

療法の開発は世界的な急務であり、治療薬の探索や、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進められている。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。

今回行った中脳大動脈閉塞による局所梗塞モデルでは、いずれも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、梗塞部位の特定を行うことにより、適切なモデル系作成が可能となると考えられた。さらに、今回用いたカテーテルは市販されているヒト用の最も細い血管用カテーテルを用いたが、サルの脳血管に適応するデバイスの開発とともに、カテーテルを用いた脳血管閉塞は高度な技術が要求されることから、さらに再現性のある安定したモデル系を確立する方法についても検討する必要があると考えられた。また、死亡原因は脑梗塞部位が広範に及んだことが原因であると思われるが、麻酔の影響についても検討が必要であると考えられた。通常短時間のMRI撮影については動物の不動化のために塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔を行っている。脑梗塞作成時は長時間の手術処置を伴うため、塩酸ケタミン導入後にイソフルレン吸入麻酔により動物を維持する方法をとった。翌日まで生存し、起立していた2例では術後1日目のMRI撮像のため、塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔により撮像を行ったが、麻酔中もしくは麻酔後に急激に状態が悪化した。キシラジンは α 2レセプターを活性化する麻酔薬であるがイヌでは一過性の血圧上昇が報告されている。一方、サルでの報告は認められず、また、当施設でこれまで行った麻酔においても明らかな血圧の上昇が認められた症例はないが、梗塞後の動物にとってなんらかの病態増悪の誘因になっている可能性が考えられたことから、今後、術後の麻酔方法について再検討を行っていくこととした。

MRIによる梗塞の評価については脳損傷の広がり为非侵襲的、経時的に描出でき、非常に有用な手段であり今回撮像を行ったT1、T2およびプロトン強調画像においても経時的な病態変化が観察された。今後、MRIの拡散強調画像(diffusion weighted image; 組織内の水分子の拡散の早さと方向をパラメータとして画像化する方法)と造影剤を用いた組織灌流画像(perfusion weighted image; 外因性物質の血

管内の通過を測定し画像化する方法)を用いた病態解析は早期診断および治療効果の評価に応用できることから、サルの撮像条件及び、データ解析方法について検討を進めていきたい。

今回は症状の進行が著しく梗塞後の脳機能評価は行えなかった。脑梗塞、血管障害性痴呆などの大脳皮質の機能障害は運動、姿勢に症状を起こすことから、行動ビデオデータを用いた画像解析およびアップルテストによる解析が有用と考えられた。手による対象の操作は二足歩行と並んで霊長類を特徴つける機能である。高次脳機能評価系として4段指迷路試験、記憶測定のための色課題試験を行い、治療の効果を判定する。他方、脑梗塞、痴呆の診断に、高次脳機能解析として利用する指迷路試験の際に、この操作刺激に基づく全脳の神経活動を一举に観察することができ、その部位同定が容易である利点を有するfMRIを用いた解析方法を検討することにより、高次脳機能評価系を確立していく予定である。

脳波は生体のあらゆる情報が投射し、その情報をもとに運動および精神活動の指令を決定するという統合制御を行う大脳皮質の活動を記録するものであり、さらにダイポールレーシングなどの2次処理によってはその活動を発現させる脳深部の機能の評価することのできる方法である。とくに脳機能の時間分解能、そして電気的活動の評価には最もすぐれた方法の1つである。また操作が簡単であるので非侵襲的機能評価法と非常にすぐれた方法である。サル用のトポグラフィープログラムを用いることにより、大脳皮質の詳細な機能の異常部位、程度の評価を経時的に行うことが可能になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

