

2005.00138A

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 17 年度 研究成果報告書

平成 18 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

平成 17
年度厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

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（国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究要旨

平成17年度は齧歯類の脳梗塞モデルからはなれて、サル類を用いたモデルの完成を目指した。齧歯類モデルのデータはほとんど霊長類に適応できないことが明らかになったため、モデルの完成に時間がかかってしまった。総数20頭というサル類を用いることにより、3つの脳虚血モデルを完成することができた。①霊長類は齧歯類と異なり、梗塞後の浮腫、生化学的ダメージに対する感受性が極めて高く容易に死亡してしまうため、再疎通の条件を限定する必要がある。②それにもかかわらず、血管の伏流が多いために、全脳虚血では通常の頸動脈閉塞では完全に脳血流をとめられず、海馬の神経細胞死は誘導されなかった。完全な神経細胞死を誘導するには閉塞後の血圧を下げるための脱血操作が必要であった。③ラクナ梗塞モデルでは白質と灰白質の反応が異なっており、特に白質の反応は齧歯類に比べて極めて強い。モデルの完成までに予想以上の時間を要したが、しかし、ヒトへの外挿を考えた場合、避けられない時間であったと思われる。

本年は上記モデルの完成のほかに、サル類抹消血を用いた *ex vivo* での遺伝子導入、マイクロスフェアを用いた、よりヒトに類似したラクナ梗塞モデルの作成、蛋白解析による初期反応と新規治療用遺伝子の検索、新しい脳障害測定のための高次認知機能測定法の開発などをすすめた。

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

ある。本研究班はヒトに近縁な霊長類を用いて3つの脳虚血モデル、すなわち微小血管、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。

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がある課題である。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、社会的な負担の増大から、深刻な疾患の1つで

B. 研究方法

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る。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あり、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、トランスポーターのない分子は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。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。①本研究班では再現性を持って3種類の脳虚血モデルを霊長類で完成するための条件を決定すること。②モデルの評価を基礎的、臨床的に評価すること、③治療遺伝子の *iv vivo*, *ex vivo* でのデリバリーを行い有効性、安全性を評価する方法を検討した。

C、結果

①ウイルスベクター：M・F 遺伝子欠失型ベクターが *in vitro* で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おり、また宿主で組織傷害性が減弱していることを齧歯類で確認した。現在サル類の脳室内接種における神経毒性を検索している。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、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。しかし、3 遺伝子欠損ベクターは回収量が低いという問題点が明らかになり、克服する必要がある。

②ラクナ梗塞モデル：ローズベンガルとレーザー光を用いた大脳皮質微小血管梗塞モデルは、再現性よく作成できるが、ヒトのラクナ梗塞とは分布が異なっている。H17 年度は、より人のラクナ梗塞に近いモデルを作成するためマイクロスフェア（ビーズ 4000）を注入する方法で人のラクナ梗塞に類似した病巣を大脳基底核に作成し、MR I で経過をおったところ人のラクナ梗塞と非常に類似した像が得られた。現在病巣を形態学的に検索し、宿主応答について調べている。

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、右中大脳動脈へアクセスし閉塞を試みた。内頸動脈の屈曲を越えることが出来るカテーテルを検討し、再現性よく梗塞を作成できるようになったが、梗塞巣の病変が激しく、6 例とも死亡してしまった。現在梗塞後の再疎通に関して条件検討を行っている。また梗塞巣については、白質、灰白質ペランブラ部位の発現蛋白についてプロテオーム解析を始めた。

④全脳虚血モデル：バルーンカテーテルにより全脳虚血モデルの作成を試みた。内頸動脈の分岐と分布に個体差が激しく、一定のプロトコルを作成するのが困難であった。個体別に造影し、分枝を含め全てを閉塞する必要があった。さらに、血管の伏流が多いために、全脳虚血では通常の頸動脈閉塞では完全に脳血流をとめ

られず、海馬の神経細胞死は誘導されなかった。完全な神経細胞死を誘導するには閉塞後の血圧を下げるための脱血操作が必要であった。現在、全脳虚血モデルについて、再疎通までの時間の設定を検討している（5分から10分以内）。GDNFを搭載した欠損型センダイウイルスベクターの有効性と安全性を確かめた後、本モデル遺伝子治療による海馬神経細胞の保護効果を評価する。

⑤ex vivo 遺伝子導入：センダイウイルスベクターによって遺伝子導入した単球を脳梗塞の治療に応用できるかどうか可能性を模索するため *in vitro* での検討を行った。その結果、GFP 発現センダイウイルスベクターの導入実験ではMOI10では感染直後から GFP の発現がみられ、センダイウイルスベクターは短時間で比較的少量の遺伝子発現を単球に誘導できる可能性が示唆された。また hGDNF 発現センダイウイルスベクター導入実験では培養上清中に GDNF が分泌されることが明らかになった。またこれらの遺伝子導入単球の遊走能は比較的保存されていた。今回の *in vitro* での研究結果をもとに、センダイウイルスベクターにより遺伝子導入した単球を用いた新しい脳梗塞遺伝子治療法に関する *in vivo* での前臨床研究が可能と考えられた。

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全く異なることが明らかになった。ヒトへの応用を考える場合、サル類で時間がかかっても完全なモデルを作成することが急務である。もちろん霊長類では齧歯類のように短期間に多数の動物を用いて、条件を検討することは困難であり、時間と多大な費用を必要とする。

2年間で、齧歯類から霊長類にモデルを移行させ、3つの脳虚血モデルを再現性よく誘発する条件を決定することができた。このモデルを用いて形態的、機能的障害の評価を行ったことは本研究班の大きな成果であり、今後、国際的にも霊長類脳梗塞モデルを用いて研究を推進する研究者への貴重な情報を提供することになるであろう。

ただ、研究の進展に時間がかかり、完成されたサル類のモデルを使ってウイルスベクターの有効性と安全性を評価し、臨床応用まで持つて行くための機会が失われたことは極めて残念である。

E. 結論

サル類を用いた脳虚血モデルの完成を目指した。齧歯類のデータはほとんど霊長類に適用できないことが明らかになったため、モデルの完成に時間がかかってしまった。17年度は20頭というサル類を用いることにより、3つの脳虚血モデルを完成することができた。モデルの完成までに予想以上の時間を要したが、しかし、ヒトへの外挿を考えた場合、避けられない時間であったと思われる。

