

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～ 2011

課題番号：22650065

研究課題名（和文） 標的ニューロンの活動を促進性・抑制性に制御する
遺伝子改変技術の開発研究課題名（英文） Development of genetic manipulation technology for excitatory and
inhibitory control of the target neuron activity研究代表者 小林 和人 (KOBAYASHI KAZUTO)
福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90211903

研究成果の概要（和文）：

本研究では、特定ニューロンの活動を促進的あるいは抑制的に制御し、普遍的に利用できる新しい遺伝子改変技術の開発に取り組んだ。ヒト IL-2R α を選択的に認識するイムノトキシンの単一鎖抗体可変部を Fc に連結した融合タンパク質 [anti-Tac(Fv)-Fc] をリポソームに結合させたイムノリポソーム、および、anti-Tac(Fv) に水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-G) の膜貫通ドメインを連結し、細胞膜結合型の融合タンパク質 [anti-Tac(Fv)-VSV-G] をコードするバキュロウイルスベクターとリポソームを融合することにより、anti-Tac(Fv)-VSV-G を持つプロテオリポソームを作製した。これらのリポソームを含む溶液（ローダミン標識）に、非標識のコントロールリポソームを混合し、非特異的な結合を低下させることに成功した。この方法は、イムノリポソームやプロテオリポソームの内部にチャンネル阻害剤を封入することによって、神経細胞の活動性の制御に応用できる。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we aimed to develop a novel technology for excitatory and inhibitory control of the activity of target neuronal types. A single chain variable region of anti-Tac monoclonal antibody against human interleukin-2 receptor α -subunit was fused to Fc fragment [anti-Tac(Fv)-Fc] was bound to liposome to produce immunoliposome. Anti-Tac(Fv) was connected to the transmembrane domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein or VSV-G [anti-Tac(Fv)-VSV-G], and anti-Tac(Fv)-VSV-G was expressed in insect cells by the baculoviral vector system. These cells were fused to liposome to generate proteoliposome containing anti-Tac(Fv)-VSV-G. We succeeded in the reduction of nonspecific binding of immunoliposome and proteoliposome by adding unlabelled control liposome into the solution containing the rhodamine-labelled liposome. This strategy will be useful to control the activity of neurons by introducing some drugs that inhibit ion channels into immunoliposome or proteoliposome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：脳機能、神経活動、細胞標的薬、抗体、リポソーム、プロテオリポソーム

1. 研究開始当初の背景

脳機能を媒介する神経機構を理解するためには、神経回路を構成する特定のニューロンの行動生理学的な役割の解明が必須である。我々のグループは、行動制御を媒介する神経回路の機構を明らかにするために、脳神経回路から特定のニューロンを誘導的に除去するイムノトキシン細胞標的法や一過性に神経伝達を抑制するイムノテタヌストキシン伝達抑制法を開発してきた。特定ニューロンの活動を促進的あるいは抑制的に制御し、より普遍的に利用できる新しい遺伝子改変技術が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、特定ニューロンの活動を促進的あるいは抑制的に制御する新規の遺伝子改変技術として、イムノリポソームを介した標的細胞へのイオンチャネル阻害剤の選択的導入法の開発に取り組んだ。ヒト IL-2R α に対する抗体をリポソームに結合させ、その内部に各種イオンチャネルブロッカーを含有させることによって、IL-2R α を標識した目的のニューロンにブロッカーを選択的に導入し、イオンチャネルの阻害により、細胞の活動を迅速に制御することが期待される。

3. 研究の方法

ヒト IL-2R α を選択的に認識する組換え体イムノトキシン anti-Tac(Fv)-PE38 の単一鎖抗体可変部を Fc に連結した融合タンパク質[anti-Tac(Fv)-Fc] をリポソームに結合させたイムノリポソームを作製した。anti-Tac(Fv)-Fc をコードする発現ベクターを作製し、HEK293T 細胞に導入した後、適当な時間に培地を回収し、プロテイン A アフィニティーカラムを用いてタンパク質を精製した。精製タンパク質をリポソームに化学修飾により結合させ、anti-Tac(Fv)-Fc イムノリポソームを調製した。次に、anti-Tac(Fv)

