

厚生労働科学研究費

ヒトゲノム・再生医療研究事業

霊長類を用いた脳梗塞モデルの遺伝子治療研究

平成 16 年度 研究成果報告書

平成 17 年 3 月

主任研究者 吉 川 泰 弘

国立大学法人

東京大学大学院農学生命科学研究科

総括報告、分担報告

霊長類を用いた脳梗塞モデルの遺伝子治療研究

主任研究者 吉川泰弘（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究要旨

平成 16 年度はラットやスナネズミのような齧歯類の脳梗塞モデルからサル類を用いたモデルに完全に転換した。霊長類を用いた脳梗塞モデルとして、中大脳動脈閉塞モデル、全脳虚血モデルおよび微小血管梗塞であるラクナ梗塞モデルの 3 種類の梗塞モデルの作成方法を検討した。これはラットとカニクイザルにおける梗塞後の病巣の推移が、明らかに異なることが示されたからである。ヒトを含む霊長類では微小血管梗塞後の白質の反応が強く、かつ持続することが MRI や組織形態学的に確認された。霊長類の微小血管脳梗塞モデルはヒト・ラクナ梗塞の新規モデルとして特許申請した（特願 2004-253205）。中動脈閉塞モデルは X 線透視下で大腿動脈より挿入したマイクロバルーンカテーテルを右中大脳動脈へアクセスし閉塞を試みたが、4 例いずれも梗塞作成後 3 日以内に死亡しており、条件の検討が必要である。閉塞モデルで術後 MRI により梗塞を確認した。病理検索では大脳皮質に神経細胞死およびミクログリアによる神経食現象、脳血管の鬱血が広範囲に認められた。また MRI 以外の臨床診断のためサル用に皮質脳波を解析する 18 電極から誘導した脳波を 2 次処理し、周波数解析によりトポグラフィーを可能とするソフトを開発した。センダイウイルスベクターに関しては M, F, HN の 3 遺伝子欠損ベクター大量生産システムを築いた。17 年度は、これまでのモデルの改良、解析を進めるとともに、脳梗塞治療用ベクターの大量生産、及び新世界ザルであるマーモセットと造血細胞に治療遺伝子を搭載した新規治療法の試み、微小脳梗塞領域の蛋白発現解析による新規治療遺伝子・蛋白の検索を進める。

キーワード：カニクイザル、脳梗塞、MRI、センダイウイルスベクター、遺伝子治療

呆症は患者数の多さ高齢者の QOL の低下、社会的な負担の増大から、深刻な疾患の 1 つである。

A. 研究目的

今世紀前半に、わが国は 65 歳以上の高齢者が全人口の 30% 以上を占める超高齢化社会を迎える。こうした状況は先進国の中でも日本が最初であり、モデルとなる国は存在しない。従ってこの弊害をどう克服するかは独自に解決する必要のある課題である。なかでも血管性病

本研究班はヒトに近縁な霊長類を用いて微小血管、中大脳動脈、全脳虚血モデルを作成し有効な遺伝子治療法を開発することを目的としている。治療用センダイウイルスベクターはわが国で独自に開発されたもので、遺伝子発現効率が極めて早く・高く細胞質内で遺伝子増幅が起こり宿主の DNA に影響するリスクがない。

またこれまでの研究から霊長類神経系で効率よく発現をすることをたしかめている。一方これまで齧歯類の脳虚血モデルで他のベクターを用いた場合、虚血作成以前か同時投与以外有効性はなかった。本ベクターは虚血形成後も有効であった。平成 16 年度はより安全性の高い M, F, HN の 3 遺伝子欠損ベクターの作成を試みた。これまでの研究でセンダイウイルスベクターの霊長類への適用を試み、脳梗塞動物モデルとしてラット、スナネズミモデルから、カニクイザルを用いた脳梗塞モデル系へとシフトさせた。またヒトで用いられる臨床解析法 (fMRI, 脳波、神経症状など) との比較、脳梗塞モデルにおける早期発現蛋白・遺伝子の解析を通じてより適切な治療遺伝子の検索を行う。本研究の成果はそのままヒトの臨床研究につながる、極めて有用性の高いものである。

B. C, 研究方法と結果

①ウイルスベクター：M・F 遺伝子欠失型ベクターの構築・回収に成功した。野生型ベクターと同等の遺伝子導入能・遺伝子発現能を有していたが、組織傷害性はさらに減弱していることを確認した。また大量生産可能なパッケージング細胞を作出することにも成功した。さらに M, F, HN 3 遺伝子を欠失したベクターの構築にも成功した。回収したベクターは 3 遺伝子が欠失しており、野生型と同等の感染性を有していた。

②ラクナ梗塞モデル：カニクイザルを用いて高い再現性で白質に一定の傷害部位を作製するため、サルの大脳回から白質に向けて一定の大きさの脳梗塞巣を作る方法を開発した。その

結果、白質部位に巨大な軸索損傷を形成する世界で初めてのラクナ性脳梗塞モデルを開発した。このモデルは光照射により過酸化ラジカルを発生する特殊な色素を利用した。白質における組織障害を評価するため、組織化学的に解析したところ、白質領域において非常に広範囲に炎症反応が誘起されていることが明らかとなった。この炎症反応は脳梗塞後、1 ヶ月後においても観察された。同様の処置をしたマウスの脳内においては、広範囲な白質の傷害は認められなかった。

③中大脳動脈梗塞モデル：カニクイザルを用いて X 線透視下で大腿動脈よりマイクロバルーンカテーテルを挿入した。右中大脳動脈へアクセスし閉塞を試みた。内頸動脈が頭蓋骨を貫通する部分（サイフォン部）の屈曲を越えることが困難であった。通過のできるカテーテルを検討し、閉塞モデルの作成を試み、術後に MRI で梗塞を確認した。処置 1 日目の病理検索では大脳皮質における神経細胞死およびミクログリアによる神経食現象認められ、脳血管の鬱血が広範囲に認められた。

