

—— 研究助成報告 ——

AAVベクターを応用したてんかんに対する 遺伝子治療基盤技術の開発

Development of rAAV-mediated transduction strategy for the treatment of refractory epilepsy

岡田 尚 巳, 岡田 浩 典

要旨：欧米では様々な神経疾患に対する遺伝子治療臨床試験の経験が蓄積され、安全性に優れたアデノ随伴ウイルス（AAV）に由来するベクターを中心に様々な遺伝子治療医薬品が販売承認されている。申請者は独自のベクター製造・精製法を開発し、持続型タンパク質補充療法への応用に取り組んできた。焦点診断技術の進歩により、本邦でも難治てんかんに対する外科的治療が普及しているが、成人例で運動野や言語野などの切除を伴う場合は機能障害が懸念される。このため、大脳機能を温存しつつ、てんかん性発射を制御する外科的遺伝子治療の開発が期待される。本研究では安全で有効性の高い治療遺伝子送達技術の開発を目的とし、マイクロバブル併用超音波照射法を用いた脳組織領域的遺伝子送達システムを検討した。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2017；28：55-58

Key Words : AAV vector, gene therapy, blood-brain interface, ultrasound irradiation, microbubble

【序論】

遺伝子治療の実用化には様々な困難があったが、欧米では臨床試験の経験が蓄積され、安全性に優れたアデノ随伴ウイルス（AAV）に由来するベクターをはじめ、様々な遺伝子治療医薬品が販売承認されている。特に、神経筋組織など終末分化した細胞では長期間安全に遺伝子発現を維持することが可能であり、我々は様々な遺伝性神経筋疾患に対する基盤的治療技術を提案してきた¹⁻⁵⁾。さらに、遺伝子治療の本格的な実用化に向け、申請者は両イオン交換精製法を応用した独自の高純度高力価ベクター製造・精製法を開発し、長期持続型タンパク質補充療法への応用に取り組んでいる^{6,7)}。霊長類

やげっ歯類の脳組織においても様々な血清型のAAVに由来するベクターを構築し、遺伝子導入様式や神経回路構築について検証を行い、その特徴と有用性を証明した⁸⁻¹¹⁾。

焦点診断技術の進歩により、本邦でも難治てんかんに対する外科的治療の症例数が増加している。ただし、成人で運動野や言語野などの切除を伴う場合は機能障害が懸念され、海馬萎縮がない症例の左海馬切除では記憶力障害が課題となる。このため、大脳機能を温存しつつ、てんかん性発射を制御する外科的遺伝子治療の開発が期待される。脳マッピングによる外科的焦点診断技術を併用し、局所的あるいは領域的に安全に治療遺伝子を導入することで、焦点切除や離断術の前段階として安全に遺伝子治療が

実施できれば、QOLの改善に大きく貢献できる。

本研究では、発作抑制や薬物治療効果の改善に向け、優性阻害変異体導入によるモデル動物の作成や安全で有効性の高い治療遺伝子送達技術の開発を目的とし、マイクロバブル併用超音波照射法を用いた脳組織領域的遺伝子送達システムを検討した。

【方法】

AAVベクターの本格的実用化に向けた課題であるGMP大量製造技術の開発を推進した。従来のCsClやiodixanolを用いた超遠心法による精製では、安定した大量生産が困難であったため、高効率イオン交換とゲル濾過カラムクロマトグラフィーを組み合わせた精製法を考案した。最終標品の品質評価を、電子顕微鏡、SDS-PAGE、感染細胞の導入遺伝子発現解析により実施した⁷⁾。

従来、脳組織に外来遺伝子を導入するには定位脳手術が一般的であったが、領域的に導入する場合は多数部位の侵襲的な針刺入操作が必要である。このため、頭部皮膚上からの超音波照射によるマイクロバブルの共振を応用し、静脈内投与したAAVベクターを領域的に導入する条件を検証した。小型霊長類であるマーモセット成体を用い、超音波照射による血液脳関門透過性の亢進効果を病理学的に検証した。アルブミンに結合する色素であるエバンスブルーを、マイクロバブルとともに大腿静脈より注入した後、左側頭部あるいは頭部全体に超音波照射し、照射部における血液脳関門の一時的な透過性亢進を試みた。この際、1MHzの超音波を2Wで10分間、頭皮上から内側側頭葉や頭頂葉を標的として照射した。超音波照射の翌日に剖検し、脳断面におけるエバンスブルーの分布を観察した。また、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡下でエバンスブルーの分布を観察し、アルブミンの脳実質内への浸透様式について検証した。

