

氏名	た だ まさ はる 多 田 正 晴
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論医博第 1918 号
学位授与の日付	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
学位論文題目	High volume hydrodynamic injection of plasmid DNA via the hepatic artery results in a high level of gene expression in rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine. (肝動脈からのハイドロダイナミクス法による plasmid DNA を用いたラット肝癌への遺伝子導入に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 千葉 勉 教授 藤田 潤 教授 清水 章

### 論 文 内 容 の 要 旨

肝細胞癌に対しては肝切除が治療の第一選択であるが、多発病変や肝外病変、背景肝の機能不良により切除不可能な症例は少なくない。これらの症例では、肝動脈塞栓化学療法が施行されることが多いが、再発は頻発し結果は満足できるものではないため、新たな治療戦略が望まれている。遺伝子治療は新たながん治療戦略として期待されているが、まだベクターの安全性や効果的な遺伝子の導入方法など、未解決な課題が多い。アデノウイルスベクターの使用は、異常免疫反応など副作用の面から使用が困難と考えられ、臨床使用例では死亡例も報告されている。近年、マウスやラットにおいて尾静脈から大量の生食とともに naked plasmid DNA を投与することで (hydrodynamic injection), in vivo での正常肝への遺伝子導入が可能であることが報告されたが、肝癌への遺伝子導入の報告はない。

そこで本研究では、ヒトの肝癌と類似した動脈血流優位を示すジエチルニトロサミン (DEN) で誘導されたラット肝癌に対して、肝動脈からの hydrodynamic injection により肝癌への遺伝子導入を試み、尾静脈からの投与と遺伝子導入効率を比較検討した。【方法】10週齢 SD ラットの胃十二指腸動脈 (GDA) から 5 ml または、10 ml の生理食塩水で 400  $\mu$ g の naked pCMV-LacZ を、肝臓に10秒以内に急速動注して投与。急速動注時に横隔膜直下で下大静脈および、門脈 (PV) の遮断併用も行い、肝実質への遺伝子導入効率を組織切片の LacZ 染色と NIH image を用いて比較検討した。次に8週 DEN 飲用による肝癌モデルラットを作成し、同様に plasmid を経動脈的に投与して、文献的に動脈血流優位といわれる径 8 mm 以上の腫瘍について、腫瘍部と非腫瘍部での導入効率を尾静脈からの hydrodynamic injection による投与と比較検討した。【結果】10週齢 SD ラットに 5 ml の生理食塩水で plasmid を肝動注しても肝臓への遺伝子導入は得られなかったが、下大静脈門脈遮断を併用することで導入が得られ、導入効率は 1.71% であった。さらに、下大静脈門脈遮断下 10 ml で投与したところ、導入効率は 2.65% と上昇した。次に 8 週 DEN 飲用肝癌ラットに同様に投与したところ、下大静脈門脈遮断下 10 ml で肝動注した場合、腫瘍部での導入効率は 6.25% と、5 ml 投与時や下大静脈門脈遮断下 (いずれも導入効率 1% 以下) と比べ、腫瘍組織での導入効率の上昇を認めた。また、尾静脈からの hydrodynamic injection による投与 (導入効率 0.14%) と比べても、腫瘍部では経動脈的投与のほうが導入効率は高かった。しかし、今回の投与方法では腫瘍組織と非腫瘍組織での導入効率に差はなく、腫瘍特異的な遺伝子導入は困難であった。

Plasmid DNA による肝癌への遺伝子導入が、肝動脈からの hydrodynamic injection で可能なことを示した。肝動脈からの hydrodynamic injection は、肝癌ラットにおいても施行可能であった。腫瘍選択的な導入は困難であったが、さらに選択的なカテーテル挿入や腫瘍特異的に高発現している遺伝子を標的にすることなどにより、同方法の臨床応用が期待される。大動物実験でも同方法が施行可能であれば、経動脈的 hydrodynamic injection はヒト肝癌の遺伝子治療のための新たな手法となり得ることが期待されると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

肝細胞癌に対する新たな治療法の1つとして、遺伝子治療の実現に期待が寄せられている。しかし、肝癌への遺伝子導入は困難で、なかでも副作用が懸念されるウイルスベクターを使用しない効率のよい導入の実現は、遺伝子治療実現への大きな課題である。

本申請者はラット尾静脈から、大量の生食とともに Naked plasmid DNA を投与して肝に遺伝子導入を図る hydrodynamic injection 法に着目し、diethylnitrosamine (DEN) で誘導されるラット肝癌に対し尾静脈からではなく、優位支配血管である肝動脈からの hydrodynamic injection による肝癌への遺伝子導入を試みた。

まず、正常ラット肝に肝動脈から Naked plasmid DNA を hydrodynamic injection で投与し、下大静脈と門脈の一時的遮断を併用した場合に肝臓への遺伝子導入が可能であることを示した。投与後、一時血中 GPT の上昇を認めるものの、組織学的には明らかな肝損傷はなく、肝への影響は一過性であることを示した。

DEN で導入した担癌ラットの動脈から、色素を hydrodynamic injection で投与し血行動態を確認した上で、Naked plasmid DNA を投与したところ、下大静脈と門脈の一時的遮断を併用した場合に、肝腫瘍での遺伝子導入が可能であった。

以上の研究は、肝癌へのウイルスを使わない新たな遺伝子導入の方法を提示し、肝細胞癌の遺伝子治療の発展に寄与するものと思われる。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年1月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。