

( $w$ ) と半長軸 ( $z$ ) の比を示す。 $\tau_D$  は拡散時間 (または相関時間) と呼ばれ、蛍光分子が拡散によって観測領域を通過する平均の時間を示す。 $N$  は一定時間内に観測領域内に存在する分子の平均の数を示す。

揺らぎを式(1)により解析すると図1(C)に示すような曲線が得られ、そこから分子の「動き易さ」を示す拡散時間 $\tau_D$ と分子の「数」 $N$ が得られる。相関曲線は、蛍光分子が他の分子と会合するなどして分子のサイズ (大きさ) が大きくなると右にシフトし、反対に解離するなどしてサイズが小さくなると左にシフトする。

式(1)で得られる拡散時間 $\tau_D$ は、拡散定数 $D$ と式(2)の関係にある。

$$\tau_D = w^2 / 4D \quad (2)$$

さらに拡散定数 $D$ は、分子を球と仮定した場合のアインシュタイン-ストークス (Einstein-Stokes) 式により、分子の半径 $r$ と式(3)に示される関係にある。

$$D = \frac{\kappa_D T}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

ここで、 $\kappa_D$ 、 $T$ 、および $\eta$ はそれぞれボルツマン定数、絶対温度、および溶媒の粘性である。

従って、拡散時間 $\tau_D$ は式(2)と(3)より分子の「大きさ」(サイズ)に当たる分子半径 $r$ と式(4)のように関係付けられる。

$$\tau_D \propto 1/D \propto r \quad (4)$$

このように蛍光強度の揺らぎを式(1)および(4)を用いて解析することで、観測領域内に存在する分子の「数」や「大きさ」を得ることができる。揺らぎと自己相関関数についての詳しい説明は解説書があるのでそちらを参考にされたい<sup>7-9)</sup>。

### 3. 抗原抗体反応解析

#### 3.1 分子量に依存した拡散時間の変化

抗原抗体反応系には、改変緑色蛍光タンパク質 (以下、EGFP) と抗 GFP 抗体を用いた。EGFP と抗 GFP 抗体は、溶液中で抗原抗体反応により

EGFP-抗 GFP 抗体複合体 (以下、EGFP-Ab) を形成する。EGFP と EGFP-Ab をそれぞれ ConfoCor2 を用いて測定し、得られた相関関数曲線を図2に示した。EGFP の相関曲線 (×) と比べて、抗 GFP 抗体と会合して分子サイズが大きくなった EGFP-Ab の相関曲線 (○) が右にシフトしているのが見てとれる。

次に分子量と拡散時間との関係を、MF20 を用いて調べた。FCS 測定し、式(1)を用いて算出した EGFP の拡散時間は  $380 \mu\text{s}$  であった。EGFP の分子量と拡散時間から式(5)を用いて予測した EGFP-Ab の拡散時間は  $690 \mu\text{s}$  であった。実際に測定し、式(1)を用いて算出した EGFP-Ab の拡散時間は  $760 \mu\text{s}$  であり、その値はほぼ一致した。なお、拡散時間に1割程度のずれが生じているが、これは式(5)が分子の形状を球体と仮定した式であるのに対して、抗体の形状が Y 字型をしているためと考えられる。

$$\tau_D \propto r \propto \sqrt[3]{\text{分子量}} \quad (5)$$

#### 3.2 FCS による抗原抗体反応解析

濃度  $10 \text{ nM}$  の EGFP と濃度  $50 \sim 0.1 \text{ nM}$  の間で希釈した抗 GFP 抗体とを混合し、 $37^\circ\text{C}$  で1時間反応させた後に FCS の測定を行った。式(1)を用いて解析した拡散時間を図3(A)に示した。抗体の

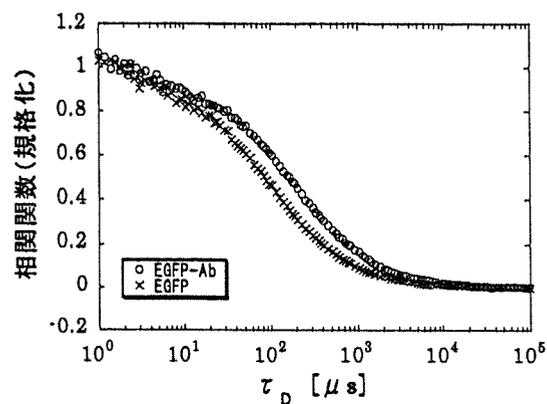


図2 EGFP と EGFP-Ab の相関関数曲線  
測定は ConfoCor2 を用いて 30 秒間測定し、得られた結果を示す。

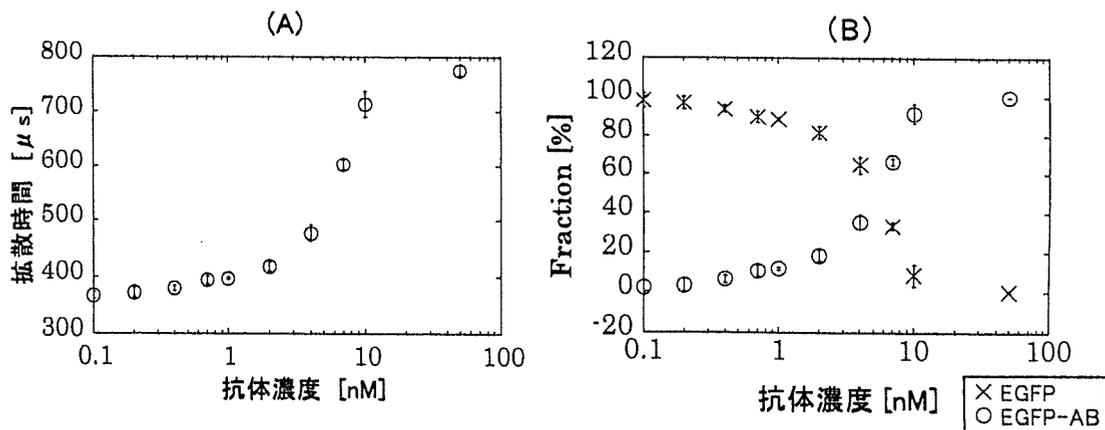


図3 (A)は横軸に投入した抗 GFP 抗体濃度を、縦軸には式(1)から得られた拡散時間を示したグラフおよび(B)は横軸には抗体濃度を、縦軸には2成分モデル式(式(6))で解析して得られた Fraction ( $f$ ) を示したグラフ

濃度が上昇するにしたがい拡散時間が徐々に大きくなっていく様子が分かる。これは、FCS 測定によって得られる平均拡散時間が混合溶液中に存在する EGFP と EGFP-Ab との存在比を反映しているためである。

次に、式(1)で示した相関関数の解析式を単純に拡張した2成分モデル式(式(6))を用いて、さらに抗原抗体反応の解析を行った(図3(B))。

$$C(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[ \frac{1-f}{\left[1 + \frac{1}{\tau_{free}}\right] \left[1 + \left(\frac{1}{s}\right)^2 \frac{1}{\tau_{free}}\right]^{1/2}} + \frac{f}{\left[1 + \frac{1}{\tau_{bound}}\right] \left[1 + \left(\frac{1}{s}\right)^2 \frac{1}{\tau_{bound}}\right]^{1/2}} \right] \quad (6)$$

ここで  $\tau_{free} = w^2/4D_{free}$ ,  $\tau_{bound} = w^2/4D_{bound}$ ,  $s = z/w$  である。また  $\tau_{free}$  は単独の EGFP の拡散時間を、 $\tau_{bound}$  は複合体を形成した EGFP-Ab の拡散時間を示す。 $f$  は全 EGFP 分子数に占める EGFP-Ab の割合 (Fraction) を示している。

検体の濃度が上昇するにつれて EGFP-Ab がより多く形成され、逆に結合していない EGFP が減少していく様子が分かる(図3(B))。

### 3.3 FCS による解離定数の算出

反応混合液中の EGFP と抗 GFP 抗体は、それぞれ互いに反応し会合と解離を可逆的に繰り返す平衡状態にある。この反応の平衡定数 ( $K_d$ ) を、FCS を用いて算出した。ここでは、濃度 1 nM の EGFP と濃度 50~0.01 nM の抗 GFP 抗体を混合し、37°C で 1 時間反応させた後に FCS 測定した。その結果得られた EGFP-Ab の割合を図4(A)に示した。

