

研究課題別評価

1 研究課題名:小脳失調関連遺伝子の機能解明と治療に向けた標的遺伝子の導入技術開発

2 研究者氏名:平井 宏和

3 研究のねらい:

小脳は歩行などの複数の筋肉を使用する協調運動、スキーが上達するといった運動学習に重要な役割を果たしている。小脳に障害があるとスムーズな動作ができなくなり、平衡感覚も悪化するため日常生活にも大きな障害が生じる。小脳が障害される代表的な疾患として脊髄小脳変性症がある。小脳皮質には脳幹から2つの入力経路が存在し、最終的にプルキンエ細胞に情報が伝えられ処理される。プルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであり、プルキンエ細胞の活動が小脳の機能として反映される。したがって、小脳研究において、プルキンエ細胞の生理学的、病理学的性質を分子レベルから理解することは重要であり、そのためには外来遺伝子をプルキンエ細胞特異的に発現させる技術が必要である。ところが、*In vivo* のプルキンエ細胞への遺伝子導入・発現は極めて困難で、現在まで 5 本の論文しかなく(PubMed 検索による)、そのいずれもがプルキンエ細胞特異的でなく、遺伝子発現効率も十分とはいえない。そこで本研究では、ウイルスベクターを用いて、プルキンエ細胞に特異的かつ効率的に遺伝子導入する技術の確立を目的とした。さらにこの技術を、小脳失調関連遺伝子の機能解明および脊髄小脳変性症などの遺伝性小脳疾患に対する遺伝子治療として応用することを目指した。

4 研究成果:

近年、開発の進むアデノ随伴ウイルスベクターと HIV 由来レンチウイルスベクターを用いて小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入を目的として実験を行った。遺伝子発現マーカーとして GFP を用い、ウイルスベクターをマウスの小脳に接種した。7 日後に灌流固定して、小脳の薄切切片を作製し GFP の局在を観察した。アデノ随伴ウイルスに関しては、高力価のウイルスを得ることが困難で

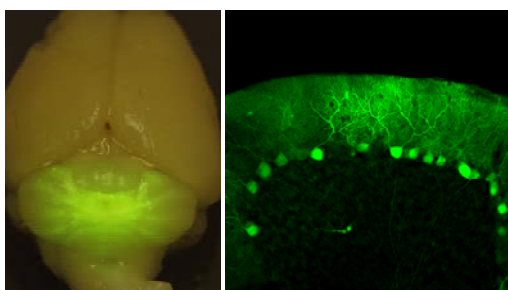


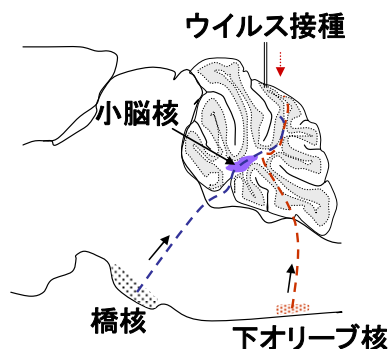
図1 レンチウイルスベクターを用いた小脳プルキンエ細胞への遺伝子発現

あり、最もよく遺伝子導入された小脳の小葉でも全プルキンエ細胞の 5~10%程度しか GFP 発現が見られなかった。これに対して、レンチウイルスベクターに関しては、 10^8 から 10^{10} (TU/ml)のオーダーの高力価ウイルスが得られ、プルキンエ細胞への GFP 発現効率もアデノ随伴ウイルスより著明に高かった(図 1:本課題の終盤で、確立したプロトコルで得られたデータ)。このようなことから、これ以降、レンチウイルスベクターを用いて研究を進めた。

1)レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種したときの遺伝子発現プロフィール

小脳には 5 種類の神経細胞、すなわち顆粒細胞、プルキンエ細胞と 3 種類の介在神経(星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞)が存在する。レンチウイルスベクターがどの細胞に親和性を持つかを検討した。GFP 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを小脳皮質に接種し、1 週間後に GFP の発現を観察したところ、プルキンエ細胞、3 種類の介在神経とバグマングリアに顕著な GFP 蛍光を認めた(プルキンエ細胞への親和性の詳細に関しては後述)。これに対して、顆粒細胞には蛍光を認めず、レンチウイルスベクターは顆粒細胞には極めて親和性が低いと考えられた。

