

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659148

研究課題名（和文） 小型魚類を用いた次世代型遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文） Development of new gene transfer system for small fish

研究代表者

坂井田 功 (SAKAIDA ISAO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80263763

研究成果の概要（和文）：

GFP レポーター遺伝子を用いて遺伝子導入の有無を調べたところ緑色の蛍光細胞の肝臓への存在を確認することに成功した。ただしマウスへの HTVi と比較したところ、導入効率は低かった。次に高脂肪食または四塩化炭素処理ではマウスと比較して肝線維化は非常に弱く線維化改善評価には不適であることが判明した。そこでジエチルニトロサミンを含む水で2ヶ月間飼育したところ、強い線維化を誘導することが可能になった。

研究成果の概要（英文）：

The possibility of gene therapy for zebrafish and medaka with hydrodynamic methods was examined. A condition setup for gene transfer was performed with GFP plasmid. We found few GFP positive cells in the liver. Gene transfer efficiency was small compared with the infusion of the mouse models.

We established fish live fibrosis model for evaluation of liver fibrosis improvement. We found that high fat diet and carbon tetrachloride is not suitable for liver fibrosis induction and DEN treatment for two months is suitable for liver fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓、遺伝子導入、線維化

1. 研究開始当初の背景

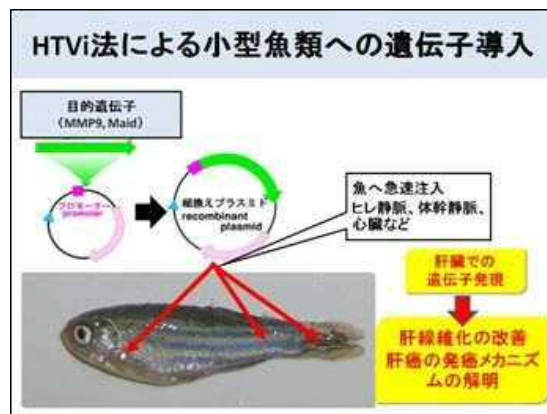
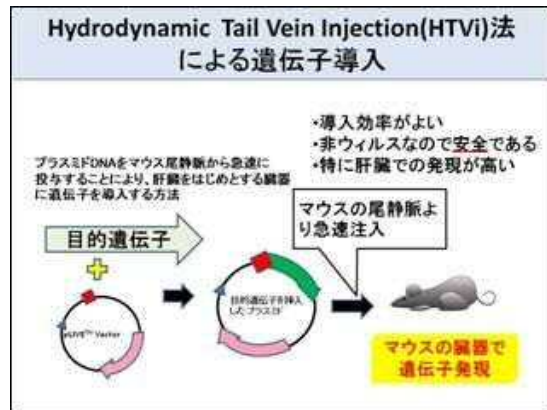
癌などに対する遺伝子治療を行うには、それを細胞に運ぶ担体が必要でありアデノウイルスなどが使用されている。しかし、ウイルスを用いることは臨床への応用を考えた場合、予期せぬ副反応など高い壁が存在する。最近になり担体なしでも、投与量や投与スピードを工夫することで、組織・細胞に目的遺伝子を入れ込む方法がマウスなどで開発されつつある（ハイドロダイナミック法）。この方法は、ヒトの肝臓内に挿入したカテーテル先端から目的遺伝子を癌細胞などに取り込ませることを可能にする方法で、一層の改良・発展が望まれる。しかし、これまで小型実験動物のメダカ、ゼブラフィッシュを使った報告例はなかった。

2. 研究の目的

現在宇宙で使用できる唯一の実験動物である小型魚類でのハイドロダイナミック法の確立は、来るべき宇宙時代に必ず役に立ち、さらに肝癌研究への応用を可能にすると考えられる。そこで我々は、ゼブラフィッシュおよびメダカを用いてハイドロダイナミック法により遺伝子治療を行うことを検討した。まず LacZ レポーター遺伝子により遺伝子導入方法の条件設定を行う。これらの *in vivo* 遺伝子導入により期待すべき結果が出た場合、多数の個体を用いた安全性評価を経て、ヒトへの応用が期待される。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュおよびメダカを用いてヒレおよび体幹の静脈または（直接）心臓にガラスニードルでプラスミド溶液の注入を試みた。遺伝子導入の評価はまずベータアクチンプロモーターに GFP をつないだプラスミドコンストラクトを用いて導入効率を評価した。次に、肝線維化モデルの作製については、チオアセトアミド、四塩化炭素、ジェチルニトロサミンを用いて検討した。チオアセトアミド、四塩化炭素は腹腔内投与、ジェチルニトロサミンは水溶液で魚を飼育することで線維化の誘導を行った。



