

4日から5日で死亡例が出る。これを観てみますと、髄膜脳炎を起こしていて、どうしても欠損型のセンダイウイルスベクターでないときついということです。

非臨床試験では先ほど言ったように、F欠損、第一世代のベクターですけれども、これにFGF2を搭載し、筋肉内投与で常用量と常用の10倍量の投与をして2週間追いました。白血球とか、CPK（クレアチンホスホキナーゼ）とかLDH等、20数項目のうちのいくつかを示しますけれども、特に搭載した遺伝子に関しては有意な上昇を示す。血液検査では特に異常がないということで、実際に病理解剖の所見も加えて大丈夫だということで、先程述べたように九大で臨床研究に入っております（図5）。

もう一つ、脳虚血のモデルですけれども、これは、スナネズミがいちばん用いられるわけです。副血管回路がないということで、全脳虚血はだいたい昔からスナネズミを使ってモデルを作ります。両側の総頸動脈を5分間結紮して、全脳虚血を起こした後再疎通をする。そうしますと、2～3日後、海馬のCA1の錐体細胞、ここが一番感受性が高いのですけれども、遅延性の細胞死を起こしてくる。これを防ごうという考えです。脳の定位固定装置を用いて、左の側頭室にセンダイウイルスベクターを入れるわけですけれども、非常に効率よく脳質周囲の上位細胞、及び神経細胞で搭載遺伝子が非常に早く発現するということがわかりました（図6）。

それで、このモデルを用いて、遺伝子治療の評価をしようということで、安全性、有効性評価を始めました。この場合は、GDNF（グリア細胞由来の神経成長因子）ですけれども、ワイルドタイプの付加型は当然ウイルスが増殖しますから、発現が非常にいいわけです。第一世代のF欠損株は、あとでわかったんですが、細胞障害性が結構強くて、実はあまりよく発現しない。それに比べてMF両欠損型というのはウイルス粒子を出しませんからそんなに組織を痛めないで、ワイルドタイプと同じくらい発現するということがわかりました。図右がGDNF、他方が陰性対照のGFPですけれども、これでは錐体細胞が6日後の判定でほとんど落ちてしまいました。こういう格好でアポトーシスを起こして消失してしまいました。こちらはGDNFを搭載したウイルスベクターで治療したケースです（図7）。

そのほかいろいろな、20種類くらいの因子を搭載して試したのですが、GDNFがもっとも著効を示しました。6日後の判定ですと、CA1の神経細胞を保護することができます。それからNGF、PGNFこのへんがちょっと落ちますけれども有効、IGF1以下はほとんど効果がないということがわかりました。以後、実験はGDNFを用いて行っています。先ほどいいましたように、ワイルドタイプ、あるいはF欠損株というのはかなり投与後の脳室周囲の浮腫、あるいは細胞浸潤が強くて、上皮細胞が脱落してしまうということになりますけれども、2世代目のNF欠損株ですと、ほとんど病変が見られないということです（図8）。

でも実際には、虚血を起こして直後に投与するというような、ヒトの場合にはそんな調子のいい治療ができるわけではありません。これまでの脳虚血の実験はほとんどそうですが、虚血前投与か、同時投与をしないと有効でないということです。ただ、センダイウイルスの場合、搭載遺伝子の発現量がすごくいい、あるいは高い、速いということで、実際の症例を考えて、一体、どこまで遅れて、有効になるかということ調べました。虚血後

投与を30分、40分、2時間、6時間とずらしてきたのですが、ここでは4時間、虚血後4時間目に接種をして、先ほどは6日目で判定するわけですがけれども、本当に6日目で止まってくれたらいいんですけれども、その後まだ神経細胞が脱落する可能性もある、ということで1か月、28日後に評価をするという、かなりきつい評価をしたわけです。

これが28日後の結果です。虚血後、4時間後にウイルスベクターを接種をして、28日後の海馬のCA1細胞です。少し疎にはなっていますが、GDNFではインタクトに残っています。これがNGF、GFPではほとんど完璧に消失するというので、このくらいいければ何とかできるのではないかとということで、サルの方に進もうということにしました(図9)。