次に、レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種したときに、小脳皮質以外の細胞に遺伝子発現が見られるかを検討した。小脳皮質は、橋核と下オリーブ核から投射を受ける(図 2)。また小脳皮質からの唯一の出力であるプルキンエ細胞は小脳核に投射する。アデノウイルスを小脳皮質に接種した場合は、軸索終末にウイルスが感染し逆行性に輸送された結果、橋核と下オリーブ核の細胞体に遺伝子発現が見られることが報告されている。本研究では、ウイルスベクターを小脳



皮質に接種し、小脳皮質外の GFP 発現を、GFP に対する抗体で染色し調べた。その結果、橋核、下オリーブ核、小脳核など小脳皮質外への発現は全く観察されなかった。このことから、小脳皮質に接種した HIV 由来レンチウイルスベクターによる遺伝子発現は、小脳皮質に限局することが明らかになった。この結果は、基礎研究と遺伝子治療の両方において、小脳皮質以外の遺伝子発現の影響や副作用を考慮する必要が無いことを示しており、今後レンチウイルスベクターが頻用されていくと考えられた。

図2 小脳皮質への入力と出力

2) レンチウイルスベクターの力価と小脳皮質における遺伝子発現の関係

独立した培養で得られた 31 バッチのウイルスベクターを① $10^8 \sim 10^9$ 、② $10^9 \sim 10^{10}$ 、③ 10^{10} TU/ml 以上の3つのカテゴリー(それぞれ 10 バッチ、10 バッチ、11 バッチ)にわけ、それぞれ 20 匹のマウス(計 60 匹)の小脳第 6 小葉に接種した。7 日後に灌流固定し小脳虫部の矢状断切片を作製、小脳の各小葉において、GFP が発現している面積(%)を求めた。その結果、第 6、第 7 小葉を中心に GFP の発現が見られ、ウイルス力価が高いほど広範囲に発現することがわかった(図 3)。 10^{10} TU/ml 以上の力価を持つウイルスベクターの接種では、第 6、第 7 小葉の 80%以上の領域に GFP の発現が認められ、さらに尾側の第 8、第 9 小葉にかけてもそれぞれ、55%、25%程度の領域に GFP 発現が認められた。この結果に基づき、ウイルスベクターの接種部位を工夫して 3 箇所を増やしたところ、小脳虫部の約 80%におよぶ広範囲で外来遺伝子を発現させることができた。