4. 研究成果

ゼブラフィッシュおよびメダカを用いたハイドロダイナミック法による遺伝子治療の可能性について検討した。まず GFP を用いて遺伝子導入方法の条件設定を行った。プラスミドは、滅菌水および TansIT inVivo Polymer Solution と混合させ、魚静脈および心臓より急速に注入し、静注後肝臓を単離後凍結切片を作製した後、蛍光顕微鏡により自家蛍光と鑑別しながら観察したところ GFP 陽性と考えられる細胞を認めた (図 1)。マウスへの HTVi と比較したところ (図 2)、導入効率は低かった。効率が悪い原因としては十分な圧力を加えることができないことが考えられた。これについては今後の課題と考える。

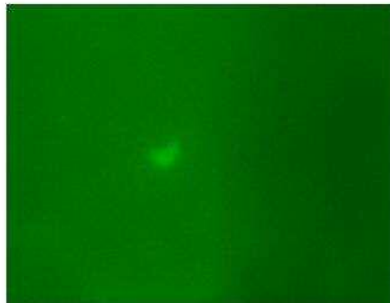


図1. B-Actin:GFPプラスミドを静脈投与したゼブラフィッシュ肝臓の蛍光顕微鏡写真

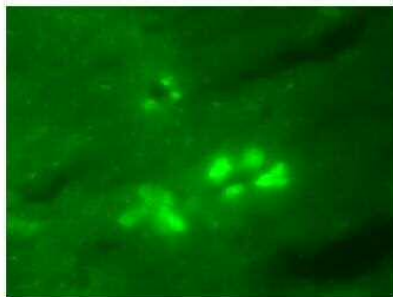


図2. B-Actin:GFPプラスミドをHTViしたマウス肝臓の蛍光顕微鏡写真

次に肝線維化改善評価に用いる魚の線維化の作製を試みた。ゼブラフィッシュおよびメダカに高脂肪食または四塩化炭素を含む水で飼育することで肝線維化の誘導を行った。マウスと比較して肝線維化は非常に弱く線維化改善評価には不適であることが判明した。そこでジエチルニトロサミンを含む水で2ヶ月間飼育したメダカおよびゼブラフィッシュを組織染色で肝線維化を評価したところ、マウス線維化モデルよりも弱いものであったが、高脂肪食や四塩化炭素と比べると強い線維化が認められた (図 3, 4)。

一方で癌抑制分子の一つの Maid について Maid siRNA などの発現プラスミドを用いて肝癌増殖抑制効果の評価を行うため、siRNA の抑制効果の確認をゼブラフィッシュ肝細胞由来培養細胞を用いて評価した。2種類の Maid siRNA を合成し、評価したところ Maid タンパクの発現量が 30%程度に低下する siRNA 配列を得た。この siRNA の配列をもつ発現ベクターを作製中である。

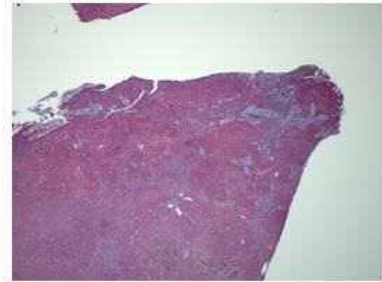


図3. DENIによるゼブラフィッシュの肝線維化(弱拡大)

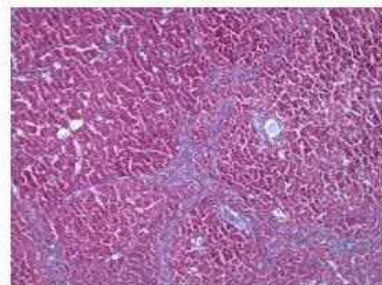


図4. DENIによるゼブラフィッシュの肝線維化(強拡大)

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)

[雑誌論文] (計2件)

① Oishi T, Terai S, Kuwashiro S, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I
Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model

Biochem Biophys Res Commun. 422 2012 22-27 査読有

② Fujisawa K, Terai S, Hirose Y, Takami T, Yamamoto N, Sakaida I.

Senescence marker protein 30 (SMP30)/regucalcin (RGN) expression decreases with aging, acute liver injuries and tumors in zebrafish.

Biochem Biophys Res Commun. 414 2011 331-336 査読有

[学会発表] (計1件)

① Koichi Fujisawa, Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Isao Sakaida
SMP30/Regucalcin is a useful marker for liver tumor ISHSR 2011.9.24 フィレンツェ イタリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井田 功 (SAKAIDA ISAO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80263763

(2) 研究分担者

寺井 崇二 (TERAI SHUJI)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00332809

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)
山口大学・大学教育機構・講師
研究者番号：90448283

高見 太郎 (TAKAMI TARO)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60511251

藤澤 浩一 (FUJISAWA KOICHI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00448284