

After exposure up to 0.4 mM  $H_2O_2$  for 60 min, total DNA of the cells was extracted. With 20 ng of total DNA as a template, the target sequence was amplified and FCS measurement was conducted. When 0.1 mM  $H_2O_2$  was added, a decrease in the fraction for the mtDNA LPCR product from  $79.3 \pm 5.4$  to  $67.9 \pm 3.4\%$  was observed. At 0.4 mM, the fraction was decreased significantly to  $53.9 \pm 5.0\%$  (Fig. 3A). The pattern of change was similar to the result of the gel electrophoresis, although the values of fractions obtained by FCS were different from those of relative band intensities, which were normalized with the highest band intensity in each gel. The fraction of the nuclear-encoded  $\beta$ -globin LPCR product remained unchanged, that is, approximately 60% under conditions up to 0.4 mM  $H_2O_2$  (Fig. 3B).  $H_2O_2$ -induced mtDNA lesion frequency increased with its dose (Fig. 3C). The frequencies were  $0.17 \pm 0.07$  lesions/10 kb with 0.2 mM treatment and  $0.25 \pm 0.05$  lesions/10 kb with 0.4 mM treatment. We confirmed that there was little effect of  $H_2O_2$  on the  $\beta$ -globin LPCR product on gel. The results shown in Fig. 3 were consistent with those obtained in previous studies indicating that mtDNA was more sensitive than nuclear DNA to  $H_2O_2$  exposure [1,4]. Therefore, the results suggest that oxidative damage of mtDNA can be detected by the LPCR–FCS method.

#### Primary screening of oxidative stress-induced mtDNA damage

The analysis time of FCS measurement was approximately 5 min, whereas that of gel electrophoresis was more than 3 h, in the current study. The current method is proposed only for a rapid primary screening, not for accurate evaluation of oxidative damage in the mtDNA genome. When the ratio of mtDNA to the nuclear-encoded gene LPCR product is significantly low due to a decrease in the intact mtDNA genome, the screened sample from FCS can be immediately subjected to detailed analysis such as sequencing.

The current measurements of FCS were carried out with a 20- $\mu$ l sample volume, although theoretically the volume can be reduced to a volume element on the order of  $10^{-15}$  L [9]. Practically, the sample volume for LPCR can be reduced to 1  $\mu$ l. Thus, this LPCR–FCS method would also have a great advantage from an economic point of view. Physical handling of such a small sample volume can be done by using a capillary tube or a small sample pit on a glass surface covered by a thin film or cover glass for mass examination.

In contrast to common methods used previously without amplification, such as Northern blotting and HPLC–electrochemical detection, target DNA was amplified in our method so that a smaller sample could be employed. Although our method has some of the same limitations as other methods with amplification (e.g., real-time PCR), the DNA sample can be reduced due to the tiny vol-

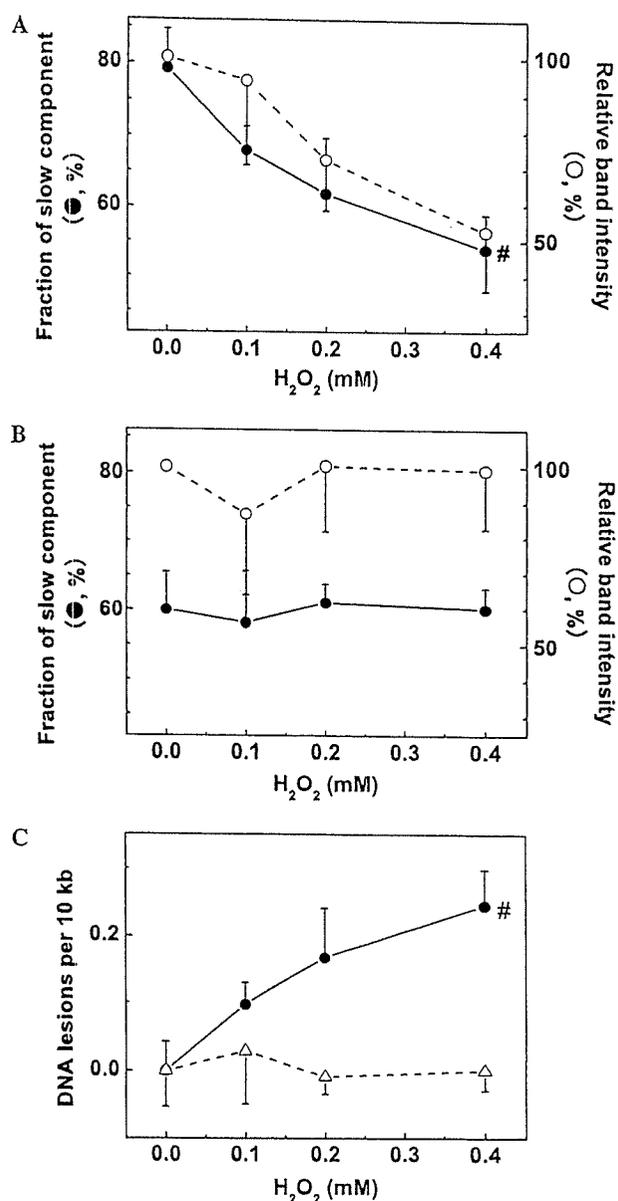


Fig. 3. (A)  $H_2O_2$  dependence on the fraction of the slow component obtained from two-component analysis of the autocorrelation function of the mtDNA LPCR product (●, means + SE) and on relative band intensity obtained by densitometry after gel electrophoresis (○, means – SE). (B)  $H_2O_2$  dependence on the fraction for  $\beta$ -globin. (C) Lesion frequencies in mtDNA (●, means + SE) and  $\beta$ -globin gene ( $\Delta$ , means – SE), evaluated by FCS. #  $P < 0.05$  compared with the fraction without  $H_2O_2$  treatment.

ume element. In this study, we used 20 ng of total DNA. As shown in Fig. 2B, 2 ng of total DNA was sufficient to detect the mtDNA LPCR product. Furthermore, because 30  $\mu$ g of total DNA was isolated from  $10^6$  cells, mtDNA damage could be detected using a few hundred cells.

Currently, real-time PCR may be the most sensitive and precise method for detection and quantification of nucleic acids. However, it is a complex technique and substantial problems are associated with its reproducibility. Furthermore, in contrast to our method measuring after PCR, the real-time PCR method measures fluorescence intensity

during PCR so that its target usually ranges from 100 to 500 bp. If real-time PCR is expanded for a long target sequence, setting the optimal PCR conditions becomes complicated. Our LPCR–FCS method makes possible the evaluation of oxidative stress-induced mtDNA damage without a complex process.

In conclusion, the current method would be advantageous for epidemiological studies to determine the relationship between mtDNA damage and the diseases in which mitochondrial deficiencies might be relevant.

#### Acknowledgment

This study was supported financially in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C 2 14580761) from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan.

#### References

- [1] F.M. Yakes, B. van Houten, Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 514–519.
- [2] W.J. Driggers, S.P. LeDoux, G.L. Wilson, Repair of oxidative damage within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 22042–22045.
- [3] J.H. Santos, L. Hunakova, Y. Chen, C. Bortner, B. van Houten, Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1728–1734.
- [4] G. Wang, T.K. Hazra, S. Mitra, H.M. Lee, E.W. Englander, Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by  $\text{CoCl}_2$  in rat neuronal PC12 cells, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 2135–2140.
- [5] M. Deschauer, A. Krasnianski, S. Zierz, R. Taylor, False-positive diagnosis of a single, large-scale mitochondrial DNA deletion by Southern blot analysis: the role of neutral polymorphisms, *Genet. Test.* 8 (2004) 383–387.
- [6] C. Richter, J.W. Park, B.N. Ames, Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 6465–6467.
- [7] S. Cheng, R. Higuchi, M. Stoneking, Complete mitochondrial genome amplification, *Nat. Genet.* 7 (1994) 350–351.
- [8] Y. Nomura, M. Kinjo, Real-time monitoring of in vitro transcriptional RNA using fluorescence correlation spectroscopy, *ChemBioChem* 5 (2004) 1701–1703.
- [9] M. Kinjo, Detection of asymmetric PCR products in homogeneous solution by fluorescence correlation spectroscopy, *BioTechniques* 25 (1998) 706–715.
- [10] M. Kinjo, R. Rigler, Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 1795–1799.
- [11] Y. Nomura, H. Tanaka, L. Poellinger, F. Higashino, M. Kinjo, Monitoring of in vitro and in vivo translation of green fluorescent protein and its fusion proteins by fluorescence correlation spectroscopy, *Cytometry* 44 (2001) 1–6.
- [12] M. Kinjo, Quantitative analysis by the polymerase chain reaction using fluorescence correlation spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 365 (1998) 43–48.
- [13] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, P. Kask, Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion, *Eur. Biophys. J.* 22 (1993) 166–175.
- [14] S. Aragon, R. Pecora, Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 1791–1803.
- [15] D.P. Kalinowski, S. Illenye, B. Van Houten, Analysis of DNA damage and repair in murine leukemia L1210 cells using a quantitative polymerase chain reaction assay, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 3485–3494.

