由来を確認した。同定された変異については、HGVS (<http://www.hgvs.org>)で過去の報告の有無を、PolyPhen-2

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)とSIFT (<http://sift.jcvi.org>)で病原性の程度を確認した。

(倫理面への配慮)

山形大学医学部倫理委員会の承認を受け(平成22年1月18日 第137号)、保護者から同意を得た。

C. 研究結果

DDC遺伝子に複合ヘテロ接合性ミスセンス変異(c.236A>G in exon 3, p.Tyr79Cys; c.755A>G in exon 7, p.Asp252Gly)を認めた。c.236A>Gは父由来、c.755A>Gは母由来であった。両変異ともHGVSに登録はなく、PolyPhen-2ではprobably damaging、SIFTではdamagingの判定であり、病的変異と考えられた。

D. 考察

AADC欠損症の確定診断は従来AADC酵素活性の測定によりなされてきたが、近年ではAADCをコードするDDC遺伝子の変異解析によって行われることが増えている。本例でも酵素活性の測定は行われていないが、眼球変異やジストニア発作などの臨床症状と髄液モノアミン代謝物のAADC欠損症に特異的な測定値に加え、DDC遺伝子にそれぞれ父および母由来の病的変異と考えられる2つのミスセンス変異を認めたことから、AADC欠損症と確定診断された。AADC欠損症の患者数が多い台湾では創始者効果によってIVS6+4A>T変異が患者の80%以上のアレルに認められるが、それ以外はAADC欠損症の変異好発部位はなく全エクソンに分布している。今回の症例でも両親の変異は異なっており、AADC欠損症の変異スクリーニングにおいては全エクソンの解析が必要である。

AADC欠損症の臨床症状には症例ごとに変化がみられるが、眼球偏位もしくは眼球回転発作oculogyric crisisと、ジストニアなどの運動障害は全例に認められる。今回の症例においても発症早期から眼球偏位とジストニア発作が認められており、早期診断の重要な臨床徴候である。今回の症例では主治医がAADC欠損症の

特徴的な臨床症状を知っていたために、非常に早い時期からAADC欠損症が疑われ、髄液検査が行われ、遺伝子解析の依頼がなされた。AADC欠損症の頻度は未だ少ないが、特殊な髄液検査を必要とする診断の困難さから見かけ上の患者数が少ないだけで、潜在的な患者数は多いと考えられる。近年、GC-MS法を用いて尿中のVMAと3-o-methyldopaを組み合わせたAADC欠損症の非侵襲的診断方法や、原因不明の発達遅滞例における全エクソーム解析による診断がなされているが、それらが実用化されるまでは、AADC欠損症自体の啓蒙活動が早期発見に最も重要である。

E. 結論

国内5例目となるAADC欠損症の遺伝子診断を行ない、両アレルとも未報告の変異であった。AADC欠損症の確定診断にはDDC全領域の解析が必要であり、特徴的な臨床症状を周知する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N: PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology* 2014;82(18):1587-1596

2. 学会発表

1) Jun Tohyama, Noriyuki Akasaka, Yu Kobayashi, Shinichi Magara, Hideshi Kawashima, Mitsuhiro Kato, Naomichi Matsumoto, Hiroto Saitsu: Genetic analysis in infantile epileptic encephalopathies with movement disorder: a single center study. 11th European Congress on Epileptology: Stockholm, Sweden; 2014年6月-7月

2) 加藤光広: 次世代シーケンス技術を用いた小児神経稀少難病研究の現状と今後. 第117回日本小児科学会学術集会, 名古屋; 2014年4月

3) Kazuyuki Nakamura, Mitsuhiro Kato, Hideki Hoshino, Hiroshi Terashima, Hitoshi Osaka, Shinichi Nakamura, Jun Tohyama, Takashi Shiihara, Masaya Kubota, Kiyoshi Hayasaka, Hiroto Saitsu: De novo mutations in

GNA01 cause epileptic encephalopathy and involuntary movement. (English session) 第56回日本小児神経学会総会, 浜松 2013年5月

- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得
なし

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究 血管内投与型 AAV ベクターの開発と応用

村松 慎一 自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門

研究要旨

広範な中枢神経領域と末梢組織の交感神経細胞への遺伝子導入を可能にする改変型アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを開発した。緑色蛍光蛋白質 GFP を発現する改変型 AAV ベクターを作製しマウスの心腔内とカニクイサルの髄腔内に投与した。組織解析の結果、広範な中枢神経と末梢臓器の神経細胞で GFP の発現が認められた。炎症反応や組織障害は認められなかった。

A. 研究目的

芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 欠損症では、脳内のドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンの欠乏により重度の精神運動発達障害を生じる。このうち、線条体のドパミン欠乏と関連した運動機能障害の改善を主目標として、被殻への AADC 遺伝子導入を計画している。重症例には、より広範な領域の中枢神経や、全身の組織における交感神経細胞にも遺伝子導入が必要となる可能性がある。そのため、血管内あるいは髄腔内投与により使用できるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作製し、マウスとカニクイサルで前臨床試験を実施する。

B. 研究方法

9 型 AAV (AAV9) の外被蛋白質と 3 型 AAV (AAV3) ゲノム配列を持つハイブリッド (AAV9/3) で、外被蛋白質のチロシンをフェニルアラニンに変異させた改変型 AAV ベクターを使用した。神経細胞特異的 Synapsin I プロモーターにより緑色蛍光蛋白質 GFP を発現する AAV ベクターを、マウスには 10^{12} vector genome (vg)/匹を心腔内投与し、カニクイサルには $6.2 \times 10^{12} - 1.2 \times 10^{13}$ vg/頭を髄腔内投与した。カニクイサルの髄腔内投与に際しては、X 線透視下で腰椎または大槽よりカニューレを挿入し先端の位置を確認した。4 週間以降に安楽殺して、免疫組織学的に GFP の発現の分布と有害反応の有無を評価した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験と動物実験は、施設内遺伝

