

—— 研究助成報告 ——

ゲノム編集を用いた遺伝子発現サイレンシングによる 遺伝性難治性てんかん脳症 ; DRPLA の治療戦略研究

加 藤 泰 介

要旨：歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（dentatorubral pallidoluysian atrophy, DRPLA）は、原因遺伝子；Atrophin-1内のCAGリピートの異常伸長によって発症するポリグルタミン病の一種であるが、現時点では根本的な治療方法はない。変異遺伝子から産生されるポリグルタミンタンパク質による細胞毒性が原因であり、この産生の停止はDRPLAの有効な治療法となりうる。我々は、この可能性に対し、ゲノム編集による遺伝子サイレンシングを用いた治療法の開発とその有効性の検討を行った。DRPLA Tgマウスが表現型を発症した後にAAVを用いて脳内ゲノム編集を行った結果、30%程度の編集効率でありながら、本モデルマウスの運動失調の進行の抑制、てんかん発作の停止、寿命の顕著な延長効果が観察された。本研究は、DRPLAに対するゲノム編集を用いた治療法の実現可能性を強く支持するものである。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2024 ; 35 : 63-68

Key Words：DRPLA, ゲノム編集, ポリグルタミン病, 難治性てんかん脳症,
モザイク遺伝子サイレンシング

序論

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（dentatorubral pallidoluysian atrophy, DRPLA, 別名 内藤・小柳病）は、難治性進行性ミオクロースてんかん、小脳失調、舞踏アテトーシス、性格変化、痴呆など多彩な神経症状を示し、歯状核赤核路と淡蒼球ルイ体路の変性を特徴とし、最終的に死に至る常染色体顕性遺伝性の脊髄小脳変性症である¹⁾。常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症の約13%を占める。原因遺伝子；Atrophin-1 (ATN1) 内のCAGリピートの異常伸長によって発症するポリグルタミン病の一種であるが、現時点では根本的な治療方法はない²⁾。CAG塩基反復配列がコードする、異常に伸長したグルタミン鎖を含む原因遺伝子産物がミスフォールディングによって不溶性の線維構造を形成し、神経細胞に蓄積することにより神経細胞が傷害される³⁾。モデルマウスであるDRPLA Tgマ

ウスが開発されており、このマウスは原因遺伝子である伸長型ヒトATN1遺伝子を、プロモーター配列も含めて、シングルコピーで保有し、進行性ミオクロースてんかん、小脳性運動失調、病理学的特徴、寿命の短命化といったヒトと類似した特徴を示す⁴⁾。

近年、遺伝性神経難病に対して、発現抑制（サイレンシング）による治療の試みがなされている。本症はATN1遺伝子欠損マウスに異常が見られず正常に生存することから、サイレンシング治療法に適していると考えられる⁵⁾。しかし、本症を初めとするポリグルタミン病には、この治療が適応できるかについて次の様な問題が指摘されている。第一に、サイレンシング効率による治療効果の割合が不明であること。第二に異常ポリグルタミン発現細胞からの異常タンパクの正常細胞への伝播や、脳内炎症反応の、正常細胞への影響が不明であることである。本研究の目的は、出生後モデルマウスの原因遺伝

子*ATN1*のゲノム編集により、これらの問題の影響を検討するとともに、毒性タンパク質発現の永続的な抑制による治療法の、安全性と有効性を証明し、治療法のない難治性てんかん性脳症であるDRPLAに対する新たな治療法の開発を目指すものである。この目的の達成のため、我々は、DRPLA Tgマウスモデルを用いて、DRPLAにおけるゲノム編集を介した遺伝子サイレンシングの治療効果を検討した。

