

11/27/19
(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Exogenous expression of hepatocyte growth factor (HGF)
in rat striatum by naked plasmid DNA

[ラット線条体へのプラスミド DNA 直接導入による肝細胞増殖因子 (HGF) の発現]

氏名 関口 恵史 (関口)




論文要旨(1)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|--|
| 【 | 緒 | 言 | 】 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 肝 | 細 | 胞 | 増 | 殖 | 因 | 子 | (| H | G | F) | | は | 様 | 々 | な | 生 | 物 | 活 | 性 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | を | 示 | す | こ | と | が | 知 | ら | れ | て | お | り | 、 | 近 | 年 | 、 | 遺 | 伝 | 子 | 治 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 療 | に | お | け | る | 有 | 効 | な | 治 | 療 | 遺 | 伝 | 子 | と | し | て | 注 | 目 | さ | れ | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | て | い | る | 。 | こ | れ | ま | で | の | 臨 | 床 | 研 | 究 | で | 、 | H | G | F | の | 各 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 種 | 臓 | 器 | に | お | け | る | 発 | 現 | お | よ | び | 難 | 治 | 性 | 疾 | 患 | に | 対 | す | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | る | 治 | 療 | 効 | 果 | が | 数 | 多 | く | 報 | 告 | さ | れ | て | い | る | 。 | ま | た | 、 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 安 | 全 | 性 | の | 面 | か | ら | 、 | プ | ラ | ス | ミ | ド | の | 直 | 接 | 投 | 与 | に | よ | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | る | 遺 | 伝 | 子 | 治 | 療 | が | 見 | 直 | さ | れ | て | い | る | が | 、 | 中 | 枢 | 神 | 経 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 系 | へ | の | H | G | F | の | 直 | 接 | 導 | 入 | を | 免 | 疫 | 組 | 織 | 化 | 学 | 的 | に | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 検 | 証 | し | た | 報 | 告 | は | な | い | 。 | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 【 | 目 | 的 | 】 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 中 | 枢 | 神 | 経 | 系 | に | お | け | る | プ | ラ | ス | ミ | ド | 直 | 接 | 導 | 入 | に | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | よ | る | H | G | F | の | 発 | 現 | お | よ | び | 発 | 現 | 様 | 式 | を | 確 | 認 | す | る | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | た | め | に | 、 | ラ | ッ | ト | を | 用 | い | て | 遺 | 伝 | 子 | 導 | 入 | 実 | 験 | を | 行 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | い | 、 | 免 | 疫 | 組 | 織 | 化 | 学 | 的 | 手 | 法 | に | よ | り | 検 | 証 | し | た | 。 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 【 | 材 | 料 | と | 方 | 法 | 】 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ラ | ッ | ト | (| W | i | s | t | a | r | 、 | オ | ネ | お | よ | び | メ | ス | 、 | 100 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 200 | g) | を | 用 | い | た | 。 | プ | ラ | ス | ミ | ド | に | は | 、 | ル | シ | フ | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | エ | ラ | ー | ゼ | 遺 | 伝 | 子 | を | コ | ー | ド | し | た | プ | ラ | ス | ミ | ド | | | |

論文要旨(2)

| |
|--|
| (pcDNA3)、ヒトHGFおよびB-Gal遺伝子 |
| をコードしたプラスミド(pVAX1)を用いた。 |
| プラスミドは定位脳手術によりラット線条体 |
| へ直接投与した。ルシフェラーゼを投与した |
| ラット群は、投与後、5日目に線条体を摘出 |
| し、ルシフェラーゼ活性測定を行った。また、 |
| HGF投与群は5日目にELISAによるHGF蛋 |
| 白量の測定を行い、7日目に投与部位免疫蛍 |
| 光染色を行った。抗体は抗ヒトHGF抗体と |
| HGFの特異的レセプターである抗c-met抗 |
| 体を用いた。また、セルマーカーとして抗 |
| GfAP (Glial fibrillary acidic protein) 抗 |
| 体、抗S-100 (β-subunit) 抗体、抗NSE |
| (neuron specific enolase) 抗体を用いた。 |
| 蛍光免疫染色ではこれらの抗体と各セルマー |
| カーによる二重染色を行った。 |
| 【結果】 |
| ルシフェラーゼ遺伝子を導入したラット線 |
| 条体からは組織1g当たり $55.7 \pm 43.1 \times$ |
| 10^3 RLUのルシフェラーゼ活性が測定され、 |

