

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890109

研究課題名（和文）神経細胞特異的ターゲティング HDAd を用いた神経因性疼痛への遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文）The engineering of neuron specific targeted helper-dependent adenovirus vectors for the treatment of neuropathic pain.

研究代表者 寺島 智也 (TERASHIMA TOMOYA)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40378485

研究成果の概要（和文）：

- ① gutless ウイルスベクターシステムである helper-dependent adenovirus vectors (HDAd) の作成に必要な 293-cre 細胞および神経細胞に親和性の高いアデノウイルスゲノムを含む helper virus を増幅させるために必要な 293-fiber 細胞の安定した細胞系を確立した。
- ② 一般的な HDAd を作成するために必要な helper virus の大量調整を 293-cre 細胞を用いて行い、helper virus のストックを確保した。
- ③ 神経細胞（後根神経節細胞）特異的な helper virus の作成を 293-fiber 細胞を用いて行い、そのストックを大量に調整した。
- ④ 疼痛治療の目的遺伝子である glutamic acid decarboxylase (GAD) cDNA を含む、HDAd 作成用のベクター-pdelta28-EF-1-GAD-pA を作成した。また、pdelta28-TNF-siRNA ベクターも作成した。
- ⑤ 神経細胞特異的にターゲティングする HDAd システムについて、論文発表するとともに、学会発表も行い、今後の有用性と将来性についても公表、啓蒙を行った。

研究成果の概要（英文）：

- ① We established two stable cell lines, which were 293-cre cells and 293-fiber cells. 293-cre cells continuously expressed cre recombinase, are essential to be produced helper-dependent adenovirus vectors as one of the gutless virus vectors. 293-fiber cells are used to be produced and amplified the helper virus with high affinities against neuronal cells.
- ② We stored much amount of wild type helper virus with 293-cre cells to be produced wild type HDAd.
- ③ We stored much amount of DRG targeting helper virus with 293-fiber cells to be produced DRG targeting HDAd.
- ④ cDNA of glutamic acid decarboxylase (GAD) was subcloned from cDNA library of mouse brain and inserted into pdelta28 vector with EF-1 promoter for HDAd production. (We also produced pdelta28-TNF-siRNA vector for knockdown of TNF-alpha.)
- ⑤ We published the article for selective gene therapy for the neurons with tissue specific targeting HDAd system. And we made the presentation about them at several meeting and propagated the usefulness and the possibilities in future of our studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

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：ウイルス、バイオテクノロジー、再生医学、脳・神経、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は難治性であり、QOLの低下や抑うつを引き起こすことがあり、治療法の開発が急務である。そこで私がペイラー医科大学留学時に開発した組織特異的ターゲティング helper-dependent adenovirus vector (HDAd) を応用できないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、組織特異的ターゲティング HDAd システムを滋賀医科大学にて立ち上げ、ベクター作成に必要な細胞株の安定培養や大量調整、helper virus の大量調整を行うと共に、神経因性疼痛への治療遺伝子 Glutamic acid decarboxylase (GAD) cDNA のクローニングおよび発現ベクター作成、TNF alpha-siRNA 発現ベクター作成を行い、疼痛モデルマウスにて遺伝子治療を行い、新規遺伝子治療法を開発することである。

3. 研究の方法

神経組織特異的 helper virus の作成のために必要な細胞株 (293-fiber 細胞) (神経細胞にしか親和性を持たないウイルスを増幅するためには、特殊な細胞株が必要) の大量調整を行う。その後、その細胞を用いて、神経細胞特異的ターゲティング helper virus を作成。さらに、cre-loxp システムを用いた gutless virus vector の作成術により、神経細胞特異的 HDAd を作成する。

次に、治療遺伝子として候補である GAD cDNA および TNF-siRNA のクローニングおよび調整を行い、プロモーター (EF-1) ベクターへの挿入およびアデノウイルス様のパッケージング信号を含んだ 28kbp の stuffer gene で構成された pdelta28 ベクターにプロモーター+発現遺伝子 (GAD or TNF-siRNA) を挿入する。この pdelta28-EF-1-GAD-pA (or

TNF-siRNA) より一般的な GAD 発現 HDAd を作成し、神経細胞特異的 HDAd と組み合わせ、目的の神経細胞特異的 GAD 発現 HDAd の作成を行う。