ゲノム編集による遺伝子サイレンシング手法として、我々はCRISPR/Cas9を用いたCAGリピートの上流での二本鎖DNA切断を誘導と、非同末端結合(NHEJ)を介したフレームシフト変異挿入法を使用した。本手法を用いて樹立したモザイクTgマウスを観察することによって、モザイク状の遺伝子サイレンシングが、編集率に相関してDRPLA症状を軽減させることを見出した。さらに、病態出現後のモデルマウスにおいて、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた遺伝子編集による生存率と運動能力の改善、脳波異常の消失に伴うてんかん発作の大幅な減少が示された。この研究は、DRPLAにおける毒性タンパク質の伝播、非神経細胞由来の毒性メカニズムの意味を明らかにし、DRPLAに対する遺伝子編集治療戦略の応用に楽観的な見通しを与える。本研究は、モザイク遺伝子治療が単発性てんかん性脳症の有効な治療法であることを初めて報告したものである。

方法

【受精卵ゲノム編集とモザイクマウスの遺伝子解析】

動物の飼育および実験はすべて新潟大学動物実験指針に準拠して実施し、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得た。受精卵ゲノム編集は、*in vitro* transcriptionによって調製したCas9 mRNAと合成gRNAを電子穿孔法によって導入することによって行った。本解析には129 CAGリピートTgマウスを用いた(Q129)。ゲノム編集操作を受けた受精卵より得られた個体に挿入された変異の塩基配列は、抽出DNAを鋳型にPCR増幅したampliconをTAクローニングした後に、各個体由来クローンを50~100

個、サンガーシーケンスによって配列決定することによって解析した。

【イムノブロットング】

マウス脳組織をSDS lysis bufferを用いて超音波処理によって破碎し、タンパク質抽出を行った。遠心処理の後、回収した上清のタンパク質濃度を決定し、SDS泳動用サンプルを調製した。タンパク質をアクリルアミドゲルによって分離後、PVDF膜に転写し、メンブレン上のタンパク質を抗原抗体反応によって検出した。1次抗体には、抗ATN1抗体(R&D systems, AF 6567)と抗 β -actin抗体(MBL, M177-3)を使用した。

【運動機能解析】

マウス運動機能をオープンフィールドテスト、ホームケージアクティビティテスト、そしてローターロッドテストによって評価した。

【ポリグルタミン封入体免疫組織染色】

マウスをホルマリン灌流法により固定した後、脳組織を採取、パラフィン包埋切片の作成を行った。Tgマウス神経細胞内に形成されるポリグルタミン封入体を、抗ポリグルタミン抗体(Sigma, MAB1574)と抗NeuN(全神経細胞マーカー; Millipore, ABN78)を用いた2重免疫染色によって検出・可視化した。得られた画像から、封入体陽性神経細胞率を算出した。

【AAVベクター】

Cas9/gRNA発現用AAVコンストラクトはpX601(addgene)プラスミドベクターを改変し作製した。具体的には、Cas9発現用プロモーターをElongation Factor 1 α (EF1 α)プロモーターに変換し、またCas9コーディング領域の3'末端下流領域にWPRE3配列を付加した。AAVセロタイプには、マウス血液脳関門を超えることができるPHP.eBを使用した⁶⁾。

【AAV投与とゲノム編集率の算出】

本解析には112 CAGリピートTgマウスを使用した(Q112)。AAVは 2×10^{12} vg/mouseの投与量で、表現型を呈した後の麻酔下の7週齢のTgマウスに眼窩後静脈より投与を行った。投与後12週齢で採取された脳組織よりゲノムDNAを回収し、ヒトATN1遺伝子編集率をdroplet digital PCRによって解析した。

【不随意運動発作定量】

DRPLA Tgマウスが呈するミオクロースス発作と強直間代発作の回数をビデオモニタリングによってカウンティングした。

【脳波解析】

DRPLA Tgマウスが呈する異常脳波を脳表電極によって検出し、その特性と発生回数について解析を行った。

【統計】

採取された数値データの統計学的解析は、IBM SPSS statistic version 22 (IBM corporation)を用いて行った。ガウス分布を持つ2群間の差は、両側t検定で評価した。ガウス分布のない2群間の比較データは、Mann-Whitney U検定で分析した。ガウス分布と等分散性の基準が満たされる3群以上の解析は、一元配置分散分析(ANOVA)や二元配置反復ANOVAなどのパラメトリック検定を使用して比較した。その後、データをBonferroni post hoc検定で分析し、グループ間の統計的有意差を検定した。不等分散を持つデータにSteel-Dwass検定を適用した。P<0.05を統計的な有意差水準として使用した。生存曲線は、survival Rパッケージのsurvdif関数を用いたlog-rank検定により評価した。

