

Title	Sendai Virus-Mediated Gene Delivery into Hepatocytes via Isolated Hepatic Perfusion
Author(s)	藤田, 繁雄
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47479">https://hdl.handle.net/11094/47479</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	藤 田 繁 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 2 1 4 2 8 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	Sendai Virus-Mediated Gene Delivery into Hepatocytes <i>via</i> Isolated Hepatic Perfusion (経門脈閉鎖灌流系を使ったセンダイウイルスベクターの肝細胞への遺伝子導入の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 澤 芳樹  (副査) 教授 福澤 正洋 教授 米田 悦啓

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

パラミクソウイルス属の一種であるセンダイウイルス (SeV) を基にした組換えベクターは、宿主ゲノムに導入遺伝子が取り込まれず安全性が高いこと・種特異性や細胞特異性が低く汎用性が高いことから、遺伝子治療用ベクターとしての実用化が期待されている。これまでに、このベクターを使って気道粘膜・血管内皮・骨格筋・網膜・中枢神経系や心筋に遺伝子導入できることが確認されているが、肝実質細胞への *in situ* での導入方法は確立されていない。その理由として、SeV の物理的サイズが直径 200 nm 以上あり、肝類洞と肝実質細胞の間の血管内皮間隙 (直径 100 nm 程度) を通過することができない点が指摘されている。一方、肝臓の血管内皮間隙は門脈圧の上昇により可逆的に拡張することが知られている。そのため、門脈圧を人為的に制御すれば SeV ベクターを肝実質細胞に効果的に送達できる可能性がある。

#### 【目 的】

肝での閉鎖灌流系を構築し、灌流量を調節することにより門脈圧を変化させた条件下でセンダイウイルスベクターを投与し、肝細胞への遺伝子導入を行う。

#### 【対象・方法】

1. ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した SeV ベクター (SeV-Luc) 及び EGFP 遺伝子を挿入した SeV ベクター (SeV-EGFP) は、10 日齢有精卵に接種し 72 時間後に漿原液中から回収し、ショ糖密度勾配法と Sephacryl S1000 を用いたゲルろ過法により粒子径の均一なベクターとした。粒子径の計測は動的光散乱法で行った。
2. 8 週令の雄 Wister ラットを全身麻酔下に開腹し、肝の流入・流出血管をすべて遮断した上で、門脈分枝である pyloric branch と大下静脈の分枝である左腎静脈にカニューレションを行い、前者より灌流液を注入し後よりドレナージを行う閉鎖系肝灌流モデルを作成した。ベクターの投与にあたっては、まず、乳酸化リンゲル液 (LRS) による 10 分間の生理的門脈圧での灌流を行い、ついで、灌流速度を調節することによって流入圧の条件を 5-12 mmHg の範囲で人為的に制御しながら、 $10^8$ - $10^9$  pfu のセンダイウイルスを懸濁した LRS10 ml を投与した。最後に LRS を

10 分間生理的門脈圧で灌流して洗浄後、肝流入・流出血管の遮断を解除した。

3. SeV-luc 4 時間投与後における全肝組織・肝臓各葉・心・肺・左腎・脾・精巣・胸腺のルシフェラーゼ活性を測定して、マーカー遺伝子発現の定量的な評価を行った。また SeV-EGFP 投与 12 時間後の肝組織切片を蛍光顕微鏡下で観察し、マーカー遺伝子発現分布を評価した。

#### 【結果】

1. 精製した組み換えセンダイウイルス粒子径は、平均直径 239.9 nm で、粒子サイズの分布度を示す polydispersity index は 0.1 以下で、均一なウイルス粒子を調整することができた。

2. 投与条件としては、ベクターの濃度 ( $10^8$  pfu/ml) と後灌流液の温度 ( $42^{\circ}\text{C}$ ) が肝障害を防ぐために適当であった。

3. 肝全体でのルシフェラーゼ活性は灌流圧依存的に上昇し、12 mmHg での活性は生理的門脈圧 (5 mmHg) のそれに比べ 2.5 倍に上昇していた。一方、肝以外の臓器 (心・肺・左腎・脾・精巣・胸腺) のルシフェラーゼ活性はいずれも検出限界以下であった。

4. EGFP の発現は、生理的門脈圧 (5 mmHg) での灌流では血管内皮細胞のみに見られ肝実質細胞には認められなかったが、灌流圧を 12 mmHg まで上昇させると、圧力依存的に EGFP の発現の範囲が血管周囲から肝細胞へ拡大した。

#### 【総括】

肝臓での Luciferase 遺伝子の発現量は門脈圧上昇に従って増大し、閉鎖灌流系を用いることにより、標的である肝臓以外の組織では遺伝子発現を認められなかった。EGFP 遺伝子の発現は、生理的門脈圧では肝実質細胞で認められなかったのに対して、灌流圧を上昇させることにより肝細胞で発現が観察された。

#### 【結語】

センダイウイルスベクターは、肝閉鎖灌流系において灌流圧を上昇させることにより、肝細胞へ遺伝子送達を行うことが可能であった。

### 論文審査の結果の要旨

センダイウイルスを基にした組換えベクターは、安全性が高いこと・汎用性が高いことから、遺伝子治療用ベクターとしての実用化が期待されているが、肝実質細胞への *in situ* での導入方法は確立されていない。肝での閉鎖灌流系を構築し、門脈圧を変化させた条件下でセンダイウイルスベクターを投与し、肝細胞への遺伝子導入が可能かどうかを検討することを目的とした。その結果、肝臓での Luciferase 遺伝子の発現量は門脈圧上昇に従って増大し、閉鎖灌流系を用いることにより、標的である肝臓以外の組織では遺伝子発現は認められなかった。また、EGFP 遺伝子の発現は、生理的門脈圧では肝細胞で認められなかったのに対して、灌流圧を上昇させることにより肝細胞で発現が増大した。以上より、灌流圧を上昇させることによって、センダイウイルスベクターによる肝細胞への遺伝子導入を行うことが可能であることを示唆した研究であり、学位に値するものと認める。