子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

ベクターを心腔内投与したマウスでは、脳と脊髄の広範な領域の神経細胞で GFP の発現が認められ、黒質緻密部でも多数のチロシン水酸化酵素陽性細胞に遺伝子導入されていた。全身の臓器では、心臓の交感神経細胞にも GFP の発現が認められた。髄腔内投与したカニクイサルでは、線条体の中型棘神経細胞の他、小脳の Purkinje 細胞、大脳では前頭葉・側頭葉・頭頂葉・後頭葉のいずれの大脳皮質にも GFP 陽性の神経細胞が存在した。脊髄では全長にわたり灰白質で GFP 陽性の神経細胞が認められた。マウス、カニクイサルのいずれにおいても明らかな炎症反応や組織障害は認められなかった。

D. 考察

改変型 AAV ベクターは、細胞内でユビキチン化の標的となる外被蛋白質のチロシンをフェニルアラニンに置換することにより、核内に到達するベクターゲノム量を増やし、目的遺伝子の発現を増強させる。また、神経細胞特異的プロモーターにより神経細胞以外で外来遺伝子が発現することを抑制している。血液脳関門、あるいは髄膜脳関門を通過する機序の詳細は不明であるが、髄腔内投与では、脊髄の後角と前角の灰白質に後根および前根に沿って侵入した可能性、小脳では苔状線維に沿って拡がる可能性が推察される。心腔内投与では、特定の血管領域に集中する傾向は認められていない。

これまで、搭載可能な目的遺伝子の発現カセットのサイズが 2kb 程度に限られる自己相補的 self-complementary AAV9 では成体動物の中樞神経の広い領域に遺伝子導入可能なことが報告されているが、チロシン変異を持つ改変型 AAV9/3 では 4.5kb 程度までの発現カセットを搭載可能である。今後、AADC 欠損症に限らず多くの先天性酵素欠損症の遺伝子治療への応用が期待できる。

E. 結論

先天性酵素欠損症の遺伝子治療へ応用できる広範な中樞神経領域と末梢組織の神経細胞に効率よく遺伝子導入する AAV ベクターを開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of Shati/Nat81, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17:1283-1294, 2014.
- 2) Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, Shimizu J, Shimizu S, Tamura T, Muramatsu S and Okazawa H: HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med*, 7(1):78-101, 2014.
- 3) Miyamoto Y, Iida A, Sato K, Muramatsu S, and Nitta A: Knockdown of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens core suppresses methamphetamine-induced behaviors and signal transduction in mice. *Int JNP*, 1-7, 2015.
- 4) Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints SGM, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu S, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker EE, Richi T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer VM and Okazawa H: In utero gene therapy rescues microcephaly

caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry*, in press.

2. 学会発表

- 1) 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease in Japan: Current status and problems. 第 55 回日本神経学会学術大会シンポジウム, 2014 年 5 月 22 日, 福岡. (プログラム p60)
- 2) 飯田麻子, 滝野直美, 嶋崎久仁子, 伊藤美加, 村松慎一: 大型動物の広範な中樞神経領域に遺伝子導入可能なアデノ随伴ウイルスベクターの開発. 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 9 月 29 日, 奈良.
- 3) 村松慎一, 新田淳美: パーキンソン病の遺伝子治療. AAV ベクターを応用した神経・精神疾患の病態解明～基礎から臨床まで～, 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 10 月 1 日, 奈良. (神経化学 Vol. 53(No. 2), 2014, p82)
- 4) 村松慎一: 遺伝子治療と細胞治療. 神経変性の制御をめざして, 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 2014 年 10 月 3 日, 京都. (プログラム p 21)
- 5) 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一: FMT-PET によるパーキンソン病のすくみ足の病態解析. 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 2014 年 10 月 4 日, 京都. (プログラム p101)
- 6) 村松慎一: Parkinson 病の遺伝子治療. 第 32 回日本神経治療学会総会, 2014 年 11 月 22 日, 東京. (特別講演) (神経治療学 Vol. 31(5), p547)
- 7) 村松慎一: AAV ベクターによる遺伝子治療. 第 54 回日本定位・機能神経外科学会, 2015 年 1 月 16 日, 東京. (プログラム p83)
- 8) 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一: FMT-PET による Parkinson 病の病態解析. 第 54 回日本定位・機能神経外科学会, 2015 年 1 月 17 日, 東京. (プログラム p106)
- 9) Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson Disease. The First Asian Symposium on AADC Deficiency, Dec 21, 2014, Taipei.

H. 知的所有権の取得状況

該当なし

アデノ随伴ウイルスによる小児期遺伝性疾患治療 ～適応疾患拡大を目指して～

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学医学部 小児科学 教授
研究協力者 中村 幸恵¹、青木 志保¹、村松 慎一²、山形 崇倫¹
¹自治医科大学小児科学、²神経内科学

研究要旨

小児期遺伝性疾患は、機能喪失により発症する疾患が多く、原因蛋白の発現増加により機能回復を見るため、ウイルスベクター治療の良い適応となる。AADC 欠損症に引き続き AAV 治療対象を拡大するためグルコーストランスポーター 1 型欠損症 (GLUT1DS) の治療研究を行い、*Glut 1 (SLC2A1)* の一過性発現により細胞膜表面での細胞内局在を確認し、糖取込試験では、細胞内糖取り込みが上昇し、取り込み能と重症度との間に相関関係を認め、糖輸送評価系を確立した。また 9 型 AAV- SLC2A1 ベクターを作製し、Glut1 (+/-) への腹腔内投与を行い、脳内での SLC2A1 蛋白発現を確認した。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は 100 例前後と希少で種類の多い疾患からなり、Glut1 欠損症を初めとする膜蛋白（トランスポーター、受容体等）の治療法の確立により更に多くの患者の治療が可能になる。