本年度は上記モデルの完成のほかに、サル類抹消血を用いた *ex vivo* での遺伝子導入、マイ

クロスフェアを用いた、よりヒトに類似したラクナ梗塞モデルの作成、蛋白解析による初期反応と新規治療用遺伝子の検索、新しい脳障害測定のための高次認知機能測定法の開発などをすすめた。

完成された3つの脳虚血モデルを用いて形態的、機能的障害の評価を行ったことは本研究班の大きな成果であり、今後、国際的にも霊長類脳梗塞モデルを用いて研究を推進する研究者への貴重な情報を提供することになるであろう。ただ、研究の進展に時間がかかり、完成されたサル類のモデルを使ってウイルスベクターの有効性と安全性を評価し、臨床応用まで持って行くための機会が失われたことは極めて残念である。

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

動物由来感染症の制御 吉川泰弘 1月 東京都獣医師会 慈恵医大
人獣共通感染症への対応 吉川泰弘 2月 関西薬剤師会 大阪府
BSEと変異型CJDのリスク評価 吉川泰弘 2月 厚生省 茗荷谷
動物由来感染症リスク 吉川泰弘 2月 関東薬剤師会 渋谷薬学会館
食の安全とリスク評価 吉川泰弘 2月 日本獣医師会 新潟
脳梗塞モデルの遺伝子治療 吉川泰弘 2月 厚生省 灘尾ホール
人獣共通感染症と問題点 吉川泰弘 2月 奈良県獣医師会 奈良県立ホール
感染症法の見直しと対策 吉川泰弘 3月 日動協フォーラム 京都
牛海面上脳症 吉川泰弘 3月 厚生省 明治記

念館 東京
zoonosis コントロール 吉川泰弘 4月 日本感染症学会 名古屋
BSE risk analysis in Japan 吉川泰弘 5月 韓国獣医学会・獣医師会(KVMS) ソウル、韓国
動物由来感染症対策 吉川泰弘 6月 兵庫県医師会・獣医師会 大阪
感染症法への対応 吉川泰弘 6月 厚生省研修会 東京
BSE risk assessment in Japan 吉川泰弘 6月 zoonosis control symposium, リバプール UK
霊長類を用いた毒性評価 吉川泰弘 7月 日本トキシコロジー学会 東京
最近の免疫学の進展 吉川泰弘 7月 東京都高校生物教師会 新宿 東京
感染症と食の安全 吉川泰弘 9月 日本公衆衛生学会 北海道
BSEとリスク分析 吉川泰弘 9月 山形県獣医師会 山形
Zoonosis control in Japan 吉川泰弘 10月 ICLAS/CALAS joint symposium, 北京, 中国
Non-human primate disease model 吉川泰弘 10月 APS symposium バンコク、タイ
感染症法への対応 吉川泰弘 11月 厚生省技術研修会 東京
プリオン病とリスク評価 吉川泰弘 11月 日獣大 公開セミナー 東京
EDCs on neural development in higher animals 吉川泰弘 11月 Japan-Germany VMS, ベルリン、ドイツ
霊長類の疾患モデル 吉川泰弘 11月 日本疾患モデル学会 伊香保 栃木県
新世界ザルの有用性 吉川泰弘 12月 サル類の臨床病理研究会 つくば市
米国・カナダの牛肉等のリスク評価 吉川泰弘 1月 厚生省研修会 東京
動物由来感染症と感染症法の対応 吉川泰弘 2月 日本実験動物協会教育フォーラム 京都
BSEとリスク評価 吉川泰弘 3月 日本獣医師会・日本獣医学会 つくば市
ゲノム科学でわかったこと 吉川泰弘 3月 日本実験動物協会教育フォーラム 東京

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

脳硬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あるいは遺伝子ワクチン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及び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 遺伝子あるいは M 遺伝子欠失型 SeV ベクターの構築とともに、M/F 2 遺伝子欠失型 SeV ベクターおよび M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターの構築に成功した。すなわち、M/F 2 蛋白を同時発現するパッケージング細胞とともに、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。今年度は、より実用化へ向けたベクター生産システムとするために、複数遺伝子欠失型 SeV ベクターについて、大量生産システムを構築するとともに、実際の治療用遺伝子を搭載したベクターの調製を行った。具体的には、M/F 2 遺伝子欠失型 SeV ベクターについては、持続発現細胞の取得に成功し、大量生産により治療用遺伝子であるグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)遺伝子搭載ベクターを調製した。また、M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターについても、ベクターの大量生産が可能になった。

A. 研究目的

センダイウイルス(SeV)ベクターを脳硬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あるいは遺伝子ワクチン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及び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 遺伝子或いは M 遺伝子欠失型 SeV ベクターの構築に成功しており、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となり、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り、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になり、特に癌治療への応用の可能性を示した。さらに、ベクターに対する免疫反応の惹起を抑制するために、ウイルス由来の遺伝子を出来るだけ欠失することを目的として、複数遺伝子の欠失を試み、M/F 2 遺伝子欠失型 SeV ベクターおよび M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターの構築に成功している。

今年度は、これら複数遺伝子欠失型 SeV ベクタ

ーについて、より実用化へ向けた大量生産システムの構築を行った。また、この複数遺伝子欠失型 SeV ベクターについても、実際の治療用遺伝子を搭載したベクターの調製を行い、脳梗塞に対する前臨床有効性および安全性試験に使用可能なベクターを構築・調製した。

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るが、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、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の採用により、それぞれのベクターが回収可能な、M/F 2 蛋白を同時発現する細胞および 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ており、これらの細胞について、細胞のリクローニングを実施し、より効果的なベクター生産が可能な細胞の取得を目指した。そして、最終的に得られた細胞を利用して、2L から 8L スケールの培養液上清からのベクター回収が可能な、大量生産システムの確立を行った。

さらに、治療用遺伝子であるグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 遺伝子を搭載した複数遺伝子欠失型 SeV ベクターについて、ベクター構築を実施し、大量生産システムによるベクター調製を行った。

