

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500419

研究課題名（和文）超音波を用いた難治性疾患への新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Gene Therapy with Ultrasound

研究代表者

谷山 義明（TANIYAMA YOSHIAKI）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60372611

研究成果の概要：

我々は、既に超音波とマイクロバブルとの併用による遺伝子導入効率の向上に関して報告してきているが、遺伝子と同様にオリゴの導入にも効果があることがあきらかになりつつある。超音波とバブルを用いた核酸の導入する方法を開発し、難治性疾患の新規治療法を検討することである。今回、我々は難治性疾患と知られるアルツハイマー病をターゲットとして、肝細胞増殖因子（HGF）を超音波とマイクロバブルを併用することによって安全に脳に導入し、症状をおさえることに成功した。今後の臨床応用が期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生物・生体工学、生物物理、核酸

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は 1990 年頃より世界中でその可能性が検討されたが、米国での死亡例や仏国での癌化症例が報告されるなど、導入効率が非常に良いとされていたウイルスベクターのコントロールの難しさが再認識された。一方、我々は臨床への応用を考えて安全性を第一に naked plasmid DNA を骨格筋や心臓に

導入して治療効果を報告してきたが、その導入効率を改善する必要性を検討していた。そこで、安全でありながら導入効率のよい遺伝子導入法を開発するため、超音波とマイクロバブルを併用した物理的的刺激による遺伝子導入法の研究を続けている。

我々は、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に超音波とマイクロバブルを併用した刺激をあたえることにより一時的に細胞表面に数 μ mの小孔が発生し、その核酸などを混ぜると細胞内に安全に導入されることを世界で初めて報告した。また興味深いことにこの小孔は24時間後には消失していることを確認した(Taniyama et al. 2002 Circ.)。この手法を用いて血管平滑筋細胞へのP53遺伝子導入による再狭窄モデルへの治療(Taniyama et al. 2002 Circ.) (特許取得済み)、骨格筋細胞へのHGF(肝細胞増殖因子)閉塞性動脈硬化症への血管新生治療(Taniyama et al. 2002 Gene Ther.) (特許取得済み)などを報告してきた。

さらには、遺伝子だけではなくオトリによって転写因子を抑制するデコイを同様に手法にて血管に導入することにも成功している(Hashiya et al BBRC 2004, Inagaki et al 2005 J Vasc Res.)。また悪性黒色腫細胞に同手法にてチミジンキナーゼという自殺遺伝子を導入し腫瘍径の縮小と生存率の改善効果があることや、樹状細胞へ癌抗原遺伝子を同手法を用いて導入することによって癌免疫を活性化しTリンパ球などの働きを強くすることを報告している。さらには、脊髄(Shimamura et al J.Gene Med.2005)や脳(Shimamura et al. Gene Ther.2004)などの神経系への遺伝子導入も可能であることを報告してきた。

2. 研究の目的

我々は、既に超音波とマイクロバブルとの併用による遺伝子導入効率の向上に関して報告してきているが、遺伝子と同様にオリゴの導入にも効果があることがあきらかになりつつある。超音波とバブルを用いた核酸の導入する方法を開発し、難治性疾患の新規治療法を検討すること。

3. 研究の方法

現在、難病として世界中で研究されているアルツハイマー病の原因は脳内のA β という蛋白の蓄積であることが考えられている。我々は超音波とマイクロバブルを併用した遺伝子導入方法を用いてこの病気を治療する手法を開発している。

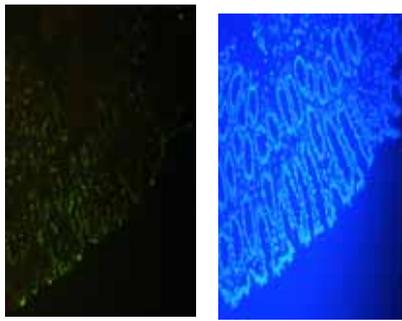
具体的にラットの脳内にA β 蛋白を挿入し、その後どのような程度で神経障害が発生するか検討した上で、神経保護効果および血管新生作用のある肝細胞増殖因子(HGF)を頸髄よりHGFプラスミドに超音波とマイクロバブルを併用することによって神経細胞にHGFを導入し、分泌したHGFによる効果でA β が惹起する神経障害の程度を評価している。

4. 研究成果

- 1、HGF遺伝子導入後の髄液中のHGF蛋白の上昇を確認した。
- 2、さらにA β を脳内に導入した後にHGF遺伝子を導入し、その後の神経障害の程度を評価している。
- 3、Water finding task およびY字迷路テストにて、HGF遺伝子導入群は、コントロールプラスミド導入群と比して、有意に神経障害が軽減されていた。
- 4、HGFによる抗酸化ストレス作用などの神経保護作用に加えて血管新生作用からくるA β の血管内へのクリアランス作用が神経症改善作用の機序として考えられた。

また同様に炎症性腸疾患である、クローン病モデルへ炎症の中心的役割を演じているNF-k β デコイという核酸を導入することによる治療実験も行っている。

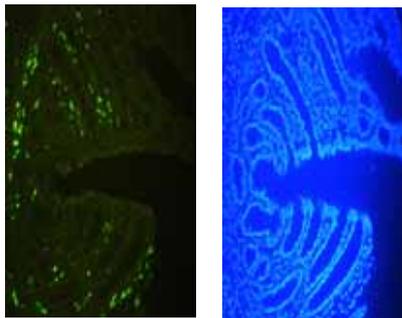
- 1、NF-k β デコイにFITCでラベルし、腸のどの部位に導入されているが観察したところ、NF-k β デコイを単独で投与しても表面にしか導入されなかった。
- 2、しかし、超音波とマイクロバブルを併用することによりNF-k β デコイが腸のより深層に到達していた。