図4(A)中の1つのプロットから式(7)を用いて  $K_d$  を算出できる。

$$K_d = \frac{[EGFP]_{free} [抗 EGFP 抗体]_{free}}{[EGFP-Ab]} \quad (7)$$

例えば抗体濃度 0.7 nM の場合(図4(A)\*), その  $K_d$  は 0.86 nM であった。また FCS 測定により得られた Fraction を利用して  $K_d$  を求めることもできる<sup>10)</sup>。Fraction は全体の EGFP 分子がどれだけの割合で EGFP-Ab を形成しているかを示すものである。したがって、Fraction は式(8)のように表すことができる。

$$Fraction = \frac{[EGFP-Ab]}{([EGFP]_{free} + [EGFP-Ab])} \quad (8)$$

ここで、式(7)と(8)から式(9)が導かれる。

$$Fraction = \frac{[抗 GFP 抗体]}{(K_d + [抗 GFP 抗体]_{free})} \quad (9)$$

式(9)を用いて得られた抗 GFP 抗体の  $K_d$  は

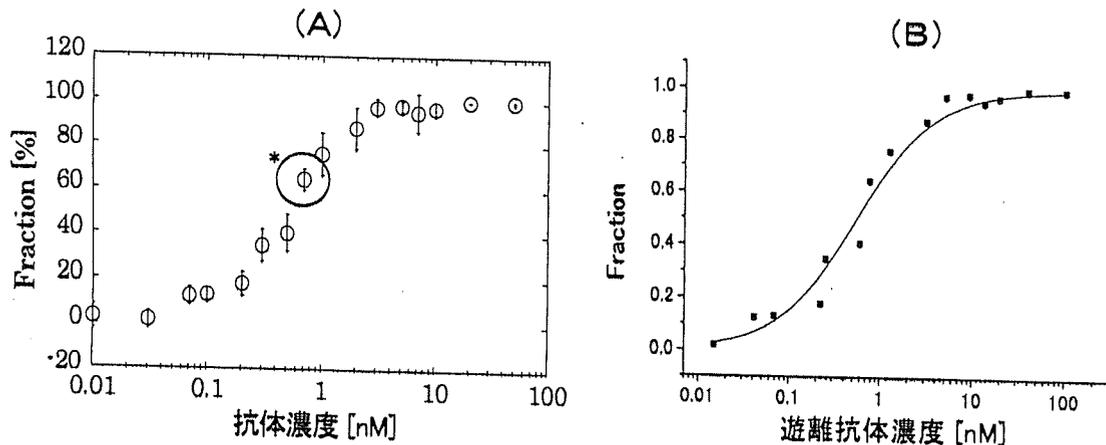


図4 抗体濃度に対して2成分モデルFCS解析(A)および式(9)を用いて図4(A)からの $K_d$ の算出 (B)  
 (A)グラフ中の\*は本文中で $K_d$ を計算したポイントを示す。  
 (B)横軸は反応溶液中で単独に存在する抗GFP抗体の濃度を、縦軸にはFCS解析から得られたFractionを示す。各プロットは図4(A)のプロットに対応し、グラフ中の曲線は式(9)を用いてフィッティングした曲線である。

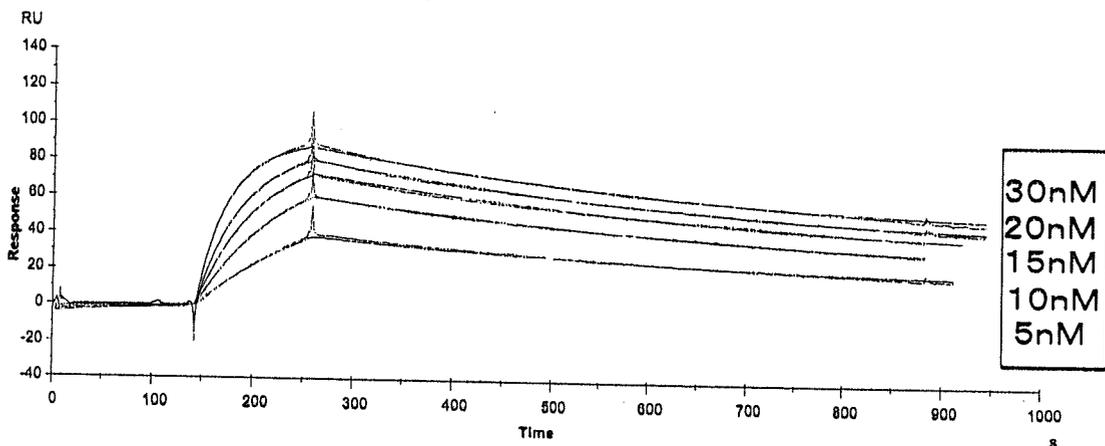


図5 BIAcore測定のスキャナグラム  
 BIAcoreによる $K_d$ 算出は、抗体をアミンカップリング法を用いてセンサーチップ表面に固定化し、濃度30~5nMのEGFPを流して行った。曲線はそれぞれの濃度におけるセンサーグラムを表し、上からEGFP濃度30nM, 20nM, 15nM, 10nM, 5nMの場合に得られたセンサーグラムである。解析は1:1 (Langmuir) bindingモデル式を用いたグローバルフィッティングを独立に3回行った。

0.54±0.05nMであった(図4(B))。

FCS測定により求めた $K_d$ を、BIAcore測定から得られた $K_d$ と比較した。BIAcore測定により得られた $K_d$ は1.5±0.03nMであった(図5)。同じ抗体であるが、FCS測定から得られた $K_d$ の方がBIAcore測定から得られた $K_d$ よりも小さくなった。これは、FCS測定による $K_d$ 算出は均一な溶液系で行ったのに対して、BIAcore測定で

は抗体をセンサーチップ上に固定化した不均一な系で行ったことによる影響と考えられる。

### 3.4 FCSによる検体検出

抗原抗体反応を利用してFCSによる検体検出を行った。EGFPを検出試薬、抗GFP抗体を検体とみなして、FCSによる検体検出の下限値を検討した。濃度10nM(図6(A))、1nM(図6(B))