調整したウイルスベクターを疼痛モデルマウスに投与し、痛覚過敏の改善を温熱刺激、痛み刺激にて評価し、治療法の判定を行う。

4. 研究成果

滋賀医科大学にて組織特異的ターゲティング HDAd を立ち上げるのに必要である 293 細胞、293-cre 細胞、293-fiber 細胞の細胞ラインを樹立、安定させることができた。

次に、293 細胞を用いて、helper virus の大量調整 (一般的な親和性の HDAd の調整に必要) を行い、293-fiber 細胞を用いて、神経細胞特異的 helper virus の大量調整を終了した。

治療遺伝子である GAD cDNA のクローニングは、pseudo gene (非常に相同性の高い異なった遺伝子) の存在のため、難航し、当初の予定よりも時間を要したが、最終的にはフルシーケンスにて変異のない cDNA のクローニングに成功した。また、TNF-siRNA 用のベクター作成も終了し、いずれも pdelta28 のベクターに挿入を終えた。

現在、神経細胞特異的ターゲティング GAD 発現 HDAd ベクター作成の最終段階に来ており、当ウイルスベクターの増幅中であり、近日中に動物投与可能量の確保が見込まれる。

今後、ウイルスベクターを疼痛モデルマウスに投与する予定であり、動物の準備もできている状態である。

GAD cDNA のクローニングに予定以上に時間を費やしたため、動物実験直前にて研究期間が終了したが、継続して検討を行う方針である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

(1) Sharma R, Buras E, Terashima T, Serrano F, Massaad CA, Hu L, Bitner B, Inoue T, Chan L, Pautler RG. Hyperglycemia induces oxidative stress and impairs axonal transport rates in mice. PLoS One, 5, e13463, 2010, 査読あり

(2) Terashima T, Oka K, Kritz AB, Kojima H, Baker AH, Chan L. DRG-targeted helper-dependent adenoviruses mediate selective gene delivery for therapeutic rescue of sensory neuropathies in mice. J Clin Invest, 119, 2100-112, 2009, 査読あり

(3) Sakai K, Tiebel O, Ljungberg MC, Sullivan M, Lee HJ, Terashima T, Li R, Kobayashi K, Lu HC, Chan L, Oka K. A neuronal VLDLR variant lacking the third complement-type repeat exhibits high capacity binding of apoE containing lipoproteins. Brain Res, 1276, 11-21, 2009, 査読あり

[学会発表] (計4件)

(1) Tomoya Terashima, Kazuhiro Oka, Angelika B Kritz, Hideto Kojima, Isamu Yamakawa, Hiromichi Kawai, Mitsuru Sanada, Andrew H Baker and Lawrence Chan. ENGINERING DRG-TARGETED HELPER-DEPENDENT ADENOVIRUSES FOR SELECTIVE GENE DELIVERY. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 (2010. 7. 1-2) 栃木

(2) 寺島 智也, Kazuhiro Oka, Angelika B. Kritz, 小島 秀人, 山川 勇, 川合 寛道, 真田 充, 片山 由理, Andrew H. Baker, Lawrence Chan. DRG-targeted helper-dependent adenovirus vectorによる感覚神経選択的遺伝子治療. 第51回日本神経学会総会 (2010. 5. 21) 東京

(3) 寺島 智也, Kazuhiro Oka, Angelika B. Kritz, 小島 秀人, 山川 勇, 川合 寛道, 真田 充, 片山 由理, Andrew H. Baker, Lawrence Chan. マウス後根神経節標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターによる感覚神経細胞障害の選択的遺伝子治療. 第9回日本再生医療学会総会 (2010. 3. 19) 広島

(4) Tomoya Terashima, Kazuhiro Oka, Angelika B Kritz, Hideto Kojima, Andrew H Baker, Lawrence Chan. Engineering DRG-t

argeted helper-dependent adenoviruses for selective gene delivery. 第19回世界神経会議 (World Congress of Neurology) (2009. 10. 28) タイ王国

[その他]

滋賀医科大学ホームページ

[http://www.shiga-med.ac.jp/education/newresearch/2009\\_terashima.html](http://www.shiga-med.ac.jp/education/newresearch/2009_terashima.html)

ベイラー医科大学ホームページ

<http://www.bcm.edu/news/item.cfm?newsID=1467>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 智也 (TERASHIMA TOMOYA)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40378485