

日本財団補助金による

1997年度日中医学協力事業助成報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

1998 年 3 月 5 日

I. 招へい責任者 中野 今治 
所属機関 自治医科大学 神経内科 職名 教授
所在地 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311 電話 0285-44-2111
(内) 3521
招へい研究者氏名 樊 東昇
所属機関 自治医科大学 神経内科
職 名 自治医科大学 研究生
研 究 テ ー マ パーキンソン病の遺伝子治療の基礎的研究

II. 日本滞在日程

平成9年5月17日 ~ 平成10年3月31日



(右) 樊東昇先生



(左) 樊東昇先生

自治医科大学研究生樊東昇報告書（1997/5/17～1998/3/31）

パーキンソン病は中脳黒質のドーパミン神経細胞の消失と線条体のドーパミン減少を特徴とする原因不明の神経変性疾患である。対症療法としてL-dopa内服による補充療法が一般に行われている。しかし、L-dopa内服治療も長期的には薬効の減弱や精神症状等の副作用がみられるなど多くの問題を抱えている。新しい治療法として遺伝子治療の開発が期待されている。

研究生、樊東昇は線条体におけるドーパミン量を効率よく回復させるための遺伝子（カテコールアミン関連酵素遺伝子など）の開発を行った。既にカテコールアミン関連酵素のチロシン水酸化酵素や芳香族アミノ酸脱炭酸酵素遺伝子を培養神経細胞やパーキンソン病モデルラット脳に導入する実験を行っており、さらに他の酵素遺伝子も使用して最も有効性の高い遺伝子治療プロトコルを策定する基礎的な実験を行った。以下箇条書きにまとめると、

1. 今回遺伝子治療にはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた。AAVベクターは神経細胞のような非分裂細胞にも遺伝子導入が可能でありまた病原性がないために脳内に遺伝子を導入するには適したベクターである。
2. 導入する遺伝子はドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)と芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)とTHのcofactorであるtetrahydrobiopterin合成の律速酵素であるGTP cyclohydrolase 1 (GTPCH1)である。これまでのパーキンソン病遺伝子治療実験はTH遺伝子を使ったものがほとんどである。TH遺伝子とAADC遺伝子を組み合わせることによって治療効果が増すことは既に我々が報告済みである。今回は三つのドーパミン合成系の酵素遺伝子を導入することによりさらに治療効果が高めることが可能と考えられる。この三つの遺伝子を導入する試みは行われておらず独創的な点である。AAVベクターは重複感染が可能であり三つのベクターを使って3種類の遺伝子の導入は可能である。上記の遺伝子を組み込んだAAVベクターを培養細胞に導入し、生化学的にドーパミン合成量を測定し、最終的には組織で導入した遺伝子が働いていることを確認した。
3. さらに神経栄養因子の一種であるGDNF遺伝子を使いAAV-ベクターを作製し、黒質培養細胞にGDNF遺伝子を導入しTH陽性細胞の生存維持および神経突起伸長作用について確認した。

研究発表は日本遺伝子治療学会、日本神経学会総会、神経組織の成長再生移植研究会、Neuroscience Meeting等で発表した。

原著論文をHuman Gene Therapyに投稿中であり、Neuroscience letterでは印刷中である。

研究生樊東昇の一年間の研究は実り多いものであった。

パーキンソン病モデルラットに対する遺伝子治療

Gene therapy of a rodent model of Parkinson's disease

樊 東昇^{1,2}、小川松夫¹、池口邦彦¹、藤本健一¹、静間奈美¹、中野今治¹、小澤敬也²
1自治医科大学神経内科、2同分子生物学

D. Fan^{1,2}, M. Ogawa¹, K. Ikeguchi¹, K. Fujimoto¹, N. Shizuma¹, I. Nakano¹, K. Ozawa²
1Dept. of Neurology and 2Dept. of Molecular Biology, Jichi Medical School

[目的]