④脳虚血モデルの作成と脳蛋白評価：バルーンカテーテルによる一過性全脳虚血の再現性のある作成方法と虚血時間の影響について検討を進めている。また他の脳梗塞モデルを含めヒトの MRI 像とカニクイザルモデルで読んだ像の類似性についても検討を進めている。脳蛋白については 2 次元電気泳動パターン、前処理効果、脳の部位別の差異、年齢の影響などについて解析を進めた。

D. 考察

加齢性に増加する脳血管障害に対する治療法の開発は世界的な急務である。そのため齧歯類を使用した脳梗塞モデルが開発され、治療候補となる薬剤の探索や、遺伝子治療・再生医療などの新医療技術開発へ向けた研究が数多く進められている。しかし、齧歯類とヒトを含む霊長類では梗塞巣に対する反応が異なり、本研究班は霊長類を用いたヒト・ラクナ梗塞モデルとして特許申請をした（特願 2004-253205）。また、これらの技術開発先進国である米国では、しばしば霊長類を用いたトランスレーショナル研究なしに、ヒトでの臨床試験が進められており、新規治療法の安全性にかかわる疑義や死亡事故などの問題が発生している。

脳梗塞後の神経細胞保護は時間との戦いで、治療効果のある保護因子の脳内での発現が早期・大量である必要がある。さらに、血液脳関門のため通常の蛋白因子は脳内に到達できないこと、脳室内投与でも脳実質に到達しにくいことなどの問題がある。センダイウイルスベクターは日本が独自に開発したウイルスベクターで、搭載遺伝子発現が 12 時間以内と早く、脳室内投与でも霊長類で 2～4 日をピークとする高濃度の神経保護因子の発現が脳実質で認められる。これまで実験的に全脳虚血モデルを起こした場合（スナネズミ）、梗塞前あるいは梗塞同時投与以外には有効性は認められなかった。GDNF 搭載センダイウイルスベクターでは梗塞後 4 時間の投与でも有効性が認められ、その効果は 28 日後でも有意であった。このような治療効果の高いベクターはこれまで知られていない。現在さらに安全な M, F,

HN 遺伝子欠損ベクターの大量生産を試みている。また我々は既に、センダイウイルスベクターについて開発時より、その安全性試験のプロトコールについて霊長類を用いて検討、確立しており、齧歯類モデルからヒトへのトランスレーショナル研究として霊長類モデルにシフトするためのノウハウを確立している。さらに再現性のある霊長類モデルの開発、幹細胞を用いた遺伝子導入と脳梗塞治療、より適切な治療遺伝子の網羅的探索、神経行動学的な治療効果の評価法の導入など、我々のグループ以外こうした研究は国内外でまだ行われていない。

E. 結論

センダイウイルスベクターに関しては大量生産可能なパッケージング細胞を作出し、M,F,HN 3 遺伝子を欠失したベクターの構築に成功した。微小梗塞モデルではカニクイザルを用いて高い再現性で白質部位に巨大な軸索損傷を形成する世界で初めてのラクナ性脳梗塞モデルを開発した。免疫組織検索では白質領域に広範な炎症反応が誘起されていることが明らかとなった。中大脳動脈梗塞モデルでは X 線透視下で大腿動脈よりマイクロバルーンカテーテルを挿入し梗塞を誘発した。処置後の病理検索では大脳皮質における神経細胞死とミクログリアによる神経食現象認められた。脳蛋白・脳脊髄液蛋白については 2 次元電気泳動パターン、パワープロット法について解析を進めた。

このように本年度は齧歯類脳梗塞モデルからサル類モデルに完全に転換し、センダイウイルスベクターに関しては第 3 世代ベクターである M,F,HN の 3 遺伝子欠損ベクターを構築した。霊

長類を用いた脳梗塞モデルとして中大脳動脈閉塞モデル、全脳虚血モデルおよび微小血管梗塞であるラクナ梗塞モデルの3種類の梗塞モデルの作成方法を検討した。特に霊長類では微小血管梗塞後の白質の反応が強く、かつ持続することがMRI や組織形態学的に確認され、この微小血管脳梗塞モデルはヒト・ラクナ梗塞の新規モデルとして特許申請した(特願 2004-253205)。

F. 研究発表

1. 論文発表 略(業績資料参照)

2. 学会発表等

特別講演、招待講演など

吉川泰弘

BSE リスク評価 厚生科学シンポジウム 2004 年 1 月(東京)

人獣共通感染症対策 新興・再興感染症シンポジウム 2004 年 2 月(東京)

感染症法の見直しと共通感染症対策 日本獣医師会 2004 年 2 月(横浜)

身近にある共通感染症 日本小動物獣医師会 2004 年 2 月(横浜)

BSE の現状と問題 食品・消費安全シンポジウム 2004 年 2 月(名古屋)

BSE の疫学 国際シンポジウム 2004 年 2 月(大手町、東京)

大型類人猿の研究資源 霊長類シンポジウム 2004 年 2 月(三島、遺伝研)

BSE のリスク評価 BSE パネル討論会 2003 年 3 月(大阪)

BSE の定量的リスク評価 日本学術会議 2003 年 4 月(東京)

BSE リスク管理とリスクコミュニケーション 農水省懇

談会 2003 年 4 月(東京)

類人猿情報ネットワーク(GAIN)の活動 日本霊長類学会 2003 年 7 月(犬山、岐阜)

サル類の造血器系疾患 サル類の臨床と病理研究会 2004 年 7 月(麻布大・神奈川県)

内分泌攪乱科学物質の神経発達への影響 日本精神薬理・神経生理学会 2004 年 7 月(東京)

BSE リスク評価と問題点 食と健康に関するフォーラム 2004 年 7 月(東京)

