

ろ、左腎にだけ、RT-PCRで導入遺伝子由来のmIL-10mRNAの発現を認めた。pCAGGS-IL10群の導入1日後の血清IL-10値は、 $116.8 \pm 19.0$  ng/ml、pCAGGS-IL10/Fcの血清IL-10値は、 $51.0 \pm 9.0$  ng/mlであり、control群値 ( $21.6 \pm 6.2$  pg/ml)に比較し上昇を認め、2週間後まで有意の高値が続いた。導入遺伝子の発現は用量依存性に認められた。本法による腎臓への明らかなtoxicityは、認められなかった。

【結論】経腎静脈的アプローチによりnaked plasmid DNAをマウスの腎臓へ導入する方法を開発した。本法による遺伝子導入は、簡便かつ安全であり、分子量の大きな分泌蛋白でも傍尿細管毛細血管を通過して血中に分泌され、腎は分子量の大きな分泌蛋白のDepotとしても有用である。

## 2 遺伝子治療により合成される蛋白血中濃度のグルカゴンC端側19-29アミノ酸標識を用いた測定法

埜 晴雄・渡辺 律雄・劉 慧  
常 賀・ラファト エルナガー  
阿部 暁・林 学・大倉 裕二  
加藤 公則・小玉 誠・相澤 義房  
丸山 弘樹\*・宮崎 純一\*\*

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
循環器学

同 腎膠原病内科学\*

大阪大学大学院医学系研究科分子  
治療学\*\*

【目的】近年、多くの施設で遺伝治療が検討され、多くの疾患モデルに対する様々な蛋白の評価がなされるようになった。その際、合成された蛋白の血中濃度を測定することが効果や副作用を判定するためにはかならず必要となる。しかし、蛋白によっては測定法が確立されていないものも多く、十分な評価ができないのが現状であった。今回我々は、pCAGGSベクターにグルカゴンC端側19-29アミノ酸を標識として用い、遺伝子治療によって合成された蛋白血中濃度を測定できるか否かを検討した。

【方法】pCAGGS-INF  $\gamma$  rec-IgG<sub>1</sub>Fc-Glucagon

19-29とpCAGGS-INF  $\gamma$  rec IgG<sub>1</sub>FcをPCRにて作成し、Lewisラットの尾静脈からそれぞれ800  $\mu$ gを80ml/kg体重のリンゲル液に溶解し、約15秒で急速静注した。4時間後、8時間後、12時間後に尾静脈から採血し、その血糖値とグルカゴンの濃度を測定し、キメラ蛋白の濃度を求めた。また1日後、3日後、7日後、16日後にもグルカゴン濃度を同様に測定し、キメラ蛋白の濃度を求めた。またINF  $\gamma$  recをCTLA4, IL-13, IL-1 rec antagonist, SLPI signal peptideあるいはIL-18 binding peptideに置換し作成したベクターを同様に急速静注し、それぞれのキメラ蛋白の血中濃度を求めた。

【結論】血漿10  $\mu$ lからの微量検体からグルカゴン濃度が測定可能で、蛋白の血中濃度が容易に計測できると考えられた。この時血糖値は影響を受けず、グルカゴンの生理作用はないと考えられた。また組み込んだ遺伝子の違いにより、血中濃度の推移はかなり異なっており、蛋白のクリアランスに差があることが示唆された。

## 3 ラット心移植モデルにおけるCTLA4Ig遺伝子導入による生着延長効果

竹久保 賢・土田 正則・羽賀 学  
齊藤 正幸・林 純一・埜 晴雄\*  
丸山 弘樹\*\*・宮崎 純一\*\*\*

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
呼吸循環器外科

同 循環器学分野\*

同 内部環境医学講座\*\*

大阪大学大学院医学系研究科幹細胞制御分野\*\*\*

【背景】遺伝子治療においてプラスミドベクターはウイルスベクターに比べ安全性が高い反面、遺伝子の発現の低さが課題であったが、プラスミドDNAを大量の溶液とともに経静脈投与することで目的遺伝子の高い発現を得ることができた。この導入法を用いてラット心移植モデルに対して、T細胞の活性化に関与しているCD28/B7結合の阻害作用を持つCTLA4Igの遺伝子導入を行いその治療効果について検討した。

