

201442010A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

難治性神経変性疾患に対する神経シナプス形成を促進させる
マイクロRNAの補充による新規治療法の開発と確立
に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 北條 浩彦

平成 27 (2015) 年 3 月

様式第18

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患実用化研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立精神・神経医療研究センターが実施した平成26年度「難治性神経変性疾患に対する神経シナプス形成を促進させるマイクロRNAの補充による新規治療法の開発と確立」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

難治性神経変性疾患に対する神経シナプス形成を促進させる
マイクロRNAの補充による新規治療法の開発と確立
に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 北條 浩彦

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
難治性神経変性疾患に対する神経シナ プス形成を促進させるマイクロRNA の補充による新規治療法の開発と確立 に関する研究 北條浩彦	----- 1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. マイクロRNA発現ウイルスの作製と新しい DDS 法に関する研究開発に関する研究 岡田尚巳	----- 10
2. 疾患モデルマウスの系統維持と治療マウス の組織化学的解析に関する研究 永井義隆	----- 13
III. 学会等発表実績	----- 16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

難治性神経変性疾患に対する神経シナプス形成を促進させるマイクロRNAの補充による
新規治療法の開発と確立に関する研究

業務主任者 北條 浩彦（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所 室長

難治性の神経変性疾患であるハンチントン病のモデル動物、R6/2 マウスにおいて、その脳内で発現が減少しているあるマイクロ RNA (miRNA-X) を補充（投与）すると、R6/2 マウスの運動機能が改善し延命することを発見した。さらに、このマイクロ RNA の補充によって神経細胞同士を繋げるシナプス形成が回復する可能性も示された。このことから、従来の疾患原因遺伝子を直接狙った治療戦略とは異なる新しい治療法を提案できると考えられる。そこで本研究開発は、この miRNA-X 補充治療がハンチントン病に代表されるポリグルタミン病をはじめアルツハイマー病など神経変性疾患の治療に有効であることを証明し、新規治療方法として実現していくための基礎基盤を築くことを目的とする。そのために、未だ明らかになっていない miRNA-X の治療効果における作用機序の解明、R6/2 マウス以外の神経変性疾患モデル動物を対象とした miRNA-X の治療効果の検証、そして核酸医薬の新しい薬物送達システムの開発を主な柱とする研究開発を推進する。

業務分担者：

岡田尚巳

日本医科大学大学院医学系研究科 教授

永井義隆

（独）国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 室長

A. 研究目的

難治性の神経変性疾患であるポリグルタミン病は、その病因遺伝子産物である異常伸長したポリグルタミン鎖をもつ変異型

（病因）タンパク質の不溶化・凝集がその神経変性の本態であると考えられている。したがって、治療戦略的にはその病因遺伝子産物の除去、不活化、または特異的な発現抑制が根本的治療に直結すると考えられる。それに基づき疾患原因遺伝子やその遺伝子産物を直接不活化する治療法の開発や研究が進んでいる。一方、患者サンプルや疾患モデル動物を用いた病態解析から新しい治療戦略を探る研究も進められている。

本研究開発は、代表的なポリグルタミン病であるハンチントン病のモデル動物、

R6/2 マウスを用いた最近の研究成果が発端となっている。R6/2 マウスの脳内で発現する機能性小分子 RNA、マイクロ RNA (miRNA) の発現を網羅的に解析したところ、あるマイクロ RNA (特許出願準備中のため当該マイクロ RNA を miRNA-X と記す) の発現が正常マウスと比べて顕著に減少していることを発見した。そこで、この減少した miRNA-X を補充するために miRNA-X を発現させる AAV 発現システムを構築し R6/2 マウスに投与したところ、miRNA-X の補充を受けた R6/2 マウスで顕著な運動機能の回復と延命が観察された。さらに miRNA-X の補充によってシナプス形成に関わる遺伝子の発現回復も観察された。miRNA-X の発現減少は、アルツハイマー病や統合失調症などの他の疾患でも観察されることから、miRNA-X 補充による治療戦略はハンチントン病だけでなくその他の神経疾患・神経変性疾患の治療にも有効である可能性が考えられる。

本研究開発は、この miRNA-X 補充療法の有効性・有用性を確認し、新しい治療法として実現していくための基盤を築くことを目的とする。そのために、miRNA-X の治療効果(運動機能改善、延命)に関する作用機序の解明、R6/2 マウス以外の神経変性疾患モデル動物を対象とした miRNA-X の治療効果の検証、そして miRNA-X の新しい薬物送達システムの開発を主な柱とする研究開発を推進する。

