



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Hydrodynamics-based delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression   |
| Author(s)    | 蒋, 菁菁   |
| Citation     | 大阪大学, 2003, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43911">https://hdl.handle.net/11094/43911</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">大阪大学の博士論文について</a>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         | 賀<br>賀<br>賀   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第17691号   |
| 学位授与年月日    | 平成15年3月25日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科先端応用医学専攻  |
| 学位論文名      | Hydrodynamics-based delivery of naked plasmid DNA for <i>in vivo</i> cytokine expression<br>(非修飾プラスミド急速静脈注射法を用いた生体遺伝子導入法によるサイトカイン発現効果の検討) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 宮崎 純一<br>(副査)<br>教授 金田 安夫 教授 下村伊一郎   |

## 論文内容の要旨

【目的】生体への遺伝子導入法の開発、改良は、基礎的遺伝子機能解析のみならず遺伝子治療のためにも重要である。生体への遺伝子導入法の中で最も単純なものは naked DNA 法（発現プラスミド DNA をそのまま生体に注射する）である。プラスミド注射法と電気穿孔法の併用は筋肉内遺伝子導入効率の大幅な改善を認めることがこれまでの検討から明らかになっている。そこで、今回に高効率の遺伝子導入法を開発する目的で、サイトカイン蛋白にイムノグロブリンの Fc 融合蛋白発現ベクターを開発し、その効果を検討した。また、プラスミドなどを大量のリソゲル液などと共にマウスに急速に静脈注射すると遺伝子が細胞に導入されることが知られるようになった。そこでサイトカイン発現遺伝子の急速静脈注射法による効果についても検討した。

【方法】①発現ベクターの作成：哺乳類の細胞で強い発現活性を持つ CAG プロモーター下に目的遺伝子（マウス IL-10、IL-10/Fc、ホタルルシフェラーゼ、lacZ）を組み込むことにより pCAGGS-IL10、pCAGGS-IL10/Fc、pCAGGS-luc 及び pCAGGS-lacZ を作成した。②*in vivo* 電気穿孔法による融合サイトカイン発現の検討：9 週齢の C57BL/6 の雄性マウス及び 7 週齢の C3H/HeJ の雄性マウスを用い、麻酔下に、 $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の pCAGGS-IL10、pCAGGS-IL10/Fc 及び pCAGGS-luc を  $33 \mu\text{l}$  ずつ両側の前脛骨筋に注射し、同部位に針型電極を刺入し、100 V、50 ms の矩形パルスを 6 回通電した。pCAGGS-luc 導入 1 日後、筋肉のルシフェラーゼの活性を Luciferase Activity Assay 法にて測定した。pCAGGS-IL10、pCAGGS-IL10/Fc は導入後、経時的に採血を行い、血清 IL-10 濃度を ELISA 法にて測定した。発現サイトカインの確認のため、pCAGGS、pCAGGS-IL10、pCAGGS-IL10/Fc 遺伝子を導入したマウスの血清を用いて、Western blot を行った。③*in vivo* 急速静脈注射法の検討：導入遺伝子発現部位の確認目的で、pCAGGS-lacZ  $50 \mu\text{g}$  を乳酸リソゲル ( $0.1 \text{ ml/g}$  体重) と共に、5 週齢の MCH-ICR マウス尾静脈より急速に（約 5 秒）注射し、遺伝子導入 7 日後、肝臓を X-gal 染色した。また、種々の濃度の pCAGGS-IL10 を上記の方法にて ICR マウスに導入後、経時的に採血を行い、血清 IL-10 濃度を ELISA 法にて測定した。

