

## ウイルスベクターを用いたレスキューマウス作出による 遺伝子機能解析法確立とその応用

Establishment and application of lentivector-based  
production of gene-rescue mouse for exploring gene functions

平井 宏和 (Hirai Hirokazu)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要 非分裂細胞である神経細胞への外来遺伝子導入は困難であるが、とくに *in vivo* 神経細胞への導入効率は極めて低い。本研究では、レンチウイルスベクターの生体脳内における性質を解明し、さらに高効率かつ細胞腫特異的に発現させる方法を確立する。その技術を用いて、これまでできなかった遺伝子機能の解明や、遺伝子欠損に起因する障害回復の臨界期研究を行う。

研究分野：総合・新領域系、総合領域、神経科学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路、神経発生・神経発達・神経再生

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターを用いた「遺伝子レスキューマウス」作出による解析は、ポストゲノム時代において汎用性の高い効果的な研究手法となる可能性がある。しかし、そのためにはウイルスベクターを細胞特異的に効率的に感染させ、その細胞で遺伝子発現を効率的に制御できる必要がある。レンチウイルスベクターは神経細胞に比較的親和性があり注目を集めていたが、その性質については多くのことが不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) レンチウイルスベクターの改良と評価  
(i) 標的遺伝子とマーカー (GFP など) 遺伝子の2つの遺伝子の発現を可能にする  
(ii) 5kb以上の遺伝子を発現可能な高力価ベクターを開発する  
(iii) レンチウイルスが細胞選択的に感染する機構を解明する  
(2) レスキューマウス作出による遺伝子機能解明と臨界期の検討  
自然発生 (Hotfoot5J など)、人工 (遺伝子ノックアウト) の運動失調マウスにレンチウイルスベクターを用いて野生型遺伝子を発現させ運動失調のレスキューを試みる。また細胞レベルでは何がどの程度レスキューされているのかを形態学的、電気生理学的に調べる。この実験を通してそれぞれの遺伝子の機能、シグナル伝達様式、臨界期について明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) レンチウイルスベクターの改良  
(i) 標的遺伝子とマーカー (GFP など) 遺伝子の2つの遺伝子の発現  
標的遺伝子と GFP の間に self-cleaving 2A ペプチド (P2A) 配列を挿入する方法を検討する。  
(ii) 5kb以上の遺伝子を発現可能な高力価ベクターを開発する  
これまでの研究でレンチウイルスベクターの Strain が異なると、発現可能な遺伝子サイズや得られるウイルスの力価が異なることを明らかにしている。そこで種々の strain を集めて、比較することで開発する。  
(iii) レンチウイルスが細胞種選択的に感染する機構を解明する  
エンベロープの糖タンパク質を Vesicular stomatitis virus の G タンパク質 (VSV-G) を修飾することで親和性を変化させることができるのかを検討する。  
(2) レスキューマウス作出による遺伝子機能解明と臨界期の検討  
生後 6 日、25 日のミュータントマウス (Hotfoot5J など) の神経細胞に、レンチウイルスベクターを使用して欠損遺伝子を導入し、障害が回復するかを、形態、シナプス機能、行動レベルで解析する。解析はウイルス接種 3 週間後に行う。また、生後 25 日の脊髄小脳変性症 (SCA) モデルマウスのプルキンエ細胞に、変異ポリグルタミン分解タンパク質分解分子 (CRAG) を導入し解析した。