B. 研究方法

(I) miRNA-X 補充による治療効果の検討:

①miRNA-X発現AAV[岡田(業務分担者)による構築と精製]を2~3週齢のHDモデ

ルマウスの脳(線条体、大脳皮質)に投与。

②AAV投与後4~6週後(約2カ月齢)マウスの行動テストを行い、運動機能の改善の有無を確認する。③運動機能の改善が見られた個体の脳組織から全RNAとタンパク質を調整し、前者はDNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析、後者はiTRAQ法による網羅的なタンパク質発現解析を実施する。④ネガティブコントロールAAV[岡田(業務分担者)による構築と精製]を投与したモデルマウスも同様の解析を実施する。⑤得られたデータを基に3層間のオミックス解析を行ない、miRNA-X 補充により改善(回復)する生体分子ネットワークを特定し、作用機序を明らかにする。

(II) マイクロ RNA 発現ウイルスの作製と新しい DDS 法の開発:

マイクロ RNA 補充療法の要となるマイクロ RNA 発現 AAV ベクターを作製するために、miRNA 発現カセットを設計した。これを元に3種類の AAV ベクターを作製した。また、AAV 中空粒子に導入可能な薬剤を検討し、その効率を測定した。

(III) 疾患モデルマウスの系統維持と治療マウスの組織化学的解析:

神経細胞の興奮性シナプス後部構造である樹状突起スパインを可視化するため、神経細胞特異的に YFP を発現する Thy1-YFP マウスを用いて、このマウスと SCA1^{154Q/2Q} マウスとの交配により得られた SCA1^{154Q/2Q}/Thy1-YFP マウスについて解析を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物(マウス)を使用する研究計画は

全て(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所小型実験動物倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針そして厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)を遵守し、動物が受ける苦痛を最小限に止めるように努めた。ヒトサンプルを用いた研究は実施しなかった。

C. 研究結果

R6/2 マウスと正常マウスの脳組織で発現するマイクロ RNA の発現プロファイル解析から R6/2 マウスの脳で顕著に発現減少している miRNA-X を発見した。その減少した miRNA-X を補うために miRNA-X 発現 AAV を構築し、投与したところ、R6/2 マウスの運動機能の改善と延命が観察された。この miRNA-X 投与による機能改善効果(作用機序)を明らかにするために miRNA-X の投与を受けたマウスの脳・線条体から全 RNA とタンパク質を抽出し、miRNA の網羅的発現解析と全遺伝子の網羅的発現解析そして iTRAQ 法によるタンパク質の比較定量解析を開始した。その結果、miRNA-X 発現 AAV による miRNA-X の発現レベルの回復と共にいくつかのマイクロ RNA で発現の増加が観察された。全遺伝子の発現解析においても発現の増加そして減少を示す遺伝子が観察された。iTRAQ 解析については、現在解析が進行中である。今後、これらの解析データを基に miRNA-X の補充による機能改善(回復)に関わる分子間ネットワークを明らかにするための 3 層間オミックス解析を実施する

予定である。

マイクロ RNA 発現ウイルスの作製と新しい DDS 法の開発に関しては、定法(Okada et al., 2009)に基づいて rAAV-miRNA 発現ベクターの精製を行い qPCR 法によってタイターを測定した。

それぞれ:

- 1) rAAV-miR-Nega; 3.1×10^{13} v.g./3.5ml
- 2) rAAV-miX1; 9.4×10^{13} v.g./3.2ml
- 3) rAAAV-miX2; 1.2×10^{14} v.g./2.75ml

の精製ウイルスを得た。

DDS に関しては FITC-PMO の rAAV9 中空粒子中に取り込まれる条件を検討し、その効率を測定した。また、取り込み済みの rAAV9-FITC-PMO を細胞に感染させ、細胞への取り込みを確認した。

2 光子レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳の *in vivo* イメージングの解析から、発症前の 4 週齢から、スパインの新生・消失を示すターンオーバー率が、有意に亢進していることが明らかになった。このとき、スパインの形態には異常は認められなかった。さらに、通常は 8 週齢までの神経ネットワークの成熟に伴って徐々に低下していくスパインのターンオーバー率が、異常亢進したまま持続することが明らかになった。

D. 考察

miRNA-X の制御下にある遺伝子の発現抑制が、miRNA-X 発現 AAV の投与によって数多く観察されると予想していたが、実際は発現増加を示す遺伝子が多く観察された。これは、miRNA-X のターゲットの一つが遺伝子発現を抑制する因子である可能性を示唆する。つまり、その抑制因子の発現を miRNA-X が阻害することで、その下