## アデノ随伴ウイルスベクターを応用した パーキンソン病の遺伝子治療

村松 慎一

抄 録：パーキンソン病に対する定位脳手術の新たな応用として、アデノ随伴ウイルス adeno-associated virus (AAV) ベクターを使用した遺伝子治療の第1相臨床試験が米国で始まっている。AAVベクターは脳内の神経細胞に効率よく治療用遺伝子を導入し、長期に発現させることが可能である。経口摂取したL-dopaをドパミンへ変換する能力を回復するため芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) の遺伝子を被殻に導入する方法、視床下核にグルタミン酸脱炭酸酵素の遺伝子を導入して抑制性神経伝達物質  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) を合成することにより神経活動の調整を行う方法、被殻で神経栄養因子 Neurturin の遺伝子を発現させて黒質緻密部のドパミン神経細胞の変性を抑制する方法、という3種類のプロトコルがある。日本でも近日中にAADC遺伝子導入による臨床試験が開始される予定である。MRIを使用した正確なベクター注入や、各種トレーサーを使用したPETによる遺伝子導入効果の *in vivo* 評価など、画像技術の進歩にも支えられ、遺伝子治療は近い将来にパーキンソン病治療の重要な選択肢になるものと期待される。

索引用語：パーキンソン病、遺伝子治療、アデノ随伴ウイルス、ドパミン

自治医科大学 神経内科

〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 / TEL: 0285-58-7352 / FAX: 0285-44-5118

(受付：2006年10月10日)

神経細胞に治療用遺伝子を効率よく導入し、発現を長期間維持できるアデノ随伴ウイルス adeno-associated virus (AAV) ベクターを応用することにより、パーキンソン病に対する遺伝子治療の臨床試験が可能になった<sup>1)</sup>。現在、パーキンソン病に対して3種類のプロトコルによる第1相臨床試験が米国で行われている (Fig. 1, Table 1)。

### I. アデノ随伴ウイルスベクター

AAVは、外被蛋白(カプシド)の中に線状一本鎖DNAを包み込んだバルボウイルスである。成人の多くは不顕性感染している。AAV単独での増殖は不可能で、自然界ではアデノウイルスやヘルペスウイルスの存在下で増殖が起こる。病原性がないため1965年に発見されて以来あまり注目されず研究者の数も限られていたが、1990

年代に遺伝子導入用ベクターとしての優れた特性が知られるようになった。現在では霊長類のAAVには100種類以上の遺伝子型が分離されている<sup>2)</sup>。AAVベクターは、アデノウイルスベクターなどと異なり脳内に注入しても、著しい炎症反応を惹起することはなく、サル脳の神経細胞に導入された遺伝子の発現は少なくとも3年間以上持続することが報告されている<sup>3)</sup>。

これまでAAVベクターを用いた遺伝子治療臨床研究として、米国で12種類の疾患に対して合計30のプロトコルが提唱されている。AAVベクターを経気道的に投与する嚢胞性線維症では、80例に対して最大で $1 \times 10^{13}$  vector genome (vg) 相当量が使用されたが、ベクター自体の毒性による副作用は見出されていない。また、血友病Bでは、肝臓への遺伝子導入を行った2例で軽度の肝逸脱酵素の一過性上昇が認められたが、その他の副作用は認められていない<sup>4)</sup>。

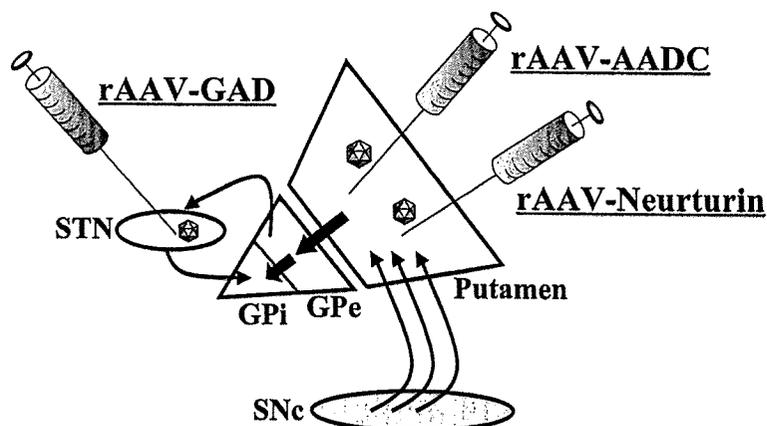


Fig. 1 Three different rAAV vector-based strategies for Parkinson's disease. Gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) restores dopamine synthesis from orally administered L-dopa in the putamen. Expression of neurturin, a neurotrophic factor, in the putamen protects dopaminergic neurons from degeneration. Transduction of the subthalamic nucleus (STN) with rAAV vectors expressing glutamic acid decarboxylase (GAD) produces  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), an inhibitory transmitter, in the nucleus and modulates its function. GPe: external portion of the globus pallidus, GPi: internal portion of the globus pallidus. SNc: substantia nigra pars compacta.

## II. 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素による遺伝子治療

パーキンソン病では中脳黒質緻密部から線条体に投射するドパミン神経細胞が進行性に变性脱落し、線条体におけるドパミンが不足する。主症状である動作緩慢・筋強剛・静止時振戦などの運動障害は、線条体におけるドパミン濃度の低下と密接に関連しており、病初期にはL-dopa投与によりドパミンを補充すると劇的に改善する。しかし、病気の進行とともに線条体における黒質ドパミン神経細胞からの神経終末の脱落が著しくなり、シナプス小胞でのドパミン貯留の減少に加えてL-dopaをドパミンに変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) の活性が低下するため、L-dopaの効果は減弱してしまう。

そこで、線条体の神経細胞にAADC遺伝子を導入し、経口摂取したL-dopaのドパミンへの変換能力を回復させる遺伝子治療が考えられた。選択的神経毒を投与して作製したモデル動物(ラット,サル)の実験では、AADC遺伝子導入によってL-dopa投与後の線条体内ドパミン産生量の増加が認められ、AADCのligandである $[^{18}\text{F}]$  Fluoro-*m*-tyrosine (FMT)を使用したPETでもAADC遺伝子の発現が確認されている<sup>3,5)</sup>。この方法では、L-dopaの内服を継続する必要があるが、服用量を調節することによりドパミンが過剰になることを防ぐことができる。AADCをcytomegalovirus (CMV) promoterにより発現するAAVベクターを両側の被殻に投与する第1相臨床試験が2004年12月に米国のUCSFで開始された。このプロトコールでは、低・中・高用量の3群で、各群5例の

合計15例を予定している。2006年4月に米国神経学会で公表された結果では、低用量群の3名に遺伝子導入を行い、それぞれ術後1,3,6ヶ月の時点の患者日記による評価で症状の改善がみられた。また、PETでは、平均15%のFMTの取込みの増加が認められた。術後すぐに軽快した頭痛がみられたが重篤な副作用は認めていない<sup>6)</sup>。現在(2006年9月)までに、低用量の5例についての投与を終了している。日本でもAADC遺伝子導入による臨床試験計画について、厚生労働省の委員会で審査が行われている。

将来的には、AADCに加えて、L-dopaの合成に必要なチロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH) と GTP cyclohydrolase I (GCH) の遺伝子も導入して、線条体内で直接ドパミンを合成し、L-dopaの内服も不要とする遺伝子治療が考えられる。モデル動物の実験では、この3種類の遺伝子導入法による運動障害の改善効果も確認されている<sup>7)</sup>。さらに万一ドパミン産生が過剰になった場合に、TH遺伝子の発現を抑制する制御機構を組み込んだAAVベクターの開発も進められている<sup>8)</sup>。

## III. グルタミン酸脱炭酸酵素による遺伝子治療

視床下核の deep brain stimulation (DBS) と同様な効果を期待して、抑制性神経伝達物質である  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) を合成するグルタミン酸脱炭酸酵素 glutamic acid decarboxylase (GAD-65 および GAD-67) の遺伝子を視床下核の細胞に導入し、本来興奮性の出力を抑制的に

Table 1 Clinical trials currently underway for gene therapy for Parkinson's disease

Therapeutic gene	Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)	Glutamic acid decarboxylase (GAD)	Neurturin
Function of therapeutic gene	Convert L-dopa to dopamine	Synthesize $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), an inhibitory neurotransmitter	Neurotrophic factor for dopaminergic neurons
Phase	1	1	1
Sponsor	Genzyme	Neurologix	Ceregene
Dose of vectors (vector genomes or particles)	Low $9 \times 10^{10}$ Middle $3 \times 10^{11}$ High $9 \times 10^{11}$	Low $3.5 \times 10^9$ Middle $1.0 \times 10^{10}$ High $3.5 \times 10^{10}$	Low $2 \times 10^{11}$ High $8 \times 10^{11}$
Subject number	15 (each group 5)	12 (each group 4)	12 (each group 6)
Target region	Bilateral Putamen	Unilateral Subthalamic nucleus	Bilateral Putamen
PET	$^{18}\text{F}$ Fluoro- <i>m</i> -tyrosine (FMT)	$^{18}\text{F}$ Fluoro-deoxyglucose (FDG)	$^{18}\text{F}$ Fluoro-DOPA (FDOPA)

変換する方法が考案された<sup>9,10</sup>。AAVベクターを使用したこの方法による臨床試験が2003年8月に米国のコーネル大学で開始された。低・中・高用量の3群、各群4例の合計12例の片側の視床下核にGAD遺伝子を導入する計画で、既に全例に遺伝子導入手術が終了している。この臨床試験に対しては、パーキンソン病における視床下核の病態は単純な発火頻度の増加だけではないためGABAを過剰発現させる根拠が十分でないという指摘や、モデルサルの実験の結果<sup>12</sup>を待つことなく開始されたことに対する批判があった。視床下核内の機能局在の問題や、DBSでは視床下核よりも近傍の不確帯 zona incertaの刺激の方がより有効という報告<sup>13</sup>もあり、確かにこの方法の理論的な背景には疑問も残る。これまでのところ、安全性に問題はなく、FDG-PETで淡蒼球内節と視床VL核におけるFDGの取込み減少と大脳皮質運動野の取込みの増加が認められたと発表されている<sup>11</sup>。

#### IV. Neurturinによる遺伝子治療

パーキンソン病に対する遺伝子治療の第3の方法は、ドパミン神経細胞の変性を抑制するために神経栄養因子の遺伝子を被殻に導入する方法である。Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) や Neurturin などの神経栄養因子は、微量でもドパミン神経細胞に対して保護効果を示すため、パーキンソン病の治療薬として期待されている。しかし、蛋白製剤として血液中または脳室内に投与した場合、血液脳関門を通過しにくい、半減期が

