

遺伝子導入可能な多機能超音波内視鏡の開発

河野 透 [旭川医科大学第二外科／助教授]

綾部 時芳 [旭川医科大学第三内科／講師]

海老澤 良昭 [旭川医科大学第二外科／助手]

丸山 弘樹 [新潟大学医歯学総合病院第二内科／助手]

早川 靖彦 [ネッパジーン株式会社／代表取締役]

研究背景

日本で開発され、世界的に診断・治療において利用されている消化管内視鏡はコンピューター画像技術の向上とともに大きな局面を迎えており、実際に内視鏡を挿入しなくても高速CTスキャンによる映像をコンピューターによって消化管内部をバーチャルに観察できるようになり、近未来では従来型の観察用の消化管内視鏡に取って代わる勢いである。一方、本邦では診断においても、現行の消化管内視鏡は単なる表面的な観察だけではなく、超音波を利用した深達度診断が盛んに行われ、治療方針決定において、ますます消化管内視鏡の重要性が増している状況である。欧米では内視鏡挿入技術の習得が広まらず、習熟した内視鏡専門医が少ないため、従来型の消化管内視鏡が、欧米において広まっていくとは考えにくい。むしろ、将来において消化管内視鏡の役割は治療に限定されていくものと考えられる。そこで、今回の研究は現行の超音波消化管内視鏡に深達度診断だけでなく、治療において内視鏡的遺伝子導入治療という新たな付加価値を与えることを目的としている。

腸管粘膜における遺伝子欠損・変異によって発生するポリープなど先天的遺伝子疾患、後天的に遺伝子の変異が原因となる肝纖維化など遺伝子治療の対象となる病態は消化器領域で数多く存在する。しかしながら選択的に限局して遺伝子導入を制御できる方法は未だ開発されていない。

導入遺伝子に関してウイルスなどを利用したものが主流であり、多くの動物研究で有効性が報告されているが、一緒に導入されるウイルスの危険性からほとんどが、臨床応用段階に到達していない。一方、遺伝子を大腸菌のプラスミドと共に導入する方法が、安全性から臨床応用への最短距離にある導入法であることが、認知されてきている。しかし、導入効率がウイルスに比べて低く効果が疑問視されていることも事実である。しかし、最近、ウイルスと同程度の導入効率を有するスーパープラスマジドが出現し、俄然、臨床応用が現実味を帯びてきた。われわれも肝臓、腎臓などの実質臓器でそのスーパープラスマジドを使用した遺伝子導入実験が行い良好な成績を得ている。その導入手法は残念ながら消化管には応用できない。ところが、最近、血管内視鏡を利用した超音波による遺伝子導入が血管壁へ

臨床応用され、動脈硬化の治療に効果が期待されていることから、消化管への遺伝子導入を現在使用されている超音波内視鏡を利用して導入可能ではないかと本研究の着想に至った。超音波エネルギーによる細胞内への薬物・遺伝子透過促進メカニズムはまだ解明されていないが、他の遺伝子導入法に比べ、選択的に限局した組織・臓器に遺伝子導入を制御できる方法といえる。さらに、最近、血管造影用として使用されている造影剤の一つであるオプチゾン（米国で認可、日本で不認可）が超音波のキャビテーション効果でミセル化し、造影剤が導入する遺伝子とともに高速（300～600m毎秒）で細胞膜を通過して細胞内に導入されることが報告された。超音波遺伝子導入にはいくつかの問題点ともいえる特徴を有している。第一に超音波を利用するため、水中でなければならぬこと、超音波のみでは遺伝子導入ができないためキャリアーとして造影剤を使用することなど、安全性と効率において検討すべきハードルは多く存在する。そこで、われわれが日頃から使用している超音波内視鏡をベースにした遺伝子導入も可能な多機能な超音波内視鏡を開発するための基礎的検討を行うことが本研究の目的である。