200

200倍

FITC-oligo
遺伝子導入



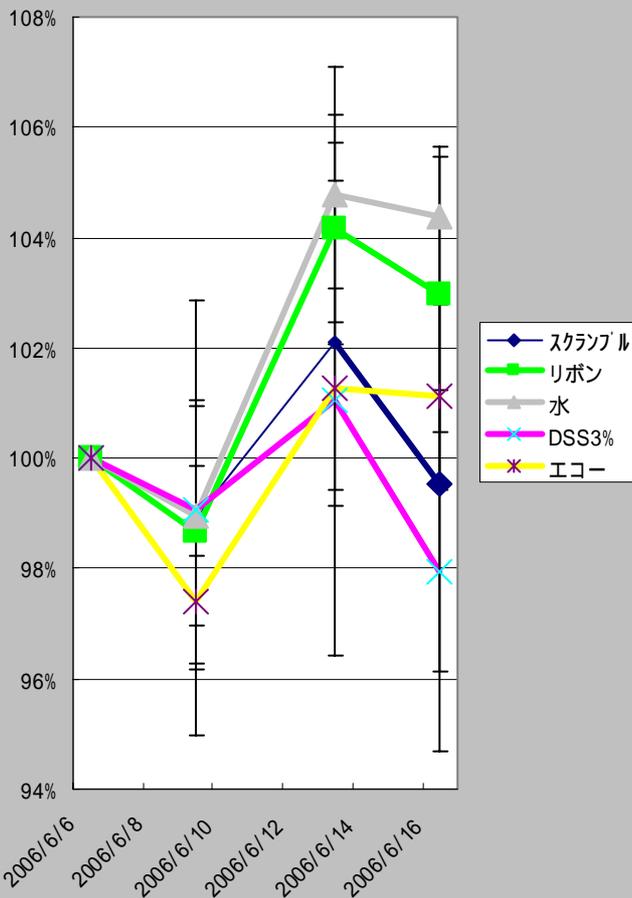
200

200倍

上段左: エコーなし
上段右: エコーなし+DAPI
下段左: エコーあり

3. クローン病へ同手法にて治療を行った。

体重変化百分率



グラフに示すように、リボン型のデコイを導入した群は、コントロールの水を投与した群と同じように体重の増加がみられた。一方、DSS3%を投与した群やスクランブルデコイ投与群では正常な体重増加が見られなかった。

このことはリボン型デコイが導入された群でのみ腸の炎症が抑制され炎症性腸疾患からくる体重の減少を抑制できたことが考えられる。

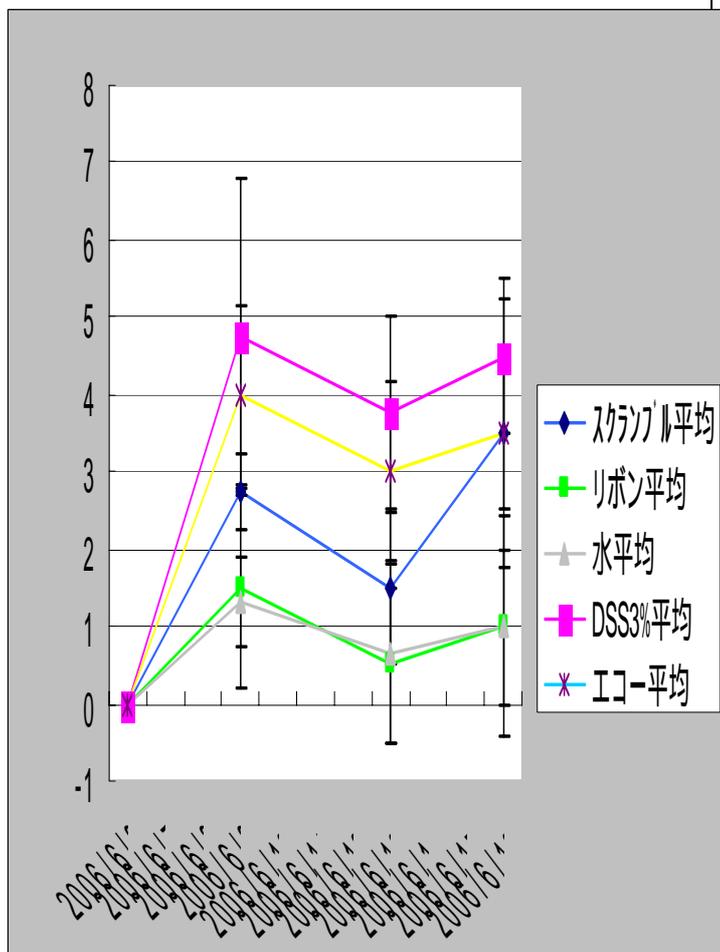


それでは、実際に炎症からくる腸の出血がどの程度になったかを染色してきると、上記に示すようにデコイを投与した群では、水を投与したコントロール群とほとんど差のない腸であった。すなわちリボン型デコイ投与群では腸の炎症が抑制され、それからくる出血が抑制されえていた。

(2)研究分担者
鯉淵 信孝 (KOIBUCHI NOBUTAKA)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30456131

(3)連携研究者
()

研究者番号：



以上の結果をグラフにすると上のグラフのようにやはりリボン型デコイ投与群では腸の炎症が有意に抑制されていることが証明された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織
(1)研究代表者
谷山 義明 (TANIYAMA YOSHIAKI)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：60372611