現在、進行中の実験ですけれども、齧歯類の脳梗塞モデルからサル類に全て移そうということでやっております。一つは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、大血管の閉塞、それから微小血管梗塞であるラクナ梗塞モデルを作るということで、サル類を用いたモデルを作成して梗塞病巣の経時的変化、脳のイメージ、病理組織、髄液所見、脳タンパク、遺伝子、この辺を総合的に調べようと考えています。また、診断、あるいは有効な治療法、今のところGDNFでやっておりますけれども、梗塞巣の病巣に応じてもう少し違う遺伝子群も選択する必要があると考えて進めております。今、スナネズミでやった全脳虚血モデルを作成して、センダイウイルスの有効性評価をするということで、サル類を用いた脳内での搭載遺伝子がスナネズミと同じように発現するかどうかという調査を進めています。

それから高次認知機能、運動機能を指標としたサル類の治療評価ということで、学習試験としての4段指迷路の試験、遅延型認知試験、運動機能試験、といったものを開発して評価に使っております(図10)。

簡単にサル類で今、行っていることを紹介したいと思います。

まず一つ目には、霊長類を用いた微小血管の脳梗塞、いわゆるラクナ梗塞モデルです。きれいなラクナ梗塞モデルというのは国際的にもあまりないということです。しかし、血管性の認知症、あるいは痴呆症の主要なリスクファクターとなっていますので、この治療薬開発等において、どうしてもこういうモデルが必要であるということでやってきました。

基本的にローズベンガルという蛍光色素を血中に投与して、梗塞を起こしたい部位に光を当てるという。非常にシンプルな方法ですが、そうすると光照射によって活性酸素ができて、その部位に血栓ができて梗塞を起こす。これが梗塞後1日、3日、5日、7日、10日という順で起こしていったらどういふふうに進んでいくかということをお脳のあちこちで梗塞を起こしてみるわけです。実際にラクナ性の脳梗塞を起こしてみると、ここに梗塞層が一つの切り口を見せておりますけれども、今までやってきた齧歯類と非常に違うことがわかってきました。特にびまん性の白質病変が強く出て、活性化アストロサイトが、誘導されるということで、従来やっていたマウスやラットのモデルと全く違うという結果になりました。やはりサルのモデルでないと、ヒト型はできないということを認識しまして、治療薬開発に必要なモデルだということで、昨年特許を申請して、「霊長類を用いたヒトのラクナ梗塞のモデル」ということで、特許請願をして受け付けられております(図11)。

実際、どんな風になるかということ、これはMRIで撮ったラクナ梗塞のモデル像ですけれ

ども、T2強調画像で非常に明瞭に見られます。このところにできているんですけども、下はその模式図です。サル類でこういう梗塞モデルを起こすと、アストログリアの反応が非常に強い。また灰白質に比べて白質の反応が非常に強くて、齧歯類ですと1週間くらいで沈静化していくんですけども、ヒトと同じようにサルの場合は白質病変が非常に長く持続して一ヶ月以上その反応が収まらないという特性があります。

なぜこうなるのかはまだわかりません。ただ、霊長類と齧歯類における白質の多さというのも全く違います。齧歯類というのはここに脳梁があるくらいで、皮質の下に厚い白質層というものが無いからかもしれませんし、グリアそのものの反応性が齧歯類と霊長類とはかなり違うということがあるのかもしれない(図12)。

中大脳動脈梗塞のモデルについて説明します。これは脳底部からの脳血管の造影像ですけども、実際にはX線透視下で大脳動脈からマイクロバルーンカテーテルをずーっと入れてきまして、ここでバルーンをふくらませて梗塞を起こすということをやっております。その後再還流して、経過を追っていくという格好になります。右上段が閉塞3時間後の像です。このところで閉塞を起こしたわけですけども、下段の24時間後になると、梗塞層がかなりはっきり読めてきます。

当然、運動障害、神経症状が出てきてしまうということになります。現在まで、4例試みましたがけれども、いずれも閉塞後3日までに死亡してしまうというかなり厳しい状況です。もう少し基本的に条件検討が必要であろうと考えております(図13)。