研究目的

本研究の目的は下記の2つである。

- 1) 遺伝子導入用の超音波条件とマイクロバブルの至適濃度を決定し、安全性を検討する

遺伝子導入用超音波と診断用超音波のスペックで大きく異なる点は、低周波（1～5MHz）、高出力（1W/cm²以上必要）、パルス波（高出力のため持続波は発熱を起こす）の3点である。臓器によって至適周波数、至適パルス波、超音波エネルギーのキャビテーション効果で細胞内に遺伝子を運び入れるマイクロバブルの至適濃度を決定する。高出力の安全性を照射時間と遺伝子導入細胞、組織への影響を培養細胞レベルで明らかにし、最小有効照射時間を設定する。

- 2) 臨床応用を前提とした標的臓器・組織への超選択的超音波遺伝子導入方法を検討する

管腔臓器ルート：血管内、管腔内に遺伝子を充満させ、管腔内側または外側から照射し、導入部位と導入効率、導入期間を検討。（検討対象：胃、小腸、大腸）

実質臓器ルート：血管内、胆管内、膵管内から遺伝子を臓器に誘導し、臓器表面から照射し同様に検討。

さらに正常臓器だけでなく、腸炎、肝硬変モデルでの導入についても同様に検討する。（肝、脾）

従来の遺伝子導入治療法は検討すべきハードルが多く存在し、標的臓器・臓器に選択的に、特に管腔臓器へ選択的に限局した遺伝子導入法は国内外で報告はない。そこで、選択的に臓器・組織診断可能な超音波をベースにした安全な選択的遺伝子導入法を開発することは、遺伝子治療法

が日常的な治療法として認知される先駆けとなるものと考える。今回の研究は消化管超音波内視鏡に診断だけでなく、超選択的遺伝子導入装置として発展する可能性を与え、消化器外科領域では術中に選択的な遺伝子導入法として発展する可能性がある。具体例を列記すると、

1. 血管壁細胞、粘膜上皮細胞、肝細胞の増殖、再生促進遺伝子を導入することで消化管吻合部の早期癒合、炎症性腸疾患の傷害粘膜の修復促進、残肝の早期再生が期待できる。
2. 各種遺伝子欠損・変異が関与する消化器疾患で遺伝子導入による病態の改善、発症予防が期待できる
3. 発癌過程における原因遺伝子を対立遺伝子導入によって発癌予防、癌治療が期待できる。
4. 胆管癌、膵癌に対して胆管、膵管内に遺伝子導入超音波内視鏡を用いた新たな治療展開が期待できる。

研究方法

超音波の条件とマイクロバブルの濃度を各種上皮細胞株の培養細胞を利用した検討(綾部担当)

- 1) 細胞: 小腸上皮細胞ヒトIntestine 407、ラットIEC-6、肝細胞ヒトHep G2、ラットRL-34をトリプシンで浮遊細胞の状態にして $1\sim2\times10^6$ cells/ml (PBS)を48well plate、各1mlで10～20wellに分注する。
 - 2) 導入遺伝子: 導入条件を評価するためレポーター遺伝子としてGFP含遺伝子(TAKARA Biomedicals社、pQB125:10 μ g/ml per well)を使用。
 - 3) 超音波照射装置: Sonitron 1000(Rich Mar社)プローブ先端6mm(本研究で購入予定設備)
 - 4) マイクロバブル(オプジン:Nycomed-Amersham社)の原液を最終濃度で5、10、20、30%の4群を作成。目的遺伝子をマイクロバブルに混入し、超音波を照射。
 - 5) 超音波照射条件の設定は臨床応用を前提に安全性を考えて出力は最低有効出力である1W/cm²に固定。また、深部到達度が最も高い周波数1MHzに固定し、連続波では生体の温度上昇につながるので断続的なパルス条件(Duty比:10～90%)と照射時間(10～120sec)を変動させて検討する。
 - 6) 超音波照射+マイクロバブル群と超音波照射単独群の2群で細胞生存率を比較して至適条件を決定する。
- 細胞レベルで決定された至適条件で遺伝子導入が動物レベルで可能か否かを検討—管腔臓器(河野担当)
- 1) 動物と臓器: 動物はWistarラット。臓器は管腔臓器として胃、小腸、大腸。
 - 2) 導入遺伝子: 導入部位を評価するレポーター遺伝子としてLacZとGFP含遺伝子。遺伝子導入・発現の効率を評価するレポーター遺伝子として造血効果という生理活性

