

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591992

研究課題名(和文) 門脈内急速投与によるオリゴヌクレオチド肝導入方法の確立

研究課題名(英文) Transfection of naked oligodeoxynucleotides by rapid portal vein infusion

研究代表者

渡辺 剛 (Go, Watanabe)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50375276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：門脈内急速投与がベクター非依存性の生体肝組織遺伝子導入方法として有効であるかの前段階研究としてOligodeoxynucleotides (ODN)を用いて検討した。naked NF- κ B ODNをラット門脈に急速投与し、naked ODNが肝臓に導入されるか、生体内で機能するのかを検討した。門脈内急速投与でnaked ODNは肝内のクッパー細胞、類洞内皮細胞に取り込まれることが明らかとなった。肝虚血再灌流障害をモデルとし、生体内での機能を確認すると、NF- κ Bの活性化は抑制されていたが、肝障害の軽減までには至らなかった。門脈内急速投与で遺伝子導入が可能であるかどうかは今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to examine whether rapid portal vein infusion (RPVI) of naked oligodeoxynucleotides (ODN) could be used to transfect sufficient amounts of NF- κ B decoy ODN into the liver to suppress NF- κ B activation during liver ischemia/reperfusion (I/R) injury. Naked NF- κ B decoy ODN solution was rapidly administered into the portal vein. Transfection efficacy was examined with a fluorescent tag. Activation of NF- κ B was investigated by EMSA. Levels of serum liver enzymes and cytokines were measured during liver I/R injury. NF- κ B decoy ODN was preferentially incorporated into Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells, but not hepatocytes in the rat liver. Transfected NF- κ B decoy ODN suppressed the function of NF- κ B in both Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells during liver I/R injury, causing significant decreases in serum TNF- α and IL-6 levels 3 h after reperfusion although the decrease of serum liver enzymes was not significant.

研究分野：肝臓外科学

キーワード：遺伝子導入 肝虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

従来の肝遺伝子導入方法は、導入遺伝子の発現効率が最優先され、その安全性は二の次とするいわば基礎実験的な要素が強いものであった。生体肝組織への遺伝子導入はウイルスまたはリポソームといったベクターを用いる報告が多々あるものの、臨床応用を考慮した場合、最も安全とされるリポソームにおいても免疫反応を惹起させることからベクターを使用しない方法がより安全でふさわしいものとする。

研究の最終目的は、ベクター非依存性に、外来遺伝子を生体肝組織中へ導入可能か否か検討し、導入遺伝子が生体肝組織内で実際に機能するのかが確認することである。そこで、naked 遺伝子導入の実験に先立ち、その前段階の実験として naked ODN (naked NF-κB decoy ODN)の実験を計画した。本研究期間においては 20 塩基の NF-κB decoy oligodeoxynucleotide (ODN) (NF-κB binding site と同配列) が生体肝組織にベクター非依存性に導入可能か否かを検討し、この ODN が生体内において実際に機能するのかが検討した。

2. 研究の目的

- (1) naked ODN は門脈内急速投与により肝内の細胞に取り込まれるか
FITC でラベルした NF-κB decoy ODN を門脈内急速投与し、24 時間後に肝へ ODN が導入されているか否かを評価する。
- (2) FITC NF-κB decoy ODN 導入細胞の検討
FITC でラベルした NF-κB decoy ODN を門脈内急速投与し、24 時間後に肝へ ODN が導入されていることはすでに確認した。肝内のどの細胞に ODN が取り込まれているのかを評価する。
- (3) NF-κB decoy ODN 投与による細胞内 NF-κB 活性化抑制の検討
NF-κB decoy ODN は門脈内急速投与により、クッパー細胞と類洞内皮細胞に取り込まれることが明らかとなったが、このとりこまれた ODN が生体内で機能するのかが検証する。肝虚血再灌流障害は、NF-κB の活性化により炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着因子などを発現をするため、NF-κB が標的遺伝子に結合する binding site と同じ配列をもつ NF-κB decoy ODN を導入することで、生体内で NF-κB decoy ODN が機能し NF-κB の活性化を抑制するのかが検討する。
- (4) NF-κB decoy ODN 投与による肝虚血再灌流障害軽減化の検討
NF-κB 活性化が障害原因の一つと考えられている肝虚血再灌流障害において、NF-κB decoy ODN 投与により、肝虚血再灌流障害の軽減効果があるか否かを