わが国の BSE リスク評価 厚生省公衆衛生研修会 2004 年 9 月(東京)

感染症法・狂犬病予防法の見直し 獣医学会若手研究会 2004 年 9 月(北海道)

人と動物の共通感染症 日本獣医学会・市民講座 2004 年 9 月(北海道)

動物実験と生命科学 日本実験動物協会白河研修 2004 年 9 月(栃木県・白河)

動物由来感染症法改正について 実験動物生産者研修会 2004 年 9 月(東京)

BSE 中間とりまとめについて BSE リスクコミュニケーション 2004 年 9 月(東京)

BSE 中間とりまとめ BSE リスクコミュニケーション 2004 年 10 月(北九州市)

環境ホルモンの神経系への影響 CREST 国際シンポジウム 2004 年 10 月(東京)

環境ホルモンと神経発達 自閉症等に関する市民講座 2004 年 10 月(東京)

わが国 BSE リスク 岩手県公衆衛生部会 2004 年 11 月(岩手県)

動物由来感染症のリスク分析 長崎大 COE 国際シンポジウム 2004 年 11 月(長崎県)

動物由来感染症 日本実験動物学会維持懇談会セミナー 2004 年 11 月(東京)

サル類を用いた環境ホルモンのリスク評価 神経行

動研究会 2004 年 12 月 (東京)
 日本の BSE リスク分析 農水省リスクコミュニケーション 2004 年 12 月 (東京)
 BSE リスク評価とコミュニケーション 食品安全フォーラム 2004 年 12 月 (東京)
 動物実験と技術師の役割 予防衛生協会セミナー 2004 年 12 月 (茨城県つくば市)
 サル類の輸入検疫と国際法・国内法 サル類の臨床と病理研究会 2004 年 12 月 (つくば市)
 動物由来感染症の見直しについて 東京都獣医師会 2005 年 1 月 (東京)
 人獣共通感染症 日本薬剤師会セミナー 2005 年 2 月 (大阪)
 免疫学の最近の進歩 都立戸山高校研修 2005 年 2 月 (東京)
 BSE のリスク管理 厚生省講習会 2005 年 2 月 (東京)
 人獣共通感染症について 日本薬剤師会セミナー 2005 年 2 月 (東京)
 BSE のリスク管理見直しの評価 日本獣医師会

2005 年 2 月 (新潟)
 トレーサビリティについて 食と健康シンポジウム 2005 年 2 月 (東京)
 牛肉のトレーサビリティ 食と健康シンポジウム 2005 年 2 月 (名古屋)
 サル類を用いた脳梗塞モデルの遺伝子治療 厚生省市民公開シンポ 2005 年 2 月 (東京)
 人獣共通感染症と感染症法 奈良県公衆衛生講習会 2005 年 2 月 (奈良県)
 動物由来感染症と法律 日本実験動物協会教育フォーラム 2005 年 3 月 (京都)
 動物由来感染症 BAMS A 研修会 2005 年 3 月 (東京)

G. 知的所有権の出願・登録状況

霊長類を用いたヒト・ラクナ梗塞モデル
 (特願 2004-253205)

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究分野)

分担研究報告書

脳梗塞モデル治療のためのセンダイウイルスベクター作成と改良

分担研究者 井上 誠 ディナベック株式会社

研究要旨 センダイウイルス(SeV)ベクターを遺伝子治療用ベクターとして開発するにあたって、SeV ゲノムから遺伝子を欠失し或いはアミノ酸変異を導入し、安全性を高める改変を実施してきた。これまでに、F 遺伝子欠失型或いは M 遺伝子欠失型 SeV ベクターの構築に成功していた。F 遺伝子を欠失することにより、安全性が高い非伝播型ベクターへの改変に成功し、遺伝子治療或いは広範な遺伝子導入ベクターとして使用可能になった。また M 遺伝子を欠失することにより、感染細胞からの粒子形成が消失し、制御可能な制限増殖型ベクターへの改変に成功し、特に癌治療への応用の可能性を示した。脳梗塞に対する遺伝子治療を想定した場合には、更に安全性の高いベクターへの改変が望まれていることから、複数の遺伝子を同時に欠失したベクターの構築を試みた。このような遺伝子欠失型ベクターを回収するには、欠失した遺伝子を強発現するパッケージ細胞の作出が必須であり、その細胞の作出こそがベクター構築の成否そのものである。今回、M/F 2 遺伝子の同時発現細胞とともに、M/F/HN 3 種の蛋白を同時に強発現する細胞の作出に成功した。則ち、M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターの構築が可能になった。現在は、GFP のマーカー遺伝子搭載ベクターのみにについての構築の成功であるが、今後、神経栄養因子などの治療用遺伝子を搭載した、改良型ベクターの構築を実施していく。

A. 研究目的

センダイウイルス(SeV)ベクターを脳梗塞遺伝子治療に応用可能な安全なベクターに改良することを目的としている。また、実際に治療用遺伝子を搭載したベクターを構築し供給することが必要である。

SeV は、一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。ゲノム RNA は、ヌクレオカプシッド(NP)蛋白と非常に強く結合しており、この状態でのみ RNA 合成の鋳型活性を有する。

野生型ウイルス(全長 15,384 塩基)のゲノム RNA には主に6個の遺伝子がコードされ、3'端から順に NP 蛋白質遺伝子、RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化蛋白質(P)遺伝子、ウイルス粒子構造を内側から維持し、ウイルス粒子のアセンブリーと出芽に関与するマトリックス蛋白質(M)遺伝子、そして宿主細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質(F)遺伝子と結合に関わる赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ(HN)遺伝子、最後に RNA ポリメラーゼの大