パーキンソン病の治療はL-dopaの補充療法が主に行われているが、胎児中脳の細胞を移植する治療法が開発され実際に臨床応用されてきている。近年遺伝子工学の進歩により遺伝子治療という新しい治療法が開発され、神経疾患に対する遺伝子治療の試みも動物実験レベルで始められている。パーキンソン病に対する遺伝子治療の導入遺伝子としてはdopamine生合成系の律速酵素であるtyrosine hydroxylase(TH)の遺伝子が使われてきた。しかし、THのみではL-dopaは合成されるがdopamineは生合成されない。L-dopaからdopamineを生合成するにはaromatic L-amino acid decarboxylase(AADC)が必要である。TH遺伝子とAADC遺伝子を一緒に導入することによりdopamineの生合成が増し、治療効果増大が期待できる。そこで我々はTHとAADCの二種類の遺伝子を同時に導入する実験を行った。また、神経系への遺伝子導入法は体外の細胞に遺伝子を導入しそれを脳内に移植する方法と、脳内細胞に直接遺伝子を導入する二つの方法がある。我々は脳内に直接遺伝子を導入する方法を取った。

遺伝子導入ではどのウイルスベクターを使うかが大きな問題である。現在遺伝子治療実験には主にレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の3種類が使われている。レトロウイルスベクターは非分裂細胞への遺伝子導入が不可能であり、アデノウイルスベクターには病原性があるため、我々は非分裂細胞への導入が可能で病原性もないAAVベクターを使用した。しかし、AAVベクターは大きな遺伝子を導入できない。そこで、今回の実験では二つの遺伝子から別々のベクターを作り、同時に導入する実験を行い、同一細胞に二つの遺伝子導入が可能であるのかも確認した。

[方法]

(1)TH遺伝子、AADC遺伝子のAAVベクター作製：TH遺伝子あるいはAADC遺伝子を組み込んだベクタープラスミドとヘルパープラスミドを293細胞にtransfectionし、さらにアデノウイルスのAAVに対するヘルパー領域の遺伝子をプラスミドにしてtransfectionしAAVベクターを作った(TH遺伝子のAAVベクターをAAV-TH、AADC遺伝子のAAVベクターをAAV-AADCとする)。AAV-THとAAV-AADCの単独あるいは両者を用いて293細胞へ遺伝子を導入し、ウエスタンブロットによりTHとAADCの発現を確認した。

(2)パーキンソン病モデルラットへの遺伝子導入：一側のmedial forebrain bundleに6-hydroxydopamineをステレオ装置下に注入し、一側の黒質線条体ドーパミン系を破壊してパーキンソン病モデルラットを作った。このモデルラットにはアポモルフィンの投与により回転運動を惹起することが可能である。回転運動を起こしたラットの障害側線条体にベクターを注入した。ベクター注入前後でアポモルフィンを投与して回転運動を惹起し、回転運動をしているラットをビデオにとり、単位時間当たりの回転数を数え治療効果を判定した。ラットは注入したベクターにより5群に分けた。内訳はAAV-TH単独群、AAV-AADC単独群、AAV-THとAAV-AADCの併用群、対照としてAAV-LacZ群とPBS注入群である。

(3)組織学的検討：回転運動の評価後、ラットをパラホルムアルデヒドで灌流固定後、クリオスタットにて10 μ mの切片を作った。抗TH抗体と抗AADC抗体を用いた蛍光二重染色によりTH陽性細胞とAADC陽性細胞を確認した。

[結果]

(1)AAV-THとAAV-AADCの単独あるいは両者を用いて293細胞に遺伝子導入し、ウエスタンブロットによりTHとAADCの発現を確認した。

(2)パーキンソン病モデルラットに遺伝子を導入したときの治療効果をアポモルフィンによる回転運動で比較したところ、AAV-TH単独より、AAV-THとAAV-AADCの併用の方が治療効果が大きいことが分かり、この二群間には有意差があった。AAV-AADC単独では効果無く、AAV-LacZやPBS注入群でも効果はなかった。

(3)蛍光二重染色の結果から、TH陽性細胞の多くがAADC陽性であった。また陽性細胞は形態からほとんどが神経細胞と判断した。

[考察]

