

# 高頻度逆行性遺伝子導入による神経疾患治療技術の開発

福島県立医科大学 医学部 生体機能研究部門  
小林 和人

## 1. はじめに

パーキンソン病や運動ニューロン疾患は、特定の神経細胞の変性・脱落に起因する神経変性疾患である。これらの疾患の発病の原因となる一部の遺伝子の同定は進んできたが、神経細胞の変性を防止する根本的な治療法の確立には至っていない。この目的のために、疾患の原因遺伝子を補償する、あるいは、特定の神経細胞の生存を促進し、細胞死を防止することを目的とした遺伝子治療法の開発が強く求められている。我々のグループは、神経終末から導入され、遠方に存在する細胞体へ遺伝子を導入し、高頻度および神経細胞特異的な逆行性遺伝子導入 (HiRet/NeuRet) を示すレンチウイルスベクターを開発した (Kato et al., 2011a-d, 2013a, b)。これらのベクターは、狂犬病ウイルス糖タンパク質 (RV-G) と水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-G) の一部から構成される融合糖タンパク質をベクターのエンベロープとして利用する。パーキンソン病の標的となる中脳黒質ドーパミンニューロンへは線条体への注入により、運動ニューロンへは筋肉にベクターを注入することにより導入が可能となると考えられる。本研究では、疾患動物モデルを利用した遺伝子治療モデル実験の第一段階として、HiRet/NeuRet ベクターによって疾患の対象となる黒質線条体ドーパミン系及び運動ニューロンへの逆行性遺伝子導入が可能かどうかについて検討した。

## 2. 方法

HiRet ベクターは、RV-G の細胞外・膜貫通ドメインと VSV-G の細胞内ドメインから構成される融合糖タンパク質 B 型 (FuG-B) を利用し、高頻度の逆行性遺伝子導入を可能とする (Kato et al., 2011a, b)。また、NeuRet ベクターは、RV-G の細胞外ドメイン N 末端領域と VSV-G の細胞外領域 C 末端領域と膜貫通・細胞内ドメインから構成される融合糖タンパク質 C 型 (FuG-C) を利用し、高頻度の逆行性遺伝子導入を示すばかりでなく、注入部位におけるグリア細胞への導入が著明に抑制される (Kato et al., 2011c)。これらのベクターを作製するために、上記の FuG-B、FuG-C、またコントロールとして RV-G を発現するエンベローププラスミド、導入遺伝子として GFP をコードするトランスポーズプラスミド、パッケージングプラスミドを混合し、リン酸カルシウム法を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした。培養液を集め、遠心分離によってベクター粒子を回収し、適当な量の PBS に溶解した。脳内への注入のためには、ベクター溶液をイオン交換カラムクロマトグラフィにかけ、0-1.5M NaCl 勾配を用いて溶出し、さらに溶出液を限外濾過により濃縮した。ベクター力価の測定のために、定量的 RT-PCR 法を用いて、RNA 力価を求めた。

運動ニューロンへの逆行性遺伝子導入のために、マウスの下肢の腓腹筋 (5.0  $\mu$ l/site x 6 sites) あるいは舌筋 (2.0  $\mu$ l/site x 4 sites) にベクター溶液を、ハミルトンシリンジを介して注入した。4 週間後、運動ニューロンへの遺伝子導入を調べるために、脊髄あるいは後脳の切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行った。コリン作動性ニューロンへの導入を確認するために、コリンアセチル転移酵素 (ChAT) と GFP の二重免疫染色を行った。また、黒質線条体ドーパミン系への逆行性遺伝子導入のために、ラットの線条体 (1.0

$\mu\text{l}/\text{site} \times 2 \text{ sites}$ )へガラスキャピラリーを介してベクター溶液を注入した。4週間後、中脳の切片を作製し、抗GFP抗体を用いた免疫染色を行った。ドーパミン作動性ニューロンへの導入を確認するために、チロシン水酸化酵素 (TH) と GFP の二重免疫染色を行った。