短い、全身性の副作用を生じる、といった問題がある。そこで、これらの遺伝子を搭載したウイルスベクターを作製し、線条体へ直接注入する遺伝子治療が考えられた。モデル動物においてアデノウイルスベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクターによりGDNF遺伝子を神経毒の投与前または投与直後に線条体で発現させると黒質ドパミン細胞の変性脱落を抑制することが報告されている<sup>1,15</sup>。さらに、モデルラットの実験では神経毒注入後から4週間を経て既に黒質線条体路の変性が進行している状態でも、GDNF遺伝子を搭載したAAVベクターを線条体に注入することにより、黒質ドパミン細胞の変性脱落が抑制され運動障害の改善効果が認められている<sup>14</sup>。これらの結果を踏まえ、現在米国のUCSFでAAVベクターにより両側の被殻にNeurturin遺伝子の導入を行う臨床試験が行われている。既に12例への投与を終了しており、低用量群6例の中間報告では、OFF時のUPDRS運動スコアの25%改善、OFF時間の50%減少、不随意運動を伴わないON時間の増加が認められた<sup>16</sup>。

#### V. 今後の展望

パーキンソン病の治療において定位脳手術が果たしてきた役割は大きい。最近では、視床下核あるいは淡蒼球内節のDBSが、薬物治療に限界を示す進行期のパーキンソン病に対する補助療法として急速に普及している。さらに、ヒト胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES細胞)の

樹立など幹細胞研究の進展に伴い、細胞移植治療への期待も高まっている。遺伝子治療は、AAVベクターという優れた遺伝子導入法の開発により、新たな定位脳手術の選択肢として臨床応用が現実的となってきた。MRIを使用したより正確なベクター注入法により、定位脳手術自体のリスクは小さい。各種トレーサーを使用したPETにより、遺伝子導入効果の *in vivo* 評価も可能になっている。日本国内では、自治医大においてAADC遺伝子導入による第1/2相臨床試験が計画されており、特に問題がなければ早期に他施設による試験に移行する予定である。今後は、DBSや移植治療との比較も必要になるであろう。また、パーキンソン病の病態の解明が進むとともに新たな遺伝子治療の戦略が加わると期待される。

#### 文献

- 1) Muramatsu S, et al: Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Exp Opin Biol Ther* 5: 663-671, 2005.
- 2) Wu Z, et al: Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14: 316-327, 2006.
- 3) Bankiewicz KS, et al: Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. *Mol Ther* 14: 564-570, 2006.
- 4) Manno CS, et al: Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12: 342-347, 2006.
- 5) Bankiewicz KS, et al: Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; *in vivo* detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* 64: 2-14, 2000.
- 6) Christine CW, et al: Aromatic L-amino acid decarboxylase gene transfer therapy for Parkinson's disease: Initial results of an open-label, dose escalation, safety and tolerability study. 130<sup>th</sup> ANA abstract: S23.005, 2006.
- 7) Muramatsu S, et al: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* 13: 345-354, 2002.
- 8) Li XG, et al: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther* 13: 160-166, 2006.
- 9) Doring MJ, et al: Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* 12: 1589-1591, 2001.
- 10) Luo J, et al: Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* 298: 425-429, 2002.
- 11) Feigin A, et al: Gene therapy for Parkinson's disease with AAV-GAD: Interim FDG PET results. 130<sup>th</sup> ANA abstract: P01.146, 2006.
- 12) Emborg ME, et al: Subthalamic glutamic acid decarboxylase gene therapy: changes in motor function and cortical metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006 [Epub ahead of print].
- 13) Plaha P, et al: Stimulation of the caudal zona incerta is superior to stimulation of the subthalamic nucleus in improving contralateral parkinsonism. *Brain* 129: 1732-1747, 2006.
- 14) Wang LJ, et al: Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 9: 381-389, 2002.
- 15) Dass B, et al: Gene transfer of trophic factors and stem cell grafting as treatments for Parkinson's disease. *Neurology* 66: S89-103, 2006.
- 16) Marks WJ, et al: Trophic factor gene transfer in Parkinson's disease: Preliminary outcomes from the phase I CERE-120 study. 131<sup>st</sup> ANA abstract: T-1, 2006.

## Recombinant adeno-associated viral vectors bring gene therapy for Parkinson's disease into the clinical arena

Shin-ichi Muramatsu

**Abstract:** Stereotaxic surgery has played an important role in the treatment of medically refractory idiopathic Parkinson's disease (PD). While deep brain stimulation becoming more popular in clinical practice, advances in stem cell research has raised hopes of creating novel cell-replacement therapies for PD. If cell-replacement therapies work by restoring dopaminergic neurotransmission, then gene therapy to produce dopamine-synthesizing enzymes is much simpler and more straightforward approach than cell therapy. With recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors, which are derived from non-pathogenic viruses, gene therapy is becoming a feasible therapeutic option for PD. Efficient and long-term expression of genes for dopamine-synthesizing enzymes in the striatum restored local dopamine production and allowed behavioral recovery in animal models of PD. A phase I clinical investigation is underway in which rAAV vector-based gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) is combined with oral administration of L-dopa. Although this method would not relieve patients of the need to take L-dopa to control their PD symptoms, the L-dopa dose would be lowered and the duration of the ON period would be prolonged after AADC transduction. Two other rAAV vector-based clinical trials for PD are also underway. One is transduction of the subthalamic nucleus (STN) with rAAV vectors expressing glutamic acid decarboxylases to produce  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), an inhibitory transmitter. This strategy aims at modulating "hyperactive"

STN neurons, which is what deep brain stimulation does, although its mechanism remains unknown and there are some theoretical concerns for chemical alterations. The other clinical trial is delivery of rAAV vectors expressing neurturin, a neurotrophic factor for dopaminergic neurons, into the putamen to slow down the ongoing degeneration. In addition to improved vectors, improved neuroimaging techniques have advanced clinical trials of gene therapy. A magnetic resonance imaging-directed method has improved the precision of the delivery of vectors to the target regions and reduced the risk of injuring blood vessels. Positron emission tomography with various tracers can be used to monitor the effects of therapeutic gene expression *in vivo*. Gene therapy using rAAV vectors may be a promising option for treatment of PD in the near future.

Key words: Parkinson's disease, Gene therapy, Adeno-associated virus, Dopamine

---

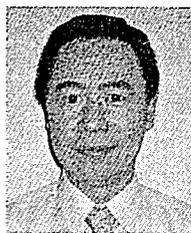
Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical University

---

# ES細胞によるParkinson病の移植治療

—臨床応用への課題

Embryonic stem cells for the treatment of Parkinson's disease



村松 慎一

Shin-ichi MURAMATSU

自治医科大学内科学講座神経内科部門

◎Parkinson 病では中絶胎児の中脳細胞を線条体に移植する治療が欧米においてすでに臨床応用されており、著しい改善効果が得られた症例が報告されている。一方、二重盲検試験の結果では、胎児細胞の移植効果は当初期待されたほどではなく、一部の症例では不随意運動が発現した。二重盲検試験で行われた手法には技術的な問題点が指摘されており、今後、免疫抑制剤の適正な使用などを行うことでよりよい成績が得られる可能性がある。大量の神経細胞を得られる ES 細胞は胎児脳細胞に代わるドナー細胞として期待されており、ES 細胞から神経幹細胞やドパミン神経細胞を効率よく分化誘導する方法が開発されてきている。ES 細胞の臨床応用に際しては、未分化細胞の混入による奇形腫の発生や、他の動物由来の成分の混入をできるだけ回避する必要がある。視床下核の電気刺激や遺伝子治療など、最近発展の著しい他の治療法と比較し、細胞移植の適応を厳選することも重要である。



Parkinson病, ES細胞, 細胞移植, ドパミン

最近の 15 年間に成体の脳から神経幹細胞を分離し培養する方法の開発や、ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞) の樹立などの技術革新が続き、中枢神経疾患に対する再生医学研究が急速に発展している。過剰な期待はクローン ES 細胞の論文捏造事件のような科学史上の汚点を残すこととなったが、中枢神経疾患に対する細胞移植治療に大きな可能性があることは間違いがない。なかでも Parkinson 病はすでに胎児脳細胞を使用した移植治療が欧米において行われており、ES 細胞を応用した再生医学研究の対象として第一にあげられることが多い。未分化の ES 細胞から神経幹細胞やドパミン神経細胞を効率よく分化誘導する方法の開発や、モデル動物への移植実験が世界中の多くの研究室で行われている。

## 薬物治療の限界

Parkinson 病は動作緩慢、無動・寡動、安静時振戦、筋強剛などの運動障害を主症状とし、高齢者

では Alzheimer 病に次いで頻度の高い神経変性疾患である。一部の家族性 Parkinson 病については  $\alpha$ -synuclein, *Parkin*, *DJ-1*, *NR4A2(NURR1)*, *UCH-L1*, *PINK1*, *LRRK2* などの遺伝子変異が判明しているが、Parkinson 病の大部分は散发性で、発病には環境要因も含めた多因子が関与すると考えられている<sup>1)</sup>。Parkinson 病では線条体(被殻と尾条核)に投射する中脳黒質緻密部のドパミン神経細胞が進行性に脱落し、それに伴い線条体のドパミン含量が正常の 20%程度に低下すると運動症状が発現する。現行の薬物治療の目標は線条体におけるドパミンの補充である。血液-脳関門を通過しにくいドパミンに代わり、その前駆物質である L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)を内服することにより病初期には改善が得られる。しかし、進行した Parkinson 病ではドパミン神経終末の変性脱落が著しく、L-DOPA をドパミンに変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) の活性が低下し、ドパ

ミンへの変換が十分行われなくなる。そのため、L-DOPA の効果は減弱し、血中濃度の変動に伴う運動症状の急激な悪化や不随意運動が生じる。さらに、前頭葉などのドーパミン受容体が刺激されるため、幻覚などの副作用も出現する。L-DOPA に代わる薬剤として経口投与により脳内に移行しドーパミン受容体に直接作用するドーパミン受容体作動薬があるが、運動障害の改善効果は L-DOPA に比べて弱い。このように、薬物治療には限界がある。

