

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題「脊髄小脳変性症の根治的遺伝子治
療法の開発」

研究期間：平成18年 4月 1日～

平成21年 3月31日

平井 宏和
(群馬大学大学院医学系研究科、教授)

1. 研究課題名

脊髄小脳変性症の根治的遺伝子治療法の開発

2. 研究実施の概要

小脳は歩行や発声など複数の筋肉が関与する運動を行う際に、筋肉の収縮・弛緩のタイミングを調節し滑らかな運動や発語を可能にする。また前庭神経からの入力を受け、体の平衡維持にも重要な役割を果たしている。日常生活はバランスをとって立ち上がり、姿勢を維持し、歩き、会話し、食事をするのが基本であるが、小脳が障害されるとこれらすべてに支障を来すことになる。

プルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであり、脳幹、脊髄を經由して小脳皮質に入力した情報を最終的に統合し、小脳核を介して大脳皮質、前庭神経核、脊髄に出力する。このようにプルキンエ細胞は小脳機能にきわめて重要な細胞であるが、先天性疾患、変性疾患、自己免疫疾患など様々な疾患で障害を受け脱落する。

生体小脳の広い領域に、しかもプルキンエ細胞特異的かつ効率的に遺伝子を導入・発現させることができれば、小脳機能の基礎研究はもちろんのことプルキンエ細胞が障害される疾患の遺伝子治療など様々な利用法が考えられる。しかし、さきがけ研究を開始した当初（～2002年）はそのような技術は世界的にも確立していなかった。そこでさきがけ研究（課題「小脳失調関連遺伝子の機能解明と治療に向けた標的遺伝子の導入技術開発」）にて、レンチウイルスベクターを用いた生体小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入技術の開発を開始した。

約3年のさきがけ研究（2002年12月～2006年3月）で、

1. それまで世界的にも成功していなかった「生体小脳のプルキンエ細胞に特異的かつ効率的に外来遺伝子を発現させる方法」を開発し特許出願した。
2. 変異した脊髄小脳変性症(SCA)の原因遺伝子産物がつくる凝集体(agggregates)を、ユビキチン・プロテアソーム系を介して分解するタンパク質「CRAG」を東京薬科大学の柳教授らが同定し、共同でその小脳における機能解析を行った。

そこで、SCAモデルマウスを作出し、(1)の方法を用いてCRAGをはじめとするユビキチン・プロテアソーム系促進分子を、機能障害・変性に陥っているプルキンエ細胞に供給し、これにより、プルキンエ細胞の変性・アポトーシスを防ぐことができるのか、そしてその結果、運動失調を改善させることができるのかを研究することを目的とした。

【SCA モデルマウスの作出と解析】

プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーターを用いて、プルキンエ細胞に局限して変異 SCA 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (SCA モデルマウス) を作出した (Torashima et al., EMBO Rep, 9:393-9, 2008)。SCA モデルマウスは小脳が著しく萎縮しており、生後 3 週より強い運動失調を示した。野生型のプルキンエ細胞層は 1 層に整列しているが、モデルマウスでは大きく配列が崩れ、不規則な 3~4 層になっていた。またモデルマウスのプルキンエ細胞では、樹状突起の発達も大きく障害されていた。通常、樹状突起は分子層に向かって伸長するが、顆粒細胞側に伸びているものも認められた。変異遺伝子産物は生後 5 日の時点ではプルキンエ細胞の細胞質及び核内に一様に存在していたが、生後 10 日以降では核内に局限した。さらに生後 40 日以降では封入体が認められた。封入体は細胞体の内部、細胞体周辺及び、小脳核に投射するプルキンエ細胞軸索末端に認められた。

細胞体周辺の封入体は、細胞体から突出した腔内に形成されていた。細胞体周辺に封入体をもつプルキンエ細胞は膜電位も野生型と変わらず、シナプス伝達も観察され、アポトーシスマーカーでも染色されなかったことから、封入体形成は細胞機能保護のための能動的現象と考えられた。

【SCA モデルマウスの遺伝子治療】

MSCV プロモーター制御下で CRAG を発現するレンチウイルスベクターコンストラクトを作製し、生後 25 日の SCA モデルマウスの小脳に接種した。コントロールとして GFP を発現するレンチウイルスベクターまたは、核移行シグナルを壊した CRAG(CRAG^{NLSmu})を発現するレンチウイルスベクターを接種した。接種後の運動失調の評価はロータロッドで行った。その結果、CRAG を発現させたモデルマウスでは、接種 2 週間後より有意な運動失調の改善が認められ、8 週間後には大幅に改善した。GFP または CRAG^{NLSmu} を発現させたモデルマウスの運動失調の程度は、2 ヶ月後でも未接種のモデルマウスと変わらず改善が見られなかった。

CRAG あるいは GFP を小脳に接種したモデルマウスを 2 ヶ月後に灌流固定し、免疫染色後にプルキンエ細胞の状態を観察した。GFP を発現しているプルキンエ細胞は、未接種のモデルマウスのプルキンエ細胞と同様、配列が大きく乱れており樹状突起の発達も著しく障害されていた。また変異遺伝子産物の凝集塊の程度も未接種のモデルマウスと同様であった。これに対し、CRAG を発現するプルキンエ細胞は配列が大きく改善して 1 層になっており、樹状突起の伸長も認められた。さらに変異遺伝子産物の凝集塊も大幅に減少していた。モデルマウスの培養プルキンエ細胞の実験結果から、CRAG による変異遺伝子産物の凝集塊分解作用はユビキチン・プロテアソーム系を介していることが明らかになった。CRAG と同様の作用は、ユビキチン・プロテアソーム系を賦活する他の分子、たとえば VCP/p97 の発現でも認められた。

【その他の実施研究】

生後 0 日のラット小脳へのウイルスの投与法を確立し、レンチウイルスベクターの感染が神経細胞に与える影響を検討した。プルキンエ細胞は生後 2 週以降、樹状突起を急激に伸ばし多数のシナプスを形成する。生後 0 日のラット小脳に、 1.0×10^{10} TU/ml の高力価ウイルスベクターを感染させたところ、プルキンエ細胞の樹状突起の発達はわずかに抑制を受けたが、電気生理学的には全く影響が見られなかった。

