

脳卒中に対する遺伝子治療の現状と将来

林 健, 阿部 康二

要 旨

遺伝子導入による脳梗塞治療にはさまざまな報告があり, 使用するベクター, 導入する遺伝子も多岐にわたる. 細胞内にて機能するタンパクであるがゆえに遺伝子導入でしか効果が期待できないケースのほかに, 脳内での安定した発現を目的として遺伝子治療を選択することもある. 実際に臨床応用するためには超えるべき障壁も大きい, 実験脳梗塞においては有効であったという報告も多く, 将来的には有効な治療法になる可能性が考えられる.

(脳循環代謝 16: 167~172, 2004)

キーワード: 遺伝子治療, アデノウイルス, ベクター, グリア細胞由来神経栄養因子

1. はじめに

実験脳梗塞においては多くの物質が神経障害を軽減することが分かっており, 臨床との discrepancy を多くの人が感じている. ここに示す遺伝子治療などは, もっともその discrepancy が大きい治療法であろう. おそらくこれが臨床応用されるには, まだ大きな障壁があると思われる. それではなぜ遺伝子治療なのであろうか. ひとつには, ある種の治療的介入は細胞内でタンパクを発現させることでしか行い得ない点があげられる. heat shock protein (HSP) などは細胞質で作用を發揮するタンパクであり, BCL-2 などミトコンドリアにて作用を發揮するタンパクである. また, もう一点としては, 治療的製剤の脳内頻回投与回避があげられる. 遺伝子導入により脳内で恒常的にタンパクが発現されれば, 頻回に脳内投与する必

要がなく, 少ない侵襲で大きな治療効果が得られることが予想されるのである¹⁾.

2. ベクターの種類とその特性

遺伝子治療にあたっては, いかなる遺伝子を導入するかということも重要なことであるが, どのようなベクターを用いるかも大切なことである. 今回は, 脳梗塞治療の目的のみに開発されてきたわけではないベクターも, ここで概観することとする.

i) DNA 直接注射

DNA または RNA を直接組織に注射するという方法でも, 遺伝子を *in vivo* で導入できる. これは脳では行われてはいないが, 筋肉や肝臓にて行われている²⁾. プラスミドに組み込んだ DNA をマウス的大腿四頭筋に注射すると, そこで導入遺伝子が発現する.

ii) リポソーム

リポソームは毒性が低く, 免疫応答を起こしにくいことが特徴としてあげられるが, 遺伝子導入

においてはその効率が低いのも事実である。

より導入効率を上昇させるために、種々のリポフェクション法が開発されてきた。正電荷脂質をもちいたリポソームでDNA-リポソーム複合体を作ると、細胞に効率的にDNAが取り込まれることが判明し、培養細胞における遺伝子導入に有効な方法となった³⁾。さらに、不活化したセンダイウイルスとリポソームを融合させることで、封入されたDNAがライソソームで破壊されずに利用されることもわかってきた。

ウイルスベクターと比較すると本法の*in vivo*での利用はあまり有効でないのは事実であるが、今後さらに効率的なりポフェクション法が開発されることが望まれる。

iii) アデノウイルス

アデノウイルスは、*in vivo*における遺伝子導入にもっとも広く用いられているベクターである。非分裂細胞にも遺伝子導入することが可能であることから、神経細胞への遺伝子導入にも有効である。

アデノウイルスの問題点の一つとして、細胞毒性と免疫応答惹起があげられる。染色体の中に組み込まれるわけではないので、突然変異を生じて増殖性疾患の原因になることはないが、感染細胞を死に至らしめることがあることが知られている。しかしこの点に関しても、さまざまな改善型アデノウイルスベクターが作成されており、少しずつ克服されていくようである⁴⁾。実際、われわれが砂ネズミ脳においてアデノウイルスを海馬に投与した実験では、TUNEL法により検出される細胞死はあまり大きな問題とはならないであろうことが示唆されている⁵⁾。

iv) アデノ随伴ウイルス

このウイルスは複製にヘルパーウイルスを必要とするため、作成が煩雑であり、また、作成の段階にて利用したアデノウイルスが混入してしまう危険性があるというデメリットを持っている。さらに、小型のウイルスであり、導入できる遺伝子の大きさに制限があることも問題点である。一方、本ウイルスは非病原性ウイルスであり比較的安全であること、また、非分裂細胞にも遺伝子導入で