C. 研究結果

複数遺伝子欠失型 SeV ベクターについて、そのベクター生産用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成功した。この細胞を用いて、実際に大量生産システムを構築するとともに、治療用遺伝子 (GDNF) を搭載したベクターの調製を行った。

具体的には、M/F 2 遺伝子欠失型 SeV ベクターについては、新たに調製に成功した持続発現細胞を利用し、ベクター大量生産により治療用遺伝子である GDNF 遺伝子搭載ベクターを調製した。また、M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターについても、ベクターの大量生産が可能になった。M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターについては、実用化レベルの大量生産システムとするには、まだ課題が残されており、今後さらに検討を行っていく。

E. 結論

M/F 2 遺伝子欠失型 SeV ベクターについては、持続発現細胞の取得に成功し、大量生産により

治療用遺伝子である GDNF 遺伝子搭載ベクターを調製した。また、M/F/HN 3 遺伝子欠失型 SeV ベクターについても、ベクターの大量生産が可能になった。このように、複数遺伝子欠失型 SeV ベクターについても、脳梗塞に対する前臨床有効性および安全性試験に使用可能なベクター供給が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Griesenbach U, Inoue M, Hasegawa M, Alton EW. Sendai virus for gene therapy and vaccination. *Curr Opin Mol Ther.* 2005;7(4):346-52.
- 2) Iwadate Y, Inoue M, Saegusa T, Tokusumi Y, Kinoh H, Hasegawa M, Tagawa M, Yamaura A, Shimada H. Recombinant Sendai virus vector induces complete remission of established brain tumors through efficient interleukin-2 gene transfer in vaccinated rats. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3821-7.
- 3) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu SI, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, Hanazono Y. Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther.* 2005;12(3):203-10.
- 4) Kinoh H, Inoue M, Washizawa K, Yamamoto T, Fujikawa S, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M. Generation of a recombinant Sendai virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases. *Gene Ther.* 2004;11(14):1137-45.
- 5) 井上誠、長谷川護: 遺伝子治療用ベクターの開発、*Biotherapy* 19(2), 85-92 (2005)
- 6) 井上誠: センダイウイルスベクターによる細胞質遺伝子治療、*細胞* 36(14), 586-590 (2004)

2. 学会発表

- 1) Inoue M, Iwasaki H, Yoshizaki M, Tagawa A, Washizawa K, Hironaka T, and Hasegawa M. Sendai virus vectors without all of the envelop-related genes: A cytoplasmic gene therapy with Sendai virus vectors: Reduction of cytopathic and immunogenic reaction of new class cytoplasmic RNA vector. The 7th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy (ASGT) (2005)
- 2) Kinoh H, Inoue M, Washizawa K, Akiba E, and Hasegawa M. Matrix Metalloproteinase-Targeted Oncolytic Sendai Virus Vector "Armed" with a Suicide Gene "Yeast

Cytosine Deaminase”: Remarkable Combinational Effects. The 7th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy (ASGT) (2005)

3) Inoue M, Iwasaki H, Yoshizaki M, Tagawa A, Washizawa K, Hironaka T, and Hasegawa M. Molecular Design of New Class Cytoplasmic Genotoxicity-Free RNA Vector, Sendai Virus Vector. 第9回日本遺伝子治療学会 (JSGT) (2005)

4) Kinoh H, Inoue M, Washizawa K, Akiba E, and Hasegawa M. Combinational Effects of “Armed” MMP-targeted Oncolytic Sendai Virus Vector with a Suicide Gene “Yeast Cytosine Deaminase”. 第9回日本遺伝子治療学会 (JSGT) (2005)

5) Kinoh H, Inoue M, Washizawa K, Fujikawa S, Akiba E, Nagai Y, and Hasegawa M. Generation of a matrix metalloproteinase-targeted oncolytic Sendai virus vector by deleting the viral matrix and changing the cleavage site of F glycoprotein. International Union of Microbiological Society (IUMS) (2005)

6) Inoue M, Kinoh H, and Hasegawa M. SeV vector with unique targeting capability: Development of genetically-engineered oncolytic SeV vector. Cold spring harbor laboratory (CSHL) meeting: Target definition & vector design for molecular medicine (2005)

7) Kinoh H, Inoue M, Yoshizaki M, Washizawa K, and Hasegawa M. Urokinase-targeted oncolytic Sendai virus vector selectively kills solid prostate cancer cells by syncytium formation. International Society for Cell & Gene Therapy of Cancer (ISCGT) China conference (2005)

