

研究種目：若手研究（S）
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19670003
 研究課題名（和文） ウィルスベクターを用いたレスキューマウス作出による遺伝子機能解析法確立とその応用
 研究課題名（英文） Establishment and application of lentivector-based production of gene-rescue mouse for exploring gene functions
 研究代表者
 平井 宏和 (HIRAI HIROKAZU)
 群馬大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：70291086

研究代表者の専門分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路、神経発生・神経発達・神経再生

1. 研究計画の概要

ウィルスベクターを用いた「遺伝子レスキューマウス」作出による解析は、ポストゲノム時代において汎用性の高い効果的な研究手法となる可能性がある。しかし、そのためにはウィルスベクターを細胞特異的に効率的に感染させ、その細胞で遺伝子発現を効率的に制御できる必要がある。レンチウイルスベクターは神経細胞に比較的親和性があり注目を集めていたが、その性質については多くのことが不明であった。そこで本研究では、以下の項目を目的とした。

(1) レンチウイルスベクターの改良と評価

- ① 標的遺伝子とマーカー（GFP など）遺伝子の2つの遺伝子の発現を可能にする
- ② 5kb 以上の遺伝子を発現可能な高力価ベクターを開発する。
- ③ レンチウイルスが細胞選択的に感染する機構を解明する。

(2) レスキューマウス作出による遺伝子機能解明と臨界期の検討

自然発生（Hotfoot5J など）、人工（遺伝子ノックアウト）の運動失調マウスにレンチウイルスベクターを用いて野生型遺伝子を発現させ運動失調のレスキューを試みる。また細胞レベルでは何がどの程度レスキューされているのかを形態学的、電気生理学的に調べる。この実験を通してそれぞれの遺伝子の機能、シグナル伝達様式、臨界期について明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) レンチウイルスベクターの改良と評価

- ① 標的遺伝子とマーカー（GFP など）遺伝

子の2つの遺伝子の発現を可能にした。レンチウイルスベクターで、P2A 配列を用いて GFP と目的遺伝子の両方を *in vivo* の脳で効率的に発現させることに成功した。

- ② 5kb 以上の遺伝子を発現可能な高力価ベクターを開発した。

MSCV プロモーターを用いて 5kb 以上の遺伝子発現可能な高力価ウィルスベクターの開発に成功した。

- ③ 生後0日のラットの小脳、及び生後1日のマウスの小脳にレンチウイルスベクターを接種し、プルキンエ細胞選択的に遺伝子発現させる方法を確立した。

生直後の小脳は未発達で紙のように薄い。また頭も極めて小さく、小脳の位置も成熟マウスとかなり違っている。そのため、うまく小脳にウィルスベクターを接種することができなかった。本研究では、頭部固定装置を特注で作成するなど、さまざまな工夫を行い、生後0日（マウスでは生後1日）の小脳神経細胞に効率的に遺伝子発現させることが可能となった。また小脳だけでなく、発達期のラット・マウスのさまざまな脳の領域に遺伝子発現が可能となった。

- ④ 約 1.2kb の大きさで強いプロモーター活性をもつプルキンエ細胞特異的なプロモーターを開発した。

- ⑤ 高力価レンチウイルスベクターの毒性について詳細に評価した。

高力価レンチウイルスベクターの感染が神経細胞の樹状突起発育及び、シナプス機能成熟に与える影響について明らかにした。

本研究により可能となった(i),(ii),(iii)の技術を用いた成果は *Eur. J. Neurosci.*、*Neurobiol.*

Dis., *Cerebellum*, *Nature* などに発表した。

(2) レスキューマウス作出による遺伝子機能解明と臨界期の検討／遺伝子治療研究

① 作成した変性疾患モデルマウス、自然発生の運動失調マウスに見られる障害を、レンチウイルスベクターを用いて分子レベルから大きく改善させることに成功した。

② レンチウイルスを用いた脊髄小脳変性症 14 型 (SCA14) モデルプルキンエ細胞の作成と解析

小脳プルキンエ細胞選択的に目的遺伝子と GFP を、高効率で共発現させる方法確立した。この方法を用いて、脊髄小脳変性症 (SCA) モデルマウスのプルキンエ細胞変性を抑え、運動失調を大きく改善させることに成功した。また、プルキンエ細胞に発現する遺伝子の点変異により顕著な歩行障害を示す自然発生運動失調マウスに、正常遺伝子を導入し、プルキンエ細胞機能を完全に回復させて運動失調を大きく改善させることに成功した。

3. レンチウイルスを用いた脊髄小脳変性症 14 型 (SCA14) モデルプルキンエ細胞の作成及び解析

患者と同じ点変異をもつ脊髄小脳変性症 14 型原因遺伝子 (Protein kinase C γ ; PKC γ) を GFP とともに生後 6 日のマウスのプルキンエ細胞に発現させ、生後 25 日に発現プルキンエ細胞の変化を検討した。電気生理学的及び、細胞生理学的解析により SCA14 の病態に迫るデータを得た。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

これまでの研究で、生直後の仔マウス (ラット) から成熟マウス (ラット) まで、プルキンエ細胞特異的、あるいは線条体や大脳皮質の神経細胞特異的に外来遺伝子を発現させることが可能となった。当初の計画通り、これまで困難であった多くの脳研究課題に取り組むことが可能となった。現在もいくつかの重要な成果が得られており、これからも新たに重要な課題の解明に取り組む予定である。レンチウイルスベクターの細胞親和性を決定するメカニズムについても手掛かりがつかめており、残りの研究期間で当初の目標以上の成果を達成できると考えている。

4. 今後の研究の推進方策

(1) レンチウイルスが細胞種選択的に感染する機構の解明を行う。

レンチウイルスがどのような修飾を受けると親和性が変化するかを解明する。

(2) レスキューマウス作出による遺伝子機能解明と臨界期の検討

レンチウイルスベクターを用いて神経の発達やシナプス可塑性のメカニズム、及び疾患病態の解明をさらに進めることを目的として、数種類の遺伝子改変マウスを準備している。これまで開発した遺伝子導入技術を用いて、準備したマウスの解析を進める。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Sawada Y, Kajiwara G, Iizuka A, Takayama K, Shuvaev AN, Koyama C, Hirai H*: High Transgene expression by lentiviral vectors causes maldevelopment of Purkinje cells in vivo. *Cerebellum* 2010 (in press)
- ② Iizuka A, Takayama K, Torashima T, Yamasaki M, Koyama C, Mitsumura K, Watanabe M, Hirai H*: Lentiviral-vector-mediated rescue of motor behavior in spontaneously occurring hereditary ataxic mice. *Neurobiol Disease* 35(3):457-65, 2009
- ③ Torashima T, Koyama C, Iizuka A, Mitsumura K, Takayama K, Yanagi S, Oue M, Yamaguchi H, Hirai H*: Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep* 9(4):393-9, 2008

[学会発表] (計 22 件)

- ① Shuvaev NA, Sakai N, Seki T, Iino M, Horiuchi H, Hirai H. A PKC γ mutations in spinocerebellar ataxia type 14 impairs PKC functions in cerebellar Purkinje cells in vivo. The 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009.7.28, 京都国際会議場 (Kyoto)
- ② Takayama K, Torashima T, Horiuchi H, Hirai H. Purkinje-cell-selective transduction by the MSCV promoter incorporated in lentiviral vectors. *Neuroscience* 2008, 2008.11.19, Convention Center, Washington DC,

[図書] (計 2 件)

[その他]

ホームページ

<http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.html>