臨床応用を考えた場合、レンチウイルスベクターを介する遺伝子発現を非侵襲的にモニターできれば大変有用である。そこで、ドパミン D2 受容体をレポーターとしてマウスのプルキンエ細胞に発現させ、D2 受容体に結合能をもつ放射性薬剤 ($[^{125}\text{I}]\text{-IBF}$) をマウスの静脈に注射し、プルキンエ細胞における D2 受容体遺伝子発現を autoradiography で観察した。その結果、小脳皮質の遺伝子発現領域に一致した $[^{125}\text{I}]\text{-IBF}$ の結合が観察された (Shiba et al., J Cereb Blood Flow Metab, 29: 434-40, 2008)。

3. 研究構想

多くの型の遺伝性 SCA やハンチントン病は、異常伸長したポリグルタミン鎖をもつ原因遺伝子産物が凝集体を形成し、神経細胞の変性・細胞死を引き起こすことが病因と考えられている。この場合、凝集体は子どものときから存在するはずであるので、症状は幼児期など若い時から表れてもよいはずであるが、多くは 30 代、あるいはそれ以降に発症する。変異した原因遺伝子を培養細胞に異所性発現させた先行研究で、ポリグルタミン凝集体はユビキチン・プロテアソーム系を介して分解されることが数多く報告されている。このことから、ポリグルタミン病の患者では、加齢に伴うユビキチン・プロテアソーム系の衰えにより凝集体が分解処理しきれなくなり、細胞内に蓄積することで発症につながると推測される。実際、ユビキチン・プロテアソーム系を賦活する CRAG は成熟すると発現量が減少する。

【レンチウイルスベクターを用いたユビキチン・プロテアソーム系賦活遺伝子発現による SCA モデルマウスの遺伝子治療効果の検討】

以上より、ユビキチン・プロテアソーム分解系の律速段階となっているタンパク質を、変性に陥っている神経細胞に供給し、若い時と同レベルにユビキチン・プロテアソーム系を賦活することができれば、SCA を含めたポリグルタミン病の根治につながるのではないかと考えた。そこで、プルキンエ細胞に変異した SCA 原因遺伝子を過剰発現し、運動失調を示すモデルマウスを作出、レンチウイルスベクターを用いてユビキチン・プロテアソーム系賦活タンパク質を発現させ、運動失調が改善されるのか、凝集体が分解されるのか、を調べることを目的とした。

研究を進めた結果、モデルマウス小脳プルキンエ細胞への CRAG の発現によりポリグルタミン凝集体が大きく減少、同時に障害されていたプルキンエ細胞の樹状突起が伸びはじめ、運動障害も大幅に改善した。このような効果は CRAG だけでなく、別のユビキチン・プロテアソーム系を賦活するたんぱく質遺伝子、VCP/p97 の発現でも認められた。

研究開始後の新展開から生まれた研究目標

【レンチウイルスベクターの安全性の詳細な検討】

このような結果から、レンチウイルスベクターを用いた小脳プルキンエ細胞へのユビキチン・プロテアソーム系賦活遺伝子の導入・発現が、SCA の治療としてヒトに応用できる可能性がさらに高まった。そこでヒトへの臨床応用を目標として、レンチウイルスベクターの安全性の検討と霊長類を用いた研究を行うこととした。この目的のため、まず、高力価レンチウイルスベクターの感染が新生ラット神経細胞の発達にどの程度の影響を及ぼすのかを、形態学的及び電気生理学的に検討した。

【宿主染色体に組み込まれないレンチウイルスベクターを用いた治療効果の検討】

レトロウイルス属の一つであるレンチウイルスベクターの特徴の一つとして、宿主染色体へのプロウイルスの組み込みが上げられる。これにより宿主の重要な遺伝子の機能が障害されたり、ガン遺伝子を活性化したりする可能性が否定できず、臨床応用を考えた場合に問題となる。最近、レンチウイルスベクターのインテグレースに変異を導入することで、宿主染色体へのプロウイルスの組み込みを起こさないベクター（Non-integrating lentiviral vector: NI vector）が報告された（Yáñez-Muñoz et al. Nat Med, 12:348-53, 2006）。そこで、NI vector を用いて SCA モデルマウスを治療しても、組み込み能力をもつレンチウイルスベクターと同様の効果が得られるのか、そしてその効果が持続するのかを検討することにした。

4. 研究実施内容

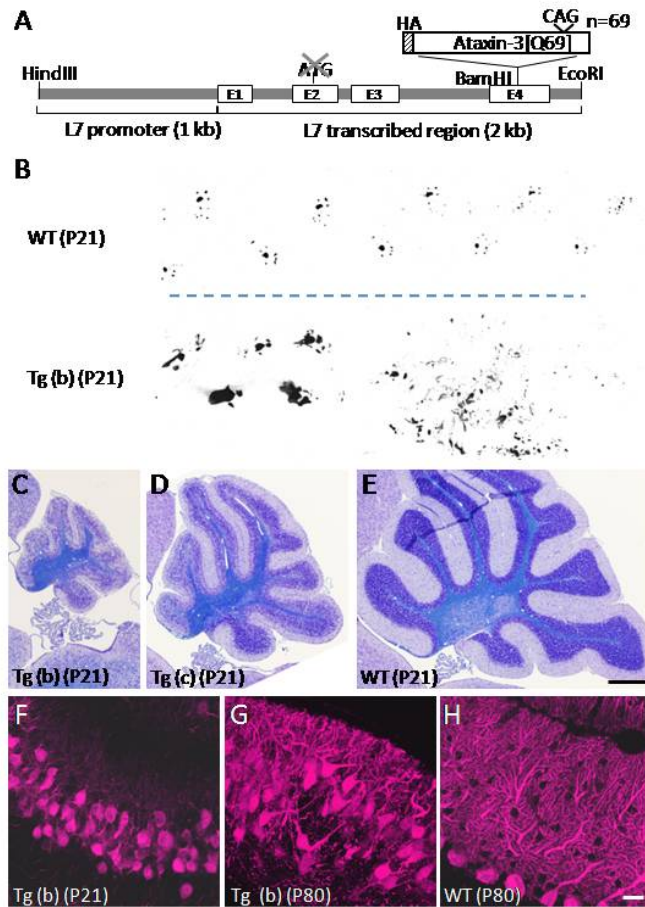


図1 **b**と**c**の2つのラインのモデルマウスが得られた。**c**ラインのマウスは小脳萎縮、運動失調とも**b**ラインより軽度であったが繁殖に問題があった。そのため研究には**b**ラインを用いた。**WT**:野生型マウス、**Tg**:トランスジェニックマウス。

で転がるという小脳失調症状を示した (図 1 B)。小脳は著しく萎縮していた (図 1 C-E)。プルキンエ細胞は正常ではきれいな 1 層に配列し、樹状突起を分子層に網状にはりめぐらしているが、モデルマウスのプルキンエ細胞の配列は大きく崩れ、樹状突起の伸長も著しく阻害されていた (図 1 F-G)。