流の遺伝子の発現が上昇（増加）したと考えられる。この予想される抑制因子は重要であり、新しい分子作用点として治療の新規ターゲットに成りえるかもしれない。

AAV 中空粒子に PMO(核酸誘導体)が導入可能であることが判明した。これにより、miRNA, 核酸についても今後検討を行っていく。さらに、細胞への導入効率を上げるためにユビキチン化を受けにくくした Tyr 変異体 AAV 中空粒子を用いて導入条件の検討を行う予定である。

2 光子レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳の *in vivo* イメージング解析の結果、SCA1 マウスは発症前からシナプス不安定性を示し、神経ネットワーク発達期のシナプス成熟が遅延している可能性が示唆された。

E. 結論

miRNA-X の補充治療が難治性の神経変性疾患の新しい治療法として有効・有用であることを確認するために、miRNA-X 発現 AAV を投与した劇症型ハンチントン病モデル動物、R6/2 マウスを用いた治療効果の検討を行った。現在、miRNA-X の補充による機能改善や延命に関わる作用機序を明らかにするために miRNA-mRNA(全遺伝子発現)-タンパク質の関連を調べる 3 層オミックス解析を実施している。その成果が来年度中に得られると期待している。

また、miRNA の新しい DDS として AAV 中空粒子が有望であることが示された。

in vivo イメージングの解析から SCA1 などの晩発性神経変性疾患の神経症状発症の根底に発達期のシナプス成熟障害が寄与する可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi M. and Hohjoh H. A novel measurement of allele discrimination for assessment of allele-specific silencing by RNA interference. *Mol Biol Rep*, 41: 7115-7120, 2014.
- 2) Fukuoka M., Yoshida M., Eda A., Takahashi M., Hohjoh H. Gene silencing mediated by endogenous microRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. *PLoS ONE*, 9(7): e103130, 2014.
- 3) Araki W., Minegishi S., Motoki K., Kume H., Hohjoh H., Araki YM., and Tamaoka A. Disease-associated mutations of TDP-43 promote turnover of the protein through the proteasomal pathway. *Mol Neurobiol*, 50: 1049-1058, 2014.
- 4) Hayashita-Kinoh H., Yugeta N., Okada H., Nitahara-Kasahara Y., Chiyo T., Okada T., and Takeda S. Intra-Amniotic rAAV-Mediated Microdystrophin Gene Transfer Improves Canine X-Linked Muscular Dystrophy and May Induce Immune Tolerance. *Mol Ther*, 2015. [in press]
- 5) Ohtsuka Y., Kanagawa M., Yu C., Ito C., Chiyo T., Kobayashi K., Okada

- T., Takeda S., and Toda T. Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci Rep*, 2015. [in press].
- 6) Arimura S., Okada T., Tezuka T., Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y., Yoshimura T., Motomura M., Yoshida N., Beeson D., Takeda S. and Yamanashi Y. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science* 345(6203):1505-8, 2014.
 - 7) Hira R., Ohkubo F., Masamizu Y., Ohkura M., Nakai J., Okada T. and Matsuzaki M. Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. *Nat Commun*, [in press] 2014.
 - 8) Masamizu Y., Tanaka YR, Yasuyo H. Tanaka YH, Hira R., Kitamura K., Isomura Y., Okada T. and Matsuzaki M. Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nature Neurosci*, 17(7):987-94, 2014.
 - 9) Nitahara-Kasahara Y., Hayashita-Kinoh H., Chiyo T., Nishiyama A., Okada H., Takeda S. and Okada T. Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Hum Mol Genet*, 23(15): 3990-4000, 2014.
 - 10) Nitahara-Kasahara Y., Takeda S. and Okada T. Cell therapeutic approaches using multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. *Inflammation and Regeneration*, 2014. [in press]
 - 11) Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K. and Nagai Y. p62 plays a protective role in the autophagic clearance of polyglutamine aggregates in polyglutamine disease model flies. *J. Biol. Chem.*, 290(3): 1442-1453, 2015.
 - 12) Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M., Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., Nagai Y., Takeda A. and Aoki M. VPS35 dysfunction causes retromer depletion and impairs lysosomal degradation of α -synuclein, leading to exacerbation of α -synuclein neurotoxicity in *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.*, 71: 1-13, 2014.
 - 13) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y. and Yamaguchi M. Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a

- strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*. *Hum. Mol. Genet.*, 23(13): 3467-3480, 2014. Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K. and Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* 21(23): 2575-2582, 2014.
- 14) 永井義隆. ポリグルタミン病における神経変性. *BRAIN MEDICAL* 26 (3): 225-229, 2014.
2. 学会発表
- 1) Furuya H, Arahata H, Watanabe A, Ohyagi Y, Hohjoh H, Maeda N, Iwaki T, and Fujii N. Long-term clinical outcome of SCA8 in Japanese. 8th International Conference on Unstable Microsatellites and Human Disease, Guanacaste, Costa Rica, Jan. 17, 2015.
- 2) Takahashi M, Nakamura Y, and Hohjoh H. Application of atypical RNAi for human diseases. Joint Australia and Japan RNA (jajRNA) meeting, Sydney, Australia, Nov. 3, 2014.
- 3) Fukuoka M, Yoshida M, Eda A, Takahashi M, and Hohjoh H. Gene silencing mediated by endogenous miRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. 64rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.20, 2014.
- 4) Takahashi M, Fukuoka M, and Hohjoh H. Early drug responses that are followed by an acquired drug resistance in non-small cell lung cancer cells exposed to gefitinib. 64rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA, Oct.19, 2014.
- 5) 福岡聖之、吉田満史子、枝垂希子、高橋理貴、北條浩彦. (2014)「熱ストレス下におけるマイクロRNAの遺伝子発現制御に関する解析」第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、Nov. 26, 2014.
- 6) 北條浩彦、高橋理貴、枝垂希子、福島達伸. (2014)「老化モデルマウスおよび正常加齢マウスにおける miR-29 の発現上昇とそれに伴うコラーゲンタイプ IV の発現低下」第 59 回日本人類遺伝学会大会、東京、Nov. 26, 2014
- 7) Okada H., Ishibashi H., Hayashita-Kinoh H., Chiyo T., Masuda C., Nitahara-Kasahara Y., Takeda S. and Okada T. Induction of local OPMD histopathology in common marmoset by rAAV1 and 8-mediated transduction. ASGCT 17th Annual Meeting, DC, USA, May 21-24, 2014.
- 8) Hayashita-Kinoh H., Nitahara-Kasahara Y., Okada H., Chiyo T., Yugeta N., Okada T., and Takeda S. Immune tolerance induction in Canine X-Linked Muscular

- Dystrophy with rAAV9-Microdystrophin Transduction. American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting, DC, USA, May 23, 2014.
- 9) Nitahara-Kasahara Y., Hayashita-Kinoh H., Chiyo T., Okada H., Takeda S. and Okada T. Skeletal muscle engraftment of mesenchymal stromal cells is augmented by IL-10. American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting, DC, USA, May 23, 2014.
- 10) 笠原優子, 喜納裕美, 千代智子, 岡田浩典, 武田伸一, 岡田尚巳 IL10 強制発現による機能強化型 MSCs の作製と生存解析 第 35 回日本炎症・再生医学会、沖縄, July 2, 2014.
- 11) Hayashita-Kinoh H., Okada H., Nitahara-Kasahara Y., Chiyo T., Yugeta N., Okada T. and Takeda S. Immune tolerance induction of canine X-linked muscular dystrophy with fetal rAAV-microdystrophin transduction. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 6, 2014.
- 12) Okada H., Ishibashi H., Hayashita-Kinoh H., Chiyo T., Nitahara-Kasahara Y., Takeda S. and Okada T. rAAV1 and 8-mediated induction of local OPMD histopathology in common marmoset. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 6, 2014.
- 13) Nitahara-Kasahara Y., Hayashita-Kinoh H., Tsumita N., Chiyo T., Okada H., Takeda S. and Okada T. Engraftment of mesenchymal stem cells is effectively associated by IL-10 in skeletal muscle. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 8, 2014.
- 14) Ishii A., Okada H., Hayashita-Kinoh H., Jin-Hong S., Okada T. and Takeda S. Effective microdystrophin expression in non-human primate muscle with rAAV type 2/8/9 vectors following immune suppression. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 6, 2014.
- 15) Nagai Y. Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone. Hungary-Japanese Symp on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation, Okinawa, Nov 17-21, 2014.
- 16) Nagai Y., et al. Dysfunction of microtubule-dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. CSHL 2014 Neurodegen Dis meeting, CSH, NY, USA, Dec 3-6, 2014.