Figure 1

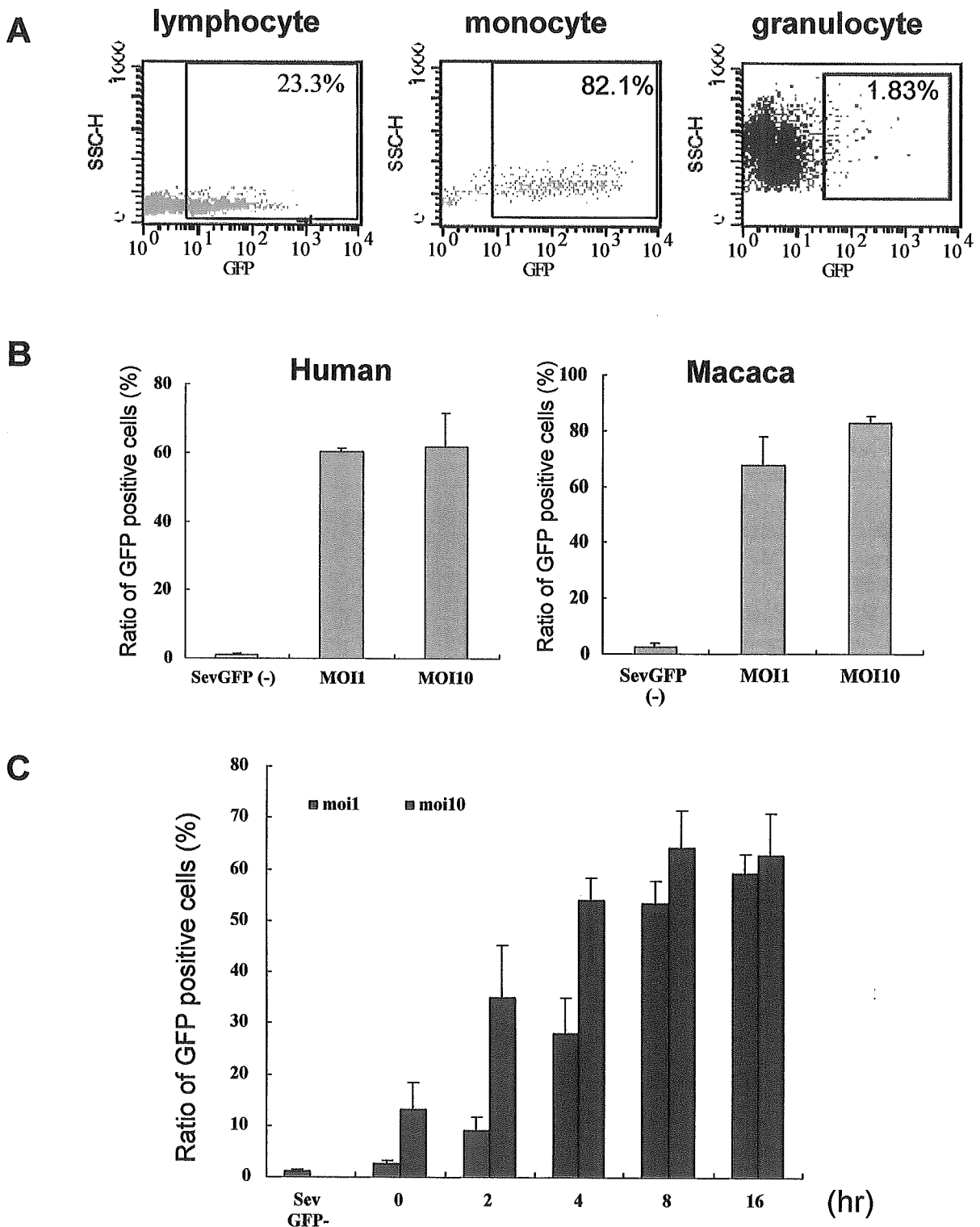


Figure 1 GFP 発現センドライウイルスベクターによる血球への 遺伝子導入効率

A. ヒトリンパ球、単球、顆粒球に MOI (CIU) 10 にて SeV GFP を感染後、16 時間培養し FCM にて解析した。数値は GFP 陽性細胞の割合を示す。B. ヒトまたはカニクイザル CD14 陽性細胞を分離し、各 MOI にて SeV GFP を感染後 16 時間培養し、GFP 陽性細胞の割合を解析した。C. ヒト CD14 陽性細胞に SeV GFP を導入後、各培養時間における GFP 陽性細胞の割合を解析した。

Table1 GDNF 産生

Macaca#	SeV hGDNF MOI (CIU)		
	0	10	100
G061	ND	ND	3.82
G063	ND	10.2	153
G064	ND	ND	107

ND; not detected

カニクイザル CD14 陽性細胞 1×10^4 個へ SeV hGDNF を各 MOI にて感染後、3日間培養し培養上清中の GDNF を定量し、培地量で補正後、GDNF 産生量 (pg) とした。