### 細胞移植治療の現況

脱落したドーパミン神経細胞を補充するという意味で、細胞移植は理にかなっているといえる。黒質緻密部に細胞を移植し、線条体まで神経突起を元どおりに投射させることができれば理想的であるが、脳の各部位との線維連絡を体部位局在まで含めて厳密に再構築することは困難である。これまで行われてきた細胞移植実験のほとんどはドーパミン産生細胞を線条体に移植し、ドーパミン補充による線条体の機能回復を目標としている。当初、自己のドーパミン産生細胞として副腎髄質細胞や交感神経節などの細胞の移植が臨床応用されたが、よい成果が得られなかった。その理由のひとつとしては、これらの細胞には加齢による変化と Parkinson 病による病的過程が及んでいる可能性が考えられている。

1980 年代以降、スウェーデンの Lund 大学、アメリカのコロラド大学などの施設で人工妊娠中絶した胎児の中脳細胞を線条体に移植する治療が推進されてきた。1999 年と 2000 年にあいついで報告された 5 つの open-label study では、いずれも L-DOPA 非服用時における unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS) の運動スコアで 30~40% の運動障害の軽減、1 日のうちで L-DOPA が無効な時間 (off) の 43~66% の減少、1 日当りに必要な L-DOPA の 16~77% の減量などの臨床効果が得られており、positron emission tomography (PET) 計測でも移植前に比べて 55~107% の [<sup>18</sup>F] L-DOPA の取込み増加が認められた<sup>2)</sup>。さらに、移植 10 年後にも移植した細胞が生存し、ドーパミンの産生と症状の軽減が得られていることも報告され<sup>3)</sup>、移植の有効性が強調された。しかし、これら

の報告はいずれも少数例における open-label study であった。

アメリカにおいて対照群の患者の頭蓋骨にも移植患者と同様の穿孔を開ける二重盲検試験が 2 つ行われた。いずれの試験でも移植群において PET により [<sup>18</sup>F] L-DOPA の取込みの増加が認められ、剖検例で移植したドーパミン神経細胞が生着していることが確認された<sup>4,5)</sup>。しかし、臨床効果については当初期待されたほどではなかった。Freed らの試験では、60 歳以下の患者でのみプラセボ群と比較して軽度の症状の改善を認めた<sup>4)</sup>。また、Olanow らの試験では移植前の運動障害が軽い患者のみ、2 年後の症状の増悪がプラセボ群より少なかったが、全体としてはプラセボ群と差がなかった<sup>5)</sup>。さらに、移植患者の一部で L-DOPA を服薬しない状態においても不随意運動 (off-medication dyskinesia) が出現することが明らかになった。これらの結果から、Olanow らは現時点では胎児細胞移植は Parkinson 病の治療として推奨できないとしている。

二重盲検試験について、Lund 大学のグループなどからはいくつかの技術的な問題点が指摘されている。Freed らの方法では、移植前に細胞を数週間培養しており、この間に細胞の性質が変化している可能性がある。また、前頭部からのアプローチによる移植手術では侵襲がより大きいと推察されている。さらに、免疫抑制剤をまったく使用していないために免疫反応を生じている可能性がある。Freed らは、その後も解析を続けた結果、移植群では対照群に比べて平均反応時間と運動時間が短縮したと報告し<sup>6)</sup>、L-DOPA によく反応し、不随意運動のない状態の患者を選択すれば、よりよい結果が期待できるとしている<sup>7)</sup>。Olanow らの試験では移植 6 カ月後に cyclosporine を中断しており、それまでみられていた改善傾向がその後より認められなくなっている。最近報告された Lund 大学での移植例の解析では、移植後平均 29 カ月まで cyclosporine, azathioprine, prednisolone が継続されており、その後中止しても UPDRS の運動スコアの悪化や [<sup>18</sup>F] L-DOPA の取込みの低下は生じていない<sup>8)</sup>。

約 15% の移植患者に出現する不随意運動の機

序としては、線条体内のドーパミン濃度が不均一になる可能性や移植細胞と宿主細胞との結合が機能的に不完全である可能性などが推察されている。Lund 大学の移植例では免疫抑制剤の中止後、不随意運動が増悪しており、軽度の炎症が関与している可能性もある<sup>8)</sup>。

### ES細胞の応用

胎児脳細胞の移植では、上述したように確実な効果を得るためには技術的な改良が必要であるが、最大の問題はドナー不足である。移植後の剖検例からの推定では、よい臨床効果を得るためには、すくなくとも 100,000 のドーパミン神経細胞が被殻に生着し、被殻の体積の 1/3~1/2 に相当する領域をカバーする必要がある。移植細胞の生着率は 5~10% と低いので、1 人の患者を治療するためには 4~5 人の人工流産を行うことになる。そこで、胎児細胞に代わる移植用細胞として、未分化な状態のままほぼ無制限に増殖させることが可能で、神経細胞を含むあらゆる体細胞に分化する能力をもつ ES 細胞に期待が集まることとなった。

マウスの ES 細胞を未分化な状態のまま Parkinson 病モデルラットの線条体に移植すると、一部はドーパミン神経細胞に分化し運動障害が改善することが報告されている<sup>9)</sup>。しかし、未分化な ES 細胞の移植では奇形腫を生じる危険がある。そこで、ES 細胞から効率よくドーパミン神経細胞を分化させる方法が工夫されてきた。もっとも標準的な方法として、未分化の ES 細胞を非付着性の培養皿で培養することにより浮遊性の胚様体 (embryoid body) を形成し、さらにレチノイン酸などを添加することで神経幹細胞を誘導する方法が知られている。こうして得られた神経幹細胞にアスコルビン酸、sonic hedgehog-N、および fibroblast growth factor 8 (FGF8) を添加して培養すると、全培養細胞のうちおよそ 1/4 がドーパミン細胞に分化する<sup>10)</sup>。骨髄間質細胞の一種である PA6 と共培養することにより、胚様体の形成を経ずに神経細胞を分化させる方法も報告されている<sup>11)</sup>。さらに効率のよい方法として、グリア細胞の条件培地を使用する方法がある<sup>12)</sup>。未分化 ES 細胞のコロニーを拾い上げてマウスまたはラット胎仔脳から採取したアス

トロサイトの条件培地中に入れて浮遊状態で培養することにより、神経幹細胞を大量に含む球状の細胞塊 (neural stem sphere) を形成する。その後、この sphere を付着させると神経幹細胞のほとんど (98%) が神経細胞に分化し、そのうち最大 70% をドーパミン細胞に誘導することができる。この方法では、FACS や磁気ビーズによる分離を行わなくても未分化 ES 細胞やフィーダー細胞の混入がほとんどない神経幹細胞を大量に調整できる。

著者らはモデルサル(「サイドメモ」参照)に霊長類 ES 細胞由来の神経幹細胞を移植して、その効果と安全性を検証する実験を行っている。グリア細胞の条件培地を使用して neural stem sphere を形成する方法により、カニクイザルの ES 細胞から神経幹細胞を分化誘導し片側の被殻へ移植した。移植前後の PET による解析の結果、ドーパミンの前駆物質である [ $\beta$ -<sup>11</sup>C] L-DOPA とドーパミントランスポーターのリガンドである  $\beta$ -CFT の取込みの増加を認めた。さらに、メトアンフェタミン投与により移植側の被殻でドーパミンの放出が促進されることが、ドーパミン受容体のリガンドである [<sup>11</sup>C] raclopride 結合能の低下として間接的に示された。これらのことから、移植側の被殻においてドーパミン機能が回復したことが明らかとなった。

### サイド メモ

#### Parkinson 病のモデル動物

治療実験には適切なモデル動物が必要となる。Parkinson 病では、黒質緻密部のドーパミン神経細胞を選択的に破壊する神経毒を応用したモデル動物が知られている。アメリカで合成麻薬を自作した学生が Parkinson 病を発病したことから、不純物として含まれていた 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) が見出された。カニクイザルに MPTP を慢性的に静脈投与することにより振戦、無動・寡動、筋強剛、動作緩慢など、ヒトの Parkinson 病と同様の運動症状を示し、黒質のドーパミン神経細胞が脱落したモデル動物を作製することができる。最近では家族性 Parkinson 病で遺伝子変異が認められ、Lewy 小体の構成成分でもある  $\alpha$ -synuclein をウイルスベクターを使用して黒質に過剰発現させることにより、ドーパミン神経細胞死を誘導するモデル動物も開発されている。

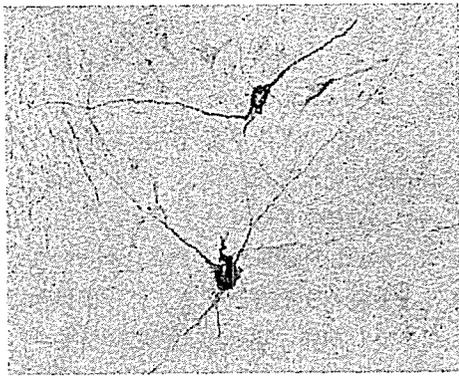


図 1 Parkinson病モデルサルでの移植部位に認められた抗チロシン水酸化酵素抗体染色陽性の細胞(ヒト ES 細胞由来の神経幹細胞を移植 3 カ月後の免疫染色)

運動障害の改善の程度は軽度であったが、不随意運動は認めていない。現在、スウェーデンから輸入したヒト ES 細胞を使用して同様の実験を行っており、モデルサルの被殻において移植細胞の生着を確認している(図 1)。カナクイザル ES 細胞では PA6 により分化誘導した細胞を移植して機能回復が得られたという報告もされている<sup>13)</sup>。