それから、全脳虚血モデルですけども、スナネズミのときは非常に有効であるということがわかりました。それで、サル2例を使いまして、 $1 \times 10^9$ のGDNFを搭載したベクターを脳室内に投与して、髄液でその発現を追ったものですけども、投与後8時間という早期ですでに遺伝子発現が見られ、4日後にピークになるということで、スナネズミとほとんど変わらない結果でした。スナネズミのときは5分間の虚血を行いましたけれども、霊長類の神経細胞は少し強いので、今考えているのは、20分から30分の全脳虚血を起こし、遺伝子治療を行おうと考えております(図14)。

また、梗塞に伴ってその修復時にどういったタンパクがどういうふうに発現してくるかという興味があります。これは抗体アレイを用いましたカニクイザルの脳内発現タンパクを網羅的に解析するという方法です。ベクトン・デッキンソン社からパワープロットというのをヒト用に出しているのんですけども、1050の抗体について、ウエスタンブロットで当たったところ、カニクイザルの脳タンパクは、そのほぼその半分の435種のタンパクについて解析できるということで、とりあえず、梗塞及びその修復過程でどんなタンパクがどんな風に出てくるかということ解析した上で、必要なものを搭載ベクターに入れていこうと考えております。

最後になりますけれども、高次認知機能と運動機能を指標としたサル類の治療効果の評価ということで、上段は我々が開発した4段指迷路試験という方法です。これは本来痴呆症のサルとか、パーキンソンのモデルで評価しようとはじめまして、最近ダイオキシンの投与で次世代の知能評価というものに使っております。かなり汎用性があります。1段、2段、3段、4段、逆方向で正解なんですけれども、これをクリアするのに必要な思

考過程を測って行って、知能測定をしようというものです。

中段は運動機能試験です。片側に梗塞を起こしますと、当然反対側の手は使えなくなります。うまく治療がいけば、エサを取れるようになるわけですがけれども、その過程を動画で解析する方法です。下段は遅延性の認知試験という当て物クイズです。途中で一定時間見ておいたものを隠してどちらか正解を取るわけで、これはラクナ梗塞モデルにおいて、記憶力が低下したことを示しています。普通のサルであれば時間が短かければ簡単に答えをみつけますけれども、ハンデを負いますと遅延時間が短かくても正解率が悪くなる。治療がうまくいけば、正常のようになってほしいということです（図15）。

これからの研究の進め方です。モデルの開発、改良、解析がまだ必要です。ベクターに関しては第3世代のベクターの大量生産が必要となってくるので、今、試みているところです。種々の脳梗塞における神経増殖因子以外の有効な治療遺伝子の検出、九州大学医学部との共同研究で始まる新世界サルのマーモセットを用いて、*ex vivo*で遺伝子を入れて脳梗塞の治療ができないかというものです。彼らの経験を生かして、新しく挑戦をするということ、それから、梗塞領域のタンパク発現の解析、そこから新規治療遺伝子を探そうという試み。それから運動高次学習、認知機能を指標とした評価法を確立する。筑波霊長類センターにfMRIが入りましたので、fMRI、脳波、髄液、その他臨床所見等、組織病変との相関を明らかにして、できれば早期診断も行いたいということを考えております。ご静聴どうもありがとうございました（図16）。

笹月 吉川先生、どうもありがとうございました。どうぞ、ご質問、あるいはコメントがございましたらどうぞ。

質問 国立成育医療センターの柳澤と申しますが、興味深い話ありがとうございました。一つお伺いしたいのですけれども、脳室に打ち込んだ場合、感染しているのを上衣細胞と考えるとよろしいのでしょうか。

吉川 はい。一番増えるのは上衣細胞ですけれども、実際には上衣細胞から中に入ってまれに海馬の皮質の神経細胞でも発現します。

質問 それは健常な脳質壁でもバリアを越えていくということですか？

吉川 はい。

質問 ありがとうございました。

笹月 他にございますか。吉川先生、ベクターの問題ですけれども、これはいわゆる日本初のベクターということで、みんなが非常に期待し、かつ注目しているところなんです。最初におっしゃった細胞毒性というのは、これは与えられた宿主の免疫反応に由来した細胞毒性なのか、あるいはウイルスベクターそのものが持つ毒性なんですか。

