

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

BDNFを用いた認知症遺伝子治療法開発に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 木村 展之

平成19 (2007) 年 3月

目次

I. 総括研究報告	
BDNFを用いた認知症遺伝子治療法開発に関する研究	----- 1
木村 展之（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）	
II. 分担研究報告	
1. ウイルスベクターの開発	----- 11
井上 誠（ディナベック株式会社）	
2. 認知機能評価を目的とする行動学的解析実験系の確立	----- 13
田代 朋子（青山学院大学）	
3. ウイルスベクター接種時期の確定を目的とした、マウス脳組織の経時検索	----- 15
田平 武（国立長寿医療センター研究所）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

I. 総括研究報告書

BDNF を用いた認知症遺伝子治療法開発に関する研究

主任研究者 木村展之 （医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）

研究要旨

本研究班では過去の *in vitro* 検索結果を基に、BDNF 発現ウイルスベクターを用いた認知症遺伝子治療法の確立に向け、アルツハイマー病モデルマウス（以下、Tg マウス）における同ベクターの治療・予防効果を検索することを主目的としている。特に BDNF 発現ベクターに関しては、神経細胞に対する親和性が極めて高いセンダイウイルスベクターに注目し、同ウイルスベクターを用いた BDNF 発現ベクターの開発・作成を行った。これまで、マウス脳へのウイルスベクター接種は、主に脳組織実質に対して直接ベクターを接種するという方法がとられているが、脳組織実質に対する免疫反応惹起や個体差による接種場所のずれ、組織障害性を考慮すると、最終的なヒトへの応用には疑問点が存在する。そこで本研究では、個体差を無視してベクターの導入が可能となる脳室内接種を採用することとした。しかしながら、マウス脳室内へのウイルスベクター接種手技＝マイクロインジェクション法は過去に報告例がほとんど存在しない。そこで今年度は、同ウイルスベクターの開発・作成および認知機能評価系の確立を行うとともに、マウス脳室内へのマイクロインジェクション法を確立するための様々な条件検討を行い、実際に BDNF 発現ベクターを接種して、BDNF 発現効果と脳組織への安全性確認を行った。この結果、Bregma（頭蓋骨十字縫合部位）を基準とする位置確定法によって脳室内への確実なマイクロインジェクション法の確立に成功するとともに、同ベクターによる脳内 BDNF 発現量上昇を確認することに成功した。

分担研究者

井上 誠

（ディナベック株式会社・部長）

ウイルスベクターの開発

田平 武

（国立長寿医療センター研究所・所長）

ウイルスベクター接種時期の確定を目的と

した、マウス脳組織の経時検索

田代 朋子

（青山学院大学・教授）

認知機能評価を目的とする行動学的解析実

験系の確立

A. 研究目的

我々は過去の *in vitro* 系を用いた検索において、BDNF（神経栄養因子の一つ）がアルツハイマー病主病変因子アミロイドβ（Aβ）による神経突起変性毒性を阻害することを明らかにした。アルツハイマー病はその初期段階において、シナプスを主とする神経終末や神経突起の変性が病態増悪の鍵を握っていると考えられている。そこで本研究班では、この BDNF による Aβ 毒性阻害効果を *in vivo* においても発揮されるか否かを検索し、新たな治療法確立に向けた実験を行うことを主目的としている。

本実験系では、Aβ の過剰産生が認められる Tg マウスに BDNF 発現ウイルスベクターを接種することでその評価を行う予定である。まずは同ベクターの開発・作成を行うことが必須課程であるが、ここで我々は、神経細胞に対する親和性が極めて高いセンダイウイルスに注目し、増殖性・組織障害性に関与するウイルス蛋白を欠損させたより安全性の高いセンダイウイルスベクターの作成を行う。次いで、実験対照群となるマウスの認知機能を行動学的に評価するための実験系を確立するため、実際に行動解析装置を導入して、検索を行う。

本研究では、マウスに BDNF 発現ベクターを接種することで認知症治療法としての評価を行うわけだが、マウス脳室内へのマイクロインジェクションは過去にほとんど例がないため（脳実質へのマイクロインジェクションは過去に報告されているが、実質へのベクター投与は確実に炎症反応を伴うことが明白であることに加え、個体差による接種部位のずれを否定することが出来ない）、まずは同手技の確立が急務である。そ

こで、まずは CT マウスを用いてマウス脳室内マイクロインジェクション法の確立を目指し、様々な検討を行う。また、実際に BDNF 発現ベクターを接種して、マウス脳内での BDNF 発現量の変化や、ウイルスベクターの安全性確認検索も併せて行う。