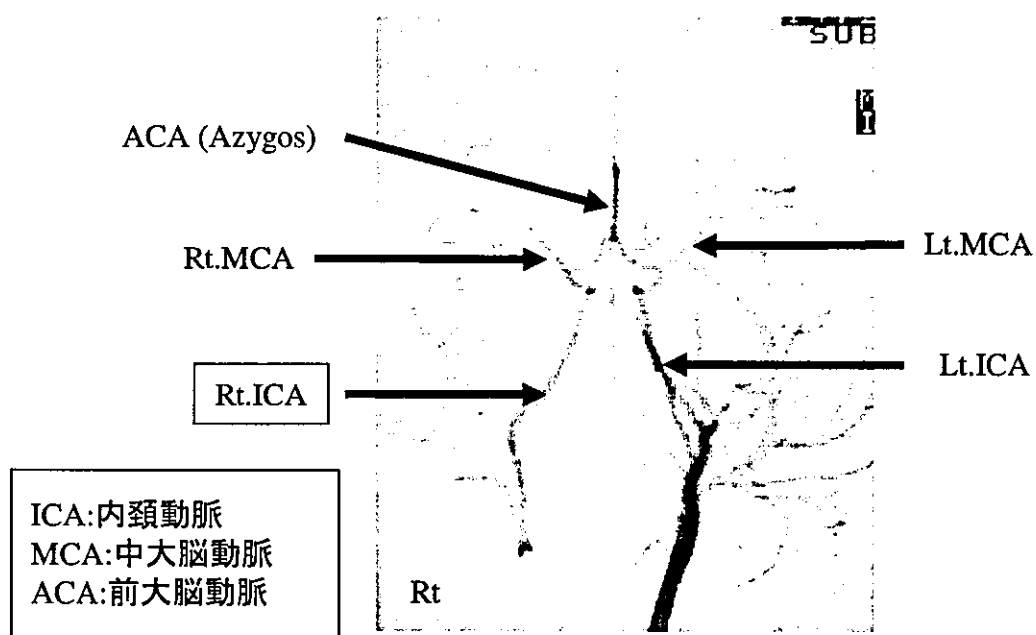


Fig.1 カニクイザルの脳血管像:症例2における左総頸動脈からのレントゲンによる血管造影

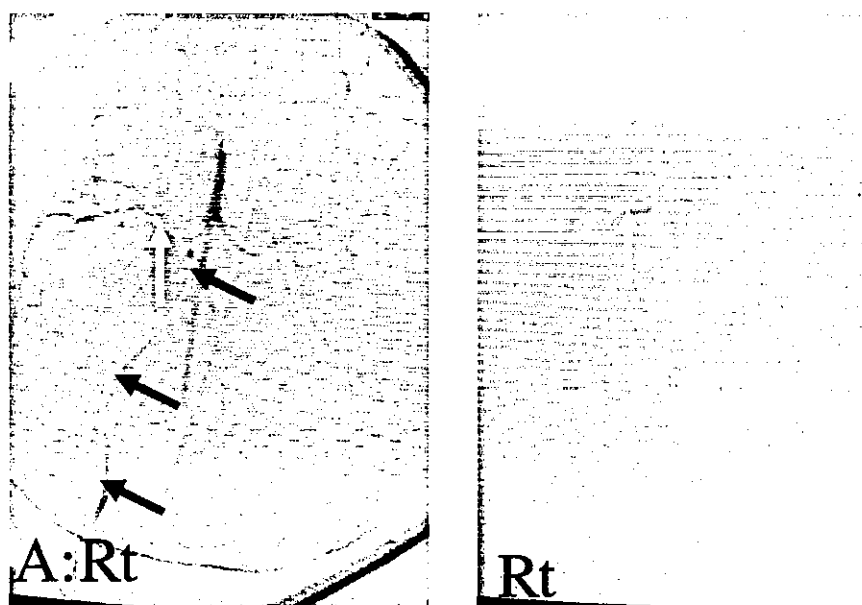


Fig.2 右中脳大動脈へのマイクロカテーテル留置(症例2)
A: Road Map下にマイクロカテ(矢印)を挿入
B: 中大脳動脈(白矢印)におけるマイクロアンギオ



Fig. 3 マイクロカテーテルによる右中脳大動脈閉塞(症例2)
 A:マイクロカテーテル(矢印)を留置後、左頸動脈から造影
 B:左頸動脈からの造影により、ロードマップにより右中大脳動脈が閉塞して血管が造影されないことを確認

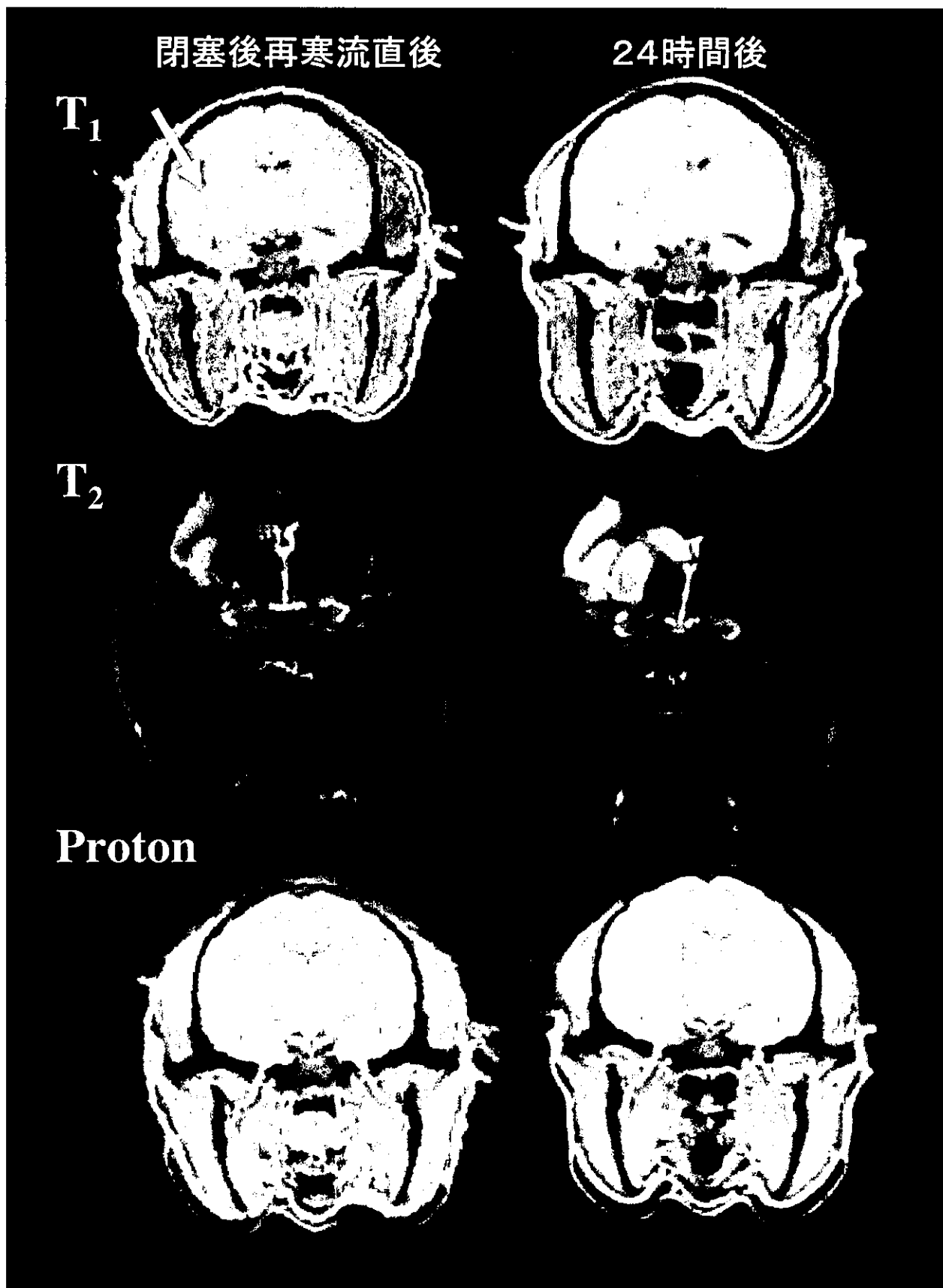
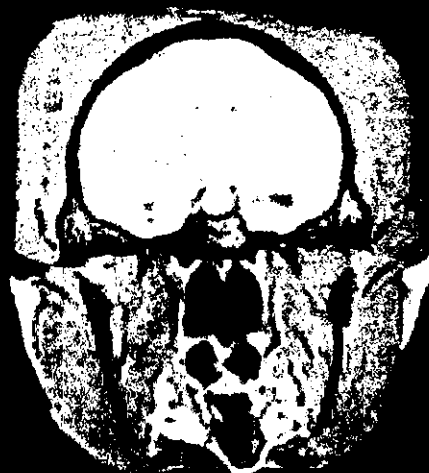


Fig.4A:症例2, 梗塞再灌流後より梗塞像が観察され、
24時間後の撮像では梗塞部は広範に広がっている。

閉塞中3時間目

24時間後

T₁



T₂



Proton



Fig.4B:症例3, 右は梗塞中3時間目の画像。わずかにカテーテルのアーティファクトが認められるが、梗塞部が確認される。、24時間後の撮像では梗塞部は右脳全域に広がっている。