(1) 実施の内容

【SCA モデルマウスの作出と解析】

遺伝性 SCA 3 型 (マシヤド・ジョセフ病) は、遺伝性の中で最も患者数の多いタイプである。原因たんぱく質は ataxin-3 で、すべての人が持っている。ataxin-3 内のグルタミンの繰り返しは通常、10 回~35 回程度であるのに対し、患者では 55 回以上と著しく延長している。このようにポリグルタミン鎖が異常伸長した ataxin-3 は、神経細胞内でプロテアーゼにより切断されて細胞障害性をもつようになる。そこで本研究では、69 回のグルタミンの繰り返しをもち、細胞障害性を獲得した ataxin-3 断片 (変異 ataxin-3) を、プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーター制御下で発現するトランスジェニックマウス (モデルマウス) を作出した (図 1 A)。

モデルマウスは、生後 20 日以降、よろよろと歩き、時にバランスを失っ

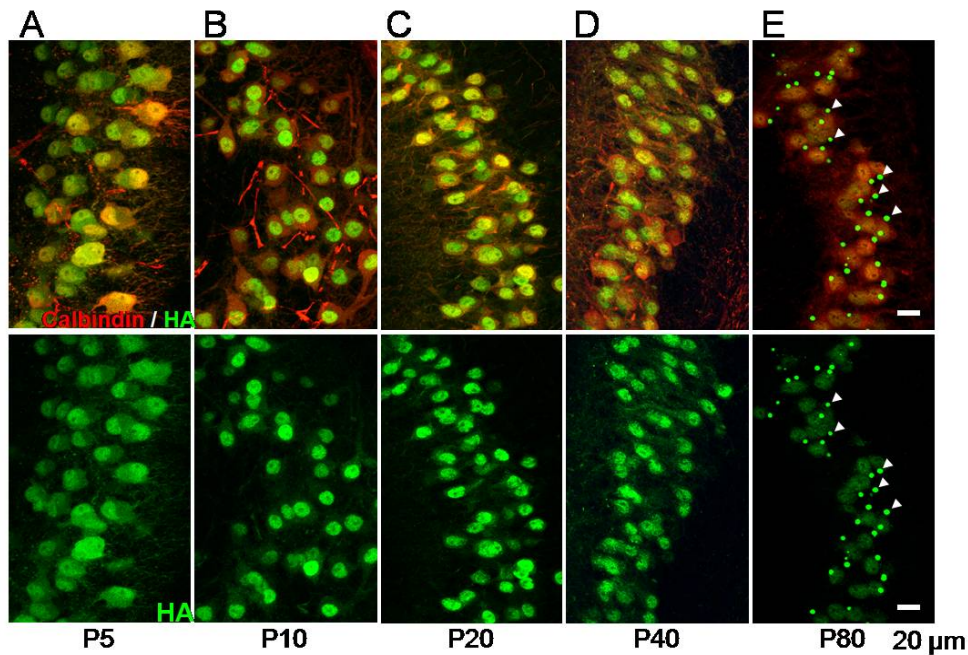


図2 生後5日(P5)から生後80日(P80)までのSCAモデルマウス小脳の免疫組織蛍光画像。プルキンエ細胞マーカであるカルビンディンと原因遺伝子に付加したHAに対する抗体で2重染色した。

生後5日では、変異 ataxin-3 はプルキンエ細胞の細胞質、核の区別なくびまん性に存在していたが(図2A)、生後10日以降では核内に限局した(図2B-E)。さらに生後40日になると細胞質内に小さな封入体の形成を認め、生後80日では細胞体周辺に大型の封入体が出現した(図2E)。プルキンエ細胞の細胞体に色素を注入すると、細胞体と同時に隣接する大型の封入体も染色されることから、両者には交通があることが明らかとなった(図3)。このようなプルキンエ細胞は電気生理学的にも免疫組織学的にも神経変性のサインは示していないことから、細胞体周辺の封入体は、プルキンエ細胞が凝集体の毒性から自らを守るための能動的な現象と推測された。

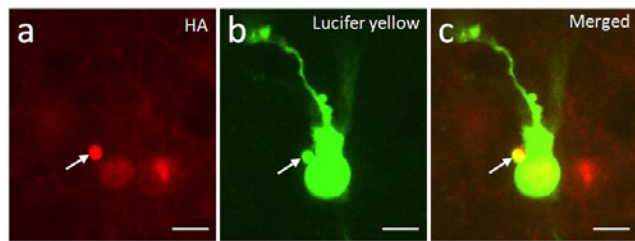


図3 SCAモデルマウス小脳スライスを作製後、プルキンエ細胞にホールセルパッチし、Lucifer yellowを注入した。その後、スライスを固定し、原因遺伝子に付加したHAに対する抗体で免疫染色し封入体を可視化した(a, 矢印)。封入体とLucifer yellowを注入したプルキンエ細胞の細胞体には交通が存在し、Lucifer yellowが封入体まで達しているのがわかる(b, c, 矢印)。

SCA モデルマウスのプルキンエ細胞のパッチクランプ解析では、平行線維-プルキンエ細胞シナプス及び登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおける興奮性シナプス後電流 (EPSC) は容易に記録可能であった (図 4 a, b)。EPSC kinetics に異常が認められたが、これは樹状突起の著しい発達障害のためと考えられ、シナプス形成には大きな障害はないと思われた。ただ、発達期の余剰登上線維シナプスの除去が障害されていた。すなわち、野生型では生後 21 日以降、90% 以上のプルキンエ細胞において、1 本の登上線維を残してすべて除去されるが、モデルマウスのプルキンエ細胞では約 ~20% のプルキンエ細胞しか 1 : 1 対応が完成していなかった (図 4 b)。

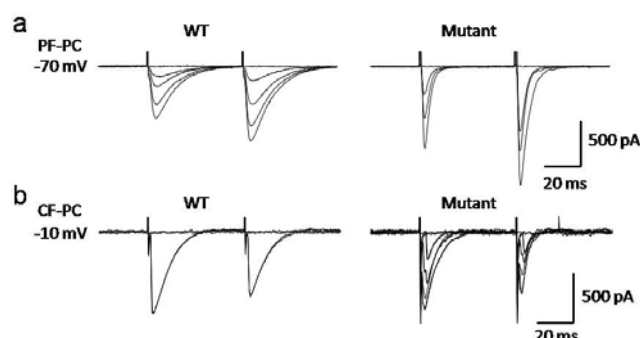


図4 野生型(WT)とSCAモデルマウスの小脳スライスのホールセルパッチクランプ解析。平行線維(PF)-プルキンエ細胞(PC)シナプス(a)、登上線維(CF)-プルキンエ細胞(PC)シナプス(b)の興奮性シナプス後電流(EPSC)は、SCAモデルマウスでも容易に記録された。CF-PCシナプスのEPSCの約80%はマルチステップとして記録され、多数の登上線維が1つのプルキンエ細胞にシナプス入力していることがわかった。