サブユニットである巨大(ラージ)蛋白質(L)遺伝子が直線的に並んでいる。各遺伝子がコードするタンパク質のうち、NP, P 及び L の3種類のタンパク質は、ウイルスのゲノム RNA とともに転写・複製の鋳型となり、自律複製可能なレプリコンであるゲノム RNA-タンパク複合体(ribonucleoprotein complex、RNP)を形成する。

それぞれの遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し、単独の mRNA として転写され、それぞれ一個の蛋白質が翻訳される。例外的に P 遺伝子からは P 蛋白質以外に、異なる蛋白質読み枠を利用して翻訳される非構造蛋白質(C)と P mRNA の読み取り途中での RNA 編集により読み枠が変えられてできる蛋白質(V)の3つが翻訳される。このような方法により、総計8種類の蛋白質が産生される

SeV ベクターを遺伝子治療用ベクターとして開発するにあたって、SeV ゲノムから遺伝子を欠失し或いはアミノ酸変異を導入し、安全性を高める改変を実施してきた。これまでに、F 遺伝子欠失型或いは M 遺伝子欠失型 SeV ベクターの構築に成功していた。F 遺伝子を欠失することにより、安全性が高い非伝播型ベクターへの改変に成功し、遺伝子治療或いは広範な遺伝子導入ベクターとして使用可能になった。また M 遺伝子を欠失することにより、感染細胞からの粒子形成が消失し、制御可能な制限増殖型ベクターへの改変に成功し、特に癌治療への応用の可能性を示した。

SeV ベクターを *in vivo* に直接投与した場合には、*in vitro* における感染(遺伝子導入)のような持続感染には至らないことが多く、遺伝子発現は数日～数週間の場合が多い。これはベクターに対する免疫反応が惹起されるためであり、センダイウイルスベクター由来の遺伝子を出

来るだけゲノムから欠失していくことによりその減弱がはかられる。特に、脳梗塞に対する遺伝子治療を想定した場合には、高い安全性を有するベクターへの改変が望まれていることから、複数の遺伝子を同時に欠失したベクターの構築を試みた。

B. 研究方法

遺伝子欠失型ベクターを回収するには、欠失した遺伝子を強発現するパッケージング細胞の作出が必須であり、その細胞の作出こそがベクター構築の成否そのものである。則ち、M/F 遺伝子欠失型ベクターの回収には、M/F 2 遺伝子を強発現する細胞、M/F/HN 3 遺伝子欠失型ベクターの回収には、M/F/HN 3 遺伝子を強発現する細胞の作出が必要である。

既に構築していた F 発現細胞をベースに、M 遺伝子、および HN 遺伝子を順次導入した。それぞれの蛋白の発現には、Cre-loxP システムを利用し、Cre 蛋白依存的に発現が誘導される方法を採用した。常法に従い、選択マーカーに対する薬剤で選択した後に、各蛋白の発現量および実際のベクター生産量を定量して細胞を選択した。

回収されたベクターについては、ベクター遺伝子構造レベル、蛋白レベルでの構造確認を行い、*in vitro* および *in vivo* での性能評価を実施した。今回構築に成功したのは、マーカーである GFP 遺伝子を搭載したベクターであるので、治療としての性能評価ではなく、ベクターそのものについての性能評価に限定される。

C. 研究結果

M および F の 2 遺伝子欠失型ベクターの構築・回収に成功し、wild type および F 遺伝子欠失

型ベクターと同等の感染性(遺伝子導入能)・遺伝子発現能を有しており、組織傷害性などはさらに減弱していることを確認した。M 蛋白質の強発現は細胞傷害性を惹起するため、M 蛋白質を持続発現する細胞の作出は困難であることが予想されたが、細胞の馴化を繰り返すことで、大量生産可能なパッケージング細胞を作出することにも成功した。

M,F,HN 3 遺伝子を欠失したベクターの構築にも成功した。回収したベクターは確かに3遺伝子が欠失しており、M/F 2 遺伝子欠失型と同様に、wild type および F 遺伝子欠失型ベクターと同等の感染性(遺伝子導入能)・遺伝子発現能を有していることを *in vitro* および *in vivo* の両者で確認した。免疫原性に関しては現在解析を行っている所であるが、ベクターを直接体内に投与する場合と、遺伝子導入(感染)細胞を移植する場合(*ex vivo*)とでの比較検討も行っている。また、M/F/HN 3 遺伝子発現細胞については、現時点では、実験室レベルのみでのベクター調製が可能な状況である。今後、ベクター生産・調製効率の向上を測っていく必要があり、さらに神経栄養因子などの実際の治療用遺伝子を搭載した M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターを調製することで、治療という側面での評価も推進していかなければならない。

E. 結論

M および F の 2 遺伝子欠失型 SeV ベクターおよび M,F,HN 3 遺伝子を欠失した SeV ベクターの構築に成功した。即ち、M/F 2 遺伝子および M/F/HN 3 遺伝子を強発現するパッケージング細胞の作出に成功した。特に、M,F,HN 3 遺伝子を欠失したタイプのベクターでは、エンベロープ関連遺伝子全てをゲノムから欠失してお

り、免疫原性減弱が可能になるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shirakura M, Inoue M, Fujikawa S, Washizawa K, Komaba S, Maeda M, Watabe K, Yoshikawa Y, Hasegawa M. Postischemic administration of Sendai virus vector carrying neurotrophic factor genes prevents delayed neuronal death in gerbils. *Gene Ther.* 11(9), 784-90 (2004)

2) Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Shirakura M, Kanaya T, Yoshizaki M, Hironaka T, Nagai Y, Iida A, Hasegawa M. Recombinant Sendai virus vectors deleted in both the matrix and the fusion genes: efficient gene transfer with preferable properties. *J Gene Med.* 6(10),1069-81 (2004)

