

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09328

研究課題名(和文) 抑制性伝達物質発現調整によるジストニア改善の試み;GAD65とVGAT過剰発現

研究課題名(英文) Attempts to improve dystonia by regulating inhibitory neurotransmitter with overexpression of GAD65 and VGAT

研究代表者

淵上 竜也 (Fuchigami, Tatsuya)

琉球大学・病院・講師

研究者番号：10381211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：「ジストニアに対する新たな治療法として大脳・脊髄における抑制性神経伝達物質の産生・放出を増大させることの有用性を評価する」ことであった。軟膜下投与法では頸髄に対し標的遺伝子を導入することが可能である。本申請においてジストニア動物モデルを利用し、全身性ジストニアの新たな治療法を探索した。その中でアデノ随伴ウイルスを用いた検討を行なった。遺伝子導入による治療を目標とし、グルタミン酸デカルボキシラーゼGAD65/小胞GABAトランスポーターVGATの過剰発現による不随運動改善効果を検討することとした。同時に二つの異なる遺伝子を導入することに成功した。ジストニアの運動改善を得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟膜下投与法を使用し、2つの異なる遺伝子を一度に脊髄運動神経に導入することに成功した。これまで静脈注入法・実質内投与法と比較して、静脈投与よりも高効率で実質内投与よりも低侵襲でありながら、安全な遺伝子導入が実施できた。2つの全く異なる遺伝子導入が実践できたことから、「異常遺伝子の抑制」と「正常遺伝子の導入」ということが新たに可能であることが示された。より複雑な病態へ対応できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to "evaluate the utility of increasing the production and release of inhibitory neurotransmitters in the cerebellum and spinal cord as a novel treatment for dystonia. The sub-pial injection method can deliver the target genes (glutamate decarboxylase 65 and vesicular GABA transporter) to the cervical spinal cord. In this application, an animal model of dystonia was used to explore a novel treatment for systemic dystonia. In this study, we investigated the use of adeno-associated virus. Targeting treatment by gene transfer, we decided to investigate the effect of overexpression of GAD65 and VGAT on improvement of involuntary movements. We succeeded in introducing two different genes at the one time (single injection). However, no improvement in dystonia movement could be obtained.

研究分野：神経内科学

キーワード：抑制性神経伝達物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジストニアは持続的な筋収縮により運動異常・姿勢異常を呈するものである。健常人では主動筋である随意筋が収縮するとその拮抗筋が自動的に弛緩することで随意運動を円滑に行うことができる。しかしながらジストニア患者の場合には主動筋と拮抗筋が同時に収縮してしまい円滑な運動が阻害されてしまう。

全身性ジストニアは人口 10 万人当たり 0.68-2.8 名と推計されている。

ジストニアでは運動調節に関わる大脳基底核における異常が考えられている。すなわち直接路の活動亢進と間接路の活動低下が生じることで結果として大脳皮質の興奮性が増大すると考えられる。これまでの研究で、ジストニアの病態機序は非常に複雑で、一次感覚野・小脳・脳幹・脊髄を含めた様々な領域が関与していることが指摘されている (Breakefield XO Nat Rev Neurosci. 2008)。

本申請研究では脊髄運動神経のみならず脊髄に軸索が存在する大脳運動野の神経細胞をターゲットとして興奮性を低下させる計画である。

このことは遺伝型ジストニアのみならず共通の分子メカニズムで運動障害を来していることが想定される症候性や 2 次性のジスキネジアの治療法開発にも直接つながる。

さらに、本申請研究は神経伝達物質の遺伝子発現調節による異常運動抑制を探ることで、新たな治療法 (遺伝子導入法) の開発に寄与できる。

2. 研究の目的

ジスキネジアの研究において、培養細胞での検討は容易であるが、有症状の成熟個体が得られず個体死をきたすため、動物モデルでの検討は進んでいない。

今回本申請においてジストニア動物モデルを利用し、脊髄運動神経・大脳運動野をターゲットとした全身性ジストニアの新たな治療法を探索することとした。

その目的として、個体におけるジストニアによる神経伝達異常の病理の解明と抑制性神経伝達物質調整による異常運動コントロールの試み、の 2 点である。

本研究の独自性として、GAD65/VGAT をジストニアの異常運動抑制に対する治療ターゲットとする研究は皆無である。これまでジストニアでは GABA 受容体をターゲットにする治療 (バクロフェン髄注療法) とその効果に関しては実臨床で実施されてきたことから、本申請において異常運動を改善できる見込みは十分にあると考えられた。

本申請では、全身性ジストニアに生じる異常運動に対して、GAD65 遺伝子/VGAT 遺伝子導入により GABA の産生と神経接合部における分泌を促すことで興奮性神経と抑制性神経の最適化を試みることにした。

3. 研究の方法

ジストニアマウスに対してグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD65) と小胞 GABA トランスポーター (VGAT) を過剰発現させることで以下の研究を実行した。

- (1) アデノ随伴ウイルス (AAV9) を用いた遺伝子導入による GAD65/VGAT の過剰発現による不随運動の改善：行動観察および電気生理学的検討
- (2) 大脳運動野・頸髄における GAD65/VGAT 増加確認
- (3) 脳脊髄における抑制性神経伝達物質の増加：分子生物学的検討、免疫組織学的検討

- マウスに対するグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD65) 及び小胞 GABA トランスポーター (VGAT) 過剰発現による異常運動改善効果

GAD65/VGAT 過剰発現のためのウイルス注入：4 週齢の dt マウスを麻酔後、椎弓固定器により固定した。固定後に後頭骨および第 1 頸椎の椎弓を切除した (大後頭孔拡大術)。大後頭孔拡大後に硬膜切開を加え、その後軟膜を切開した。軟膜切開部位より薬剤注入用 30G 針 (注入針) 挿入、経注入針的に AAV9 を注入し GAD65/VGAT 遺伝子を導入した。

- マウスに対する GAD65 及び VGAT 過剰発現の分子生物学的ならびに組織学的検討
遺伝子導入を行ったマウス大脳運動野・脊髄における GAD65/VGAT の過剰発現によるジストニア改善に関する分子生物学的・組織学的検討を行なった。

AAV9-UBC-GAD65 による組織中での GAD65 組織学的変化についての検討 (神里)

遺伝子導入前、導入後 7、28 日後と野生型で検討を行う。マウスは灌流固定後に脳/脊髄を摘出し凍結切片を作成する。GAD65 や VGAT に NeuN、GFAP、Iba1 を用いて免疫組織染色を施行する。それぞれ経時変化、局在性を蛍光顕微鏡下に観察した。

GAD65 及び VGAT の発現強度が高くなっていることを蛍光免疫染色で確認した。特に GAD65 に関して、脊髄横断的に強発現していることを確認した。

4 . 研究成果

本研究において、GAD65 及び VGAT 過剰発現を一度の外科的介入で実行するという試みは実施可能であった。しかしながら、当初の目的であったジストニアを調整するということではできなかった。その原因として、蛋白のみの過剰発現では放出機構を備えていないことが挙げられる。本研究において、神経伝達物質 (= GABA) 過剰産生と小胞体形成までは可能であることが証明できたが、異常運動に合わせてあるいは異常運動を抑制する程度の神経伝達物質の脊髄内(運動神経間)の基礎値がコントロールできなかったために十分な結果を得ることができなかったと考えられる。

本研究の創造性として、存在している神経細胞を利用して神経伝達物質分泌量を増加させるという考え方は、髄腔内薬剤投与と異なり単回治療で終了するため、今回 GAD65 を脊髄横断的に産生させる事ができたことは大きな前進であると考えられる。さらに2種類の異なる遺伝子の導入に同時に成功ことも大きいと考えられる。本研究成果はジストニアがおこった後の異常運動に対する介入であるため、ジストニアのみならず神経伝達物質のアンバランスによる異常運動が疑われる神経疾患に対する治療法の開発の発展にも直接寄与できると考えられた。

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	神里 興太 (Kamizato Kota) (10554454)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関