

氏名(本籍)	いの うえ せいいちろう (東京都)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3797号		
学位授与年月日	平成17年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>GENE THERAPY FOR ORGAN GRAFTS USING RAPID INJECTION OF NAKED DNA : APPLICATION TO THE RAT LIVER</b> (Naked DNA 急速静注法を用いた移植グラフトへの遺伝子治療: ラット肝への応用)		
主査	筑波大学教授	医学博士	大河内 信 弘
副査	筑波大学助教授	博士(医学)	重 田 治
副査	筑波大学助教授	医学博士	須磨崎 亮
副査	筑波大学助教授	医学博士	松 崎 靖 司

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

**目 的:** 臓器移植は小児領域で非常に重要な治療法であり、各種の小児重症肝不全に対して肝移植は現在唯一の根治療法である。臓器移植後のグラフト生着は現在のところ免疫抑制薬による非選択的免疫抑制が中心であるが、免疫抑制薬の服用を中止できる免疫学的寛容の誘導が理想である。一方、肝は遺伝子治療上重要な標的臓器であり、肝への遺伝子導入と臓器移植を組み合わせた治療法は、免疫寛容誘導、DNA ワクチン法、抗アポトーシス遺伝子導入によるグラフト保存などが次世代を担う新しい治療法として注目されている。肝への実験的遺伝子導入法はその効率の点からアデノウイルスベクターを用いたものが一般的であるが、ベクターウイルス自体の危険性と炎症誘導が重大なリスクとなり得る。近年、動物実験モデルで大量の溶媒に溶解した naked DNA 溶液を経静脈的に急速注入して肝に高率に遺伝子導入する、いわゆる Hydrodynamic Based Method が非ウイルスベクター法として注目されている。本研究ではこの方法に注目し、ラット肝移植を用いた実験モデルで、肝選択的に遺伝子導入する方法の開発をめざした。

**方 法:** 雄性 Lewis ラット (MHC haplotype : RT1<sup>l</sup>), Dark Agouti ラット (RT1<sup>a</sup>) (体重 160 ~ 200g) を用いた。β-ガラクトシダーゼ遺伝子 (pCAG LacZ) 125μg, 250μg を PBS に溶解し陰茎背静脈から急速全身投与した。3日後に各主要臓器での遺伝子発現を X-gal 染色で評価した。遺伝子導入時の循環動態を血圧と中心静脈圧を測定して評価し副作用について検討した。本法の副作用が溶媒の大量投与によると考えられたため、カテーテルを用いた肝選択的投与法を開発した。カテーテル法を用いてレシピエントラット肝に免疫抑制タンパク遺伝子 pCAG CTLA4Ig を導入し2日後にアロ異所性心移植を施行した。レシピエント末梢血中 CTLA4Ig 値を ELISA 法で経時的に測定し、アロ心移植グラフト生存とともに評価した。最後に術前2日にドナーラット肝にルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3) を、カテーテルをもちいて遺伝子導入し、2日後にこの肝をグラフトに用いて同所性及び異所性肝移植を施行した。移植後のグラフト肝内での遺伝子発現を Living Image System (IVIS Xenogen Inc. USA) を用いて経時的に評価した。遺伝子導入された肝はまず異所

性移植を行って遺伝子発現を確認した。同様に CTLA4Ig 遺伝子を導入した Lewis 肝をグラフトとして同所性肝移植を行い、術後レシピエントラット末梢血中の CTLA4Ig 値を経時的に評価した。同所性肝移植は我々が開発したすべての血管を手縫い法で再建する方法を採用した。

**結果：** 全身投与ではラット体重の 6.25%以上の大量溶媒に 125 $\mu$ g の naked cDNA を溶解した場合に肝のみに良好な遺伝子発現を認めた。体重の 7.5%以上の遺伝子溶液を全身投与すると高率に心肺循環系の副作用を認め、致死率も上昇した。溶液の急速静注により中心静脈圧上昇、全身血圧低下をきたし容量負荷による心不全が考えられた。肝選択的投与方法では 125 $\mu$ g の cDNA を溶解したラット体重の 2.5%の遺伝子溶液の投与で肝に有効な遺伝子発現が得られた。CTLA4Ig 遺伝子をレシピエント肝に導入し、アロ心移植を行うと 50%のグラフトで対照群と比べ生着期間の延長を認めた。遺伝子導入同日の異所性肝移植群では高率にレシピエント死亡を認めたが、移植 2 日前に遺伝子導入した肝による同所性及び異所性肝移植を行うと、レシピエントは生存し移植後有効な遺伝子発現を認めた。グラフト肝導入遺伝子の発現は一過性だった。

**考察：** 本法は大量の溶媒に naked cDNA を溶解して急速静注することで一過性に肝組織圧を上昇させ遺伝子導入する。良好な導入効率が得られるが、大量の遺伝子溶液が循環系に容量負荷を与え副作用が生じる。カテーテルでの肝選択的投与により副作用を抑えつつ有効な遺伝子導入効率を得ることに成功し、本法によりレシピエント体内で有効な遺伝子発現が得られた。本法の問題点として、導入遺伝子の発現率は個体差が激しくそれは現在のところ遺伝子溶液濃度の調整だけでは改善できなかった。また遺伝子発現期間は一過性であった。遺伝子導入に伴う肝組織障害も移植術に影響を与えた。これらの問題点は今後の重要な検討事項と考えられる。

**結論：** カテーテルによる肝選択的非ウイルスベクター遺伝子導入法を開発し、この方法が移植医療に応用できることを示した。ドナー肝に遺伝子導入した後に移植し、レシピエント体内で遺伝子発現できることを初めて示した。本法の臨床応用には遺伝子発現効率、遺伝子発現期間、副作用の肝障害等のさらなる改善が必要である。

## 審査の結果の要旨

本論文は、ウイルスを用いずに、物理的な圧力により特定の臓器に対して遺伝子を導入する方法を考案し、その方法を用いて低免疫原性の臓器を作成、移植モデルでその効果を確認したという内容である。ラット in vivo モデルにおいて、目的とした臓器、特に肝臓に関して障害性が低く、かつ効率のよい遺伝子導入が得られる条件を検討し、免疫抑制蛋白である CTLA4Ig を発現する cDNA を導入しその発現と期間、ならびに免疫抑制効果について詳細に検討している。この非ウイルス性遺伝子導入法の遺伝子導入効率が高いこと、目的とした臓器に特異的に遺伝子導入ができる点は高く評価される。しかし安定した遺伝子導入効率が得られないこと、ならびに蛋白発現が一過性であることが今後解決されるべき問題点と考えられる。これらの内容は雑誌 *Transplantation* (2004 年) に掲載されており、移植の免疫抑制療法の分野のみでなくウイルス性肝炎をはじめとする種々の疾患の治療の発展に寄与する貴重な研究といえる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。