2. 学会発表

1) Inoue M, Yoshizaki M, Tokusumi Y, Hironaka T, Ban H, Nagai Y, Iida A and Hasegawa M. Sendai virus vectors without all of the envelop-related genes: Successful recovery and characterization of the three genes (matrix, fusion and hemagglutinin-neuraminidase)-deleted vectors. The 6th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy (ASGT) (2004)

2) Inoue M, Yoshizaki M, Tokusumi Y, Hironaka T, Ban H, Nagai Y, Iida A and Hasegawa M. Successful recovery and characterization of all of the envelop-related genes (matrix, fusion and

hemagglutinin-neuraminidase)-deleted Sendai virus vectors. 第8回日本遺伝子治療学会 (2004)

3) 井上誠、吉崎真理子、徳炭由美子、弘中孝史、伴浩志、永井美之、飯田章博、長谷川護:M, F, HN エンベロープ関連3遺伝子全てを欠失したセンダイウイルスベクター作出の成功とその性能評価。第52回日本ウイルス学会 (2004)

分担研究報告書

小血管性脳梗塞モデルの作成と遺伝子治療の有効性評価

分担研究者 久恒辰博（東京大学 大学院新領域創成科学研究科）

研究要旨：

ラクナ梗塞を再現するサル類（カニクイザル）モデルの開発を行い、小血管性脳梗塞モデルの作成に成功した。このカニクイザルモデルにおいて、大脳新皮質に微小の脳梗塞を作製することにより、直下の白質部位に巨大な軸索損傷が形成されることが認められた。

A. 研究目的

高齢社会が一段と加速するわが国において、高齢者の心と体の健康をいかに高めていくかが、大きな課題となっている。脳の老化については、ここ数年非常に研究が進み、その原因のひとつに、脳組織内を走行する微細な血管が血栓等により閉塞することで、周囲の脳細胞が障害死滅することがあげられている。

また、近年の研究によって、画像診断によって識別される脳組織障害の周囲にびまん性の広範囲に及ぶ組織変化が引き起こされ、これによって大脳半球内のニューロン群を連結する多くの神経線維にダメージが及ぶことで、認知機能障害が発症してしまうことが論じられている。

そこで、白質部位が傷害される脳梗塞モデルを開発するために、脳構造、遺伝子、蛋白質等の生物情報が多く、医科学実験に用いられている、代表的な非ヒト霊長類実験動物であるカニクイザルを選定し、本研究において新しい疾患モデルの作出を行った。

B. 研究方法

本研究においては、高い再現性で白質部位に一定の傷害部位を作製するために、サルの大脳回（Cerebral gyrus）の部位から白質に向けて一定の大きさの脳梗塞巣を作る方法を採用した。このモデルにおいては、光照射により過酸化ラジカルである一重項酸素を発生する特殊な色素（ローズベンガル）を利用した。あらかじめ、実験動物にローズベンガルを注入し、脳血管内に浸潤するのを待って、実験動物の頭皮を切開し頭骸骨の上から一定量の光を照射した。この処置により、光照射部位において、微小な毛細血管内に過酸化ラジカルが発生し、数段階のカスケード反応を経てこの毛細血管が閉塞し、結果的にこの血管が栄養を供給していた脳組織に虚血性の障害が誘導された。

倫理面への配慮）

全ての動物試験は、所属施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

白質部位における組織障害を評価するために、炎症反応により誘起されるグリア細胞内のたんぱく質であるGFAPに対する抗体を用いて脳梗塞後のサル脳組織を組織化学的に解析した。その結果、脳梗塞部位に近接する白質領域において、非常に広範囲に炎症反応が誘起されていることがわかった。この炎症反応は、脳虚血手術の後、1ヵ月後においても観察されており、このような広範囲な白質の障害により、血管性痴呆の症状が出現してしまうことが推定された。なお、同様の処置をしたマウスの脳内においては、広範囲な白質の傷害は認められておらず、この病変はヒトを含めた霊長類に固有の特質であることが示唆された。

D. 考察

脳梗塞による病的な脳組織の変化が、痴呆症へとつながってしまうことが論じられている。脳血管性痴呆の場合、大脳半球内の白質と呼ばれる神経線維が集まった部位に小型の脳梗塞が無数に観察される。MRI画像診断によりこのような変化を見ることができるのだが、どうして、このような小型の脳梗塞であっても、ヒトの認知機能を奪ってしまう痴呆症を引き起こしてしまうかについて、今まで脳外科分野における大きな謎であった。本研究の結果（微小な脳梗塞であっても、直下の白質部位に巨大な軸索損傷が形成されていたこと）より、その理由の一端を推察することが可能になった。

E. 結論

カニクイザルにおいて大脳新皮質に微小の脳梗塞を作製することにより、直下の白質部位に巨大な軸索損傷を形成する世界で初めてのラクナ性脳梗塞モデルを開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sato Y; Koketsu D; Ageyama N; Ono F; Miyamoto Y; Hisatsune T “Successful retrograde transport of fluorescent latex nanospheres in the cerebral cortex of the Macaque Monkey” *Experimental Animal*, 53, 383-386 (2004)

2. 学会発表

- (1) Sato Y; Ageyama N; Ito H; Aizawa K; Yokoyama C; Terao K; Yoshikawa Y; Miyamoto Y; Tatsuhiro Hisatsune “Induction of targeted cerebral ischemia in Macaque monkeys” 34th annual meeting of society for neuroscience, San Diego, Oct. 23-27, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 久恒辰博, 川原信隆, 吉川泰弘
「ラクナ性脳梗塞の非ヒト霊長類疾患モデル動物」 特願 2004-253205
(2004. 8. 31)

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 東京大学

氏名 久恒辰博

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato Y; Koketsu D; Ageyama N; Ono F; Miyamoto Y; Hisatsune T	Successful retrograde transport of fluorescent latex nanospheres in the cerebral cortex of the Macaque Monkey	Experimental Animal	53	383-386	2004