A. 研究目的

近年の次世代シーケンス解析等により、遺伝子診断される小児遺伝性神経疾患例が飛躍的に増えてきている。しかしながら原因が判明しても大多数の疾患には対症療法のみしか存在せず、根本的治療は確立されていない。小児遺伝性神経疾患は、対象患者は数百人からなる数百種の“希少性難病”より構成されている。これらの希少難病は、劣性遺伝形式をとり、機能欠失で発症する場合が多い事にある。この点で優性遺伝形式をとり、変異による細胞毒性が年余に渡り蓄積し発症する成人発症の遺伝性疾患と比較した特徴である。これらの優性遺伝性疾患では、詳細な病態の解明の上で細胞毒性を軽減させる治療法の開発が必要である。アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) は遺伝性疾患治療において、現在最も有望視されている遺伝子治療のベクターであり、本研究班では、AAV ベクターを用いたアミノ酸脱炭酸酵素欠損症；Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) 欠損症での、遺伝子治療臨床研究を進めている。AAV ベクターによる遺伝子導入は現在治療法の存在しない多くの小児難治性遺伝性疾患患者および家族にとり、大きな希望となっている。この治療法を、今後多くの患児に行うためには、AADC 欠損症に加

え、新たな対象疾患の拡大が必要である。現在私達は、治療のモデルとしてグルコーストランスポーター 1 型欠損症 (Glucose transporter 1 deficiency syndrome, GLUT1DS) 治療研究を細胞レベル、動物モデルで行った。

B. 研究計画・方法 (概要)

1) ヒト培養細胞への *SLC2A1* 導入

HEK293 細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞）に SLC2A1 正常型および SLC2A1 変異体ベクター、を用いて遺伝子導入する。変異体ベクターは、ミスセンス変異の 2 種類 (A405D; 軽症、R333W; 中等症)、フレームシフト変異 1 種類 (V303fs; 重症) を作成する。それぞれの変異に対応するオリゴヌクレオチドを作成し、アニーリングの後、制限酵素反応およびライゲーションで発現ベクターに組み込む。フレームシフト変異は患者 cDNA より RT-PCR 法により合成する。作成したプラスミドをリポフェクタミン法により一過性発現させ、得られたタンパク発現確認は anti c-myc Ab. (9E10; anta Cruz Biotechnology)、anti GLUT1 Ab. (N-terminus; OriGene Technologies) を用いて免疫染色およびウェスタンブロットによる蛋白の検出を行う。

2) ヒト神経系培養細胞への AAV9-SLC2A1 導入

SLC2A1 遺伝子をインサート DNA として、経

静脈投与で脳移行が確認されている9型 AAV ベクター (AAV9) に組み込む。ヒト神経系培養細胞である SH-SY5Y 細胞 1×10^5 cell に AAV9-SLC2A1 (myc-DDK タグ付) を 3×10^9 vg 感染させ免疫染色を行う。

3) Glu1 (+/-) への AAV9-SLC2A1 導入

ウイルスベクターの投与経路として、経静脈投与もしくは髄腔内 / 脳室内投与の比較検討をおこなう。GLUT1 は、赤血球や脳の血管内皮細胞、神経細胞に発現を認める。今回ニューロン特異的プロモーターであるシナプシン1プロモーターを用い神経細胞で発現効率を上げる。

生後1週間前後の新生児マウスは、乳幼児に対応し、脳血液関門の脆弱性があり、腹腔内投与でも薬剤が高率に脳移行するため、日齢7にヘテロマウス Glut1 (+/-) に AAV9-SLC2A1 1.5×10^{10} vg 腹腔内投与する。

(倫理面への配慮)

研究実施にあたって、自治医科大学遺伝子解析研究倫理委員会、自治医科大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) ヒト培養細胞への SLC2A1 導入

一過性発現後の細胞を用いたウェスタンブロット法にて、正常型およびミスセンス変異を有する SLC2A1 の発現を確認した。免疫染色では、SLC2A1 正常型およびミスセンス変異で細胞膜近傍に myc 染色陽性を確認した。フレームシフト変異では、ウェスタンブロットティングおよび免疫染色法いずれもタンパク発現はみられず、蛋白が安定せず小胞体で分解していることが考えられた。また GLUT の細胞内の糖取込み機能を 2-デオキシグルコース (2DG) 取込試験で評価した。SLC2A1-正常型、ミスセンス変異、フレームシフト変異、コントロールベクター導入細胞の順に糖取込み能は低下しており重症度との相関を認めた。

2) ヒト神経系培養細胞への AAV9-SLC2A1 導入

AAV9-SLC2A1 を導入した SH-SY5Y 細胞膜近傍に SLC2A1 の発現を確認した。

3) Glu1+/-1 への AAV9-SLC2A1 導入

生後6週で、脳組織を採取し採取した脳組織で免疫染色 (anti-GLUT1, anti-myc-tag)、ウェスタンブロット法 (anti-GLUT1, anti-myc-tag) でタンパク発現確認を行ったところ~1%の中脳神経細胞で発現を認めた。

D. 考察

SLC2A1 遺伝子導入による、糖輸送機能の獲得を、2DG 取込試験で評価する系を作成した。GLUT1DS の重症度と相関しており、GLUT1 の機能評価として適切であることが示された。また Glut1 KO マウス、Glu1 (+/-) に AAV-SLC2A1-9 を腹腔内に投与したところ、脳内での発現を確認した。導入効率が低いため、今後は脳室内投与を行い、導入効率や Glu1 (+/-) に認められる、失調症状、小頭症等の臨床症状の改善が認められるか観察する。

E. 結論

AADC 欠損症に対する遺伝子治療を国内における難治性神経疾患のさきがけとして、更に治療対象を拡大するため GLUT1DS を対象とした研究を行っている。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は100例前後(希少で)の数多くの(種類の多い)疾患からなる。AADCのように発現が、脳内の基底核に限られた疾患は、少なく、GLUT1DSのように、欠損蛋白が、広く脳内に分布するものが多いため、GLUT1DSの治療法の確立により、多くの適応疾患;膜受容体・キャリア蛋白、またライソゾーム病、ミトコンドリア病、ペルオキシゾーム病などの細胞内小器官の遺伝性神経難病への AAV 治療の応用拡大を目指すことが可能となり、結果として多くの小児遺伝性疾患患児・家族にとって待ち望んだ根本治療を提供することになる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol.* 2014;50:99-100.