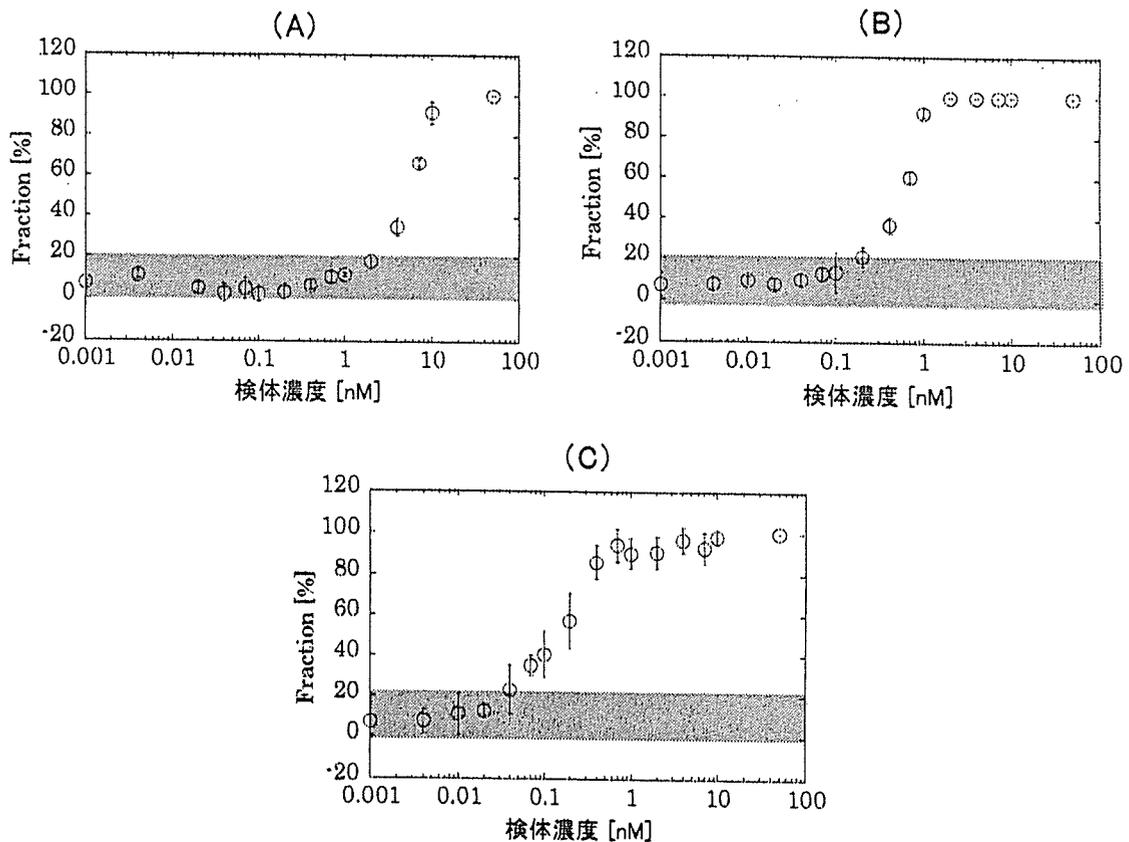


図6 2成分モデル解析を行ったFCSによる検体検出の結果

(A), (B)および(C)はそれぞれ10nM, 1nMおよび0.1nMのEGFPを用いた場合の検体検出の結果を示す。網掛け部分はEGFPを認識しない抗体とEGFPとを反応させた時に得られた複合体のFraction値(バックグラウンド値)の3倍の領域を示す。この領域よりFraction値が高い場合について検体検出できていると判断した。

および0.1nM(図6(C))のEGFPを用いて濃度50~0.01nMの抗GFP抗体をFCSにより検出した結果を図6に示した。

結果は、EGFP濃度が10, 1および0.1nMの場合に、それぞれ濃度3, 0.3および0.05nMまで検体検出が可能であった。これにより、EGFP濃度を下げることによって、より低い濃度の検体を検出できることが分かった。これは、溶液中に存在するEGFP単独体の濃度に対して、EGFP-Abの濃度が相対的に大きくなったためである。つまりFCS測定を用いた検体検出では、検出試薬の濃度を下げることによって検出感度を向上させ得ることが分かった。

### 3.5 蛍光相互相関分光法による検体検出

検出試薬の濃度を下げる方法以外に検体を高感度に検出し得る方法として蛍光相互相関分光法(Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy; FCCS)<sup>6, 11, 12)</sup>を用いた検体検出を試みた。FCS測定が1色の蛍光色素を用いるのに対し、FCCS測定では2色の蛍光色素を用いる。詳しい原理はここでは割愛するが、FCS測定の場合は分子の大きさに依存した分子の「動きやすさ」を測定したが、FCCS測定では分子間の相互作用を直接検出する。FCCS測定でも微小な領域を観察して蛍光強度の揺らぎを検出することは同じだが、色の異なる2種類の蛍光分子の揺らぎの「同時性」を解析する点で異なる。2色の蛍光分子が「別々」

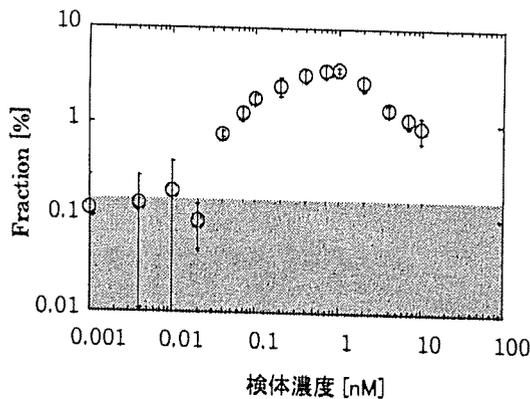


図7 FCCS 法による検体検出

横軸には抗 GFP 抗体 (検体) の濃度を、縦軸には全蛍光分子中に占める EGFP-Ab-Fab647 の Fraction を示す。網掛け部分は EGFP を認識しない抗体を用いた時に得られる Fraction の範囲を示す。この領域より Fraction 値が高い場合について検体検出できていると判断した。

に動いている場合は 2 つの揺らぎに相関はないが、それらの分子が直接的にまたは別の分子を介して間接的に結合して「同時」に動く場合には 2 つの揺らぎに相関が生じる。FCCS 測定では相関のあったシグナルだけを取り出し、得られたシグナルを解析するため、相互作用していない分子からのシグナルを取り除くことができる。

今回行った FCCS 測定による検体検出では、先程まで使用していた EGFP と抗 GFP 抗体 (検体) に加えて、さらに別の色で標識化した抗 GFP 抗体を認識する抗体断片 (Fab647) の 3 種類を合わせて用いた。FCCS で検出する分子は、EGFP、抗 GFP 抗体および Fab647 の 3 種類の分子が結合した 3 重合体 (以下、EGFP-Ab-Fab647) である。濃度 1 nM の EGFP および 1 nM の Fab647 を用いて、濃度 10~0.001 nM の抗 GFP 抗体を検討した結果を図 7 に示した。

検体濃度が上昇するに従って EGFP-Ab-Fab647 の Fraction が上昇するのがみとれる。また検体濃度が 1 nM を超えた辺りから EGFP-Ab-Fab647 の割合が減少しているのが分かる。これは、EGFP-Ab-Fab647 の中心に位置する検体 (抗 GFP 抗体) がそれぞれの検出試薬 (EGFP および Fab647) よりも多くなることで、EGFP-

Ab あるいは Ab-Fab647 といった複合体を形成する割合が高くなり、逆に EGFP-Ab-Fab647 を形成する割合が減るためと考えられる。濃度 1 nM の EGFP および 1 nM の Fab647 を用いた場合、検体濃度 40 pM まで検体を検出できている。これは同じ濃度の検出試薬 (1 nM の EGFP) を用いた FCS 法による検体検出の場合 (300 pM, 図 6 (B) を参照) よりも約 1 オーダー感度が高い。

濃度 0.1 nM の EGFP と 0.1 nM の Fab647 を用いた場合の検体検出限界は 4 pM であった。このことから、FCCS の場合も FCS と同様に検出試薬の濃度を下げることで感度を上げ得ることが分かった。

#### 4. おわりに

本稿では、EGFP と抗 GFP 抗体との抗原抗体反応を用いた FCS 測定による抗原抗体反応解析および検体検出を主に紹介したが、これらの解析は EGFP と抗 GFP 抗体との抗原抗体反応に限定されるものではなく、他の抗原抗体反応を用いても実施可能である<sup>11)</sup>。実際に、FCS とほぼ同じ装置を用いて、1 分子あたりの蛍光強度変化から神経変性疾患であるクロイツフェルト・ヤコブ病やアルツハイマー病の原因物質であるプリオンタンパク質や  $\beta$ -アミロイドタンパク質の凝集状態を解析した報告が既になされている<sup>13, 14)</sup>。筆者らもまた、科学技術振興機構のプロジェクトにおいて FCS 測定を用いて迅速かつ高感度に神経変性疾患の一つ、BSE の原因物質である病原性変異性タンパク質プリオンを自動検出する系、「高感度ハイスループット BSE 検出系」の構築を試みている。

FCS は抗体や抗原を固定せず自然な状態で測定できるため、抗体を用いた薬や治療を行うときの抗体の力価というものを測定する場合にも有用である。加えて、分子の「大きさ」や「数」といった実にシンプルで基本的な物理量を測定する手法であるため、本稿で紹介したような特定の研究目的に限定されず、研究者のアイディア次第で様々な研究に応用可能であろう。しかしながら、FCS

測定する際に注意していただきたいのは蛍光分子の標識化である。今回用いた EGFP はそれ自体が強い蛍光を発するタンパク質であるため蛍光分子の標識化を要しなかったが、通常は抗原、抗体またはその他の分子のいずれかに蛍光分子を標識化しなければならない。このため、分子それ自体の性質が標識化によって変化しないよう注意しなければならない。