【成績】 1. *in vivo* 電気穿孔法による融合サイトカイン発現の検討：1) pCAGGS-IL10 遺伝子導入したマウス血清

中に、Western blot にて 22 kDa の IL-10 のバンドを検出した。pCAGGS-IL10/Fc 導入マウスの血清の場合は、還元状態では 48 kDa の単一なバンドを示し、非還元状態では 96 kDa にシフトした。このことから融合蛋白は血清中でホモダイマーを形成していることが示唆された。2) C3H/HeJ マウスに IL-10/Fc 遺伝子導入した場合、著明に IL-10 血中濃度を高め（ピーク値 :  $182.9 \pm 93.5$  ng/ml vs  $18.4 \pm 13.4$  ng/ml）、IL-10 遺伝子導入の約 10-100 倍になった。また、発現期間も延長した。しかし、C57BL/6 マウスの場合 IL-10 の血中濃度は増加したが（ピーク値 :  $4.9 \pm 0.6$  ng/ml vs  $0.7 \pm 0.3$  ng/ml）、C3H/HeJ マウスに比し発現量は低値であった。また、発現期間延長効果も認めなかった。3) C3H/HeJ マウスに pCAGGS-luc 遺伝子を導入すると、C57BL/6 マウスに比し、約 10 倍のルシフェラーゼ活性を認め、マウスの strain 間で遺伝子発現の差異が認められた。2. in vivo 急速静脈注射法の検討：pCAGGS-lacZ  $50 \mu g$  の急速静脈投与後 7 日の肝臓を X-gal 染色したところ、マウス肝全体に LacZ 発現を認め、高率に遺伝子導入する事が確認された。pCAGGS-IL10  $10 \mu g$  の遺伝子導入では、導入 1 日後で血清 IL10 濃度は  $28.3 \pm 4.4 \mu g/ml$  のピーク値に達し、2 週間後でも約  $0.3 \pm 0.3 \mu g/ml$  の濃度を保っていた（Control（注射前）:  $19 \pm 7 \mu g/ml$ ）。発現プラスミド量の検討では、pCAGGS-IL10 を  $50 \mu g$  導入させた場合に、 $50.8 \pm 12.1 \mu g/ml$  のピークに達した。以上から、プラスミド急速静脈投与法により、肝における持続的な導入遺伝子の発現と、高濃度の血中サイトカインを保ちうることが確認された。

【総括】1. 生体における Fc 融合サイトカイン遺伝子導入法は、血中サイトカイン発現の上昇、維持に有効であるが、効果判定の際には、マウス系統間で遺伝子発現に差異があることを考慮する必要がある。2. プラスミド急速静脈注射法は、効率良く遺伝子導入可能で、サイトカイン遺伝子を発現させた場合、血中濃度が数十  $\mu g/ml$  の order に上昇することを認めた。本研究は全て非修飾プラスミド DNA を用いるため、特殊な設備が必要でなく、抗原性や感染の可能性もなく、反復施行も可能である。この手法を活用すれば、遺伝子機能を in vivo で広くスクリーニングするための有効な方法になると思われる。

### 論文審査の結果の要旨

生体への遺伝子導入法の開発、改良は、基礎的遺伝子機能解析のみならず遺伝子治療のためにも重要である。生体への遺伝子導入法の中で最も単純なものは naked DNA 法である。プラスミド注射法と電気穿孔法の併用は筋肉内遺伝子導入効率の大幅な改善を認めることができ、これまでの検討から明らかになっている。本研究では、高効率の遺伝子発現法を開発する目的で、サイトカイン蛋白と免疫グロブリンの Fc との融合蛋白発現ベクターを開発し、その効果を検討した。また、プラスミドなどを大量のリソゲル液などと共にマウスに急速に静注すると肝細胞に導入されることが知られるようになった。そこでサイトカイン発現遺伝子の急速静脈注射法による効果についても検討した。

電気穿孔法による融合サイトカイン発現の検討：pCAGGS-IL10/Fc 遺伝子導入したマウス血清では、Western blot の結果から融合蛋白は血清中でホモダイマーを形成していることが示唆された。C3H/HeJ マウスに IL-10/Fc 遺伝子導入した場合、著明に IL-10 血中濃度を高め、IL-10 遺伝子導入の約 10-100 倍になった。発現期間も延長した。C57BL/6 マウスの場合 IL-10 の血中濃度は増加したが、C3H/HeJ マウスに比し発現量は低値であった。発現期間延長効果も認めなかった。C3H/HeJ マウスに pCAGGS-luc を導入すると、C57BL/6 マウスに比し、約 10 倍のルシフェラーゼ活性を認め、マウスの strain 間で遺伝子発現の差異が認められた。急速静脈注射法の検討：pCAGGS-1acZ  $50 \mu g$  の急速静脈投与により、マウス肝全体に LacZ 発現を認め、高率に遺伝子導入される事が確認された。pCAGGS-IL10 遺伝子導入により極めて高濃度の血中 IL-10 を保つことができた。

生体における Fc 融合サイトカイン遺伝子導入法は、血中サイトカイン発現の上昇、維持に有効であるが、効果判定の際には、マウス系統間で遺伝子発現に差異があることを考慮する必要があることを示唆し、プラスミド急速静脈注射法は、効率良く遺伝子導入可能で、サイトカイン遺伝子を発現させた場合、血中濃度が数十  $\mu g/ml$  の order に上昇することを認めた。本研究は全て非修飾プラスミド DNA を用いるため、特殊な設備が必要でなく、抗原性や感染の可能性もなく、反復施行も可能である。この手法は、遺伝子機能を in vivo で広く解析するスクリーニングとしても有効であり、学位に値する研究であると考えられる。