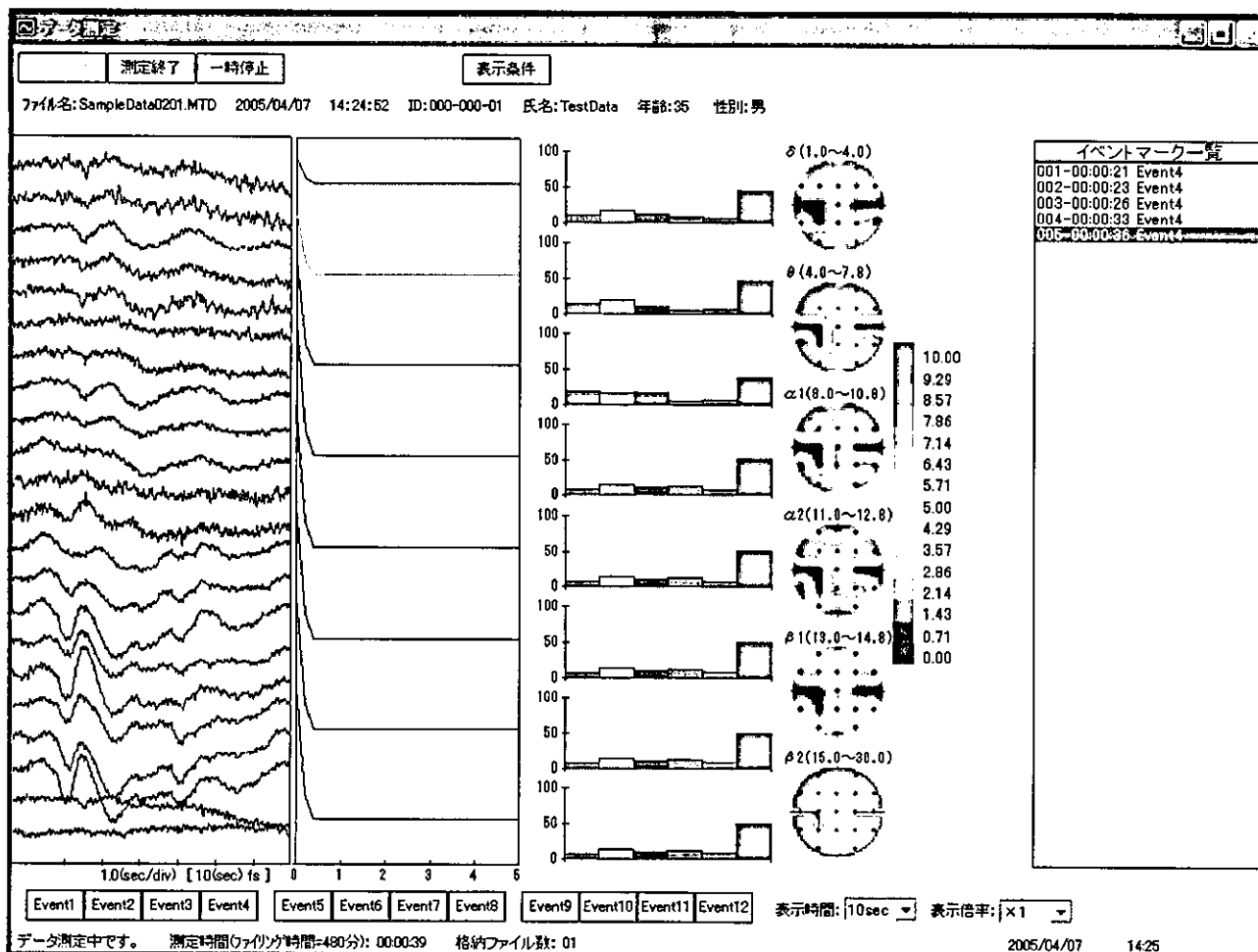


Fig.5 16チャンネル皮質脳波を最大エントロピー法により周波数解析を行ったトポグラフ

厚生労働科学研究費補助金・ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業
霊長類を用いた脳梗塞モデルの遺伝子治療研究
分担研究報告書

分担研究者 寺尾 恵治 厚生労働省国立感染症研究所筑波霊長類センター
研究協力者 木村 展之 厚生労働省国立感染症研究所筑波霊長類センター

実験的脳梗塞作成カニクイザル脳組織の病理組織学的検索

研究要旨：

カニクイザルはヒトに近縁な霊長類であることから、新たな脳梗塞モデル動物として大きな可能性を持つ。そこで本研究では実験的に脳梗塞を発症させたカニクイザル脳組織を用いて、カニクイザル脳組織における梗塞の影響を病理組織学的に検索した。

A. 研究目的：

脳梗塞は我が国における致死率の高い疾病の一つであり、治療法開発はもちろんのこと根本的な病態メカニズム等を早急に明らかにする必要がある。特に、一次閉塞の場合はその後のケアによって生存率が大きく左右されることから、いかに残存神経細胞をレスキューするかが焦点となる。そこで我々は、ヒトへのスムーズな外挿が期待できるカニクイザルを用いた新たな脳梗塞モデル（一次閉塞）開発に向けた研究を行い、梗塞によってカニクイザル脳内にどのような病理学的変化が生じるか、また、ヒトにおける脳梗塞病変との類似性を検索した。

B. 研究対象および方法

本実験ではカニクイザルを用いて実験的に脳梗塞（一次閉塞）を生じさせ、剖検後に病理組織学的検索を行った。本実験に用いたカニクイザルは、国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターに由来する

22 歳齢カニクイザル（メス：#1）と 5 歳齢カニクイザル（メス：#2）の計 2 頭を用いた。

#1 は当初、マイクロカテーテルによる右中大動脈閉塞を試みたが、内頸動脈屈曲部を越えることができなかったため、液体塞栓物質（Eudragid）による永久閉塞モデルとした。#2 は当初の予定通り、右中大動脈閉塞・再灌流を行い一次閉塞モデルとした。

両個体とも剖検後に脳組織を定法に従いホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色および各種免疫染色を行った。

C. 結果：

（#1）HE 染色の結果、大脳組織全体にわたる広範囲の脳血管鬱血が確認された。組織的には神経細胞の層構造は維持されており、神経細胞脱落や脱髄は明確に確認できなかったが、アストログリアおよびミクログリア浸潤が多数確認された。また、肉眼所見的には脳室の著しい拡大が確認された。