結果**【受精卵編集由来モザイクマウスは、編集効率に応じた表現型の低減を示す】**

DRPLA Tgマウス受精卵へのゲノム編集処理の結果、60~90%の体細胞のヒトATN1遺伝子にフレームシフト変異が挿入されたモザイクマウスが得られた。加えて、フレームシフト変異もしくは、インフレーム変異によって100%編集された完全編集マウスも同時に作出された。脳組織のイムノブロットング解析の結果、フレームシフト変異によって完全編集されたTgマウス脳内では変異ポリグルタミンATN1タンパク質の発現が完全に停止しており、またモザイクマウスでは、モザイク状態に応じた変異タンパク質の発現レベルの減少が確認された。行動学的解析の結果、非編集Tgマウスは、解析開始の6週齢からすでに運動失調と活動量の低下を示し、加齢とともにこれらの表現型は

増悪した。一方で、フレームシフト変異によって完全編集されたTgマウスは野生型マウスと同等の行動学的スコアを示し、正常型を呈していた。モザイクマウスの解析の結果、行動学的病態指標はゲノム編集効率に相関した改善を示した。さらに、寿命解析の結果、非編集Tgマウスは100日齢までに全頭が死亡したが、モザイクマウスにおいては、同様にゲノム編集効率に応じた寿命の延長が観察された(Fig. 1A)。これらの結果から、モザイク状のゲノム編集がDRPLAの病態抑制に有効であることが確認された。

脳内におけるポリグルタミンタンパク質封入体形成を免疫組織染色によって解析した結果、非編集Tgマウスではほぼ100%に近い神経細胞で封入体の形成が認められた。一方でフレームシフト変異完全編集Tgマウスにおいては、ポリグルタミンタンパク質封入体の完全な消失が確認された。モザイク編集Tgマウスでは、ほぼゲノム編集率と同等の、ポリグルタミンタンパク質陰性神経細胞の出現が確認され、この結果は、脳内において、ポリグルタミンATN1タンパク質が細胞間を伝搬しないことを示唆していた(Fig. 1B)。

【DRPLA Tgマウスの表現型は発症後のゲノム編集治療でも軽減可能である】

次に、DRPLA病態を発症した後のTgマウスに対してもゲノム編集法は治療効果を与えるかどうかの検討を行った。Tgマウスが、不随意運動(振戦)、運動失調、活動性の低下が明確となった7週齢のDRPLA Tgマウスに対して、ゲノム編集用AAVの投与を行い、その治療効果を検討した。AAV投与5週後の12週齢で脳組織を採取し、ゲノム編集効率を算出した結果、AAV投与を受けたDRPLA Tgマウス脳では、平均して30%のヒトATN1遺伝子にゲノム編集による変異が挿入されていた。また、AAV投与による発症後のゲノム編集治療で合ってもTgマウスの寿命は顕著に延長することが確認された(Fig. 1C)。