### 今後の課題

ES 細胞由来の神経幹細胞の臨床応用に際しては、奇形腫の発生を防ぐ必要がある。そのため未分化な細胞を排除する方法<sup>14)</sup>や、万一、奇形腫が発生したときに機能させる自殺遺伝子の導入などの技術開発が行われている。また、通常ヒト ES 細胞の培養に際してはマウスの線維芽細胞をフィーダーとして使用し、ウシ胎仔血清などを培地に加えているが、移植用細胞の調整に際しては動物製剤を極力排除することが望ましい(xeno-free ES cell)。そのために、既知の化学成分のみからなる培地などが試みられている<sup>15)</sup>(表 1)。胎児脳細胞移植の知見から、免疫反応は比較的軽度と考えられているので、体細胞核移植した ES 細胞(NT-ES)をあえて使用しなくてもよいかもしれない。患者自身の体細胞核を導入した場合、健常人由来のドパミン神経細胞よりも Parkinson 病の変性機序に侵されやすい可能性も考えられる。

最近、視床下核の電気刺激(deep brain stimulation)が急速に普及しており、遺伝子治療も臨床試

表 1 ES細胞移植の課題と対策

- |  |
|--|
| 1. 奇形腫の発生阻止→未分化細胞の除去<br>自殺遺伝子の導入                         |
| 2. 動物由来成分の混入防止→defined medium の使用<br>(xeno-free ES cell) |
| 3. 不随意運動の抑制→被殻内の移植部位を増やす?<br>免疫抑制剤の長期使用?<br>深部脳刺激との併用    |
| 4. 臨床効果の増強→遺伝子治療との併用                                     |

験が行われている。これらの治療法を考慮したうえで細胞移植治療の適応を厳密に決めることが重要となってきた。線条体におけるドパミンの補充を目標とするのであれば、ウイルスベクターにより線条体の細胞にドパミン合成系の酵素遺伝子を導入して直接線条体内でドパミンの合成を行う遺伝子治療が有力である<sup>16)</sup>。細胞移植にはドパミンの補充以外に神経栄養因子やサイトカインの分泌などによる神経保護効果も期待したい。また、線条体の細胞の脱落により Parkinson 病と同様の症状を示す Parkinson 症候群に対しては現時点で有望な遺伝子治療はないが、GABA を伝達物質とする神経細胞の移植が応用できるかもしれない。遺伝子治療と細胞移植治療の併用も今後行われるであろう。

Parkinson 病ではドパミン以外にセロトニン、ノルアドレナリンなどにも障害があることが知られており、L-DOPA 治療があまり有効でない症状として認知症、うつ状態、姿勢反射障害、自律神経障害、すくみ足などがある。これらの黒質線条体系以外の障害に対する効果についても考慮する必要がある<sup>8,17)</sup>。

Parkinson 病の原因が解明され、根本的な治療法が見出されるまで、移植治療の可能性は引き続き検討する必要がある。胎児細胞に代わるドナー細胞として ES 細胞に近い将来臨床応用されることが期待される。

### 文献

- 1) 水野美邦：日本内科学会雑誌，94：1761-1773，2005.
- 2) Dunnett, S. B. et al. : *Nat. Rev. Neurosci.*, 2 : 365-369, 2001.
- 3) Piccini, P. et al. : *Nat. Neurosci.*, 2 : 1137-1140, 1999.
- 4) Freed, C. R. et al. : *N. Engl. J. Med.*, 344 : 710-

- 719, 2001.
- 5) Olanow, C. W. et al. : *Ann. Neurol.*, **54** : 403-414, 2003.
  - 6) Gordon, P. H. et al. : *Arch. Neurol.*, **61** : 858-861, 2004.
  - 7) Freed, C. R. et al. : *Ann. Neurol.*, **55** : 896, 2004.
  - 8) Piccini, P. et al. : *Brain*, **128** : 2977-2986, 2005.
  - 9) Bjorklund, L. M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** : 2344-2349, 2002.
  - 10) Lee, S. H. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **18** : 675-679, 2000.
  - 11) Kawasaki, H. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** : 1580-1585, 2002.
  - 12) Nakayama, T. et al. : *Neuroreport*, **15** : 487-491, 2004.
  - 13) Takagi, Y. et al. : *J. Clin. Invest.*, **115** : 102-109, 2005.
  - 14) Shibata, H. et al. : *Stem Cells*. (in press)
  - 15) Ludwig, T. E. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **24** : 185-187, 2006.
  - 16) Muramatsu, S. et al. : *Exp. Opin. Biol. Ther.*, **5** : 663-671, 2005.
  - 17) Lang, A. E. and Obeso, J. A. : *Ann. Neurol.*, **55** : 761-765, 2004.

\* \* \*

**PNE**  
PROTEIN,  
NUCLEIC ACID  
AND ENZYME  
**蛋白質 核酸 酵素**

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

# 細胞生物学における蛍光相関分光法と 蛍光相互相関分光法

三國新太郎・金城政孝

細胞の中で注目している分子のおかれた環境がどのようになっているか、単独で存在しているのか、それとも大きな構造体に含まれているのかなどを知るためには、その中で分子がどの程度自由に動くことができるのかを直接測定することが重要となる。このような細胞内の分子の動きを測定する方法として、ここでは蛍光相関分光法 (FCS) を紹介する。また、生体分子の多くは単独で機能することは少なく、多くの場合、同じ分子どうし、または異なった分子との複合体をつくり、離合集散しながら機能を発現している。このような相互作用を分子の運動という観点から解析する手法として、蛍光相互相関分光法 (FCCS) を紹介する。

▶▶KEY WORDS : 蛍光測定 拡散定数 揺らぎ 単1分子検出 分子間相互作用

## はじめに

細胞の中にはさまざまな細胞内小器官や細胞骨格、蛋白質やmRNAをはじめとする高分子が存在し、それらが障害となって物質は簡単には動かないと考えられがちである。しかし細胞は外界からのいろいろな刺激(情報)に対して短時間のうちにさまざまな反応を起こす。このことは、細胞の中でいろいろな情報伝達・処理が行われていることを示している。細胞の中の情報伝達の存在はとりもなおさず、分子が移動や相互作用しながらダイナミックに動いていることを示唆している。物質が動いたり運ばれたりするにはさまざまな機構が考えられ、そのなかには標的を決めて配送するきわめて効率的なシステムも存在する。しかし一方では、そのような配送システムではなく、単純な拡散を介したシステムもまた重要な役割を担っている。拡散を介したシステムがどのように機能しているかを知るためには、細胞の中で分子がどの程度自由に動くことができるのかを直接測定することが重要となる。このような細胞内の分子の動きを測定する方法として、ここでは蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy : FCS) を紹介する。また、生体分子の多くは、同じ分子どうし、または異なった分子と複合体をつくり、離合集散しながら機能を発現してい

る。このような相互作用を解析する手法として蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross correlation spectroscopy : FCCS) を紹介する。

なお、FCSに関する詳しい解説はいくつかすでに報告があるので、それらを参考にしてほしい<sup>1-3)</sup>。また、後述するFRAPとFCSとの比較について和田の解説<sup>4)</sup>がよい参考になる。

細胞の中で分子の動きやすさを測定する手法として、FCSのほかによく知られている方法としては、画像の時間変化(タイムラプス)やSMT (single molecule tracking), FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), iFRAP (inverse FRAP) などがある。いずれも細胞内や生体膜中での分子の動きとその速さを解析する方法であり、その速さは拡散定数(車の運転でいえばスピードにあたる)として表される。同じ分子で細胞の中の状態が同じであるなら、その拡散定数は変化しない。もし、動きが変化するなら、分子の存在する環境が変化したか、もしくは分子の性質や形状が変化したことを示す。環境の変化としては粘性の変化や細胞内の微細構造の変化が考えられる。一方、分子の形状や性質の変化としては、複合体の形成や2量体化などが考えられる。車の運転でいうなら、道路工事や雪や雨などの天

Shintaro Mikuni, Masataka Kinjo, 北海道大学 電子科学研究所 超分子分光研究分野 E-mail : kinjo@imd.es.hokudai.ac.jp  
s-mikuni@imd.es.hokudai.ac.jp

Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross correlation spectroscopy for cell biology

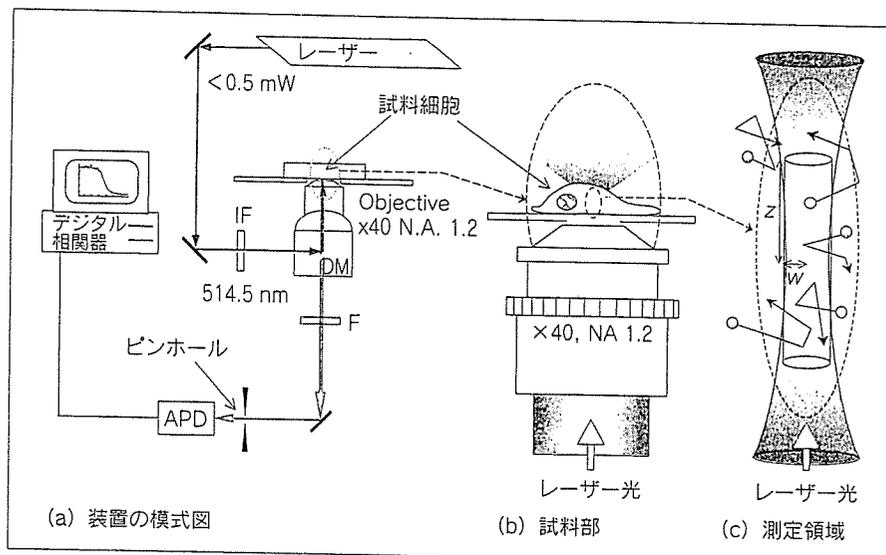


図1 測定装置の概要

(a) 蛍光相関分光装置の全体の模式図。励起用のレーザー光源、光を絞るための対物レンズと検出器としてのAPD（アバランシェフォトダイオード）で構成されている。IF：干渉フィルター、DM：ダイクロイックミラー、F：ロングパスフィルター。

(b) 試料測定部の模式図。レーザー光は対物レンズによって、カバーガラス上の溶液や細胞中の1点に絞られている。

(c) 観察領域の拡大模式図。観察領域はここでは半径  $w$ 、軸長  $2z$  で定義される円柱状の領域として示した。蛍光分子（○）はブラウン運動により溶液の中を自由に動きまわり、この円柱の中で蛍光を発する。

