



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor : in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons( 内容の要旨(Summary) )
Author(s)	林, 克彦
Report No.(Doctoral Degree)	博士 ( 医学 ) 甲 第477号
Issue Date	2001-03-31
Type	博士論文
Version	
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/14647">http://hdl.handle.net/20.500.12099/14647</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本籍)	林 克彦 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 477 号
学位授与日付	平成 13 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: <i>in vivo</i> gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons
審査委員	(主査) 教授 坂井 昇 (副査) 教授 犬塚 貴 教授 岡野 幸雄

## 論文内容の要旨

脳卒中による死亡率は癌、心疾患に次ぐもので、脳梗塞は脳卒中の70%近くを占めている。脳梗塞完成までの過程においては脳虚血の病態を伴う。神経細胞は短時間の虚血に脆弱であり、実験的には砂ネズミの両側頸動脈を5分間閉塞すると、海馬のCA1細胞に遅発性神経細胞死 (以下DND) が認められる。短時間虚血により生じるこの現象は虚血誘導神経細胞死のモデルとして広く知られる。一方、神経細胞死の抑制、保護を目指した研究が多くみられ、神経栄養因子を用いたもの、あるいは抗アポトーシス作用を持つ薬剤を用いたものなどがある。これらの研究においてはDNDに対してある程度の抑制効果が認められるものの、神経細胞死抑制因子が虚血刺激前に投与され、直接脳実質内あるいは脳室内へ持続投与する必要があり臨床応用を目指した場合大きな問題点となる。

申請者は、血管新生作用、抗アポトーシス作用などの多彩な作用をもつサイトカインであり、また最近神経栄養因子としての作用が確認された肝細胞増殖因子 (以下HGF) に着目し、DNDの抑制を目指した新しい治療法の開発に取り組んだ。すなわち、ヒトHGFの遺伝子をHVJ-liposome法を用いて砂ネズミ脳に導入し、発現させる事でDNDに対する抑制効果を検討した。

### 実験方法

#### 1) HVJ-liposome法を用いた遺伝子導入効果の確認

砂ネズミにlac Z遺伝子をHVJ-liposome法を用いて大槽から投与導入し、1週間後に脳におけるその発現をX-Gal染色法で確認した。

#### 2) ヒトHGFの発現の確認

砂ネズミにヒトHGF遺伝子を導入し、1週間後その髄液を採取。ELISA法にてその髄液中濃度を測定した。

#### 3) DNDの抑制効果の解析

体重60g前後の雄性砂ネズミを用いた。ハロセン麻酔下に両側頸動脈を露出、クリップを用いて総頸動脈を5分間閉塞し、一過性前脳虚血モデルを作製した。再灌流後、HVJ-liposome法を用いて大槽からヒトHGF遺伝子を1回のみ導入した(HGF群)。また同様にリコンビナントHGFの大槽投与を行った (r-HGF群)。対照として脳虚血刺激を行わない無虚血刺激群 (sham 手術群) と虚血刺激後lac Z遺伝子導入群 (コントロール群) を作製した。術中、術後の体温は直腸温で37度に維持した。DNDの抑制効果は術後1週間で評価した。各群のCA1細胞の数をカウントし、1mmあたりの細胞数で評価した。

#### 4) 免疫組織染色法によるmolecular mechanismの解析

免疫染色法を用いて HGFのreceptorであるc-Met, アポトーシス関連分子であるBax, Bcl-xLの変化を術後4日後、1週間後に検討した。

#### 5) TUNEL法によるDNDの解析

各群におけるDNDによる核の断片化をTUNEL法で術後4日後、1週間後に評価検討した。

## 結 果

- 1) 遺伝子の導入効果を確認するために行ったlac Z遺伝子導入砂ネズミでは投与1週間後、皮質深部、海馬神経細胞、脈絡叢など、その発現が脳の各所に認められた。
- 2) HGF導入群砂ネズミの髄液中からはELISA法でヒトHGFが検出 ( $2.3 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ ) された。コントロール群では検出されなかった。
- 3) 1週間目における海馬CA1領域の神経細胞数はコントロール群では平均2.5個/mm, HGF導入群では平均159個/mmであり、有意に神経細胞死が抑制された ( $P < 0.01$ )。また、同時に作製したr-HGF群の大槽投与モデル群では平均43個/mmであった。各群間には有意差を認めた ( $P < 0.01$ )。
- 4) 免疫染色ではc-Metの発現がHGF導入群で増加し、Baxの細胞質から核への移動が抑制されていることが認められた。Bcl-xLには明らかな変化は認められなかった。
- 5) TUNEL法ではコントロール群に陽性細胞が多数認められたのに対し、HGF群では陽性細胞は明らかに少なく、核の断片化が抑制されていることが確認された。

## 考 察

HVJ-liposome法を用いてヒトHGF遺伝子を一過性前脳虚血刺激後の砂ネズミの大槽内に投与し、脳に発現させ、DNDの有意な抑制効果がhippocampal CA1 神経細胞で認められた。

この機序として以下の過程が考えられた。分泌蛋白質であるHGFの遺伝子を大槽より投与することにより、髄液中に産生されたHGFが分泌される。このHGFが神経細胞膜表面にあるHGF receptor (c-Met) に結合するとc-Metが活性化され、その下流にあるチロシンキナーゼが活性化され、下流のカスケードが活性化される。また、c-Metの活性化は自己HGFの分泌を促し、さらにHGFが産生され、また、c-Met が活性化するといったポジティブフィードバックが働く。この結果、導入されたHGFのみでなく、自己のHGFの産生が持続することにより、その作用が増強されると考えられる。結果として、大槽からの1回の投与でも、持続した効果が得られたことになる。

本研究で用いた方法は、これまでの報告にあった薬剤、栄養因子を用いた研究が虚血刺激前から脳内・脳室内持続投与を開始し、虚血障害に陥った細胞に直接導入する方法であったのに対し、虚血刺激後の投与にてDND抑制効果が認められたこと、1回の投与で持続した効果が得られたこと、直接障害された細胞に導入する必要がないことが大きな特徴である。従って本法は生体への侵襲性が低く、より長期の持続効果が期待できることから、虚血脳の治療、脳梗塞の急性期における治療法としての有効性が期待され、臨床応用の可能性が極めて高い。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 林 克彦は、一過性虚血刺激を加えた砂ネズミにヒト肝細胞増殖因子の遺伝子をHVJ-liposome法を用いて大槽から投与することによりhippocampal CA1のDNDを有意に抑制できることを明らかにした。この新知見は脳梗塞に対する新しい遺伝子治療法の道を開いたものである。本研究は脳神経外科学、脳卒中学の進歩・発展に少なからず、寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: *in vivo* gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons  
Gene Therapy (in press)