B. 研究方法

研究全般の総括およびマウス脳室内へのマイクロインジェクション法確立は木村が行った。BDNF 発現センダイウイルスベクターは井上が製造し、木村がマウス脳室内接種実験を行い、その後の病理組織学的検索は木村・田平が協力して行った。行動学的検索法を用いたマウスの認知機能評価系確立は田代が行った。また、BDNF 発現ベクターの接種時期＝治療開始時期を確定するための基礎検索は田平が行った。

1) センダイウイルス (SeV) ベクターは、染色体への組み込みがなく（細胞質での発現により遺伝毒性がない）、神経細胞への極めて高い遺伝子導入効率で一過的発現を示す。同ウイルスベクターを基にして、BDNF 遺伝子搭載 F 遺伝子欠失型 SeV ベクター (hBDNF-SeV/TS Δ F) を構築した。特に、目的遺伝子を SeV cDNA の NP 遺伝子上流に挿入することで、発現量の高いベクター構築を行った。ベクターの再構成は T7 RNA ポリメラーゼでドライブして調製した。この時、T7 の供給は plasmid で行い、ワクシニアを使用しない系で実施した。増殖および生産には F 蛋白質を持続発現するパッケージング細胞株を利用し、温度 35.5°C での大量生産を実施した。フィルターろ過による細胞残渣除去、

カラムクロマトグラフィー、濃縮の過程を組み合わせることによって、ベクターの精製を行った。

また、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を設定し実施した。最終的に、PBS 溶液として *in vivo* 投与可能な状態で調製した。

- 2) 現在世界中で最も高い信用性が寄せられている Morris 水迷路を用いた検索系を確立させ、CT マウスおよび Tg マウスを用いて実際に認知機能（主に、空間認知能力が対象となる）を検索した。直径 120cm、深さ 30cm の円形プール（東西南北 4 方向に目印を設置）を水迷路として用い、直径 15cm 程度のプラットフォームとよばれるゴールを水面下 1cm に設置し、壁面から水中に投じられたマウスが見えないプラットフォームにたどり着くまでの時間・距離等を空間認知能力として評価する。マウスは試行を重ねる度にプラットフォームの空間的位置を記憶し、すばやくプラットフォームにたどり着く。行動試験は動物種、系統または月齢によってパラメータ（試行回数、試行時間または試行日数）を適宜調節する必要があるため、まず 9 ヶ月齢正常マウスを用いてこれらのパラメータを検討した。その結果を踏まえて 10 ヶ月齢時において正常マウスと本研究で用いるヒトアルツハイマー病変異遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウス (Tg マウス) に Morris 水迷路試験を行い、Tg マウスの行動異常を評価した。
- 3) Tg マウスと同じバックグラウンドを有する SJ6 マウスを用いて、様々な位

置確定条件検討を繰り返し、脳室内マイクロインジェクション法を確立する。マイクロインジェクションは、以下の方法にて行った。エーテル麻酔下のマウスに対してペントバルビツールを腹腔投与し、十分な麻酔効果が確認された時点で頭位固定台（スナネズミ用固定台を流用する）に設置する。この際、イヤーパーによって耳腔を固定するため、マウスの脳が揺れ動くことはない。マウスの頭皮を切開し、綿棒にて結合組織を取り払った後、Bregma（頭蓋骨十字縫合部）を基準位置として、 μm 単位での接種位置確定を行う。接種位置が確定次第、マイクロドリルにて頭蓋骨に穴を開け（この際、脳実質を傷つけないように細心の注意を払う）、マイクロシリンジによる接種を行う。条件検討の段階においては、ウイルスベクターではなくエバンスブルー色素を接種し、実際に脳組織に接種されているか否かを確認した。

マイクロインジェクション終了後、マウス頭皮を縫合し（2〜3 針）、麻酔から覚醒するのを確認する。その後、最大 2 週間までマウスの状態を確認し、安楽殺後に病理組織学および生化学的検索を行った。

- 4) 実際に（1）で作成した BDNF 発現ウイルスベクターを、（3）で確定した条件にて CT マウス脳室内へ接種し、脳内での BDNF 発現量変化および安全性確認を免疫組織学および生化学的に行った。
- 5) 月齢を揃えた CT マウスと Tg マウスを用いて、病理組織学および生化学的

検索を行い、Tg マウス脳組織において神経変性が生じ始める時期を確定する。本研究で用いる Tg マウス (Tg2576) は 9 ヶ月齢から認知機能低下および神経変性が確認されるという報告が存在することから、8・9・10 ヶ月齢のマウス脳組織を用いて検索を行った。