Figure2

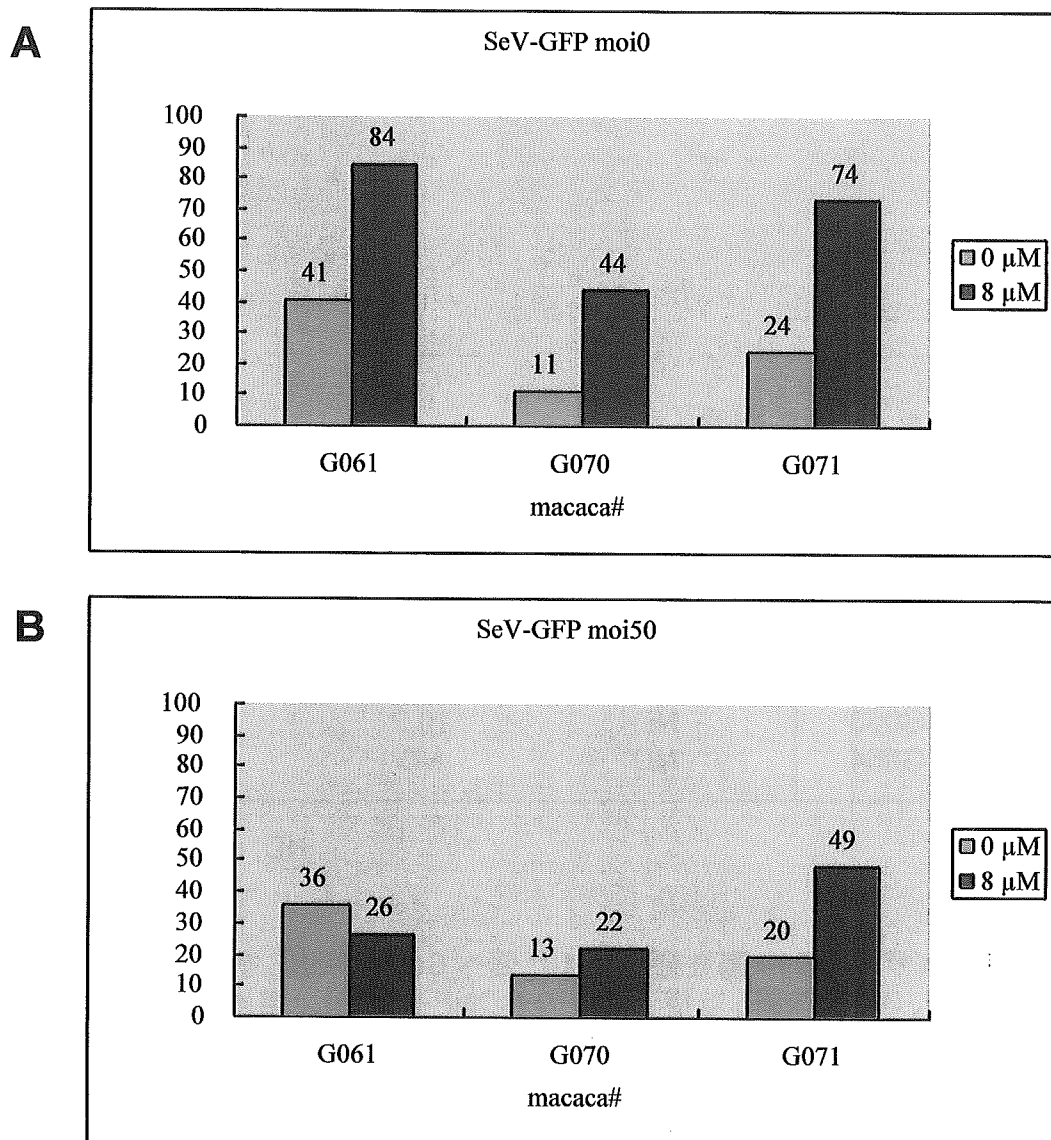


Figure2 SeV GFP 感染による単球の走化性への影響

A. SeV GFP 非感染カニクイザル末梢血単核球をトランズウェルにアプライし、0 または 8 μ M fMLP 存在下にて 3 時間誘導後、メンブレンを移動した細胞を回収し FCM にて2分間解析し CD14 陽性細胞の総数をカウントした。移動率算出用に分取しておいたコントロールサンプルも同様に FCM にて CD14 陽性細胞の総数をカウントし、これらの細胞数の比率を求め、CD14 陽性細胞の移動率とした。B. SeV GFP 感染カニクイザル末梢血単核球にて A と同様のアッセイを行い、CD14 陽性 GFP 陽性細胞のコントロールとの比率からウイルス感染細胞の移動率を算出した。

厚生労働科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
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

遺伝子導入単球を用いた新しい脳梗塞遺伝子治療法の開発

分担研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所

研究要旨

センダイウイルスベクターによって遺伝子導入した単球を脳梗塞の治療に応用できるかどうか可能性を模索するため *in vitro* での検討を行った。その結果、GFP 発現センダイウイルスベクターの導入実験では MOI10 では感染直後から GFP の発現がみられ、センダイウイルスベクターは短時間で比較的少量の遺伝子発現を単球に誘導できる可能性が示唆された。また hGDNF 発現センダイウイルスベクター導入実験では培養上清中に GDNF が分泌されることが明らかになった。またこれらの遺伝子導入単球の遊走能は比較的保存されていた。今回の *in vitro* での研究結果をもとに、センダイウイルスベクターにより遺伝子導入した単球を用いた新しい脳梗塞遺伝子治療法に関する *in vivo* での前臨床研究が可能と考えられた。

A. 研究目的

霊長類(カニクイザルまたはヒト)末梢血血球にセンダイウイルスベクターを用いて遺伝子導入した場合、血球細胞を遺伝子担体として脳梗塞治療に応用可能性であるかを検討する目的で以下の実験を行う。1)GFP 発現センダイウイルスベクターを用いて遺伝子導入効率の高い血球を明らかにし、導入効率(MOI 依存性及び GFP 陽性細胞の割合の経時的変化)を検討する。2)ヒト GDNF 発現センダイウイルスベクターを用いて血球細胞へ遺伝子導入を行い、GDNF 量を測定する。3)センダイウイルスベクター導入による血球機能(単球の遊走能)への影響を検討する。

B. 研究方法

末梢血の分画とウイルス感染

末梢血は Ficol にて分画した。分画した単核球を培養フラスコにて1時間培養後、浮遊細胞(リンパ球)と接着細胞(単球)を分取した。赤血球及び顆粒球沈殿を Percol にて分画し、顆粒球を分取した。CD14 陽性細胞は、末梢血単核球を 抗 hCD14-PE 抗体(Biolegend 社)及び抗 PE-MicroBeads(Miltenyi 社)にて分離した。分画した細胞にセンダイウイルスベクター(DNavec 社より供与)を各 MOI (CIU)にて 37℃、2 または 4 時間感染後、RPMI 1640 培地にて洗浄後 RPMI 1640 培地(10% FBS, penicillin/streptomycin 添加)中で培養後、各アッセイに用いた。

フローサイトメトリー

GFP 陽性細胞または細胞表面抗原マーカーを、フローサイトメーターにて解析した。

GDNF の定量

血球細胞培養上清を回収し、GDNF Emax ImmunoAssay System (Promega 社)にて定量し、細胞数 1×10^4 個当たりの GDNF 量を算出した。

トランズウェルアッセイ

ウイルス感染または非感染カニクイザル末梢血単核球 5×10^5 個をトランズウェル (Coring 社、孔径 $5 \mu\text{m}$) に添加し、走化性因子 N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) (Sigma 社) $8 \mu\text{M}$ にて遊走を誘導し、トランズメンブレン間を移動した細胞を回収した。コントロールとしてウェルに添加した細胞と等量の細胞を各実験群で分取しておいた。回収した移動細胞及びコントロール用に分取した細胞を抗 hCD14-PE 抗体にて標識後、フローサイトメーターにて2分間解析及び取込を行った。移動した細胞中の単球の総数がコントロール細胞中の単球の総数に占める割合を算出し、遊走能を評価した。ウイルス感染の影響は、MOI 50 にて GFP 感染ウイルスベクターを導入し、非感染群と同様にアッセイを行い移動した細胞中の GFP 陽性単球の総数がコントロール細胞中の GFP 陽性単球の総数に占める割合により検討した。

C. 結果

センダイウイルスベクターの血球への遺伝子導入効率

ヒトリンパ球、単球または顆粒球へ GFP 発現センダイウイルスベクターを導入後、16 時間培養し GFP 陽性細胞の割合を解析した。GFP 陽性細胞の割合はリンパ球では 23.3%、単球では 82.1%、顆粒球では 1.83% であっ