また、超音波照射による血液脳関門透過性の亢進(BBI opening)の効果について動物用PETを用いて詳細に解析した。アルブミンに結合するPETプローブである¹¹C標識アミノイ

ソ酪酸(¹¹C-AIB)を用い、同一個体の脳におけるBBI opening処置前後の血液脳関門透過性を比較した。最初にBBI opening未処置の個体に¹¹C-AIBを尾静脈から投与した後に1時間のPET撮像を行った。その後、¹¹Cが十分に減衰するまで6時間の間隔を空け、BBI opening処置と直後の撮像を行った。BBI opening処置はマイクロバブルを尾静脈より注入し、左側頭頂部に超音波を照射することで実施した。この際、マイクロバブルと¹¹C-AIBは混合溶液として同時に注入した。

さらに、超音波照射による血液脳関門透過性の亢進(BBI opening)効果とその回復について、ゲノムが安定なself-complementary AAV(scAAV)ベクターを用いて解析した。BBI opening直後(scAAV1-GFP)とその2日後(scAAV1-DsRed2)に各々異なるAAVベクターを投与し、さらに5日後の脳組織中の各々のAAVベクターゲノム量を比較した。この際、1回目のAAVベクターはマイクロバブルおよびエバンスブルー色素と共に尾静脈から注入し、直後に左側頭頂部に超音波を照射することでBBI openingを実施した。還流固定後に脳組織を採取して組織中の色素量をホルムアミド抽出にて定量的に評価し、ベクターゲノムのコピー数を定量的PCR法にて算定した。

【結果】

超遠心操作を省略した新規精製技術により高純度かつ発現効率の高い1型AAVベクターが得られ、電子顕微鏡、SDS-PAGEおよび感染細胞の導入遺伝子発現により精製効果が確認できたが、ラージスケールの製造精製操作でも同様の結果が再現された⁷⁾。

超音波照射翌日の脳断面を解析した結果、頭部全体に超音波照射した場合には脳組織全体にエバンスブルーの沈着を認めた。一方、側頭部に照射した場合には、同側の側頭葉を中心とした色素沈着がみられた。この際、病理組織像を観察したところ、抵抗血管である細動脈よりもやや細い直径10-50 μ mの血管の周囲にアルブミンの漏出が多く確認された。また、アルブミンの漏出はPET撮像の最初から観察され、BBI

opening処置直後から起きていることが明らかとなった。このアルブミン漏出は前部帯状回、基底核、視索、扁桃体、上側頭回、および海馬において確認された。BBI opening直後のPET撮像においても、超音波照射領域の ^{11}C -AIB集積が確認された。AAVベクター反復投与後の定量的PCR解析の結果、BBI opening直後では超音波を照射した側の海馬においてAAVベクターの高い導入が認められた。しかし、2日後に投与したベクターのゲノム量に関しては左右半球で差異は認められず、この結果から、マーモセット脳におけるBBI openingの効果は48時間以内に回復することが明らかとなった。

【考察】

本研究では、高純度AAVベクターとマイクロバブル併用超音波照射法を用いて、小型霊長類における外来遺伝子導入条件を検討した。その際、BBI openingの効果は一過性であることが確認できた。今後、難治性てんかんでみられるGABAA受容体 $\gamma 2$ サブユニットGABRG2遺伝子やSCN1A遺伝子の優性阻害変異体を領域的あるいは細胞種特異的に発現させてチャネル異常を誘導することで、任意の領域に発作焦点を示す疾患モデル動物の作出が期待される。また、我々の従来の研究でELマウス発作抑制効果が示唆されたGAD発現AAVベクターを用い、治療効果を検証する予定である。発作焦点局所でGABA合成能を高め、GABAニューロンの機能を亢進させることにより、てんかん発作や神経細胞の興奮制御作用を検証し、非臨床POCの取得と臨床応用に向けた課題抽出を推進したい。