主な検索項目は、以下の通りである。

Synaptophysin : 神経網の評価

Neurofilament : 神経突起変性の評価

BDNF : 内因性 BDNF の評価

TrkB : BDNF レセプターの評価

p75NTR : BDNF レセプターの評価

(倫理面への配慮)

動物実験は、全て医薬基盤研究所 (= 実際に行った場所) の動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから実験を開始した。

また、BDNF 発現ウイルスベクターを用いた実験に関しては、全て医薬基盤研究所 (= 実際に動物を飼育し、実験を行った場所) の組換え DNA 安全委員会およびバイオセーフティー委員会の審査を受け、その承認を得てから実験を開始したとともに、カルタヘナ法および医薬基盤研究所病原体取扱規程を遵守して実験を遂行した。

C. 研究結果

- 1) 上記作成方法により、BDNF を高度に発現する BDNF 発現センダイウイルスベクターの開発・作成に成功した。本研究系ではこのベクターを用いて、今後の遺伝子治療法確立実験および各種条件検討を行う予定である。(井上)
- 2) Morris 水迷路は被験マウスに対し 1 日

8 試行、4 日連続で行った。その結果、正常マウスの場合、試行を重ねるにつれプラットフォームにたどり着く時間が短縮し、2 日目にはプラットフォームに対しほぼ直線的に到達するようになった。

これを背景に Tg マウスでの検索を行ったところ、10 ヶ月齢時 Tg マウスにおいて、空間認知能力の低下が生じていることが明らかとなった。(田代)

- 3) エバンスブルー色素を用いた条件検討により、Bregma より外側 $2\mu\text{m}$ ・尾方向 $2\mu\text{m}$ ・深度 $1.5\mu\text{m}$ の条件にて接種を行うことで、脳室内へほぼ確実に接種を行うことが明らかとなった。さらにこの部位は、認知機能を司る海馬の直上部にあたることから、産生された BDNF が海馬組織へ到達しやすいと予測される。生理食塩水を接種したマウスでは、2 週間を過ぎても行動に異常は見られず、安楽殺後の病理組織学的検索においても有意な変性は確認されなかった。(木村)
- 4) BDNF 発現ベクター接種実験では、同様に脳室内投与を行った結果、接種後 2 週間後においてもマウスに大きな行動性変化や活動低下は見られなかった。ベクター接種群は、接種後 3・7・14 日後に安楽殺解剖を行い、病理組織学および生化学的検索を行った。病理組織学的検索から、ベクター接種マウス脳においては、接種近辺にてアストログリアの有意な活性が生じていることが明らかとなった(Fig. 1)。Westernblot 法を用いた生化学的検索からは、ウイルス接種 3 日後から、BDNF 蛋白発現

量が対照群に比して有意に上昇していることが明らかとなった(Fig. 2)。この BDNF 蛋白発現量上昇は、接種 14 日後において最も高い上昇度が確認された。

(木村、田平)

- 5) 病理組織学的検索によって、8-10 ヶ月齢の Tg マウス脳においては、神経網の脱落および神経突起の明確な変性は確認されなかった。一方、western blot 法を用いた生化学的検索では、Synnptophysin および Neurofilament 蛋白発現量に大きな差は確認されなかったものの、内因性 BDNF 蛋白発現量は 10 ヶ月齢において、CT マウス脳に比べて低下していることが明らかとなった (Fig.3)。

BDNF レセプターである TrkB および p75NTR には大きな変化は認められなかった。(田平)

D. 考察

- 1) F 蛋白を欠損させたことにより、本研究にて作成した BDNF 発現センダイウイルスベクターが脳組織に与える傷害性を著しく低下させることが可能となった。また、目的遺伝子を SeV cDNA の NP 遺伝子上流に挿入することで、発現量の高いベクター構築が可能となったことから、BDNF のみならず、他の様々な因子を神経系に強く発現させるデバイスが可能となり、他の研究分野への応用可能性が非常に期待できる。
- 2) Morris 水迷路試験の結果から Tg マウスは約 10 ヶ月齢時において空間認知能力が低下していると考えられる。過去の報告からこの Tg マウスにおいて

病理組織学的または生化学的異常が現れるのが 7 から 8 ヶ月齢であることを考えるとこの空間認知能力異常は、今後月齢とともに増悪していくものと考えられ、来年度行う BDNF ベクター投与時期は「予防」という観点にたてば 10 ヶ月齢よりも前に設定する必要がある。また Tg マウスの空間認知障害は試行 1 日目がもっとも顕著で以後、正常マウスと同等になることから記憶能力自体が消失しているわけではないと考えられる。この結果はこの Tg マウスが軽度認知障害の予防・治療を目的とする本研究に有用なモデルであることを示す。