【SCA モデルマウスの遺伝子治療】

生後 21~25 日のモデルマウスの小脳皮質に、CRAG を発現するレンチウイルスベクターを接種した。2 週間後にロータロッドを用いて運動失調の程度を検査したところ有意な回復が認められ、接種 2 ヶ月後には大幅に改善した (図 5)。野生型 CRAG の代わりに核移行シグナルを壊した CRAG (CRAG_{NLSmu})、あるいは GFP を発現させたモデルマウスでは 2 ヶ月後でも全く運動失調の改善は見られなかった。

レンチウイルスベクター接種 2 ヶ月後 (~生後 80 日) にモデルマウスを灌流固定し、ポリグルタミン凝集体の様子を観察した。生後 80 日の未接種モデルマウス (コントロール)、GFP 発現ウイルスベクター接種モデルマウス、CRAG_{NLSmu} 発現ウイルスベクター接種モデルマウス的小脳には多数の封入体が観察された。これに対し、CRAG 発現ウイルスベクター接種のモデルマウス小脳では、封入体は激減しており、凝集体の免疫染色強度も大きく低下していた (図 6 A-E)。しかも、CRAG を発現するプルキンエ細胞はきれいな 1 層の配列に戻っており、樹状突起の伸長も観察された (図 6 F、図 7)。

培養プルキンエ細胞を用いた実験においても、CRAG 発現によってモデルマウスのプルキンエ細胞内の凝集体は有意に減少し、樹状突起も大きく伸長しているのが観察された。このような CRAG の作用は、培地にプロテアソーム阻害剤である MG132 を加えることによりブロックされた。

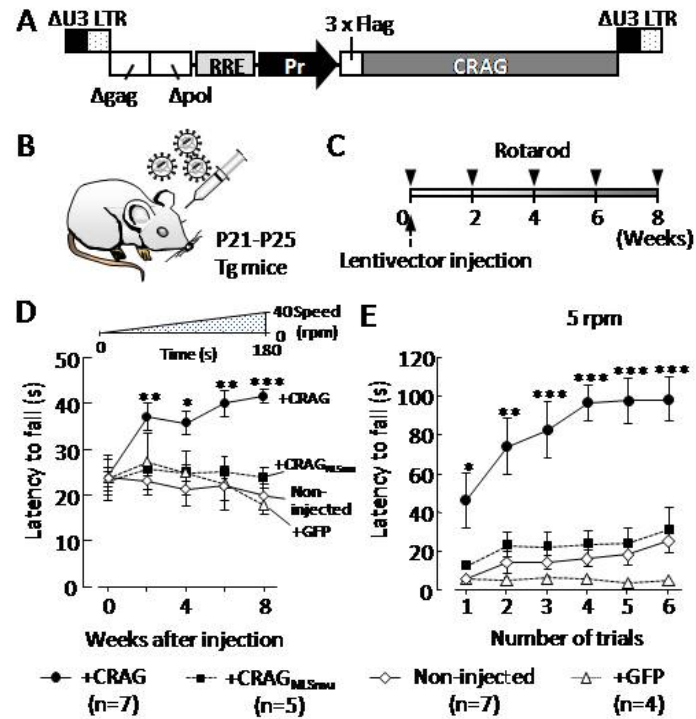


図5 **CRAG**発現レンチウイルスベクター接種による**SCA**モデルマウスの運動失調の回復。生後**21～25**日のモデルマウスにレンチウイルスベクターを接種(**A,B**)し、**2**週おきに運動機能を加速するロータロッドにて測定した(**C,D**)。**8**週後には定速(**5 rpm**)で運動失調の程度を評価した(**E**)。

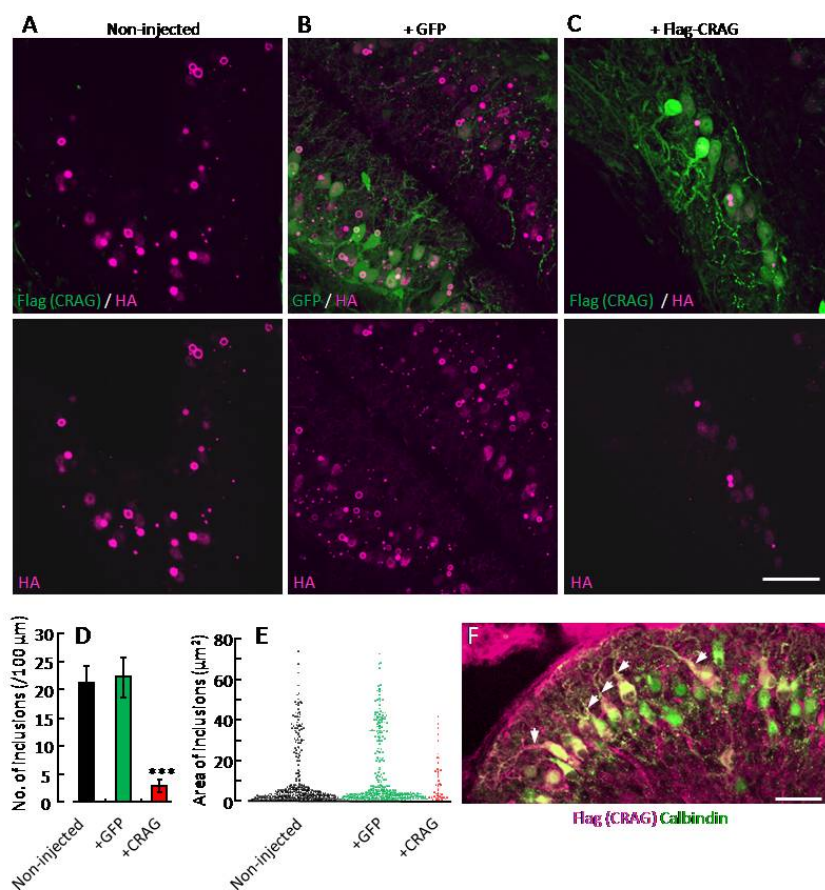


図6 レンチウイルスベクターを用いたCRAG発現による封入体の消失。ウイルス未接種あるいは、GFP発現ウイルスベクターを接種したモデルマウスの小脳皮質には多数の封入体を認める(A,B,D,E)。これに対し、CRAG発現ウイルスベクターの接種では封入体の著明な減少が認められた(C-E)。またCRAGを発現しているプルキンエ細胞では樹状突起が伸長していた(F, 矢印)。