運動機能試験の結果、非治療Tgマウス群では、加齢とともに運動機能障害、活動性の低下が顕著に進行した一方で、AAV投与群では、こ

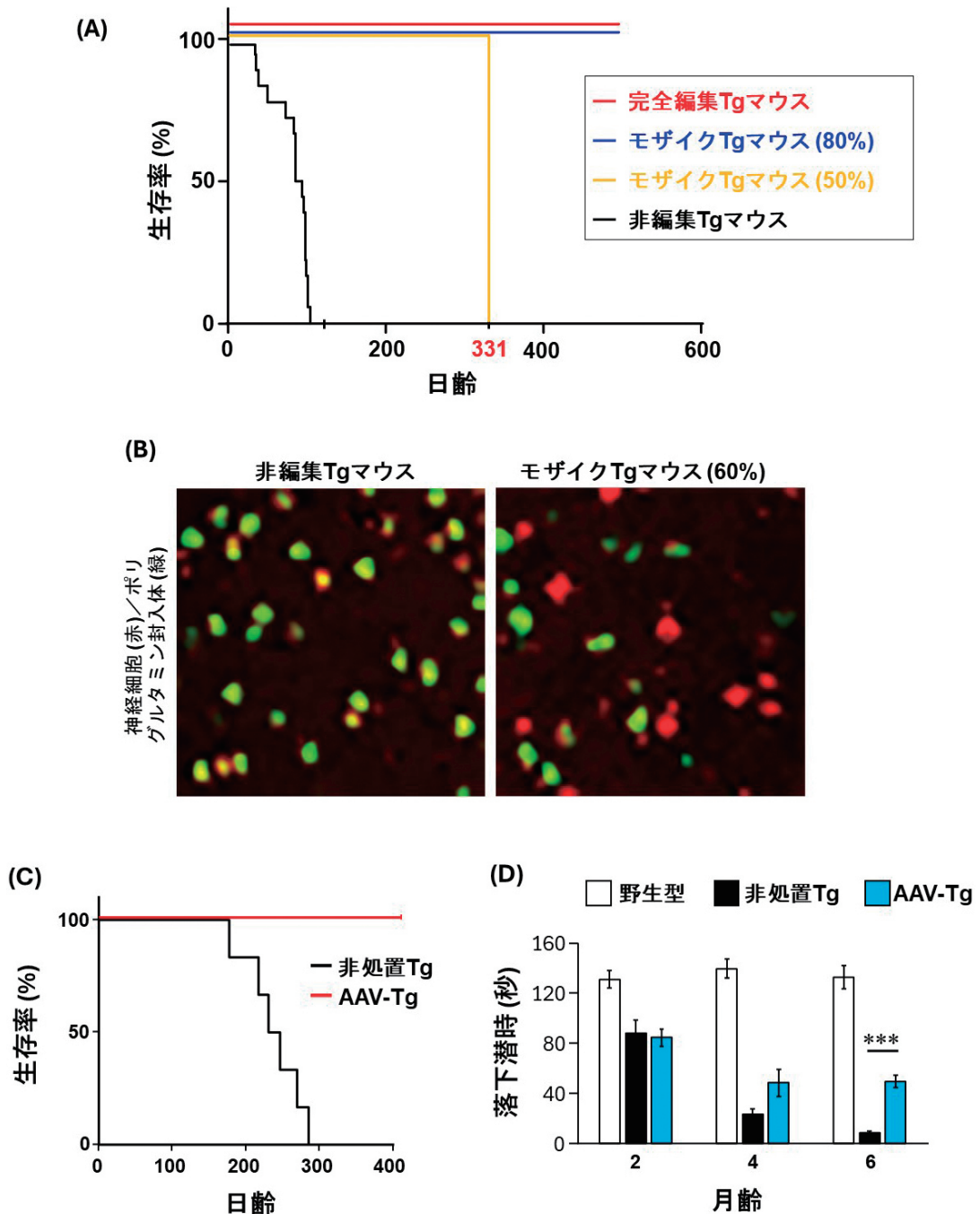


Fig. (A) モザイク Tgマウスの生存率観察結果。非編集 Tgマウスは100日齢までに全頭が死亡するが、モザイク率の上昇に相関して、Tgマウスの寿命の延長が観察された。(B) DRPLA Tgマウス受精卵ゲノム編集によって得られたモザイクマウス脳のポリグルタミン封入体免疫染色画像。非編集 Tgマウスでは全神経細胞に封入体の形成が認められ、完全編集マウスでは封入体が消失する。モザイクマウスではモザイク編集率に応じた封入体陰性細胞が観察される。(C) AAV投与による生体ゲノム編集による寿命延長効果。(D) AAV投与による生体ゲノム編集による運動失調表現型の改善。*** $p < 0.001$ 。