GFAP・TUNNEL・Caspase3についての免疫染色を行ったところ、大脳皮質のかなりの範囲にわたってアストログリア活性化（Ⅰ型およびⅡ型）が見られ、神経細胞にかなりのストレス障害が生じていることが示唆された。しかしながら、ヒト脳梗塞で確認される腫大アストログリアは確認されなかった。TUNNELとCaspase3（Active form特異的抗体）によるアポトーシス検索の結果、#1においてはTUNNEL陽性のアポトーシス細胞は確認されなかった。

（#2）再灌流を行ったため、#1のような脳血管の鬱血は確認されなかったが、側頭葉および後頭葉において神経細胞および神経網脱落、脱髄が巣状に多数確認された。グリア細胞の活性化も確認されたが、やはり腫大したアストログリアは確認されなかった。本個体においては明確なTUNNEL陽性アポトーシス細胞は確認できなかったが、Caspase3活性化断片陽性細胞が散見されたため、アポトーシス反応が生じている可能性も示唆された。

D. 考察：

本研究では結果的に永久閉塞モデルと一次閉塞モデルの双方を作成・検索することとなったが、前者（永久閉塞モデル：#1）ではヒト脳梗塞で見られる神経細胞脱落等の明確な病理学的変化が確認されなかったことに加えて脳室の著しい拡大が見られており、また術後2日目に同個体が死亡したことから脳梗塞巣を形成する以前に脳閉塞症に起因する脳圧上昇等の影響によって死亡した疑いがある。#2においては巣状の神経細胞脱落が確認され、脳梗塞状態が生じている可能性が示唆された。しかしなが

ら、明確なグリオシスおよびアポトーシス反応は確認できなかったこと、また、同個体も術後3日には死亡してしまったことから、今後のさらなる条件改善が必要であると考えられる。

E. 結論：

本研究においてマイクロカテーテル法によるカニクイザルを用いた一次閉塞モデルの可能性を検討したが、神経細胞脱落が確認されたことから、同モデルが脳梗塞状態を反映する可能性が示唆された。しかしながら一方では、完全なる脳梗塞像の取得には至っておらず、術後短期間で死亡してしまったことから治療法開発研究に用いるには更なる条件・手技の改善が必要であることもまた確認された。

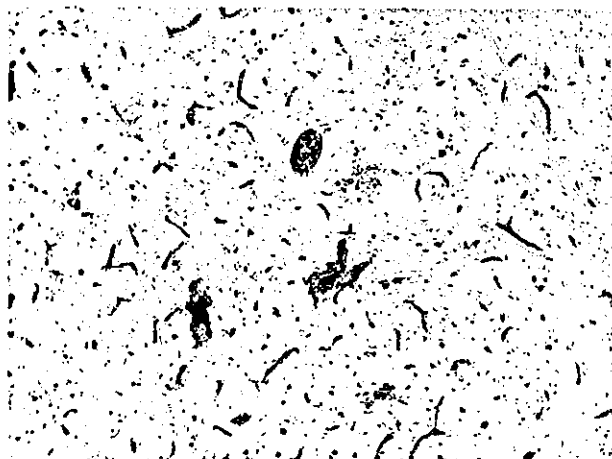
今後は、より完全に近い形でヒト脳梗塞像を反映するモデル作出に向けた研究を行うとともに、術後のモデル維持を可能にするためのケア方法の開発が急務となると考えられる。