検討した。

3. 研究の方法

- (1) 週齢の雄性 SD ラットを用いる。NF-κB decoy ODN の配列は
5'-CCTTGAAGGGATTTCCTCC-3'、
3'-GGAACTTCCCTAAAGGGAGG-5'を用いる(下線: consensus sequence)。NF-κB decoy ODN の投与量は、マウスを用いた NF-κB decoy ODN の実験の投与量から体重当たりの量を算出し 50nmol とした。FITC でラベルした NF-κB decoy ODN を準備し、以下の検討を行った。SD ラットを麻酔後開腹し、回腸の静脈枝から 24G の血管内留置針を穿刺し、針先端を門脈内に置く。1ml に希釈した 50nmol の FITC NF-κB decoy ODN を 3 秒間内に門脈内急速投与し (~0.5% BW、20mL/min)、抜針後閉腹する。一方、コントロール群として希釈にもちいる Ringer 液のみを投与する。門脈急速投与 24 時間後に肝を摘出し、凍結切片を作製するとともに肝を凍結保存する。
蛍光顕微鏡による肝内 FITC NF-κB decoy ODN の確認
凍結切片を薄切し固定後、蛍光顕微鏡で肝内に FITC NF-κB decoy ODN が導入されているか、コントロールと比較し検討する。
肝組織の蛍光量測定による FITC NF-κB decoy ODN の確認
凍結保存した肝組織をホモジネートし遠心後、上清のみを採取する。蛍光測定器で上清中の蛍光強度を測定する(Ex 494nm, Em 518nm)、上清のタンパク濃度を測定し、を算出し、二群間で比較検討する。
- (2) FITC NF-κB decoy ODN を門脈内急速投与し、24 時間後に肝を摘出し、凍結切片を作製する。凍結切片を薄切し固定後、抗アルブミン抗体(肝細胞)(Cappel, Aurora, OH)、抗 CD68 抗体(クッパー細胞)(Serotec, Oxford, UK)、抗 hepatic sinusoidal endothelial cell 抗体(類洞内皮細胞)(American Research Products, Belmont, MA)と抗体反応をさせた後、AlexaFluor-594 標識蛍光二次抗体(Molecular Probes/Life Technologies, Eugene, OR)で蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡(Carl Zeiss, Jena, Germany)で FITC NF-κB decoy ODN が導入された細胞を同定する。
- (3) SD ラットに NF-κB decoy ODN を門脈内急速投与し、24 時間後に 45 分間の肝流入血遮断(Pringle 法)し、1 時間再灌流させる。肝を摘出し、肝細胞を分離する。また、エルトリエーター(Hitachi, Japan)により、クッパー細胞、類洞内皮細胞をそれぞれ分画する。各分画より核タンパ

クを抽出後、アイソトープを使用し、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で NF-κB 活性が NF-κB decoy ODN 投与により抑制されているか、細胞レベルで検討する。なお、ODN 投与による影響を鑑別除外するため、NF-κB decoy ODN 投与群(NF-κB decoy)、コントロール群 (Nil decoy)に加え scrambled decoy ODN 群(SC decoy) (5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3'、3'-AACGGCATGGACTGAATCGG-5')を作製し比較検討した。また、EMSA がきちんと機能しているかを確認するため、NF-κB p65 抗体または大量の非アイソトープラベルの競合阻害 ODN を加え実験を行った。さらに、陽性コントロールとして LPS を腹腔内に投与したラットを用いた。

- (4) SD ラットに NF-κB decoy ODN を門脈内急速投与し、24 時間後に 45 分間の肝流入血遮断(Pringle 法)し、その後再灌流させる。再灌流 1, 3, 6 時間後に血液、肝組織を採取し以下の項目を検討した。なお、NF-κB decoy ODN 群(NF-κB decoy)のほか scrambled decoy ODN 群(SC decoy)、コントロール群 (Nil decoy, 溶媒のみ投与) の三群を設けた。

肝酵素値の検討

再灌流 1, 3, 6 時間後の血中 AST, ALT, LDH を測定し、三群間で比較検討した。

血中サイトカイン値の検討

再灌流 1, 3, 6 時間後の血中 TNF-α, IL-1β, IL-6, GRO/CINC-1

(growth-related oncogene / cytokine-induced neutrophil

chemoattractant-1; rat IL-8 homolog) を ELISA で測定し、三群間で比較検討した。

肝類洞内好中球数の検討

肝組織切片を α-naphthyl acetate と Fast Blue RR Salt を用いて specific esterase の活性染色を行った。類洞内の染色された細胞数を顕微鏡下に計測し、三群間で比較検討した。

4. 研究成果

(1)

蛍光顕微鏡で観察すると、FITC NF-κB decoy ODN を門脈内急速投与した群においてはコントロール群に比して、FITC は肝内にびまん性に分布しており、FITC NF-κB decoy ODN はいずれかの肝内の細胞に導入されているものと考えられた。

単位タンパク重量あたりの蛍光強度は、NF-κB decoy ODN 群(FITC-ODN)では 83.7 ± 10.6 /mg protein、溶媒のみを投与した群(Control)では溶媒群 34.4 ± 4.2 /mg protein と優位に増加しており ($p < 0.001$)、