これらの病態表現型の進行が抑制され、長期間、一定の身体機能が維持された (Fig. 1D)。また、非治療 Tg マウス群では 25~30 週齢において自発性のてんかん発作が観察されたが、AAV 投与群では顕著にてんかん発作回数が減少していた。同時期に脳波測定による解析を行った結果、非治療 Tg マウスでは spike-and-wave discharges (SWD) と呼ばれる、てんかん関連脳波異常が観察されることを突き止めた。そして、AAV 投与によるゲノム編集治療によって、この SWD の発生が持続的かつ顕著に抑制されることを見出した。

ポリグルタミン封入体形成率を、寿命末期の Tg マウス脳で解析した結果、非治療 Tg マウスでは、ほぼ全て (95~98%) の神経細胞がポリグルタミン封入体陽性である一方で、AAV 投与 Tg マウス群においては平均で 25% のポリグルタミン封入体陰性神経細胞が観察され、これはゲノム編集によるフレームシフト変異挿入率とほぼ一致していた。興味深いことに、AAV 投与治療法の検討の基盤となった受精卵ゲノム編集によって得られた 100% フレームシフト変異挿入 Tg マウス、また AAV 投与 Tg マウスにおいても、ヒト *ATN1* mRNA 量の低下は観察されなかった。100% 編集マウスでは表現型が消失し、AAV においても治療効果が得られたという事実は、他の原因遺伝子変異に起因する別種のポリグルタミン病で指摘されている、CAG 伸長 mRNA 毒性は、DRPLA 病態の分子機序に寄与していない可能性が高いことを示していた。

以上の研究成果により、病態発症後ゲノム編集を用いた遺伝子サイレンシングによって、DRPLA の病態進行が抑制され、本戦略は有効な治療戦略となりうることが示された。

考察

本研究は、CAG リピートが伸長した、ヒト *ATN1* ゲノムをシングルコピー保有する DRPLA Tg マウスを用いて、ゲノム編集による遺伝子サイレンシングが DRPLA 症状を抑制できることを示し、生存率、表現型、病理所見は、編集効率とともに改善した。これらの結果から、

この DRPLA Tg マウスでは、非編集細胞が他の細胞に与える影響は限定的であることが示唆された。さらに、神経細胞の約 30% にゲノム編集を施すことによって、疾患発症後であっても、本モデルマウスの生存期間の延長と運動症状が改善を示した。特に、てんかん発作の抑制と脳波所見の改善は顕著であった。これらの研究結果は、ゲノム編集によってポリグルタミン ATN1 タンパク質の発現を停止させた細胞をモザイク状に誘導することによって、DRPLA の治療が可能であることを示している。

特に、モザイク状態のゲノム編集は、ミオクロヌス、跳躍発作、痙攣、脳波異常所見などの発作性運動症状を有意に改善した。若年発症型 DRPLA では難治性てんかんを合併し、DRPLA 患者は脳波検査で SWD を伴う脳波異常を呈することが示されている⁷⁾。我々は DRPLA Tg マウスも同様に、てんかん発作期に SWD が発生していることを見出した。さらにこの異常脳波が、約 20~30% の神経細胞をゲノム編集することにより、持続的に抑制され、発作性運動症状が劇的に軽減することを示した。てんかんは、興奮性ニューロン発火と抑制性ニューロン発火のアンバランスによる、同期したニューロンの過剰興奮から生じると考えられている⁸⁾。従って、モザイク状のゲノム編集操作によって、異常細胞と正常細胞の間に正常細胞が介在することで、異常な過剰興奮の同期が抑制することが、てんかん発作の発生を抑止している可能性が考えられる。この結果は、DRPLA の難治性てんかんの治療のみならず、他の遺伝性難治性てんかんの治療にも示唆を与えるものである。