性を示すエリスロポイエチン遺伝子。ベクターは大腸菌のプラスミド(pCAGGS:阪大の宮崎教授より供与)を使用。大腸菌にpCAGGS+遺伝子を組み込みnaked-DNA遺伝子として、遺伝子大量調整を行う。

- 3) 遺伝子導入法(管腔臓器ルート): 全身麻酔下で、ラットを開腹し、管腔臓器は経口的アプローチに胃、経盲腸的に小腸、経肛門的に大腸にチューブを挿入、チューブまたは同時にプローブを挟むように胃、腸管をクランプし、長軸2cmの閉鎖胃、腸管を作成、マイクロバブルを含む1mlのnaked DNA(プラスミドDNA: 40 μ g/ml)溶解液を投与し、超音波を管腔外側から照射した群と内側から照射した群を作成する。
- 4) 遺伝子導入の評価: 導入後、経時的に臓器摘出し、組織レベルでの導入効果を共焦点レーザ顕微鏡でLacZ染色細胞、GFP染色細胞を観察し、導入細胞を同定、細胞数から導入効率を換算する。さらにPCR、ウエスタンによる遺伝子の同定と導入効率を検討する。採血血清から血清エリスロポイエチン値、ヘマトクリット値をパラメーターとして導入遺伝子の発現の時間的、空間的推移について検討する。

細胞レベルで決定された至適条件で遺伝子導入が動物レベルで可能か否かを検討—実質臓器(河野担当)

- 1) 動物と臓器: 動物はWistarラット。実質臓器として肝臓、膵臓。
- 2) 導入遺伝子: LacZとGFP含遺伝子。エリスロポイエチン遺伝子。ベクターは大腸菌のプラスミド(pCAGGS)を使用。大腸菌にpCAGGS+遺伝子を組み込みnaked-DNA遺伝子として、大量調整を行う。
- 3) 遺伝子導入法(実質臓器ルート): 全身麻酔下で、ラットを開腹し、経胆管、経門脈、経膵管的にマイクロバブル遺伝子溶解液を注入し滅菌した超音波診断用ゲルを臓器表面に塗布し超音波を照射。
- 4) 遺伝子導入の評価: 前述と同じ。

各種動物疾患モデルでの遺伝子導入実験:DSS潰瘍性大腸炎、チオアセタマイド肝硬変モデルで検討する。

結果

超音波の条件とマイクロバブルの濃度を各種上皮細胞株の培養細胞を利用した検討

- 1) 細胞: 小腸上皮細胞ヒトIntestine 407、ラットIEC-6、肝細胞ヒトHep G2、ラットRL-34をトリプシンで浮遊細胞の状態にして $1\sim2\times10^6$ cells/ml (PBS)を48well plate、各1mlで10～20wellに分注し、超音波照射装置: Sonitron 1000(Rich Mar社)プローブ先端6mmで検討した結果、1W/cm²3分以内であれば細胞への障害は認められなかった。

