

論文の内容の要旨

アデノウイルスベクターによる脊髄損傷治療に関する基礎的研究

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 三浦俊樹

[目的] 成熟哺乳動物の中樞神経では、一旦損傷された神経軸索の再生はほとんどおこらないとされているが、再生がおこらないメカニズムはまだ十分には解明されていない。近年、培養神経細胞を用いて神経栄養因子による細胞内シグナル伝達経路の解明が進み、神経栄養因子による神経突起伸長に古典的 MAPキナーゼ系である Ras-Raf-MEK-ERK 系の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。本研究の目的は、アデノウイルスベクターを用いた恒常活性型の MEK1 遺伝子の導入によって神経細胞における extracellular-signal-regulated kinase (ERK)の活性化を誘導し、これによって神経細胞の軸索再生を促し、脊髄損傷の治療を図ることである。

[方法] β -ガラクトシダーゼ遺伝子、あるいは MEK1 の 218 番目と 222 番目のセリンをグルタミン酸に置き換えた恒常活性型 MEK1 変異体遺伝子を組み込んだ非増殖型アデノウィルスベクター（各々 LacZ ウィルス、CA-MEK ウィルス）は COS-TPC 法で作製した。CA-MEK ウィルスの生物学的活性の *in vitro* での検討はラット褐色細胞腫由来の細胞株である PC12 細胞を用いて行った。MEK の過剰発現および MEK の下流にある ERK1 および ERK2 の発現とリン酸化を、各々抗 MEK 抗体、抗 ERK 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体を用いたウェスタンブロットティング法で確認後、遺伝子導入による PC12 細胞の神経突起伸長への効果を検討した。次に、5 から 6 週令の雄 SD ラットの第 10 胸髄完全切断モデルを用いてアデノウィルスベクターによる遺伝子導入の *in vivo* での検討を行った。脊髄切断部断端に LacZ ウィルスあるいは CA-MEK ウィルスを注入した後、経時的に灌流固定し、脳と脊髄の凍結切片を作製した。LacZ ウィルス感染後の β -ガラクトシダーゼ活性、CA-MEK ウィルス感染後の ERK のリン酸化は各々 X-gal 組織染色、抗リン酸化 ERK 抗体による免疫染色により検討した。脊髄損傷ラットを切断直後に CA-MEK ウィルスを注入した群（CA-MEK ラット、n=11）、LacZ ウィルスを注入した群（LacZ ラット、n=8）、何も加えなかった群（Tx ラット、n=8）に分け、下肢運動機能を週 1 回、切断後 6 週まで BBB open field locomotor rating scale を用いて評価した。観察終了後、再切断実験、WGA-HRP による軸索の順行性標識実験、あるいは電気生理学的解析を行った。

[結果] PC12 細胞に CA-MEK ウィルスを感染させると神経栄養因子の刺激なしに ERK の活性化が誘導され、神経突起伸長がおこった。また、若年ラットの脊髄完全切断モデルでは CA-MEK ウィルスを切断端に注入すると、注入部近傍のみならず脳内の赤核などの神経核の神経細胞でも ERK の活性化が誘導された。CA-MEK ウィルスの投与により完全切断後の下肢機能は 2 週後から LacZ ラッ

トや Tx ラットに比べて有意に回復した。この回復は再切断により失われた。WGA-HRP を用いた順行性標識では切断部を越えて軸索が標識されることを確認した。更に、下肢機能が回復した CA-MEK ラットでは切断部を越えて脊髄誘発電位が記録された。

[考察] アデノウイルスベクターを用いることで神経細胞に *in vitro* のみならず *in vivo* でも遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。CA-MEK ウイルスの注入による脊髄完全切断ラットの下肢機能回復は、赤核などの運動神経細胞で CA-MEK 遺伝子導入により軸索の再生が促進され、下行路が機能的にも再結合したためと考えられた。これらの結果は、軸索再生能力を賦活化させることによって自発的な回復の見込めない成体哺乳動物の脊髄損傷を回復させることが可能であることを示している。今後神経細胞の細胞内シグナル伝達経路の詳細な検討によって、さらに有効な治療法の開発が期待される。