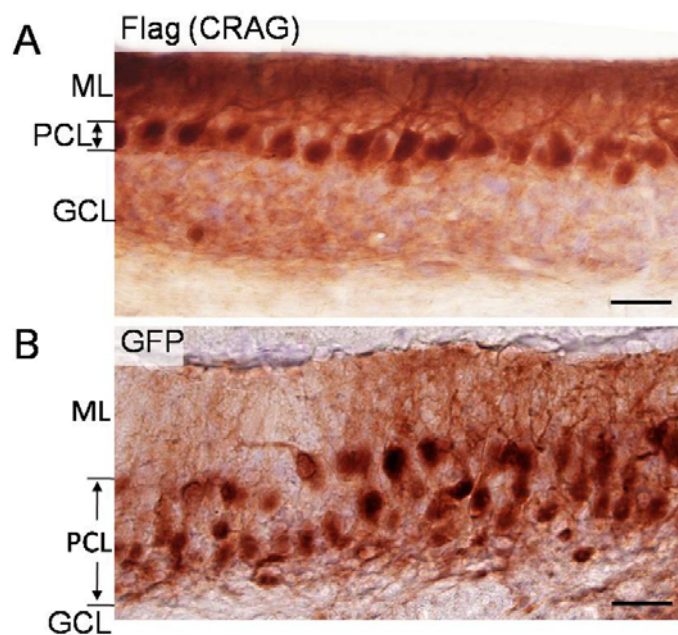


図7 SCAモデルマウスの大きく乱れたプルキンエ細胞層は、CRAGの発現により一層に回復した(A)。しかも分子層への樹状突起の伸長も観察された。これに対し、GFPの発現ではプルキンエ細胞層の配列の変化は認められなかった(B)。

【レンチウイルスベクターの安全性に関する研究】

1990年代に遺伝子治療用ベクターとして広く用いられたアデノウイルスベクターは、神経細胞にも感染して遺伝子発現が可能である。しかし、グリア細胞への親和性が高く、細胞障害性があり、遺伝子発現も一過性である。これに対し、レンチウイルスベクターは神経親和性が比較的高く、感染による細胞障害性も少ないと考えられている。しかし、高力価のレンチウイルスベクターが神経細胞に感染した場合、どの程度の障害があるのかは十分検証されていない。この点を明らかにすることは臨床応用を考えると大変重要である。そこで、高力価のレンチウイルスベクターを生後 0 日のラット小脳皮質に接種して細胞障害性を検討した。

小脳は生後、様々な遺伝子を厳密に決められたタイムウインドウで発現し、急激に発達する。外顆粒細胞層では顆粒細胞の前駆細胞が盛んに分裂し、分子層を通過して内顆粒細胞層へ遊走する。プルキンエ細胞は樹状突起を網目状に伸展させ、分子層を遊走中の顆粒細胞の軸索（平行線維）との間にシナプスを形成する。また下オリーブ核の神経細胞の軸索である登上線維もこの時期、プルキンエ細胞とシナプスを形成する。最初は、1つのプルキンエ細胞に5〜6本以上の登上線維がシナプスを形成するが、その後、不要な登上線維シナプスは除去され、最終的に1：1対応が完成する。このような小脳の急激な発達に伴う小脳神経回路形成は、生後 21 日までにほぼ完成する。したがって、発達期に高力価のレンチウイルスベクターを小脳の神経細胞に感染させた場合、もしレンチウイルスベクターが何らかの細胞障害性をもつならば、それが顕著に現れると考えた。生後 0 日のマウスは小さすぎて小脳皮質へのウイルス接種が困難なためラットを用いた。

生後 0 日のラットの小脳に力価 1.0×10^{10} TU/ml、6 μ l の GFP 発現レンチウイルスベクターを接種した。これは小脳が高力価ウイルス液の中に完全に浸かってしまう量である。生後 21 日の時点で小脳を形態学的及び、電気生理学的に検討した。電気生理学的には、プルキンエ細胞の膜抵抗、膜容量に異常を認めなかった。平行線維—プルキンエ細胞シナプス、登上線維—プルキンエ細胞シナプスの伝達も異常を認めなかった。登上線維とプルキンエ細胞の1：1対応の完成割合についても、未接種マウスの小脳と変わりなかった。形態的にもプルキンエ細胞は、未接種マウスのプルキンエ細胞と同様に網目状に樹状突起を伸長させていた。ただ画像解析ソフトを使用して詳細に解析すると、ウイルス感染プルキンエ細胞の樹状突起の長さは、未感染プルキンエ細胞の樹状突起の長さの約 90%しかなく、有意に短かった。この理由として 2 つのことが考えられる。1つはレンチウイルスベクター感染による影響である。もう1つは GFP 発現の影響である。前述のように、新生期から生後 21 日目までは小脳が急激に発達する時期であり、たくさんの種類のたんぱく質が大量に合成されなければならない。この時期にたんぱく質合成経路の一部を GFP 産生に使われたため、樹状突起の伸長に影響が出た可能性が高い。いずれにせよ、高力価 GFP 発現レンチウイルスベクター接種による影響は、樹状突起伸長にわずかに見られただけであり、電気生理学的及びロータロッドで評価できる運動機能には全く変化が見られなかった。

【レポーター遺伝子の開発】

パーキンソン病に対する遺伝子治療は欧米だけでなく日本でもすでに行われている。日本のパーキンソン病の遺伝子治療では、ドパミン前駆体 L-DOPA をドパミンに変換する芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 遺伝子が線条体に導入されている。パーキンソン病では様々な核医学薬剤が開発されており、遺伝子治療による AADC 発現効果はたとえば ^{18}F -DOPA の取り込みで評価することができる。しかし小脳においては、ウイルスベクターを介する遺伝子発現を非侵襲的に評価できる適当な検査薬や検査法は存在しない。導入した遺伝子が小脳においてどの程度発現しているのかは、行った治療の効果判定はもちろんのこと、追加のウイルスベクター投与を行うかどうかを決定する上でも極めて重要な情報となる。したがって、小脳疾患に対する遺伝子治療の臨床応用にはレポーター遺伝子の開発が一つのポイントとなる。