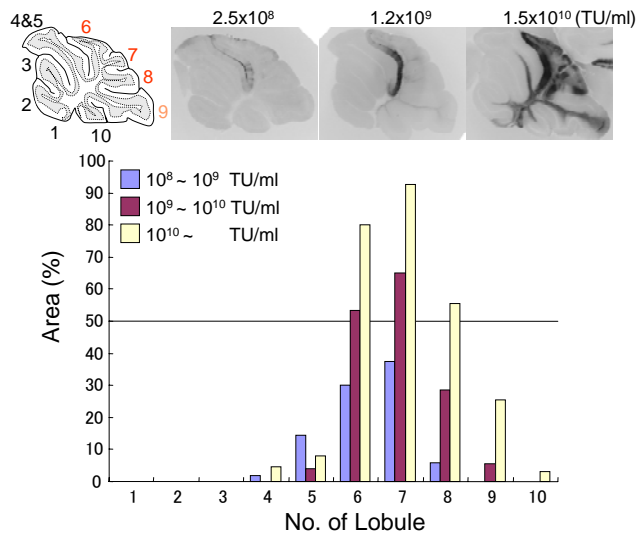


図3 ウイルスベクターの力価と小脳の遺伝子発現領域の関係

3) レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞への親和性に影響を与える因子

レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞に対する親和性は、ウイルスを産生する HEK293T 細胞の培養液の pH に依存することを発見した。pH7.2 の培養液から得られたウイルスを接種した小脳では、全 GFP 発現細胞のうち、約半分がプルキンエ細胞であった。これに対し、pH6.7-7.0 の培養液から得られたウイルスを用いた場合、全 GFP 発現細胞のうちプルキンエ細胞は 15%しか無く、80%近くがバークマングリア細胞であった。このようにウイルス産生時の培養液 pH のわずかな変化が、得られたレンチウイルスベクターのプルキンエ細胞への親和性を大きく変化させることが明らかとなった。さらに、この現象の詳細なメカニズムについてもすでに解明しており、レンチウイルスのプルキンエ細胞への親和性を上昇させる方法に関して、現在、特許出願の準備を進めている。

4) レンチウイルスベクターを用いた小脳星状細胞、籠細胞特異的遺伝子発現法の確立

前述のごとく、小脳には 5 種類の神経細胞が存在する。顆粒細胞、プルキンエ細胞と 3 種類の介在神経(星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞)である。介在神経は抑制性の神経で顆粒細胞とプルキンエ細胞の活動を抑制することから、小脳活動を微調整していると考えられている。しかし、顆粒細胞やプルキンエ細胞と比較し、介在神経の機能はあまり解明されていない。介在神経の働きと、小脳機能に果たす役割を遺伝子レベルから理解するには、介在神経特異的に外来遺伝子を発現させる技術が必要であるが、これまで介在神経特異的なプロモーターは知られていなかった。

本研究課題で、レンチウイルスベクターに組み込んだときに神経細胞に特異性を持つプロモーターを探索していたが、その過程で偶然、星状細胞と籠細胞に高い選択性を持つプロモーターを発見した(図 4)。このプロモーターを組み込んだレンチウイルスベクターを用いることにより、星状細胞と籠細胞の研究が進むことが期待される。

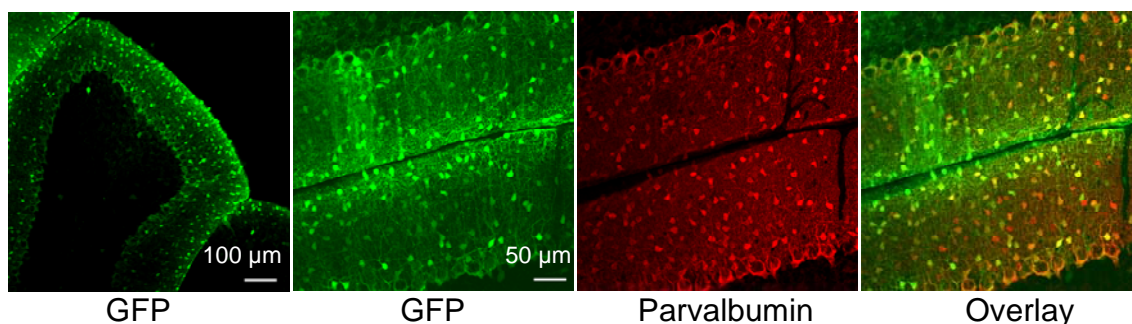


図4 レンチウイルスベクターを用いた星状細胞／籠細胞特異的な遺伝子導入

5) 小脳顆粒細胞で産生される糖蛋白質、Cbln1 の機能解明

Cbln1 は小脳顆粒細胞で作られ、顆粒細胞軸索(平行線維)終末より活動依存的に放出される。Cbln1 は 10 年以上前に発見されていたが、その機能は不明であった。そこで Cbln1 のノックアウトマウスを作出したところ、顕著な運動失調が観察された。電気生理学的には、① 平行線維－プルキンエ細胞シナプスの伝達障害、② 平行線維－プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象(LTD)の誘導障害、③ プルキンエ細胞上の余剰な登上線維シナプスの排除障害、が観察された。電顕では、平行線維－プルキンエ細胞シナプスの数が野生型の 2 割程度しか形成されていないことが明らかになった。これらの所見は平行線維－プルキンエ細胞シナプスのプルキンエ細胞側(ポスト)に発現する $\delta 2$ グルタミン酸受容体のノックアウトマウスと極めて類似の表現型であった。以上より、顆粒細胞で合成され平行線維終末より放出される Cbln1 は、プルキンエ細胞に作用し、 $\delta 2$ グルタミン酸受容体と最終的には重なるシグナル伝達経路をトリガーし、平行線維－プルキンエ細胞シナプスの形成と可塑性、さらに登上線維シナプスの排除を制御していることがわかった。