きることなどがメリットである⁶⁾。また、遺伝子が宿主DNAに組み込まれるため、長期的な遺伝子発現が期待できることも、時には大きな利点となるであろう。実際、パーキンソン病モデルラットにおいて本ベクターを利用して線条体に遺伝子導入すると、その症状を改善させることが報告されている⁷⁾。将来的な可能性の大きい方法であると思われる。

v) レトロウイルス

本ウイルスは、感染による細胞障害性が低い、導入遺伝子が長期にわたり発現する、といった特徴を有する⁸⁾。しかし、神経細胞のような非分裂細胞に効率的に感染するものではないため、脳梗塞治療に対して用いられたとは報告がない。

3. 導入遺伝子が虚血脳にて翻訳されるか否か

虚血後の脳においてはタンパク翻訳が障害されているため、遺伝子を導入してもそれがタンパク産成につながらず、治療的効果が期待できない可能性が考えられる。われわれは、非分裂細胞にも効率的に遺伝子を導入できるアデノウイルスを使用して、虚血後脳における導入遺伝子の発現を検索した。

ラット中大脳動脈永久または一過性閉塞モデルを用い、永久閉塞モデルにおいては閉塞直後に、一過性閉塞モデルにおいては再灌流直後にlacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスを大脳皮質実質内に注射し、 β -galactosidase活性を観察、投与後の外来遺伝子発現を検索した。その結果を図1に示す⁹⁾。コントロール群の脳においては、ベクター投与8時間後から導入遺伝子の発現が認められ、その後次第に増加していった。永久閉塞群においては、8時間後から導入遺伝子の発現は見られたが、コントロール群に比較するとその程度はやや少ないようである。これは、虚血時にはタンパク合成が障害されていることを反映しての結果であると考えられる。一方、一過性閉塞後脳においては、ベクター投与2日後まで導入遺伝子の発現は認められなかった。これは、再灌流に伴うカ

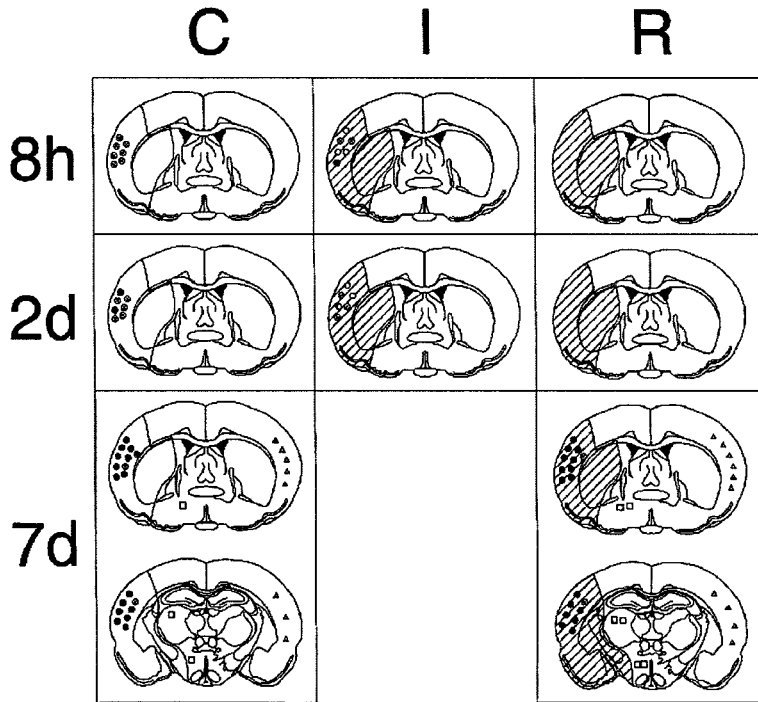


図1. 正常脳, 一過性局所虚血脳, 永久局所虚血脳における *LacZ* 遺伝子の発現変化 (文献9より). 正常脳においてはベクター投与後8時間より導入遺伝子の発現を認め, 以後7日後までやや増加しつつ発現は持続した. また, 7日後には対側の皮質でも発現を認めた. 一方, 永久閉塞モデルラットにおいては, 8時間後と2日後に導入遺伝子の発現を認めたが, 非虚血ラットに比べやや発現量は少なかった. 一過性中大脳動脈閉塞ラットにおいては, 2日後まで導入遺伝子の発現を認めなかったが, 7日後になって強い発現を認めた. また, 対側の皮質にもわずかながら発現を認めた. これらのことより, タンパク合成が抑制されている虚血脳においても, 遺伝子導入が成立することが明らかとなった.

