

Title	Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver : co-introduction of DNA and nuclear protein by a simplified liposome method.
Author(s)	加藤, 啓子
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37162">https://hdl.handle.net/11094/37162</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【4】

氏名・(本籍)	かとう げい 子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9655 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver ; co-introduction of DNA and nuclear protein by a simplified liposome method. (動物組織内への遺伝子導入法の開発とその応用)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄
	(副査) 教授 松原 謙一 教授 上田 重晴

論文内容の要旨

(目的)

生態機能を解明したり、様々な病態を解析するために、種々の疾患モデル動物が作成されている。先天性の病態を解明するために、トランスジェニックマウス、ES細胞由来のモデルマウスや、先天性の疾患動物は有用だが、後天性の疾患や、完全に分化した個体の生体機能を知るには、生きた動物組織内への遺伝子の導入とその発現が有効であると思われる。本研究では、動物組織内に直接遺伝子を導入し、発現させる方法を開発し、この方法を実用段階まで発展させることを目的とした。

(方法ならびに成績)

1. DNAとタンパク質を同時に封入できるリポソームと、細胞融合活性をもつセンダイウイルス (HVJ) を用いて効率の良い遺伝子発現を起こさせる系を開発した。
  - (1) DNAが細胞内に導入されると速やかに核内へ運ばれるように、核内移行活性を持つ核タンパク質 (HMG1) をDNAと結合させ、その複合体水溶液をフォスファチジルコリン：フォスファチジルセリン：コレステロール (4.8 : 1 : 2 W/W) から調整した脂質層に加え、ボルテックス・超音波処理・振とう後、リポソームを作成した。このリポソーム内には、10%のDNAと30%のHMG1が同時に封入された。
  - (2) 紫外線照射により不活化したHVJとリポソームを4℃・10分、37℃・30分振とうさせながら反応させ、リポソームと結合していないフリーのHVJを、蔗糖密度勾配遠心法により除き、HVJ-リポソームを作成する。
  - (3) アクチンプロモーターにつないだβ-ガラクトシダーゼ遺伝子とHMG1を封入したHVJ-リポソームをLLCMK<sub>2</sub>細胞に導入した結果、遺伝子を単独で封入したHVJ-リポソームの

場合より、3倍発現量が上昇した。

2. 成育ラットの臓器での遺伝子発現を試みた。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子とHMG1を封入したHVJ-リポソームを、ラットの肝臓被膜下へ注入した2日後に、グルタル固定・肝臓組織切片をX-galにより染色した結果、導入部位付近の中心静脈周囲の肝細胞内に発現が見られた。

3. HVJ-リポソーム法により、成育ラットの肝臓内へB型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子を導入・発現させ、肝炎の発症を観察した。

(1) アクチンプロモーターにつないだB型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子とHMG1を封入したHVJ-リポソームを、ラットの肝臓被膜下へ注入した結果、注入2日目の25-45ng/mlをピークに9日間、血中に抗原の分泌がみられた。この結果は、20匹のラットで再現された。

(2) 一週間に一度、合計4回、このHVJ-リポソームを4匹のラットに注入した結果、3匹のラットは、2度目の注入以降、表面抗原に対する高い抗体価を示し、血中の抗原をマスクした。病理所見の結果、これらのラットの肝臓には、激しい出血層やリンパ球の浸潤が見られた。

(総括)

1. 核タンパク質と結合させた後に、細胞質内へ導入された遺伝子は、単独で導入された場合より明らかに発現量が増加した。
2. HVJ-リポソーム法により、ラット肝実質細胞内への遺伝子の導入と発現が可能になった。
3. ラット・肝細胞へのB型肝炎ウイルスの表面抗原遺伝子の導入・発現により、血中に表面抗原及び、その抗体を確認した。
4. ラット・肝細胞へのB型肝炎ウイルスの抗原遺伝子を導入・発現により、ラットの肝臓内に病理変化を認めることができた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、生きた動物組織内へ直接遺伝子を導入し、発現させる方法を開発し、そのうえ、この方法を実用段階にまで発展させるために、B型肝炎ウイルスモデルラット作製を試みたものである。

本研究において開発された方法は、非常に勘弁に、ラット肝臓内へ遺伝子を導入し、多量の遺伝子産物の発現を、10日間も持続させることに成功したものである。このように、肝臓内で効率良く外来遺伝子を発現させた例は、いままで報告されていなかった。また、実際に、B型肝炎ウイルス・表面抗原遺伝子をラットの肝臓内に導入することで、血中に表面抗原に対する高い抗体価を検出し、肝臓内に、ヒトのウイルス性肝炎と同様の病理変化を認めることに成功したものである。

動物体内での様々な病態を解析する上で、このような汎用性の高い遺伝子導入法を開発した事は非常に意義深く、また、B型肝炎ウイルスの疾病機構の解明、及び、治療手段を知る上で、今回開発したモデルラットは非常に有用であると思われる。