The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats
Author(s)	大島, 一男
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45305
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

【115】

氏　　名	大島一男（おおしまかずお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　１８５４３　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	Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats **(HVJ-E ベクターを用いた HGF 遺伝子導入によるラット難聴モデルの予防と治療効果)**
論文審査委員	（主査） 教　授　久保　　武 （副査） 教　授　金田　安史　　教　授　荻原　俊男

論文内容の要旨

【目的】

内耳性難聴は、罹患率の高い感覚器障害であり、また、治療が非常に困難な疾患である。有毛細胞（音信号を電気信号に変換する感覚細胞）の障害を主な病態とするが、従来、有毛細胞は一度障害を受けると再生せず、一旦生じた内耳性難聴は治癒しないと考えられてきた。本研究は、代表的難治性難聴である内耳性難聴の治療・機能改善をめざし、新規かつ独自の臨床的治療法を開発するという目的に対して、治療用遺伝子としての Hepatocyte Growth Factor（HGF：肝細胞増殖因子）遺伝子の選択、遺伝子導入法としての Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope（HVJ-E）法の利用、という独自な方法論開発を特色とする。

我々は、以前より、HGF と内耳の関連に注目し、内耳における HGF 及びそのレセプターである c-Met の局在・機能についての研究を重ねてきている。これまでの研究結果より、HGF は、正常な聴力機能を保持する分子として、また、胎生期に於ける内耳の正常な発達を制御する分子として、重要な生理機能を有する因子である事が示唆されている。

遺伝子導入の手段には HVJ-E 法を用いた。これは大阪大学遺伝子治療学教室（金田教授）にて開発されたもので、Hemagglutinating Virus of Japan（HVJ；別名：センダイウイルス）の持つ細胞融合能を利用したベクターシステムである。これは、ゲノム RNA を不活化した後のウイルスの脂質膜（envelope）を利用したもので、その内部に高分子量の遺伝子や核酸試薬などを封入し、安全・高効率な細胞内遺伝子導入を可能とする。これ迄、多種の臓器への導入の有効性が報告されているが、内耳への適応例はない。今回、初めて本法を内耳への遺伝子導入法として応用した。

【方法ならびに成績】

①内耳への遺伝子導入実験

６週齢ラットに対し、マーカー遺伝子（蛍光蛋白、β-gal）を封入した HVJ-E を、小脳延髄槽経由で脳脊髄液内投与した。内耳での発現を薄切切片にて観察した結果、有毛細胞・らせん神経節細胞・血管条などに於いて、マーカー

遺伝子の発現が観察された。染色液（ファーストグリーン）を髄液内投与すると、内耳での染色が観察されたことより、HVJ-E も同様に内耳に到達していたことが考えられる。また、内耳・脳の器質的変化、機能障害は見られなかった。この実験より、HVJ-E 法は、安全かつ有効な内耳への遺伝子導入手段であることが確認された。

②HGF を用いた難聴予防・治療実験

一般的な難聴モデルであるカナマイシンによる有毛細胞障害ラットモデルに対し、HVJ-E を用いた HGF 遺伝子導入実験を行った。HGF 遺伝子を組み込んだ plasmid DNA、又は、control plasmid を HVJ-E 内に封入し、ラットに髄液内投与した。予防実験では、カナマイシン投与（400 mg/kg/day）開始と同時に同ベクターを髄液内投与、治療実験ではカナマイシン投与（同量）開始から 14 日後に、同ベクターを髄液内投与した。

免疫染色により、らせん神経節細胞において導入 HGF 遺伝子の発現が確認された。また、髄液内の HGF 濃度を ELISA 法にて測定した結果、14 日間以上にわたり、HGF の発現量増加が観察された。有毛細胞・らせん神経節細胞の残存数の評価を行ったが、HGF 投与群で有意に多かった。HGF 群では apoptosis 細胞数の減少が見られた（TUNEL 法）。また、らせん神経節細胞において、HGF 受容体である c-Met の発現の増加も見られ、HGF の効果を増強させていると考えられた。聴性脳幹反応（ABR）による聴力評価の結果、予防実験では、コントロール群で高度難聴が認められたが、HGF 投与群の聴力はほぼ正常のまま保たれていた。治療実験に於いては、コントロール群・HGF 投与群共に、14 日後迄高度難聴を認めたが、HGF 投与後、HGF 群では有意な聴力改善を認めた。