ルシウム細胞内流入がタンパク合成を抑制しているからであると思われる. しかし7日後には明らかな遺伝子の発現が認められた. この頃になると, タンパク合成能が回復していることを示唆している. いずれにせよ, 虚血性障害後の脳においても導入遺伝子の発現は認められ, 遺伝子治療も可能であると考えられた.

4. 具体的な治療実験の成果

導入することにより虚血性障害を軽減すると考えられる遺伝子にはさまざまなものがあるが, ここでは今までにあった代表的な報告の概略を列記

することとする.

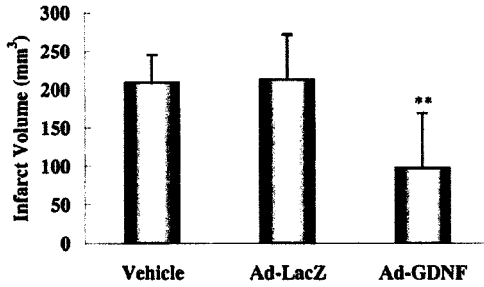
i) HSP 72

HSP 72 は細胞内で作用するため, タンパクとして投与することで治療効果を期待することはできない. Yenari らは, ヘルペスウイルスをベクターに用い, 線条体に HSP 72 遺伝子を導入し, ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて線条体神経細胞死が有意に抑制されることを報告した¹⁰⁾.

ii) IL-1 ra

Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1 ra) タンパクが虚血性脳障害の軽減に有効であることより, その遺伝子導入による脳保護が実験的に試みられ, 有効であることが報告されている¹¹⁾. アデ

A



B

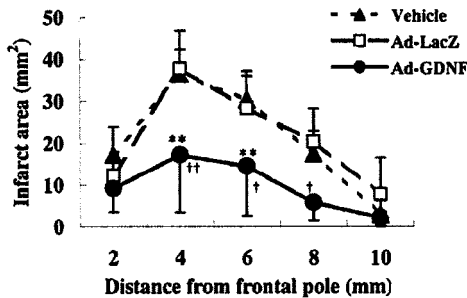


図2. アデノウイルスベクターを用いた *GDNF* 遺伝子導入による脳梗塞縮小効果について (文献 13 より). A. 虚血 1 日前の *GDNF* ベクター投与により, 脳梗塞体積は有意に縮小する. 同じアデノウイルス投与でも, *lacZ* 遺伝子の導入では脳保護効果は認められない (** $P < 0.01$). B. 梗塞面積の測定では, 全スライスにおいて梗塞面積の縮小を認める (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus vehicle group; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ versus Ad-LacZ group).

ノウイルスに IL-1 ra 遺伝子を組み込み, 脳室内に投与すると, 髄液および脳実質において IL-1 ra 濃度が上昇する. その状態でラット中大脳動脈閉塞を生じさせると, コントロール群に対し梗塞巣が有意に小さくなったのである. しかし, 本実験ではウイルス投与 5 日後に梗塞を起こさせており, 臨床応用のためにはまだ越えるべきハードルも大きいものと思われる.

iii) BCL-2

虚血性神経細胞死にはアポトーシスのメカニズムも関与していると考えられている. アデノウイルスに bcl-2 遺伝子を組み込み, ラット脳の線条体に注入, 中大脳動脈閉塞を行い線条体の神経細胞

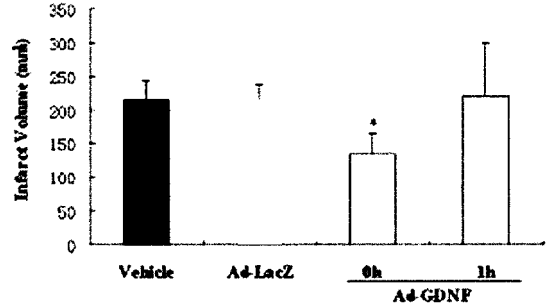


図3. アデノウイルスベクター投与時期と脳保護効果について (文献 14 より). *lacZ* 遺伝子の導入では脳梗塞縮小効果は認められないが, *GDNF* 遺伝子を再灌流直後に導入すると脳梗塞体積が縮小した. しかし, 再灌流 1 時間後のベクター投与では脳保護効果は統計的には認められなかった (* $p < 0.05$). *GDNF* 遺伝子導入での therapeutic time window は本モデルでは 1 時間以内と考えられる.