2. 学会発表

1) Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Aoki S, Jimbo EF, Yamagata T.: Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome. 第64回アメリカ人類遺伝学会 2014. 10. 18-22 サンディエゴ

H. 知的所有権の取得状況

なし。

アデノ随伴ウイルスベクターに対する中和抗体と 遺伝子治療への影響に関する検討

研究分担者 水上 浩明 自治医科大学分子病態治療研究センター
遺伝子治療研究部 教授

研究要旨

AAV ベクターを用いた遺伝子治療の効果に影響することが懸念される因子として代表的なものである、ベクターに対する中和抗体に関して検討を行った。肝臓への遺伝子導入に際しては中和抗体の有無は効果に直結したが、パーキンソン病臨床研究における中枢神経系への遺伝子導入に際しては、中和抗体は効果に影響を与えていなかった。抗体価が非常に高い場合の影響に関しては検討できておらず、この点は今後の課題といえる。また、日本人全体としては中和抗体の陽性率は約3割で、年齢による大きな違いがあり、若年層では低下する傾向が認められた。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療法の成功例が増えてきており、有効性と安全性に関する情報が蓄積してきた。一方、AAV ベクターに対する中和抗体が存在する場合には、血液中への通常の投与方法では効果が得られないことが懸念されている。本研究ではこのようなベクターに対する中和抗体の問題につき検討し、遺伝子治療を確実に実施することを目的とした。

B. 研究方法

- ・パーキンソン病遺伝子治療臨床研究における中和抗体と治療効果の解析：2007年から本学で実施されたパーキンソン病遺伝子治療臨床研究に関して、結果を改めて解析すると共に、保存されていたサンプルを必要に応じて最新の高感度測定法を用いて再測定した。
- ・血友病遺伝子治療前臨床研究における中和抗体と治療効果の解析：実験対象となったサルの子供の遺伝子導入前の中和抗体を測定し、治療効果との関連を検討した。また、医薬基盤研・霊長類医学研究センターのカニクイザル188頭に関して中和抗体陽性率を検討した。
- ・日本人における中和抗体陽性率の解析：日本国内の健常者85人、血友病患者59人を対象とした解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性のAAVに由来するベクター

の開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。また、ヒトサンプルの取扱いに際しては非連結匿名化を行い、測定結果と本人が関連づけられないように配慮した上で実施した。

C. 研究結果

- ・パーキンソン病遺伝子治療臨床研究における中和抗体の解析：本臨床研究の対象となった6名の治療前の中和抗体の状況は、2名が陰性、2名が弱陽性、2名が中等度陽性であった。治療前の中和抗体の力価と治療効果の間には関連を認めなかった。また、注入後の中和抗体は全例で陽性となっており、全例で2週間後に力価の上昇が認められ、半年後にも上昇した状態は続いていた。
- ・血友病遺伝子治療の前臨床研究における中和抗体と治療効果の解析：この検討では8型のベクターを末梢静脈から注入した。対象となったサルの遺伝子導入前の中和抗体は3例で陽性、

4例で陰性であった。中和抗体陰性例では全例で治療域に達する凝固第IX因子濃度が得られた。一方、中和抗体陽性例では効果を認めた個体はなかった。また、医薬基盤研・霊長類医学研究センターのカニクイザルでは、8型に対する中和抗体陽性率は71.3%であった。

・日本人における中和抗体陽性率の解析：日本国内の健常者85人、血友病患者59人を対象とした測定したところ、いずれのグループでも約3割が陽性との結果を得た。この結果を更に年齢別に検討したところ、年代が下がるにつれて陽性率が下がる傾向が認められた。

D. 考察

AAVベクターを用いる遺伝子治療に際してはさまざまな組織が標的となっており、中枢神経系への遺伝子導入には2型が好適で、神経細胞に特異性の高い効果が得られる。肝臓を標的とする場合には静脈内投与で効果が期待できる8型が最も有望と考えられている。一方で、サルでは8型に対する中和抗体の陽性率が高く、中和抗体が存在する場合には遺伝子導入に成功していない。一般に中枢神経系を標的にする場合のように組織に直接注入する際には血液中への投与に比べて中和抗体の影響は受けにくいと考えられており、今回の検討結果もこの説を支持するものである。中和抗体の力価が非常に高い場合には影響する可能性があるが、今のところ詳細は不明である。中和抗体の測定法に関しては我々も改良を加えてきており、世界的に見ても最も鋭敏な検出法として確立できたものと考えられる。日本人における陽性率に関してはこれまで検討されていなかったが、いずれの血清型においても陽性率は約3割であり、他の先進諸国と大きな差はなかった。若年層で陽性率が低くなっている理由は明らかではないが、A型肝炎ウイルスなどでも同様の事象が認められており、公衆衛生の改善、特に下水道の整備による経口感染の減少が影響している可能性がある。今後の追跡調査が必要であるが、この傾向は遺伝子治療の効果が期待できる対象者が増えることを意味しており、AAVベクターを用いた遺伝子治療を広く進めていく上で有利な知見である。

台湾で12月に行われたAADC国際シンポジウムでは台湾のAADC症例において中和抗体陽性率が極めて低いことが話題となった。台湾全体における中和抗体陽性率のデータがないので正確な議論は出来ないが、他の国々と同等と仮定すると、幼少時における同年代の子ども達から

の感染の機会が少ないことが影響しているのではないかと思料される。

E. 結論

AAVを用いた遺伝子治療法に影響しうる因子として治療前の中和抗体につき検討した。肝臓に対する遺伝子治療の際には中和抗体の存在により効果の著明な減弱が認められたが、中枢神経系を対象とした場合には影響は明らかでなかった。高力価の場合には影響する可能性があることから、今後もこの点に留意しつつ、臨床への展開を進めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsukahara, T., Iwase, T., Kawakami, K., Iwasaki, M., Yamamoto, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Teruya, T., Ido, H., Yasushi, S., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Brentjens, R., Ozawa, K.: The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. *Gene Ther, in press.*

2) Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol*, 86:1990-7, 2014.