- 3) 本研究によって、個体差を無視することが可能な、普遍的マウス脳室内マイクロインジェクション法を世界に先駆けて開発することに成功した。この成果をもとに、来年度は実際に Tg マウスへの BDNF 発現ベクター接種実験を行う予定である。
- 4) 実際にウイルスベクターを接種したマウス脳組織では、接種部位近辺の脳室辺縁部において炎症細胞の浸潤ならびにアストログリアの活性が確認されたことから、ウイルスベクター接種を原因とする炎症は少なからず生じることが明らかとなった。しかしながら、神経細胞そのものの大きな変性は確認されなかったため、マウス脳組織への負担度はそれほど大きなものではないと考えられる。

Western blot による生化学的検索結果から、本研究で用いる予定の BDNF 発現ベクターは、実際に接種されたマウス

脳内にて有意な BDNF 発現機能を有していることが確認された。特に、接種 14 日後において最も有意な上昇度が確認されたことから、来年度予定している、Tg マウスへの BDNF 発現ベクター接種による神経突起の保護効果および認知機能障害保護効果の検索においては、BDNF ベクター接種 14 日後の個体を用いて検索をするという条件が確立された。

- 5) 病理組織学的検索によって、8-10 ヶ月齢の Tg マウス脳における明確な神経網の脱落および神経突起の変性は確認されなかったことから、BDNF 発現ベクターによる神経突起保護効果を検索するためには、Tg マウスの更なる加齢が必要であることが示唆された。この結果は過去の報告と一致しないが、今回我々が購入・飼育している Tg マウスの性質であると理解すべきである。一方、10 ヶ月齢の Tg マウス脳では内因性 BDNF 蛋白発現量が CT マウスに比べて低下していたことから、10 ヶ月齢の Tg マウスに BDNF 発現ベクターを接種することで、同因子のアルツハイマー病態機構＝特に認知能力低下に対する予防効果の確認検索が可能であると考えられる。最新の知見では、アルツハイマー病初期段階の患者脳組織では BDNF 発現量が低下しているとの報告があり、今回の結果はそれを反映するものである可能性が高い。この点に関しては、同月齢における Tg マウスの認知機能評価結果と照らし合わせて考慮する必要があるとも考えられる。また、10 ヶ月齢においては TrkB や

p75NTR といった BDNF レセプターに明確な変化が見られなかったため、BDNF による脳組織への影響を、より純粋に検索しやすいともいえる。

E. 結論

本研究によって、BDNF を神経細胞親和的に高発現できるウイルスベクターの開発・作成に成功したとともに、マウス脳室内へのウイルスベクター接種法＝マイクロインジェクション法を確立することができた。この成果は、本研究班における研究目的外でも流用が可能な技術であることから、神経系研究領域において非常に大きな貢献となることは明白である。

また、実際に BDNF 発現ベクターの効果および安全性が確認されたことから、来年度はこの成果を元にして、Tg マウスを用いた BDNF による神経突起変性保護効果ならびに、認知機能障害の抑制効果を検索する予定である。また、Morris 水迷路試験は本研究に用いる Tg マウスの空間認知障害および BDNF ベクターの効果を評価することに適した試験であることが確認されたことから、行動学的検索法を用いた認知機能評価系を確立することが出来た。

本研究系の骨子＝BDNF を用いた遺伝子治療・予防法確立実験の対象である Tg マウスは、10 ヶ月齢において内因性 BDNF 発現量の低下と認知機能の低下が見られたことから、少なくとも予防法としての評価実験は 10 ヶ月齢より以前にベクター接種を行う必要がある。また、治療法としての評価実験は、10 ヶ月齢を境として行うことで、有意な結果が得られるものであると考えられる。現在は、来年度行う BDNF ベクター遺

伝子治療本試験に向けて、新たに購入した Tg マウスを継続飼育中である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

○Kimura N, Ishii Y, Suzaki S, Negishi T, Kyuwa S, Yoshikawa Y. A β upregulates and colocalizes with LGI3 in cultured rat astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 2007; In Press

○Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, Terao K. Amyloid β up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid β -related neuritic degeneration. *J Neurosci Res* 2006;84:782-789.

Nagai Y, Kato A, ○Inoue M. Establishment and progress of Sendai virus engineering. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2006;51(1):27-37.

Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, Ban H, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M, ○Inoue M. Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J Gene Med*. 2006;8(9):1151-9.

Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi S, ○Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a recombinant adeno-associated viral vector attenuates age-related A β accumulation and memory deficits without lymphocytic

infiltration in Tg2576 mice. (投稿中)

2. 学会発表

・The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders

(第 10 回国際アルツハイマー病及び関連疾患学会)

2006 年 7 月 スペイン国マドリッド

・日本認知症学会 2006 年 10 月 広島

・The 8th International Conference AD/PD (第 8 回国際アルツハイマー病及びパーキンソン病学会)

2007 年 3 月 オーストリア国ザルツブルク

H. 知的財産権の出願・登録状況

(出願予定)

「マウス脳室内マイクロインジェクション法」

Fig.1

Immunohistochemistry by using antibody for GFAP

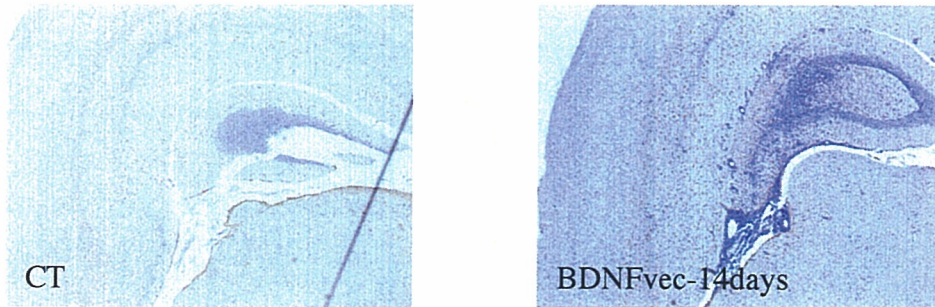


Fig.2

Westernblot for investigating the BDNF expression in mouse brains

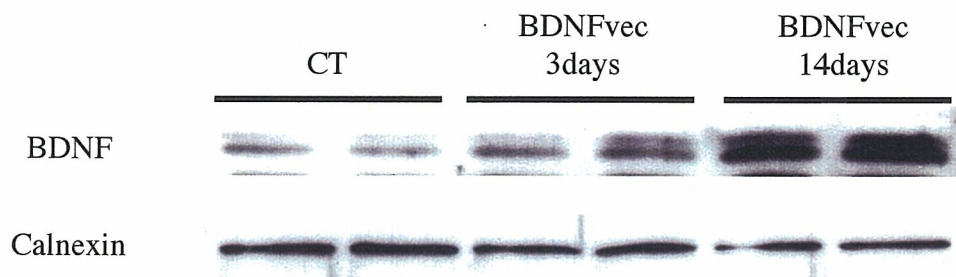
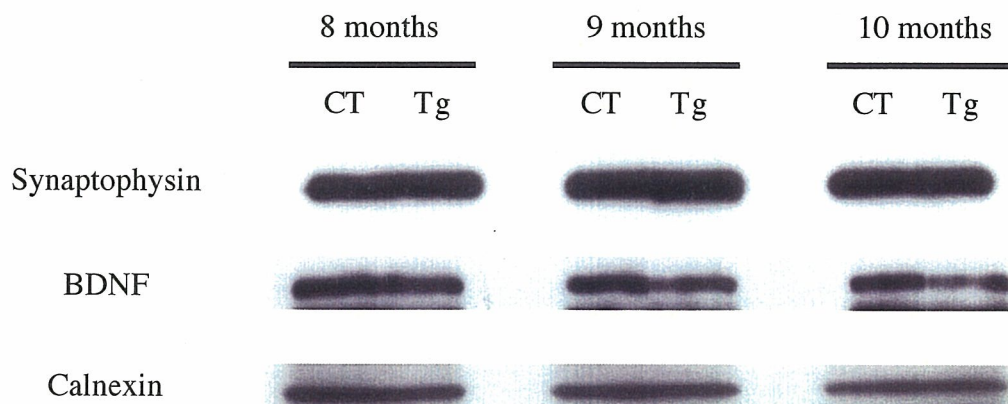


Fig.3

Westernblot for comparing the protein expressions in mouse brains



II. 分担研究報告

ウイルスベクターの開発

分担研究者 井上 誠（ディナベック株式会社）

研究要旨

ヒト BDNF 遺伝子発現 F 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターの構築を行い、ベクター再構成および大量調整（生産・精製）を実施した。精製後、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を実施し、問題なく *in vivo* 実験に使用可能であることを示した。