F. 健康危険情報：なし

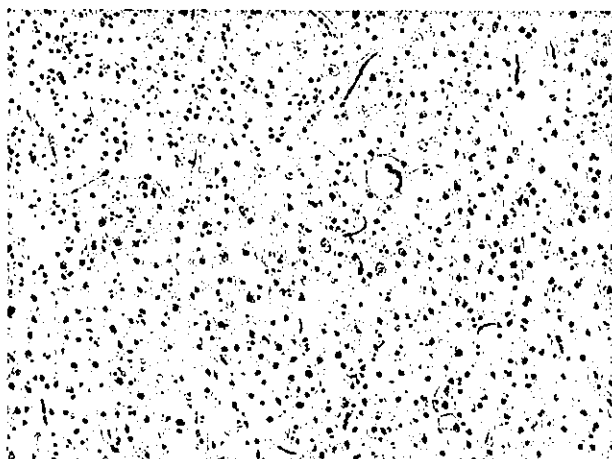
G,H:研究発表・論文発表（資料・業績参照）

I. 知的財産権の出願・登録状況：なし

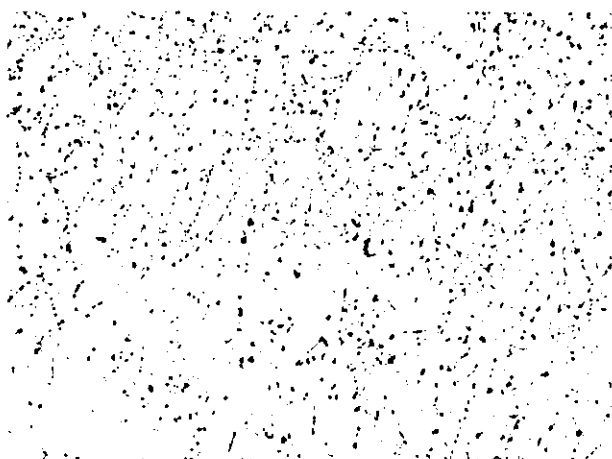
カニクイザル#1における病理組織像



側頭葉における著しい脳鬱血



後頭葉におけるミクログリア浸潤

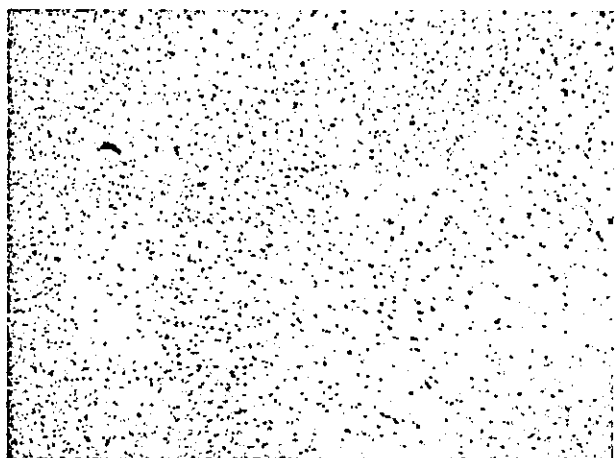


後頭葉におけるアストログリア活性化
(抗GFAP抗体による免疫染色像)
#1では、Ⅱ型アストログリアの活性化
が目立った。

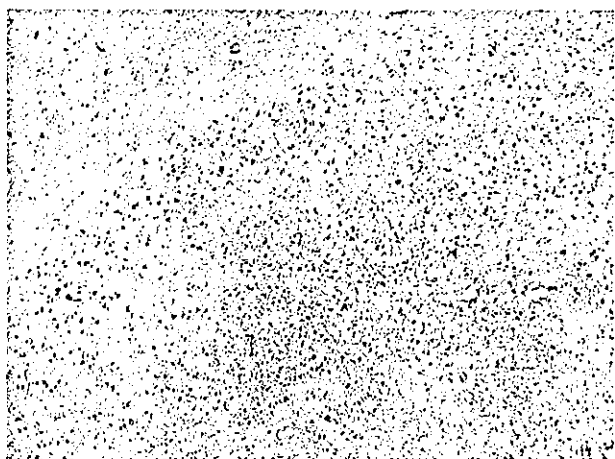
カニクイザル#2における病理組織像



低倍率視野
後頭葉における神経細胞および
神経網脱落像

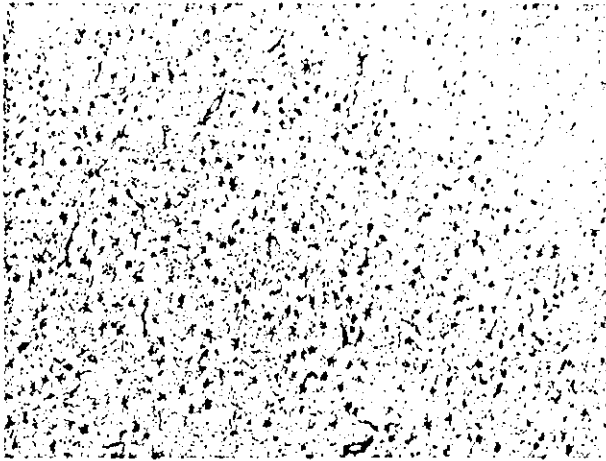


上記部位の拡大像
後頭葉における神経細胞および
神経網脱落像

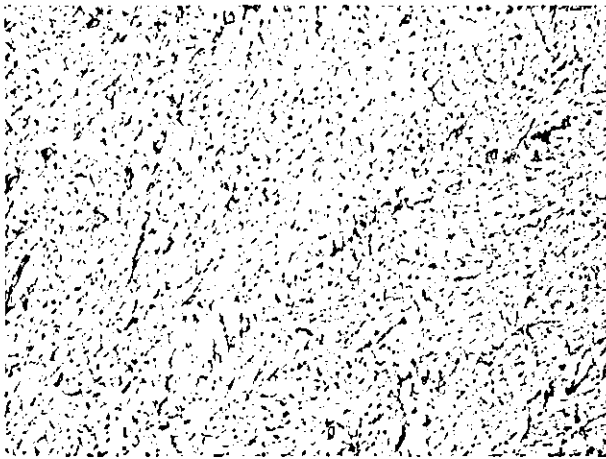


後頭葉における白質脱落像

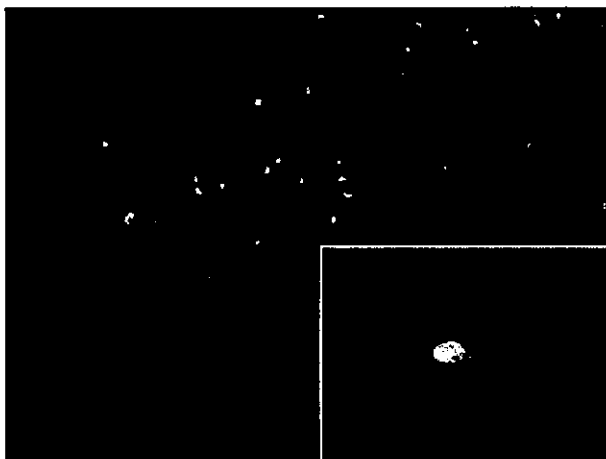
カニクイザル#2における病理組織像



後頭葉大脳皮質におけるアストログリア(Ⅰ型)活性化像



後頭葉白質におけるアストログリア(Ⅰ型およびⅡ型)活性化像



後頭葉大脳皮質にて確認された抗活性型断片Caspase3陽性細胞の一例

カニクイザル脳梗塞モデルを用いた遺伝子治療の 分子生物学的評価法の開発に関する研究 (特定部位における発現たんぱくの網羅的解析)

主任研究者 吉川 泰弘 (東京大学・農学生命科学研究科)
協力研究者 濱崎裕子 (東京大学・農学生命科学研究科)

研究要旨

カニクイザルの脳梗塞モデルから得られた脳サンプルを用いて発現たんぱくの網羅的解析を行うことにより、脳梗塞部位およびその反対側の正常部位のたんぱく発現量の変化を検討した。正常部位および梗塞部位から抽出したたんぱく質を2次元電気泳動後、銀染色を行うことにより、それぞれ426、416スポットを検出した。

マッチング後、検出された合計480スポットのうち、正常部位に対し梗塞で発現量が10倍以上に上昇したスポットとして56スポット、1/10以下に減少したスポットとして78スポットを認めた。これらスクリーニングしたたんぱくをさらに検討することにより、遺伝子治療の分子生物学的評価法を確立するために必要な標的たんぱくを特定することが可能となる。

キーワード: カニクイザル、脳梗塞モデル、病態プロテオミクス、プロテオミックディフ
ァレンシャルディスプレイ

A. 研究目的

超高齢社会の到来が目前となったわが国において、高齢化社会に伴う弊害をどう克服して行くかは重要な問題である。特に老人病、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・孤立をもたらすだけではなく、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。我々はこれまでに、スナネズミの脳梗塞モデルを用いた遺伝子治療において成果を得てきた。スナネズミで得られ

た成果をヒトへ応用するために、前臨床試験として、サル類を用いた脳梗塞モデルを作成し、遺伝子治療の安全性、有効性を評価することは必須である。

現在、各種疾患におけるかかわる病態プロテオーム解析は、世界各地において急ピッチで推進されている。この病態プロテオーム解析は、疾患発症のメカニズムや治療標的・臨床マーカーを明らかにするだけでなく、治療の安全性、有効性を評価することに対しても大変有用である。

そこで、本研究では、作成したカニクイザル脳梗塞モデルの梗塞部位周辺組織におけるたんぱく発現量の変化をプロテオミック

ディファレンシャルディスプレイ法によって網羅的に解析し、遺伝子治療における分子生物学的評価を行うことを目的とした。

B. 材料と方法

カニクイザル脳梗塞モデルの脳より梗塞部位および反対側の正常部位を採取し、たんぱく抽出まで、 -80°C で保存した。凍結保存した脳組織を、液体窒素存在下、凍結粉碎し、約 20mg を分取、rehydration buffer(8M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0.2% Bio-Lyte3/10, 0.001% BPB; Bio-Rad) 100 μg を加え、30秒3回の超音波処理を行った。30分後遠心し、上清をたんぱく抽出液として用いた。