【方法】雄 LEW ラットをレシピエント、BN ラットをドナーとし、心移植前日にレシピエントに pCAGGS-CTLA4Ig 800 $\mu$ g を 80ml/kg のリンゲル液に溶解し尾静脈より投与した (Group 1). コントロール群 (Group 2), 無治療群 (Group 3) で、移植心の生着期間を観察し、経時的にグラフトを採取し組織学的検討を行った。また、正常 LEW および BN ラット脾細胞を用いて混合リンパ球反応試験 (MLR) を行い、遺伝子導入動物血清を加えることでの反応抑制の有無を検討した。

【結果】移植心拍動停止までの期間は group 2, 3 で 5~7 日であったのに対して、group 1 では 14~100 日超と有意に延長していた。また、組織学的には group 2, 3 でグラフト内に著明な細胞浸潤があるのに対して、group 1 では浸潤の抑制が認められた。MLR では遺伝子導入動物血清を加えたもののみ反応の抑制が認められた。

【考察】従来、ラット心移植モデルに対してウイルスベクターを用いた CTLA4Ig 遺伝子導入治療が行われていたが、プラスミド DNA でもその治療効果が認められた。

#### 4 ラット大腿骨頭壊死モデルを用いた *In vivo* electroporation 法による遺伝子治療実験 —第 2 報—

伊藤 知之・徳永 邦彦・丸山 弘樹\*  
北原 洋・伊藤 雅之・宮崎 純一  
遠藤 直人

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
整形外科  
新潟大学大学院医歯学総合研究科  
内部環境医学講座腎・膠原病内科学分野\*

前回我々は、ラット大腿骨頭内骨組織に対する electroporation 法による遺伝子導入に成功し、その至適条件を決定しました。また preliminary study ではありますが、HGF 遺伝子を大腿骨頭壊死モデルに導入しその組織学的変化をみました。今回はその詳細を報告するとともに、現在未解決である問題について御指導いただければと考えております。

#### 5 *In vivo* electroporation を用いた BMP 遺伝子導入による骨誘導

河井まりこ・別所 和久・海原 真治  
園部 純也・飯塚 忠彦・丸山 弘樹\*  
京都大学大学院医学研究科感覚運動系  
外科学口腔外科学分野  
新潟大学大学院医歯学総合研究科内部  
環境医学講座腎・膠原病内科学分野\*

顎口腔外科領域において、腫瘍、先天奇形、外傷等によって生じる顎顔面骨骨欠損の再建は Q.O.L を高める上で非常に重要視されている。現在までは主に人工材料あるいは自家骨による骨再建が行われてきたが、必ずしも満足しうる結果がえられていないのが現状である。そのため、人工材料、自家骨などの移植ではなく、骨欠損部あるいはその周辺の細胞を利用して効率的に自己再生を誘導し、骨欠損を再建する手法の開発が期待されている。われわれはこの点に着目し、アデノウイルスベクターを用いて骨形成因子 (Bone morphogenetic protein: BMP) 遺伝子を宿主細胞に導入することにより著明な骨形成を誘導できることを動物実験で明らかにしてきた。しかし、臨床応用を考えた場合、アデノウイルスを用いることの是非が問われ、許認可等の困難が十分予測できるために、非ウイルス性遺伝子導入による骨形成誘導法が開発が望まれている。今回われわれは *in vivo* electroporation 法を用いた遺伝子導入法に着目した。ラット下腿筋肉内に *in vivo* electroporation 法を用いてヒト BMP 遺伝子を導入すると、十分な骨組織を誘導することが可能となった。この方法が優れている点は、今までのウイルスベクターを用いた骨再生法において問題となる抗原性、毒性についての考慮の必要性がないことである。さらに経皮的 *in vivo* electroporation 法を用いることにより同一部位にくり返し遺伝子導入を行えることも利点としてあげられる。このように、*in vivo* electroporation 法を用いた BMP 遺伝子導入による骨再生法は近未来的に臨床応用できる可能性が高く、骨欠損の再建法として有用と考えられる。