A. 研究目的

センダイウイルス（SeV）ベクターは、一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA ベクターであり、その全生活環において DNA への変換がなく、転写ならびにゲノムの複製は細胞質内で、自前の RNA ポリメラーゼ（P および L 蛋白質）を利用して行われる。すなわち、治療用遺伝子を核内に挿入し染色体遺伝子に組み込むことなく、細胞質において直接発現することができる特徴があり、「細胞質型 RNA ベクター」と呼ばれている。このような特徴のあるベクターの開発にあたって、宿主細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質 F 遺伝子を欠失させることにより、二次感染性のない、非伝播型ベクターへ改良することに成功している（SeV/ Δ F）。この F 遺伝子欠失型ベクターについては、*in vivo* 実験が十分可能な、あるいは将来的な臨床適用にも応用可能なクオリティーを有する、大量生産システムを既に構築している。

この SeV/ Δ F を バックボーンとして、ヒト脳由来神経栄養因子（BDNF）遺伝子搭載 SeV/ Δ F ベクターを構築し、*in vivo* 実験に十分利用可能な、クオリティーの高いベクターを供給することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ベクター構築

ヒト BDNF 遺伝子搭載 SeV/ Δ F ベクターを構築した。目的遺伝子を SeV cDNA の NP 遺伝子上流に挿入し、発現量の高いベクター構築を行った。

(2) ベクター大量生産

ベクターの再構成は T7 RNA ポリメラーゼでドラッグして調製した。この時、T7 の供給は plasmid で行い、ワクシニアを使用しない系で実施した。

増殖および生産には F 蛋白質を持続発現するパッケージング細胞株を利用し、温度 35.5°C での大量生産を実施した。

(3) ベクター大量精製

フィルターろ過による細胞残渣除去、カラムクロマトグラフィー、濃縮の過程を組み合わせることによって、ベクターの精製を行った。

(4) ベクターの品質検査

力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を設定し、実施した。

（倫理面への配慮）

SeV は実験室飼育下のネズミから単離されたパラインフルエンザウイルスであり、ヒトへの病原性は知られていない。野生型ウイルスでも文部科学省の指針ではバイオハザードレベル P2 であり、通常の実験室で使用でき、非常に安全なウイルスと考えられている。さらに実験に使用するベクターは、ウイルスの感染融合に必須の F 蛋白質遺伝子をゲノムから欠損しているため、非伝播型に改良されており、理論的にも実験的にも伝播性が無いことが証明されている。この様に実験動物および環境等に与える影響は最小限にとどめる。なお当分担研究では動物等への投与実験は厳選して限定されたものとし、その際には動物愛護の基準に従うものとする。

C. 研究結果

ヒト BDNF 遺伝子搭載 SeV/ Δ F ベクターについて、ベクター再構成を実施し、ベクタークローニング、大量生産・精製を行った。最終的には、PBS 溶液に置換し、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を実施し、*in vivo* 試験に十分使用可能な

クオリティーでのベクター調製に成功した。

力価： 1.5×10^{10} CIU/ml

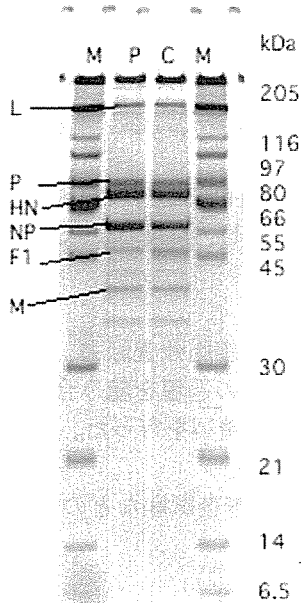
無菌試験(TG 培地/SCD 培地)：適合

マイコプラズマ否定試験(PCR 法)：適合

エンドトキシン試験：3.84 EU/ml 未満

タンパク質濃度：256.529 μ g/ml

電気泳動：下記参照



SDS-PAGE result
M:Molecular Marker
C:Control Vector SeV/TS Δ F
P:Product Vector

D. 考察

目的のヒト BDNF 遺伝子搭載 SeV/ Δ F ベクターについて、問題なく調製が可能であった。SeV/ Δ F ベクター調製法がシステムとして仕上がっていることを示していると認識される。今後、有効性評価のための治療用ベクター、および治療理論確立のための解析用ベクターなど、種々のベクターに関しても調製を実施していく。

E. 結論

ヒト BDNF 遺伝子搭載 SeV/ Δ F ベクターの構築を行い、ベクター再構成および大量調整を実施した。精製後、力価測定・配列確認・無菌試験など

の QC 試験項目を実施し in vivo 実験に十分利用可能なクオリティーの高いベクターを供給した。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1) Nagai Y, Kato A, Inoue M. [Establishment and progress of Sendai virus engineering]

Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2006;51(1):27-37.

2) Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, Ban H, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M, Inoue M. Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity.