候の変化や、新しい信号機の設置だろうか。また、トレーサーなどをつけたときの動きの変化かもしれない。このように分子の動きやすさ（拡散定数）を測定することで、分子のまわりの微環境や分子間の相互作用を解析することが可能である。大雑把な言い方を許してもらえば、タイムラプスやSMTは画像での解析になるため、細胞内小器官などの比較的遅い動き（ $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ）、FRAPやiFRAPでは専用機やLSM（下記参照）などを用いて生体膜中の分子の動きやクロマチンなどの巨大分子複合体などの動き（ $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ）の測定に用いられている。FCSでは、溶液や細胞質内の蛋白質の動きなどのさらに速い動き（ $100 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ）を解析することができる。

## I. 蛍光相関分光法 (FCS)

### 1. 装置

蛍光相関分光装置の基本構成は、共焦点レーザー光学系が用いられている。そのため、しばしば同様の光学系で構築されている共焦点走査型レーザー顕微鏡（laser scanning microscopy：LSM）を利用することが多く、構造も類似している（図1a）。レーザーからの励起光は対物レンズで1点に絞り込まれ、カバーガラス上の試料に達し測定領域を形成する。蛍光分子はその測定領域内において励起され、蛍光を発する（図1b）。発せられた蛍光はピンホールを通り、高感度検出器（アバランシェフォトダイオード（APD）または光電子増倍管）にて検出される。蛍光相関分光装置では、検出された信号から

デジタル（またはソフトウェア）相関器により自己相関関数（後述）が計算される。

### 2. 単1分子検出

測定領域は微小な円柱状と仮定することができる（図1c）。その直径は励起光の波長と同程度の約  $0.4 \mu\text{m}$ 、軸長は  $1 \sim 2 \mu\text{m}$  であり、その体積はフェムトリットル（ $10^{-15}$ リットル）以下に絞り込まれていることになる。1M（mol/L）に含まれる分子の数（アボガドロ数  $\approx 6 \times 10^{23}$ ）からすると、蛍光分子が  $0.1 \mu\text{M}$ （ $10^{-7}$ M）濃度で存在する場合、FCSの測定領域内にはわずかに60個程度の分子が存在することになる。微小に絞り込まれた測定領域と高感度検出器を組み合わせることにより、単一分子レベルの蛍光を検出することが可能となる。

### 3. 分子の運動と蛍光強度の揺らぎ

溶液中や細胞内の分子はまわりに制限するものがなければ、ブラウン運動という分子の大きさに依存した速さをもつランダムな拡散運動をしている。このランダムな運動により測定領域を絶えず出入りする蛍光分子の動きは検出器を通して蛍光強度の値として観測される。この蛍光分子の出入りにより蛍光強度の値は増減を繰り返して、揺らぎとして観測される。

さて、分子が小さく、速いブラウン運動をしているときは測定領域を通過する時間が短いため、蛍光強度の揺らぎの変化が急になる（図2a）。逆に分子が大きく、遅いブラウン運動をしているときは測定領域を通過する時間が長いため、蛍光強度の揺らぎの変化は緩やかになる

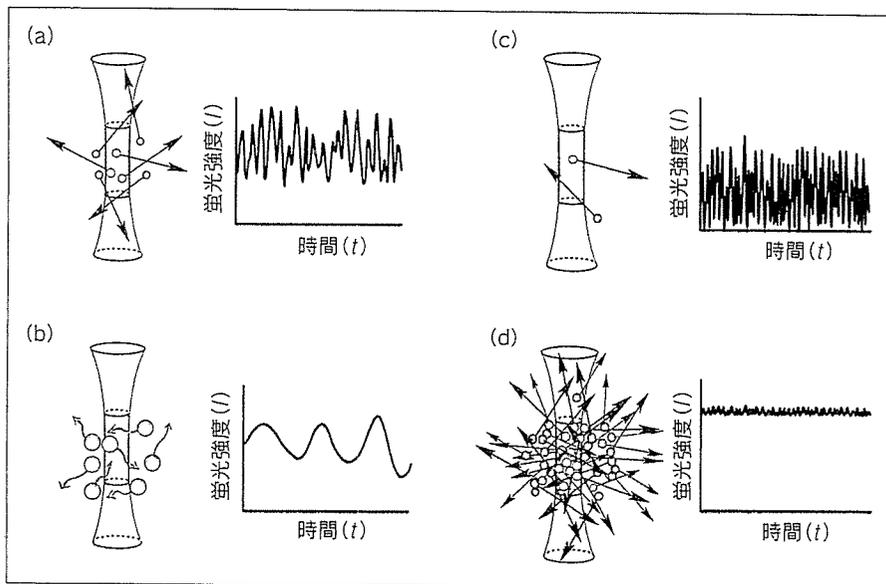


図2 FCSの測定対象領域を出入りする蛍光分子の挙動と、そこから検出される蛍光強度の揺らぎの関係

(a) 小さな分子と速い揺らぎ。  
 (b) 大きな分子と遅い揺らぎ。  
 (c) 分子の数が少ないときと大きな揺らぎ。  
 (d) 分子数が多いときに平均化される揺らぎ。  
 実際の測定は単一光子計測なので、光電子パルス系列として観測され、ここで示したアナログのような変化ではないことに注意されたい。

(図2b). つまり、揺らぎの緩急のなかには“分子の大きさ”(分子量, 形)に関する情報が含まれていることがわかる。揺らぎの緩急は温度や溶媒の粘性といった分子のおかれている環境にも依存する。

分子の数が少ないとき、極端な例では平均1個の分子が測定領域を出入りするときは、測定領域内に分子が存在するときとしないときで0~100%の間で蛍光強度の大きな揺らぎが観測される(図2c)。逆に分子の数が多いとき、たとえば平均1000個の分子が測定領域にあるときは、100個の分子が一挙に出入りをしてもわずか10%の蛍光強度の小さな揺らぎしか観測されない(図2d)。つまり、揺らぎの大きさのなかには“分子の数”に関する情報が含まれている。

#### 4. 自己相関関数による解析

以上のように蛍光強度の揺らぎのなかには“分子の大きさ”と“分子の数”に関する情報が含まれている。しかし、これらの情報は蛍光強度の揺らぎを眺めているだけではわからない。揺らぎから情報を引き出すために自己相関関数 (fluorescence auto-correlation function;  $G(\tau)$ ) が用いられる。自己相関関数は以下の式に従い蛍光強度の値から計算する。ここで、 $\langle \rangle$  はアンサンブル平均、 $I(t)$  は時間  $t$  での蛍光強度を示す。すなわち、 $G(\tau)$  はあるシグナルと時間遅れのシグナルの掛け合わせの平均として示される(図3)。

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \dots (1)$$

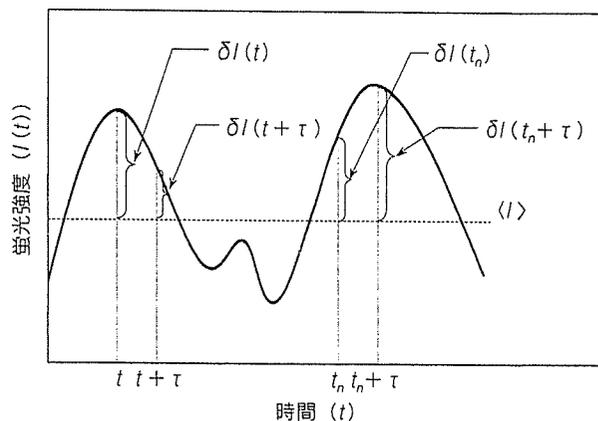


図3 数揺らぎに起因する蛍光強度の時間変化

平均蛍光強度を  $\langle I \rangle$ 、平均からの偏差を  $\delta I(t)$  とすると、

$$I(t) = \delta I(t) + \langle I \rangle, I(t+\tau) = \delta I(t+\tau) + \langle I \rangle$$

式(1)は時間  $t$  における蛍光強度  $I(t)$  の値と、ある  $t$  から  $\tau$  時間後の強度  $I(t+\tau)$  がどの程度同じなのか、または、異なっているのかを調べるために両者を掛け合わせ、さらに多くの時間ポイント  $t_n$  に対して測定を行い、平均を求める操作を行う(式の  $\langle \rangle$  はこのような平均操作を表す)。次に別の時間間隔  $\tau_2$  を設定して同じ操作を繰り返す。

FCSで用いられる相関関数は式(1)のように平均蛍光強度の2乗で規格化されて示されていることが多い。典型的な自己相関関数は図4に示すような減衰曲線となる。図2aからbのように分子が大きくなると、自己相関関数は図4の曲線1から曲線3へと変化する(右にシフトする)。曲線2の自己相関関数は大きな分子と小さな分子が半分ずつ混ざった状態を示す。FCSのy軸切片の大きさは相関関数の振幅(amplitude)とよばれる。測

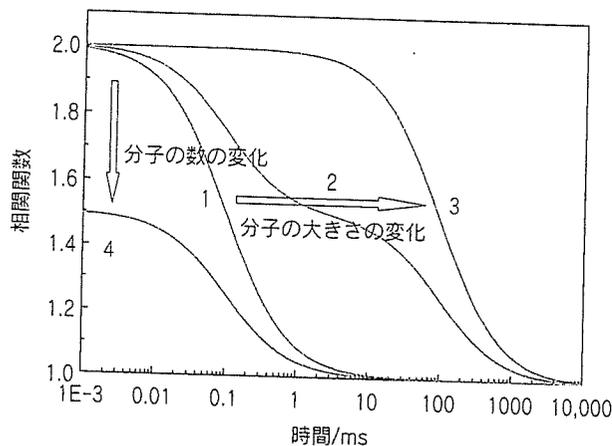


図4 自己相関関数  $G(\tau)$  と分子の動きと数の関係

曲線1~3: 分子の大きさが大きくなると、水平の矢印のように自己相関関数は1から3へと、減衰が遅くなるよう変化する。曲線2は大きな分子と小さな分子が50%ずつ混ざった状態を示す。曲線4: 観察領域に含まれる平均分子数が少ないと揺らぎは大きい。自己相関関数の振幅も大きい。分子数が増えると揺らぎは小さく振幅も小さくなる。1から4の変化として示される。

