



Title	In vivo and ex vivo gene transfer into the liver using electroporation
Author(s)	小林, 省吾
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45325
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	小 林 省 吾 こ ばやし しょう ご
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 18523 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	<i>In vivo</i> and <i>ex vivo</i> gene transfer into the liver using electroporation. (Electroporation 法を利用した経門脈的 <i>in vivo</i> および <i>ex vivo</i> 肝内遺伝子導入法の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 宮崎 純一 教授 金田 安史

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

肝移植における過小グラフトや拒絶反応といった問題を解決するためにグラフト肝への HGF や Bc12 等の種々の遺伝子導入が試みられてきた。しかし、ウイルスベクターを中心とした遺伝子導入法は遺伝子突然変異や免疫反応を引き起こす可能性がある。一方、エレクトロポレーション等の非ウイルスベクター遺伝子導入法は nakedDNA のみを使用するためそういった危険性は少ないが、遺伝子導入の部位が限定される。そこで、本研究では広範囲の肝組織に遺伝子を導入するために、経門脈的に遺伝子溶液を注入後、*in vivo* エレクトロポレーションを試みた。さらにグラフト肝への *ex vivo* 遺伝子導入を 'bath tab' 型遺伝子導入装置を作成しエレクトロポレーションを行い、至適条件を検討した。

〔方法〕

1) 肝臓への *in vivo* 遺伝子導入

麻酔下に雄 Shionogi-Wistar ラット (6 週齢) に門脈カテーテルを留置し、肝右葉・尾状葉にのみ遺伝子溶液が注入されるようにクランプした。カテーテルより遺伝子溶液 (25-400 μ g/ml, 500-2000 μ l) を緩徐に注入し、尾状葉にのみ電圧 (50-125 V, 100 msec/1000 msec, 6 回) を加えた後、クランプを解放した。導入遺伝子としては pCAGGS-EGFP と pCAGGS-ルシフェラーゼを用い、遺伝子導入 4 日後に肝臓を摘出し、蛍光顕微鏡 (EGFP) で観察し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

2) 肝臓グラフトへの *ex vivo* 遺伝子導入

雄 Shionogi-Wistar ラット (9 週令) よりグラフト肝を採取後、血管カフを留置し、右葉・尾状葉にのみ遺伝子が注入されるようにクランプし、門脈より遺伝子溶液 (100 μ g/ml, 1 ml) を緩徐に注入した。グラフト肝を 4℃ の導入溶液を満たした 'bath tab' 型遺伝子導入装置 (電極 6×2 cm, 電極間距離 6 cm) に浸漬し、電圧 (100 msec/1000 msec, 6 回) を加えた後、クランプを解放した。注入遺伝子溶液としては TE buffer と生理的食塩水、または Sucrose で浸透圧を調製したものをを用いた (20-310 mOsm/kg)。導入溶液としては、リンゲル液、HTK 液、UW 液を用い、一定実効電流 (1.4-1.7 A) ・一定実効電圧 (150 V) で導入効率を比較した。また、溶液を一定にし、電圧を変化さ

せて遺伝子導入効率を比較した (0-450 V)。肝移植は同ラットをレシピエントとし、Kamada らのカフ法変法で行った。遺伝子の導入効率は移植 24 時間後にグラフト肝を摘出し、*in vivo* の系と同様の方法にて検討した。

[成績]

1) 肝臓への *in vivo* 遺伝子導入

ルシフェラーゼ活性は電圧を加えた尾状葉でのみ認められた。また、遺伝子溶液の濃度 (200 μ g/ml 以下) と実効電圧 (100 V 以下) に依存していた ($P < 0.01$) が、注入量とは無関係であった。