1994年にMatthewらによりTH遺伝子がパーキンソン病モデルラットの線条体に導入され、この手法が本症の治療法

としての可能性が示されてから1)、パーキンソン病の遺伝子治療実験が注目を集めてきた。当初使われたベクターはヘルペスウイルスベクターであったが、ヘルペスウイルスは病原性の問題から、臨床的には使用不可能である。その後、AAVベクターを使用したパーキンソン病治療実験も行われてきたが導入する遺伝子はTHだけであった2)。

今回の実験はTHとAADCの二種類の遺伝子を同時に導入する実験を行ったが、培養細胞、パーキンソン病モデルラットへの遺伝子導入実験でTH遺伝子単独よりもTH遺伝子とAADC遺伝子を同時に導入した方がより効果的であることが確認できた。また、免疫染色から神経細胞にTH遺伝子とAADC遺伝子の両者がAAVベクターによって導入可能であることが確認された。パーキンソン病の遺伝子治療実験は始まったばかりであり、今後更に基礎的実験と治療効果を高める工夫が必要である。

[文献]

- 1) Matthew JD, et al:Science 266:1399-1403,1994
- 2) Michael GK, et al:Nature Genetics 8:148-154,1994

以上を Human Gene Therapy に投稿中である。

樊 東昇

アデノ随伴ウイルスベクターを用いた培養神経細胞へのGDNF遺伝子導入によるTH陽性細胞の生存維持および神経突起伸長作用について

Dong-sheng Fan^{1, 2)}、中野今治¹⁾、小川松夫¹⁾、池口邦彦¹⁾、藤本健一¹⁾、村松慎一¹⁾、小澤敬也²⁾、小笠原洋治²⁾、卜部匡司²⁾、久米晃啓²⁾、一ノ瀬宏³⁾、永津俊治³⁾、Gary J. Kurtzman⁴⁾

- 1)自治医科大学神経内科、
- 2)血液医学研究部門分子生物学
- 3)藤田保健衛生大学総合医科学研究所神経科学
- 4)Avigen, Inc.

はじめに

パーキンソン病に対する遺伝子治療の試みが動物実験レベルで盛んに行われている。パーキンソン病に対する遺伝子治療の導入遺伝子としてはdopamine生合成系の律速酵素であるtyrosine hydroxylase(TH)の遺伝子が使われてきた。しかし、THのみではL-dopaは合成されるがdopamineは合成されない。L-dopaからdopamineを生合成するにはaromatic L-amino acid decarboxylase(AADC)が必要である。TH遺伝子とAADC遺伝子を一緒に導入することによりdopamineの生合成が増し、治療効果増大が期待できる。昨年の本研究会で我々はTHとAADCの二種類の遺伝子を同時に導入する実験の結果を報告した。遺伝子導入ではどのウイルスベクターを使うかが大きな問題である。我々は非分裂細胞への導入が可能で病原性もないAAVベクターを使用してきた。しかし、AAVベクターは大きな遺伝子を導入できない。前回、二つの遺伝子から別々のAAVベクターを作り、同時に導入する実験を行い、同一細胞に二つの遺伝子導入が可能であることも報告した。

パーキンソン病に対する遺伝子治療はドーパミン生合成酵素遺伝子を導入する方法とドーパミン神経細胞の生存維持に関係する神経栄養因子遺伝子を導入する方法の二つが現在考えられている。神経栄養因子のなかでもドーパミン神経細胞に効果が期待されているのはneurotrophin family (BDNF, NT-3, NT-4/5), ciliary neurotrophic factor, mitogenic growth factors (FGF, EGF, IGF), TGF, PDGF, IL-6, GDNFなどがある¹⁾。GDNFはドーパミン神経細胞と運動神経細胞に対して生存維持作用が報告されている神経栄養因子である。GDNFはドーパミン神経細胞に対する効果が大きく最近、大変注目されている。我々は今回GDNF遺伝子を培養細胞に導入しドーパミン神経細胞に対する効果を確認したので報告する。