定領域に含まれる平均分子数が少ないほど揺らぎは大きくなるために、自己相関関数の振幅は大きくなる。図2のcからdのように測定領域内の平均分子数が増え、図4の曲線1から曲線4へと自己相関関数は変化する。

自己相関関数の減衰からは測定領域を分子が通過する平均の時間、または測定領域に分子が滞在する時間である“拡散時間”が求められる。この“拡散時間”が“分子の大きさ”あるいは“運動の速さ”に関する情報に相当する。自己相関関数の振幅の大きさは測定領域に存在する分子数を反映する。具体的には自己相関関数の振幅から1を引いた値の逆数が測定領域内に存在する平均の“分子の数”を示す。これらを定量的に解析するために、以下の多成分モデル式による自己相関関数の解析が行われる。ここで、 $N$ は蛍光分子の数、 $s$ は円柱状の測定領域の軸長( $z$ )と直径( $2w_{xy}$ )の比( $s = 2z/2w_{xy}$ )、 $\tau_i$ は*i*番目の蛍光分子種の拡散時間、 $y_i$ は*i*番目の蛍光分子種の測定領域内での割合を示す。

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \sum_i y_i \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_i}\right)^{-1/2} \dots (2)$$

さらに、蛍光分子の三重項状態の寿命を考慮したモデル式が用いられる場合もある。また拡散定数  $D_i$  と拡散時間  $\tau_i$  には、 $\tau_i = w_{xy}^2 / (4D_i)$  という関係があり、結果として拡散定数が得られる。

## 5. FCSによる細胞の測定

装置は、前述したようにレーザー光源と対物レンズ、高感度検出器および解析用コンピュータの3つから構成されている(図2)。通常市販の装置はLSMをベースにしているため、次の4つの特徴を有する。まず、① フェムトリットルという非常に小さい領域を測定できる。これは細胞の体積に比較して十分小さいといえる。顕微鏡をベースにしているため、② 高い空間分解能がある。さらに、③ 微量で測定ができる。微量とは小さな液滴、つまり、1~2  $\mu\text{L}$  くらいの溶液があれば十分である。もう一つ大きな特徴は、④ 均一系の測定であるということである。ブラウン運動を基本とした、水溶液の測定なので、水中で分子を固定したり、止めたりする必要がない。つまり細胞1個の中の任意の場所を測ることが可能であり、図4で示したように、動きの異なる分子の情報を物理的な分離過程を行うことなく、同時に得ることができる。次にその一つとして、細胞質と核内それぞれについて測定した例を示す。

実際の細胞の測定は、どのような蛍光色素や蛍光性蛋白質を利用するのか、観察する細胞の種類、ターゲットとなる蛋白質や分子によりさまざまではあるが、ここではまずGFPのみをHeLa細胞内に発現させてFCS測定を行った例を示そう。図5bのように細胞質内(C)と核内(N)を区別して測定したところ、細胞質内と核内の間に相違はほとんどないことがわかった(図5a)。また、それぞれの自己相関関数の解析から、細胞内での拡散定数は溶液中の約1/3であることも確かめられた(図5の表)。

次に、グルココルチコイド受容体(glucocorticoid receptor: GR)のGFP融合蛋白質(GFP-GR)の測定結果を紹介する。GRはリガンドと結合することで、細胞質から核内へと局在を変化させ、転写を調節している核内転写因子の一つである。先ほどと同様にHeLa細胞にGFP-GRを発現させ、細胞質内と核内を区別して測定を行ったところ、細胞質内ではリガンド添加前後で減衰曲線に変化は生じなかった(図5c)。その一方、核内ではリガンド添加後、時間とともに減衰曲線が右にシフトしていく様子が観察された(図5d)。つまり、細胞質内ではリガンドの有無にかかわらず、ほとんどのGFP-GRが自由なブラウン運動をしている様子が観測され(図6a)、それに対してリガンド添加後の核内では、自由な

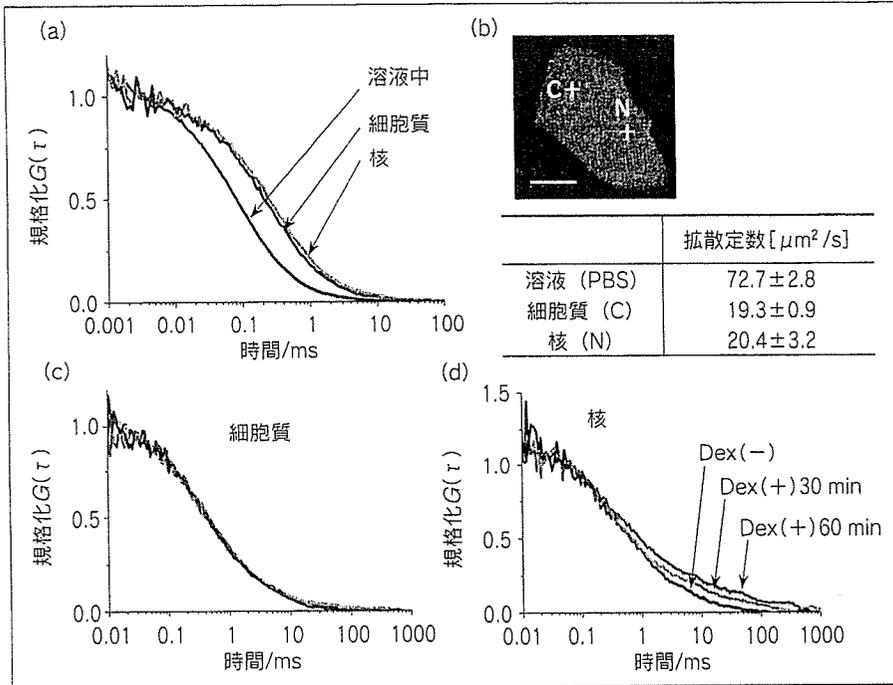


図5 細胞内FCS測定

(a) GFPを細胞内に発現させ、細胞質、核と区別して測定した。対照としてPBS (phosphate-buffered saline) 中の測定結果も合わせて載せてある。

(b) 細胞内FCSの測定場所を示す。測定から得られた各場所の拡散定数を表に示した。

(c) GFP-GRを細胞内に発現させ、細胞質で測定した。リガンド(デキサメタゾン; Dex)を培地に添加しても相関関数に変化はない。

(d) GFP-GRを細胞内に発現させ核内でFCS測定を行った。リガンドDex添加後、相関関数は時間とともに右にシフトしている様子がわかる。

[口絵3 (p.1914) 参照]

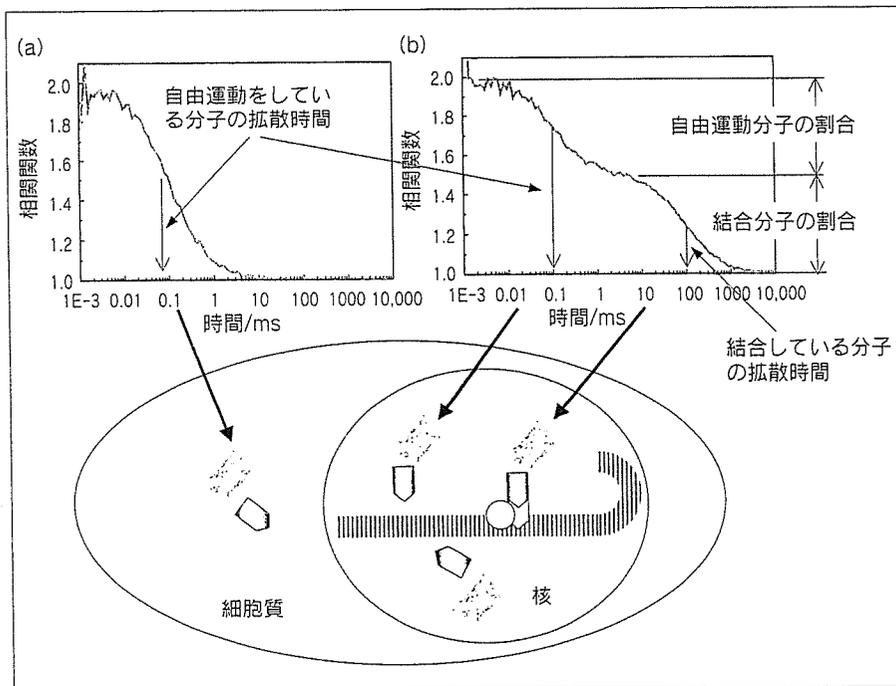


図6 細胞質と核をそれぞれ区別して測定した図5の測定結果のモデル

(a) GFP融合蛋白質が他の分子と相互作用せず、細胞質で自由なブラウン運動をしているときは、FCSの測定では速い動きが検出される。

(b) GFP融合蛋白質が核内において他の分子(蛋白質やDNA)と相互作用しているときは、結合した割合に応じて速い動きと遅い動きが検出される。

GFP-GRの動きと、動きが遅くなったGFP-GRの動きの重ね合わせとして観測されたと考えられる(図6b)。先にも述べたが、FCSは動きの異なる分子の情報を同時に得ることができるので、ここでは遅い動きに注目し解析を行ったところ、リガンド添加によってGFP-GRは拡散定数にして数倍も遅くなっていることが明らかになった。さらに、さまざまな測定を通して、この

GFP-GRが遅くなる現象が、DNAとの結合によるものだけでなく、他の共役因子との結合や2量化など、さまざまな要因に関係していることがわかってきている。

GRはその機能のほとんどが既知であるといって過言ではないほど、古くから多くの生化学的な研究が行われてきた。しかし、紹介したようにFCSによって得られるダイナミックな情報がこれまでの研究へフィードバック

