



Title	Gene delivery by HVJ-liposome in the experimental gene therapy of murine glioma
Author(s)	馬淵, 英一郎
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41112
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 馬 淵 英 一 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 4 0 3 0 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 4 月 23 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 Gene delivery by HVJ-liposome in the experimental gene therapy of murine glioma
(マウス脊髄腔播種モデルに対する HVJ-リポソームを用いた遺伝子導入の検討)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 早 川 徹 教 授 門 田 守 人
(副査)
教 授 濱 岡 利 之 教 授 高 井 義 美

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

悪性グリオーマ細胞に対する遺伝子導入には、レトロウイルスベクターを用いる方法が遺伝子発現の安定性と安全性において優れている。しかし、*in vivo* における遺伝子導入効率の低さを改善しない限り臨床応用は困難である。そこで、*in vivo* における高い遺伝子導入効率を持ったベクターを開発する目的で、センダイウイルス (HVJ) とリポソームとの膜癒合リポソームを作製し、マウス脊髄腔播種 (MG) モデルに対する遺伝子導入について検討した。

[方法ならびに成績]

1) マウス脊髄腔播種 (MG) モデル

MG モデルは、イソフルレン吸入麻酔下の C3H/HeN 雌マウス (7 週齢) 大槽内に、50 μ l の RSV-M マウスグリオーマ細胞浮遊液 (5×10^6 個/匹) を経皮的に 26 G 針を用いて移植し作製した。

2) レトロウイルスベクターおよび HVJ-リポソーム

遺伝子導入には、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) 遺伝子を制御するプロモーターで単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HTK) 遺伝子をコントロールするように再構築したレトロウイルスベクター (MBP1.3/pNT230) を用いた。さらに HVJ-リポソームに BAG および MBP1.3/pNT230 レトロウイルスベクターを封入して遺伝子導入実験に用いた。

3) Bystander 効果の検討

野生型の RSV-M 細胞と HTK 遺伝子導入 RSV-M 細胞を種々の割合で混合し、HTK 遺伝子導入細胞の割合が 0%, 10%, 25%, 50% および 100% となる MG モデルを作製した。そして、腫瘍細胞移植 2 日後より 14 日間 10 mg/kg の割合でガンシクロビル (GCV) を腹腔内投与し、生存曲線を求めた。野生型 RSV-M 細胞で作製したモデルおよび 10% 導入群の中間生存期間はそれぞれ 11 日、14 日であった。これに対し、25% および 50% 導入群では 5 匹中 4 匹が治癒し、100% 導入群では全例が治癒した。

4) HVJ-リポソームを用いた遺伝子導入の評価

MG モデル作製 2 日後に、BAG ベクターを封入した HVJ-リポソームを経皮的に大槽内に注入し、その 2 日、4 日、8 日後に屠殺し、4 %パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、100-200 μ l 厚の切片を作製し、X-gal 染色を行い遺伝子導入の評価を行った。HVJ-リポソーム注入 2 日後には、ほとんど X-gal 陽性細胞を認めなかったが、4 日後には脳室内・脳底槽および脳表の多くの腫瘍細胞に X-gal 陽性細胞を認めた。

5) HVJ-リポソーム併用遺伝子療法

MG モデル作製 2 日後に、HTK 遺伝子を挿入した MBP1.3/pNT230ベクターを封入した HVJ-リポソームを大槽内に経皮的に注入し、さらにその 2 日後より14日間 GCV を10 mg/kg 腹腔内投与し生存曲線を求めた。DNA を含まない HVJ-リポソームを注入し GCV 治療を行っても、生存期間の中間値は7日で野生型 RSV-M 細胞の MG モデルの 6 日間と有意差は認めなかった。これに対し、HTK 遺伝子挿入ベクター封入 HVJ-リポソームを注入した群では、1 匹が死亡しただけで 4 匹が30日以上生存した。

[包括]

HTK 遺伝子導入グリオーマ細胞が25%以上含まれる状態で作製された MG モデルの場合、2 週間の GCV 投与によりほぼ治癒出来た。MG マウス作製後 LacZ 遺伝子を封入した HVJ-リポソームを注入し X-gal 染色を行った結果、注入 2 日後ではほとんど陽性細胞を認めなかったにも拘わらず、4 日目には多くの腫瘍細胞が陽性所見を示し、導入後 β -galactosidase 蛋白の産生までに48時間以上が必要であると考えられた。さらに、HTK 遺伝子を導入発現させる治療実験の結果、著名な生存期間の延長を認めた。これらの結果より、遺伝子導入効率が低いレトロウイルスベクターにおいても HVJ-リポソームを封入手段として用いることによって、25%以上の腫瘍細胞に HTK 遺伝子を導入できる可能性が明らかとなり、悪性グリオーマに対して一層効果的な遺伝子療法が臨床応用され得る可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

悪性グリオーマ細胞に対する遺伝子導入には、その安定性の観点から、レトロウイルスベクターが様々な利点を有している。しかし、レトロウイルスを用いて遺伝子を導入するためには、ウイルスの外被糖蛋白質に対するレセプターが必要である。このレセプターを有しない細胞をも含めてレトロウイルスベクターを用いた治療方法を模索する一貫として、マウスの meningeal gliomatosis モデル (MG モデル) に対する HVJ-リポソームを用いた遺伝子の導入発現を検討した。本研究では MG モデルに HVJ-リポソームを用いて lacZ 遺伝子を導入し、X-gal 染色を行うことで多くの腫瘍細胞に遺伝子が導入しうることが示された。さらに、グリオーマ細胞に特異的な MBP プロモーター制御下の HTK 遺伝子を HVJ-リポソームを用いて導入し、GCV を用いて治療することにより著明な治療効果が得られた。即ち、HVJ-リポソームを用いることでより多くの悪性脳腫瘍に対してレトロウイルスベクターを導入する事が期待され、一層幅広くかつ効果的な遺伝子療法が臨床応用される可能性を示した。

以上より、本論文は学位の授与に値するものと考えられる。