た (Fig. 1A)。センダイウイルスベクターによる単球への遺伝子導入効率が高いことが示された。次にヒト CD14 陽性細胞を用いて、センダイウイルスベクターによる遺伝子導入効率の MOI (CIU) 依存性を検討した。MOI=0, 1, 10 にて感染後、16 時間培養した。GFP 陽性細胞の割合はそれぞれ 1.2%, 60.2%, 61.8%であった (Fig. 1B)。カニクイザルでも同様の結果であった。また、ヒト CD14 陽性細胞へセンダイウイルスベクター (MOI1) の導入後、0, 2, 4, 8, 16 時間培養後の GFP 陽性細胞の割合はそれぞれ 2.71%, 9.03%, 27.9%, 53.3%, 59.2% であった (Fig. 1C)。

GDNF 産生

カニクイザル CD14 陽性細胞に hGDNF 発現センダイウイルスベクター (MOI100) を導入し、72 時間培養後、培養上清中の GDNF は細胞 1×10^4 個あたり G063, G064 では各々 153 pg, 107 pg であった。G061 では 3.82 pg と低量であった (Table1)。

センダイウイルス感染による単球の遊走能

カニクイザル末梢血単核球に GFP 発現センダイウイルスベクターを導入後、トランズウェルアッセイを行い細胞遊走能について、センダイウイルスベクター非導入群との比較検討を行った。走化性誘導因子 $8 \mu\text{M}$ fMLP 存在下において、ウイルスベクターによる遺伝子導入がない場合、遊走した単球の割合は G061, G070, G071 でそれぞれ 84%, 44%, 74% の遊走能が確認された (Fig. 2A)。 $8 \mu\text{M}$ fMLP 存在下において、ウイルスベクターを MOI 50 にて導入した場合、遊走した単球の割合は G061, G070, G071 でそれぞれ 26%, 22%, 49% の遊走能が確認されたが、ウイルスベクター非導入時と比較して遊走

能低下がみられた (Fig. 2B)。走化性因子 fMLP 非存在下では、G061, G070, G071 ウイルス感染前後の遊走能は同程度であった。

D. 考察

本研究ではセンダイウイルスによって遺伝子導入した単球を脳梗塞の治療に応用できるかどうか可能性を模索するため *in vitro* での検討を行った。GFP 発現センダイウイルスベクターの導入実験では MOI10 では感染直後から GFP の発現がみられた (Fig. 1C)。このことからセンダイウイルスベクターは短時間で比較的多量の遺伝子発現を単球に誘導できる可能性がある。また hGDNF 発現センダイウイルスベクター導入実験では培養上清中に GDNF が分泌されることが明らかになった。生体内において、単球・マクロファージは免疫応答において重要な役割を担っている。これまでの報告では、センダイウイルスは単球、マクロファージ及び樹状細胞へ感染することが示されており、ウイルス感染時の免疫応答機序が解析されている。センダイウイルス感染マクロファージは IFN α/β 、IL-12、IL-23 等のサイトカインを産生し、T 細胞 (Th1 細胞) や NK 細胞の活性化する。活性化した T または NK 細胞は IFN γ を産生しマクロファージを活性化する。このポジティブフィードバック機構が免疫の活性化に寄与していると考えられている。また、センダイウイルスに感染した単球はマクロファージと同様にインターフェロン α/β 、IL-12 等のサイトカインを産生することが知られているが、遺伝子担体として使用することを目的としてウイルスベクターを導入した単球について、免疫への影響はこれまで明らかにされていない。よって今後は各サイトカインの定量や免疫に関与する遺

伝子発現の定量 PCR 等の検討を予定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Maeda, T., Oyama, J., Mukai, Y., Satoh, S., Sugano, M., Makino, N. and Tani, K. Cardiac dysfunction with severe anemia in an aged case. J Am Geriatr Soc. 53: 361-362, 2005

2) Sasaki, E., Hanazawa, K., Kurita, R., Akatsuka, A., Yoshizaki, T., Ishii, H., Tanioka, Y., Ohnishi, Y., Suemizu, H., Sugawara, A., Tamaoki, N., Izawa, K., Nakazaki, Y., Hamada, H., Suemori, H., Nakatsuji, N., Okano, H. and Tani, K. Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Stem Cells 2005 (in press)

3) Nishimura H., Yajima T., Muta H., Podack E.R., Tani K., and Yoshikai Y. :A novel role of CD30/CD30L signaling in the generation of long-lived memory CD8+T cells .J.Immunol. 2005 (in press)

4) Kang X., Xinru Xiao, X., Harata M., Bai, Y., Nakazaki Y., Soda, Y., Kurita, R., Tanaka T., Komine, F., Izawa K., Kunisaki R., Setoyama M., Nishimori H., Natsume A., Makoto Sunamura M., Lozonshi L., Saitoh I., Tokino T., Asano S., Nakamura Y., Tani K. Antiangiogenic activity of BAI1 in

vivo: implications for gene therapy of human glioblastomas *Cancer Gene Ther* 2005 (in press)

5) Nagano, K., Itagaki, C., Izumi, T., Nunomura, K., Soda, Y., Tani, K., Takahashi, N., Takenawa, T., Isobe, T. Rb plays a role in survival of Abl-dependent human tumor cells as a downstream effector of Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 2005 (in press)

2. 学会発表等

学会発表、特別講演、招待講演など
(学会発表)

1) Yokoo T., Kurita R., Sasaki E., Hiroyama T., Nakazaki, Y., Izawa K., , Ishii H., Tanioka Y., Hanazawa, K., Bai Y.S., Soda Y., and Tani K.

Hematopoietic Cell Differentiation from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Embryonic Stem Cells by Their Genetic Manipulation Using the Third Generation Lentiviral Vector.

American Society of Gene Therapy 8th Annual Meeting
2005.6.1- 6.5 St.Louis MO

2) Yokoo T., Kurita R., Sasaki E., Hiroyama T., Nakazaki Y., Izawa K., Ishii H., Tanioka Y., Hanazawa K., Bai Y.S., Soda Y., and Tani K.

