

様式 C 18

# 研究成果報告書

---

AAVベクターを用いた糖尿病性神経障害に対する新規遺伝子治療

---

18590934

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金

( 基盤研究 (C) ) 研究成果報告書

平成20年 6月

研究代表者 安田 斎

滋賀医科大学医学部教授

滋賀医科大学附属図書館



2007015698

## <はしがき>

糖尿病性神経障害(DN)の発症には代謝障害、血流障害、酸化ストレス等の多彩な因子が関与するとの仮説に基づき、多様な作用点を有する薬物が開発されてきた。しかし、推奨される薬物はいまだ見つかっていない。近年、エリスロポエチン(Epo)をはじめとして、細胞の増殖分化因子の有効性が報告され、その作用メカニズムの解明に注目が集まっている。研究の全体構想として、糖尿病性神経障害の真の原因をつきとめ、進行性の病態から回復させるための治療法の開発を目的とする。我々はこれまでに糖尿病モデル動物を使った研究から、骨髄由来の異常細胞が脊髄後根節(DRG)ならびに末梢神経に遊走・浸潤し、ニューロンや軸索・シュワン細胞と細胞融合することにより神経機能異常が惹起することを見いだした。本研究では DRG ニューロンにおける異常な細胞融合に焦点を当て、ファージ・ディスプレイならびにバイオパンニングを使用した標的細胞特異的な治療システムを作成し、DN に対する新しい遺伝子治療法の開発を目的とする。

当初、本研究の目的であるファージ・システムを用いたベクターの作成を計画したが、平成14年文部科学省より組換え DNA 実験指針により、ファージの実験が大臣承認実験の範疇に入っていることから、書類を提出し、その間、AAV を用いた研究に変更した。しかし、AAV では治療ベクターの標的化ができず、また、遺伝子発現能も劣ることから、研究は困難を極めた。一方、平成18年研究開発二種告示により、ファージを用いる実験が大臣承認不要で P1 扱いとなり、ファージ・ライブラリーを用いたバイオパンニングによる DRG ニューロンを標的とする 7 桁ペプチドの採取を開始し、in vitro にて DRG ニューロン特異的に結合できる 3 種類の 7 桁ペプチド(DRG1、DRG2、DRG3 と命名)の採取に成功した。

以上より、方法を AAV ベクターからファージベクターの作製へと変更したが、目的達成のためのベクター作りは着実に進行しており、現在も引き続き新たな治療法の開発を進めている。

## 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准教授)

**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18年度	2,200,000	0	2,200,000
平成19年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	390,000	3,890,000

## 研究発表

### (1) 雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名等)

【雑誌論文】 計(1)件

著者名	論文標題			
Oi J, Terashima T, Kojima H, Fujimia M, Maeda K, Arai R, Chan L, Yasuda H, Kashiwagi A, Kimura H	Isolation of specific peptides that home to dorsal root ganglion neurons in mice			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Neuroscience Letters	有り	434	2 0 0 8 	266-272

### (2) 学会発表 (発表者名、発表標題、学会等名等)

無し

### (3) 図書 (著者名、出版社名、書名等)

無し

研究成果による産業財産権の出願・取得状況  
なし

## 研究成果

【研究目的】糖尿病性神経障害の新しい治療法として、神経細胞内で長期間安定した遺伝子発現を可能とする脊髄後根神経節(DRG)ニューロン特異的なファージベクターの作成を試みる。

【研究実施計画】①New England Biolabs 社製 Ph.D.C7C Phage Display Peptide Library を用いて、DRG に特異的に接着する 7 桁ペプチドを採取し、この配列を phage vector pIII サイトに付加し、DRG 特異的に接着できるベクターを作製する。②マウスより EPO および NGF など糖尿病性神経障害に有効とされる成長因子の RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を作製し、これにプロモータならびに polyA を接着して発現遺伝子システムを作製し、ファージベクターに組み込む。STZ 糖尿病マウスを用いて、糖尿病性神経障害に対する治療効果を検討する。また、同時に、神経障害性のサイトカインである TNF $\alpha$  の発現抑制をねらって、RNAi を用いたノックダウンも試みる。

【研究成果(内容、意義、重要性)】①Phage Display Peptide Library を用いた *in vitro* バイオパンニングにより、87 種類の DRG ニューロンに親和性を有するペプチド配列を抽出した。この配列のうち 3 種類を用いて、DRG ニューロンに対する特異性を *in vitro* ならびに *in vivo* で検討し、有用性を明らかにした(後述の論文に詳細を記載)。次に、ファージベクターの作製を行い、緑色蛍光色素(GFP)を発現する遺伝子配列をこれらのベクターに組み込み、*in vivo* にて、遺伝子発現の効率を観察している(現在継続中)。②EPO、NGF ならびに TNF $\alpha$  の RNAi を用いて、発現システムを作り上げた。ベクター作製の完成までには今しばらくの努力が必要であるが、これらの結果は異常骨髄細胞ならびに病的神経細胞を標的とする遺伝子治療を計画することが可能であることを意味しており、現在開発を進めている。

以上の結果は論文として公表しており、添付する。