

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	小川 光平
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 790 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Efficacy and Safety of Pancreas-Targeted Hydrodynamic Gene Delivery in Rats (膵臓特異的なハイドロダイナミック遺伝子導入法の有効性と安全性: ラットを対象動物とした検証)
論文審査委員	主査 教授 高塚 尚和 副査 講師 川合 弘一 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

【背景と目的】

難治性の膵疾患に対する治療法として、遺伝子治療はその有用性が期待されている。その根拠は、少ない治療回数で長期間の効率が期待できること、遺伝子導入方法が確立されれば、導入する遺伝子を変えることによって、対象となる疾患領域が広がるためである。一方で、これまでにいくつかの遺伝子治療が膵疾患に対して臨床試験がなされているが、膵臓選択的な導入法の確立が十分になされておらず、安全性、効率の観点から、実臨床での適応には制限がある状態であった。そのため、膵臓選択的な新規遺伝子導入法の確立は膵疾患に対する治療の発展のためには急務と考えられる。申請者らのグループでは、これまでにハイドロダイナミック遺伝子導入法を用いて、核酸そのものを、すなわちウイルスベクターや化学物質を用いることなく、小動物から大動物の肝臓、筋肉、腎臓へ臓器選択的に導入する方法論を報告し、その安全性と、有効性を実証してきた。

そこで申請者らは本研究で、このハイドロダイナミック遺伝子導入法を用いて膵臓選択的な遺伝子導入法を確立し、有効性と安全性を検証することを目的とした。

【方法】

① 膵臓選択的ハイドロダイナミック遺伝子導入法の確立

ラットを対象動物として、全身麻酔下で腹部正中切開を行い、門脈と上腸間膜静脈を分離、同定した。上腸間膜静脈にカテーテルを挿入し、一時的に門脈を結紮して、血流分布を膵臓限局的にした状態で遺伝子発現プラスミドをハイドロダイナミック法で導入した。この導入法の安全性と効率について、下大静脈よりカテーテルを挿入して遺伝子導入を行う、全身的ハイドロダイナミック遺伝子導入法と比較した。pCMV-Luc を導入遺伝子として、膵臓組織での遺伝子発現を、膵臓内のルシフェラーゼ活性、及び免疫染色によるルシフェラーゼ蛋白の発現領域を評価し、検証した。

② 膵臓選択的なハイドロダイナミック法に最適な DNA 容量の検証

5 µg/ml 濃度の pCMV-Luc 溶液を用いて、遺伝子導入する DNA 容量を約 200 mg のラットの体重当たり 0.5% (1ml)、1.5% (3ml)、2.0% (4ml)、2.5% (5ml) で振り分け、膵臓中のルシフェラーゼ

活性および免疫組織学的な遺伝子発現量を評価することで、最も安全で効率的な遺伝子発現を可能にする DNA 容量の検証を行った。

③ 安全性の評価：膵組織における影響の評価

膵臓選択的なハイドロダイナミック遺伝子導入前と導入後 4 時間、12 時間、24 時間、72 時間の各膵臓組織を採取して、膵臓に与える影響を検証した。

④ 安全性の評価：血液生化学的な影響の検証

膵臓選択的なハイドロダイナミック遺伝子導入前、導入後 4 時間および 72 時間における血液サンプルを採取して血液生化学的(AMY、AST、ALT、LDH)な観点において全身的な遺伝子導入法と比較して、安全性の検証を行った。また DNA 容量毎の血液生化学的な反応も検証した。

【結果】

① 膵臓での遺伝子発現は、全身的なハイドロダイナミック遺伝子導入法において、最も効率的に発現を得られる肝臓内でのルシフェラーゼ活性で約 3000 倍低値であったが、膵臓選択的な方法論においては、肝臓に比べ膵臓内で約 2000 倍活性が高値であった。また、この導入法では脳、心臓、肺、脾臓および腎臓などの他臓器中に検出できるルシフェラーゼ活性は認めず、その臓器選択性が確認された。

