

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11180

研究課題名(和文) 排尿筋低活動におけるウイルスベクターを用いたニューロトロピン遺伝子治療の検討

研究課題名(英文) The effects of viral vector encoding neurotrophin in a rat model of detrusor underactivity

研究代表者

馬嶋 剛 (Majima, Tsuyoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90625138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、骨盤神経の圧挫による排尿筋低活動モデルラットを用いて、ニューロトロピン遺伝子を搭載したウイルスベクターの遺伝子治療の有効性について検討した。アデノ随伴ウイルスベクター1、2、5、6、8、9型の後根神経節及び骨盤神経節への上行性は確認できなかったが、単純ヘルペスウイルスベクターの上行性は確認された。本ウイルスベクターにNGF及びBDNF遺伝子を搭載し投与したところ、排尿効率改善が認められた。Muscle strip studyでは、これらのラットから採取した排尿筋の収縮反応は有意に改善した。免疫染色にて後根神経節及び骨盤神経節において、NGF及びBDNFの発現亢進が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

排尿筋低活動は、排尿筋や膀胱支配神経(大脳、脳幹、脊髄、自律神経)を含む排尿機構に障害が生じることにより、十分な尿排出ができなくなる病態である。有効な治療法がないため、重度の患者は間欠的導尿や尿道カテーテル管理を余技なくされる。尿路感染症や腎後性腎不全などの重篤な合併症をも来し得る難治性疾患である。我々の開発したウイルスベクターは、根本的な治療法が存在しない難治性疾患である本病態に、全く新しい治療戦略をもたらす可能性が示唆された。また排尿筋低活動における新たな病態解明の糸口となる可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of viral vector encoding neurotrophin in a rat model of detrusor underactivity induced by pelvic nerve crush injury. We identified successful delivery of herpes simplex virus (HSV) vectors into dorsal root ganglions and pelvic ganglions, but not 6 serotypes of adeno-associated viral vectors (1, 2, 5, 6, 8, and 9). Rats treated by HSV vectors encoding NGF and BDNF showed significant better voiding efficiency and less post-void residual urine volume compared to control rats in cystometry. Muscle strip studies showed that contractile responses of detrusor obtained from rats treated by HSV vectors was significantly higher than those from control rats. Immunohistochemistry indicated that the expressions of NGF and BDNF in dorsal root ganglions and pelvic ganglions were significantly higher in rats treated by HSV vectors than control rats.

研究分野：泌尿器科

キーワード：排尿筋低活動 遺伝子治療 ウイルスベクター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

排尿筋低活動は、排尿筋や膀胱支配神経を含む排尿機構に障害が生じ、十分な尿排出ができなくなる病態である。有効な治療法がないため、間欠的導尿や尿道カテーテル管理を余技なくされ、尿路感染症や腎後性腎不全など重篤な合併症をも来し得る難治性疾患である。従って、新たな治療法の開発は喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では排尿筋低活動に対する新規治療法の確立を目指し、排尿筋低活動モデルラットの膀胱神経路に対する各種ニューロトロピン (NT) 遺伝子導入を、近年我々が構築した次世代型ウイルスベクターシステムを用いて行う。本研究の目的は、排尿筋低活動の病態における NT の役割を明らかにするとともに、NT の膀胱支配神経の再生作用並びに、排尿機能の回復効果について検討する。

### 3. 研究の方法

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (1、2、5、6、8、9 型) 及び、無毒化単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターにレポーター遺伝子である GFP を組み込む。これらをラット膀胱壁に注入後、後根神経節並びに骨盤神経節における GFP 発現を免疫染色にて解析する。

で神経節への上行性が確認されたウイルスバックボーンを使用し、各種 NT 遺伝子 (NGF、BDNF、GDNF、NT-3) を挿入する。ラットの骨盤神経を圧挫することにより排尿筋低活動モデルを作成する。ラットを 5 群に分け、各種 NT 遺伝子、或いは GFP 遺伝子を搭載したウイルスベクターを膀胱壁に注入する。コントロール群は、シャム手術を施行する。その後以下の実験を行う。

- (a) 覚醒下膀胱内圧測定
- (b) 後根神経節及び骨盤神経節における各種 NT 遺伝子並びにタンパク質の発現量を、RT-PCR 及び免疫染色により解析する。
- (c) 圧挫した骨盤神経の GAP43 免疫染色
- (d) Masson trichrome 染色

上記の実験により有効性が確認された複数の NT 遺伝子を選択し、無毒化 HSV ベクターに搭載する。本ベクターを排尿筋低活動モデルに導入し、上記と同様の実験により、その治療効果を解析する。

### 4. 研究成果

AAV ベクターはいずれの血清型も神経節への上行性は確認できなかった。一方、無毒化 HSV ベクターの上行性は確認できた。従って以降の実験は、本ウイルスベクターを用いて行った。

NGF または BDNF 遺伝子を搭載したウイルスベクターを注射したラットにおいて、膀胱内圧測定上排尿効率の改善、残尿量の減少が確認された。これらのラットから採取した骨盤神経において、GAP43 蛋白の発現が有意に高かった。さらに、Masson trichrome 染色により、これらのラットから採取した膀胱の線維化が有意に少ないことが確認された。

NGF 及び BDNF 遺伝子を同時に搭載した無毒化 HSV ベクターを作成し、同様の実験を行ったが、相加相乗効果については確認されなかった。

以上より、我々の作製した NT 遺伝子搭載無毒化 HSV ベクターは、排尿筋低活動モデルラットにおける膀胱機能を改善することが示された。従って、この遺伝子治療は有効な治療法の無い排

尿筋低活動における新たな治療法確立に繋がる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮川 世志幸  (Miyagawa Yoshiyuki)  (90415604)	日本医科大学・医学部・講師    (32666)	