

| | |
|--------------|--|
| Title | Widespread gene transfection into the central nervous system of primates |
| Author(s) | 萩原, 靖 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42645 |
| 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"〉 大阪大学の博士論文について <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 | 萩原 靖 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 第 16118 号 |
| 学位授与年月日 | 平成13年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻 |
| 学位論文名 | Widespread gene transfection into the central nervous system of primates (霊長類中枢神経系への広範な遺伝子導入の試み) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 吉峰 俊樹 (副査) 教授 金田 安史 教授 佐古田三郎 |

論文内容の要旨

【目的】

HVJ-AVE liposome は従来の HVJ liposome の脂質組成を工夫し、組織浸透性を高めることにより in vivo での遺伝子導入効率を飛躍的に高めた anionic type liposome である。これを用いて *lacZ* 遺伝子の霊長類の大槽内、或いは脳内に直接注入を行い、中枢神経での遺伝子導入効率を検討した。

【方法】

lacZ 遺伝子を封入した HVJ-AVE liposome (HVJ-AVE-*lacZ*) 1 ml を各3頭のニホンザル大槽内に注入した。1頭のニホンザルは、同様の手技で、DNA を含まない HVJ-AVE liposome (HVJ-AVE-empty) 1 ml を大槽内に注入した。その他に2頭のニホンザルには、定位的に脳内に HVJ-AVE-*lacZ* を注入した。7日後に灌流固定し、中枢神経を摘出し、脳各部位のスライスを X-gal 染色した。脳各部位の β -gal 陽性細胞をカウントし、遺伝子導入効率を算出した。また、遺伝子導入された細胞種を調べるため、神経細胞のマーカーとして抗 neurofilament 抗体、グリア細胞のマーカーとして抗 GFAP 抗体を用いて免疫染色を行った。

【成績】

HVJ-AVE-*lacZ* を大槽内に注入したサルでは、中枢神経に広範に遺伝子導入が観察された。小脳歯状核、小脳虫部、三叉神経核、蝸牛神経核、動眼神経核、オリーブ核、海馬、顔面神経核では37.2~59.4%と特に高い導入効率が観察された。尾状核、小脳皮質、被殻、前頭葉、頭頂葉、後頭葉では0~9.5%と低い導入効率にとどまった。HVJ-AVE-*lacZ* を脳内へ注入したサルでは、注入ルートおよび注入部位に強い遺伝子発現が観察された。遺伝子導入効率は、注入部位から離れるに従い低下したが、 β -gal 陽性細胞は最大15mm離れた部位まで観察された。

β -gal 陽性細胞のうち、90±6.0%は neurofilament 陽性であり、GFAP 陽性細胞は観察されず、HVJ-AVE liposome の標的細胞は神経細胞であると考えられた。

【総括】

HVJ-AVE liposome を用い、霊長類中枢神経への広範囲な遺伝子導入が可能であった。大槽内注入の場合、大槽に距離的に近い脳幹周囲、側頭葉内側部、第四脳室周囲で高い遺伝子導入効率が観察された。脳内への直接注入では、局所に高い遺伝子導入が観察され、脳実質内への HVJ-AVE liposome の拡散によると思われる遺伝子導入が注入部位周囲に観察された。

HVJ-AVE liposomeはanionic type liposomeで、組織浸透性にすぐれているため組織内部に拡散するように広がり、広範囲に遺伝子導入がなされたものと考えられる。また神経細胞特異的に遺伝子発現が見られた理由として、HVJ envelopeに発現しているHN蛋白が、脊椎動物のほとんどの細胞と結合可能であるということと、神経細胞内にあるhCMV major immediate-early promoter (HCMV-MIEP)が、CMV promoterを持つ遺伝子の発現を促進した可能性が考えられる。今後、この方法を応用した臨床的遺伝子治療法の開発が期待される。

論文審査の結果の要旨

従来用いられてきたベクターでは、広範囲な中枢神経への遺伝子導入には限界があった。そのため本研究では、新たに開発されたHVJ-AVE liposomeを用いて霊長類中枢神経系への遺伝子導入を試みた。このHVJ-AVE liposomeは、conventional HVJ liposomeの脂質組成を改良し、in vivoでの遺伝子導入効率を飛躍的に高めたハイブリッド型ベクターである。投与方法としてニホンザル大槽内注入、線条体直接注入を行い*lacZ*遺伝子をリポーターとして脳各部位の遺伝子導入効率を算出した。その結果、大槽内注入法では脳内に広範囲に遺伝子導入され、一方線条体注入法では注入部位に限局した導入となることが明らかになり、その標的細胞は主として神経細胞であった。本研究の結果は、困難とされてきた中枢神経系への広範囲な遺伝子導入の可能性を示し、様々な中枢神経疾患に対する遺伝子治療の開発に大きく貢献すると考えられ、学位に値するものであると考える。