本方法で肝組織中に ODN が導入されているものと考えられた。

- (2) FITC NF-κB decoy ODN は、抗 CD68 抗体と抗 hepatic sinusoidal endothelial cell 抗体に染色陽性の細胞に取り込まれていることから、クッパー細胞と類洞内皮細胞に取り込まれることが明らかとなった。しかし、アルブミン陽性の肝細胞中には取り込まれておらず、肝細胞には取り込まれないことが判明した。

以上より、門脈内急速投与により FITC NF-κB decoy ODN はクッパー細胞と類洞内皮細胞に取り込まれることがわかった。

- (3) クッパー細胞においては、陰性コントロールである Nil decoy 群と SC decoy 群において、細胞核内に NF-κB が存在していることから、肝虚血再灌流障害において NF-κB が活性化し、細胞核内に移動していることが証明された。なお、NF-κB p65 抗体を加えることで、NF-κB は supershift を示すこと、競合阻害 ODN を加えることで NF-κB のバンドが見えなくなることから、EMSA はきちんと機能し、NF-κB が描出されていることが明らかであった。NF-κB decoy 群では核内に NF-κB は検出されず、NF-κB decoy 導入により NF-κB の活性化が抑制されたものと考えられた。

類洞内皮細胞においては、Nil decoy 群では NF-κB の活性化により、細胞核内に NF-κB が存在していた。SC decoy 群では、クッパー細胞と異なり、細胞核内に存在する NF-κB は Nil decoy 群よりも少なく、scrambled decoy であっても類洞内皮細胞においては何らかの機序により NF-κB の活性化が抑制されていたものと考えられた。この結果は、同一のラットより得たクッパー細胞、類洞内皮細胞を用いて行ったもので、肝虚血再灌流障害の軽重などに差はなく、また別の個体のラットでも同様の結果であった。しかし、scrambled decoy による NF-κB の活性化抑制の機序は不明であった。NF-κB decoy 群では核内に NF-κB は検出されず、NF-κB decoy 導入により NF-κB の活性化が抑制されたものと考えられた。

肝細胞においては、肝虚血再灌流障害では肝細胞の NF-κB は活性化されないこと、門脈内急速投与により ODN は肝細胞に導入されないことから、Nil decoy 群、SC decoy 群、NF-κB decoy 群では、NF-κB に差は見られなかった。

(4)

肝虚血再灌流障害 1 時間後においては、AST、ALT、LDH 値とも Nil decoy 群 > SC decoy 群 > NF-κB decoy 群の傾向にあったが、各群で有意な差は認められなかった。3 時間後においては、AST、ALT、LDH 値とも NF-κB decoy 群が最も低値

であったが、6 時間後においては、NF- κ B decoy 群がかえって高い値を示した。しかし、3 時間後、6 時間ごとにも有意な差は認めなかった。

肝虚血再灌流障害 1 時間後においては、血清 TNF- α 、IL-6 の値に 3 群間で差を認めなかった。3 時間後においては、血清 TNF- α 、IL-6 値とも Nil decoy 群 > SC decoy 群 > NF- κ B decoy 群の傾向にあり、Nil decoy 群と NF- κ B decoy 群の間には、それぞれ有意な差($p < 0.05$)があった。しかしながら、血清 IL-1 β の値に 3 群間で差を認めなかった。6 時間後の血清 GRO/CINC-1 値においては、3 群間で差を認めなかった。

肝虚血再灌流障害 6 時間後の肝類洞内好中球数においては、NF- κ B decoy 群で少ない傾向にあったが、3 群間で差を認めなかった。

結論

門脈内急速投与により naked ODN はクッパー細胞、類洞内皮細胞に導入された。導入された NF- κ B decoy ODN は生体肝組織中で機能することが確認されたものの、肝虚血再灌流障害の軽減効果は一過性であった。

遺伝子導入が門脈内急速投与により同様に可能であるかは今後の課題である。

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 1 件)

Watanabe G, Uchinami H, Yoshioka M, Abe Y, Kikuchi I, Iwasaki W, Kume M, Yamamoto Y. Transfection of naked nuclear factor- κ B decoy oligodeoxynucleotides into liver by rapid portal vein infusion in rats: Its effect on ischemia-reperfusion injury. Human Gene Therapy 23:428-436, 2012.

〔学会発表〕(計 1 件)

第 113 回日本外科学会総会
渡辺剛、打波宇、吉岡政人、阿部ゆき、山本雄造。門脈内急速投与によるオリゴヌクレオチド肝導入方法の確立

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 剛 (WATANABE, Go)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50375276

(2) 研究分担者

山本 雄造 (YAMAMOTO Yuzo)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70281730

(3) 連携研究者

()

研究者番号：