2. 学会発表

1) Mizukami, H.: "Immune responses in hemophilia gene therapy" in Symposium II, Genetic diseases. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, August 6-8, 2014.

2) Mizukami, H., Mimuro, J., Ohmori, T., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Madoiwa, S., Sakata, Y., Ozawa, K.: Age-related eligibility of hemophilia gene therapy using AAV vectors. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Osaka, Oct. 31-Nov. 2, 2014.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

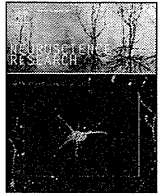
研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inaguma Y, Ito H, Hara A, Iwamoto I, Matsumoto A, <u>Yamagata T</u> , Tabata H, Nagata KI	Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development.	Neurosci Res	92	21-28	2015
Mizuno M, Matsumoto A, Hamada N, Ito H, Miyauchi A, Jimbo EF, Momoi MY, Tabata H, <u>Yamagata T</u> , Nagata KI	Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders.	J Neurochem	123	61-69	2014
Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y, Nakachi Y, Matoba N, Sakai T, Yamazaki T, Harashima H, Murayama K, Hattori K, Hayashi J, <u>Yamagata T</u> , Fujita Y, Ito M, Tanaka M, Nibu K, Ohtake A, Okazaki Y	New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders.	Ann Clin Transl Neurol	1	361-369	2014
Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, <u>Muramatsu S</u> , Nabeshima T, Uno K, Nitta A	Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice.	Int J Neuropsychopharmacol	17	1283-1294	2014
Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, Shimizu J, Shimizu S, Tamura T, <u>Muramatsu S</u> , Okazawa H	HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice.	EMBO Mol Med	7(1)	78-101	2014
Miyamoto Y, Iida A, Sato K, <u>Muramatsu S</u> , Nitta A	Knockdown of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens core suppresses methamphetamine-induced behaviors and signal transduction in mice.	Int JNP	-	1-7	2015
Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints SGM, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, <u>Muramatsu S</u> , Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker EE, Richi T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer VM, Okazawa H	In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells.	Mol Psychiatry	-	-	In press

Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H.	A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome.	Mol Genet Metab Report	1	133–138	2014
Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H.	A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia.	Pediatr Neurol	50	99-100	2014
Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H.	Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies.	Neurology	82	2230-2237	2014
Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H.	PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels.	Epilepsia	55	e13-17	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development



Yutaka Inaguma^a, Hidenori Ito^a, Akira Hara^b, Ikuko Iwamoto^a, Ayumi Matsumoto^c, Takanori Yamagata^c, Hidenori Tabata^a, Koh-ichi Nagata^{a,*}

^a Department of Molecular Neurobiology, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, Aichi 480-0392, Japan

^b Department of Tumor Pathology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu 501-1194, Japan

^c Department of Pediatrics, Jichi Medical University, Tochigi 329-0498, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2014

Received in revised form 24 October 2014

Accepted 28 October 2014

Available online 6 November 2014

Keywords:

Timeless
Antibody
Cerebral cortex
Development

ABSTRACT

Timeless was originally identified in *Drosophila* as an essential component of circadian cycle regulation. In mammals, the ortholog of Timeless (Tim) has also implicated in cell cycle control and embryonic development. In this study, we generated a specific antibody against Tim, and carried out expression and localization analyses of Tim during mouse brain development. In Western blotting, Tim was detected throughout the developmental stage. In immunohistochemical analyses, Tim was detected strongly in neurons in the ventricular zone/subventricular zone and moderately in cortical neurons during corticogenesis. In adult mouse brain, Tim was observed moderately in cortical neurons. Notably, Tim was enriched in the nucleus of cortical neurons from embryonic to early postnatal stages while it was distributed in the cytoplasm in the adult stage. Similar distribution change from nucleus to cytoplasm was observed in the hippocampal neurons between P0 and P30. In situ hybridization revealed that the tissue expression profile of Tim-mRNA was similar to that of the protein. In differentiated primary cultured mouse hippocampal neurons, Tim was detected in cell body, axon and dendrites. The obtained results suggest that Tim is expressed in neuronal tissues in a spatiotemporally regulated manner and involved in developmental stage-specific neuronal functions.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

1. Introduction

Timeless was originally identified in *Drosophila* as an essential component of the circadian rhythm regulation, and is conserved in all eukaryotes (Reppert, 1998). However, no consensus has been established regarding whether mammalian Timeless (Tim) indeed plays an essential role in the circadian clock machinery (Gotter, 2006). While the Tim gene was shown to be expressed in the suprachiasmatic nuclei (SCN), the brain circadian clock center, most reports detected little or low circadian oscillations in Tim mRNA or protein level in the SCN (Koike et al., 1998; Sangoram et al., 1998; Takumi et al., 1999; Zylka et al., 1998). Although Tim function specific in the circadian clock mechanism remains to be controversial, Tim has been implicated in the cell cycle control (McFarlane et al., 2010). In addition, Tim was reported to link the circadian rhythm

to cell cycle, and may have additional function in DNA damage control (Unsal-Kaçmaz et al., 2005; Gotter et al., 2007). On the other hand, genetic studies have shown that Tim is essential for early embryonic development, as homozygous knockout produces early embryonic lethality in mice (Gotter et al., 2000). In this context, Tim has been reported to be crucial in the developmental process of lung and kidney (Li et al., 2000; Xiao et al., 2003). Based on these results, Tim is possible to have an important role during the development of mammalian central nervous system (CNS). However, physiological role of Tim in CNS remains to be elucidated not only in developmental but also in adult stages. In the present study, we prepared a specific antibody against Tim and performed some morphological, cell biological and biochemical analyses of Tim by focusing mouse brain development.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

Mouse Tim cDNA was a kind gift from Dr. Smithgall (University of Pittsburgh) (Genbank accession no. AF126480), and

* Corresponding author at: Department of Molecular Neurobiology, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, 713-8 Kamiya, Kasugai, Aichi 480-0392, Japan. Tel.: +81 568 88 0811; fax: +81 568 88 0829.

