

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野研究成果展開事業

産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-MS)

(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer

ACceleration Transformative research for Medical innovation (ACT-MS)

研究開発課題名：(日本語) 中枢神経症状を伴うライソゾーム病に対する遺伝子治療法開発

(英語) Development of gene therapy for lysosomal diseases involving neurological symptoms

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 大学院医歯薬学研究部 教授 伊藤 孝司

所属 役職 氏名：(英語) Tokushima University, Graduate School of Biomedical Sciences, Professor, Kohji Itoh

実施期間：平成 28 年 10 月 19 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) テイ-サックス病遺伝子治療用ベクターの開発と非臨床試験 (安全性評価)

開発課題名：(英語) Development of AAV vectors for Tay-Sachs disease and preclinical study for safety evaluation

研究開発分担者 (日本語) 学校法人自治医科大学 医学部 内科学講座 神経内科学部門 教授 村松 慎一

所属 役職 氏名：(英語) Jichi Medical University, Division of Neurology, Professor, Shin-ichi Muramatsu

分担研究 (日本語) テイ-サックス病患者 iPS 細胞由来神経系細胞に対する AAV ベクターの有効性評価

開発課題名：(英語) Efficacy evaluation of AAV vectors for neural cells induced from iPS cell line derived from Tay-Sachs disease patient

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 大学院医歯薬学研究部 助教 辻 大輔

所属 役職 氏名：(英語) Tokushima University, Graduate School of Biomedical Sciences,

成果の概要（総括研究報告）

リソソーム性 β -ヘキソサミニダーゼ A (HexA, $\alpha\beta$ 二量体) 欠損症で、未だ治療法が確立されていない、テイ-サックス病及びサンドホッフ病患者に対し、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いる新規遺伝子治療法を開発する目的で研究を進めた。既に代表者の伊藤 (徳島大院薬) は、改変ヒト Hex β 鎖遺伝子を恒常高発現する CHO 細胞株から精製した組換え改変型 HexB (改変 β 鎖ホモ二量体) を、サンドホッフ病モデル (SD) マウスの脳室内に投与することにより、その運動機能を改善し、寿命を延長させることを明らかにしている。平成 28 年度は、分担者の村松 (自治医科大) との共同で、改変ヒト Hex β 鎖遺伝子を搭載する AAV ベクター (AAV-*modHEXB*) を構築した。また AAV-*modHEXB* を SD 成体マウスの脳室 (脳脊髄液) 内に一回投与することにより、遺伝子産物である改変型ヒト HexB が各脳実質領域に広く分布し、ヒト HexB が存在する神経系細胞では、蓄積した GM2 ガングリオシド (GM2) が減少することが明らかになった。

分担者の辻 (徳島大院薬) は、テイ-サックス病患者 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導条件を確立した。またゲノム編集によりヒト *HEXB* をノックアウトし、HexA 活性が欠損したヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 株を樹立し、レチノイン酸処理による神経細胞への分化誘導系を構築した。これらの疾患ヒト神経細胞培養モデル系に対して AAV-*modHEXB* を投与すると、神経細胞内での欠損 HexA 活性が回復し、蓄積 GM2 が減少することを示した。これらの結果から、改変ヒト Hex β 鎖遺伝子を搭載した AAV-*modHEXB* は、HexA 欠損症モデルに対して治療効果を示すことが示唆され、その有効性に関する POC の一部を取得することができた。

成果の概要（英文）

We have been studying to develop a novel gene therapy by utilizing adeno-associated virus (AAV) vector for lysosomal β -hexosaminidase A (HexA, $\alpha\beta$ heterodimer) deficiencies, including Tay-Sachs disease and Sandhoff disease, of which treatments are not established at present. Dr. K. Itoh (Tokushima Univ.), as the research representative of this program, had already demonstrated that the human modified HexB (homodimeric modified Hex β subunits), purified from the conditioned medium of the CHO cell line overexpressing modified *HEXB* encoding the with partial α -type amino acid substitutions, has therapeutic effects on improvement of motor function and prolongation of life spans of Sandhoff disease model (SD) mice when administered intracerebroventricularly (*icv*). In this program (2016 fiscal year) we constructed the AAV-*modHEXB*, which expresses the human modified *HEXB*, in collaboration with Dr. S. Muramatsu (Jichi Medical Univ.). The AAV-*modHEXB* was found to produce the human modified HexB in the organs of the SD mice after *icv* injection. The expression distributed not only throughout the brain but also peripheral organs, such as heart, liver, spleen, etc. The modified HexB incorporated by neuronal cells of SD mice also reduced the GM2 gangliosides (GM2) accumulated in the neuronal cells.