今回紹介した研究の一部は、北海道大学大学院薬学研究所・稲垣冬彦教授の研究室で行われたものであることを記すとともに感謝の意を表します。また、同研究所の森岡弘志先生には BIAcore 測定その他につき様々なご指導を頂きました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Ehrenberg, M., Rigler, R., *Chem. Phys.*, 4, 390-401 (1974)
- 2) Elson, E. L., Magde, D., *Biopolymers*, 13, 1-27 (1974)
- 3) Koppel, D. E., *Physical Rev. A*, 10, 1938-1945 (1974)
- 4) Thompson, N., in *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (ed. Lakowicz, J. R.), 1, pp.337-378, Plenum Press, New York and London (1991)
- 5) R. Rigler, E. S. Elson (Eds.), *Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and Applications*, Springer, Berlin (2001)
- 6) 金城政孝, 蛋白質・核酸・酵素, 44, No.9 (1999)
- 7) 武者利光, ブルーバックスーゆらぎの世界, 講談社 (1980)
- 8) D. アイゼンバーグ, D. クローサーズ著, 西本吉助・影本彰弘訳, 生命科学のための物理化学 (下), pp. 596-600, 培風館 (1988)
- 9) 日野幹雄, スペクトル解析, pp.25-39, 朝倉書店 (1977)
- 10) S. Y. Tetin *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 307, 84-91 (2002)
- 11) Z. Földes-Papp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11509-11514 (2001)
- 12) Takagi, T. *et al.*, *Curr. Pharm. Biotech.*, in press
- 13) M. アイゲン, 日経サイエンス 1月号, pp.68-77 (2002)
- 14) M. Pitschke *et al.*, *Nature Medicine*, 4, No.7, 832-834 (1998)

## パーキンソン病モデルサルへの ES 細胞由来神経幹細胞の移植

*Transplantation of neural stem cells derived from embryonic stem cells in a primate model of Parkinson's disease*

### Keywords

パーキンソン病

ES 細胞

霊長類

ドパミン→用語解説 158 頁

PET

村松 慎一

自治医科大学内科学講座神経内科学部門

### Summary

Neural transplantation, as a treatment for advanced Parkinson's disease (PD), has been studied for more than a decade with the aim of replacing degenerated dopamine (DA) neurons. In some open-labeled clinical studies, fetal midbrain cells relieved motor symptoms when implanted in PD patients. However, in double-blind trials, the benefits were small and bothersome off-medication dyskinesias were observed in some patients. Progressive embryonic stem (ES) cell research has raised hopes of creating novel cell replacement therapies for PD. Neuronal stem cells (NSCs) were generated efficiently by cultivating cynomolgus monkey ES cells in astrocyte-conditioned medium under free-floating conditions. Transplantation of these NSCs into the putamen of cynomolgus monkeys treated with MPTP, a selective toxin for midbrain DA neurons, restored striatal DA functions. This may indicate that ES cells are suitable donor cells for humans. Further research is necessary to avoid adverse effects such as teratoma formation and dyskinesias, and to control multisystem degenerations.

Muramatsu, Shin-ichi

Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical School

E-mail : muramats@jichi.ac.jp

### パーキンソン病

パーキンソン病は、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。欧米を中心に、すでに 350 例以上の胎児脳細胞の移植が行われており、再生医学研究において新しい発見や技術開発が報告されるたびに臨床応用の有力な候補としてあげられてきた。

パーキンソン病では、線条体(被殻と尾状核)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するが、その詳細な機序は明らかではない。一部の家族性パーキンソン病については、 $\alpha$ -synuclein, Parkin, DJ-1, NR4A2 (NURR1), UCH-L1, PINK1<sup>1)</sup> などの遺伝子変異が判明し、精力的に研究が進められている。しかし、大部分を占める散在性のパーキンソン病で

は単一遺伝子の異常は見い出されず、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。そのため、現時点では根本的な治療法はない。

パーキンソン病の運動機能障害は、線条体におけるドーパミンの欠乏によると考えられており、線条体のドーパミン濃度が正常の20%程度に低下すると症状が発現する。淡蒼球や黒質網様部へ投射する線条体の神経細胞は脱落せず、それらに存在するドーパミン受容体の機能は保たれているので、ドーパミンを補充することにより運動機能の改善が期待できる。現行の薬物治療の目標は、線条体におけるドーパミンの補充である。血液脳関門を通過しにくいドーパミンに代わり、その前駆物質であるL-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)の製剤が使用され、少なくとも病初期には著効を示す。しかし、進行したパーキンソン病ではドーパミン神経終末の変性脱落が著しく、L-dopaをドー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、ドーパミンへの変換が十分行われなくなる。また、ドーパミンの貯蔵も困難となる。症状の改善を得るためには高用量のL-dopaを投与する必要が生じ、血中濃度の変動に伴い運動症状の急激な悪化や不随意運動が生じる。さらに、線条体だけでなく前頭葉などのドーパミン受容体が刺激されるため精神症状もみられる。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。また、高用量ではL-dopaと同様の不随意運動や精神症状を生じる。このように、薬物治療には限界がある。

パーキンソン病では、L-dopaが臨床応用される以前には、線条体の出力を伝える淡蒼球または視床を電気凝固により破壊する脳定位手術が行われてきた。最近では、破壊手術に代わり視床下核の深部脳刺激 (deep brain stimulation: DBS)が行われている。DBSはL-dopaの投与量を減らし、副作用を少なくする効果があるため有力な治療手段であるが、L-dopa治療に置き換わるものではない。

### 胎児脳細胞移植の現状

神経毒により黒質ドーパミン神経細胞を脱落させたパーキンソン病モデルラットの線条体へ、ラット胎仔中脳のドーパミン神経細胞を移植すると異常運動が改善したという1970年代後半の基礎実験に端を発し、1980年代以降スウェーデンのグループを中心に、人工中絶した胎児の中脳細胞をパーキンソン病患者の線条体に移植する治療が推進されてきた。移植後10年を経て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など<sup>2)</sup>、移植の有効性が強調された。しかし、これらの報告のほとんどは対照のないopen studyであった。そこで、米国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とい

う侵襲的な二重盲検試験が2つ行われた。いずれの試験でも移植群において、positron emission tomography (PET)によりドーパミン合成を反映するF-18 fluorodopaの取り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ている。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。最初の試験では、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>3)</sup>。また、二番目の試験では、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>4)</sup>。問題になったのは、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 dyskinesiasあるいはrun-away dyskinesias)が出現したことである。その出現機序としては、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。これらの結果から、二番目の試験を行ったOlanowらは、現時点では胎児細胞移植は推奨できないとしている。しかし、一番目の試験を行った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>5)</sup>、対象患者の選択 (L-dopaによく反応し、不随意運動のない状態が望ましいという)を行えば、よりよい結果が期待できるとしている<sup>6)</sup>。免疫抑制剤の使用法 (Freedらは不必要と

いい、Olanowらはcyclosporineを中絶したために拒絶反応が生じた可能性を指摘している)や移植細胞の培養法(Freedらは移植までに数週間培養している)など、手技上の争点について、今後も引き続き検討が必要である。また、移植後の不随意運動は不可避なものなのか、臨床応用を推進する前に明らかにしなくてはならない。

## ES細胞の応用

胎児脳細胞の移植が世界の限られた施設でしか行われてこなかった理由として、胎児組織の利用に伴う倫理的問題に加え、移植細胞の生着率が5～10%と低いので、1人の患者を治療するために4～5体の中脳組織を必要とするというドナー不足の問題があげられる。そこで、胎児細胞に代わる移植用細胞が探求されてきた。未分化な状態のままほぼ無制限に継代し増殖させることができ、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細胞は、以前から遺伝子改変動物の作製をはじめとした基礎研究に使用されてきたが、1998年にヒトのES細胞株が樹立されるに至り、再生医学への応用が現実的な研究テーマとして注目を集めることとなった。

### 1. 霊長類ES細胞

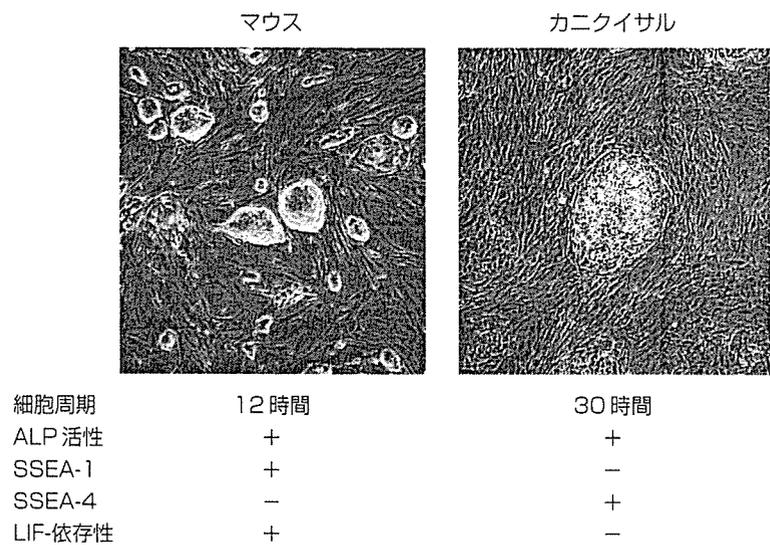
これまでES細胞を使用した移植研究は、マウスのES細胞を使用して行われてきた。しかし、マウスのES細胞と霊長類のES細胞では、形態や表