- 17) Saitoh Y., et al. p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. CSHL 2014 Neurodegen Dis meeting, CSH, NY, USA, Dec 3-6, 2014.
- 18) Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in *Drosophila*. CSHL 2014 Neurodegen Dis meeting, CSH, NY, USA, Dec 3-6, 2014.
- 19) 永井義隆、他. 2光子 in vivo イメージング解析による SCA1 マウスにおけるシナプス異常の解明. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 20) 藤掛伸宏、他. DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 21) 鈴木マリ、他. ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 22) 斉藤勇二、他. ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 23) Minakawa E.N., et al. Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 24) 東裕美子、他. FUS-ALS モデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 25) 三浦永美子、他. VPS35 障害はカテプシン D 活性低下を介し α シヌクレイン蓄積・神経変性を惹起する. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 26) 石黒太郎、他. SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす. 第 55 回 日本神経学会学術大会、福岡、May 21-24, 2014.
- 27) 鈴木マリ、他. 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 37 回 日本神経科学会、横浜、Sep 11-13, 2014.
- 28) 斉藤勇二、他. p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす. 第 37 回 日本神経科学会、横浜、Sep 11-13, 2014.
- 29) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. 第 37 回 日本神経科学会、横浜、Sep 11-13, 2014.
- 30) 石黒太郎、他. 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす. 第 37 回 日本神経科学会、横浜、Sep 11-13, 2014.
- 31) 上山盛夫、他. GGGGCC リピート RNA

を発現する新規 ALS モデルショウジ
ヨウバエの樹立と病態解析. 第 86 回
日本遺伝学会大会、長浜、Sep 17-19,
2014.

- 32) 永井義隆、他. 微小管依存的 TDP-43
輸送の障害はオリゴマー形成を促進
し、神経変性を惹き起こす. 第 33 回
日本認知症学会学術集会、横浜、Nov
29- Dec 1, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

本研究成果に関する特許出願準備中。

マイクロ RNA 発現ウイルスの作製と新しい DDS 法に関する研究開発

業務分担者 岡田 尚巳 日本医科大学大学院医学系研究科 教授

本研究では、ポリグルタミン病などの神経変性疾患に対し、マイクロ RNA 補充療法のためのマイクロ RNA 発現 AAV の作成と、AAV 中空粒子を用いて新しい DDS 法の開発を実施することを目的としている。H26 年度は上記疾患モデルに対し治療効果を期待できるマイクロ RNA の発現カセットを構築し、AAV-miRNA ベクターを作製した。また、AAV 中空粒子に核酸誘導体が導入可能であることを明らかにした。

研究協力者：

岡田浩典

日本医科大学医学部生化学・分子生物学（分子遺伝学）研究員

増田千明

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病第三部流動研究員

喜納裕美

日本医科大学医学部生化学・分子生物学（分子遺伝学）研究員

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは西欧で初めて遺伝子治療製剤として医薬承認を得たウイルスベクターであり、*in vivo*での高い安全性と長期にわたる遺伝子導入効率を誇る。本研究では、脊髄小脳変性症1型モデルである SCA1 ノックインマウスなどのポリグルタミン病モデル動物やアルツハイマー病などの神経変性疾患モデル動物に対しマイクロ RNA 補充療法を行うためのマイクロ RNA 発現 AAV の作製と、その AAV 中空粒子を利用した新しい DDS 法の開発を目的とする。

B. 研究方法

- 1) マイクロ RNA 補充療法のためのマイクロ RNA 発現 AAV ベクターを作製するために、miRNA 発現カセットを設計した。これを元に3種類の AAV ベクターを作製した。
- 2) AAV 中空粒子に導入可能な薬剤を検討し、その効率を測定した。まず始めに蛍光標識された核酸誘導体(FITC-PMO)について、AAV9 型中空粒子で検討を行った。

C. 研究結果

- 1) 293EB 細胞に対し、PEI を用いて plasmid をトランスフェクションし、rAAV ベクターを含む培養上清と細胞ペレットを得た。これを定法(Okada et al., 2009)に基づいて精製を行い、rAAV-miRNA 発現ベクターとした。qPCR を用いてタイターを測定したところ、それぞれ
rAAV-miR-Nega; 3.1×10^{13} v.g./3.5ml
rAAV-miX1; 9.4×10^{13} v.g./3.2ml
rAAAV-miX2; 1.2×10^{14} v.g./2.75ml
の精製ウイルスを得た。
- 2) FITC-PMO について、rAAV9 中空粒子中に取り込まれる条件を検討し、その効率を測定した。また、取り込み済みの rAAV9-FITC-PMO を細胞に感染させ、細胞への取り込みを確認した。

D. 考察

- 1) 疾患モデルマウスに対して、投与実験を行うに足る量の精製ウイルスが作製できた。
- 2) AAV 中空粒子に PMO(核酸誘導体)が導入可能であることが判明したので、miRNA, 核酸についても検討を行う。さらに細胞への導入効率を上げるために、ユビキチン化を受けにくくした Tyr 変異体 AAV 中空粒子を用いて導入条件の検討を行う。

E. 結論

神経疾患病態モデルマウスに AAV-miRNA を用いて検討を行う準備が完了した。次年度も引き続き AAV-miRNA の構築と供給を行う。また、AAV 中空粒子は DDS として有望であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき健康危険情報はなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiromi Hayashita-Kinoh, Naoko Yugeta, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Takashi Okada and Shin'ichi Takeda: Intra-Amniotic rAAV-Mediated Microdystrophin Gene Transfer Improves Canine X-Linked Muscular Dystrophy and May Induce Immune Tolerance. Mol. Ther. 2015 [in press]
- 2) Yoshihisa Ohtsuka, Motoi Kanagawa, Chih-Chieh Yu, Chiyomi Ito, Tomoko Chiyo, Kazuhiro Kobayashi, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda and Tatsushi Toda: Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. Sci. Rep. 2015 [in

press].

- 3) Sumimasa Arimura, Takashi Okada, Tohru Tezuka, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Toshiro Yoshimura, Masakatsu Motomura, Nobuaki Yoshida, David Beeson, Shin'ichi Takeda and Yuji Yamanashi. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. Science 345(6203):1505-8, 2014
- 4) Riichiro Hira, Fuki Ohkubo, Yoshito Masamizu, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Takashi Okada and Masanori Matsuzaki. Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. Nat. Commun. [in press] 2014
- 5) Yoshito Masamizu, Yasuhiro R. Tanaka, Yasuyo H. Tanaka, Riichiro Hira, Kazuo Kitamura, Yoshikazu Isomura, Takashi Okada and Masanori Matsuzaki. Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. Nature Neurosci. 17(7):987-94, 2014
- 6) Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Akiyo Nishiyama, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Hum Molecular Genetics, 23(15):3990-4000,2014.
- 7) Yuko Nitahara-Kasahara, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Cell

therapeutic approaches using multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. Inflammation and Regeneration. 2014 [in press]

2. 学会発表

- 1) Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Chiaki Masuda, Yuko Nitahara-Kasahara, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Induction of local OPMD histopathology in common marmoset by rAAV1 and 8-mediated transduction. ASGCT 17th Annual Meeting May 21-24, 2014 DC, USA.
- 2) Hiromi Hayashita-Kinoh, Yuko Nitahara-Kasahara, Hironori Okada, Tomoko Chiyo, Naoko Yugeta, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda. Immune tolerance induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy with rAAV9-Microdystrophin Transduction. American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting, DC, 2014 May 23
- 3) Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda, Takashi Okada. Skeletal muscle engraftment of mesenchymal stromal cells is augmented by IL-10. American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting, DC, 2014 May 23
- 4) 笠原優子, 喜納裕美, 千代智子, 岡田浩典, 武田伸一, 岡田尚巳 IL10 強制発現による機能強化型 MSCs の作製と生存解析 第 35 回日本炎症・再生医学会 沖縄, July 2, 2014
- 5) Hiromi Hayashita-Kinoh, Hironori

Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Naoko Yugeta, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda. Immune tolerance induction of canine X-linked muscular dystrophy with fetal rAAV-microdystrophin transduction. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 6, 2014

- 6) Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Shin'ichi Takeda, Takashi Okada. rAAV1 and 8-mediated induction of local OPMD histopathology in common marmoset. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 6, 2014
- 7) Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Nana Tsumita, Tomoko Chiyo, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda, Takashi Okada. Engraftment of mesenchymal stem cells is effectively associated by IL-10 in skeletal muscle. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 8, 2014
- 8) Akiko Ishii, Hironori Okada, Hiromi Hayashita-Kinoh, Shin Jin-Hong, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda. Effective microdystrophin expression in non-human primate muscle with rAAV type 2/8/9 vectors following immune suppression. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Aug 6, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

