

論文の内容の要旨

論文題目 Hydrodynamic 法を用いたブタ肝への遺伝子導入法の検討

指導教員 岩中督 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年度 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

吉野浩之

遺伝子導入法は、遺伝子欠損症などに対する臨床的な遺伝子治療のみならず、悪性腫瘍や生活習慣病などの治療への応用も期待されており、さらに生体内で遺伝子の持つ未知の機能を解明する実験的手法などとしても用いられてきた。非ウィルスの遺伝子導入法、中でも Hydrodynamic 法は、naked plasmid DNA を大量の溶媒とともに、急速に静脈内に注入することで遺伝子を導入する、物理的遺伝子導入法の一つであるが、特殊な機器を必要としないこと、技術的に簡便であることに加えて、使用する naked DNA の増幅は、ウィルスベクターの増幅に較べて容易であり、遺伝子導入効率も高いため、重要な遺伝子導入法の一つと考えられている。本法は、全身的な静脈投与では肝臓に高い遺伝子発現が認められることが知られ、近年は Hydrodynamic 法のメカニズムも徐々に明らかにされつつある。一方で、大量の溶媒を急速に静注することによる心不全の副作用のため、Rodent、Rabbit での報告はあるものの、中大動物への Hydrodynamic 法の応用は行われておらず、これまでは小動物における簡易な実験的遺伝子導入法と考えられてきた。本研究では、いまだ世界的に成功例のない中動物であるブタの肝へ、Hydrodynamic 法を用いた遺伝子導入の実現に向け検討を行った。

まず、Hydrodynamic 法における遺伝子導入の条件を検討した（実験 1）。実験にはメキシカン・ヘアレス・ピッグを用い、マーカー遺伝子として Green

Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子 GFP を用いた。ブタ肝静脈の解剖学的特長から遺伝子導入部位は肝左葉外側区域の遠位約 2/3 とし、右外頸静脈より肝静脈左葉外側区域枝にバルーンカテーテルを透視下に挿入した。次に Rodent の実験結果より plasmid DNA(p-DNA) 量を 3mg、溶媒量を 150ml と設定し、注入速度の検討を行った。ブタ肝への Hydrodynamic 法を用いた遺伝子導入には 5ml/sec. の注入速度が適しており、それ以上の速度では肝の損傷が強く、それ以下の速度では導入されなかった。以上から、遺伝子量 3mg、溶媒量 150ml、注入速度 5ml/sec が必要であることがわかった。

次に肝血流が遺伝子導入効率に及ぼす影響を検討した（実験 2）。遺伝子量 3mg、溶媒量 150ml、注入速度 5ml/sec の条件下で、肝へ流入する肝動脈、門脈の血流をそれぞれ遮断したもの、両方遮断したもの、両方遮断した上に門脈から乳酸リンゲル液を注入し血液を洗い流したものに分けて検討を行った。肝動脈、門脈を両方遮断した場合のみ遺伝子発現を認め、さらに血液を洗い流したものは、洗い流さないものより多くの GFP の発現を認めた。この結果より、門脈・肝動脈の血流遮断が必須であること、より遺伝子導入効率を上げるためには肝内の血液を洗い流すことが有効であることがわかった。

Hydrodynamic 法では遺伝子導入に際して肝静脈の圧が重要であるとされており、それを近似的に測定して遺伝子導入に必要な静脈圧を確認した（実験 3）。

また、導入された遺伝子の発現を定量的に測定するため、GFP を用いて定めた最適条件下で CTLA4Ig 遺伝子を導入し、CTLA4Ig 血中濃度を経時的に測定し、その発現を確認した（実験 4）。先の実験より得た導入条件に従い CTLA4Ig 遺伝子を Hydrodynamic 法にてブタ肝に導入し、経時的に採血し CTLA4-Ig 血中濃度を測定した。血中濃度は ELISA 法で測定可能であり、最大で 161.7ng/ml であった。

また、本法行う際におきる水圧による肝障害の評価もあわせて行った（実験 5）。本研究で決定した条件下に Hydrodynamic 法を用いて遺伝子導入を行ったブタでは AST 値は導入後 1 日目に 501.3IU/l をピークとし、4 日目にはほぼ術前値に回復した。

以上より、Hydrodynamic 法を用いてブタ肝に遺伝子導入するためには、肝外側区域にバルーンカテーテルを用いて行い、その導入条件は遺伝子量 3mg、溶媒量 150ml、注入速度 5ml/sec であった。導入効率を上げるためには肝の血液を洗い流すことが重要であった。この条件下で導入された CTLA4-Ig は血中濃度が測定できる十分な導入効率であり、導入の副作用である肝障害は術直後より速やかに改善した。

本研究は Hydrodynamic 法を用いて、ブタ肝への遺伝子導入することに成功

した、世界で初めての報告である。

本研究は非ウイルスベクター法の一つである **Hydrodynamic** 法が中動物でも施行可能であることを証明し、**Hydrodynamic** 法の将来的な臨床応用の可能性を示すものであるとともに、遺伝子治療を併用した臓器移植における臓器特異的免疫修飾の基礎的実験となりうるものとして期待できる。