面抗原の相違だけでなく、いくつかの重要な性質が異なる(図1)。たとえば、マウスのES細胞に対しては、未分化状態を維持するために白血病阻害因子(leukemia inhibitory factor: LIF)が有効であるが、カニクイサルやヒトのES細胞には、無効である。また、電気穿孔法やウイルスベクターによる外来遺伝子の導入もマウスのES細胞のほうが、霊長類のES細胞よりも容易である。今後、ヒトへの臨床応用を目的とした研究には、霊長類のES細胞を使用することが望ましい。

### 2. ドパミン神経細胞の分化誘導

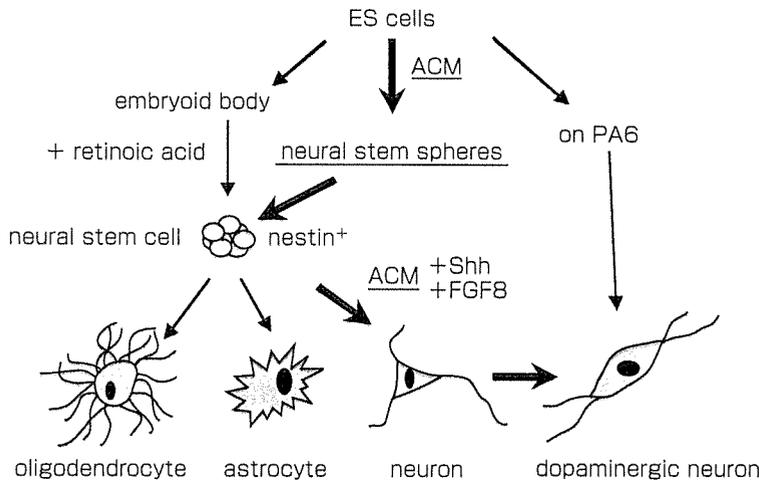
マウスES細胞を未分化な状態のままパーキンソン病モデルラットの線条

体に移植すると、少なくとも一部はド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>7)</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パミン神経細胞を分化させる方法が模索されている。最も標準的な方法として、未分化なES細胞を非附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 (Shh-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



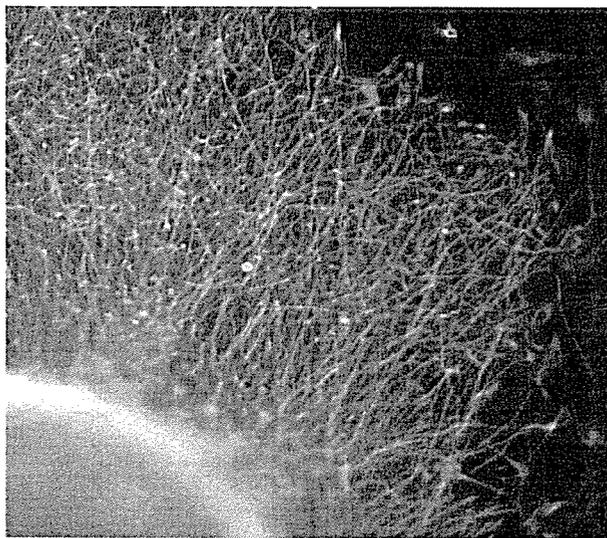
マウス線維芽細胞のフィーダー上のES細胞のコロニーを示す。  
ALP: alkaline phosphatase, SSEA: stage specific embryonic antigen, LIF: leukemia inhibitory factor

図1 マウスES細胞とカニクイサルES細胞の相違



ES細胞から神経細胞への分化誘導法には、胚様体(embryoid body)を形成する方法、骨髄間質細胞(PA6)と共培養する方法、アストロサイトの条件培地(ACM)中で浮遊培養することにより、神経幹細胞を含むneural stem sphereを誘導する方法がある。

図2 ES細胞から神経細胞への分化誘導



Nestin(緑)およびMAP2(赤)抗体による蛍光染色。  
付着させたneural stem sphere(左)周辺の神経幹細胞から神経細胞が分化してくる。

図3 カニクイサルES細胞から分化した神経細胞(→巻頭Color Gravure参照)

ちおよそ1/4がドパミン細胞に分化する<sup>9)</sup>。また、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>10)</sup>。最近、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開発された<sup>10)</sup>。この方法では、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neural stem 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%をドパミン細胞に誘導することが可能である(図2, 3)。

### 3. モデルサルへの移植

治療実験には適切なモデル動物が必要となる。カニクイサルに、黒質のドパミン細胞を選択的に破壊する神経毒である1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)を慢性的に投与することにより、振戦、無動・寡動、筋強剛、動作緩慢など、ヒトのパーキンソン病と同様の運動症状を示すモデル動物を作製することができる。私たちは、このモデルサルに、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。まず、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サルの

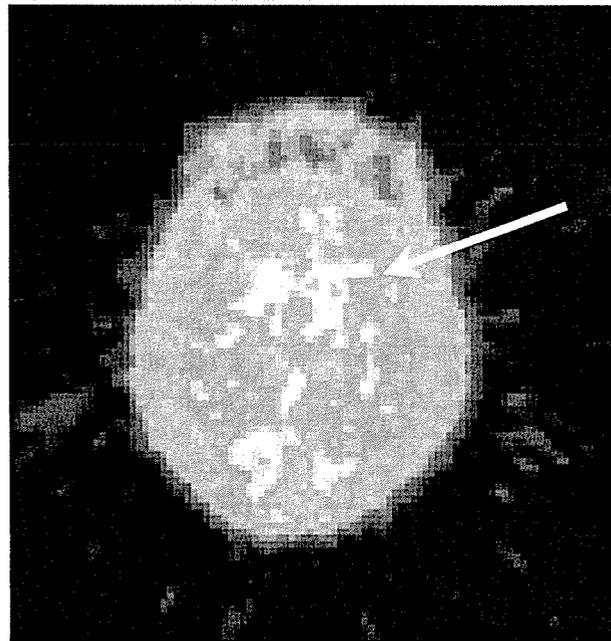
ES細胞から神経幹細胞を分化誘導した。この方法では、FACS (fluorescence activated cell sorter) や磁気ビーズによる分離を行わなくても、未分化なES細胞やフィーダー細胞の混入がほとんどない神経幹細胞を大量に調整できる。 $10^5 \sim 10^7$ の神経幹細胞をMPTPサルの片側の被殻へ移植した。移植前後のPETによる解析の結果、ドパミンの前駆物質である $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]$ L-dopaとドパミントランスポーターのリガンドである $\beta\text{-CFT}$ の取り込みの増加を認めた(図4)。さらに、メトアンフェタミン投与により移植側の被殻でドパミンの放出が促進されることが、ドパミン受容体のリガンドである $^{11}\text{C}$ -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パミン機能が回復したことが明らかとなった。移植3ヵ月後の脳組織切片では、移植側の被殻に移植細胞(宿主細胞と区別するためGFP遺伝子を導入してある)由来のドパミン神経細胞が観察された。ヒトの胎児脳細胞移植の臨床試験と同様に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。

### 今後の課題

現在、パーキンソン病の細胞移植のほとんどは線条体に対して行われている。厳密に正常の状態に修復することを目指すのであれば、黒質緻密部にドパミン神経細胞を移植して線条体までの投射線維も元通りに再生させること

が必要となる。しかし、黒質緻密部のドパミン神経細胞は均一ではないし、投射の局在まで含めて再構築することは困難であろう。仮に黒質緻密部のドパミン神経細胞と同じ性質の細胞を分化誘導できたとしても、それらの細胞を移植した場合にはパーキンソン病的過程に巻き込まれて再び変性してしまう可能性も考えられる。当面は、線条体におけるドパミンの補充が主な目標となるが、その場合には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との優劣を比較検討する必要がある<sup>11)</sup>。細胞移植では、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、黒質ドパミン神経の変性ではなく、線条体の細胞の脱落によりパーキンソン病と同様の症状を示すパーキンソン症候群にも適応があるかもしれない。その場合、移植するのは、ドパミン神経細胞ではなくGABAを伝達物質とする神経細胞である。さらに、うつ状態、痴呆など黒質