1次元目の等電点電気泳動は、7cmのIPGストリップ(pH 3-10; Bio-Rad)を使用、たんぱく量 125 μg 相当をアプライし、 20°C で12時間膨潤後、250V 15分、4000V 2時間、10000VH、500V hold(プロティアン IEFセル; Bio-Rad)の条件で泳動した。1次元目の泳動後、ストリップの平衡化 I (375mM Tris-HCl pH8.8, 6M urea, 2% SDS, 2% DTT) 30分、平衡化 II (375mM Tris-HCl pH8.8, 6M urea, 2% SDS,) 15分を行い、2次元目のSDS PAGEを行った。2次元目の泳動後、銀染色を行うことにより、たんぱくの可視化を行った。得られた2次元電気泳動像を、画像解析ソフトを用いてイメージデータとして処理することにより、約400スポットのゲル上のスポットを検出した。その後、ディファレンシャル解析を行うため、正常部位と梗塞部位間で、ゲル上のスポットのマッチングを行った。また、ゲルごとに検出されたスポットの発現量の総和を同値にすることにより、ゲルのノーマライズを行い、ゲル間の補正を行った。なお、これらの画像解析は、2次元画像解析ソ

フトである PDQuest (Bio-Rad)を用いて行った。

C. 結果および考察

図1にカニクイザル脳梗塞モデルの脳より抽出した正常部位および梗塞部位のたんぱく2次元電気泳動の泳動図を示す。銀染色の結果、カニクイザル脳の正常部位および梗塞部位におけるたんぱく質発現量が明らかに違うスポットが20スポット以上確認された。2次元用画像解析ソフトPDQuest (Bio-Rad)を用いたデータ解析においては、正常部位において426スポット、梗塞部位において416スポットを検出した。検出されたスポットに対しディファレンシャル解析を行った結果、マッチングしたスポットは、362スポットであった。正常部位と梗塞部位で発現しているスポットのたんぱく発現量比較を行った結果、発現量が2倍以上上昇したたんぱくスポットは108スポットあり、そのうち56スポットは10倍以上の発現上昇が認められた。一方、1/2倍以下に発現量の減少したスポットは、170スポットあり、そのうち78スポットは1/10以下の発現量しか認められなかった。

解析に用いたカニクイザル脳サンプルは、同一個体、梗塞部位とそのほぼ同じ位置の反対側を用いているため、今回の解析により変化の見られたスポット(たんぱく)は、梗塞により何らかの変化が起こったものと考えられる。別の個体で同様のスクリーニングを行う、あるいは、別の組織でのプロテオーム解析を行うことにより、梗塞特異的関連たんぱくを特定することが可能であると考えられる。