そこで、既存の核医学検査用化合物、 ^{125}I 5-iodo-7-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl) methyl] carboxamide-2,3-dihydrobenzofuran (^{125}I IBF)を用いて、小脳への導入遺伝子の発現が検出可能であるのかを検討した。 ^{125}I IBF はドパミン D2 受容体に結合するため、ドパミン D2 受容体を発現するレンチウイルスベクター (図 8) をマウス小脳に接種した。接種 2 週間後に ^{125}I IBF (1.85 MBq) を静注し、その

60 分後に灌流固定を行った。その後、小脳矢状断切片を作製しオートラジオグラムと免疫染色を行った。ドパミン D2 受容体に付加した HA に対する抗体で小脳切片を免疫染色したところ、第 6 小葉を中心として広範囲に D2 受容体が発現しているのが確認できた (図 9 f-h)。オートラジオグラムでは、D2 受容体の発現領域に一致して強い放射活性が認められた (図 9 a-e)。

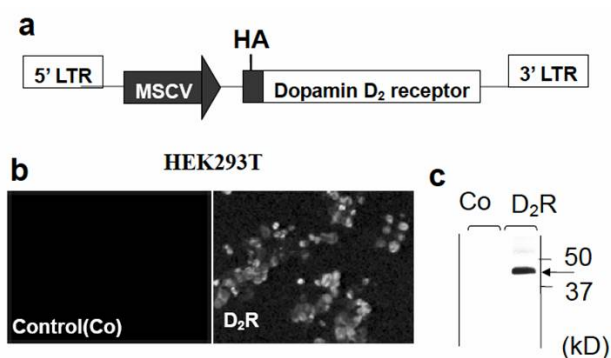


図8 MSCVプロモーター制御下でドパミンD2受容体を発現するレンチウイルスベクター。(a) プルウイルス部の模式図。(b) レンチウイルスベクターをHEK293T細胞に感染させ、抗HA抗体にて染色した図。(c) D2受容体を発現するHEK293T細胞を用いたWestern blot。抗HA抗体を用いてプロットングを行った。矢印はD2受容体が現れる場所を示す。

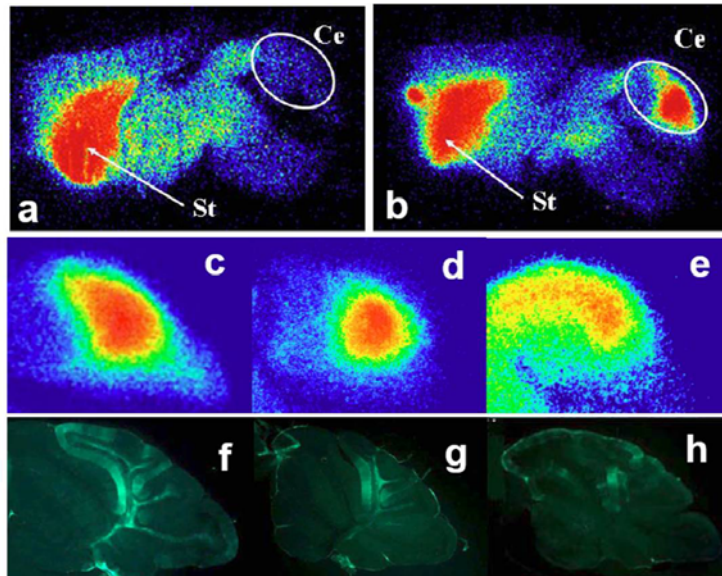


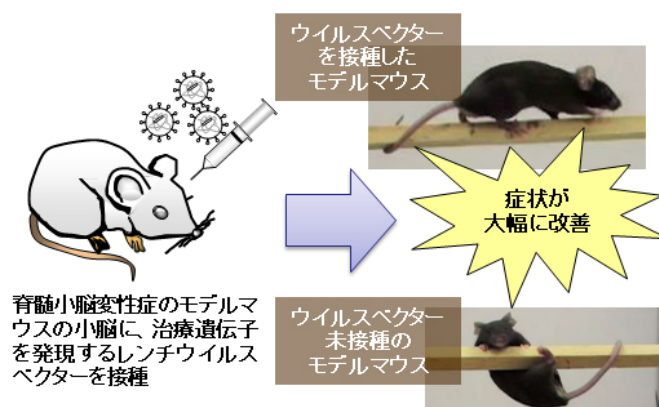
図9 D2受容体レンチウイルスベクターを接種したマウスの脳の $[^{125}\text{I}]\text{IBF}$ オートラジオグラム。St: 線条体、Ce: 小脳。(a,b) ウイルス未接種マウス(a)と接種後14日のマウス(b)。接種したマウスのみ小脳に強い放射活性を認める。(c-e) 接種したマウス3匹の小脳の拡大。(f-g) それぞれ(c)、(d)、(e)に対応する抗HA抗体を用いた免疫組織画像。

今回はマウスに使用できる Single photon emission computed tomography (SPECT) が利用できなかったため小脳切片を作製したが、放射活性から考えると十分 SPECT で非侵襲的に遺伝子発現を同定できるレベルであった。D2 受容体遺伝子の大きさは 1.5 kb であるが、必ずしも全長が必要なわけではなく $[^{125}\text{I}]\text{IBF}$ に対する結合能が維持されていれば削ることも可能である。以上より、レンチウイルスベクターを介して発現するたんぱく質で十分、SPECT 検査において遺伝子発現の検出が可能であり、ドパミン D2 受容体の $[^{125}\text{I}]\text{IBF}$ 結合配列はレポーター遺伝子となり得る可能性がある。加えて、よりよいレポーター遺伝子—核医学検査 (SPECT または PET) 用化合物を検索あるいは開発していく予定である。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

最近の HEK293 細胞などの培養細胞やショウジョウを用いた研究で、SCA の原因遺伝子産物は神経細胞内に毒性をもつ凝集体 (オリゴマー) を形成し、細胞変性・細胞死を誘導することが報告されている。さらに、ユビキチン・プロテアソーム系を賦活するたんぱく質遺伝子を導入することで凝集体の分解が促進し、細胞変性・細胞死が抑制できることもわかってきた。しかし、そのようなたんぱく質遺伝子が本当に哺乳類の脳内で副作用なく凝集体を分解するのか、そしてその結果運動失調が改善するのかは不明であった。

