慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Adenoviral GDNF gene transfer enhances neurofunctional recovery after recurrent laryngeal nerve injury
Sub Title	反回神経障害ラットへのアデノウイルスベクターを用いたGDNF遺伝子導入による喉頭機能回復効果の検討
Author	荒木, 幸仁
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.3 (2006. 9) ,p.4-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060902-0004

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.

Adenoviral GDNF gene transfer enhances neurofunctional recovery after recurrent laryngeal nerve injury

（反回神経障害ラットへのアデノウイルスベクターを用いた
GDNF遺伝子導入による喉頭機能回復効果の検討）

荒　木　　幸　仁

内容の要旨

反回神経障害に起因する音声障害や嚥下困難、誤嚥性肺炎などは、重大なQOL低下をきたす。反回神経再支配による動的な声帯再運動化は、神経損傷後の筋萎縮や運動ニューロンの脱落、神経過誤支配など様々な問題により困難な場合が多い。一方、神経保護作用や神経再生作用を有する様々な神経栄養因子が発見され、神経障害治療への期待が寄せられている。中でもGDNFはin vivoやin vitroにおいて運動神経に対し強力な作用を有することが示されている。近年drug delivery systemとしての遺伝子治療を用い、DNA導入により神経栄養因子を発現させ、一度のベクター投与で長期間、一定レベルの栄養因子を供給する治療の研究が行われている。ラット反回神経挫滅モデルにおけるアデノウイルスを用いたGDNF遺伝子導入による神経機能の回復効果を検討した。

12週齢SDラットの左反回神経挫滅部へのベクター直接注入法にて遺伝子を導入した。治療遺伝子としてヒトGDNF cDNAあるいはレポーター遺伝子としてβ-galactosidase遺伝子を挿入した非増殖型アデノウイルスベクター（順にAxCAhGDNF、AxCALacZ）を作成し、まず神経へのベクター注入による運動神経核（疑核）への外来遺伝子導入の可否を検討した。続いて治療遺伝子（GDNF）導入による神経機能回復効果について、神経伝導速度ならびに声帯可動性の回復を検討し、機能回復の裏付けとなる反回神経の形態学的検討も行った。

疑核における遺伝子発現は、AxCALacZ注入ラットではX-gal組織染色にて、AxCAhGDNF注入ラットではRT-PCR法およびGDNF免疫組織染色により確認した。続いてAxCAhGDNF注入による神経機能回復効果を神経伝導速度にて検討したところ、２週後・４週後ともにControl群（AxCALacZ注入または挫滅のみ）と比較し、統計学的に有意な改善を認めた。また声帯可動性も２週後・４週後ともにControl群（AxCALacZ注入および挫滅のみ）と比較し、統計学的に有意な改善を認めた。２週後のAxCAhGDNF注入ラットおよび神経挫滅ラットの反回神経切断面の軸索径を比較したところ、AxCAhGDNF注入ラットで径の太い軸索を多く認める傾向を示し、平均値において統計学的有意差を認めた。

AxCAhGDNFの注入後、逆行性軸索輸送により疑核でGDNF遺伝子が発現、神経軸索の保護・再生効果を認めた。軸索再生により神経伝導速度は改善し、声帯可動性の早期回復を導き、障害の長期化に伴う喉頭筋の萎縮や疑核運動神経の脱落、運動神経軸索の変性、神経筋接合部の脱落などを防ぎ、良好な喉頭機能の維持が期待された。将来的に、反回神経障害に対しGDNF遺伝子導入により、神経機能改善を目指した治療を行える可能性が示唆された。

論文審査の要旨

反回神経障害に対する理想的な治療は声帯再運動化であるが、再生不良や過誤支配などの問題により、十分な効果は期待できないのが現状である。そこで本研究では反回神経挫滅障害ラットに対し、非増殖型アデノウイルスベクター注入法を用いたヒトglial cell line-derived neurotrophic factor（hGDNF）遺伝子導入による神経機能回復効果について検討した。まずX-gal酵素組織染色、GDNFに対するRT-PCR、GDNF免疫染色にて疑核での外来遺伝子の発現を確認し、反回神経伝導速度測定、声帯可動性観察、および反回神経軸索径測定にて機能を評価した。その結果、反回神経伝導速度および声帯可動性の回復促進を認め、hGDNF遺伝子導入による機能回復効果が示された。

審査においては、まずアデノウイルスベクター注入による発現期間、hGDNFの疑核における発現の強度および経時的変化について質問された。本実験では経時的な検討は行っていないが、他の報告から発現のピークは１週間後、一度の投与で４週間程度の持続的効果を期待できると回答した。また、GDNF蛋白の直接投与との効果の違いについて、一度の投与で長期間の効果が期待できる点で、遺伝子導入の方が効率的と考えられると回答した。疑核におけるhGDNF発現確認法での技術的問題点の指摘があり、ウイルス由来であるか検討が必要であるとの指摘があった。続いてウイルス以外の遺伝子導入法についての質問があり、ウイルスの副作用などの問題もあり、現在非ウイルスベクターを高率に導入・発現させる技術についても検討中であると回答した。また、挫滅モデルの妥当性についての質問があり、同一検者が同一手技で行うことで一定性は保たれると回答した。挫滅後の注入時期、注入部位の違いによる効果の違いについての質問では、臨床応用の場合障害直後のみでなく障害発症後時間が経過後でも効果が期待できるのか、検討すべき課題であるとされた。障害部位への注入による導入効率向上、障害部位以外への追加障害を加えない、またシュワン細胞などへの感染による局所での効果も期待される点から挫滅部への注入は妥当との指摘もあった。また他のベクターや神経栄養因子での検討の必要性も指摘された。本実験結果が示したhGDNFの効果が、神経の再生を促した結果か、神経障害を軽減した結果であるのか、また作用機序が不明でありautocrine、paracrineどちらが作用したか等についてレセプターの発現などを検討し、効果発現のメカニズムの解明が今後の臨床応用には不可欠であるとの意見が述べられた。

以上のように、今後さらに検討を加えるべき点が多く残されているものの、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、神経機能評価という臨床的にも価値ある有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　耳鼻咽喉科学　小川　郁
生理学　岡野　栄之　　解剖学　仲嶋　一範
内科学　鈴木　則宏
学力確認担当者：池田　康夫、岡野　栄之
審査委員長：岡野　栄之

試問日：平成18年4月19日