Dr. D. Tsuji (a member of Tokushima Univ.) established the conditions for the neural induction from the iPS cell line derived from the fibroblasts of a patient with Tay-Sachs disease. He also succeeded in establishing the

HEXB gene knockout human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line, which could be differentiated into neuronal cells by retinoic acid treatment. The AAV-*modHEXB* was demonstrated to restore the Hex activities and reduce the GM2 accumulated in these human neural cells with HexA deficiency when administered to the culture medium. These findings suggested that the AAV-*modHEXB* encoding the human modified Hex β subunit has therapeutic effects on the murine and human disease models with HexA deficiency (GM2 gangliosidosis). Thus, we partially acquired the proof of concept (POC) for the effectiveness of *in vivo* gene therapy by utilizing the AAV-*modHEXB* in the current year.

II. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国際誌 4 件)

研究開発代表者 伊藤孝司 (徳島大院薬), 研究開発分担者 辻大輔 (徳島大院薬)

1. FcR γ -dependent immune activation initiates astrogliosis during the asymptomatic phase of Sandhoff disease model mice. Ogawa Y, Sano T, Irisa M, Kodama T, Saito T, Furusawa E, Kaizu K, Yanagi Y, Tsukimura T, Togawa T, Yamanaka S, Itoh K, Sakuraba H, *Oishi K. *Sci Rep* 7, 40518, 2017.
2. Enhancement of uridine diphosphate-induced production of macrophage inflammatory protein-1 alpha in microglia derived from Sandhoff disease model mice. Kawashita E, Tsuji D, Kanno Y, Tsuchida K, *Itoh K. *J Inher Metab Dis Rep* 28, 85-93, 2016.
3. Combined replacement effects of human modified β -hexosaminidase B and GM2 activator protein on GM2 gangliosidosis fibroblasts. Kitakaze K, Tasaki C, Tajima Y, Hirokawa T, Tsuji D, Sakuraba H, *Itoh K. *Biochem Biophys Rep* 7, 157-163, 2016.
4. Tailored synthesis of 162-residue S-mono glycosylated GM2-activator protein (GM2AP) analogues that allows access to protein library. Nakamura T, Sato K, Naruse N, Kitakaze K, Inokuma T, Hirokawa T, Akira Shigenaga A, Itoh K, *Otaka A *ChemBioChem* 17, 1986-1992, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

研究開発代表者: 伊藤孝司 (徳島大院薬)、研究開発分担者: 辻大輔 (徳島大院薬) (国内口頭発表 3 件)

1. 渡邊綾佑, 辻大輔, 田中裕大, 宇野マイケル新太郎, 伊藤孝司: Tay-Sachs 病患者 iPS 細胞由来神経細胞を用いた分子病態解析と治療薬の開発, 日本薬学会第 137 年会(仙台), 口頭, 2017 年 3 月.
2. 宇野マイケル新太郎, 辻大輔, 田中裕大, 渡邊綾佑, Spampamoto CARMINE, Ballabio ANDREA, 伊藤孝司: Sandhoff 病モデルマウス脳内の神経細胞死に対するリソソーム制御因子 Tfeb の役割, 日本薬学会第 137 年会(仙台), 口頭, 2017 年 3 月.
3. 田中裕大, 辻大輔, 本窪田絢加, 山口沙恵香, 渡邊綾佑, 宇野マイケル新太郎, 杉崎圭, 辻大輔, 伊藤孝司: リソソーム病におけるオートリソソーム形成異常メカニズムの解明, 日本薬学会第 137 年会(仙台), 口頭, 2017 年 3 月.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. **Kohji Itoh**: Molecular pathogenesis and molecular therapy for GM2 gangliosidoses. Short course on gangliosphingolipidoses, Special lecture. Dept. of Medical Biotechnology and Translational Medicine. University of Milan, LITA-Segrate. Feb. 10th ~27th, 2017, Milan, Italy.

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-MS)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology
Transfer
ACceleration Transformative research for Medical innovation (ACT-MS)

研究開発課題名：(日本語) 中枢神経症状を伴うライソゾーム病に対する遺伝子治療法開発
(英語) Development of gene therapy for lysosomal diseases involving
neurological symptoms

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 大学院医歯薬学研究部 教授 伊藤 孝司
所属 役職 氏名：(英語) Tokushima University, Graduate School of Biomedical Sciences,
Professor, Kohji Itoh

実施期間：平成 28 年 10 月 19 日～平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) テイ-サックス病遺伝子治療用ベクターの開発と非臨床試験 (安全性評価)
開発課題名：(英語) Development of AAV vectors for Tay-Sachs disease and preclinical
study for safety evaluation

研究開発分担者 (日本語) 医学部 内科学講座 神経内科学部門 教授 村松 慎一
所属 役職 氏名：(英語) Division of Neurology, Professor, Shin-ichi Muramatsu

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者 (課題リーダー)：伊藤 孝司 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国際誌 1 件)

1. Sehara, Y., Fujimoto, K., Katakai, Y., Ono, F., Takino, N., Ito, M., Ozawa, K., Muramatsu, S.: Persistent Expression of Dopamine-Synthesizing Enzymes 15 Years after Gene Transfer in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev. in press.*

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表（国際学会口頭発表 1 件）

1. Muramatsu S: Gene therapy for neurodegenerative diseases. (Oral), European Society of Gene & Therapy, October 19, 2016, Florence.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし