



Title	EFFICIENT OLIGONUCLEOTIDES DELIVERRY USING HVJ-LIPOSOME METHOD IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM
Author(s)	山田, 和生
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40314
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	やま だ かず お 山 田 和 生
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 9 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	EFFICIENT OLIGONUCLEOTIDES DELIVERY USING HVJ-LIPOsome METHOD IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM (HVJ-リボゾーム法による中枢神経系への高効率なオリゴヌクレオチド導入)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 荻原 俊男 (副査) 教 授 福田 淳 教 授 田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

アンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) は特異的遺伝子を選択的に抑制することで遺伝原性疾患の治療や病因・病態の解明において革新的な進歩をもたらすと期待される。ところが、ODN の細胞への取り込みの低さや酵素による分解による不安定性によって、現状では ODN の有用性が十分に利用できていない。我々は不活化したセンダイ・ウイルス (hemagglutinating virus of Japan; HVJ) とリボゾームとの複合体をベクターとして利用することによって、血管内皮細胞に対しアンチセンス ODN の効率のよい安定した導入を経験している。しかし、中枢神経系への ODN 導入において HVJ-リボゾーム法の利用は未だ行われてはいない。そこで、中枢神経系への ODN の導入に HVJ-リボゾーム法を利用し、導入効率や導入強度さらに安定性について *in vitro*, *in vivo* の実験を行い検討した。

【方 法】

蛍光色素 FITC (florescein isothiocyanate) で標識した ODN をリボゾームとともに振盪・超音波処理することでリボゾームに包埋した。さらに、紫外線にて不活化した HVJ と 4°C で 5 分間、37°C で 30 分間インキュベートし超高速遠心にて分離して ODN-HVJ リボゾーム複合体を作製した。HVJ リボゾーム法にて ODN を初代培養小脳顆粒細胞 (*in vitro*)、成熟ラット脳内 (*in vivo*) 導入し、導入効率や導入強度そして半減期を ODN のみを直接導入したものと比較検討した。

in vitro 実験には生後 7 日目の SD ラット小脳より顆粒細胞を分離・培養し、その 2 日後にグリア細胞の増殖をおさえるためにサイトシン・アラビノシドを加え、1 週間培養した FITC-ODN の導入に利用した。

in vivo 実験では中枢神経系への ODN 導入法を確立するために、雄性 SD ラットを使って、1) 総頸動脈からの直接流入、2) 視床下部・室傍核 (paraventricular nuclei; PVN) への直接注入、3) 側脳室内 (ICV) への直接注入を行った。

ICV 投与は 1) HVJ-リボゾーム複合体 (ODN 濃度 1 μ M)、2) HVJ 複合体 (ODN 濃度 10 μ M)、3) リボゾーム

複合体 (ODN 濃度 $1\ \mu\text{M}$) 4) ODN のみ (ODN 濃度 $10\ \mu\text{M}$) で行い、導入方法の違いによる導入強度の比較検討を行った。また ICV 注入部位より吻側の脳、尾側の脳、さらに脳幹・小脳に分けて蛍光計で FITC 強度を計測し、ODN の導入の広がりも検討した。

【結 果】

in vitro での HVJ リポソーム法による ODN の導入では、強い蛍光が核に局在し蛍光の持続はベクターの無い ODN 単独導入では 3 日であったのに対し 14 日以上であった。*in vivo* での HVJ リポソーム法による ODN の視床下部への注入においても、ODN 単独の注入よりも高濃度かつ長期間持続する蛍光を生じた。また HVJ リポソーム法による ODN の ICV 投与では、脳室周囲層に著大な長期間持続する蛍光を生じ、その蛍光は核においてより顕著であった。さらに、蛍光染色された細胞の広がり、HVJ リポソーム法においてより広範囲なものであった。FITC 定量においては、吻側脳や尾側脳での FITC 強度は HVJ リポソーム法で有意に増加しており、さらに興味深いことに脳幹・小脳においても HVJ リポソーム法では目立った FITC 強度が認められた。

【総 括】

以上の結果より、HVJ リポソーム法が ODN の半減期を延ばし、ODN を細胞の核へと集積させることが認められた。これらは、ODN の導入に効果的な方法であり、中枢神経系でのアンチセンス技術の応用において有望な方法となると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は中枢神経系へのオリゴヌクレオチドの導入における HVJ-リポソーム複合体の利用を検討したものであり、蛍光色素によって標識されたオリゴヌクレオチドを中枢神経系へ導入し、その蛍光発色の強度・範囲・持続性の観察や蛍光色素の定量によって HVJ-リポソーム法の有用性を明らかにしている。さらに、HVJ-リポソーム法を用いた脳室内投与により中枢神経系へのアンチセンス等の導入が充分可能であることや、それによって中枢神経系においても核酸技術が利用できることを示している。

本研究は、HVJ-リポソーム法による遺伝子レベルでの脳機能の解明や疾患治療の発展の可能性を示唆し、学位の授与に値すると思われる。