2 光子レーザー顕微鏡を用いた SCA1 ノックインマウスにおけるシナプス動態異常の解析

業務分担者 永井 義隆 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究 室長

本研究では、神経変性疾患における神経細胞死に先行する神経機能障害のメカニズム解明を目的とし、2光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング解析により、脊髄小脳失調症1型（SCA1）ノックインマウスにおけるシナプス形態・動態異常の解析を行った。その結果、SCA1 ノックインマウスでは、発症前からシナプスのターンオーバー率が有意に亢進し、不安定になっていることが明らかになった。さらに、このシナプスの異常不安定性は神経ネットワークの発達期から確認され、通常は安定化する成熟期においても持続した。以上のことから、晩発性神経変性疾患の神経機能障害の根底に神経ネットワークの発達障害が存在する可能性があると考えられた。

研究協力者：

畑中悠佑

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病
研究第四部 科研費研究員

藤田寛美

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病
研究第四部 科研費研究補助員

和田圭司

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病
研究第四部 部長

A. 研究目的

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン（PolyQ）病など多くの神経変性疾患において、様々なタンパク質のミスフォールディング・凝集がかかわる共通の神経変性メカニズムが考えられている。しかしながら、神経症状は最終的な神経細胞死に至る前の神経機能障害の段階で出現すること、そしてそれが可逆的であることが明らかにされたものの、タンパク質のミスフォールディング・凝集の下流で引き起こされる可逆性神経機能障害の実体、その詳細なメカニズムについてはこれまで未解明であった。発症後か

らの治療介入を考えた場合、可逆性神経機能障害の解明とそれによる新たな治療標的の特定は、きわめて重要な課題である。本研究では、神経変性疾患における可逆性神経機能障害の根底に存在するシナプス異常の詳細を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

B&C&D. 研究方法、結果および考察

様々なポリグルタミン病モデルの中から、ヒト患者での遺伝子異常を忠実に再現されており、組織特異的な神経ネットワーク障害が保存されている脊髄小脳失調症1型（SCA1）のノックインマウス SCA1^{154Q/2Q}（Watase et al. Neuron 2002）を用いた。この SCA1^{154Q/2Q} マウスは、ヒト SCA1 患者と同様に小脳の神経変性に伴う運動失調を発症する一方で、神経変性を認めない大脳皮質・海馬などの機能障害に伴う記憶・学習能の障害を呈することから、神経変性非依存的な神経機能障害の実体解明に適したモデルと言える。

神経細胞の興奮性シナプス後部構造である樹状突起スパインを可視化するため、神経細胞特異的に YFP を発現する Thy1-YFP マウスを用いて、このマウスと SCA1^{154Q/2Q} マウスとの交配により得られた SCA1^{154Q/2Q}/Thy1-YFP マウスについて解析を行った。

1. 2光子レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳の *in vivo* イメージング解析

まず、観察深度が深いレーザーによる組織・細胞障害が少なく、生体のタイムラプスイメージング解析に適した2光子レーザー顕微鏡を用いて、スパインの形態のみならず、その動態解析を行った。SCA1^{1540/20}マウスの頭蓋骨を薄く削る thinned-skull 法により、大脳皮質第5層錐体神経細胞の第1層樹状突起におけるスパインを、非侵襲的に経時観察した。その結果、発症前の4週齢から、スパインの新生・消失を示すターンオーバー率が、有意に亢進していることが明らかになった。このとき、スパインの形態には異常は認められなかった。さらに、通常は8週齢までの神経ネットワークの成熟に伴って徐々に低下していくスパインのターンオーバー率が、異常亢進したまま持続することが明らかになった。以上のことから、SCA1マウスは発症前からシナプス不安定性を示し、神経ネットワーク発達のシナプス成熟が遅延している可能性が示唆された。

2. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳固定切片の *ex vivo* 解析

次に、2光子レーザーでも励起が難しい海馬領域の評価のために、SCA1^{1540/20}マウスを灌流固定して脳切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてスパイン形態の解析を行った。その結果、海馬CA1錐体神経細胞の樹状突起スパインは、発症する5週齢時点では顕著な形態変化を認めなかったが、8週齢、12週齢と週齢を重ねるに連れて密度が徐々に減少し、スパイン頭部の大きさも狭小化していた。以上のことから SCA1マウスの海馬におけるシナプス変性は、症状の進行とともに増悪すると考えられる。

(倫理面への配慮)

