

氏 名	岡 野 高 之
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3184 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 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	Cell-Gene Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor to the Mouse Inner Ear (細胞移植を用いたマウス内耳への脳由来神経栄養因子の遺伝子導入)
論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司 教 授 芹 川 忠 夫 教 授 野 田 亮

論 文 内 容 の 要 旨

感音難聴は、現代社会で最も頻度の高い身体障害のひとつであるが、内耳障害がその主因である。感音難聴に対する治療法の選択は、きわめて限られているのが現状で、新規治療法の開発が切望されている。その中でも遺伝子治療は、内耳障害に対する新規治療法として有望視されており、活発に研究されている。しかし、現在報告されている内耳への遺伝子治療の大半はウィルスベクターを用いているため、ウィルスの持つ生体への毒性が問題となる。難聴に対する遺伝子治療の臨床応用には、安全で効果的な内耳への遺伝子導入方法を開発することが必要と考え、本研究では、非ウィルスの遺伝子ベクターを用い細胞移植を応用した内耳遺伝子治療法を考案し、その有効性を検討することとした。

導入する遺伝子として、脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子を選択した。BDNF は、発生期の聴覚一次神経節細胞の生存に必須であることや、音響やアミノ配糖体で傷害された聴覚一次神経節細胞の保護効果を有することが知られており、難聴治療への応用が期待されている分泌ペプチドである。しかし BDNF は血液中での半減期が短いため、BDNF の全身投与では内耳における有効濃度を長期間保つことができないという欠点があり、これまで内耳へ効果的に BDNF を導入する試みが数多くなされてきた。そこで本研究では、BDNF 遺伝子を体外で非ウィルスベクターを用いて線維芽細胞に導入した後、得られた遺伝子改変細胞を内耳に移植することにより、導入した遺伝子産物が内耳で誘導できるかを検討した。

マウス BDNF 遺伝子を有するプラスミドのマウス線維芽細胞系列 NIH3T3 細胞への導入には、リポフェクション法を用いた。BDNF 遺伝子と同時に抗生剤 G418 に対する耐性遺伝子をプラスミドに組み込み、同抗生剤の存在下で培養することにより、遺伝子改変細胞の選択を行った。こうして得られた遺伝子改変細胞の BDNF タンパクの分泌能を、まず *in vitro* にて培養液中の BDNF 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定することで確認した。ついで、細胞移植による遺伝子改変細胞の内耳での生着を調べるために、若年成体の C57BL/6 マウスの後半規管より内耳の外リンパ腔内へ遺伝子改変細胞を移植した。細胞移植 1 週間後および 4 週間後の移植細胞の局在を免疫組織化学にて評価したところ、内耳の蝸牛器官および前庭器官のいずれにも移植した細胞が確認された。また、ウェスタンブロットにより導入した遺伝子産物の内耳での発現を確認した。次に、遺伝子改変細胞の移植後の内耳における BDNF の *in vivo* 産生量を評価する目的で、細胞移植 1 週間後の内耳から総タンパクを抽出し ELISA により BDNF タンパクを定量したところ、遺伝子改変細胞の移植により内耳の BDNF タンパクの総量は有意に増加していた。

これらの所見は、非ウィルスの遺伝子ベクターと細胞移植を用いた遺伝子導入法が、目的遺伝子の内耳への局所的かつ持続的な導入において有効であることを示唆する。したがって、遺伝子改変細胞の内耳への移植は、難聴に対する治療効果を有する遺伝子を内耳に導入する方法として新たな可能性を持つと考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

感音難聴は、現代社会で最も頻度の高い身体障害のひとつだが、内耳障害がその主因であり、現状ではその治療法の選択

は極めて限られている。難聴に対する安全で効果的な内耳への遺伝子治療法の開発が必要と考え、申請者は非ウイルスの遺伝子ベクターを用い細胞移植を応用した内耳遺伝子導入法を考案し、有効性を検討した。まず脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子を体外で非ウイルスベクターを用いて線維芽細胞に導入した後、*in vitro* にて培養液中の BDNF 濃度を測定し遺伝子改変細胞の BDNF 産生能を確認した。ついでマウスの後半規管より内耳へ遺伝子改変細胞を注入し、細胞移植 1 および 4 週間後の移植細胞の局在を免疫組織化学にて評価したところ、内耳の蝸牛器官および前庭器官のいずれにも移植細胞が確認された。またウェスタンブロットにより細胞移植 4 週間後において遺伝子産物の内耳での発現を確認した。さらに移植 1 週間後では、細胞移植により内耳の BDNF タンパクの総量は有意に増加していた。これらの所見は、非ウイルスの遺伝子ベクターと細胞移植を用いた遺伝子導入法が、目的遺伝子の内耳への導入において有効であることを示唆する。したがって、遺伝子改変細胞の内耳への移植は、難聴に対する遺伝子治療法として新たな可能性を持つと考えられた。

以上の研究は、内耳における遺伝子治療法開発の解明に貢献し、感音難聴の治療法の開発に寄与するところが多い。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みとめる。

なお本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 16 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。