### 3. 結果

第一に、運動ニューロンへの逆行性遺伝子導入が可能かどうか、また、HiRet と NeuRet ベクターの導入効率を比較するために、GFP を導入遺伝子とする両者のベクター(コントロールとして RV-Gベクターを利用)を作製し、マウスの下肢の腓腹筋にベクター溶液 ( $5.0 \times 10^{11}$  copies/ml) を注入し、脊髄運動ニューロンへの遺伝子導入を解析した。HiRet ベクターを注入した場合、脊髄に多数のGFP陽性細胞が観察されたが、NeuRet あるいは RV-G ベクターを注入した場合は、陽性細胞は少数であった。これらの陽性細胞は、ChAT 陽性でありコリン作動性の運動ニューロンであることが確認できた。脊髄の GFP 陽性細胞数をカウントした結果、HiRet ベクターによる導入効率は、RV-G ベクターの約 4.6 倍であることが判明し、NeuRet ベクターは RV-G ベクターとほぼ同等の導入効率であった。同様に、後脳運動ニューロンへの遺伝子導入効率を解析するために、ベクター溶液をマウス舌筋へ注入し、後脳舌下神経核への遺伝子導入を解析した。HiRet ベクターを注入した場合、舌下神経核に多数のGFP陽性細胞が観察されたが、NeuRet あるいは RV-G ベクターを注入した場合は、少数の陽性細胞が観察された。これらの陽性細胞は、ChAT 陽性でありコリン作動性の運動ニューロンであった。舌下神経核のGFP陽性細胞数のカウントの結果、HiRet ベクターによる導入効率は、RV-Gベクターの約 15 倍であり、NeuRet ベクターは RV-G ベクターの 2 倍程度であった。以上の結果から、HiRet ベクターは、筋肉注射後の脊髄および後脳運動ニューロンへの逆行性遺伝子導入について最も高い効率を示すことが明らかとなった (Hirano et al., 2013)。

黒質線条体ドーパミンニューロンへの逆行性遺伝子導入については、HiRet/NeuRet ベクターともに霊長類モデルの本経路には高い導入効率を示したが、マウスの経路への効率は著しく低いことが知られていた (Kato et al., 2011a, c)。げっ歯類モデルへの効率を向上させることは、逆行性遺伝子導入によるパーキンソン病遺伝子治療のモデル研究を幅広く進めるために有益である。このため、今回はラットをモデルとして、その黒質線条体ドーパミンニューロンへの逆行性遺伝子導入について検討した。ラットの線条体に NeuRet ベクター溶液 ( $5.0 \times 10^{11}$  copies/ml) を注入し、中脳の切片を作製し、抗GFP抗体を用いた免疫染色を行った。マウスと比較して、ラットでは黒質緻密部により多数の陽性細胞が観察され、それらはTH陽性のドーパミンニューロンであることが確認された。この結果は、NeuRet ベクターは、マウスよりもラットの黒質線条体系への遺伝子導入効率が高く、ラットは本ベクターを用いた逆行性遺伝子導入によりパーキンソン病に対する遺伝子治療モデル実験を行うために好適なことが示された。

### 4. 考察

本研究において、神経疾患の遺伝子治療モデル実験の対象となる神経細胞への逆行性遺伝子導入を行う実験系の開発に取り組んだ。第一に、運動ニューロンへの遺伝子導入には、HiRet ベクターが他のベクター系に比較して格段に高い導入効率を持つことが明らかとなった。第二に、黒質線条体ドーパミンニューロンへの遺伝子導入には、マウスよりもラットを使った方が、より導入効率の高い実験が行えることが判明した。これらの結果から、今後、HiRet/NeuRet ベクターを利用し、神経細胞の生存を促進する、あるいは、神経細胞死を抑制する遺伝子を導入遺伝子として用いることによって、パーキンソン病あるいは運動ニューロン疾患モデル動物に対して遺伝子治療実験を施し、その効果を検証することが可能となる。

## 5. 発表論文、参考文献

1. Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Kuramochi, M., Okada, T., Yaginuma, H., Morimoto, K., Shimada, T., Takada, M., and Kobayashi, K. (2011a) A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 22 (2) 197-206.
2. Kato, S., Kuramochi, M., Kobayashi, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima M., Watanabe, M., Tsutsui, Y., and Kobayashi, K. (2011b) Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. *J. Neurosci.* 31 (47) 17169-17179.
3. Kato, S., Kuramochi, M., Takasumi, K., Kobayashi, K., Inoue, K., Takahara, D., Hitoshi, S., Ikekana, K., Shimada, T., Takada, M., and Kobayashi, K. (2011c) Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 22 (12) 1511-1523.
4. Kato, S., Kobayashi, K., Kuramochi, M., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K. (2011d) Highly efficient retrograde gene transfer for genetic treatment of neurological diseases. In *Viral Gene Therapy* (ed. Xu, K.) Chapter 17, InTech, Rijeka, pp.371-380.
5. Kato, S., Kobayashi, K., and Kobayashi, K. (2013a) Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific neural pathways. *Rev. Neurosci.* 24 (1) 1-8.
6. Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K. (2013b) Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases. In *Gene Therapy -Tools and Potential Applications*, (ed. Molina, F.M.) Chapter 15, InTech, Rijeka, pp.387-398
7. Hirano, M., Kato, S., Kobayashi, K., Okada, T., Yaginuma, H., and Kobayashi, K. (2013) Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein. *PLoS One* 8(9): e75896.