

## ゲノム編集を用いたDRPLA (Dentatorubral-Pallidoluysian Atrophy)の治療戦略研究

研究分担者 小野寺 理 新潟大学脳研究所神経内科学分野  
研究協力者 加藤 泰介 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野  
佐藤 俊哉 北里大学医学部実験動物学  
辻 省次 国際医療福祉大学大学院

### 研究要旨

本研究はゲノム編集による毒性タンパク質の発現抑制を用いて、遺伝性脊髄小脳変性症の一種である DRPLA (歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症)の治療を目的とする前臨床研究である。我々は疾患病態を呈した DRPLA モデルマウスに原因遺伝子である Atrophin-1 編集用 CRISPR/Cas9 搭載 AAV ベクターを投与し、脳内の毒性タンパク質の永続的な発現抑制を行い、その治療効果を評価した。結果、AAV ベクターの投与によって、DRPLA モデルマウスの運動機能・活動性低下は明らかに抑制され、生存日数に関しても平均値で 10 カ月程度の延長効果が認められた。本研究結果は、ゲノム編集による発現抑制治療法は病態発症後においても DRPLA の治療法として有効であることを示している。

### A. 研究目的

本研究では、Atrophin-1 遺伝子内の CAG リピートの伸長によって発症する遺伝性脊髄小脳変性症、DRPLA の新たな治療法として、ゲノム編集を用いた発現抑制法の有効性を検討することを目的として行われた<sup>(1)</sup>。

### B. 研究方法

本研究には 112 CAG リピート伸長を有するヒト Atrophin-1 遺伝子を 1 コピー有する DRPLA モデルトランスジェニック(Tg)マウスを用いた<sup>(2)</sup>。本モデルマウスは 5~6 週齢より運動機能・活動性の低下、振戦などの DRPLA 病態を呈する。6 週齢においてこれら行動学的指標の低下が確認されたモデル Tg マウスに対して、経静脈的に血液脳関門を超える機能を持つヒト Atrophin-1 ゲノム

編集用 CRISPR/Cas9 AAV ベクターを投与し、中枢神経細胞の変異 Atrophin-1 遺伝子のゲノム編集を行った<sup>(3)</sup>。AAV ベクター投与による中枢神経系組織内のゲノム編集効率は、ゲノム DNA を鋳型とした Droplet-Digital PCR 法によって行った。マウス運動機能はロータロッド試験、活動量はオープンフィールド試験によって評価を行った。伸長型 CAG リピートより産生されるポリグルタミンタンパク質封入体の評価は、脳組織を用いた免疫組織染色によって評価した。

### (倫理面への配慮)

遺伝子改変動物実験は新潟大学遺伝子倫理審査委員会と動物実験倫理審査委員会の承認を得て、実施した。

### C. 研究結果

AAV ベクター投与によりゲノム編集を受けた DRPLA モデル Tg マウス脳内のゲノム編集効率は、大脳皮質においておよそ 30~35%であり、脳組織内においてモザイク状に誘導されていた。

112 CAG リピート DRPLA モデル Tg マウスは、9 カ月以内に全頭が死亡したが、AAV 投与を受けた Tg マウスでは、全てのマウスが 9 カ月を超えて生存し、平均値で 10 カ月程度の寿命延長効果を認めた。

運動機能評価と活動量の評価を経時的に実施した結果、AAV ベクター非投与 DRPLA Tg マウスの機能は、死亡まで加齢に沿って低下した。一方で、AAV ベクター投与により、変異遺伝子の発現抑制を受けた DRPLA Tg マウスでは、野生型と比較して低いスコアであるものの、有意に AAV ベクター非投与群よりも高い機能スコアを維持し続けた。

脳組織の病理学的な評価の結果、AAV ベクター非投与 DRPLA Tg マウス神経細胞では全ての細胞でポリグルタミン封入体の形成を認めた。一方で AAV ベクター投与を受けた DRPLA Tg マウスでは、モザイク状にポリグルタミン封入体陰性の神経細胞を認め、その比率はゲノム編集効率と相関していた。

### D. 考察

本研究成果によって、DRPLA 病態の発症後であっても、毒性タンパク質産生を抑制することによって機能低下の進行を抑制し、治療効果を得ることが可能であることが示された。また、重要な点は、脳組織内の 30%程度の神経細胞のゲノム編集でも明瞭な治療効果が得られた点である。本手法は永続的な毒性タンパク質産生の抑制が可能であり、オフターゲット効果の懸念がある一方で、生涯に渡る薬剤の投与を必要としない、有望な手法であることが示唆される。また、DRPLA は原因遺伝子である Atrophin-1 欠損が生存や機能に重

篤な影響を与えないことから、本手法による発現抑制法が臨床応用可能な疾患であることが示唆される。

### E. 結論

ゲノム編集による毒性タンパク質産生の抑制法は DRPLA の有望な治療戦略の一つであることが示された。以降は、重篤な疾患病態の一つである難治性てんかんへの治療効果の評価を実施する。

### [参考文献]

- 1) Tsuji S. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Handb Clin Neurol.* 2012;103:587-94.
- 2) Suzuki K, Zhou J, Sato T, Takao K, Miyagawa T, Oyake M, Yamada M, Takahashi H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S. DRPLA transgenic mouse substrains carrying single copy of full-length mutant human DRPLA gene with variable sizes of expanded CAG repeats exhibit CAG repeat length- and age-dependent changes in behavioral abnormalities and gene expression profiles. *Neurobiol Dis.* 2012 May;46(2):336-50.
- 3) Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, Greenbaum A, Ravi N, Wu WL, Sánchez-Guardado L, Lois C, Mazmanian SK, Deverman BE, Gradinaru V. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci.* 2017 Aug;20(8):1172-1179.

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

なし

### 2.学会発表

発表者名.題名.学会名.発表地,発表日.

- 1) Taisuke Kato<sup>1</sup>, Sachiko Hirokawa<sup>1</sup>, Kenta Kobayashi<sup>2</sup>, Shoji Tsuji<sup>3</sup> and Osamu Onodera. Phenotypic suppression of DRPLA model mice using CRISPR / Cas9 system. Keystone symposia. アメリカ合衆国. 2018. 口頭発表.
- 2) Taisuke Kato, Sachiko Hirokawa, Kenta

Kobayashi, Shoji Tsuji and Osamu Onodera  
Gene therapy for DRPLA model mice by  
AAV-delivered CRISPR / Cas9. Keystone  
symposia. カナダ. 2019. 口頭発表.

- 3) Shoichiro Ando, Taisuke Kato, Yuka Koike,  
Sachiko Hirokawa, Kenta Kobayashi, Shoji  
Tsuji and Osamu Onodera. Gene therapy for  
DRPLA model mice by AAV-delivered  
CRISPR / Cas9. Keystone symposia. アメリ  
カ合衆国. 2020. 口頭発表.