今回、SCA モデルマウスを作出し小脳神経回路が完成した後に、レンチウイルスベクターを用いてユビキチン・プロテアソーム系を賦活する CRAG や VCP/p97 を発現させると、小脳プルキンエ細胞内の凝集体が激減し、運動失調の大きな改善が可能であることを世界ではじめて証明した。また、レンチウイルスベクターは神経細胞に対してほとんど障害性がないことが明らかとなった。



これらの成果は、SCA に対する遺伝子治療の臨床応用実現を大きく後押しする成果であると考えられる。実際の臨床応用にはいくつかのハードルがあるものの、今後 SCA 患者に本法を応用し、大きな治療効果をもたらすことが期待される。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

米国アイオワ大学の Davidson 教授らは、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて SCA1 型 (SCA1) モデルマウスの小脳プルキンエ細胞に shRNA を発現させることで、変異した原因遺伝子産物の産生を抑え、運動失調の進行を抑制できることを報告した (Xia et al., Nat Med, 10:816-20, 2004)。この方法では運動失調の進行を抑制できるが、改善まで至っていない。また Davidson 教授に直接伺ったところ、その後の研究で shRNA 発現は細胞毒性が強く臨床応用には問題があることがわかってきたとのことであった。Davidson 教授らはこの問題を解決するため、副作用の少ない miRNA を用いた研究を進めている。

Davidson 教授らの研究では、原因たんぱく質の産生を抑えることを目的としているのに対し、本研究課題では原因たんぱく質が産生された後に分解を促進する戦略である。どちらが優れているのかは現時点では判断できないが、本研究課題の方が生理的であるといえる。患者の原因たんぱく質は発症以前から産生されているが、ユビキチン・プロテアソーム系を介して分解されているから発症しなかったと推測される。しかし、年齢が進むにつれ、ユビキチン・プロテアソーム系の処理能力が低下したことで発症したと考えられる。実際、CRAG の発現量は若いときに高く、その後次第に低下することがわかっている。したがって、ユビキチン・プロテアソーム系を賦活する戦略は、低下してきた不要たんぱく質処理能力を元にもどす意味をもつ。Davidson 教授の原因たんぱく質産生抑制も、本研究の原因たんぱく質分解促進も、神経細胞内で処理しきれなくなった原因たんぱく質を減少させるという障害の根本原因を取り除くため、疾患の根治につながることを期待される。

6. 研究実施体制

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
平井 宏和	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	教授	疾患モデルマウスの電気生理学解析・染色体に組み込まれないレンチベクターの効果の検証	平成18年4月～平成21年3月
寅嶋 崇	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	助教	レンチウイルスベクターの準備とマウスへの接種	平成18年4月～平成21年3月
三浦 比佳理	金沢大学大学院医学系研究科	M1	脳切片の作製、染色	平成18年4月～平成19年3月
田中 良男	金沢大学医学部	医学部 5 年生	遺伝子クローニング	平成18年4月～平成19年3月
小山 知穂	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	産学官連携研究員	マウスの行動解析、タンパク質化学実験、マウスの飼育管理・遺伝子タイピング、分子生物学実験	平成18年4月～平成21年3月
岩崎 祐美子	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	研究補助員	マウスの飼育管理・遺伝子タイピング、免疫組織染色	平成19年10月～平成21年3月
堀内 始	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	M2	マウスの飼育管理・遺伝子タイピング、分子生物学実験	平成19年4月～平成21年3月
三ツ村一浩	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	D3	脊髄小脳変性症モデルマウスの電気生理学的解析	平成20年10月～平成21年3月
高山 清彦	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	D2	マウスの飼育管理・遺伝子タイピング、分子生物学実験	平成20年4月～平成21年3月
Anton Shuvaev	群馬大学医学系研究科神経生理学分野	D1	マウスの飼育管理・遺伝子タイピング、電気生理学実験	平成20年4月～平成21年3月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成20年7月9日	【第31回日本神経科学大会シンポジウム】ウイルスベクターが切	東京国際フォーラム	約100名	ウイルスベクターを用いた脳研究で有名な米国ノースウエスタン大学 Dr.

	り開く新しい神経科学研究 ～可塑性、行動、疾患研究への効果的な利用法を探る			Pavel Osten、日本ではじめてパーキンソン病の遺伝子治療を行った自治医大の中心メンバーである村松慎一特命教授を招いてシンポジウムを行った。
平成 19 年 2 月 28 日	【日本神経化学会 2007 年冬の学校】 レンチウイルスを使った脳局所遺伝子発現法	金沢大学	18 名	レンチウイルスベクターの作製法、神経系への発現法についての講義・実習 1 日コースを開催した。全国から 13 名、金沢大学から 5 名が参加した。
平成 18 年 12 月 15 日～16 日	さがけライブ	東京国際フォーラム	約 1000 人 (ブースには 100 人程度)	さがけ研究及び一部発展研究の成果を一般に方にブース形式で紹介した。
平成 18 年 7 月 21 日	【第 29 回日本神経科学大会シンポジウム】 神経系における特異的遺伝子発現方法を求めてーウイルスベクターを用いた神経研究の新しい可能性	京都・国立京都国際会館	約 150 人	レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクターなどの専門家によるシンポジウムを開催した。

(2) 招聘した研究者等

なし

8. 発展研究による主な研究成果

(1)論文発表 (英文論文 15件 邦文論文 8件、*corresponding author)

- ① Qin Q, Inatome R, Hotta A, Kojima M, Yamamura H, Hirai H, Yoshizawa T, Tanaka H, Fukami K, and Yanagi S: A novel GTPase, CRAG, mediates PML-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein.
Journal of Cell Biology 172:497-504, 2006
2. Torashima T, Okoyama S, Nishizaki T, Hirai H*: In vivo transduction of murine cerebellar Purkinje cells by HIV-derived lentiviral vectors.
Brain Research 12;1082(1):11-22, 2006
3. Torashima T, Yamada N, Itoh M, Yamamoto A, Hirai H *: Exposure of lentiviral vectors to subneutral pH shifts the tropism from Purkinje cell to Bergmann glia.
European Journal of Neuroscience 24(2):371-380, 2006
4. Hisatsune C, Kuroda Y, Akagi T, Torashima T, Hirai H, Hashikawa T, Inoue T, Mikoshiba K: Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 1 in granule cells, not in Purkinje cells, regulates the dendritic morphology of Purkinje cells through BDNF production.
Journal of Neuroscience 26(42):10916-10924, 2006
- ⑤ Jin D†, Liu H†, Hirai H†*, Torashima T, Nagai T, Lopatina O, Shnayder NA, Yamada K, Noda M, Seika T, Fujita K, Takasawa S, Yokoyama S, Koizumi K, Shiraishi M, Tanaka S, Hashii M, Islam MS, Yamada N, Hayashi K, Noguchi N, Kato I, Okamoto H, Matsushima A, Salmina A, Munesue T, Asano M, Higashida H*: CD38 is critical for social behavior by regulating oxytocin secretion.
(†co-first author, *co-corresponding author)
Nature (Article) 446(7131):41-5, 2007
6. Kakegawa W, Miyazaki T, Hirai H, Motohashi J, Mishina M, Watanabe M, Yuzaki M: Ca²⁺ permeability of the channel pore is not essential for the {delta}2 glutamate receptor to regulate synaptic plasticity and motor coordination.
Journal of Physiology 579:729-735, 2007
7. Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsui M,