Hematopoietic Cell Differentiation from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Embryonic Stem Cells by Exogenous Gene Expression Using the Third

Generation Lentiviral Vector

Japan Society of Gene Therapy. The 11th Annual Meeting 2005

2005.07.28-30 Tokyo

3) 栗田良, 横尾朋子, 佐々木えりか, 寛山隆, 高杉香志也, 谷岡功邦, 伊澤清子, 曾田泰, 中崎有恒, 谷憲三朗
コモンマーモセット胚性幹(ES)細胞を用いた血球細胞分化誘導系の検討
(優秀ポスター)

第 67 回 日本血液学会総会
2005. 9. 17-19, 横浜

(招待講演)

1) Kurita, R., Yokoo, T., Takasugi, K., Imoto, E., Hiroyama, T., Nakazaki, Y., Izawa, K., Ishii, H., Tanioka, Y., Hanazawa, K., Bai, Y.S., Soda, Y., Sasaki, E., Tani, K. Hematopoietic cell differentiation from common marmoset embryonic stem cells by their genetic manipulation using the third generation lentiviral vector. In the First German-Japanese symposium on nonhuman primates: embryonic stem cells and transgenesis. 13, 14 March 2006 (Göttingen, Germany)

Figure1

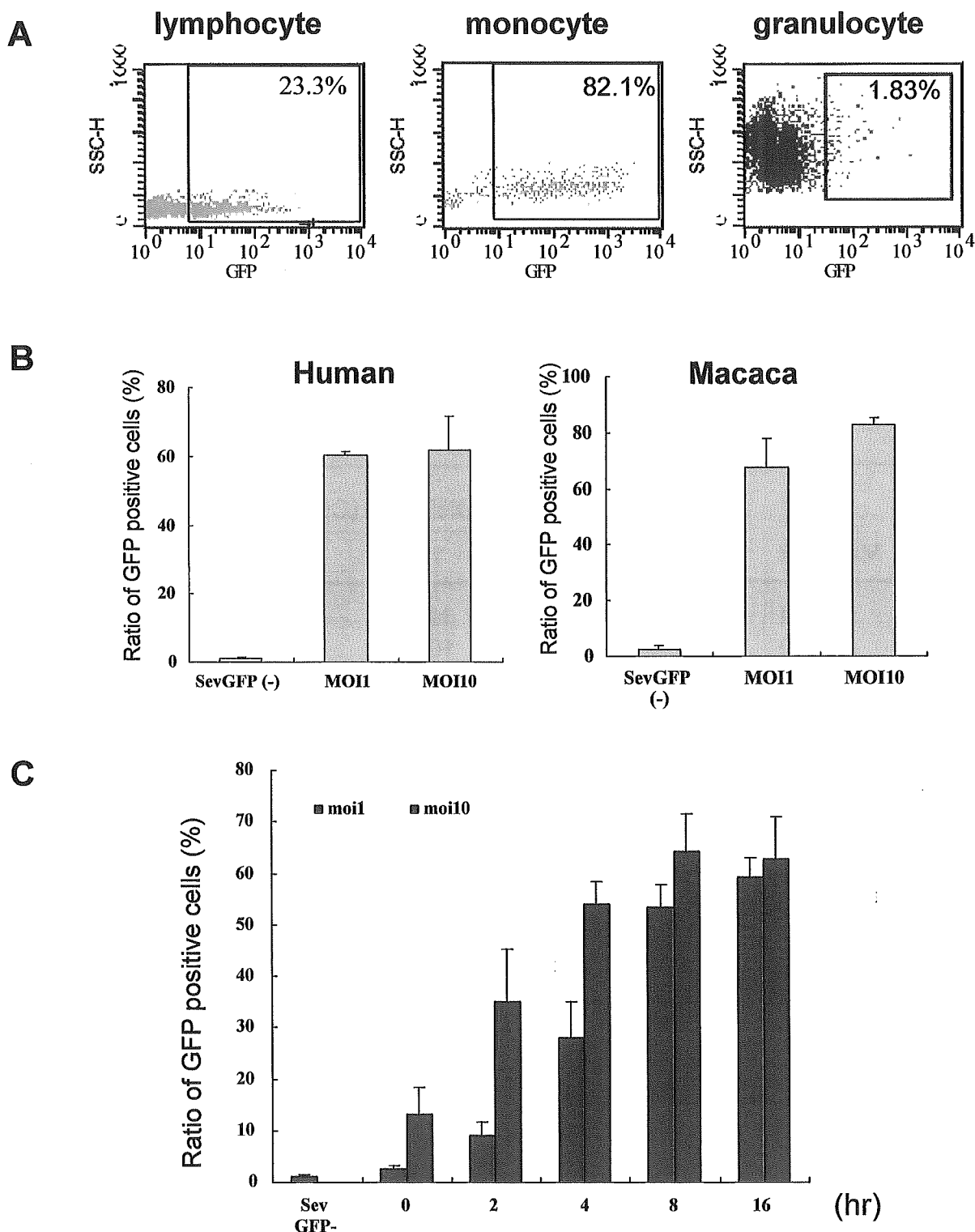


Figure 1 GFP 発現センドライウイルスベクターによる血球への 遺伝子導入効率

A. ヒトリンパ球、単球、顆粒球に MOI (CIU) 10 にて SeV GFP を感染後、16 時間培養し FCM にて解析した。数値は GFP 陽性細胞の割合を示す。B. ヒトまたはカニクイザル CD14 陽性細胞を分離し、各 MOI にて SeV GFP を感染後 16 時間培養し、GFP 陽性細胞の割合を解析した。C. ヒト CD14 陽性細胞に SeV GFP を導入後、各培養時間における GFP 陽性細胞の割合を解析した。

Table1 GDNF 産生

Macaca#	SeV hGDNF MOI (CIU)		
	0	10	100
G061	ND	ND	3.82
G063	ND	10.2	153
G064	ND	ND	107

ND; not detected

カニクイザル CD14 陽性細胞 1×10^4 個へ SeV hGDNF を各 MOI にて感染後、3日間培養し培養上清中の GDNF を定量し、培地量で補正後、GDNF 産生量 (pg) とした。

