

氏名	秋元正行
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2165号
学位授与の日付	平成11年11月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Adenovirally Expressed Basic Fibroblast Growth Factor Rescues Photoreceptor Cells in RCS Rats (塩基性線維芽細胞増殖因子遺伝子導入による網膜変性の抑止効果に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 大森治紀 教授 西川伸一 教授 本田孔士

論文内容の要旨

塩基性線維芽細胞増殖因子(以下 bFGF)には、網膜神経細胞死を抑制する効果があることが知られている。その効果は、遺伝性網膜変性、網膜光障害、網膜虚血再灌流障害モデル動物において、リコンビナント蛋白投与によって検証された。また、機能しない bFGF レセプターを視細胞に強制発現させた遺伝子導入マウスにおいては網膜変性が進行するなど、bFGF は網膜神経細胞の生存に重要であることが知られている。

bFGF を眼内組織において持続的に供給することができれば、網膜神経細胞のより一層の保護効果が期待できる。そこで、生体内への遺伝子導入効率の高い非増殖型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入手段を用い、bFGF の遺伝子を眼内組織に導入し、発現された bFGF による網膜神経細胞に対する保護効果を検討した。

はじめに、培養網膜色素上皮細胞に bFGF 発現アデノウイルスを感染させ、細胞内、および、培養上清中に分泌された bFGF を定性的・定量的に観察した。コントロールウイルス感染および、非感染細胞においては、細胞内外とも僅かな bFGF のみを認めた。bFGF 発現アデノウイルスの感染においては、細胞全体の染色性および、核への集積を認めた。また細胞外へ分泌された bFGF は、コントロールと比べ5~10倍程度の高濃度であった。

次に、視細胞層に遺伝的に変性をきたす網膜変性モデル動物のひとつ Royal College of Surgeons ラットを用いて、生後21日令時、その眼内網膜下に33Gハミルトンシリッジを用いてウイルス液を注入し、遺伝子の発現、それによる網膜変性に対する抑制効果を組織学的に検討した。遺伝子産物の発現をアデノウイルス注入2日後に組織学的に検討した。注入2日後、bFGF 発現アデノウイルスの注入によって、網膜色素上皮細胞に一致して bFGF が強発現していることが観察された。コントロールウイルス注入やリコンビナント bFGF 蛋白液注入眼においては、浸潤細胞や網膜色素上皮細胞などによると考えられる内因性 bFGF 産生亢進が観察された。また、視細胞核の集合からなる外顆粒層の高さは各群間で差は認められなかった。注入後、28日目、56日目における外顆粒層の高さは変性発生時と比べればいずれの群においても低下傾向にあった。しかし、各群における変性を免れた外顆粒層の高さには差を認め、bFGF 発現アデノウイルス注入眼において最も高く、次いでリコンビナント bFGF 蛋白注入眼、コントロールウイルス注入眼、非処置眼であった。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって、ある程度網膜変性を抑制することが可能であった。bFGF 遺伝子導入による神経細胞変性の抑制効果を確認したことは、この報告がはじめてである。従来、有効な治療法が無かった網膜変性に対する新しい治療の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

著者らは、非増殖型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いてヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（以下 bFGF）を網膜細胞へ導入し、網膜の変性を遅延させることに成功した。まず bFGF を発現するアデノウイルスベクターを作成し、培養網膜色素上皮細胞において、極めて効果的に遺伝子導入が行われることを確認した。また、培養上清、および細胞破砕液を用い、bFGF 産生量を同定した。その結果、遺伝子導入により、培養細胞内外において、コントロールと比べ数倍～数十倍の蛋白産生・分泌を確認した。

さらに、生体内における遺伝子導入効果、および網膜変性の進行状況を、21 日齢網膜変性ラット眼内網膜下へ直接ウイルス液を注入して、処置後の眼球を経時的に組織学的に検討した。処置後 2 日目において、網膜色素上皮細胞への遺伝子導入が効果的に行われていることを確認した。また、28 日目、56 日目において、未処置眼、コントロールウイルス注入眼の網膜変性は著明に進行したが、bFGF 蛋白注入眼、bFGF 産生アデノウイルス注入眼の網膜変性は進行したものの、コントロール群と比べ、有意に変性が抑制させていた。

以上の研究は、bFGF 遺伝子導入により神経に対する保護作用を検証した初めての報告であり、新しい網膜変性に対する治療方法を提案し、その可能性を示したものである。

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 11 年 10 月 25 日実施の論文内容に関連した試問を受け、合格と認められたものである。