本研究では、実験動物の取り扱いにあたっては国の法律・指針および国立精神・神経医療研究センター動物実験倫理指針を遵守した。

E. 結論

本研究の結果から、SCA1などの晩発性神経変性疾患の神経症状発症の根底に発達期のシナプス成熟障害が寄与する可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K., *Nagai Y. p62 plays a protective role in the autophagic clearance of polyglutamine aggregates in polyglutamine disease model flies. *J. Biol. Chem.* 290(3): 1442-1453 (2015)
- 2) Miura E., Hasegawa T., Konno M., Suzuki M., Sugeno N., Fujikake N., Geisler S., Tabuchi M., Oshima R., Kikuchi A., Baba T., Wada K., Nagai Y., Takeda A., Aoki M. VPS35 dysfunction causes retromer depletion and impairs lysosomal degradation of α -synuclein, leading to exacerbation of α -synuclein neurotoxicity in *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.* 71: 1-13 (2014)
- 3) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M. Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*. *Hum. Mol. Genet.* 23(13): 3467-3480 (2014)
- 4) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* 21(23): 2575-2582 (2014)
- 5) 永井義隆. ポリグルタミン病における神経変性. *BRAIN MEDICAL* 26 (3): 225-229 (2014)

2. 学会発表

- 1) Nagai Y. Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone. *Hungary-Japanese Symp on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation* (Nov 17-21, 2014, Osaka, Japan)
- 2) Nagai Y., et al. Dysfunction of microtubule-

- dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
- 3) Saitoh Y., et al. p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
 - 4) Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in *Drosophila*. *CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting* (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)
 - 5) 永井義隆, 他. 2光子 in vivo イメージング解析による SCA1 マウスにおけるシナプス異常の解明. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 6) 藤掛伸宏, 他. DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 7) 鈴木マリ, 他. ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 8) 齊藤勇二, 他. ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 9) Minakawa E.N., et al. Investigating the Role of Ubiquilin-2 in the Pathomechanism of ALS/FTD. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 10) 東裕美子, 他. FUS-ALS モデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 11) 三浦永美子, 他. VPS35 障害はカテプシン D 活性低下を介し α シヌクレイン蓄積・神経変性を惹起する. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 12) 石黒太郎, 他. SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす. 第55回 日本神経学会学術大会 (H26.5.21-24, 福岡)
 - 13) 鈴木マリ, 他. 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第37回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 14) 齊藤勇二, 他. p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす. 第37回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 15) Minakawa et al. Investigating the role of ubiquilin-2 in the pathomechanism of ALS/FTD. 第37回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 16) 石黒太郎, 他. 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす. 第37回 日本神経科学学会 (H26.9.11-13, 横浜)
 - 17) 上山盛夫, 他. GGGGCC リピート RNA を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析. 第86回 日本遺伝学会大会 (H26.9.17-19, 長浜)
 - 18) 永井義隆, 他. 微小管依存的 TDP-43 輸送の障害はオリゴマー形成を促進し、神経変性を惹き起こす. 第33回 日本認知症学会学術集会 (H26.11.29-12.1, 横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「難治性神経変性疾患に対する神経シナプス形成を促進させるマイクロRNAの補充による新規治療法の開発と確立」

機関名 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Long-term clinical outcome of SCAS in Japanese. (ポスター)	Furuya H, Arahata H, Watanabe A, Ohyagi Y, <u>Hohjoh H</u> , Maeda N, Iwaki T, and Fujii N.	8th International Conference on Unstable Microsatellites and Human Disease	2015年1月17日	国外
Application of atypical RNAi for human diseases. (ポスター)	Takahashi M, Nakamura Y, and <u>Hohjoh H</u> .	Joint Australia and Japan RNA (jajRNA) meeting	2014年11月3日	国外
Gene silencing mediated by endogenous miRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. (ポスター)	Fukuoka M, Yoshida M, Eda A, Takahashi M, and <u>Hohjoh H</u> .	64rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics	2014年10月20日	国外
Early drug responses that are followed by an acquired drug resistance in non-small cell lung cancer cells exposed to gefitinib. (ポスター)	Takahashi M, Fukuoka M, and <u>Hohjoh H</u> .	64rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics	2014年10月19日	国外
熱ストレス下におけるマイクロRNAの遺伝子発現制御に関する解析 (ポスター)	福岡聖之、吉田満史子、枝垂希子、高橋理貴、 <u>北條浩彦</u> .	第37回日本分子生物学会大会	2014年11月26日	国内
老化モデルマウスおよび正常加齢マウスにおけるmiR-29の発現上昇とそれに伴うコラーゲンタイプIVの発現低下 (口頭)	<u>北條浩彦</u> 、高橋理貴、枝垂希子、福島達伸.	第59回日本人類遺伝学会大会	2014年11月21日	国内