E-mail address: knagata@inst-hsc.jp (K.-i. Nagata).

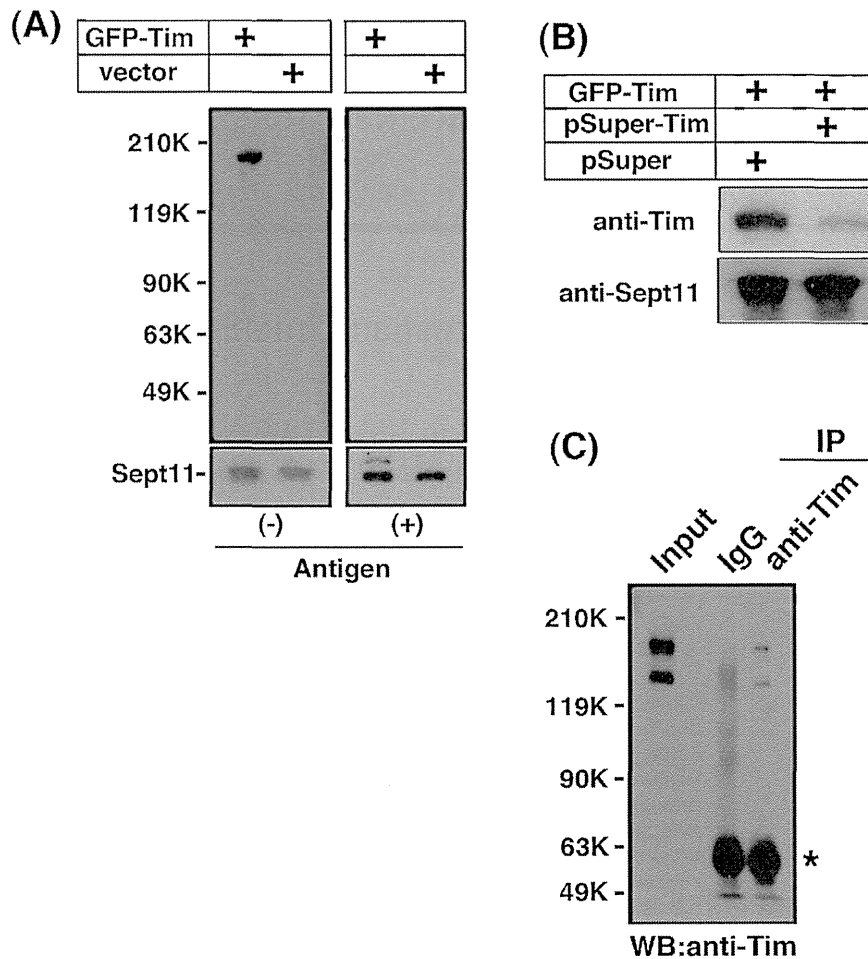


Fig. 1. Production of an affinity-purified antibody for mammalian Timeless, anti-Tim. (A) Lysates (20 μ g of protein per lane) from COS7 cells transiently expressing GFP-Tim or control vector were subjected to SDS-PAGE (10% gel) followed by western blotting with anti-Tim (upper left panel) or the antibody preabsorbed with the antigen (upper right panel). The blots were reprobbed with anti-Sept11 antibody for the loading control (lower panels). Molecular size markers were shown at left. (B) COS7 cells were transfected with pSuper vector or pSuper-Tim together with pCAG-GFP-Tim. After 48 h, cells were collected and lysates (20 μ g of protein) were subjected to Western blotting using anti-Tim. The blot was reprobbed with anti-Sept11. (C) Immunoprecipitation of Tim by anti-Tim. Lysates (100 μ g of protein) from COS7 cells expressing GFP-Tim were immunoprecipitated with anti-Tim. In the control experiment, rabbit IgG was used. The precipitated materials (20%) and the input (5%) were subjected to Western blotting with anti-Tim. IgG heavy chain was marked (*).

constructed into pCAG-EGFP vector (Addgene Inc., Cambridge, MA). For RNAi experiments, the mouse Tim target sequence (GAA-GAAACGGTTTCAGATT, 3555–3573) was inserted into pSuper-puro vector (OligoEngine, Seattle, WA), which was named as pSuper-Tim. Numbers indicate the positions from translational start sites. All constructs were verified by DNA sequencing.

2.2. Preparation of anti-Tim antibody

Using glutathione S-transferase (GST)-fused mouse Tim C-terminal fragment (aa 981–1198) expressed in *Escherichia coli* as an antigen, a rabbit polyclonal antibody (anti-Tim) was generated and affinity-purified on a column to which the antigen had been conjugated.

2.3. Antibodies

The following antibodies were used; monoclonal mouse anti-synaptophysin (Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany), anti-gliofibrillary acidic protein (GFAP) (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-Tau-1 (Chemicon International, Temecula, CA), and anti-MAP2 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Polyclonal rabbit

antibody against a cytoskeleton-related protein, Sept11 (anti-Sept11) was prepared as described (Hanai et al., 2004).

