

(別紙様式第3号)

論文要旨

論文題目

In situ Perfusion of the Liver Enhances the Efficiency of
Retrovirus-Mediated Gene Transfer to Hepatocytes

(生体内分離肝灌流手技とレトロウイルスベクターを
使用した再生肝への遺伝子導入)

氏名 友利 寛文 印
(直筆)

【目的】レトロウイルスベクター(RVV)は、安定してゲノムへ導入が可能なことから広く遺伝子組み替えに使用されてきた。しかし、RVVの遺伝子導入効率の低さは、臨床遺伝子治療において大きな障害となりうる。さらに生体内における遺伝子治療においては、補体によるウイルスベクターの急速な不活化や循環血液による希釈等の影響も考えなければならない。当教室では門脈-体循環バイパスを使用した生体内分離肝灌流を用いて、肝臓へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を報告してきた。本法は無血冷阻血下の肝臓にベクターを注入し長時間接触させることが可能であり、希釈や補体による影響を受けない。また本法により従来報告のなかった大動物（ブタ）肝臓への遺伝子導入も可能となった。本研究では、この生体内分離肝灌流法をRVVの導入効率を改善させる目的で使用した。

【方法】大腸菌 β ガラクトシダーゼをコード

するLacZ遺伝子を含むecotropic RVVを作製し、培養液中に放出されるウイルスを回収して実験に用いた。そのウイルスベクターの力価は 1×10^5 cfu/mlであった。実験には雄性Wistarラット（10-16週齢）を使用し、まず門脈-体循環シャントを作製するため、脾臓を左季肋部皮下に移動固着した。次いで4週間後、70%肝切除を行い、肝切除24時間後に再開腹した。グループ1（n=5）は、生体内分離肝灌流により、RVVベクターと肝臓を30分間接触させた。グループ2（n=5）はRVVベクターを門脈内に1回投与した。遺伝子導入後1、3、7、28日目に肝組織を採取し病理組織学的検討、X-gal染色、ONPG assay、RT-PCRを施行し、血清AST、ALT値を測定した。

【結果】血清AST、ALT値および組織像において両グループ間に差はなく、X-gal染色、ONPG assayにおいては遺伝子導入3日目以後はどの時点においてもグループ1で大腸菌

由来βガラクトシダーゼの発現が高かった。
βガラクトシダーゼの発現は遺伝子導入後3日目に最も高く、X-gal染色ではグループ2の肝細胞の青染は見られなかったが、グループ1では10-15%の肝細胞が青染した。両グループとも肺、腎臓、精巣には大腸菌由来βガラクトシダーゼの発現はみられなかった。

【結論】生体内分離肝灌流法はRVVの従来報告されてきた遺伝子導入効率を改善した。このことは臨床の場においてもRVVを用いた肝臓への遺伝子導入への応用の可能性を示唆すると考える。

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏名	友利寛文
		平成 12 年 6 月 / 日		
論文審査委員		主査教授	田中龍夫	
		副査教授	古謝景春	
		副査教授	田中勇恒	
(論文題目)				
In situ Perfusion of the Liver Enhances the Efficiency of Retrovirus-Mediated Gene Transfer to Hepatocytes				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して研究に至る背景と目的、論文の内容、研究成果の意義と学術的水準などについて慎重に審査し、以下の結論を得た。				
1. 研究の背景と目的				
レトロウイルスベクターは細胞へ安定に遺伝子を導入し、長期間発現させる事を可能にするが、その導入効率の低いことが問題であった。本研究は肝細胞へのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率の改善を目的としている。				
2. 論文の内容				
動物細胞には相当する酵素活性の無い大腸菌β-ガラクトシダーゼの遺伝子を、レトロウイルスベクターに組み込みマーカーとした。予め脾臓を皮下に移動することによって門脈-体循環シャントを形成し、肝臓の血流遮断を可能にした生体内分離肝灌流法によって肝細胞に高濃度のウイルスを30分間接触させた。同量のウイルスを血流を遮断せずに門脈より注入したコントロールと比較して、肝細胞に特別の損傷を与えることなく、著しい導入効率の改善を見ることができた。				
3. 研究成果の意義と学術的水準				
臨床応用にはまだ問題点が多いが、導入効率の改善を見た意義は大きく、遺伝子治療に向けて種々の遺伝子導入法の開発が進められる中であって、本論文の学術的水準は高い。				
以上により本論文は学位授与に十分値するものと判定した。				

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
 3 *印は記入しないこと。