- Lin QS, Tsukamoto K, Nishimura H, Ono M, Watanabe M, Hirose S: CD3 and IgG Fc receptor regulate cerebellar functions.
Molecular and Cellular Biology 27: 5128-5134, 2007
8. Torashima T, Koyama C, Higashida H, Hirai H*: Production of neuron-preferential lentiviral vectors.
Nature Protocols 2007 doi: 10.1038/nprot.2007.89
 - ⑨ Torashima T, Koyama C, Iizuka A, Mitsumura K, Takayama K, Yanagi S, Oue M, Yamaguchi H, Hirai H*: Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia.
EMBO Reports 9(4):393-9, 2008
 - ⑩ Hirai H*. Progress in transduction of cerebellar Purkinje cells in vivo using viral vectors.
Cerebellum 7(3):273-8, 2008
 11. Takayama K, Torashima T, Horiuchi H, Hirai H*: Purkinje-cell-preferential transduction by lentiviral vectors with the murine stem cell virus promoter.
Neuroscience Letters 443(1):7-11, 2008
 12. Sato T, Torashima T, Sugihara K, Hirai H, Asano M, Yoshioka K: The scaffold protein JSAP1 regulates proliferation and differentiation of cerebellar granule cell precursors by modulating JNK signaling.
Molecular & Cellular Neuroscience 39(4):569-78, 2008
 13. Kobayashi T, Hirai H, Iino M, Fuse I, Mitsumura K, Washiyama K, Kasai S, Ikeda K: Inhibitory effects of the antiepileptic drug ethosuximide on G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels.
Neuropharmacology 56(2):499-506, 2008
 14. Shiba K, Torashima T, Hirai H, Ogawa K, Akhter N, Nakajima K, Kinuya S, Mori H: Potential usefulness of D2R reporter gene imaging by IBF as gene therapy monitoring for cerebellar neurodegenerative diseases.
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 29(2):434-40, 2009
 - ⑮ Oue M, Mitsumura K, Torashima T, Koyama C, Yamaguchi H, Furuya N, Hirai H*: Characterization of mutant mice that express polyglutamine in cerebellar

Purkinje cells.

Brain Research 1255:9-17, 2009

【邦文】

1. 平井宏和. 小脳シナプス形成とシナプス可塑性を制御する分子・細胞メカニズム. 羊土社・実験医学 Vol. 24, No.15(増刊), 2402-09, 2006
2. 平井宏和. 神経細胞選択的な HIV 由来レンチウイルスベクターの作製法. 羊土社・実験医学 Vol. 24, No.19, 2997-3001, 2006
3. 平井宏和. グルタミン酸受容体リン酸化と運動学習制御. クバプロ・ブレインサイエンス レビュー2007, 123-40, 2007
4. 平井 宏和、東田陽博. 「子育て」「他者の認識と記憶」に必要な膜タンパク質 CD 38. 羊土社・実験医学 Vol. 25, No.11, 1707-10, 2007
5. 平井宏和. 脊髄小脳変性症 SCD マウスの運動障害を遺伝子治療で改善. 難病と在宅ケア Vol. 14, No.2, 43-6, 2008
6. 平井宏和. レンチウイルスベクターを用いた脊髄小脳変性症の遺伝子治療. THE KITAKANTO MEDICAL JOURNAL Vol. 58, No.3, 325-6, 2008
7. 平井宏和. レンチウイルスベクターの作成方法とその応用. 組織細胞化学 93-9, 2008
8. 平井宏和. 脳の遺伝子治療の可能性と展望. 生体の科学 Vol. 60, No. 1, 23-30, 2009

(2) 口頭発表

①学会

国内 17 件, 海外 2 件

②その他

国内 13 件, 海外 2 件

(3)特許出願（SORST 研究の成果に関わる特許（出願人が JST 以外のものを含む））

	件数
国内出願	1
海外出願	1
計	2

(4)その他特記事項

【Nature の論文に関して】

● プレス発表

2007 年 2 月 8 日毎日新聞、9 日朝日新聞など 8 社

【EMBO Reports の論文に関して】

● プレス発表

2008 年 3 月 14 日英国 Nature Publishing Group よりプレスリリース

2008 年 3 月 14 日読売新聞、産経新聞、21 日朝日新聞、23 日毎日新聞など国内 26 社

英国の GUARDIAN、米国の AMERICA'S DAILY、イランの TEHRAN TIMES など 4 カ国 4 社

● テレビ・ラジオ

NHK 3 月 14 日午後 12 時 15 分、18 時 15 分 首都圏ニュース

群馬テレビ 3 月 14 日午後

FM 群馬 3 月 14 日ニュース 時間不明

● その他

Euro-ataxia(ヨーロッパの運動失調症支援団体の機関誌)の Newsletter に総説掲載

9. 結び

本研究課題は研究総括である吉田光昭先生をはじめ、SORST 事務所の似鳥嘉昭技術参事、堀元事務参事、JST の辻真博主査など多くの方々の多大なご支援をいただき、当初の目標を超える進展があったと考えています。お世話になった方々に、心より感謝を申し上げます。哺乳類であるマウスモデルを用いた本研究成果により、脊髄小脳変性症の運動失調の進行が抑制できるだけでなく、改善もできる可能性を示すことができたことは、患者とその家族に希望を与えることができたのではないかと考えています。今後、患者と家族の希望が本当の喜びに代わることを目標に、サルの研究を進めるとともに安全性についても十分に検証し、臨床応用できるよう研究を続けていきたいと考えています。



- 群馬大学医学系研究科神経生理学分野のメンバー



- 本研究課題を行った研究室の様子：左の実験台はさがけ研究者に採用され神戸大学で研究を開始したときに購入し、金沢大学を経て群馬大学に研究者と一緒に移動しました。