



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Selective blockade of apoptosis by in vivo electroporation-mediated gene transfer combined with portal infusion of plasmid DNA attenuates liver cirrhosis

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2016-06-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮原, 利行 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/47818

氏名（本籍）	宮原利行（大阪府）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	乙第 1470 号
学位授与日付	平成 25 年 9 月 11 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Selective blockade of apoptosis by in vivo electroporation-mediated gene transfer combined with portal infusion of plasmid DNA attenuates liver cirrhosis
審査委員	（主査）教授 武田 純 （副査）教授 原 明 教授 星 博 昭

論文内容の要旨

肝臓を対象とした遺伝子治療において、安全かつ効率的な遺伝子導入を実現することは重要である。これまでに我々はウイルスベクターに関連した副作用を回避するために、目的遺伝子を組み込んだプラスミドを門脈に注入し、electroporation法（EP法）を用いて遺伝子導入する方法を検討してきた。ラット肝硬変モデルにおいてHepatocyte growth factor（HGF）遺伝子をEP法により導入し、その結果、HGF遺伝子発現により肝細胞のアポトーシス抑制や細胞増殖効果を確認し、その結果として肝線維化の抑制と生存率の改善が認められた（Matsuno Y et al. Gene Ther. 2003 Sep; 10(18):1559-66.）。しかしながらHGFの細胞増殖効果が発癌を惹起することが危惧されており、その回避を目的として、本研究では細胞増殖効果を有しない選択的アポトーシス阻害因子としてsoluble Fas（sFas）遺伝子を導入し、肝硬変モデルにおいて肝線維化の抑制を検討した。

【対象と方法】

動物：Sprague-Dawley系雄性ラットを用いた。

EP法：麻酔後開腹し肝臓および門脈を露出し横隔膜下肝上部下大静脈を血管クリップで遮断後、生理食塩水にて総量1 mLとしたsFas・HGF・GFP遺伝子（500 µg）をそれぞれ門脈より24G針にて注入した。注入直後肝中葉を平板方電極（径10mm）で挟み、EP（Square Electroporater CUY 21:NEPA GENE Japan）を施行した。EPの条件は、電圧40 V、電流負荷時間50 ms、パルス回数6回とした。ラット肝硬変モデル：1% dimethylnitrosamine（DMN）1 mL/kgを週3回、連続6週間腹腔内投与を行った。

アポトーシスおよび肝線維化の検討：DMNを3週間投与した後に同様に各遺伝子導入（sFas群・HGF群・GFP群）を行い、その後さらに2週間DMNの投与を行った後に犠死させ、アポトーシスはTUNEL染色によりapoptotic cell indexとして評価し、肝線維化はAzan-Mallory染色および組織hydroxyproline含有量にて評価した。

生存率の評価：DMN投与開始3週間後に各遺伝子導入（sFas群・HGF群・GFP群）を行った後、さらに3週間DMN投与を行い、投与開始後10週まで観察した。

【結果】

apoptotic cell indexはsFas群：8±3.7、HGF群：5.9±2.5であり、GFP群：21.3±7.0に比べ

有意に低かった ($P < 0.01$)。sFas 群と HGF 群との間には有意差を認めなかった。また EP 部位と他の部位では apoptotic cell index に差を認めなかった。Azan-Mallory 染色では、GFP 群で顕著な肝の線維化を認め肝硬変の所見であったが、sFas 群と HGF 群では線維化が著明に抑制されていた。sFas 群と HGF 群の間の線維化の差異は認めなかった。組織 hydroxyproline 含有量は、sFas 群: $3.5 \pm 1.0 \mu\text{mol/g}$, HGF 群: $3.3 \pm 0.7 \mu\text{mol/g}$ であり、GFP 群: $5.8 \pm 2.0 \mu\text{mol/g}$ に比べ有意に低かった ($P < 0.05$)。sFas 群と HGF 群との間には有意差を認めなかった。10 週間の経過観察における生存率は HGF 群 100 %、sFas 群 56 %、GFP 群 0 % で、sFas 群は GFP 群に比べ有意に改善を認めた ($P < 0.05$)。

【考察】

動物の肝硬変モデルにおいて HGF タンパク投与や HGF 遺伝子導入による肝硬変の治療効果が証明されてきた。その機序は HGF の有する肝細胞のアポトーシス抑制効果と細胞増殖効果の双方によるものであった。しかし HGF の細胞増殖効果による発癌性が危惧され、肝硬変治療としての HGF の利用が臨床応用に至っていないのが現状である。

また、遺伝子導入法についてはウイルスベクターを用いたものが一般的であるが、臨床応用を考えた場合、致命的肝障害の発生や子孫への導入遺伝子の伝播など、いくつかの問題が報告されている。一方、非ウイルスベクター法は比較的安全ではあるが、導入効率や発現効率が低いことが難点である。我々は遺伝子が発現しやすい環境である筋肉や肝臓においてウイルスベクターを用いない EP 法による遺伝子導入法の効果を検討してきた。特にこの EP 法による HGF 遺伝子導入では、肝硬変モデルラットにおいて有意な生存率の改善を確認した。

今回、我々は肝硬変モデルラットに対し細胞増殖効果のないアポトーシス抑制因子として sFas 遺伝子を EP 法により導入し、肝硬変の線維化抑制効果を検討した。その結果、EP 法による sFas 遺伝子導入は有意なアポトーシス抑制効果により線維化を抑制し、対照群に比し生存率を有意に改善した。

EP 法による sFas 遺伝子導入はウイルスベクターや HGF の有する副作用を回避し、臨床応用の可能性が示唆された。

【結論】

EP 法による sFas 遺伝子導入はラット肝硬変モデルにおいて肝細胞のアポトーシスを選択的に抑制し、肝線維化を低減し、生存率を有意に改善した。

論文審査の結果の要旨

申請者 宮原利行は、ラット肝硬変モデルにおいて EP 法による sFas 遺伝子導入が肝細胞のアポトーシスを選択的に抑制し、肝線維化を制御できることを明らかにした。本研究は、肝硬変治療の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

T. Miyahara, Y. Umeda, S. Yoshikawa, Y. Matsuno, H. Iwata, H. Takemura : Selective blockade of apoptosis by in vivo electroporation-mediated gene transfer combined with portal infusion of plasmid DNA attenuates liver cirrhosis
Minerva Chir 67, 249-255 (2012)