- 2) マイクロバブル(オプジゾン:Nycomed-Amersham社)の原液を最終濃度で5、10、20、30%の4群を作成。目的遺伝子をマイクロバブルに混入し、超音波を照射した結果、濃度依存性に遺伝子導入効率が上昇した。
- 3) 超音波照射条件の設定は臨床応用を前提に安全性を考えて出力は最低有効出力である1W/cm²に固定。また、深部到達度が最も高い周波数1MHzに固定し、連続波では生体の温度上昇につながるので断続的なパルス条件(Duty比:10~90%)と照射時間(10~120sec)を変動させて検討した結果、パルス条件は50%、照射時間は120秒で導入効率はもっとも良好であった。
- 細胞レベルで決定された至適条件で遺伝子導入が動物レベルで可能か否かを検討—管腔臓器
- 4) 導入部位を評価するレポーター遺伝子としてLacZ遺伝子。遺伝子導入・発現の効率を評価するレポーター遺伝子として造血効果という生理活性を示すエリスロポイエチン遺伝子。ベクターは大腸菌のプラスミド(pCAGGS:阪大の宮崎教授より供与)を使用。大腸菌にpCAGGS+遺伝子を組み込みnaked-DNA遺伝子として、遺伝子大量調整を行い、経肛門的アプローチによる遺伝子導入(全身麻酔下で、ラットを開腹し、大腸内に経肛門的にチューブを挿入、挿入されたチューブを挟むように腸管をクランプし、長軸2cmの閉鎖腸管を作成、1mlのnaked DNA(プラスミドDNA:40μg/ml)溶解液を投与し、超音波で腸管の粘膜細胞内に遺伝子を導入)、その結果、レポーター遺伝子、エリスロポイエチン遺伝子共に、大腸粘膜上皮細胞に導入されていることが組織学的に確認できた。
- 5) 遺伝子導入の評価:採血血清から血清エリスロポイエチン値、ヘマトクリット値をパラメーターとして導入遺伝子の発現の時間的、空間的推移については検討中である。

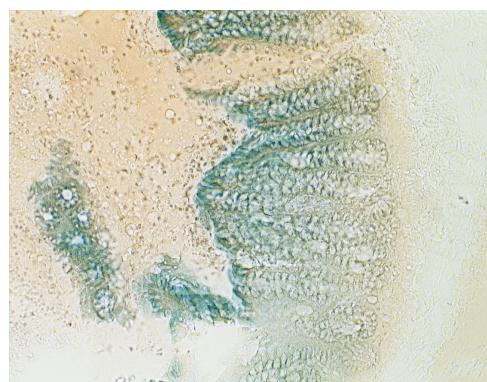
研究開発の効果及び影響

日本で発達した消化管内視鏡はコンピューター画像診断技術の向上とともに大きな局面を迎えている。つまり、従来型の観察用の消化管内視鏡にとってかわり実際に内視鏡を挿入しなくても高速CTスキャンによる映像をコンピューターによって消化管内部をバーチャルに観察できるようになり、さらに、超小型カプセル型カメラを経口的に用いることで、従来、直接観察できなかつた小腸を含めて観察できるようになり、近未来的には表面的な観察用消化管内視鏡そのものの存在意義を失いつつある。一方、超音波内視鏡による深達度診断の重要性が脚光を浴びているが、今回の研究は超音波消化管内視鏡に深達度診断だけでなく治療に関して新たな付加価値を与えるものである。以下、その具体的な効果について列記すると、

1. 粘膜上皮細胞の増殖、再生を促進する遺伝子を導

- 入することで傷害粘膜の修復促進、
2. 外科的切除後の吻合部位の早期癒合が期待できる。
 3. 各種遺伝子が関与する消化管疾患における遺伝子導入による病態の改善、発症予防が期待できる
 4. 発癌過程における原因遺伝子を対立遺伝子導入によって発癌予防、癌治療が期待できる。
 5. 抗癌剤の代謝酵素を選択的に阻害、または誘導し、抗癌剤の副作用軽減、作用増強が期待できる。
 6. 胆管にできる胆管癌、胰管にできる膵癌など今まで治療に難渋している疾患にたいして胆管、胰管内に挿入できるダウントライシングした遺伝子導入超音波内視鏡を用いて新たな治療展開が期待できる

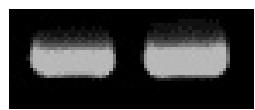
超音波遺伝子導入によりpCAGGS-lacZの発現が大腸粘膜細胞に導入されていることが組織学的に確認



(右側が腸管外、左側が腸管内側)

pCAGGS-Epo遺伝子導入後腸管組織におけるRT-PCRで遺伝子の発現を確認

control pCAGGS-Epo



(上段がEpoで下段がG3PDH)