に水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-G) の膜貫通ドメインを連結し、細胞膜結合型の融合タンパク質[anti-Tac(Fv)-VSV-G] をコードするバキュロウイルス発現ベクターを作製した。このベクターを昆虫の Sf9 培養細胞に導入し、anti-Tac(Fv)-VSV-G を含むウイルスベクターを作製し、ベクターとリポソームを融合することにより、anti-Tac(Fv)-VSV-G を持つプロテオリポソームを調製した。結合アッセイのためには、種々の濃度のイムノリポソームあるいはプロテオリポソームをヒト IL-2R α をコートした 96 well に添加し、ELISA により測定した。また、細胞への導入のために、ヒト IL-2R α を発現する培養細胞株あるいはレンチウイルスベクターを用いて IL-2R α を強制的に発現させた細胞を利用した。

4. 研究成果

anti-Tac(Fv)-Fc をリポソームに結合させたイムノリポソームと anti-Tac(Fv)-VSV-G を持つプロテオリポソームについて、ヒト IL-2R α との *in vitro* 結合活性を ELISA 法によって検討した。いずれのリポソームも非特異的な結合活性があるものの、選択的に IL-2R α に結合する活性を持つことが示された。イムノリポソームあるいはプロテオリポソームは、培養細胞に対して非特異的な吸着率が高いため、物質導入活性を評価するためには *in vitro* での非特異的な結合を抑制する実験条件を検討する必要がある。この目的のために、イムノリポソームあるいはプロテオリポソームを含む溶液（ローダミンで標識）に、anti-Tac(Fv)-Fc を含まないリポソーム（非標識）を種々の濃度で混合することにより、ブロッキング効果について検討した。その結果、非標識リポソームの濃度依存性に非特異的な結合が低下することが明らかとなった。今後、リポソーム内部にナトリウムチャネルあるいはカリウムチャネルに対する阻害剤を封入し、標的の神経細胞に導入することにより、神経活動の制御に応用するこ

とが可能である。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kato, S., Kuramochi, M., Kobayashi, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima M., Watanabe, M., Tsutsui, Y., and Kobayashi, K. (2011) Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. **J. Neurosci.** 31 (47) 17169-17179. 査読有
- ② Sawada, M., Kaneko, N., Wake, H., Inada, H., Kato, Y., Yanagawa, Y., Kobayashi, K., Nemoto, T., Nabekura, J. and Sawamoto, K. (2011) Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. **J. Neurosci.** 31 (32) 11587-11596. 査読有
- ③ Masuda, M., Miura, M., Inoue, R., Imanishi, M., Saino-Saito, S., Takada, M., Kobayashi, K., and Aosaki, T. (2011) Postnatal development of tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in mouse neostriatum. **Eur. J. Neurosci.** 34 (9) 1355-1367. 査読有
- ④ Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Kuramochi, M., Okada, T., Yaginuma, H., Morimoto, K., Shimada, T., Takada, M., and Kobayashi, K. (2011) A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. **Hum. Gene Ther.** 22 (2) 197-206. 査読有
- ⑤ Kobayashi, K., Masuda, T., Takahashi, M., Miyazaki, J., Nakagawa, M., Uchigashima, M., Watanabe, M., Yaginuma, H., Osumi, N., Kaibuchi, K., and Kobayashi, K. (2011) Rho/Rho-kinase signaling controls axon patterning of a specified subpopulation of cranial motor neurons. **Eur. J. Neurosci.** 33 (4) 612-621. 査読有
- ⑥ 小林和人、深堀良二、甲斐信行、岡田佳奈、小林とも子 (2010) 道具的学習と行動制御を研究するモデル実験動物、生体の科学 Vol.61, No.1, pp. 47-52. 査読無

[学会発表] (計 2 件)

- ① 小林和人、分子・細胞標的による脳疾患モデル研究、第 6 回日本統合失調症学会、2011 年 7 月、札幌
- ② 加藤成樹、小林憲太、深堀良二、小林和

人、高頻度逆行性輸送ベクターを利用した視床-線条体路の学習行動における機能の研究、第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会 (神戸) 大会、第 20 回日本神経回路学会大会合同大会)、2010 年 9 月、神戸

[図書] (計 1 件)

- ① Kobayashi, K., Okada, K., and Kai, N. (2012) Functional circuitry analysis in rodents using neurotoxins/immunotoxins. In *Neuromethods, Controlled Genetic Manipulations* (ed. Alexei, M.), chapter 10, pp. 193-205. Humana Press Inc., New York

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 小林 和人

(KOBAYASHI KAZUTO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90211903

