

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590995

研究課題名（和文） DRG 標的ベクターを用いた糖尿病神経障害の治療

研究課題名（英文） Treatment of diabetic neuropathy by DRG-targeting vector

研究代表者

安田 斎 (YASUDA HITOSHI)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：80135467

研究成果の概要（和文）：

本研究ではファージ・ディスプレイを用いて採取した DRG ニューロン特異的に結合できる 3 種類の 7 桁ペプチド配列 (DRG1、DRG2、DRG3) を用いて、*in vivo* において DRG を標的として治療できる遺伝子治療ベクターの作成を試みた。M13 ファージの pIII を含む相同領域と変換して作成し、これによりファージ・ベクターがえられた。このベクターのマルチクローニングサイトに緑色蛍光色素 (GFP) の遺伝子を組み込み、発現効果を見るためのテストベクターを作成した。これをマウスのクモ膜下腔に投与した後、DRG を取りだし、組織切片を作成して緑色蛍光色素の発現を観察した。しかし、GST 融合タンパク質を用いた特異性の検討時と異なり、ごく僅かの蛍光しか認められず、発現効率はあまり良くなかった。この原因として、ファージ自身がきわめて不安定であることが考えられ、発現効率を上げるための改良が必要である。

研究成果の概要（英文）：

We have tried to make *in vivo* gene therapy vectors targeting dorsal root ganglia (DRG) by using 3 kinds of 7 amino acids sequence that could specifically bind to DRG neurons (DRG1, DRG2, DRG3). Phage vector system was obtained by transformations of the isolated 3 kinds of peptides to the PIII of the M13 phage. The test vectors were made by an introduction of green fluorescent protein (GFP) to multi-cloning site of the vector to see the effect of the gene expression. The vectors were administrated to subarachnoid space of mice, and the GFP-expression was examined in DRG tissues. Compared with the results of a study using GST-fusion protein, the expression of GFP by a gene transfer was very low by phage vector system. This might be caused by the unstableness of the phage itself, and we need a further arrangement for the improvement of the expression efficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・神経内科学

キーワード： 遺伝子治療、糖尿病合併症、ファージ・ベクター、RT PCR

1. 研究開始当初の背景

糖尿病神経障害(DN)は末梢神経障害の中で最も高頻度で、進行性かつ治療抵抗性を特徴とする。これまで、アルドース還元酵素阻害薬(ARI)、血流改善薬、PKC β 阻害薬、酸化薬、糖化阻害薬、神経栄養因子及びそのアナログなどが開発され、治療が試みられてきたが、臨床的に明らかな有効性を示す薬物の報告はない。原因の一つには、DNは糖尿病に伴う高血糖が引き起こす様々な原因が複合的に関与して発症することに起因すると考えられる。また、未知の発症因子が存在する可能性も否定できない。

そこで、筆者らは根本的な治療を実現するための遺伝子治療ベクターの作成を試みた。それまでの研究により、ファージ・ライブラリーを用いたバイオパンニングによるDRGニューロンを標的とする7桁ペプチドの採取する検討を行い、DRGニューロン特異的に結合できる3種類の7桁ペプチド(DRG1、DRG2、DRG3と命名)の採取に成功した。

2. 研究の目的

本研究ではDRGニューロンにおける異常な細胞融合に焦点を当て、ファージ・ディスプレイならびにバイオパンニングを使用した標的細胞特異的な治療システムを作成し、DNに対する新しい遺伝子治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

これまでの研究でファージ・ライブラリーを用いたバイオパンニングにより、*in vitro*においてDRGニューロン標的的特異的に結合できる3種類の7桁ペプチド配列(DRG1、DRG2、DRG3)を採取した。興味あることに、DRG1ならびにDRG3は小径ニューロン、DRG2は大径ニューロンと特異的に結合し、細胞内に取り込まれていた。そこで、この配列を含むGST融合蛋白を作成し、マウスの脊髄髄腔内へ投与し、採取したペプチド配列が、*in vivo*においても*in vitro*同様のニューロン特異性

を持つことを明らかにする。

また、上記により、特異ペプチドの有用性を確認した後、DRGを特異的な標的とするファージ・ベクターの作成を行う。

さらに、このファージ・ベクターを用いて、ストレプトゾシン(STZ)糖尿病マウスに生じたDNに対する遺伝子治療を行う。

4. 研究成果

本研究ではDRGニューロン特異的に結合できる3種類の7桁ペプチド配列(DRG1、DRG2、DRG3)を用いて、*in vivo*においてDRGを標的として治療できる遺伝子治療ベクターの作成を試みた。ベクター骨格はNew England Biolabs社製Ph.D.C7C Phage Display Peptide Libraryにより得られたPIIIを含む領域を取り出し、TOYOBO社製M13mp18RFIのpIIIを含む相同領域と変換して作成し、これによりファージ・ベクターがえられた。このベクターのマルチクロニングサイトに緑色蛍光色素(GFP)の遺伝子を組み込み、発現効果を見るためのテストベクターを作成した。

これをマウスのクモ膜下腔に投与した後、DRGを取りだし、組織切片を作成して緑色蛍光色素の発現を観察した。しかし、GST融合タンパク質を用いた特異性の検討時と異なり、ごく僅かの蛍光しか認められず、発現効率はあまり良くなかった。この原因として、ファージ自身がきわめて不安定であることが考えられ、発現効率を上げるための改良が必要である。

GFP遺伝子がごく僅かしか発現しなかったことから、米国ベイラー医科大学のDr. Lawrence Chanから、培養DRG細胞を用いて感染効率ならびに遺伝子発現能について検討を行い、ファージ自身のバックボーンを安定化するように改良することが必要であるとのアドバイスを受け、現在この目標に向けて検討中である。これにより、ベクターの遺伝子発現効率を上昇させた後に、今後治療に向けた検討を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 小島秀人、山川勇、寺島智也、川合寛道、木村博、シンポジウム6 糖尿病性神経障害の新時代-成因から治療まで、細胞融合と神経障害、第25回糖尿病合併症学会、2010. 10. 23、大津

② 山川勇、小島秀人、寺島智也、大井二郎、浦部博志、真田充、川合寛道、木村博、安田斎、前川聡、ワークショップ2 (神経)、糖尿病性末梢神経障害における TNF α の関与と治療標的としての有用性、第25回糖尿病合併症学会、2010. 10. 23、大津

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 斎 (YASUDA HITOSHI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：80135467

(2) 研究分担者

小島 秀人 (KOJIMA HIDETO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00225434