



Title	Fetal Gene Transfer by Intrauterine Injection with Microbubble-Enhanced Ultrasound
Author(s)	遠藤, 誠之
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45228
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	遠藤 誠之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18532 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Fetal Gene Transfer by Intrauterine Injection with Microbubble-Enhanced Ultrasound (超音波とマイクロバブルを用いた子宮内胎児への遺伝子導入方法の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 金田 安史 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

[目的]

出生時にすでに不可逆的なダメージが確立している先天性疾患に対し、そのようなダメージが起こる前、すなわち胎児期に治療することは有用である。

幸いなことに胎児は免疫系が未熟なため導入遺伝子生成物に対して寛容が誘導され長期に存在できること、また遺伝子導入の標的となる幹細胞が豊富であることから出生前での遺伝子治療の有益性が強く予想される。

さらに胎児への遺伝子導入方法の開発は発生時期・部位特異的な遺伝子機能解析に対してトランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスと並んで非常に有用な手段となりうると考えられる。

しかし、胎児へ遺伝子を導入する場合、細胞障害性の有無、生殖細胞系への導入の有無等に関しての安全性が大人以上に重要である。その点でウイルスベクターよりも非ウイルスベクターの使用が望ましいが、最終的な目標が治療である以上やはり導入効率の向上も必要である。

そこでわれわれは非ウイルスベクターのひとつである naked DNA を用いてそれに超音波造影剤と超音波を組み合わせることによって胎児期での効率的でかつ安全な遺伝子導入方法を開発することを研究目標とした。

[方法ならびに成績]

13~15 日令の胎仔マウスの各部位(羊水内・胸腔内・腹腔内・脳室内)へ naked DNA (ルシフェラーゼ、GFP、LacZ) あるいは FITC label したオリゴヌクレオチドを超音波造影剤と共にガラス針にて注入し、経子宮壁的に超音波照射することで遺伝子導入を行った。この方法を Shotgun Method (以下 SGM と記す。) と称する。その後再度妊娠子宮を母体内へ戻して、以下の 9 項目について、ルシフェラーゼ活性測定・蛍光顕微鏡による観察・走査電子顕微鏡による観察・X-Gal 染色・RT-PCR を用いて検討した。

(1)生存率

SGM 施行後の胎仔マウスの 24~48 時間後での生存率は、sham-ope 群の生存率が 94%であったのに対して 70%であった。

(2)他方法との導入効率の比較

Naked DNA 法でのルシフェラーゼ活性が 1569RLU であったのに対して、SGM での活性は約 300 万 RLU と、導入効率は約 2000 倍になった。

(3)SGM の発現持続期間

ルシフェラーゼ活性は、投与後 1 日目をピークに漸減していき、28 日後では当初の 1000 分の 1 にまで活性は減少した。

(4)SGM 後の胎仔皮膚の変化

電子顕微鏡下での観察では、SGM 直後に胎仔皮膚表面に一時的な径 10 μ m 程度の孔の形成を認めたが、24 時間後には閉鎖していた。

(5)投与部位別での luciferase 発現の分布

羊水腔では皮膚・羊膜、脳室では脳、腹腔では腸管、胸腔では肺・腸管での発現を特に高く認めた。

(6)投与部位別での GFP 発現の分布

GFP の発現は部位特異的で、羊水腔では皮膚・羊膜、脳では脳室周囲、腹腔では肝・腸管表面に、胸腔では肺に限局して発現していた。

(7)投与部位別での LacZ 発現の分布

X-Gal 染色で、LacZ 発現部位は GFP と同様で、さらに臓器表面に限局していた。

(8)投与部位別での FITC-oligonucleotide の分布

導入部位は LacZ と同様であったが、より広範に導入されていた。

(9)生殖器への遺伝子導入の有無

唯一腹腔内投与した例で、GFP 遺伝子が生殖器に PCR により確認されたが、出生 1 ヶ月後の生殖器では認められなかった。子孫への継代も認めなかった。

[総括]

- (1)SGM 法によって効率的且つ部位特異的な遺伝子導入が可能であった。
- (2)SGM 法で生存率は他方法と比較して低かった。
- (3)SGM 法の発現は一過性であった。
- (4)SGM では生殖細胞への導入が認められたが、一過性であった。

論文審査の結果の要旨

<目的>

出生時にすでに不可逆的なダメージが確立している先天性疾患に対し、胎児期に治療することは有用である。われわれは naked DNA を用い、それに超音波造影剤と超音波を組み合わせ、胎児期での効率的でかつ安全な遺伝子導入方法を開発する。

<方法>

胎仔マウスの各部位（羊水内・胸腔内・腹腔内・脳室内）へ naked DNA（ルシフェラーゼ、GFP、LacZ）あるいは FITC-ODN を超音波造影剤と共に注入し、経子宮壁的に超音波照射することで遺伝子導入を行った。（以下 SGM。）

<成績>

- (1)Naked DNA 法と比較し、導入効率は約 2000 倍。
- (2)走査電顕で、羊水腔内 SGM 直後に皮膚表面に径 10 μ m の孔の形成を認めたが、24 時間後には閉鎖した。
- (3)遺伝子発現は投与後 1 日目をピークに、28 日後ではその千分の一まで減少。
- (4)羊水腔内投与では皮膚・羊膜、脳室内投与では脳、腹腔内投与では腸管、胸腔内投与では肺・腸管で導入遺伝子の発現、及び FITC-ODN の導入を高く認めた。

(5)腹腔内投与群で、出生直後に導入遺伝子が生殖器に認められたが、出生1ヶ月後、また子孫で発現は認めなかった。

<結論>

(1)SGM法によって効率的且つ部位特異的な遺伝子導入が可能であった。

(2)SGM法の発現は一過性であった。

(3)SGMでは生殖細胞への導入が認められたが、一過性であった。

この研究成果によって、超音波を用いた胎児への遺伝子導入方法が開発された。これは将来の胎児遺伝子治療への応用に大きく寄与する物であり、博士（医学）の学位授与に値する。