クされることで、より詳細な生細胞内でのシグナル伝達メカニズムの解明につながると筆者らは考えている。

FCSはさまざまな実施例や応用例が報告されてきているが、まだ測定条件など改良していく必要がある技術だと考えている。そのことは逆に研究者のアイデアで発展させていくことも可能であることを示している。細胞内における蛋白質のダイナミクスな状態の研究に関してFCSとFRAPやFRETなど、他の手法との比較については文献5を参考してほしい。

## II. 蛍光相互相関分光法 (FCCS)

これまでに、FCSは細胞内や核などの細胞内小器官における生体分子の動きを1分子感度で解析する方法であることは理解できたと思う。では、どの程度の分子運動の変化をとらえることができるのであろうか？ 一般にFCSで測定される並進拡散定数(分子の動きやすさ)と分子の大きさは次の式で示される。

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad \dots (3)$$

$D$ はここでは拡散定数、 $r$ は分子を球体としたときの半径であり、残りの $k$ ,  $T$ ,  $\pi$ ,  $\eta$ はそれぞれボルツマン定数、温度、円周率、溶液の粘性で、それぞれ定数である。ここで $D$ は半径 $r$ と逆比例することが示されており、また先にも述べたように $D$ が拡散時間 $\tau$ と逆比例する関係から、結局、拡散時間と分子の半径は比例することになる。つまり、拡散時間が10倍程度変化することは半径 $r$ も10倍変化したことになり、体積(つまり分子量)は1000倍大きく(もしくは小さく)変化したことを示す。このことは逆の見方をすると、分子の大きさが1000倍変化しても測定されるパラメーターである拡散時間は10倍程度しか変化しないことになる。実際、同じ大きさの分子どうしが結合しても相関関数のグラフは右へシフトすることをほとんど見込めないこととなり、FCSはそれほど敏感な測定法とはいえない\*1。このようなFCSの弱点を克服する手法の一つとしてFCCSがある。FCSが1種類の蛍光色素の揺らぎを測定しているのに対して、FCCSは2種類の蛍光色素の揺らぎを同時に測定できるように拡張した方法である。次にFCSの原理に基づいて、FCCSの特徴を紹介しよう。

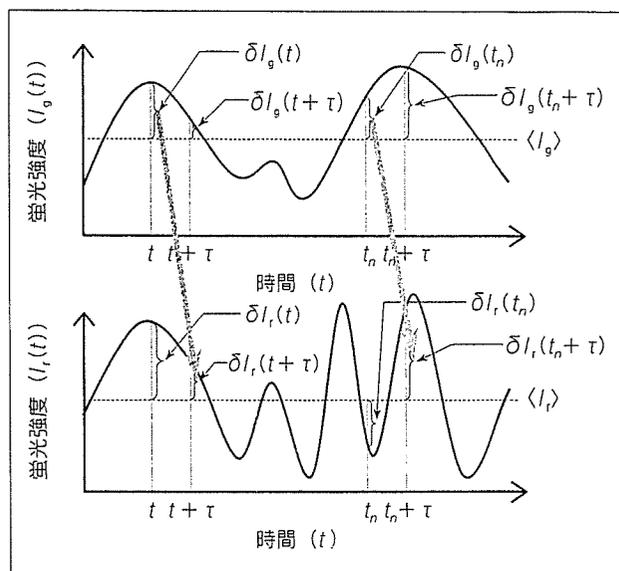


図7 相互相関関数の解析方法の原理

2つの揺らぎのシグナルの測定を行い、時間 $t$ に対して、別のシグナルの時間遅れのシグナル強度を掛け合わせる。それを、すべての時間 $t_n$ に対して測定を行い平均を求める。図3と異なることは掛け合わせる相手が自分ではなく、別のシグナルであることである。 $\tau$ の大きさを変化させて、上記と同じ操作を繰り返す。

### 1. 蛍光相互相関分光法の原理

FCSでは1種類の蛍光色素からの蛍光強度シグナルと、ある時間遅れのシグナルの掛け合わせの平均を求めた(式(1))のに対して、FCCSでは蛍光発光波長の異なる蛍光色素からのシグナルの時間遅れを掛け合わせて、シグナルの変化の速さを求める方法である(式(4))。

$$G_{gr}(\tau) = \frac{\langle I_g(t) I_r(t+\tau) \rangle}{\langle I_g(t) \rangle \langle I_r(t) \rangle} \quad \dots (4)$$

式の示す様子を図7に示した。

FCSでは分子の数と分子の動きを求めることができた。FCCSではさらに、2種類の分子の時間的・空間的同時に性を求めることができる。とくに、FCSのy軸切片の大きさ(相関関数の振幅、amplitudeとして示される)が分子の数の逆数として示されていたのに対して、FCCSの強度は相互作用をしている分子数に比例していることが特徴として挙げられる(図8)。

次にFCCSによる細胞測定の例を示そう。

\*1 DNAのような棒状分子の場合、このことは当てはまらない、詳しくは文献6, 7を参照されたい。

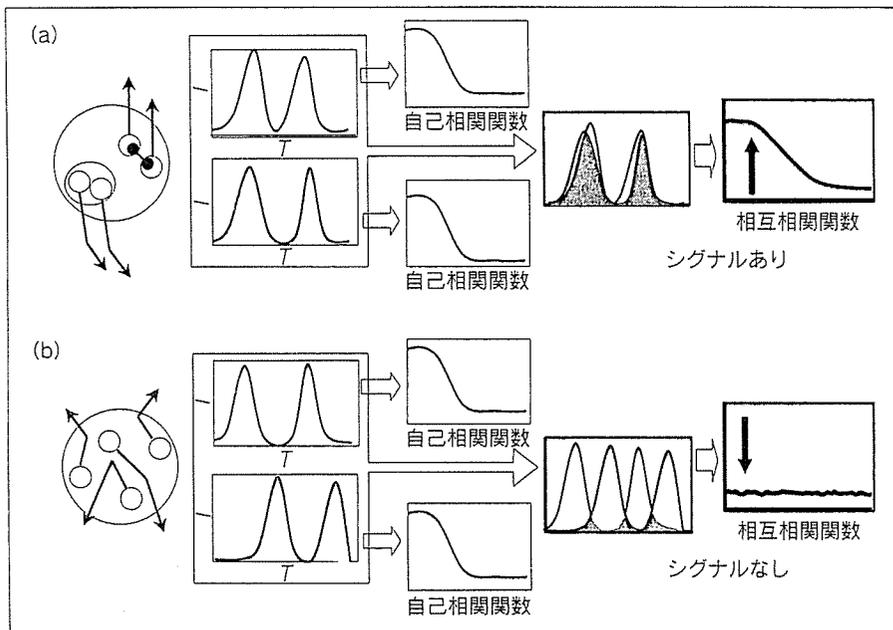


図8 FCCSの原理

(a) 相互作用をしている（結合や複合体形成など）2種類の蛍光色素は微小領域では同時に入出力を行う。そうすると、それぞれのシグナルに由来するFCSの測定と同時に、2つのシグナルの重ね合わせを求めることが可能である。その重ね合わせのシグナルの相関関数を計算することで蛍光相互相関関数が得られる。  
 (b) 2つの蛍光色素が相互作用をしていないときには、2つのシグナルの重ね合わせは少なく、したがって、相互相関関数は低くなる。

## 2. FCCSによる細胞内分子間相互作用の解析

ここでは、FCCSを用いた細胞内の分子間相互作用検出の例<sup>9)</sup>を紹介しよう。カスパーゼ3が認識するアミノ酸配列であるDEVDでGFPとmRFPを結んだタンDEM複合体(GFP-mRFP)をHeLa細胞に発現させ、FCCS測定(図中の黒線のグラフ)を行った結果を図9aに示す。GFPとmRFPは直接結ばれているので2色の蛍光間の相互作用は100%であり、確かにFCCSのシグナルが観察された。一方、単にGFPとmRFPが共発現した細胞では、両者は何ら関係なく細胞の中を動いているので、FCCSのシグナルは観察されなかった(図9b)。

次に、GFP-mRFPが発現した細胞にアポトーシスを誘導させると、FCCSのシグナルはほとんどなくなった(図9c)。これはアポトーシス誘導に伴うカスパーゼ3の活性化によりDEVDの位置での切断が起こったことを示している。一方、カスパーゼ3に認識されない配列DEVGでGFPとmRFPを結んだ複合体は、アポトーシスを起こした後もFCCSのシグナルは減少しない(図9d)。

FCCSでは2つの自己相関関数(FCS)と1つの相互相関関数(FCCS)の合計3つの曲線が表示される。分子間相互作用が100%で、装置が理想的なことを考えると、これら3つの曲線はすべて一致するはずである。しかし、光学的に波長の異なる2種類のレーザー光を光の

回折限界まで絞り、サブマイクロメートルオーダーで3次元的に一致させることはそう簡単なことではない。波長が異なることに由来する水、ガラス、細胞質の屈折率の違いや色素間の波長のオーバーラップなどによるシグナルの分離の不完全(クロストーク)など、さまざまな要因で3つの曲線が一致することは少ない。また、内在性の非蛍光性蛋白質との相互作用によるFCCSのシグナルの低下も引き起こされる。そのために実験に当たっては当然のことであるがポジティブコントロールやネガティブコントロールをしっかりと取ることが求められる。

### おわりに

FCCSはこれまでのFCSに比較して装置的にも解析手法にも格段の精密さが求められるが、一方でさまざまな展開も始まってきている。その一つの方向として励起波長と発光波長が離れている色素を利用することを前提として、1波長励起2波長発光によるFCCSも研究されてきた。これによると、先に述べた2つの励起波長間の3次元的なずれを気にすることなく、高感度に分子間の相互作用を検出できることが示されている<sup>9)</sup>。

今後、ますます、蛍光色素や蛍光性蛋白質の改変や発展を踏まえて、さまざまな測定法へと展開することが期待できるであろう<sup>10)</sup>。

筆者らの研究の一部は文部科学省科学研究費補助金による。カスパーゼ3の測定データに関しては齊藤健太博士(北海道大学