領域選択的脳虚血

虚血を誘導したい部位を露出させる。

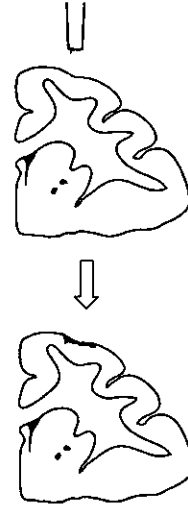
↓
光感受性の色素 (Rose Bengal) を静脈から注入し、全身に灌流させる。

↓
露出させた部位に、コールドライト (波長の定まったレーザー光でなくてもよい) を照射する。

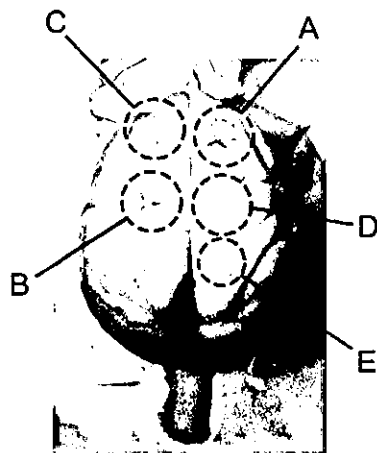
↓
Rose Bengal が photoactivation を起こし、活性酸素を生じる。

↓
ライト照射部位に存在する微細な血管の内皮細胞が傷害され、血栓ができる。

↓
ライト照射部位にのみ選択的に虚血を誘導できる。



領域選択的脳虚血 — 虚血後の脳の外観 —



- (A) 虚血後10日目
(20分間ずつ4か所に光照射)
- (B) 虚血後10日目
(20分間1回光照射)
- (C) 虚血後1日目
(20分間ずつ4か所に光照射)
- (D) 虚血後1日目
(20分間1回光照射)
- (E) ローズベンガル投与の前に20分間
1回光照射した対照部位(1日後)

A-Dの領域には梗塞巣に特徴的な外見的变化が見られるが、Eの領域にはそのような変化は観察されない。

領域選択的脳虚血 — 虚血1日後の梗塞巣の状態(1) —



光照射を4か所に施した部位 (Cresyl violet染色)。組織の劣化が激しく、健常部位から剥離している部分も見られる。Scale bar = 5 mm。

以降の解析は光照射を1回のみとした部位で行う。



光照射を1回のみとした部位 (Cresyl violet染色)

(A) 運動野に生じた梗塞巣。

(B) 正常部位の拡大写真。

(C) Infarct border (梗塞巣の外縁部) の拡大写真。正常部位に比べてニューロンの数が減少しており、細胞死の途上にあるニューロンも観察される(矢頭)。

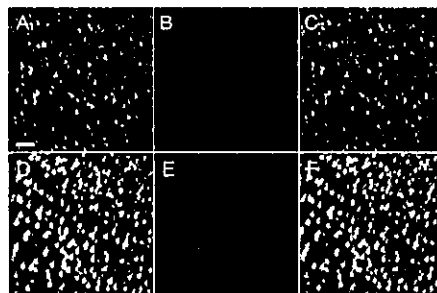
(D) Core (梗塞巣の中心部) の拡大写真。

ニュー

ロンは全く見られない。

Scale bar in A = 5 mm and in B = 50 μ m (also

領域選択的脳虚血 — 虚血1日後の梗塞巣の状態(2) —



梗塞巣におけるニューロンの脱落

(A-C) 梗塞巣 (core)

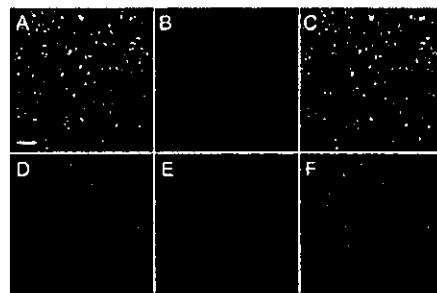
(D-F) 健常部位

(A, D) NeuN (green)

(B, E) DAPI (blue)

(C, F) Merged

Scale bar = 50 μ m



梗塞巣におけるアポトーシスの検出

(A-C) Coreの領域

(D-F) Infarct border

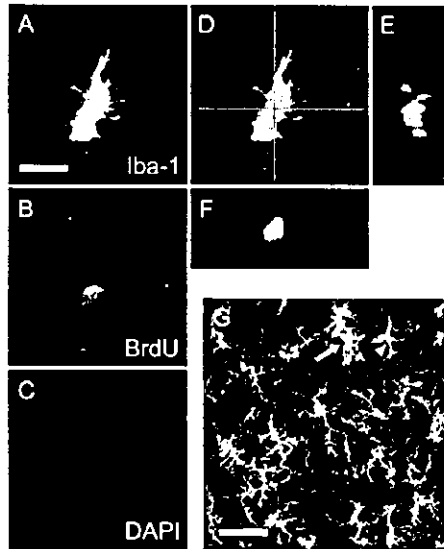
(A, D) TUNEL (green)

(B, E) DAPI (blue)

(C, F) Merged

Scale bar = 50 μ m.

領域選択的脳虚血 — 虚血1日後の梗塞巣の状態(3) —



ミクログリアの分裂と活性化

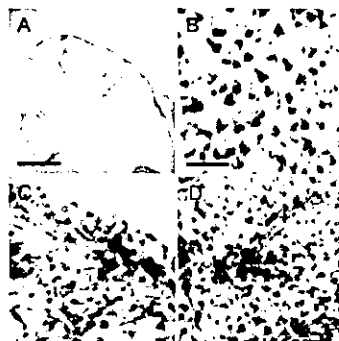
(A-D) 活性化し、形態変化を起こしたミクログリアの高解像度顕微鏡像。

(A) Iba-1 (green). (B) BrdU (red). (C) DAPI (blue). (D) Merged. (E) The y-z cross section of D. (F) The x-z cross section of D.

