Osaka University Knowledge Archive

Title	Acceleration of Wound Healing by Combined Gene Transfer of Hepatocyte Growth Factor and Prostacycline Synthase with Shima Jet
Author(s)	椚座, 康夫
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47435
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【２】

氏　　名	椚　座　康　夫（くぬぎ　ざ　やす　お）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０５７８　号
学位授与年月日	平成 18 年 4 月 24 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	Acceleration of Wound Healing by Combined Gene Transfer of Hepatocyte Growth Factor and Prostacycline Synthase with Shima Jet （シマジェットを用いた HGF 遺伝子及び PGIS 遺伝子導入による創傷治癒効果の促進）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　吉川　秀樹 （副査） 教　授　片山　一朗　　教　授　中村　敏一

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

HGF は、上皮系細胞の増殖、管腔形成などの多彩な生理作用を持つ多機能分子であり、上皮形成促進、血管新生などの効果を有する。一方、プロスタサイクリンは血小板凝集抑制、血管平滑筋の弛緩などの作用を有し、循環障害を改善することが知られている。今回、ヒト HGF 遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素であるヒトプロスタサイクリンシンターゼ（PGIS）遺伝子をばね式の針なしインスリン皮下注射器であるシマジェットを用いてラット皮膚に導入することにより、創傷治癒に対する効果を検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

始めにシマジェットを用いてラット皮膚に LacZ 遺伝子を導入し、遺伝子発現部位を検討したところ、遺伝子発現は表皮、中でも表皮基底細胞層に強く認められた。次に、Luciferase 遺伝子を同様に導入し、遺伝子導入効率を検討したところ､遺伝子発現は注射針で遺伝子を導入した場合に較べて約 100 倍の高い効率であり､用量依存性を認めた。発現期間は導入７日後まで確認できた。ヒト HGF 遺伝子 100μg をラット皮膚にシマジェットを用いて導入したところ２日後導入部位において約 12 pg/mg tissue の HGF 蛋白の発現を確認できたが、注射針で導入した場合では有意な発現を認めなかった。HGF 遺伝子及び PGIS 遺伝子をそれぞれラット皮膚にシマジェットを用いて導入し、免疫染色にて発現を確認したところ、いずれの遺伝子を導入した場合も表皮に強い発現を認めた。これらの基礎データをもとに、次に創傷治癒に対するシマジェットによる HGF、PGIS 遺伝子導入の効果を検討した。

７週齢雄性ウイスターラットに 30 mg/kg のプレドニゾロンを３日間隔で計２回筋肉注射し、創傷治癒遅延モデルを作成した。２回目のプレドニゾロン注射後にラット背部に直径 1.6 cm の全層性の創を作成した。ラットを５グループに分け、グループ２～５にはプレドニゾロン、グループ１にはコントロールとして PBS を筋肉注射した。創作成と同時（Day0）にシマジェットを用いて創周囲に遺伝子を導入した。グループ３には HGF 遺伝子 100μg×５箇所、グループ４には PGIS 遺伝子 100μg×５箇所、グループ５には HGF 遺伝子 100μg×５箇所及び PGIS 遺伝子 100μg×５箇所を導入し、グループ１、２にはコントロールとして PBS を注射した。創治癒の評価として、Day4

にて Laser Doppler Image Analizer を用いて創周囲の血流量を検討したところ、PGIS 打ち込み群において有意な血流の増加を認めた。

組織学的評価として、Day3 において創辺縁の PCNA 陽性表皮細胞の数を計測したところ、HGF 導入群において有意な増加を認め、また Day7 において肉芽組織中の新生血管数を測定したところ HGF 導入群において有意な増加を認めた。創面積を測定したところ Day4 において HGF、PGIS 共導入群（グループ５）においてコントロール群（グループ２）に比較して有意な総面積の縮小を認め、Day6 において HGF 導入群（グループ３）において有意な創面積の縮小を認め、PGIS との共導入（グループ５）によりその効果は増強した。PGIS 導入群（グループ４）においては創縮小効果を認めなかった。

〔 総　　括 〕

創傷治癒を促進するためリコンビナント蛋白製剤が用いられているが、短い半減期、高用量の蛋白が必要であること等課題も多い。皮膚への遺伝子導入は、遺伝子産物を局所的或いは全身的に作用させる為の有用な手段となりうると考えられる。遺伝子導入の方法としてシマジェットは安全性、経済性、効率性に優れ、また反復導入が可能、などの利点を有することより臨床応用の可能性が非常に高いと考えられる。本研究では、創傷治癒遅延モデルのラットにおいてシマジェットを用いた HGF 遺伝子導入による表皮細胞の分化促進、新生血管の増加、PGIS 遺伝子導入による血流増加を確認できた。HGF 遺伝子導入による創収縮効果は PGIS 遺伝子との共同入により促進された。PGIS 遺伝子単独の導入群では創収縮効果を認めなかったが、これはプロスタサイクリンの半減期が短いことによると考えられた。

高齢化社会を迎えている現在、糖尿病や閉塞性動脈硬化症等により難治性の潰瘍の症例は増加している。シマジェットによるヒト HGF、ヒト PGIS 遺伝子導入は難治性潰瘍の有効な治療手段となる可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究においては、皮膚表皮細胞の分化促進、血管新生作用をもつ HGF の遺伝子と血小板凝集抑制、血管拡張作用等をもつプロスタサイクリンの合成酵素である PGIS の遺伝子をラットの創周囲にシマジェットを用いて導入することにより創傷治癒が促進することを示した。実験結果の解析により、HGF 遺伝子の導入による表皮細胞の分化促進、肉芽中の内皮細胞の増加、PGIS 遺伝子の導入による創周囲の血流量増加が認められた。シマジェットによる遺伝子導入は、ベクターを用いない DNA の局所投与により皮膚表皮に高効率の蛋白を発現させることができ、また操作が簡単、反復投与が可能、など治療手段としての有用性も高いと思われる。

近年、食生活の欧米化に伴い、糖尿病や閉塞性動脈硬化症などに伴う難治性潰瘍の症例は増加しているが、シマジェットによる HGF 遺伝子と PGIS 遺伝子の共導入は有用な治療手段のひとつになる可能性が示唆され、本研究は学位授与に値すると考えられる。