選択的神経毒であるMPTPを慢性投与して作製したパーキンソン病モデルサルの片側の被殻に、カニグイサルES細胞由来の神経幹細胞を移植した。4週間後の $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]$ L-dopaによるPET画像を示す。移植側で $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]$ L-dopaの取り込みの増加が認められる(矢印)。

図4 移植4週間後のPET画像(→巻頭Color Gravure参照)

線条体系以外の障害に対する治療も考慮しなくてはならない<sup>12)</sup>。

ES細胞では、奇形腫の発生を防ぐ技術開発が必要になる。未分化な細胞を確実に排除する選択方法や、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が検討されている。胎児脳細胞移植の知見から拒絶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、正常ヒト由来のドーパミン神経細胞よりもパーキンソン病の変性機序に侵されやすい可能性も考えられる。

日本国内でもヒトのES細胞が樹立され、パーキンソン病の移植治療に対する期待が高まっている。今後、サルモデルを使用してさらに検討を続けたい。

#### 謝 辞

本稿で紹介したMPTPサルの実験は、自治医科大学神経内科(永田三保子、滝野直美、奈良優子、古寺美加、中野今治)、横浜市立大学生化学Ⅰ(中山 孝、井上順雄)、浜松ホトニクス(垣内岳春、福本 大、原田典弘、西

山新吾、塚田秀夫)、筑波霊長類センター(小野文子、土田順子、寺尾恵治)、田辺製薬先端医学研究所(鈴木 豊、小西奈依、近藤 靖、仁藤新治)との共同研究で行われたもので、ここに感謝致します。

#### ●文 献

- 1) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al: Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science* 304 : 1158-1160, 2004
- 2) Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, et al: Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2 : 1137-1140, 1999
- 3) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344 : 710-719, 2001
- 4) Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, et al: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54 : 403-414, 2003
- 5) Gordon PH, Yu Q, Qualls C, et al: Reaction time and movement time after embryonic cell implantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* 61 : 858-861, 2004
- 6) Freed CR, Breeze RE, Fahn S, et al: Preoperative response to levodopa is the best predictor of transplant outcome. *Ann Neurol* 55 : 896 ; author reply 896-897, 2004
- 7) Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al: Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 2344-2349, 2002
- 8) Lee SH, Lumelsky N, Studer L, et al: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18 : 675-679, 2000
- 9) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 1580-1585, 2002
- 10) Nakayama T, Momoki-Soga T, Yamaguchi K, et al: Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells. *Neuroreport* 15 : 487-491, 2004
- 11) Muramatsu S, Wang L, Ikeguchi K, et al: Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 55 : 205-222, 2003
- 12) Lang AE, Obeso JA: Time to move beyond nigrostriatal dopamine deficiency in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55 : 761-765, 2004

日本臨牀 第62巻・第9号（平成16年9月号）別刷

特集：パーキンソン病

## 遺伝子治療

村松 慎一

## 圖文 獻

- 1) Piccini P, et al: Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2(12): 1137-1140, 1999.
- 2) Freed CR, et al: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719, 2001.
- 3) Olanow CW, et al: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 403-414, 2003.
- 4) Itakura T, et al: Autotransplantation of superior cervical ganglion into the brain. A possible therapy for Parkinson's disease. *J Neurosurg* 68(6): 955-959, 1988.
- 5) Date I, et al: Cografting with polymer-encapsulated human nerve growth factor-secreting cells and chromaffin cell survival and behavioral recover in hemiparkinsonian rats. *J Neurosurg* 84(6): 1006-1012, 1996.
- 6) Nagata M, et al: Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J Gene Med* 5: 921-928, 2003.
- 7) Martin G: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634-7638, 1981.
- 8) Evans MJ, Kaufmann MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.
- 9) Thomson JA: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
- 10) Lee SH, et al: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18: 675-679, 2000.
- 11) Kawasaki H, et al: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31-40, 2000.
- 12) Nakayama T, et al: Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells. *Neuroreport* 15(3): 487-491, 2004.
- 13) Freed CR: Will embryonic stem cells be a useful source of dopamine neurons for transplantation into patients with Parkinson's disease? *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1755-1757, 2002.
- 14) Kim JH, et al: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418(6893): 50-56, 2002.
- 15) Hwang WS, et al: Evidence of pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, Epub 2004 Feb 12.

## 遺伝子治療

村松 慎一

### Gene therapy for Parkinson's disease

Shin-ichi Muramatsu

Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical School

#### Abstract

Recent advances in gene transfer methods, especially development of a high titer recombinant adeno-associated viral (AAV) vector, are making gene therapy for Parkinson's disease (PD) a feasible therapeutic option in the clinical arena. Efficient and long-term expression of genes for dopamine (DA)-synthesizing enzymes in the striatum restored local DA production and allowed behavioral recovery in animal models of PD. Moreover, sustained expression of a glial cell line-derived neurotrophic factor gene in the striatum rescued nigral neurons and led to functional recovery in a rat model of PD, even when treatment was delayed until after the onset of progressive degeneration. A clinical trial to evaluate the efficacy of subthalamic transduction to produce inhibitory transmitters is underway.

**Key words:** Parkinson's disease, gene therapy, adeno-associated virus, dopamine

#### はじめに

遺伝子治療や細胞移植などの先端医学の研究対象として、パーキンソン病は多くの中枢神経疾患の中でも第一にあげられることが多い。その理由としては、①線条体に投射する中脳黒質緻密部のドーパミン細胞の変性が主な病変であり、脳の広範な領域が障害されるアルツハイマー病などの疾患に比べて目標を絞れること、②胎児脳細胞の移植、淡蒼球あるいは視床の破壊、視床下核の電気刺激などの定位脳手術が既に臨床応用され手技が確立していること、③線条体は解剖学的に他の脳組織から区別しやすくアプローチしやすいこと、④黒質線条体路を選

択的に傷害する神経毒を使用することにより、運動障害を呈するモデル動物を作製し、治療効果と安全性を検証する前臨床試験ができること、などがある。最近の遺伝子導入技術の進歩、特に高力価アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターの開発により、霊長類の脳内の神経細胞に効率良く治療用遺伝子を導入し、長期間発現させることが可能になった。AAV ベクターを使用したパーキンソン病の遺伝子治療は、動物実験における好結果を踏まえて臨床試験の段階に進もうとしている<sup>1)</sup>。

#### I. AAV ベクター

遺伝子治療では、治療用の遺伝子を効率良く

目的の細胞に導入し長期間発現させる技術が鍵となる。ウイルスを改変したベクターを利用する方法が優れており、これまで AAV のほかにアデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス(オンコレトロウイルスとレンチウイルス)などに由来するベクターが開発されている。このうち、オンコレトロウイルスベクターでは、非分裂細胞には遺伝子導入できないため、神経細胞を目標とした治療には適さない。また、アデノウイルスベクターとヘルペスウイルスベクターは、免疫反応を惹起しやすく、導入した遺伝子の発現が短期間しか持続しないという難点がある。AAV ベクターとレンチウイルスベクターは、実験動物の脳で神経細胞に効率良く遺伝子を導入し、数年以上も発現させることが確かめられている。特に AAV はレンチウイルス(HIV など)と異なり、野生型のウイルスに元々明らかな病原性がないため、臨床応用に際しては最も有力と考えられる。

AAV は線状の一本鎖 DNA をもつ *Parvovirus* である。成人の多くには不顕性感染しており、大多数では episomal concatemer として存在するが、少数はウイルスの塩基配列の一部と相同性の高い配列をもつ 19 番染色体の特定部位(S1 site)に組み込まれている。AAV の増殖には、アデノウイルスやヘルペスウイルスの機能(ヘルパー機能)が必要で、アデノウイルスの感染に際して AAV も活性化し増殖すると考えられている。霊長類の AAV には多くの型が分離されているが、遺伝子治療用ベクターとしては、最初に塩基配列が決定され研究も進んでいる 2 型の AAV(AAV-2)が使用されることが多い。AAV-2 では約 4.7kb のゲノム DNA の両端に特徴的なヘアピン構造(inverted terminal repeats)があり、その間に非構造蛋白である Rep と外被蛋白である VP をコードする領域が存在する。遺伝子治療用の組換え AAV ベクターを作製する際には、Rep と VP をコードする部分を切り出して、その代わりに目的とする遺伝子をプロモーターと poly A 配列の間に挟んで組み入れる。AAV ベクターには、ウイルスゲノムサイズの制約から約 4kb 以上の大きさの遺伝子は組み込めないが、

