

Title	アデノウイルスベクターを用いた疑核へのGDNF遺伝子導入による運動ニューロン脱落防止効果の検討
Sub Title	
Author	齋藤, 康一郎(Saito, Koichiro)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.4 (2003. 12) ,p.13-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20031202-0013">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20031202-0013</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# アデノウイルスベクターを用いた疑核へのGDNF遺伝子導入による 運動ニューロン脱落防止効果の検討

齋藤 康一郎

## 内容の要旨

反回神経麻痺患者は、嗄声、嚥下障害、呼吸困難といった症状に悩まされる。現状では静的に声帯位を変える術式が主体で、これは発声、嚥下、呼吸すべての機能を理想的に回復させる術式とはいえない。声帯の再運動化ができれば問題を解決できると考えられるが、神経吻合術は術後の声門閉鎖筋と開大筋の過誤支配などの問題のため安定した術式とは認められていない。声帯再運動化が成功していない原因の一つとして疑核運動ニューロンの脱落が関与していると考えられる。本研究では非増殖型アデノウイルスベクターを用いて神経栄養因子の一つであるglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 遺伝子を迷走神経損傷後の疑核に導入し、その効果について検討した。さらに、損傷された運動ニューロンで誘導されるnitric oxide synthase (NOS) および、神経損傷後速やかに免疫反応性が減弱するcholine acetyltransferase (ChAT) に関してもGDNF遺伝子導入の効果を検討した。

12週齢の雄Sprague Dawleyラットの左迷走神経を頸静脈孔にて抜去して疑核運動ニューロン脱落誘発モデルを作製し、ヒトGDNF cDNAあるいは $\beta$ -galactosidase遺伝子を組み込んだ非増殖型組み換えアデノウイルスベクター（順にAxCAhGDNF、AxCALacZ）およびphosphate buffered saline (PBS) を頸静脈孔より投与した。AxCALacZ投与群では、X-gal酵素組織染色により処置側疑核運動ニューロンが明瞭にラベルされた。AxCAhGDNF投与群では、同ニューロンがGDNF免疫染色で明瞭に染色され、RT-PCRにより処置側脳幹組織からヒトGDNF mRNAの発現を認めた。処置後2週と4週の時点で脳幹パラフィン切片にトリジンブルー染色を行い、左右の疑核運動ニューロンを算定して検討したところ、2週、4週とも、AxCAhGDNF投与群では他の二群に比べ、有意に運動ニューロンの脱落が防止されていた。さらにAxCAhGDNF投与により、処置側疑核でのNOS活性誘導の抑制、ChAT免疫反応性の改善を認めた。

本研究により、非増殖型アデノウイルスベクターを用い、迷走神経抜去断端から逆行性軸索輸送にのせて、疑核に遺伝子を導入、発現させることが可能であることが示された。またAxCAhGDNFの投与には、迷走神経抜去による疑核運動ニューロンの脱落を防止し、保護する効果があることが示された。将来的に、迷走神経・反回神経が損傷された症例に対して遺伝子導入を行い、疑核運動ニューロンの脱落を防止する治療を行えるようになる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

反回神経・迷走神経損傷後の疑核運動ニューロンの脱落は、反回神経麻痺治療として理想的な声帯の再運動化不成功の原因の一つと考えられる。そこで本研究ではラット迷走神経抜去による疑核運動ニューロン脱落誘発モデルを用い、非増殖型アデノウイルスベクターによるglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 遺伝子導入の運動ニューロン脱落防止効果を検討した。方法として、X-gal酵素組織染色、GDNF及びChATに対する免疫染色、hGDNFに対するRT-PCR、疑核運動ニューロンの算定及びNADPH diaphorase酵素組織染色を用いた。その結果、GDNF遺伝子の疑核への選択的導入による疑核運動ニューロンの脱落防止・保護効果を認めた。

審査では、まずアデノウイルス-GDNF系の選択について、神経系への導入効率が高いAAVベクターや、運動ニューロンに対する神経保護効果が高いHGFの利用も、今後は検討していく必要があると助言があった。また、蛋白の直接投与でも投与方法によっては有効であるとコメントされた。さらに、GDNFのレセプターに対する理解を問われ、疑核を含む運動神経核で胎生期に発現し、顔面神経核でも神経損傷後に誘導されるGDNF- $\alpha$ 及びRetの関与が推測されると回答した。これに対し、GDNFのレセプターとしてNCAMも働いていること、疑核でのこれらレセプターの誘導及びGDNFの作用機序についても今後は研究を進める必要があると指摘があった。また、X-gal酵素組織染色陽性細胞の割合について質問がなされた。今回は導入効率の詳細な検討は行わなかったが、発現したGDNFはautocrineだけでなくparacrineでも奏功すると考えられ、また細胞数としての導入効率だけでなく、プロモーターの強さなど総合的に効果を高める研究を進める必要があると回答した。ウイルス排除の反応の有無についての質問に対しては、少なくとも4週までトリジンブルー染色による切片を検討した結果では、明らかな炎症細胞浸潤や脳軟化の所見は認めなかったと回答した。これに対し、臨床応用に際しては重要なポイントであり、今後長期的にも詳細な検討が必要であろうとコメントされた。また、本モデルの反回神経麻痺モデルとしての妥当性が問われ、反回神経麻痺の病態とは異なるが、本研究では確実な脱落を誘発するため神経抜去モデルを用いたと回答した。また、今後さらに長期的に、強力に効果を期待できる方法について問われ、ベクターの種類だけでなく、免疫抑制剤の併用や複数のneurotrophic factorの同時導入など検討していく必要があると回答した。

以上、本研究は今後改善、追加すべき点があるものの、反回神経麻痺に対する新しい治療法を確立するための重要な研究であり、臨床的にも価値ある優れた研究と評価された。

論文審査担当者 主査 耳鼻咽喉科学 小川 郁  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
外科学 河瀬 斌  
学力確認担当者：北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成15年9月17日