【総括】

我々は、HVJ-E 法を用いて HGF 遺伝子を経髄液投与で内耳に導入することで、内耳障害を予防・治療し、聴力機能も改善可能な、新しい内耳性難聴の治療法を開発した。これまでに報告された内耳性難聴に対する神経栄養因子を用いた実験では、らせん神経節細胞、又は、有毛細胞数の減少が防止可能であった報告はあるが、機能改善の報告はない。これまでの治療遺伝子では、効果発現の面で不十分であったが、今回、HGF 遺伝子を用いて初めて機能改善の効果がみられた。この HGF 遺伝子を用いた難聴治療法は、臨床上よく目にする突発性難聴や騒音性・薬剤性難聴に対してだけでなく、人工内耳装用効果を補助する手段としても有効かつ独創的な治療法となり得ると思われる。

論文審査の結果の要旨

内耳性難聴は、罹患率の高い感覚器障害であり、また、治療が非常に困難な疾患である。有毛細胞の障害を主な病態とするが、従来、有毛細胞は一度障害を受けると再生せず、一旦生じた内耳性難聴は治癒しないと考えられてきた。申請者は、代表的難治性難聴である内耳性難聴の治療・機能改善をめざし、新規かつ独自の臨床的治療法を開発する為に、治療用遺伝子としての Hepatocyte Growth Factor（HGF：肝細胞増殖因子）遺伝子の選択、遺伝子導入法としての Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope（HVJ-E）法の利用、という独自の方法論を用いて、新たな治療法の開発を試みた。

まず、HVJ-E を用いた内耳への遺伝子導入実験を行った。6 週齢ラットに対し、マーカー遺伝子を封入した HVJ-E を、小脳延髄槽経由で脳脊髄液内投与した。有毛細胞・らせん神経節細胞・血管条などに於いて、マーカー遺伝子の発現が観察された。また、内耳・脳の器質的変化、機能障害は見られなかった。この実験より、HVJ-E 法は、安全かつ有効な内耳への遺伝子導入手段であることが確認された。

次に、HGF 遺伝子を用いた難聴予防・治療実験を行った。一般的な難聴モデルであるカナマイシンによる有毛細胞障害ラットモデルに対し、HGF 遺伝子を組み込んだ plasmid DNA、又は、control plasmid を HVJ-E 内に封入し、ラットに髄液内投与した。予防実験では、カナマイシン投与（400 mg/kg/day）開始と同時に同ベクターを髄液内投与、治療実験ではカナマイシン投与（同量）開始から 14 日後に、同ベクターを髄液内投与した。免疫染色により、らせん神経節細胞において導入 HGF 遺伝子の発現が確認された。また、14 日間以上にわたり、HGF の髄液内での発現量増加が観察された。有毛細胞・らせん神経節細胞の残存数は、HGF 投与群で有意に多かった。HGF 群では apoptosis 細胞数の減少が見られた（TUNEL 法）。また、らせん神経節細胞において、HGF 受容体である c-Met の

発現の増加も見られ、HGF の効果を増強させていると考えられた。聴性脳幹反応（ABR）による聴力評価の結果、予防実験では、コントロール群で高度難聴が認められたが、HGF 投与群の聴力はほぼ正常のまま保たれていた。治療実験に於いては、コントロール群・HGF 投与群共に、14 日後迄高度難聴を認めたが、HGF 投与後、HGF 群では有意な聴力改善を認めた。

この研究により、内耳性難聴の新たな治療法が開発され、今後の臨床応用も期待される。従って、学位に値するものと認める。