J Gene Med. 2006;8(9):1151-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

認知機能評価を目的とする行動学的解析実験系の確立

分担研究者 田代 朋子 青山学院大学理工学部・教授

研究要旨

本分担研究は脳由来神経栄養因子 (BDNF) による認知症の遺伝子治療法を開発することを目的とする研究の中で、モデル動物である変異 APP 導入マウス (Tg マウス) に対する BDNF ベクター導入の効果を行動学的に評価するものである。本年度は数ある行動試験の中でも空間認知能力を評価するのに適している Morris 水迷路試験の確立および本試験を用いた Tg マウスの空間認知能力の評価を行った。その結果、Tg マウスは 10 ヶ月齢時において軽度の空間認知障害を有していることが明らかとなった。今後、この系を用いて BDNF ベクターの効果の行動学的評価を行う。

A. 研究目的

本年度はまず認知症モデルマウスに対して行う行動試験法の確立、およびモデルマウスにおける行動異常の評価を目的とした。

B. 研究方法

行動評価法としてマウス・ラットの空間認知能力を理解するために用いられている Morris の水迷路試験を選択した。この試験では直径 120cm、深さ 30cm の円形プール（東西南北 4 方向に目印を設置）を水迷路として用い、直径 15cm 程度のプラットフォームとよばれるゴールを水面下 1cm に設置し、壁面から水中に投げられたマウスが見えないプラットフォームにたどり着くまでの時間・距離等を空間認知能力として評価する。マウスは試行を重ねる度にプラットフォームの空間的位置を記憶し、すばやくプラットフォームにたどり着く。行動試験は動物種、系統または月齢によってパラ

メータ（試行回数、試行時間または試行日数）を適宜調節する必要があるので、まず 9 ヶ月齢正常マウスを用いてこれらのパラメータを検討した。その結果を踏まえて 10 ヶ月齢時において正常マウスと本研究で用いるヒトアルツハイマー病変異遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウス (Tg マウス) に Morris 水迷路試験を行い、Tg マウスの行動異常を評価した。

C. 研究結果

Morris 水迷路は被験マウスに対し 1 日 8 試行、4 日連続で行った。その結果、正常マウスの場合、試行を重ねるにつれプラットフォームにたどり着く時間が短縮し、2 日目にはプラットフォームに対しほぼ直線的に到達するようになった。

一方、10 ヶ月齢時において Tg マウスと正常マウスを比較した結果、Tg マウスは 1 日目は試行を重ねてもプラットフォームに

たどり着く時間が短縮しなかったが 2 日目には徐々にそれが短縮した。3 日目、4 日目には Tg マウスと正常マウスの到達時間に有意な差は見られなかった。

D. 考察

Morris 水迷路試験の結果から Tg マウスは約 10 ヶ月齢時において空間認知能力が低下していると考えられる。過去の報告からこの Tg マウスにおいて病理組織学的または生化学的異常が現れるのが 7 から 8 ヶ月齢であることを考えるとこの空間認知能力異常は、今後月齢とともに増悪していくものと考えられ、来年度行う BDNF ベクター投与時期は本研究の「予防」という観点から 10 ヶ月齢よりも前に設定する予定である。また Tg マウスの空間認知障害は試行 1 日目をもっとも顕著で以後、正常マウスと同等になることから記憶能力自体が消失しているわけではないと考えられる。この結果はこの Tg マウスが軽度認知障害の予防・治療を目的とする本研究に有用なモデルであることを示す。

E. 結論

Morris 水迷路試験は本研究に用いる Tg マウスの空間認知障害および BDNF ベクターの効果を評価することに適した試験である。

F. 健康危険情報

特記事項無し。

G. 研究発表

無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し。

ウイルスベクター接種時期の確定を目的とした、マウス脳組織の経時検索

分担研究者 田平武 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)

研究要旨

本研究班では、BDNF 発現ウイルスベクターを用いたアルツハイマー病治療法の確立に向け、アルツハイマー病モデルマウス (以下、Tg マウス) における同ベクターの治療・予防効果を検索することを主題目的としている。そこで本研究では、BDNF 発現ベクターの接種時期確定を目的として、Tg マウス脳組織を用いた基盤的検索を行った。その結果、少なくとも 10 ヶ月齢までは、Tg マウス脳組織における神経網および神経突起の大きな変性は確認されなかった。一方、10 ヶ月齢 Tg マウス脳組織において、内因性 BDNF 蛋白発現量がやや減少していることが生化学的検索によって明らかとなった。この結果、Tg マウス脳への BDNF 発現ベクター接種時期は、10 ヶ月齢またはそれ以降が予防・治療効果の検索に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