2.4. Animals

Timed-pregnant and postnatal ICR mice were from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan). Anesthesia was carried out as follows. For Western blotting, mice were deeply anesthetized intraperitoneally with pentobarbital (100 mg/kg body weight). For immunohistochemistry, anesthetic containing 1 mg/ml of medetomidine (Nippon Zenyaku Kogyo, Tokyo, Japan), 5 mg/ml of midazolam (Astellas Pharma, Tokyo) and 5 mg/ml of butorphanol (Meiji Seika Kaisha, Tokyo) was injected intraperitoneally at 0.08 ml/10 g body weight (Kirihara et al., 2013). Deeply anesthetized mice were perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). The brains were post-fixed by immersion in 4% PFA overnight at 4 °C. As for in situ hybridization, pregnant mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbitone (Somnopentyl) at 100 mg/kg body weight (Kyoritsu Pharmaceuticals, Tokyo). Embryos were perfused transcardially with 4% PFA in PBS. Postnatal mice were also anesthetized and perfused with 4% PFA as above. All mice were kept at ~37 °C until sacrifice.

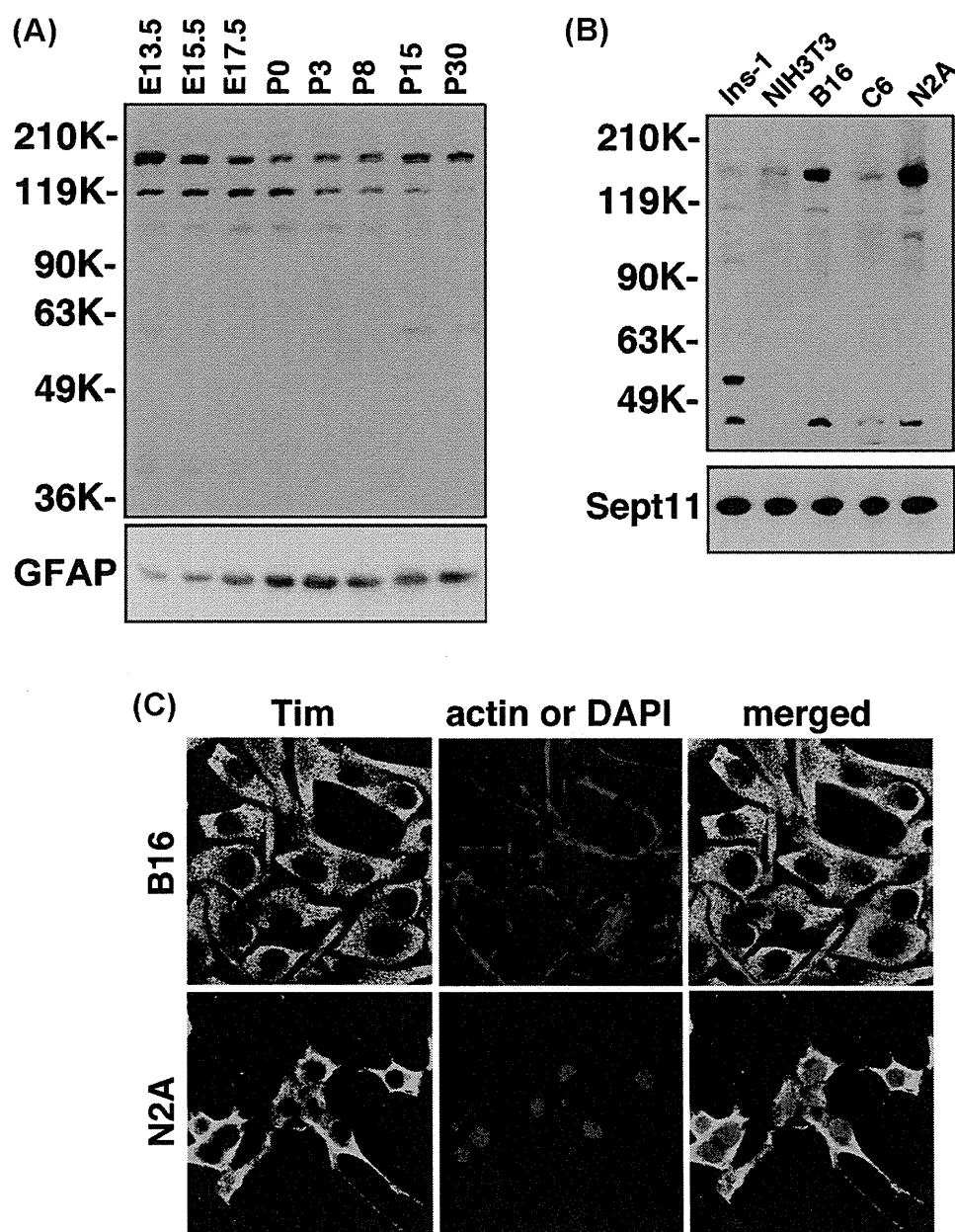


Fig. 2. Western blotting analyses of Tim in the mouse brain and in cultured cell lysates. (A) Developmental changes of Tim protein level in brain. Extracts (30 μ g of proteins) at various developmental stages were subjected to Western blotting (10% gel) with anti-Tim (upper panel). The blot was reprobed with anti-GFAP to confirm the tissue differentiation (lower panel). (B) Detection of Tim in cultured cell lines. Lysates (30 μ g of proteins) of Ins-1, NIH3T3, B16, C6 and Neuro2A cells were subjected to western blotting using anti-Tim (upper panel). The blot was reprobed with anti-Sept11 for the loading control (lower panel). (C) B16 and Neuro2A cells were double-stained with anti-Tim and rhodamine-phalloidin (B16) or DAPI (Neuro2A). Merged images were shown. Bar, 20 μ m.

We followed the Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments and Related Activity in Academic Research Institution under the jurisdiction of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and all of the protocols for animal handling and treatment were reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center (Approval number, M10).

2.5. Preparation of extracts from mouse brain

Whole brain extracts were prepared for the analyses of the developmental change of Tim (Sudo et al., 2006). Concentrations of protein were estimated with a micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL) with bovine serum

albumin as the standard. SDS-PAGE (10% gel) and Western blotting were done as described (Nagata et al., 2009).