(G) Infarct borderの領域(写真右上方向)および健常部位(写真左下方向)におけるミクログリアの分布。活性化し、増殖しているミクログリア(矢印)や、増殖中ではないが形態変化を起こしているミクログリア(矢頭)が観察される。

Scale bar in A = 20 μ m for A-F, in G = 50 μ m.

領域選択的脳虚血 — 虚血10日後の梗塞巣の状態(1) —



Cresyl violet染色。

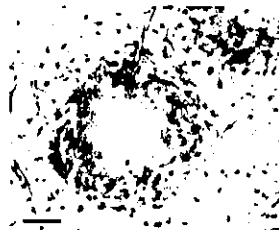
(A) 運動野に生じた梗塞巣。黒い斑点のように細胞集団が見える。

(B) 正常部位の拡大写真。

(C) 皮質表層部に見られる細胞集団の拡大写真。

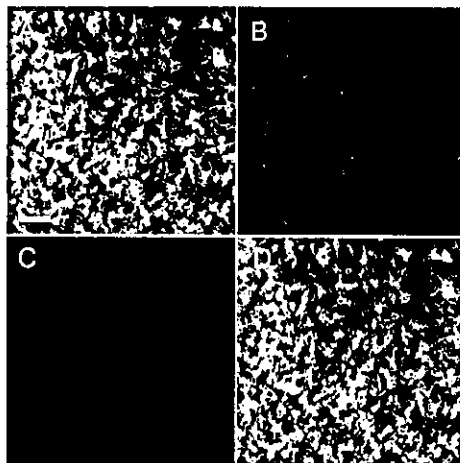
(D) Infarct borderに見られる細胞集団の拡大写真。血管の周囲に細胞が集まっている様子がわかる。

Scale bar in A = 5 mm and in B = 50 μ m (also for C and D).



さらに、Coreの部分に存在する血管(細小血管であると考えられる)の周囲に特に密な細胞集団が見られる。Scale bar = 50 μ m.

領域選択的脳虚血 — 虚血10日後の梗塞巣の状態(2) —



ミクログリアの分裂と活性化

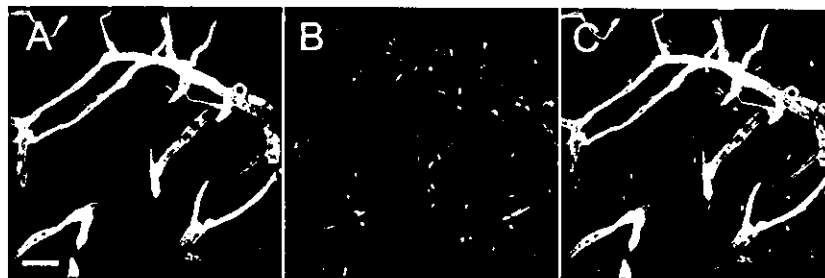
Infarct borderにおける活性化ミクログリア。

- (A) Iba1 (green)
- (B) BrdU (red)
- (C) DAPI (blue)
- (D) Merged

Scale bar = 50 μ m.

脳の表層およびcoreの部分の血管周辺においても、左図と同様な活性化型ミクログリアの分布が確認できた。

領域選択的脳虚血 — 虚血10日後の梗塞巣の状態(3) —



虚血後10日目におけるinfarct border領域での抗ラミニン免疫抗体染色。
(A) Laminin (green)。 (B) BrdU (red)。 (C) Merged. Scale bar = 50 μ m。
ラミニンに沿うように存在するBrdU陽性の核が多く見られる。

⇒ 血管新生が起こっている可能性を検討中。

大血管性脳梗塞モデルの作成と遺伝子治療の脳機能による評価

分担研究者 小野文子（社団法人 予防衛生協会）
協力研究者 間瀬光人（名古屋市立大学 脳神経外科）
和田直巳（山口大学農学部 獣医生理学）
川原信隆（東京大学 脳神経外科）
飯島 明（東京大学 医学部付属病院）

研究要旨

血管性脳障害に対する治療法の開発は世界的な急務であり、ヒトへの応用を考えた場合、脳の構造と機能がヒトと類似した霊長類モデルは不可欠である。今年度3例のカニクイザルにおいて、マイクロカテーテルを用いた中脳大動脈閉塞による局所梗塞モデル作成を試みた。梗塞術後明らかな臨床症状とMRIによる梗塞像が確認された。しかし、梗塞部位が広範となり、障害の程度が著しかったことから、今後は梗塞時間、梗塞部位の特定により、治療研究の評価に適切なモデル系確立を行っていく。また、MRIによる梗塞の評価については脳損傷の広がりや非侵襲的、経時的に描出でき、非常に有用な手段であった。今後、適切なモデル系の確立とともに、脳波トポグラフ、行動解析、さらにfMRIを組み合わせた評価系を確立することにより治療研究に躍進的な発展に寄与するものと考えられる。

キーワード：カニクイザル、脳梗塞、MRI、脳波トポグラフィー

A. 研究目的

高齢化社会を迎え老人病、なかでも血管性痴呆症は患者数の多さ、高齢者のQOLの低下・孤立化をもたらすだけでなく、社会的な負担も著しく増大させる最も深刻な疾患である。

本研究はヒトへのトランスレーショナルリサーチとして、カニクイザルの大血管脳梗塞モデルを作成し、センダイウイルスベクターを用いた脳梗塞治療法等の開発研究において臨床応用可能なプロトコルを作成しようとするものである。

脳梗塞モデル作成はヒト脳梗塞に近いモデル系確立のために、脳内にマイクロカテーテルを留置し、再灌流を行う方法について検討した。

梗塞の評価には認知機能、MRIによる画像診断、脳波解析等の指標を用いて評価系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 動物

