

Title	Needless in vivo gene transfer into muscles by jet injection in combination with electroporation
Author(s)	堀木, 真由美
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46292
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	堀 木 真 由 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19720 号
学位授与年月日	平成 17 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Needleless <i>in vivo</i> gene transfer into muscles by jet injection in combination with electroporation (ジェット注入法と電気穿孔法併用による無針性遺伝子導入法の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男 (副査) 教授 金田 安史 教授 下村伊一郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

遺伝子導入の臨床的実用化を目的として、インスリン注入法として臨床応用されているジェット注入法と、既に開発されている電気穿孔法を併用することにより、針を用いずに生体の筋肉への遺伝子導入を試みる。

〔 方 法 〕

発現ベクターは、マウス IL-5 cDNA を CAG プロモータとウサギ β -グロビン遺伝子のポリ A シグナルの間にある EcoRI サイトに挿入して作製した (pCAGGS-IL-5)。同様に大腸菌の lacZ 遺伝子と EGFP 遺伝子を pCAGGS 発現ベクターの EcoRI サイトに挿入し、pCAGGS-lacZ と pCAGGS-EGFP を作製した。ジェット注入にはインスリン注射器として開発された ShimaJET を用いた。8-10 週齢の雌の ICR マウスをペントバルビタールの腹腔内注射で麻酔し、別々のマウスで両側の前脛骨筋、腓腹筋、大腿筋の部分の毛を丁寧に剃った後、ShimaJET あるいは 27 ゲージの注射器で計 50 μ g の DNA を筋肉内に注射した。直後に、5 mm 間隔で離れた 1 \times 1.5 cm² の一対のステンレス電極で DNA を注射した筋肉を挟み、通電した (100 V、50 msec、順方向・逆方向 3 回ずつ、計 6 回)。経時的に尾動脈より採血し、ELISA 法により血中 IL-5 濃度を測定した。また lacZ 遺伝子導入後 5 日目に各筋肉を採取し、X-gal 染色を施した。EGFP 遺伝子導入後に採取した筋肉を蛍光顕微鏡下で観察した。

〔 結 果 〕

ジェット注入法と電気穿孔法を併用してマウスの前脛骨筋に IL-5 遺伝子を導入したところ、血中 IL-5 濃度は、導入後 5 日目にピークを示し (2.9 \pm 0.5 ng/ml)、28 日後も測定可能であった (0.4 \pm 0.1 ng/ml)。3 つの異なる場所の筋肉に、従来の注射器と ShimaJET を用いて IL-5 遺伝子を注入し、それぞれ電気穿孔法を併用した時の血中 IL-5 濃度を比較すると、前脛骨筋においては注射器で注入した群で有意に高値を示した (ピーク値: 17.8 \pm 1.3 vs 2.9 \pm 0.5 ng/ml、 $P < 0.01$)。一方、腓腹筋、大腿筋においては、ShimaJET を用いた群で血中 IL-5 濃度は高い傾向を示した (2.5 \pm 1.0 vs 8.4 \pm 2.7 ng/ml、2.9 \pm 0.5 vs 5.3 \pm 1.9 ng/ml)。LacZ 遺伝子と EGFP 遺伝子を、それぞれ注射器と ShimaJET を用いて腓腹筋に導入し、染色および蛍光顕微鏡にてその導入効率の差異を比較したが、いずれの方法でもその差は明らかでなかった。ジェット注入法により、最も高い血中 IL-5 濃度が得られた腓腹筋を用いて、通電時の

電圧、通電時間、注入する DNA 量について、至適条件を検討した。電圧に関しては、100 V で通電時に血中 IL-5 濃度がピークを示した (8.4 ± 2.7 ng/ml) が、80~120 V では有意差を認めなかった。通電時間については、50 msec. でそれ以下の時間に比して血中 IL-5 濃度は有意に高く (8.4 ± 2.7 ng/ml)、99 msec. まで時間依存性に高値を示す傾向を認めた。DNA 量に関しては、30 μ g 投与時に血中 IL-5 濃度は最高値を示し (15.5 ± 3.1 ng/ml)、150 μ g まで増量しても血中 IL-5 濃度に有意な変化を認めなかった。

[総 括]

従来の電気穿孔法で用いられていた、遺伝子注入時と通電時の針を必要としない新たな手法を用いることにより、より侵襲性の少ない条件下で、全身性に目的の蛋白を産生させることに成功した。蛋白産生のピーク値は従来法に比して少量であったが、適切な筋肉部位を選択することによって、より少量の DNA 量で従来法以上の蛋白産生が得られたことから、今後の臨床応用に向けて有用な方法であることが示された。

論文審査の結果の要旨

遺伝子治療を一般の臨床に応用するには、遺伝子の導入方法ならびに導入効率の面で改善すべき点が多く残されている。特に、動物実験で用いられる筋肉内注射と針型電極による電気穿孔法を併用する方法は、針刺入を繰り返すことから侵襲性の面で臨床応用に際しては改良が望まれている。本研究ではインスリン注入法として臨床応用されているジェット注入法と、既に開発されている電気穿孔法をプレート型電極で併用することにより、針を用いずに生体の筋肉への遺伝子導入を行うと共に、その至適条件を詳細に検討した。その結果、針を用いない本方法による筋肉内への遺伝子導入が確認されると共に、導入遺伝子産物の血中濃度が導入後5日目にピークを示し、28日後にも測定可能であること、比較的大きな筋肉である腓腹筋、大腿筋においてジェット注入法を用いた群で従来の筋肉注射の群に比し高い血中濃度が得られること、電気穿孔法の至適条件として、電圧 100 V、通電時間 99 msec、DNA 量 30 μ g で血中濃度が最高値を示すことを明らかにした。本研究は、従来法で遺伝子注入時と通電時に必要とされていた針刺入を必要としない侵襲性の少ない新たな方法を提供するとともに、より少量の DNA 量で全身性に目的の蛋白を産生させることに成功したものである。本研究から得られた知見は遺伝子治療の臨床応用に資する情報を提供し、遺伝子治療研究の発展に寄与するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。