2.6. Cell culture, transfection and immunoprecipitation

Ins-1 (rat insulinoma), NIH3T3 (mouse fibroblast), B16 (mouse melanoma), C6 (rat glioma) and Neuro2A (mouse neuroblastoma) cell lines were cultured essentially as described (Hanai et al., 2004). Mouse primary hippocampal neurons were cultured as described (Ito et al., 2010). Transient transfection was carried out using Lipofectamine 2000 (Life Technologies Japan, Tokyo).

Immunoprecipitation was done as previously described (Murase et al., 2012). Briefly, COS7 cells expressing GFP-Tim were homogenated with lysis buffer containing 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0.1% NP-40, 0.1% Trion X-100, 10 μ g/ml aprotinin and 10 μ g/ml

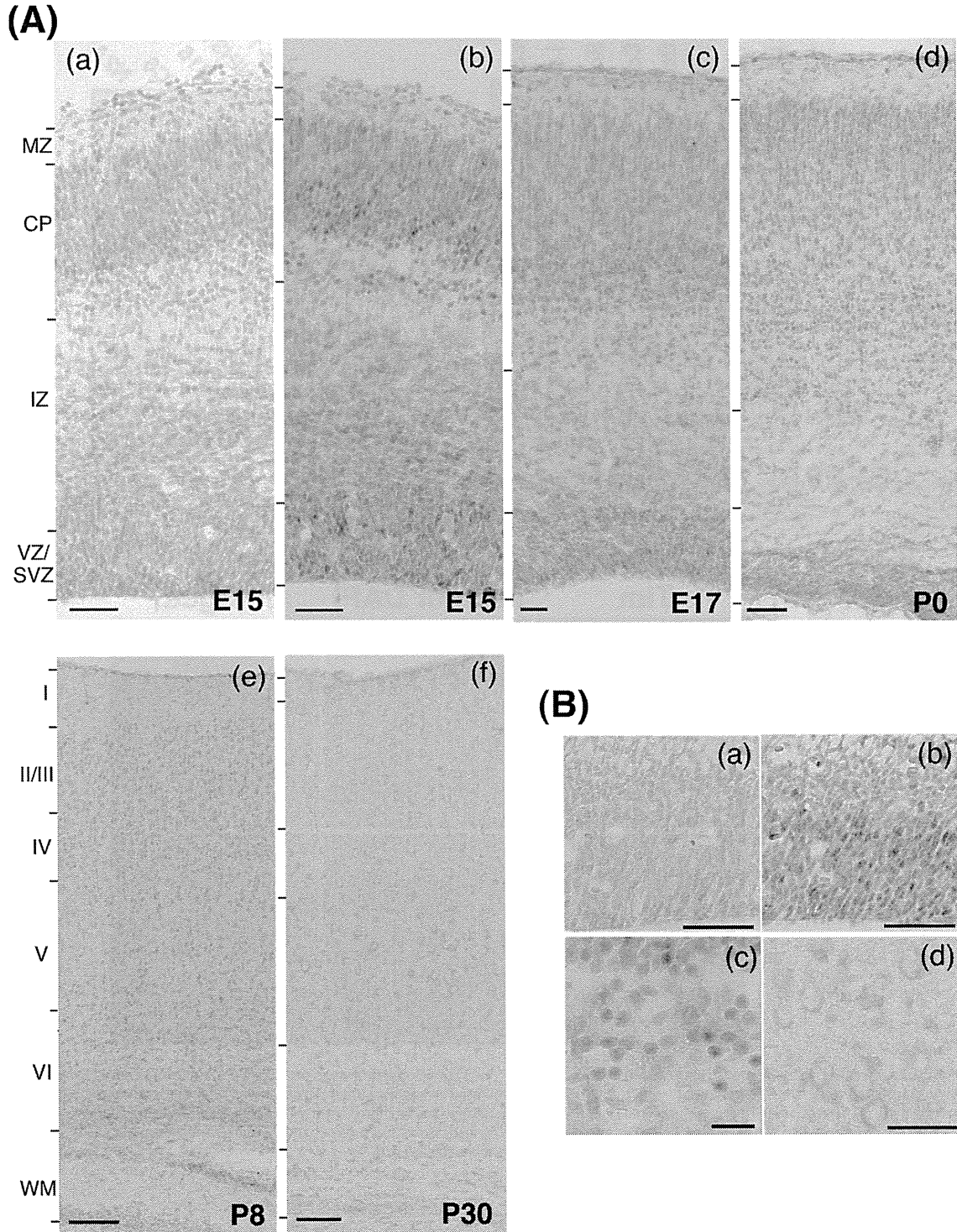


Fig. 3. Immunohistochemical analyses of Tim in the mouse brain during corticogenesis. (A) Cerebral cortex sections at E15 (a, b), E17 (c), P0 (d), P8 (e) and P30 (f) were stained with anti-Tim preabsorbed with the Tim-antigen (a) or with GST-p75NTR fragment (b), or without preabsorption (c–f). Counterstaining was performed with hematoxylin. Layers of each sample were indicated. MZ, marginal zone; CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone; WM, white matter. Bars, 50 μm (a–d) and 100 μm (e, f). (B) Magnified images of neuronal progenitor/stem cells at VZ/SVZ (a, b) and neurons at CP at E15, and cortical neurons at P30 (c). Sections were stained with anti-Tim preabsorbed with Tim-antigen (a) or GST-p75NTR fragment (b), or without preabsorption (c and d). Bars, 50 μm (a, b and d) and 20 μm (c).

leupeptin. After insoluble material was removed by centrifugation at 4°C for 60 min at 10,000 $\times g$, immunoprecipitation was done using 1 μg of anti-Tim together with Protein A-agarose beads (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). After washing the precipitates three times with the lysis buffer, the precipitates were subjected to SDS-PAGE (10% gel). Western blotting was then carried out with anti-Tim.

2.7. Immunohistochemical analyses

Sections were processed essentially as reported (Sudo et al., 2006). Briefly, tissues were cryoprotected in ice-cold buffered sucrose (30% in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0), frozen in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan), and sectioned at 10 μm using a cryostat (Leica CM1900, Leica Microsystems,