5 自己評価:

本課題をはじめた当初は、小脳プルキンエ細胞への外来遺伝子の効率的な導入・発現に成功した論文は無く、うまく行くかどうか全くわからなかった。しかし HIV 由来レンチウイルスベクターがプルキンエ細胞に比較的高い親和性を持っていたことが幸いであった。研究を進めるに従い、レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞に対する親和性に影響を与えるファクターも明らかになった。最終的には、プルキンエ細胞に高い親和性を持つウイルスベクターの産生法を確立することができ、小脳の広範囲のプルキンエ細胞に、従来より格段に高効率で外来遺伝子を導入し、発現させることが可能となった。

小脳失調関連遺伝子の機能解明に関しては、プルキンエ細胞に発現する $\delta 2$ グルタミン酸受容体、顆粒細胞で合成され平行線維終末より放出される Cbln1 の解析を行い、その成果は Nature Neuroscience 誌(2 編)と EMBO Reports 誌(1 編)に出版された。現在、これらの遺伝子に関して、本課題で開発したウイルスベクター発現系を用いて、さらに解析をすすめているところである。

一方、遺伝子治療の分野では、脊髄小脳変性症のモデルマウスを作出した。現在、治療用の遺伝子を、レンチウイルスベクターを用いて疾患モデルマウスのプルキンエ細胞に導入し、神経変性を抑える実験を行っているところである。以上、まとめると当初の計画より若干時間はかかっているものの、遺伝子導入法を確立するという最も重要な目標は達成でき、これに続く目標も達成されつつあると考えている。

6 研究総括の見解:

ウイルスベクターを用いて、プルキンエ細胞に特異的かつ効率的に遺伝子導入する技術の開発という所期の目的を、産生細胞の培養液のpHに依存して産生されたレンチウイルスベクターがプルキンエ細胞に高い親和性を持つことを発見して達成したことは、高く評価できる。特異的で、高い効率の遺伝子導入を可能にしたことは、小脳の機能に関する分子レベルでの解明、ならびに、小脳疾患の理解とその対策に大きく貢献すると考えられ優れた成果であった。

7 主な論文等:

論文

(1)原著論文

1. Hirai H, Launey T, Mikawa S, Torashima T, Yanagihara D, Kasaura T, Miyamoto A, Yuzaki M.: New role of delta2-glutamate receptors in AMPA receptor trafficking and cerebellar function. **Nat. Neurosci.** 6: 869-876, 2003
2. Hirai H, Miyazaki T, Kakegawa W, Matsuda S, Mishina M, Watanabe M, Yuzaki Y: Rescue of abnormal phenotypes of the delta2 glutamate receptor-null mice by mutant delta2 transgenes. **EMBO Rep.** 6: 90-95, 2005
3. Hirai H, Zeng P, Bao D, Miyazaki T, Li L, Miura E, Parris J, Rong Y, Watanabe M, Yuzaki Y, Morgan JI.: Cbln1 is essential for synaptic integrity and information processing in the cerebellum. **Nat. Neurosci.** 8:1534-1541, 2005

(2)総説

4. 平井宏和. 第1章 小脳のグルタミン酸受容体と運動. 柳原大/内藤久士編, 運動とタンパク質・遺伝子, 第1版, 東京:ナッパ出版, 2-16, 2004
5. 平井宏和. 遺伝子レスキューマウス作出による小脳の運動学習機構の解明. 実験医学, 23(8): 1170-1175, 2005

特許出願(3件)

特願 2004-234912「プルキンエ細胞における遺伝子発現のための発現ベクター」

特願 2005-189518「パーキンソン病の治療のための医薬」

特願 2005-231514「小脳星状細胞及び籠細胞特異的な遺伝子発現方法」