

Title	In Vivo Transfection of Hepatitis C Virus Complementary DNA into Rodent Liver by Asialoglycoprotein Receptor Mediated Gene Delivery
Author(s)	山本, 正人
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40908">https://hdl.handle.net/11094/40908</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

氏 名	山 本 正 人 <small>やま もと まさ と</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 4 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 12 月 4 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	<i>In Vivo</i> Transfection of Hepatitis C Virus Complementary DNA into Rodent Liver by Asialoglycoprotein Receptor Mediated Gene Delivery (Asialoglycoprotein レセプターを介した遺伝子導入法による齧歯類肝へのC型肝炎ウイルス cDNA の <i>In Vivo</i> 遺伝子導入)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二 (副査) 教 授 松 澤 佑 次 教 授 山 西 弘 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

asialoglycoprotein receptor mediated gene delivery は、肝細胞表面に存在し、糖鎖末端に galactose を持つ糖蛋白と特異的に結合する receptor を介して、肝細胞特異的に遺伝子導入を行う方法で、*in vitro* 及び *in vivo* (齧歯類およびウサギ) での肝細胞特異的遺伝子導入が報告されている。本研究においては、慢性肝疾患の主要な原因の一つであり、チンパンジー以外に実験動物系が無い C 型肝炎ウイルス (HCV) の cDNA を asialoglycoprotein receptor mediated gene delivery にて齧歯類に導入し、HCV 蛋白を肝臓に発現する齧歯類モデルを作製することを目的とした。

### 【方法】

遺伝子導入効率の検討には  $\beta$ -galactosidase 遺伝子の発現ベクターを、HCV 遺伝子の発現には HCV の core 部分の cDNA を  $\beta$ -actin promoter 下流に挿入したベクターを用いた。遺伝子導入に用いた carrier は、asialo-orosomucoid と分子量約 40 kDa の poly-L-lysine を架橋して作製した。

この carrier についての最適の carrier-DNA 比と、lysosomal enzyme inhibitor であるクロロキンを添加した際の効果を培養肝細胞株 HepG2 を用いて検討した。

*in vivo* での検討はマウス、ラットに対して、carrier-DNA complex を尾静脈もしくは門脈から注入して行った。経尾静脈的投与と経門脈的投与の差、およびクロロキンを腹腔内投与した場合の効果は、 $\beta$ -galactosidase 発現ベクターを導入したラット肝組織を X-gal で染色して検討した。また、HCV core 発現ベクターをクロロキンを併用し経門脈的にラットに導入し、肝臓内の HCV core RNA および蛋白の発現の有無を、RT-PCR および免疫組織化学によって検討した。

### 【成績】

培養細胞での最適の carrier-DNA 比 (480 : 1) における効率は、gel retardation assay で従来のように決定した比 (160 : 1) で行った場合の 4.7 倍であった。50  $\mu$ M のクロロキン添加は遺伝子導入効率を 22 倍に上昇させた。これ

らの最適化の結果、培養肝細胞株では3.0%の細胞に導入遺伝子の発現が見られた。

$^{32}\text{P}$ でラベルした plasmid と carrier の complex をマウスに経尾静脈的に投与し各主要臓器への分布を測定したところ、72.1%が肝に集積した。 $^{35}\text{S}$ でラベルした plasmid を導入後に、microautoradiography によって肝内での分布を検討したところ、complex は肝実質細胞特異的に取り込まれていた。

ラットを用いた *in vivo* での検討において、X-gal で染色される細胞数は、クロロキン投与により有意に増加し、経尾静脈的投与に比べて経門脈的投与で有意に多かった。クロロキン投与下に経門脈的に carrier-DNA complex を投与した場合、導入遺伝子を発現する細胞の数は20倍に増加した。

ラットに HCV core 発現ベクターをクロロキン併用経門脈的に導入して2日後の肝組織中に、HCV core RNA が検出された。また、肝組織の免疫組織化学的検討で肝実質細胞での HCV core 蛋白の発現が確認された。

#### 【総括】

従来、asialoglycoprotein receptor を介した遺伝子導入法は肝実質細胞への特異性について厳密な検討が行われていなかったが、 $^{35}\text{S}$ で標識されたプラスミドを導入した後の肝組織の microautoradiography にて導入が肝実質細胞特異的であることが確認された。また、従来、遺伝子導入効率が不十分であるために免疫組織化学的にとらえ得るレベルの蛋白発現を確認することができなかったが、本研究で carrier-DNA 比の最適化、投与経路の変更、クロロキンの併用により遺伝子導入効率の向上を図った結果、免疫組織化学的に検出されるレベルの HCV core 蛋白を肝実質細胞特異的に発現するラットを作成し得た。

### 論文審査の結果の要旨

この論文においては、Asialoglycoprotein Receptor Mediated Gene Delivery (アジアロ法)に関する詳細な検討が行われている。培養細胞系において、至適 carrier-DNA 比およびクロロキンの併用についての検討が行われ、その結果、遺伝子導入効率は95倍に向上している。*in vivo* においては、導入されたプラスミドの体内分布についての検討が行われ、肝実質細胞選択性が明らかにされている。また、経尾静脈投与と経門脈投与の比較、クロロキンの併用についての検討がおこなわれ、*in vivo* でも遺伝子導入効率の向上がはかられている。このようにして遺伝子導入効率の向上した、C型肝炎ウィルスの core 部分の cDNA をアジアロ法を用いて肝実質細胞特異的に導入することで、肝実質細胞に core 蛋白を発現するラットの作成に成功しており、このラットは core 蛋白のC型慢性肝炎の病態への関与を *in vivo* で解明することに役立つものと考えられる。従って、この論文は学位の授与に値するものと考えられる。