1つの細胞に2種類以上の AAV ベクターを同時に感染させることにより、複数の遺伝子を発現させることが可能である。

## II. 線条体におけるドパミン合成の回復

パーキンソン病の大部分では環境因子を含む複雑な要因が発症に関与すると推定されており、単一の遺伝子異常は明らかではない。そのため、現時点における遺伝子治療の目標は、遺伝子変異を修復することではなく、外来遺伝子の導入により障害された機能を補充し進行を少しでも遅らせることにある。

パーキンソン病の主症状である運動障害は、線条体におけるドパミンの欠乏と関連して生じ、線条体内のドパミン濃度を上げることにより軽減する。ドパミンの前駆物質である L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) を服用することで病初期には著効が得られる。経口投与された L-dopa は、線条体において黒質ドパミン神経細胞からの神経終末に存在する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(aromatic L-amino acid decarboxylase: AADC)によりドパミンに変換される(図 1)、しかし、進行したパーキンソン病では、ドパミン神経終末の変性脱落が著しく AADC の活性が低下しているため、L-dopa からドパミンへの変換が障害される。症状の改善を得るには高用量の L-dopa を頻回に投与することになり、血中濃度の変動に伴う不随意運動や、前頭葉に存在するドパミン受容体への作用による幻覚などの副作用が生じる。

そこで、AADC の遺伝子を線条体内に導入し酵素活性を回復し、再び L-dopa の効果が得られるようにする遺伝子治療が考えられる<sup>2)</sup>(図 2)。この方法では、L-dopa の服用を継続する必要があるが、L-dopa の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。将来的には、線条体内で L-dopa を合成するのに必要となるチロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH) と、TH の補酵素として働くテトラヒドロピオプテリン(BH4)を合成する際の律速酵素である GTP cyclohydrolase I (GCH) の遺伝子も導入することにより、L-dopa の内服を

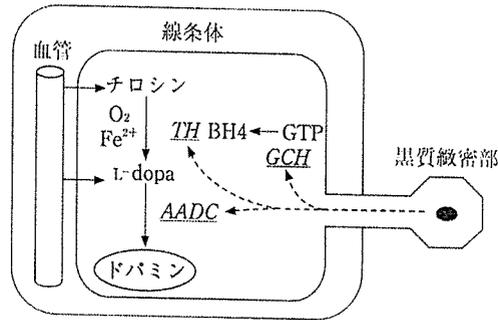
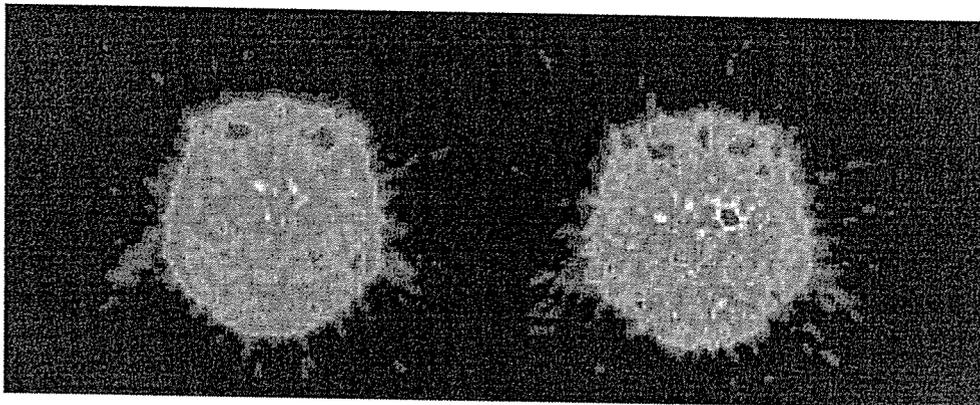


図1 線条体におけるドパミンの合成

経口投与されたL-dopaは、線条体において血液脳関門を通過し、黒質緻密部神経細胞からの軸索終末に存在する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)により、ドパミンに変換される。進行期のパーキンソン病ではこの神経終末の脱落が著しく、AADCの活性が低下している。そこで、AADCの遺伝子を発現させる遺伝子治療が考えられる。将来的には、チロシン水酸化酵素(TH)とTHの補酵素となるテトラヒドロbioptリン(BH4)合成に必要なGTP cyclohydrolase I(GCH)の遺伝子も導入してL-dopaの服用を不要にする方法が望まれる。



遺伝子治療前

12週間後

図2 AADCの遺伝子を導入したモデルサルでの $[^{14}\text{C}]$ L-dopa PET画像

カニクイサルに神経毒1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)を慢性投与し、選択的に黒質のドパミン細胞を脱落させてパーキンソン病のモデルサルを作製した。その後、左側の被殻(図では右)に、AAVベクターによりAADCの遺伝子を導入した。線条体における $[^{14}\text{C}]$ L-dopaの取り込みは、遺伝子導入前には両側とも著しく低下しているが、治療12週間後には導入側で回復している(浜松ホトニクス、自治医科大学遺伝子治療、筑波霊長類センターとの共同研究による)。

不要とする遺伝子治療が望まれる。TH, AADC, GCHの3種類の酵素の遺伝子を線条体内で発現させる遺伝子治療は、選択的神経毒により黒質線条体路を破壊したパーキンソン病モデル動物を使用した実験で、その効果が確認されており期待できる。

パーキンソン病では、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、痴呆、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。これらに対しては、線条体へのドパミン合成系酵素の遺伝子導入のみでは不十分で、より広範な遺伝子導入が必要かもしれない。しかし、ドパミン合成の回復により運動障害を治療することで、ADLの著しい改善が期待できる。現在、AAVベ

クターを使用してAADCの遺伝子を導入する臨床試験が自治医大と米国のUCSFで計画されている。

### III. 神経栄養因子による細胞保護

パーキンソン病の遺伝子治療の第二の方法としては、神経保護作用のある物質を脳内に持続的に供給する遺伝子治療が考えられる。パーキンソン病における黒質ドパミン神経細胞の選択的な変性機序は十分解明されていないが、ミトコンドリア機能障害、フリーラジカル産生、アポトーシス、ミクログリア活性化など様々な要因が考えられており、それらにかかわる分子を利用した種々の変性抑制方法が考えられる。現在、最も有望なのは培養ドパミン神経細胞に対する強力な保護作用をもつ因子として単離されたglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)である。欧米で行われたGDNFを蛋白製剤として被殻に持続注入する第1相臨床試験では、運動障害の改善効果が認められた。しかし、この方法は高価であるとともに、注入用カテーテル留置に伴う位置ずれや感染などの合併症を生じる危険がある。そこで、線条体にGDNFの遺伝子を導入して持続的に発現させる遺伝子治療が考えられる。モデルラットの実験では、線条体への神経毒注入後、既に黒質線条体路の変性がある程度進行している状態でも、GDNFの遺伝子を搭載した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>9)</sup>。このことから、今後、PETなどによりパーキンソン病を早期に診断しGDNFの遺伝子を線条体に導入する遺伝子治療を行えば、症状の増悪を抑制できる可能性がある。

### IV. 視床下核の抑制

パーキンソン病では、視床下核の神経細胞の活動性が異常に亢進し、過剰な興奮性の出力を黒質網様部および淡蒼球内節に及ぼしている。定位脳手術により電極を視床下核に挿入し、高頻度刺激してその機能を抑制する深部脳刺激(deep brain stimulation: DBS)が行われるよう

になり、症状の改善が報告されている。この臨床経験に基づき、電気刺激の代わりに、抑制性伝達物質であるGABAの合成酵素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て、本来興奮性の出力を抑制性に変換する遺伝子治療が考えられた<sup>9)</sup>。視床下核は体積が小さく(140mm<sup>3</sup>、脳全体の0.02%)、神経細胞の数も約30万個と比較的少ないため、ごく少量のAAVベクターにより遺伝子導入が可能である。2003年8月には、米国でAAVベクターを使用して、この方法による臨床試験が開始された。しかし、視床下核の電気刺激が有効である機序は十分解明されているわけではなく、視床下核の過剰な興奮がGADの遺伝子導入後には過剰な抑制に代わる可能性や、視床下核内の機能局在により遺伝子導入の効果が異なる可能性も考えられる。サルの実験を行わずにラットの実験結果のみに基づいてヒトへの応用が行われたことについての批判もあり、臨床試験の結果が注目されている。