【謝辞】

本研究を推進するにあたり多大なご支援をいただきました。てんかん治療研究振興財団に深く感謝いたします。また、本研究の推進に多大なご協力をいただきました東京薬科大学根岸洋一准教授、東京医科大学石橋英俊センター長、国立精神・神経医療研究センター加藤孝一室長、自治医科大学島崎久仁子博士に感謝いたします。

【文献】

- 1) Ohshima, S., Shin, J.H., Yuasa, K., Nishiyama, A., Kira, J., Okada, T. et al.: Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol Ther* 2009 ; **17** : 73-80.
- 2) Shin, J.H., Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Kinoshita, K., Chiyo, T. et al: Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther* 2011 ; **18** : 910-919.
- 3) Koo, T., Okada, T., Athanasopoulos, T., Foster, H., Takeda, S., Dickson, G.: Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med* 2011 ; **13** : 497-506.
- 4) Arimura, S., Okada, T., Tezuka, T., Chiyo, T., Kasahara, Y., Yoshimura, T. et al: Neuromuscular disease. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science* 2014 ; **345** : 1505-1508.
- 5) Hayashita-Kinoh, H., Yugeta, N., Okada, H., Nitahara-Kasahara, Y., Chiyo, T., Okada, T. et al: Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance. *Mol Ther* 2015 ; **23** : 627-637.
- 6) Okada, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Kinoshita, K., Hayashita-Kinoh, H., Nitahara-Kasahara, Y. et al: Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther* 2009 ; **20** : 1013-1021.
- 7) Tomono, T., Hirai, Y., Okada, H., Adachi, K., Ishii, A., Shimada, T. et al: Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016 ; **3** : 15058.
- 8) Masamizu, Y., Okada, T., Kawasaki, K.,

- Ishibashi, H., Yuasa, S., Takeda, S. et al.: Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. *Neuroscience* 2011 ; **193** : 249-258.
- 9) Okada, H., Ishibashi, H., Hayashita-Kinoh, H., Chiyo, T., Nitahara-Kasahara, Y., Baba, Y. et al: Robust Long-term Transduction of Common Marmoset Neuromuscular Tissue With rAAV1 and rAAV9. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013 ; **2** : e95.
- 10) Masamizu, Y., Tanaka, Y.R., Tanaka, Y.H., Hira, R., Ohkubo, F., Kitamura, K. et al.: Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat Neurosci* 2014 ; **17** : 987-994.
- 11) Hironaka, K., Yamazaki, Y., Hirai, Y., Yamamoto, M., Miyake, N., Miyake, K. et al.: Enzyme replacement in the CSF to treat metachromatic leukodystrophy in mouse model using single intracerebroventricular injection of self-complementary AAV1 vector. *Sci Rep* 2015 ; **5** : 13104.

Summary

Development of rAAV-mediated transduction strategy for the treatment of refractory epilepsy

Takashi Okada, Hironori Okada

Promising characteristics of adeno-associated virus (AAV)-based vectors with safety and long-term expression have made it an attractive transduction tool for clinical gene therapy of neuronal diseases. We developed methods of producing recombinant AAV (rAAV) with scalable purification protocol using the high-performance membrane adsorbers for considerable *in vivo* experimentation and clinical investigations. We sought to adopt the efficient production system to investigate rAAV-mediated neuronal transduction for the treatment of refractory epilepsy.

A fully mature blood-brain interface significantly limits passive rAAV transport from the circulation to the brain, although there are many kinds of naturally occurring or artificially evolved AAV serotypes with variable tropisms. To improve rAAV delivery into the adult marmoset brain, we investigated blood-brain interface opening using the resonance of intravenously injected microbubbles locally excited with ultrasound irradiation to transiently permeabilize cerebral capillaries. This strategy to use an ultrasound-mediated microbubble-assisted blood-brain interface opening would be useful for developing improved gene therapy of refractory epilepsy.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2017 ; 28 : 55-58