

脊髄前角ターゲティング HdAD を用いた
筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療法の開発

[課題番号 16590822]

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金 (基礎研究 (C))

研究成果報告書

平成 18 年 6 月 5 日

研究代表者 安田 齋

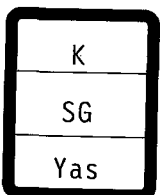
滋賀医科大学医学部教授

[16590822]
基礎研究 (C)

脊髄前角ターゲティング HdAD を用いた
筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療法の開発

滋賀医科大学医学部
安田 齋
教授

平成十八年六月





2005014911

はしがき

近年、種々の臓器・細胞特異的なペプチドの存在が報告されている。特に癌治療の領域で組織特異的なペプチドを用いた治療が試みられている。しかし、神経領域ではごく少数である。本研究は神経難病である筋萎縮性側索硬化症の治療として、前角細胞特異的なペプチドを結合させた遺伝子治療ベクターを作製し、神経栄養因子などの種々の神経保護作用を有する因子を細胞内に導入し遺伝子治療を行わんとするものである。

研究組織

研究代表者 安田 斎 (滋賀医科大学医学部教授)
研究分担者 小島秀人 (滋賀医科大学医学部助教授)
研究分担者 前田憲吾 (滋賀医科大学医学部助手)
研究分担者 川合寛道 (滋賀医科大学医学部助手)

交付決定額〔配分額〕

〔金額単位：円〕

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,500,000	0	2,500,000
平成17年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究発表

(1) 口頭発表

大井二郎、寺島智也、安田斎、藤宮峯子、小島秀人、木村博：脊髄後根神経節ニューロンを標的とした遺伝子ベクターの作成. 第4回日本再生医療学会総会、平成17年3月

研究成果

1. 脊髄後根神経節ニューロンに特異的な配列ペプチドの同定

①脊髄前角細胞のターゲティングを最終目的としているが、並行して既に培養技術を習得している脊髄後根神経節(DRG)ニューロンを用いて標的ペプチドの探索技術の獲得を目指した。

②7桁のランダムなペプチド配列を含む phage display peptide library (Ph.D.-CX7C kit)を利用して DRG 特異的なペプチド配列の候補ペプチド A,B,C を得た。

③mouse に候補ペプチドを含むファージを静注し抗ファージ抗体を用いて DRG を免疫染色することによりペプチド A のみが DRG に染色性を示し特異的と考えられた。

次に、neuro2A(neuroblastoma cell line)、HEK293, mouse proximal tubular cell, opossum kidney などの DRG 以外の細胞を用いた subtractive panning protocol を5回繰り返してファージ数の増幅を行う方法にも候補ペプチドの同定を行い候補ペプチド D,E,F を得た。培養細胞に候補ペプチド配列を含む phage を孵置した後、固定し免疫染色を施行した。ペプチド D を含む phage を投与したとき DRG のみで染色され peptide D が DRG 特異的なものと考えられた。

2. 脊髄後根神経節ニューロンに対する遺伝子治療ベクターの開発

ファージを用いた研究が文部科学省の方針により中断している間、ペプチド配列を用いずに行う方法として、脊髄後根神経節ニューロンに対して親和性を有するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた検討を行い、マウス神経組織より PCR 法によりクローニングした神経成長因子ならびにエリスロポイエチン遺伝子に CMV プロモータならびに polyA を接着し、シャトルベクターを作成した。この配列は AAV 作成に際し、組み込める適正容量より小さいことから、stuffer を作成し、現在ベクター作成の最終段階にある。今後、動物モデルを用いた治療研究に移る準備状態にある。