吉川 両方だと思っんです。ウイルスそのものが持つ毒性として、一番強いのはヒュージョン活性で細胞融合を起こしてしまいますので。それで一番最初にFタンパクを消そうと考えました。しかしF蛋白を消して、細胞と細胞を融合させないようにしても、実際にはMタンパクがあるとウイルス粒子が出てきてしまうので、これに対して免疫反応がかなり強く起こります。そこで次にMを消そうというんで、FMを欠損したものを作ったんです。

やはりどうしても中和活性を含めて、HNの抗原が一番強いんで今の世代はFとMとHNをつぶして、なおかつウイルスが細胞に入れるようなデザインを、端的にいうと、HNの抗原エピトープを消して細胞に吸着できる場所を残して遺伝子を持ち込ませようということで、今、3世代目まで来て、一応、細胞への導入効率はそれまでの第2世代までとそんなに変わらないのができました。ただ大量に作るのがまだです。

ワイルドタイプは卵に入れればバツと増えるのですが、欠損型は、ワクチニアウイルスのベクターに入れたものとそれぞれの遺伝子のプラスミドを入れたもの、それぞれ独立に細胞にかけてウイルスを回収する方法を取るので、大量生産までなかなかいかないという問題があります。

笹月 細胞にin vivoでは感染する、この系ではそういうようにしてあるわけですね。

吉川 そうですね。第1次世代からあとは、そういう意味では完全な感染性粒子ができなくなってきました。

笹月 そうしますと、一旦感染して入ったRNAのハーフライフはどれくらいなんですか。

吉川 それはわかっておりませんが。たぶん搭載遺伝子発現から見ると、4日目がピークで7日目くらいまでには終わってしまうんで、おそらくウイルス由来のものはもう少し安定だとは思いますが、所詮、細胞質内での異種のゲノムなものですから、そんなに長くは持たないのではないかなと思います。

笹月 他にどなたかございますか。

質問 国立感染研の浜口と申します。興味深いお話ありがとうございました。パワープロットを使ってヒト抗体アレイでいくつかのタンパクを脳梗塞に伴ってあがってくるタンパクを見つける、その中から治療の効能のある遺伝子を見つけてこようということだったんですけれども、実際にそれをやられて、いくつか候補になってくるものがもうすでにあがってきているのでしょうか。

吉川 いや、まだこれは霊長類センターとの協力でやっております。実はものすごく、費用が高いんですよ。1000いくつ一遍に当たってもらうというのが。それで、とりあえずヒト用に開発されたパワープロットなものですから、カニクイザルで、それぞれモノクローナル抗体なものなので、ヒトのエピトープとどれくらい交差するかという情報が全くなかったんで、脳タンパクがどのくらい当たるかということまでやって、できれば当たったものから絞った格好でやらないと、研究費がものすごくかかってしまいます。とりあえず450選出出して、それについて、ラクナ梗塞、あるいは中大脳動脈梗塞、たぶん梗塞部位の領域や大きさが全然違うので、出てくる壊れ方も違うし、反応も違うんで、たぶん違うタンパクがひっかかってくると思うんですけれども、まだ、これから進めるところで実際何が上がってきたというレベルまでには到っていません。