論文審査結果の要旨

| | | | |
|--------|---------------------|--------|---|
| 報告番号 | 課程博 * 第 号 論文博 | 氏名 | 関口 恵史 |
| 論文審査委員 | 平成 14 年 12 月 26 日 | | |
| | 主査教授 | 吉井 興志彦 |  |
| | 副査教授 | 小川 由英 |  |
| | 副査教授 | 金谷 文則 |  |

(論文題目)

Exogenous expression of hepatocyte growth factor (HGF) in rat striatum by naked plasmid DNA
[ラット線条体へのプラスミド DNA 直接導入による肝細胞増殖因子 (HGF) の発現]

(論文審査結果の要旨)

上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容と学術的水準、研究成果ならびにその意義について慎重に審査し、次ぎのような結論を得た。

1. 研究の背景と目的

肝細胞増殖因子(HGF)は近年発見されたサイトカインであり、その多様な生物活性から遺伝子治療において各種疾患への応用が試みられ、その中で神経変性疾患への応用も期待されている。HGF遺伝子の中樞神経系への導入に関しては、いまだ報告例が非常に少ない状況であり、特に中樞神経系へのHGF遺伝子プラスミドの直接導入についてはいまだ報告例がない。非ウイルスベクターの中で、プラスミドの直接導入は病原性蛋白が存在しないことを始めとして、低コスト、簡便性などの面で利点があり、中樞神経系のような脳血液関門による閉鎖的環境においては有効な導入法であると言える。本研究では中樞神経系における遺伝子治療の基礎研究として、プラスミド直接導入法を用いたラット線条体へのHGF遺伝子の直接導入およびその発現様態の解明を試みた。

2. 研究内容

ヒトHGF遺伝子およびコントロールとしてβ-galactosidase遺伝子をラット線条体へプラスミド直接導入し、蛍光染色により外因性HGFの発現を確認し、同時に導入したHGF遺伝子の発現様

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
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。

態を観察した。今回のプラスミドの直接導入では発現範囲が極めて局所的（100～300 μ m）であった。GFAP（glial fibrillary acidic protein）、S100（ β -subunit）、NSE（neuron specific enolase）の各セルマーカーを用いた蛍光二重染色では、導入したHGF遺伝子は主に反応性グリア細胞でHGFを発現しており、ニューロンでのHGFの発現は確認することができなかった。特に、投与部位の組織傷害部位においては、反応性グリアおよび導入HGFの共発現が顕著に認められた。さらに、c-Metの染色では、HGF遺伝子を導入したラットにおいてコントロールと比較して多くのc-Metが発現していた。以上の結果から、プラスミドの投与による神経組織が傷害された後、同部位に増殖した反応性グリア細胞によって導入HGF遺伝子が発現したと考えられ、また、c-Metの染色結果により外因性ヒトHGFが内因性のラットc-Metの発現を誘導したこと、すなわち異種間レベルでの発現誘導が示唆された。

3. 研究成果の意義および学術的水準

本研究は、プラスミドの直接導入による外因性HGF遺伝子の発現および発現様態を中枢神経系において初めて免疫組織化学的に証明したものである。また、本研究は近年注目されている治療遺伝子であるHGF遺伝子に関する新しい知見を提供するものであり、学術的に高水準であると判断される。治療遺伝子としてのHGF遺伝子の有効性または中枢神経系への応用という観点から、本研究は将来においてHGFあるいは類似したサイトカインの治療遺伝子を中枢神経系疾患の臨床応用に用いるための基礎研究として重要な役割を果たすものと言える。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 - 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。