2) 肝臓グラフトへの *ex vivo* 遺伝子導入

遺伝子溶液を注入した右葉および尾状葉にルシフェラーゼ活性を認めた。同活性は実効電圧または実効電流と相関して増加した ($P < 0.01$)。導入溶液によって同活性は変化し、一定実効電流 (1.4-1.7 A) では HTK 液を用いた場合が (HTK; 350 V; $1.9 \pm 1.8 \times 10^4$, UW; 250 V; $2.6 \pm 1.9 \times 10^3$, リンゲル; 150 V; $2.6 \pm 4.6 \times 10^3$, 単位 RLU/mg protein)、また、一定実効電圧 (150 V) ではリンゲル液を用いた場合が最も高値であった (HTK; 0.7 ± 0.1 A; $3.3 \pm 5.6 \times 10^2$, UW; 1.1 ± 0.1 A; $1.4 \pm 0.7 \times 10^3$, リンゲル; 1.7 ± 0.1 A; $2.6 \pm 4.6 \times 10^3$, 単位 RLU/mg protein)。遺伝子溶液の浸透圧とルシフェラーゼ活性は相関しており ($p < 0.05$)、浸透圧が低いほど同活性は高値であった (20 mOsm/kg; $1.9 \pm 1.8 \times 10^4$, 110 mOsm/kg; $2.1 \pm 1.4 \times 10^3$, 290 mOsm/kg; $2.4 \pm 3.9 \times 10^2$, 単位 RLU/mg protein)。この結果は NaCl と Sucrose を用いた場合のどちらでも同様に認められた。

[総括]

エレクトロポレーション法を用いて、肝臓およびグラフト肝への経門脈的遺伝子導入法を確立した。本法の遺伝子導入効率は実効電圧、遺伝子濃度と正の相関性を、溶媒の浸透圧と負の相関性を認めた。本研究によって、非ウイルスベクターによる移植グラフトへの効果的な遺伝子導入が可能となり、今後肝移植に於ける過小グラフト・拒絶反応といった諸問題への応用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は遺伝子突然変異・免疫反応といった副作用が考えられるため、臨床移植症例ではより危険性の少ない非ウイルスベクターによる遺伝子導入が望ましい。本研究では、非ウイルスベクター導入法の中でも比較的安全、安価に導入効率を高めることのできるエレクトロポレーション法を用い、肝移植グラフトに *ex vivo* で遺伝子を導入する方法をラットを用いて検討した。

まず、経門脈的遺伝子注入と *in vivo* エレクトロポレーション法により、肝臓全体に遺伝子導入が可能か否かを、遺伝子濃度およびエレクトロポレーション電圧を含めて至適条件を検討した。ルシフェラーゼ、GFP 遺伝子導入後 4 日目の肝に於いて、遺伝子発現は遺伝子を注入しエレクトロポレーションを行った肝臓のみに広範囲に認められた。次に、*ex vivo* での肝グラフトへのエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行うため、'bath tab' 型遺伝子導入装置を自作し、*in vivo* エレクトロポレーション法を応用して *ex vivo* 導入法の確立を試みた。遺伝子を肝グラフトに経門脈的に注入し、臓器保存液で満たした 'bath tab' の中央に静置しエレクトロポレーションを行い、その後 60 分以内にカフ法で同系移植した。臓器保存液としては乳酸加リンゲル液、HTK 液、UW 液を用いた。遺伝子を導入したグラフトを移植したラットの生存率は、非遺伝子導入ラットの生存率と変わらなかった。移植後のルシフェラーゼ遺伝子の発現は 24 時間目をピークとして以後漸減し、14 日目にはほとんど認められなくなった。GFP を導入し、移植後 24 時間目の肝の発現を蛍光顕微鏡で検討したところ、*in vivo* 法と同様な発現が認められた。また、臓器保存液の種類によって導入効率は異なり、一定実効電流では HTK が、一定実効電圧では乳酸加リンゲルが最も導入効率が高く、臓器保存液自体の伝導率が関係している可能性が考えられた。

本研究によって、非ウイルスベクターによる肝グラフトへの遺伝子導入が可能となり、今後肝移植に於ける虚血再灌流傷害・過小グラフト・拒絶反応といった諸問題の解決に寄与するものと考えられ、学位 (医学) の授与に値すると認める。