

吉岡 敬 論文内容の要旨

主 論 文

Cationic liposomes-mediated plasmid DNA delivery in murine hepatitis induced by carbon tetrachloride

四塩化炭素誘発性肝炎マウスにおける
プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体の遺伝子発現

吉岡 敬 吉田 昇平 黒崎 友亮 手嶋 無限 西田 孝洋
中村 純三 中嶋 幹郎 藤 秀人 北原 隆志 佐々木 均

Journal of Liposome Research • 19 巻 2 号 141-147 2009 年

長崎大学大学院医学研究科生理系専攻
(指導教授：佐々木 均教授)

緒 言

遺伝子治療は近い将来、様々な病気に対して有効な治療法になると期待されている。しかし、遺伝子自身は酵素による分解が速く、細胞内への取り込み効率も低い。そこで遺伝子を安定に細胞へ取り込ませ、発現することのできる様々な遺伝子ベクターが開発されている。標的組織の細胞に効率よく遺伝子を導入するには、ベクターの選択、組織の状態、遺伝子導入のタイミングなどを考慮し、最適な条件下で投与する必要がある。しかしながら、ベクターなどの製剤学的な研究は盛んにされているものの、遺伝子導入に対する生体側の影響を系統的に研究した報告は少ない。そこで、今回我々は、肝炎モデルマウスを作成し、プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体を用い、遺伝子導入効率に対する病態の影響を検討した。

対象と方法

実験には 5-6 週齢の ddY 系 雄性マウスを用いた。マウスを 20 時間絶食後、四塩化炭素を皮下投与し、肝炎モデルマウスを作成した。四塩化炭素投与後、ALT および AST 値がピークに達する 18 時間後を障害期、肝肥大が残る 48 時間後を回復前期、酵素値および肝臓の状態がコントロールと差がなくなる 168 時間後を回復後期とした。また、ホタルルシフェラーゼをコードした pCMV-Luc を用い、このプラスミド DNA (pDNA) に N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl ammonium chloride (DOTMA)-dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) リポソームまたは DOTMA-cholesterol (CHOL) リポソームを静電的に結合させ、リポプレックスと呼ばれる複合体を作成した。肝炎モデルマウスの障害期 (18 時間)、回復前期 (48 時間)、

回復後期（168 時間）に、リポプレックスを静脈内投与し、6 時間後にを肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺を摘出した。摘出臓器をホモジネート後、遠心し、上清中のルシフェラーゼ活性をルミノメーター（BERTHOLD TECH. 社）により測定した。

結 果

溶媒のみをマウスに皮下投与したコントロールに、リポプレックスを静脈内投与した結果、pDNA/DOTMA-DOPE では肝臓と脾臓に、pDNA/DOTMA-CHOL では肝臓と脾臓と肺において高いルシフェラーゼの酵素活性が認められた。これに対し、四塩化炭素誘発性肝炎マウスに、リポプレックスを静脈内投与した結果、遺伝子発現がコントロールに比べ有意に変動した。すなわち、四塩化炭素投与 18 時間後の障害期では、pDNA/DOTMA-DOPE は肝臓と脾臓において、コントロールに比べ有意な遺伝子発現の減少が認められた。pDNA/DOTMA-CHOL では、コントロールと大きな差異は認められなかった。一方、48 時間後の回復前期では、pDNA/DOTMA-CHOL において、肝臓でコントロールの約 10 倍高い遺伝子発現が観察された。また、168 時間後の回復後期では、両製剤ともコントロールと同程度の遺伝子発現を示した。

考 察

カチオン性リポソームをベクターに用いたリポプレックスは、有用な遺伝子製剤として期待されている。実際、リポプレックスを静脈内投与後、肝臓や脾臓において高い遺伝子発現が示された。一方、今回の研究で、肝炎の病態においてリポプレックスの遺伝子発現が顕著に変動することが明らかとなった。またこの変動は、遺伝子製剤の脂質成分により大きく異なることも示された。pDNA/DOTMA-DOPE では、肝炎の障害期で遺伝子発現が減少したが、pDNA/DOTMA-CHOL の遺伝子発現は病態の影響を受けにくかった。また、回復前期で pDNA/DOTMA-CHOL の遺伝子発現が顕著に増加し、その有用性が示唆された。これらの結果は、遺伝子治療の実用化に向けて、重要な知見になるものと考えられる。