

44062607

アデノウイルスを用いた新たな時間空間的遺伝子相同
組換え法による神経傷害応答の解析

(10044227)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金
(基盤研究(A)(2)) 研究報告書

平成13年3月

研究代表者 木山 博資
(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

本報告書は平成10年度～平成12年度に渡って研究代表者：木山博資らが研究課題「アデノウイルスを用いた新たな時間空間的遺伝子相同組換え法による神経傷害応答の解析」のために受領した文部省科学研究費補助金（基盤研究（A）（2））によって行われた研究の報告である。

またこの場を借りて、本報告書作成を手伝っていただいた中林晃代さん、及び本研究に多大なるご助力をいただいた旭川医科大学並びに The Babraham Institute の両付属動物実験施設の皆様に深く感謝申し上げます。

研究組織

| | | | |
|-------|---|--------------------|--|
| 研究代表者 | ： | 木 山 博 資 | （旭川医科大学医学部教授） |
| 研究分担者 | ： | Nicholas D. Allen | （The Babraham Institute, Principal Investigator） |
| 研究分担者 | ： | Michael J. Skynner | （ファイザー製薬株式会社、研究員） |
| 研究分担者 | ： | Piers C. Emson | （The Babraham Institute, Principal Investigator） |
| 研究分担者 | ： | 加 藤 英 政 | （旭川医科大学医学部助手） |
| 研究分担者 | ： | 桐生（瀬尾）寿美子 | （旭川医科大学医学部助手） |
| 研究協力者 | ： | 涛 川 一 彦 | （旭川医科大学医学部助手） |

研究経費

| | |
|--------|-----------|
| 平成10年度 | 5,900 千円 |
| 平成11年度 | 3,500 千円 |
| 平成12年度 | 3,600 千円 |
| 計 | 13,000 千円 |

研究成果

本研究は、日本側研究室のテーマである神経傷害応答メカニズムの解明に技術面の一助を目論んで行ったものである。神経傷害は様々な臨床現場において直面されるが、その結末は中枢神経系においては納得しうるものでは決してない。その原因の一因は、本現象に対する実験医学の対応の遅れにあると考えている。その困難さは、神経傷害現象の複雑さに内包されている。機能的には、神経細胞の不可逆的機能傷害が問題にされるが、その実、神経傷害は神経細胞に限らない。むしろ周辺環境をひっくるめた、多種細胞間のコミュニケーションによると考える。この事は本研究において、一元論的な追求を多くの場合無力にするものである、との議論もある。しかし我々は、現在の段階をあえて大きな研究の流れの中で、極初期のものと位置づけて神経細胞に着目した研究を、生体をベースに行うことを目指した。

なるだけ厳密な意味で、時間的・空間的に遺伝子発現を制御する発想は、それ以前より本研究室にて着手していた、神経細胞特異的プロモーターを用いた実験系からの反省より発した。研究協力者加藤らの論文などに紹介したもの (Kato H. et al, Dev. Brain Res. 2000) は、神経細胞特異的発現遺伝子 GAP-43 のプロモーターを用いた lacZ トランスジェニックマウスをテストケースに、神経細胞特異的な遺伝子発現を目指すものであった。その結果、最終的には内因性発現を極めて模倣できたことで、発生神経解剖学の研究に極めて有用なツールが出来上がった。その反面、当初は予期をしなかった問題点も数々浮き彫りになった。トランスジェニックの手法は、実験着手までの手取り早さに引き替え、トランスジーンの positional effect による発現変異に強く影響を受けることを再確認する事になった (添付の「トランスジェニックマウスの問題点」参照;平成12年日本神経科学学会発表)。そこで、この点を打破するものとして平行して試行を重ねていたアデノウイルスを用いることを思いついた。アデノウイルスを用いた傷害神経細胞への遺伝子導入は、極めて効率が高く、研究協力者濤川らの仕事 (Namikawa K. et al, J. Neurosci. 2000) を添付した。この方法は、切断神経軸索や、神経細胞の標的組織からのピンポイントな逆行性輸送を利用して時空的に発現を制御しうるものである。このウイルスに Cre リコンビナーゼを運ばせ目的細胞で組み換えを起こすことは、現段階では十分にはテストできていないが、実現可能なレベルにこぎ着けられた。唯一本法の難点を挙げるなら、本実験系においては発現部位をウイルスの感染性に任せるため、厳密な意味での神経細胞への選択性が得られにくい点がある。今後はこのウイルスに神経選択性をもったプロモーターを組み込むことで、より厳密に実験系確立に努めたい。

また、本実験系にて具体的に何を見るかについて次のような流れを経て実験を進めた。実験企画当初、本実験系の先進性を鑑みて、標的遺伝子 (=時空的にノックアウトを目論む遺伝子) には神経傷害に不可欠かつ広範な生命現象に関わるものを選択するよう考えた。当時興味を持ったもので、神経細胞のアポトーシスなどにも深く関わりと見られていた c-jun に着目した。当該遺伝子を独自に取得し、floxed ベクターを作成後、リコンビナントを得て現在 germline transmission を待っている (このマウスに関しては、別のグループがその作製に先んじたとの情報も得ている)。しかしながら、別の視点から本遺伝子を眺め返した際、本遺伝子が単独で細胞の運命決定を司るものではないとするデータも得るに至った (Takeda M. et al, IOVS 2000)。従って今後は、これらをふまえて実験系に修正を加えることが不可欠である。

また、本実験遂行で得た印象では、ネックとなった神経 (あるいは組織) 特異性が打破されれば、特定の領域における細胞機能障害 (つまり大部分の疾患) をモデル化することが可能となると思われる。本共同研究にて分裂病患者脳を用いた解析を通じて得られた PSD95 発現異常などの現象 (Oonuma T. et al, NeuroReport 2000) などへの応用も、新世紀へ向けた脳研究の新たな試みとして興味深く映った。