Figure2

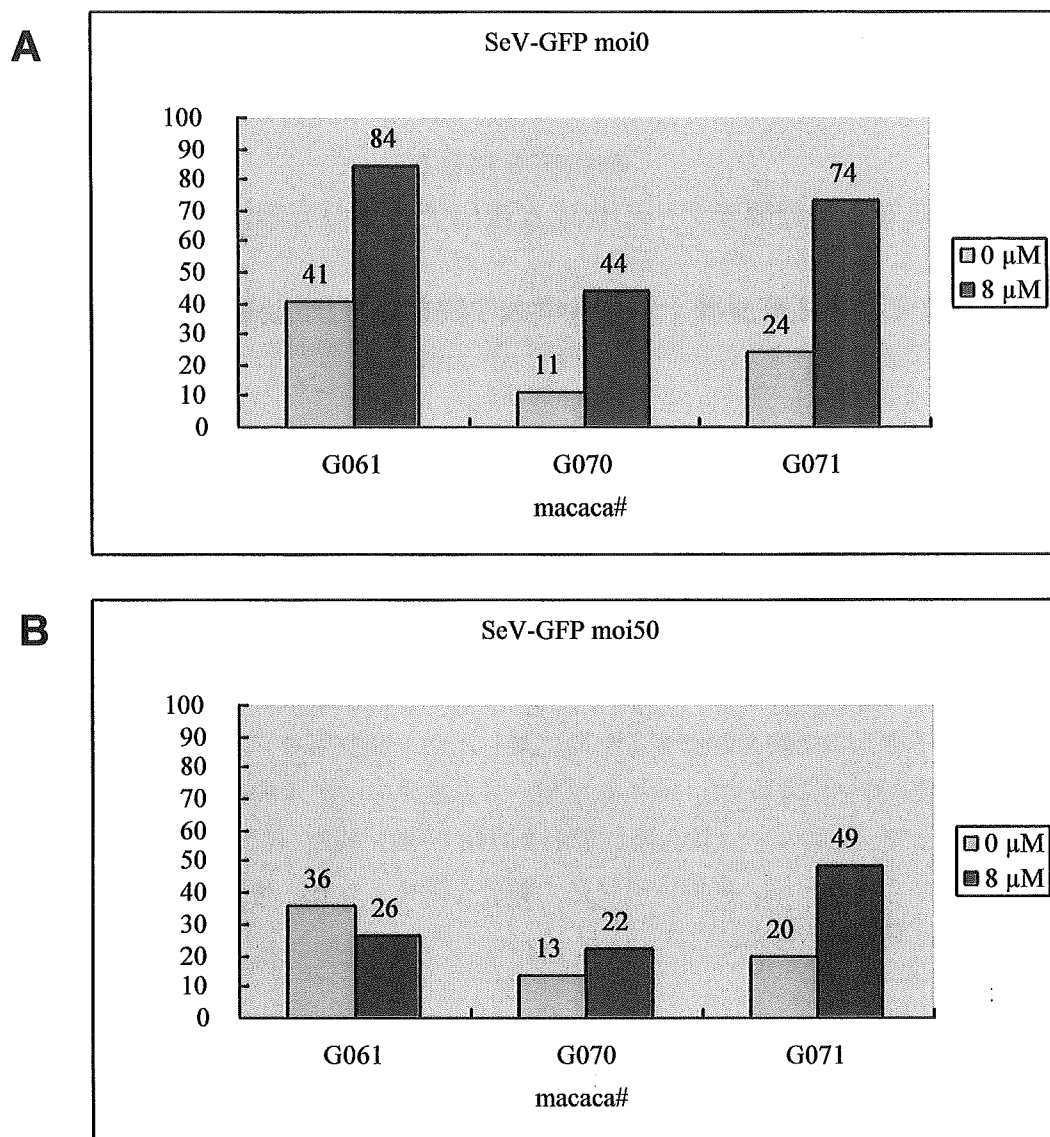


Figure2 SeV GFP 感染による単球の走化性への影響

A. SeV GFP 非感染カニクイザル末梢血単核球をトランズウェルにアプライし、0 または 8 μM fMLP 存在下にて 3 時間誘導後、メンブレンを移動した細胞を回収し FCM にて2分間解析し CD14 陽性細胞の総数をカウントした。移動率算出用に分取しておいたコントロールサンプルも同様に FCM にて CD14 陽性細胞の総数をカウントし、これらの細胞数の比率を求め、CD14 陽性細胞の移動率とした。B. SeV GFP 感染カニクイザル末梢血単核球にて A と同様のアッセイを行い、CD14 陽性 GFP 陽性細胞のコントロールとの比率からウイルス感染細胞の移動率を算出した。

平成17年度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

「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：

小血管性脳梗塞を再現するカニクイザルモデルとして、二種類の動物モデルの開発を行った。①サル大脳新皮質微小脳梗塞モデルにおいて、大脳新皮質に一定の大きさの微小脳梗塞を形成する実験系を確立した。このモデルでは、さらに、皮質直下の白質部位にも巨大な軸索損傷が形成されることが認められ、脳梗塞後亜急性期に見られる白質の炎症反応を再現することもできた。このモデルは、一定の大きさの脳梗塞巣が再現よく作製可能なことから、遺伝子導入の効率を評価するために適したサル脳梗塞モデルといえる。②サル多発性ラクナ梗塞モデルにおいて、マイクロビーズを経カテーテル的に内頸動脈の遠位部から注入することで、このビーズ注入後わずか3時間でMRI観察(拡散画像)において明瞭な梗塞層を認めた。さらに、両側性にラクナ梗塞を誘導すると、高次脳機能(記憶力)が傷害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。脳梗塞は非常に致死率の高い急性疾患として知られている。脳梗塞動物モデルを開発するにあたり、脳構造・遺伝子・蛋白質等の生物情報が多く、すでに広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、とくに近年認知症との関連が論じられている小血管性脳梗塞について、本研究において新しい疾患モデルの作出を行うことを目的とする。

一つ目のモデルである大脳新皮質性微小

脳梗塞モデルは、大脳新皮質の微小血管内で光照射により光感受性色素(ローズベンガル)から一重項酸素を発生させ、脳血管内に血栓を作出させる方法である。この方法により、非常に再現性よく、同程度の広さの梗塞部位を作成することが可能となる。

二つ目のモデルである多発性ラクナ梗塞モデルは、平均球径50マイクロメートル(25-75 μm)のマイクロビーズ(Sigma Sephacryl S-200-HR)を内頸動脈の遠位部から経カテーテル的に注入する方法である。本モデルでは、時間経過と共に、脳内にラクナ性脳梗塞がどのように広がっていくかについてMRI画像イメージング解析を行