我々は過去の *in vitro* 系を用いた検索において、BDNF (神経栄養因子の一つ) がアルツハイマー病主病変因子アミロイドβ (Aβ) による神経突起変性毒性を阻害することを明らかにした。アルツハイマー病はその初期段階において、シナプスを主とする神経終末や神経突起の変性が病態増悪の鍵を握っていると考えられている。そこで本研究班では、この BDNF による Aβ 毒性阻害効果を *in vivo* においても発揮されるか否かを検索し、新たな治療法確立に向けた実験を行うことを主題目的としている。この実験系では、Aβ の過剰産生が認められる Tg マウスに BDNF 発現ウイルスベクターを接種することでその評価を行う予定であるが、ただやみくもにベクター接種を行っても意味がないことは明白である。そこで本研究で

はまず、マウス脳への BDNF 発現ベクター接種時期の確定を目的として、Tg マウス脳組織における神経突起および内因性 BDNF 発現量の加齢性変化を検索する。

B. 研究方法

本研究では、ヒト家族性アルツハイマー病変異型アミロイドβ前駆体蛋白 (APP) 導入マウスを用いるため、同じバックグラウンドを有する SJ6 マウスを用いて病理組織学および生化学的検索を行った。主な検索項目は、以下の通りである。

- Synaptophysin : 神経網の評価
 - Neurofilament : 神経突起変性の評価
 - BDNF : 内因性 BDNF の評価
 - TrkB : BDNF レセプターの評価
 - p75NTR : BDNF レセプターの評価
- また、本研究で用いる Tg マウス (Tg2576)

は9ヶ月齢から認知機能低下および神経変性が確認されるという報告が存在することから、8・9・10ヶ月齢のマウス脳組織を用いて検索を行った。

C. 研究結果

病理組織学的検索によって、今回我々が検索に用いた8-10ヶ月齢のTgマウス脳においては、神経網の脱落および神経突起の明確な変性は確認されなかった。SynaptophysinおよびNeurofilament抗体を用いた免疫組織化学的検索からも同様の結果が得られたことから、神経網および神経突起の大幅な変性は生じていないことが明らかとなった。BDNF抗体を用いた免疫染色では、CTマウス・Tgマウス脳におけるBDNF発現領域に明確な差は認められなかった。

westernblot法を用いた生化学的検索では、SynaptophysinおよびNeurofilament蛋白発現量に大きな差は確認されなかった。この結果は、上述した病理組織学的検索結果を裏付けるものである。一方、内因性BDNF蛋白発現量を比較したところ、10ヶ月齢においてTgマウス脳でのBDNF蛋白発現量がCTマウス脳に比べて低下していることが明らかとなった。BDNFレセプターであるTrkBおよびp75NTRには大きな変化は認められなかった。

D. 考察

病理組織学的検索によって、8-10ヶ月齢のTgマウス脳における明確な神経網の脱落および神経突起の変性は確認されなかったことから、BDNF発現ベクターによる神経突起保護効果を検索するためには、Tg

マウスの更なる加齢が必要であることが示唆された。この結果は過去の報告と一致しないが、今回我々が購入・飼育しているTgマウスの性質であると理解すべきである。一方、10ヶ月齢のTgマウス脳では内因性BDNF蛋白発現量がCTマウスに比べて低下していたことから、10ヶ月齢のTgマウスにBDNF発現ベクターを接種することで、同因子のアルツハイマー病態機構に対する予防効果の確認検索が可能であると考えられる。最新の知見では、アルツハイマー病初期段階の患者脳組織ではBDNF発現量が低下しているとの報告があり、今回の結果はそれを反映するものである可能性が高い。この点に関しては、同月齢におけるTgマウスの認知機能評価結果と照らし合わせて考慮する必要があるとも考えられる。また、10ヶ月齢においてはTrkBやp75NTRといったBDNFレセプターに明確な変化が見られなかったため、BDNFそのものによる脳組織への影響を、より純粋に検索しやすいともいえる。

E. 結論

本研究によって、Tgマウス脳へのBDNF発現ベクター接種時期の大まかな予測をつけることが可能となった。その反面、神経突起保護効果を確認するためには、Tgマウスの更なる加齢が必要であることも同時に示唆された。このため、現在もTgマウスの飼育を継続中である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi S, O Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a recombinant adeno-associated viral vector attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without lymphocytic infiltration in Tg2576 mice. (投稿中)

2. 学会発表

・ The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders

(第10回国際アルツハイマー病及び関連疾患学会)

2006年7月 スペイン国マドリッド

・ 日本認知症学会 2006年10月 広島

・ The 8th International Conference AD/PD

(第8回国際アルツハイマー病及びパーキンソン病学会)

2007年3月 オーストリア国ザルツブルク

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表