質問 ありがとうございます。

笹月 それでは時間ですので、先生、どうもありがとうございました。

吉川 ありがとうございます。

### 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。

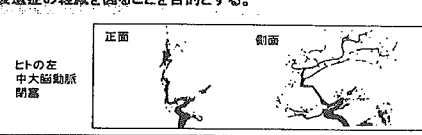


図 1

### 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・新領域創生科学研究会  
 筑波霊長類センター、ディナベック(DNAvec)、九州大学医学部

図 2

### 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

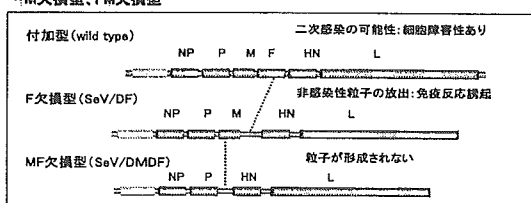


図 3

### 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

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

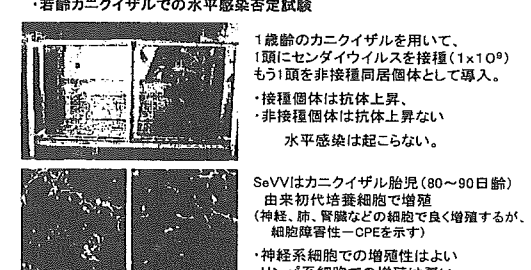


図 4

### 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SeVVの安全性評価(筋肉内投与)

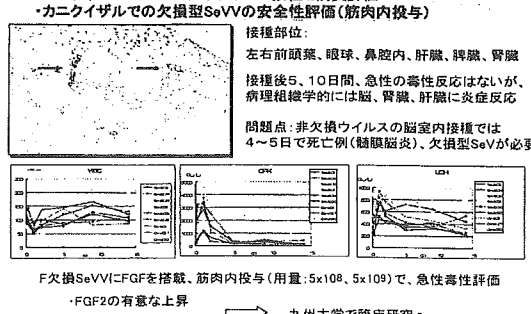


図 5

### 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

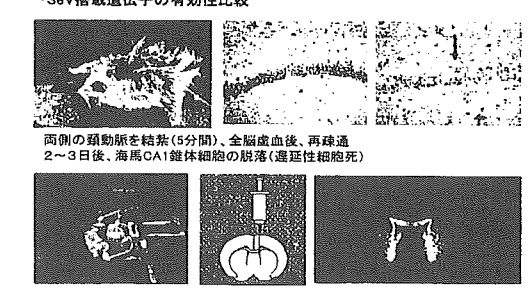


図 6

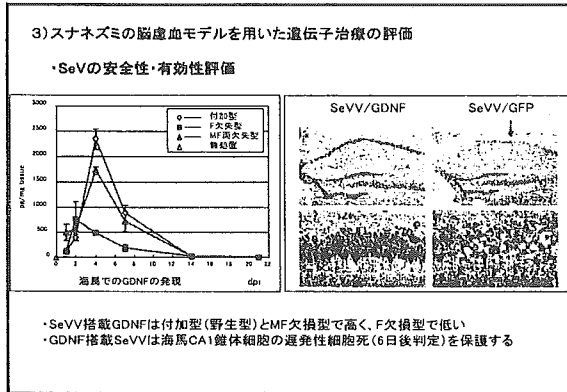


図 7

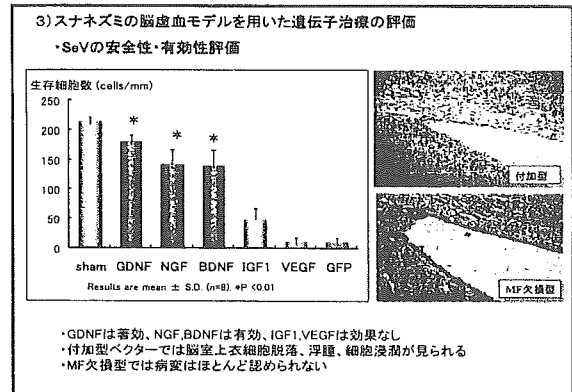


図 8

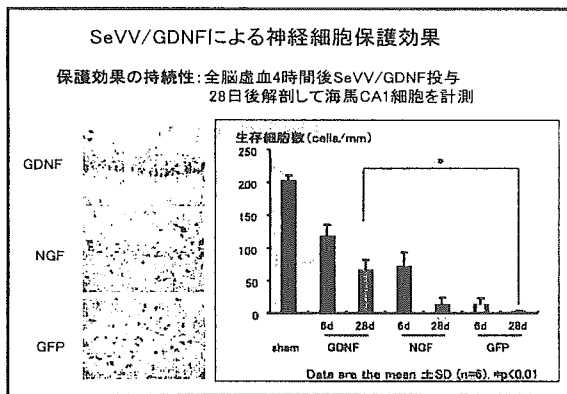


図 9

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SeVの有効性評価  
 サル類を用いた、脳内でのSeV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段指迷路試験、遅延型認知記憶試験、運動機能試験など

図 10

・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、国際的にほとんど普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炎症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)