従って、申請者らの考案した方法によって、より膵臓選択的に効率的に遺伝子導入を可能にすることが示唆された。

② 5 µg/ml 濃度の pCMV-Luc 溶液量を体重当たり 0.5%、1.5%、2.0%、2.5% で振り分けて、膵臓選択的なハイドロダイナミック遺伝子導入法を施行したところ、体重当たり

2.0% で導入した場合が最もルシフェラーゼ活性が高く、0.5% および 1.5% の条件より有意に高値であった。2.5% の条件では有意な上昇を認めなかった。免疫組織学的な解析においても、ルシフェラーゼ蛋白陽性の細胞数の比較において、体重当たり 2.0% の DNA 溶液量の投与がもっとも効率的な遺伝子発現を示した。

③ 体重当たり 2.0% の DNA 容量用いた膵臓特異的なハイドロダイナミック遺伝子導入によって、膵臓に及ぼすハイドロダイナミック力の影響を組織学的に評価したところ、導入直後に膵臓の小葉間の細胞間隙は導入前のサイズに比べ 396% 開大したが、経時的に回復し、導入後 7 日目には膵臓組織の線維化や障害はなく、導入前と同じ状態に復した。以上より、本法が膵臓に与える組織学的な影響は一時的かつ可逆的なものであることが示唆された。

④ 全身的遺伝子導入法と膵臓特異的導入法との比較では、血清 AST および ALT は前者で、血清 AMY は後者で導入 4 時間後において優位に高値となるが、いずれも 72 時間以内に正常レベルまで戻った。また血清 LDH も 4 時間後に上昇するも有意差はなく、こちらも 72 時間後には正常値に回復した。さらに DNA 容量毎による導入 4 時間後の血液生化学的な結果は 2.5% 容量で有意に血清 AMY が高値であった。

以上より膵臓選択的なハイドロダイナミック遺伝子導入法では一時的な血液生化学的なマーカーの上昇を認めるが、ラットにおいて体重当たり 2.0% の DNA 容量の条件下では安全であることが示唆された。

【考察と結論】

今回の申請者らの研究で、これまでの成果に基づいた、カテーテル挿入による膵臓特異的なハイドロダイナミック遺伝子導入法を確立し、その安全性と有効性について学術的に証明した。本方法の開発は、膵臓選択的な遺伝子導入法の確立により、各種遺伝子を導入することで、難治疾患

である膝疾患の治療法の開発に寄与するのみならず、膝疾患のモデル動物の開発に貢献することができる。と考える。

今後、本法のさらなる発展のために、人間に近い大動物や膝疾患モデルに対する治療効果などの検証が必要である。

審査結果の要旨

膝疾患は難治性であることから遺伝子治療が期待されているが、遺伝子の膝臓選択的導入法は確立されておらず、安全性及び効率の観点から臨床への適応には制限がある。申請者は、ラットを用いて、膝臓選択的遺伝子導入法の確立を目指し、その有効性及び安全性について検討した。その結果、①上腸間膜静脈にカテーテルを挿入し、一時的に門脈を結紮して、血流分布を膝臓に局限した状態で遺伝子発現プラスミド (pCMV-Luc) を投与することにより、選択的に遺伝子を導入できる膝臓選択的ハイドロダイナミック遺伝子導入法を確立し、②導入する遺伝子溶液量 (pCMV-Luc, 濃度 5 µg/ml) は体重あたり 2.0% が最も効率が高いこと、③遺伝子導入により膝小葉間の細胞間隙は開大したが、投与 7 日後には導入前の状態に復すること、④血清 AMY は 4 時間後に上昇するが、72 時間以内に正常レベルまで下がること等を明らかにし、膝臓選択的に遺伝子を安全かつ有効に導入できる方法を確立した。

本論文により各種遺伝子の膝臓への選択的導入が可能となり、難治性である膝疾患の新たな治療法開発への道が開かれ、また、膝疾患のモデル動物の開発への貢献も期待できることから、学位論文としての価値を認める。