

氏 名	上 ^{うえ} 原 ^{はら} 徹 ^{てつ} 也 ^や
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2213 号
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 23 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	Gene transfer to the rat biliary tract with the HVJ-cationic liposome method (HVJ カチオニックリポソーム法を用いたラット胆管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 今 村 正 之 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

進行胆道癌治療は近年の先端技術の発達に伴い年々進歩しているものの予後を飛躍的に改善したとは言いがたい。一方、胆管癌や線維性嚢胞症、原発性硬化性胆管炎などの胆道疾患において胆管上皮細胞に様々な遺伝子異常が見られるようになり、胆管疾患への遺伝子治療法の開発が期待されているものの、なお確立したベクターは発表されていない。

近年 HVJ リポソーム法を用いた心臓、脳、腎臓、肝臓などへ遺伝子導入が報告され、リポソームを陽電荷とした HVJ-cationic リポソーム法により目的遺伝子の封入効率が高められてきた。本研究では、陽電荷リポソームは負電荷を持つ組織との親和性が高く、組織深部への浸透性が低いという点に着目し、HVJ-cationic リポソーム法を用いた胆管内投与による胆管上皮細胞への選択的な遺伝子導入の可能性について検討した。

HVJ-cationic リポソーム (HVJ-DC) はフォスファチジルコリン、コレステロール、DC コレステロール (重量比 = 8 : 4 : 1) よりなる乾燥混合脂質に目的遺伝子を封入し、紫外線で不活化した HVJ とリポソームとの融合により作成した。

まず、蛍光標識オリゴヌクレオチド (F-ODN) を用いてヒト胆管癌細胞株 (HuCC-T 1) への導入効率を検討した。F-ODN 単独投与では細胞への蛍光の集積は認めず、HVJ-DC 使用時に投与後 30 分で 90% 以上の核への蛍光の集積を認めた。

次にラット胆管への投与は臨床における内視鏡的逆行性胆管到達法に準じて、経十二指腸乳頭に行った。即ち、十二指腸壁より乳頭を経由して胆管内に逆行性に留置したチューブより行った。F-ODN 単独投与では蛍光の集積は認めず、HVJ-DC 使用時に投与後 60 分で肝外胆管上皮細胞および一部の膵管細胞に蛍光の集積を認めた。肝内細胆管レベルでは、周囲の脈管と区別するためにケラチン染色を行い胆管上皮細胞を同定した。蛍光は胆管上皮細胞の核に集積しており (90% 以上)、肝細胞、門脈、肝静脈への導入は認めなかった。LacZ 遺伝子投与によりタンパク発現を確認した結果、LacZ 単独投与では発現を認めず、HVJ-DC 使用時に胆管上皮細胞のみに LacZ の発現を認め、発現は 14 日間継続した。投与後 3 日目での血清総ビリルビン (0.17 ± 0.06 mg/dl), ALT (61 ± 1 U/l), γ GTP (< 2 U/l) 値は正常範囲内であり、HE 染色では明らかな細胞障害を認めなかった。

以上の結果から HVJ-cationic リポソーム法を用いた経乳頭の投与により (1) 胆管上皮細胞への選択的な遺伝子導入が可能となり、(2) 短時間で安全に遺伝子導入が可能である事が判明した。本方法は胆道疾患に対する研究、治療の両面で有用であると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

胆管疾患の多くは胆管上皮細胞の遺伝子異常の主因とし、胆管疾患への遺伝子治療法の開発が期待されているものの確立したベクターはない。本研究では、陽電荷リポソームが組織深部への浸透性の低い点に着目し、HVJ カチオニックリポソーム法 (HVJ-DC) を用いた胆管内投与による胆管上皮細胞への選択的な遺伝子導入の可能性を検討した。培養細胞 HuCC-T

1 への蛍光オリゴヌクレオチド (F-ODN) 投与において、単独投与では導入は認めず、HVJ-DC 使用時に投与後 30 分で 90% 以上の核への蛍光の集積を認めた。ラット胆管への投与は内視鏡的逆行性胆管到達法に準じ、経十二指腸乳頭的に行った。F-ODN 単独投与では導入は認めず、HVJ-DC 使用時に投与後 60 分で肝外胆管上皮細胞への集積を認めた。蛍光は胆管上皮細胞の核に集積し、肝細胞、門脈、肝静脈への導入は認めなかった。LacZ 遺伝子単独投与では発現を認めず、HVJ-DC 使用時に胆管上皮細胞のみに LacZ の発現を認め、発現は 14 日間継続した。投与後 3 日目の血液検査は正常範囲内であり、明らかな細胞障害を認めなかった。以上より HVJ-カチオニックリボソーム法を用いた経乳頭的投与により胆管上皮細胞への選択的かつ短時間で安全な遺伝子導入が可能である事が判明した。

以上の研究は胆道疾患に対する遺伝子治療の可能性を示唆するもので、胆道系疾患の将来的展望を開くものである。

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 12 年 2 月 9 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。