微小血管梗塞作成法      サル大脳皮質の梗塞      梗塞病変

- ・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)

図 11

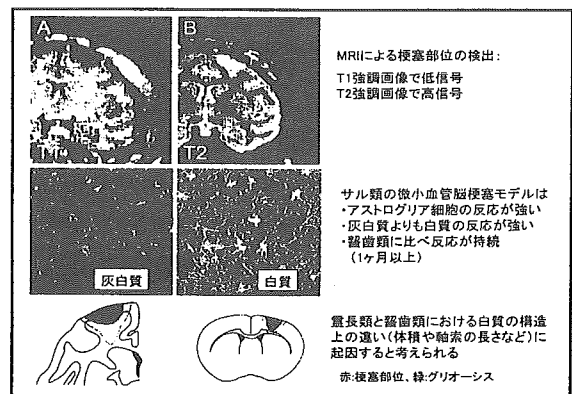


図 12

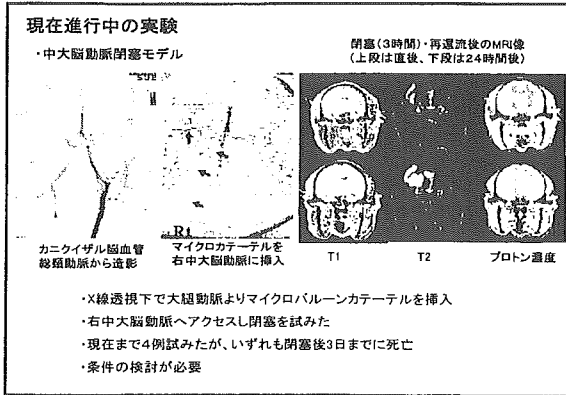


図 13

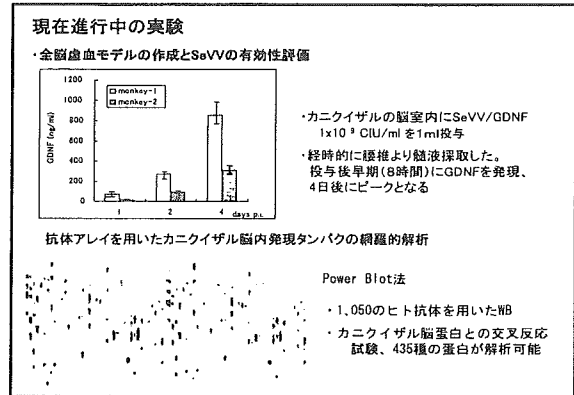


図 14

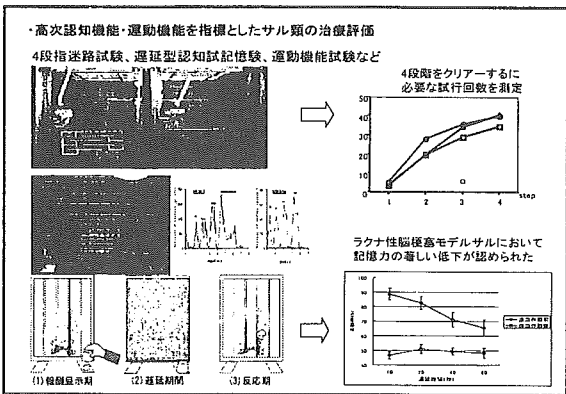


図 15

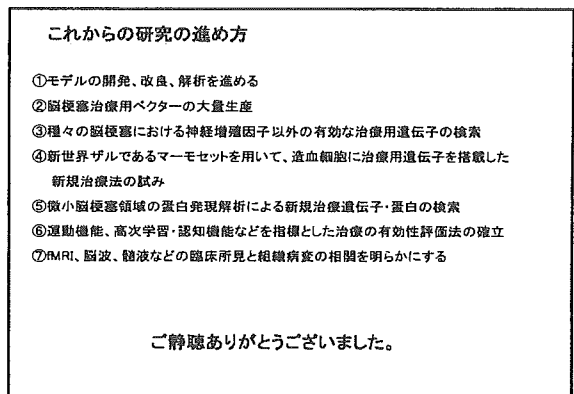


図 16