カニクイザル3頭（22歳雌、5歳雌、及び10歳雄）を用いて脳梗塞モデルの作成を試みた。

2. 局所脳梗塞モデル作成

イソフルレン全身麻酔下において、サルの大脳動脈よりレントゲン透視下でマイクロカテーテルをマイクロガイドワイヤーとともに脳内の右中大脳動脈まで進めた（Fig. 1）。このマイクロカテーテルを右中大脳動脈血管内に留置し一定時間虚血後カテーテルを抜去することにより、再灌流モデルの作成を試みた。

3. MRI撮像

MRI撮像は3T MRI装置（MAGNETOM Allegra [Siemens 社]）を用い、術前および、術中、術後および術後1日目に実施した。組織灌流画像（perfusion）撮像は、静脈ラインを確保し、造影剤（ガドジアミド水和物水溶液）を撮像中に投与した。動物は麻酔下で全身を保温しマグネットボア内に頭部を固定し撮像を行った。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高いS/Nを持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルのCP型コイルを用いて撮像した。MRIによる評価条件として、T1, T2, プロトン強調画像、perfusion 及び diffusion 画像を用いた。

4. 行動解析

脳梗塞モデル作成手術の術前および、術後のビデオ撮影、神経機能を指標として指定行動観察および、運動機能評価としてのアップルテストを実施した。アップルテストはケージ両側に

配置したトレーにおいたリングを手を伸ばしてとる行動について評価を行った。

5. サル用脳波トポグラフィープログラムの作成

脳機能の時間分解能、そして電氣的活動の評価として脳波測定を行っていくにあたり、客観的変動をモニターするためにサル用のプログラム作成を行った。

C. 研究結果

1. 脳梗塞モデル作成

当初の目的としてバルーンカテーテルによる血管閉塞を考え、全身麻酔下においてレントゲン透視により大腿動脈よりマイクロバルーンカテーテルを挿入し、右中大脳動脈へのアクセスを試みたが、内頸動脈が頭蓋骨を貫通する部分（サイフォン部）の屈曲を越えることができなかった。そのため、バルーンカテーテルより径が細くスムーズな先端を持つマイクロカテーテルによる閉塞を試みた。中大脳動脈へのアクセスは外径 0.0165inch (Excelsior SL-10) および 0.021inch (Renegade18) とともに可能であった (Fig. 2)。1 例目では、カテーテルのみの閉塞では造影剤が停留せず完全閉塞でないと判断し、液体塞栓物質 (Eudragid) を注入して永久閉塞モデルを作製した。また、2, 3 例目においてはレントゲン造影によりカテーテル挿入部からの閉塞を確認しそれぞれ 6 時間、3 時間の閉塞を試みた (Fig. 3)。1 例目および、3 例目においては脳内におけるカテーテル操作時に目的以外の脳血管を傷つけた可能性が考えられた。

2. MRI 撮像

T1, T2 プロトン強調画像については梗塞作成後より梗塞部の所見が観察された (Fig. 4)。しかし、虚血中の撮像ではカテーテル先端の金属部分によりアーティファクトが認められたため、3 例目ではカテーテル先端を切断することにより、虚血中の撮像においてもアーティファクトを除去することができた。しかし、脳梗塞において唯一治療可能な領域 Penumbra (細胞膜電位が破綻するまでは脳血流が低下していないが、細胞として機能できない状態：完全虚血部と正常部の境界領域) 領域の評価に有効な Diffusion および、Perfusion 画像はヘッドコイル外にあるカテーテル挿入部のシーズにある金属にもアーティファクトが検出され、また撮像条件も微細領域の評価を行うことの

できる条件にはなっておらず、撮像条件の検討が必要と考えられた。

3. 神経症状評価

今回行った永久閉塞、6 時間および 3 時間閉塞においても障害部位が広範に及んだため、永久閉塞を行った 1 例目においては、術後覚醒は確認したが、起立不能で左側（閉塞の反対側）の麻痺が認められ、翌日に死亡した。

6 時間閉塞を行った 2 例目では翌日の朝座位が可能であったが、MRI 撮像後麻酔覚醒後も横臥状態となり、3 日目に死亡した。3 時間閉塞を行った 3 例目では 2 例目と同様、術後には横臥していたものの、翌日には座位にあったが、MRI 撮像中に死亡した。以上の結果より、今回行った 3 例においては、術後の行動解析は実施できなかった。また、2 例目で実施した術後の血液検査では CPK 1,672,000 IU/L, LDH 58,200 IU/L と異常高値を示し、脳障害が著しいことが示唆された。

1. サル用脳波トポグラフィープログラムの作成

一般に動物で行なわれている脳波検査法 (4-8 の電極を使う) を今回のプロジェクトの機能評価法として改善を行った。改善のポイントは①電極数を増やし大脳皮質の活動に関する情報を増やす、②脳波 2 次処理により脳の異常部位の特定、その障害の程度の判定の速度的、精度的充実をはかることの 2 点である。電極を増やすには、1 つ 1 つの電極の電位を記録する範囲を小さくする、つまり電極先端を小さくするために、直径約 100 μm のテフロンコティングステンレス線の先端の皮覆を約 1mm はがしたものをを用い、16-18 個の電極を頭皮下に刺入して測定を行うこととした。電極の配置は頭頂部を基点として放射線状に配置する。すでにこの方法の有用性はビーグル犬を用いた予備実験で確認されている。次に 2 次処理については日本光電 (メディカルトライシステム) とサル用の脳波解析ソフトを開発した。Memcalc (最大エントロピー法) を用いた解析ソフトであり、周波数解析によって power および振幅によるトポグラフィーを可能にした。またそれぞれの周波数帯のパワーの時間経過を表示できるようにした (Fig. 5)。

D. 考察

高齢化社会を迎え、血管性脳障害に対する治