### V. 遺伝子発現の調節

これまでは、導入した遺伝子の発現をいかに高めるかということに研究の焦点があったが、今後は過剰な発現を抑制する技術開発が必要である。一つの例として、エストロゲン受容体のリガンド結合部位と、Creリコンビナーゼとの融合蛋白質CreER<sup>TM</sup>を応用したシステムを図3に示した。AAVベクターによってCreER<sup>TM</sup>を発現させると、合成エストロゲンであるタモキシフェンの存在下のみCreリコンビナーゼの活性を発揮して2つのloxP配列の間に挟まれた目的の塩基配列を切り出すことができる。ドパミン合成系の酵素TH、AADC、GCHをそれぞれ発現する3種類のAAVベクターのうち、THだけをloxP配列の中に挿入したベクターを作製し、AAV-CreER<sup>TM</sup>とともに使用すれば、万ドパミン産生が過剰になったときにはタモキシフェンを服用することにより、THの発現を抑制できる。その場合、AADCの活性は維持されるので、L-dopaを服用することによりドパミンの産生は可能である。

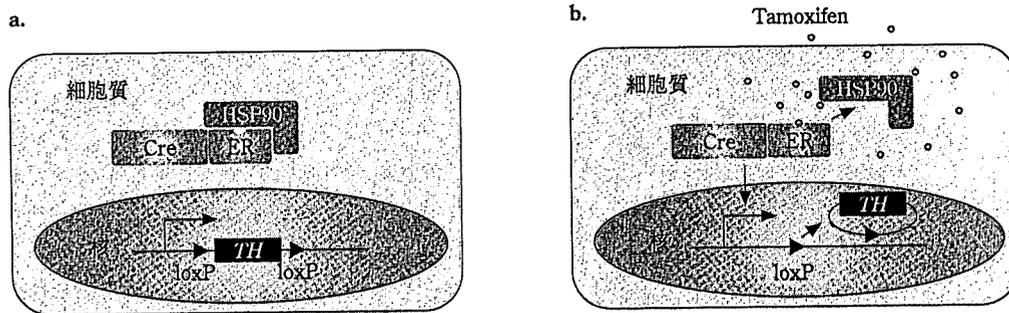


図3 AAV-CreER<sup>2</sup>によるTH遺伝子発現の抑制

改変したエストロゲン受容体のリガンド結合部位を Cre リコンビナーゼと融合した蛋白 CreER<sup>2</sup> による遺伝子発現の調節機構。

AAV ベクターにより発現した CreER<sup>2</sup> は、細胞質では HSP90 と結合して不活性な状態にあるが (a)、合成エストロゲンであるタモキシフェンの存在下では核内に移行し Cre リコンビナーゼの活性を発揮して、2つの loxP 配列の間に挟まれた目的の塩基配列 (この場合は TH) を切り出す (b) (IGBMC, Prof. Chambon らとの共同研究による)。

## VI. 今後の展望

遺伝子治療は、1990年に米国の国立衛生研究所 (NIH) において adenosine deaminase (ADA) 欠損症の小児に対して、末梢血のリンパ球にレトロウイルスベクターを使用して ADA 遺伝子を導入する世界初の試みが行われて以来、多くの期待を集めてきた。しかし、難治性の悪性腫瘍や先天性代謝異常症を主な対象としてきたこともあり、目立った成果はあげられていなかった。その間に、米国でアデノウイルスベクターを肝動脈内に投与したオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の青年が死亡した事例や、フ

ランスでレトロウイルスベクターによる X 連鎖重症複合免疫不全症の小児に対する遺伝子治療において白血病が発生した事例など、重篤な副作用が報告されている。これらの事例では、使用されたベクターや原疾患の特性による要因が大きいと考えられている。パーキンソン病に対する AAV ベクターによる遺伝子治療の安全性は高いと考えられるが、臨床応用に際しては注意が必要なおことは間違いない。

今後は、傷害された遺伝子そのものを修復する技術の開発や細胞移植との組み合わせなどが行われるものと期待される。

## 図文 献

- 1) Muramatsu S, et al: Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 55: 205-222, 2003.
- 2) 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* 164: 2-14, 2000.
- 3) 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.
- 4) Wang L, 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.
- 5) 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.

# 新規毒性物質「アミロスフェロイド」の形成と神経細胞死 ～アルツハイマー病発症における神経細胞死の解明に向けて～

星 美奈子

タンパク質は固有の三次構造を取ることで生理的機能を果たす。「異常構造タンパク質」の凝集と蓄積は、アルツハイマー病を初めとする多くの神経変性疾患に共通の病態であるばかりか、病因である可能性も高くなっている。しかし、個々の疾患において凝集体の構造もその作用機序もまだ充分解明されてはいない。 $\beta$ アミロイド ( $A\beta$ ) は、アルツハイマー病発症への引き金を引くと考えられているが、若年時から生理的ペプチドとして存在する  $A\beta$  が、老人の脳で神経毒を持つに至る物理化学的機構は未だ謎である。我々は、 $A\beta$  の神経細胞死活性と構造の問題に取り組み、化学合成した  $A\beta$  の水溶液を回転攪拌させることで、球状の会合体が形成されることを見いだした。10-15 nm のこの球状  $A\beta$  の毒性は線維の約 400 倍も強く、これを「アミロスフェロイド」と名付け、今回発見の経緯を報告する。

## はじめに

人は生まれた以上、いつかは死んでいく。しかし、誰しも「第2の人生」である老後を寝たきりで過ごしたくない。我が国は、高齢化社会から急速に超高齢化社会へと移行しつつあり、2050年には2.8人に1人が65歳以上という未曾有の事態に直面しようとしている(図1)。従って、「健やかに老いる」ということは、一人一人の問題であると同時に、社会全体にとって越えるべきハードルとなっ

た。特に、神経変性疾患は年々増加し、近い将来にがんや心疾患とならぶ主要な死因になると予測されている。従って、その代表であるアルツハイマー病の1日も早い新たな治療法の開発と臨床応用が望まれているが、発症機構の多くは未だ不明である。

筆者は「生体における高次な生命現象を物質(タンパク質)の物理化学的な変化で説明する」との視点で研究を行ってきた。そして、この何年間かは、アルツハイマー病の原因とされながらも未だ謎が多い $\beta$ アミロイド( $\beta$ -amyloid:  $A\beta$ )の神経細胞死機構の問題に取り組んでいる。そして先頃、研究の過程で見いだした新たな球状の構造体が非常に強い神経毒性を持つことから「アミロスフェロイド」(amylospheroid: ASPD)(図2)と名付け論文にまとめる機会を得た<sup>1)</sup>。そして、その論文が契機となり、研究者以外の方に自らの研究を語るという貴重な経験をすることとなった。その時以来、治療や予防ということを実際に考えた時、基礎研究としては具体的にはどこまでを明らかにすれば「わかった」と言えるのか、そして自らの研究はどこに位置しているのか、ということをししばしば思い巡らすようになった。そのことも踏まえつつ、本総説においては、アミロスフェロイド同定の経緯と今後の展望を簡単にまとめたと思う。

三菱化学生命科学研究所アルツハイマー病研究グループ  
発症機序解明チームリーダー/主任研究員(〒194-8511  
東京都町田市南大谷11号)

国立大学法人東京工業大学大学院生命理工学研究科生命  
情報専攻広域生命情報講座連携客員助教授

Morphology and neurotoxicity of newly identified  
spherical  $\beta$ -amyloid aggregates, 'amylospheroid', aim-  
ing at elucidation of the neurodegenerative cascades  
in Alzheimer's disease

Minako Hoshi, Ph.D., Leader (Unit of Neurodegenerative  
Disease, Mitsubishi Kagaku Institute of Life  
Sciences (MITILS), 11 Minamiooya, Machida, Tokyo  
194-8511, Japan)

Visiting Associate Professor, Faculty of Bioscience  
and Biotechnology, Department of Bioinformatics,  
Tokyo Institute of Technology