D. 結論

カニクイザル脳梗塞モデルの脳を用いた

プロテオーム解析により、脳梗塞部位の発現たんぱくプロファイルにおいて、かなり大きな差異が認められ、梗塞関連候補たんぱくがスクリーニングされた。

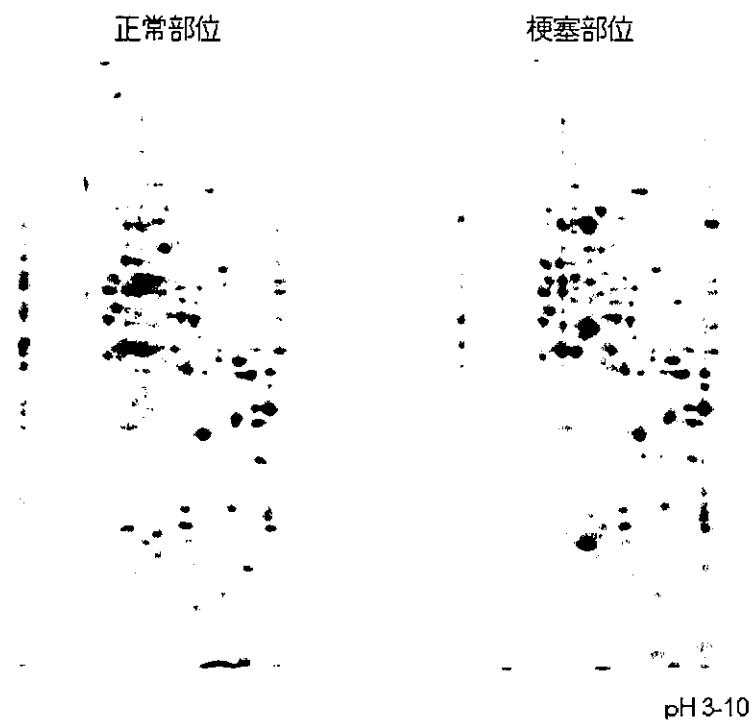


図1:カニクイザル梗塞モデル脳組織の2次元電気泳動像

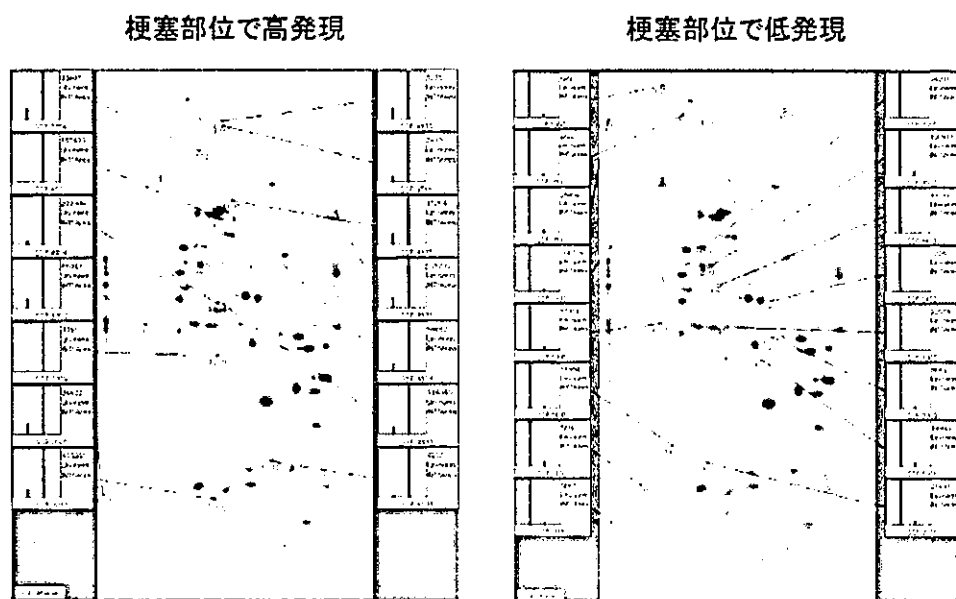


図2:梗塞によるたんぱく発現量の比較例

厚生労働科学研究事業平成 16 年度成果報告会要旨
霊長類を用いた脳梗塞モデルの遺伝子治療研究
東京大学大学院農学生命科学研究科 吉川泰弘

1、はじめに：わが国は 2030 年までに 65 歳以上の高齢者が全人口の 30%以上を占める超高齢社会を迎える。こうした状況は先進国でも日本が最初であり、高齢化社会に伴う弊害をどう克服して行くかは重要な問題である。特に老人病、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・孤立をもたらすだけではなく、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。この研究班ではサル類を用いて脳梗塞モデルを作成し、遺伝子治療による後遺症の軽減を図ることを目的として研究を進めている。

2、これまでに進めてきた主な研究

- ① 脳梗塞、脳虚血モデル：実験用小型齧歯類であるマウス、ラット、スナネズミを用いて微小血管脳梗塞モデル、中大脳動脈閉塞、全脳虚血モデルを作成した。微小血管脳梗塞モデルはローズベンガルという色素を静脈注射した後、梗塞を起こしたい脳部位に一定波長の光を当てることで、任意の部位に微小血管脳梗塞を発生させるものである。
- ② ウイルスベクターの開発と改良：この研究班では日本で独自に開発されたセンダイウイルスをベクターとして用いている。センダイウイルスは細胞内でのみ増殖し、細胞の染色体に影響しない安全なベクターである。また遺伝子の発現効率が高く、早いという特徴を持っている。しかし、細胞毒性が強く、免疫反応を引き起こしやすいという欠点も持っている。現在この点を克服するため、M 遺伝子欠損ウイルス、MF 遺伝子欠損ウイルス、FMH の 3 遺伝子を欠失したウイルスベクターの開発を進めている。
- ③ サル類を用いたセンダイウイルスベクターの安全性評価：カニクイザルを用いてセンダイウイルスベクターの安全性試験のプロトコールを作成した。カニクイザル胎児由来初代培養細胞を用いた試験、若齢個体を用いたセンダイウイルスの水平感染試験、種々の臓器での感染試験、常用量・高容量投与試験を行い、ベクターの安全性を評価した。
- ④ 齧歯類脳虚血モデルを用いたセンダイウイルスベクターの安全性と有効性評価：スナネズミを用いて内頸動脈結紮による一過性全脳虚血モデルを作成した。センダイウイルスベクターにグリア細胞由来神経増殖因子 (GDNF) を搭載した組み換えベクターによる遺伝子治療を行い、梗塞後 4 時間後のベクター投与でも、海馬の神経細胞死を防止できること、虚血後 28 日の評価でも有効であるという画期的結果を得た。

3、現在進行中の実験

平成 16 年に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）。中大脳動脈閉塞モデルは 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、1 例では完全閉塞とならなかった。他の例では梗塞後 2 日で死亡してしまい、更なる検討が必要である。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。センダイウイルスペクターに関しては M, F, HN の 3 遺伝子欠損ベクター大量生産システムの構築を試みた。

4、おわりに

これからの研究の進め方：平成 17 年には、①これまでのモデルの改良、解析を進めるとともに、②脳梗塞治療用ベクターの大量生産、種々の脳梗塞における神経増殖因子以外の有効な治療用遺伝子の検索を進める。また、③新世界ザルであるマーモセットを用いて、造血細胞に治療用遺伝子を搭載した新規治療法の試み、④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。さらに⑤運動機能、高次学習・認知機能などを指標とした治療の有効性評価法の確立、fMRI、脳波などの臨床所見と組織病変の相関を明らかにすることを考えている。

霊長類を用いた脳梗塞モデルの遺伝子治療研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 吉川泰弘

- ・わが国は2030年までに65歳以上の高齢者が全人口の30%以上を占める超高齢社会を迎える。
- ・こうした状況は先進国でも日本が最初であり、高齢化社会に伴う弊害をどう克服して行くかは重要な問題である。
- ・特に血管性痴呆症は患者数の多さ、高齢者のQOLの低下・孤立をもたらすだけではなく、社会的な負担も大きい
- ・この研究班ではサル類を用いて脳梗塞モデルを作成し、遺伝子治療による後遺症の軽減を図ることを目的とする。

ヒトの左
中大脳動脈
閉塞



研究班の特性

目的: 脳梗塞に伴う神経細胞死を軽減する安全・有効な遺伝子治療法の確立

- ・ヒトに近縁なサル類を用いた脳梗塞・脳虚血モデルの開発
- ・センダイウイルス・ベクターを用いた脳梗塞・脳虚血モデルの治療
- ・霊長類を対象とした新しい評価法による治療の有効性、安全性の確認

特徴: 臨床応用をめざすサル類での疾患モデル作成

霊長類モデルで確立した方法に基づき、ヒトへのトランスレーショナル・リサーチとして、ザルの脳虚血、大血管・微小血管脳梗塞モデルを作成し、わが国で独自に開発されたセンダイウイルス・ベクターを用い、虚血性脳血管障害の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

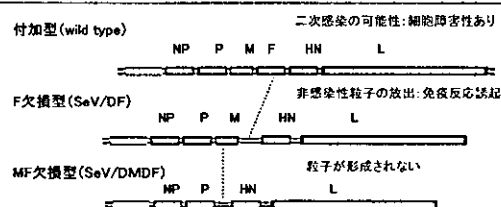
研究組織: 医師、獣医師、基礎科学者の共同研究

東大医学部脳神経外科・農学部獣医・新領域創生科学、筑波霊長類センター、ディナベック(DNAvec)、九州大学医学部

これまでの成果:

1) センダイウイルスベクターの改良

- ・センダイウイルスベクター(SeVV)は日本で独自に開発されたベクター
- ・SeVVは搭載遺伝子(最大3.5KBの外來遺伝子)を早期に高発現する
- ・非分裂細胞に感染可能で、細胞質内で増殖し、宿主の染色体に影響しない
- ・細胞障害性が強い(欠点)
- ・M欠損型、FM欠損型



これまでの成果:

2) センダイウイルスベクター(SeVV)の有効性と安全性

- ・初代カニウザル胎児由来培養細胞でのSeVの増殖性の確認
- ・若齢カニウザルでの水平感染否定試験



1歳齢のカニウザルを用いて、1頭にセンダイウイルスを接種(1x10⁶)もう1頭を非接種同居個体として導入。

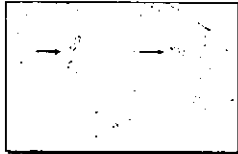
- ・接種個体は抗体上昇、
 - ・非接種個体は抗体上昇しない
- 水平感染は起こらない。

SeVVはカニウザル胎児(80~90日齢)由来初代培養細胞で増殖(神経、肝、腎臓などの細胞で良く増殖するが、細胞障害性-CPEを示す)

- ・神経系細胞での増殖性はよい
- ・リンパ系細胞での増殖は悪い

2) センダイウイルスベクター (SeV) の有効性と安全性

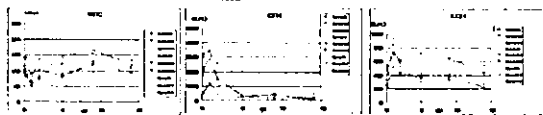
- ・カニクイザルへのセンダイウイルス接種と病変評価
- ・カニクイザルでの欠損型SeVの安全性評価(筋肉内投与)



接種部位:

左右前頭葉、眼球、鼻腔内、肝臓、脾臓、腎臓
接種後5、10日間、急性の毒性反応はないが、
病理組織学的には脳、腎臓、肝臓に炎症反応

問題点: 非欠損ウイルスの脳室内接種では
4~5日で死亡例(髄膜炎)、欠損型SeVが必要



F欠損SeVにFGFを搭載、筋肉内投与(用量: 5×10^8 , 5×10^9)で、急性毒性評価

・FGF2の有意な上昇

・血液検査では異常なし

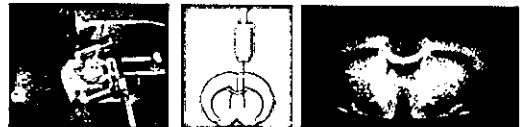
→ 九州大学で臨床研究へ

3) スナネズミの脳虚血モデルを用いた遺伝子治療の評価

- ・モデルの作成
- ・SeV搭載遺伝子の有効性比較



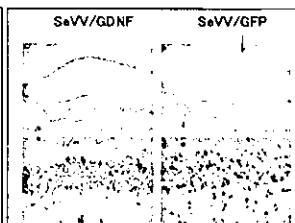
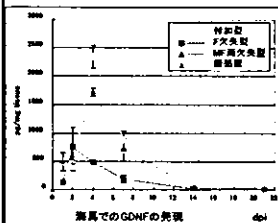
両側の頸動脈を結紮(5分間)、全脳虚血後、再疎通
2~3日後、海馬CA1錐体細胞の脱落(遅延性細胞死)



定位固定装置を用いて左側脳室投与SeV: 5ml (5×10^6 PFU)

3) スナネズミの脳虚血モデルを用いた遺伝子治療の評価

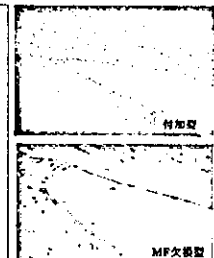
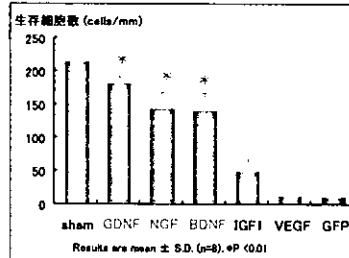
- ・SeVの安全性・有効性評価



- ・SeV搭載GDNFは付加型(野生型)とMF欠損型で高く、F欠損型で低い
- ・GDNF搭載SeVは海馬CA1錐体細胞の遅延性細胞死(6日後判定)を保護する

3) スナネズミの脳虚血モデルを用いた遺伝子治療の評価

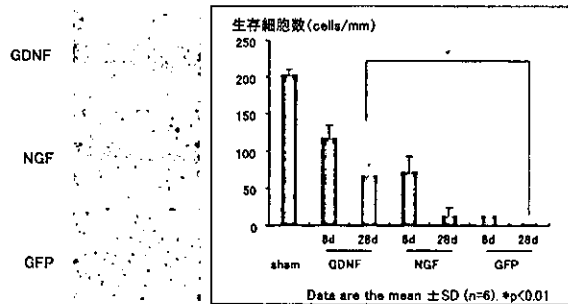
- ・SeVの安全性・有効性評価



- ・GDNFは著効、NGF、BDNFは有効、IGF1、VEGFは効果なし
- ・付加型ベクターでは脳室上内細胞脱落、浮腫、細胞浸潤が見られる
- ・MF欠損型では病変はほとんど認められない

SeVV/GDNFによる神経細胞保護効果

保護効果の持続性: 全脳虚血4時間後SeVV/GDNF投与
28日後解剖して海馬CA1細胞を計測



現在進行中の実験

- ・霊長類の脳梗塞モデルからサル類を用いたモデルへ転換
これまでラット、スナネズミ等で行われてきたモデルを、よりヒトに近縁なサル類に転換することにより、遺伝子治療の臨床応用を可能にするための検討
- ・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、微小血管梗塞であるラクナ梗塞モデルの作成方法を検討
サル類を用いたモデルの作成
脳梗塞病巣の経時的変化(脳イメージ、病理組織、髄液所見、蛋白、遺伝子など)を解析し、診断及び有効な治療遺伝子の選択に役立てる
- ・全脳虚血モデルの作成とSeVVの有効性評価
サル類を用いた、脳内でのSeVV搭載遺伝子の発現
有効性・安全性評価
- ・高次認知機能・運動機能を指標としたサル類の治療評価
4段階迷宮試験、遅延型認知記憶試験、運動機能試験など

・霊長類を用いた微小血管脳梗塞(ラクナ梗塞)モデルの作成

- ・ラクナ梗塞モデルは、国際的にほとんど皆無であり血管性認知症に対する治療薬開発において、霊長類は極めて有効な動物モデル
- ・ラクナ性脳梗塞に伴う慢性白質病変で活性化型アストロサイトが誘導されることを発見、新たな治療薬の開発に必要なモデルとして特許申請
(霊長類を用いたヒト・ラクナ梗塞のモデル: 特願2004-253205)



- ・ローズベンガルを用いた微小血管梗塞モデル
- ・脳の任意の部位に梗塞を作成できる(蛍光色素投与、光照射、活性酸素、血栓)