#### 4. これまでの成果

(1) レンチウイルスベクターの改良と評価  
(i) 標的遺伝子とマーカー (GFP など) 遺伝子の2つの遺伝子の発現が可能となった。

レンチウイルスベクターで、P2A 配列を用いて GFP と目的遺伝子の両方を *in vivo* の脳で効率的に発現させることに成功した。

(ii) 5kb 以上の遺伝子を発現可能な高力価ベクターを開発した。

(iii) 生後 0 日のラットの小脳、及び生後 1 日のマウスの小脳にレンチウイルスベクターを接種し、プルキンエ細胞選択的に遺伝子発現させる方法を確立した。

生直後の小脳は未発達で紙のように薄い。また頭も極めて小さく、小脳の位置も大人とかなり違っている。そのため、うまく小脳にウイルスベクターを接種することができなかった。本研究では、頭部固定装置を特注で作成するなど、さまざまな工夫を行い、生後 0 日 (マウスでは生後 1 日) の小脳神経細胞に効率的に遺伝子発現させることが可能となった。また小脳だけでなく、発達期のラット・マウスのさまざまな脳の領域に遺伝子発現が可能となった。

(iv) 高力価レンチウイルスベクターの毒性について詳細に評価した

高力価レンチウイルスベクターの感染が神経細胞の樹状突起発育及び、シナプス機能成熟に与える悪影響について明らかにした。

(2) レスキューマウス作出による遺伝子機能解明と臨界期の検討/遺伝子治療研究

(i) 作成した変性疾患モデルマウス、自然発生の運動失調マウスに見られる障害を、レンチウイルスベクターを用いて分子レベルから大きく改善させることに成功した。

小脳プルキンエ細胞選択的に目的遺伝子と GFP を、高効率で共発現させる方法を確立した。この方法を用いて、(1) SCA モデルマウスのプルキンエ細胞変性を抑え、運動失調を大きく改善させることに成功した

(EMBO Rep. 2008)、(2) プルキンエ細胞に発現する遺伝子の点変異により顕著な歩行障害を示す自然発生運動失調マウスに、正常遺伝子を導入した。これにより、プルキンエ細胞機能を完全に回復させて運動失調を大きく改善させることに成功した (Neurobiol. Dis. 2009)。

ノックアウトあるいは自然の遺伝子欠損マウスに見られるフェノタイプを、生後に脳局所に遺伝子導入することでレスキューさせることができれば、その遺伝子がコードするタンパク質が、ウイルス接種場所において、観察されているフェノタイプの原因であることを証明することができるため、極めて重要な実験結果を提供すると言える。

#### 5. 今後の計画

(1) レンチウイルスが細胞種選択的に感染する機構の解明を行う。

レンチウイルスがどのような修飾を受けると親和性が変化するのかを解明する。

(2) レスキューマウス作出による遺伝子機能解明と臨界期の検討

これまで開発した遺伝子導入技術を用いて、さらに重要な問題の解明を目指す。

#### 6. これまでの発表論文

1. Torashima T, Koyama C, Iizuka A, Mitsumura K, Takayama K, Yanagi S, Oue M, Yamaguchi H, Hirai H\*: Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep* 9(4):393-9, 2008
2. Hirai H\*: Progress in transduction of cerebellar Purkinje cells *in vivo* using viral vectors. *Cerebellum* 7(3):273-8, 2008
3. Torashima T, Iizuka A, Horiuchi H, Mitsumura K, Yamasaki M, Koyama C, Takayama K, Iino M, Watanabe M, Hirai H\*. Rescue of abnormal phenotypes in delta2 glutamate receptor-deficient mice by the extracellular N-terminal and intracellular C-terminal domains of the delta2 glutamate receptor. *Eur J Neurosci* 30(3):355-65, 2009
4. Iizuka A, Takayama K, Torashima T, Yamasaki M, Koyama C, Mitsumura K, Watanabe M, Hirai H\*: Lentiviral-vector-mediated rescue of motor behavior in spontaneously occurring hereditary ataxic mice. *Neurobiol Disease* 35(3):457-65, 2009
5. Sawada Y, Kajiwara G, Iizuka A, Takayama K, Shuvaev AN, Koyama C, Hirai H\*: High Transgene expression by lentiviral vectors causes maldevelopment of Purkinje cells *in vivo*. *Cerebellum* 2010 (in press)

ホームページ:

<http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.html>