方法

(1)GDNF遺伝子のAAVベクター作製：

GDNF遺伝子を組み込んだベクタープラスミドとヘルパープラスミドを293細胞にtransfectionし、さらにアデノウイルスのAAVに対するヘルパー領域の遺伝子をプラスミドにしてtransfectionしAAVベクターを作った(AAV-GDNFとする)。AAV-GDNFを用いて293細胞へ遺伝子を導入し、ウエスタンブロットによりGDNFの発現を確認した。

(2)培養神経細胞へのGDNF遺伝子導入：

胎生14日目のウィスターラット胎児の中脳腹側を取り出し培養した。培養開始2時間後から培地を完全無血清にした。培養開始24時間後に培地にmock, AAV-GDNF, AAV-LacZおよびrecombinant human GDNF(rhGDNF)を添加した。添加24時間後に培地を無血清培地に変更し、その後は無血清培地で培養を続けた。rhGDNF添加群は引き続き固定するまでrhGDNFを添加した培地で培養を続けた。

(3)組織学的検討：

培養開始1週と2週後にパラホルムアルデヒドにて固定し、抗TH抗体を用いABC法にて免疫染色を行った。各培養皿のTH陽性細胞数を数え、単位面積あたりの陽性細胞数を計算した。また、TH陽性細胞の神経突起の長さについても検討した。

結果

単位面積あたりのTH陽性細胞数を数えると、培養1週後ではrhGDNFとAAV-GDNF添加群がmock及びAAV-LacZ添加群と比較してTH陽性細胞数は有意に多かった。培養2週後には無血清培地であるためどの群でもTH陽性細胞数が減少していた。しかし、2週目でもrhGDNFとAAV-GDNF添加群は他の群と比較して有意にTH陽性細胞が多く残存していた。

mockを添加した培養皿の抗TH抗体陽性神経細胞とAAV-GDNFを添加した培養皿の抗TH抗体陽性細胞を比較すると、AAV-GDNFを添加した方が神経細胞体が大きかった。さらに、神経突起を観察するとAAV-GDNFを添加した培養皿の神経突起の方が著明に伸長していた。

考察

パーキンソン病脳の分析から、黒質のドーパミン神経細胞の変性脱落がおり、線条体のドーパミン減少によりパーキンソン病の様々な症状が起こることが確認されている。また、L-DOPAの内服治療が確立している。そこで我々はドーパミン生合成酵素遺伝子を組み込んだベクターを線条体に注入し遺伝子を発現させ、線条体でのドーパミンを増やす実験を行ってきた。

神経栄養因子を使ったパーキンソン病の治療は変性していくドーパミン神経細胞を守ろうとするものである。前述の

ように、GDNFはドーパミン神経細胞に効果を示す。神経栄養因子のなかでもドーパミン神経細胞にとくに効果が大きく、最近注目されている神経栄養因子である。今回の我々の培養細胞を使った実験からGDNF遺伝子を導入することによりTH陽性細胞の細胞死予防と神経突起伸長作用が確認できた。さらに、ラットモデルを使ったGDNF遺伝子治療の報告がある2), 3), 4), 5)。我々の実験結果およびこれまでの報告からGDNF遺伝子治療はパーキンソン病患者のドーパミン神経細胞変性予防効果が期待できる。

今後、我々もモデル動物を使ったGDNF遺伝子治療実験を進める。さらに、GDNFは運動神経にも作用することが分かっており6)、筋萎縮側索硬化症モデル動物を使った実験を進める予定である。

文献

- 1) Lindsay RM et al, *Exp Neurol* 124: 103-118, 1993
- 2) Bilang-Bleuel A et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8818-8823, 1997
- 3) Choi-Lindberg DL et al, *Science* 275: 838-841, 1997
- 4) Mandel RJ et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14083-14088, 1997
- 5) Kojima H et al, *BBRC* 238:569-573, 1997
- 6) Henderson CE, *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*, Lippincott-Raven Publishers, 235-240, 1995

以上は英文で *Neuro Science Letter* (in press) です。

樊 東昇