胞死を比較した¹²⁾. すると, 虚血再灌流後にベクターを投与したにもかかわらず, 有意に神経細胞死を抑制した. 本実験で得られた結果は障害後の投与でも有効であった点が特徴的であり, 将来の脳卒中治療に途を開く可能性があるものと思われる.

iv) GDNF

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は虚血性神経障害を軽減することが知られているが, われわれは本遺伝子をアデノウイルスに組み込み脳実質内に投与することでもラット局所虚血モデルによる脳梗塞を縮小できることを発見した¹³⁾. 図2にこの結果の一部を示す. *lacZ* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与した脳に比較して, *GDNF* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与した脳では, 梗塞巣が縮小していることがわかる.

5. 遺伝子治療の therapeutic time window

Neuroprotection を目指した遺伝子治療の場合, その therapeutic time window は限られてくると考えられる. われわれは, 前述したアデノウイルスを利用した *GDNF* 遺伝子導入モデルを用

い, その therapeutic time window を検索した.

結果を図3に示す¹⁴⁾. 前述の研究から虚血前にベクター投与を行った場合梗塞巣を小さくすることが分かっていたが¹³⁾, 再灌流直後の投与でも脳梗塞縮小効果があることが判明した. しかし, 再灌流1時間後の投与では梗塞巣は縮小せず, therapeutic time window はこのモデルでは再灌流1時間以内であることが明らかとなった.

6. おわりに

脳は血液脳関門を設け, 種々の外来物の侵入を阻止しているが, これはひとたび疾病に陥った時に治療を困難にしている一つの要因ともなっている. 種々のベクターも, ただ血管内に投与しただけでは脳実質にはほとんど入っていかない. 今までの実験的な報告も脳室内, 脳実質内にベクターを投与しているものがほとんどであり, 脳梗塞というのが非常に多い疾病であることを考えるとデリバリーシステムのさらなる改善が望まれるところである.

文 献

- 1) Abe K : Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 : 1393-1408, 2000
- 2) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL : Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247 : 1465-1468, 1990
- 3) Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M : Lipofection ; a highly efficient lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 7413-7417, 1987
- 4) Yeh P, Dedieu JF, Orsini C, Vigne E, Deneffe P, Perriaudet M : Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 region from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 function unit. *J Virol* 70 : 559-565, 1996
- 5) Kitagawa H, Setoguchi Y, Fukuchi Y, Mitsumoto Y, Koga N, Mori T, Abe K : Induction of DNA fragmentation and HSP 72 immunoreactivity by adenovirus-mediated gene transfer in normal gerbil hippocampus and ventricle. *J Neurosci Res* 54 : 38-45, 1998
- 6) Podsakoff G, Wong KK Jr, Chatterjee S : Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* 68 : 5656-5666, 1994
- 7) Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, Durning MJ : Long-term gene expression and phenotypic correlation using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genet* 8 : 148-154, 1994
- 8) Miller AD : Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 158 : 1-24, 1992
- 9) Abe K, Setoguchi Y, Hayashi T, Itoyama Y : In vivo adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemia and reperfused rat brain. *Brain Res* 763 : 191-201, 1997
- 10) Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, Onley D, Ho DY, Sapolsky RM, Steinberg GK : Gene therapy with HSP 72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 44 : 584-591, 1998
- 11) Betz AL, Yang GY, Davidson BL : Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 15 : 547-551, 1995
- 12) Lawrence MS, McLaughlin JR, Sun GH, Ho DY, McIntosh L, Kunis DM, Sapolsky RM, Steinberg GK : Herpes simplex viral vectors expressing bcl-2 are neuroprotective when delivered after a stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 740-744, 1997
- 13) Kitagawa H, Sasaki C, Sakai K, Mori A, Mitsumoto Y, Mori T, Fukuchi Y, Setoguchi Y, Abe K : Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 : 1336-1344, 1999
- 14) Zhang WR, Sato K, Iwai M, Nagano I, Manabe Y, Abe K : Therapeutic time window of adenovirus-mediated GDNF gene transfer after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Brain Res* 947 : 140-145, 2002

Abstract

Gene therapy for stroke-present state and future possibility

Takeshi Hayashi and Koji Abe

Department of Neurology Okayama University Graduate School of Medicine
and Dentistry 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558 Japan

Ample evidence suggests that gene therapy can be an innovative means therapy for stroke. Various kinds of vectors as well as many gene products have been tried and proven to be useful. In some cases, gene delivery needs to be employed because certain proteins exert their effects only within the cells. In other cases, gene therapy is exploited in order to avoid frequent intracranial injection. There still are lots of difficulties to be overcome before gene therapy becomes clinically available, but this innovative therapy can be a useful choice for treating stroke in the future.

Key words : gene therapy, adenovirus, vector, glial cell line-derived neurotrophic factor