DRPLA は、未だ治療法のない神経変性疾患である。若年性 DRPLA は治療抵抗性てんかんを合併する重篤な疾患であり、早期の寝たきり状態や合併症による死に至る。本研究では、DRPLA が発症後であっても、細胞の部分的ゲノム編集によって運動機能を維持し、発作や脳波所見を有意に改善できることを示した。さらに、過去の報告と併せて考えると、DRPLA は神経細胞死ではなく、可逆的な神経機能障害が主体であることが示唆される⁹⁾。これらの結果

は、DRPLAが進行した段階でも回復の可能性があることを示唆している。若年性DRPLAのような進行性で致死的な疾患では、治療の利点がゲノム編集のリスクを上回る可能性があり、AAV-PHP.eBのような血液脳関門を越えて、脳全般に感染可能なAAVを用いる手法は有望な治療手段となる。この研究で使用されたAAVセロタイプは、霊長類では血液脳関門を通過しない¹⁰⁾。霊長類の中枢神経系への導入効率に優れた、最近開発されたAAV.CAP-Macのようなデリバリー技術のさらなる開発が併せて期待される¹¹⁾。

参考文献

- 1) Silvia Prades, Claudio Melo de Gusmao, Silvia Grimaldi, Yael Shiloh-Malawsky, Thomas Felton, and Henry Houlden. DRPLA. GeneReviews. 1999 [updated 2023].
- 2) R Koide I, T Ikeuchi, O Onodera, H Tanaka, S Igarashi, K Endo, H et al., Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet.* 1994 : 9-13.
- 3) Toshiaki Takahashi, Shinichi Katada, Osamu Onodera. *olyglutamine diseases : where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going?* 2010 : *J Mol Cell Biol.* 180-91.
- 4) Toshiya Sato, Masami Miura, Mitsunori Yamada, Takayuki Yoshida, Jonathan D. Wood, Ikuru Yazawa et al., Severe neurological phenotypes of Q129 DRPLA transgenic mice serendipitously created by en masse expansion of CAG repeats in Q76 DRPLA mice. *Hum Mol Genet.* 2009 : 723-736.
- 5) Yiguo Shen, Gena Lee, Youngshik Choe, J Susie Zoltewicz, Andrew S Peterson. Functional architecture of atrophins. *J Biol Chem.* 2007 : 5037-5044.
- 6) Ken Y Chan, Min J Jang, Bryan B Yoo, Alon Greenbaum, Namita Ravi, Wei-Li Wu. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci.* 2017 : 1172-1179.
- 7) K Kobayashi, H Hata, M Oka, M Ito, H Yoshinaga, K Kashiwara, Y Ohtsuka. Age-related electrical status epilepticus during sleep and epileptic negative myoclonus in DRPLA. *Neurology.* 2006 : 772-3.
- 8) Christopher P Warren, Sanqing Hu, Matt Stead, Benjamin H Brinkmann, Mark R Bower, Gregory A Worrell. Synchrony in normal and focal epileptic brain : the seizure onset zone is functionally disconnected. *J Neurophysiol.* 2010 : 3530-9.
- 9) Yamada M. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) : The 50th Anniversary of Japanese Society of Neuropathology. *Neuropathology.* 2010 : 453-7.
- 10) Sophie N Mathiesen, Jasmine L Lock, Lucia Schoderboeck, Wickliffe C Abraham, Stephanie M Hughes. CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 : 447-458.
- 11) Miguel R Chuapoco, Nicholas C Flytzanis, Nick Goeden, J Christopher Octeau, Kristina M Roxas, Ken Y Chan et al., Adeno-associated viral vectors for functional intravenous gene transfer throughout the non-human primate brain. *Nat Nanotechnol.* 2023 : 1241-1251.