



臍島細胞シートへの改良型アデノウィルスベクターを用いた抗アポトーシス遺伝子導入の検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-01-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 花山, 寛之 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000165

論 文 内 容 要 旨

しめい 氏名	はなやま ひろゆき 花山 寛之
学位論文題名	膵島細胞シートへの改良型アデノウイルスベクターを用いた抗アポトーシス遺伝子導入の検討
【はじめに】1型糖尿病に対する新たな細胞移植治療として、温度応答性培養皿上で膵島細胞を単層培養した膵島細胞シートが開発されている。この膵島細胞シートを糖尿病モデルマウスの皮下に移植することによって、長期の血糖制御が得られた。様々な部位への膵島移植モデルにおいて、皮下移植は他の部位に比し、治療効果を得るためにはより多くの細胞数を要する。これは皮下における血行分布が少ないため移植部位における低酸素が生じ、酸化ストレスに起因するアポトーシスが誘導され、移植片の生着率低下が生じると考えられる。近年、酸化ストレスに対する抵抗性の獲得を目的として、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入が報告されている。本研究では、膵島細胞シートの作製過程における改良型アデノウイルス (AdK7) ベクターを用いた抗アポトーシス遺伝子導入法を開発し、酸化ストレスに対するアポトーシス抑制効果について検証した。【方法】Lewis ラットから分離した膵島をトリプシン処理で単離細胞とし、温度応答性培養皿上で単層培養した。培養 24 時間後に MOI (multiplicities of infection) = 0、5、10、30 の通常型アデノウイルス (Ad) ベクターもしくは AdK7 ベクターを膵島細胞に感染させ、遺伝子導入効率および細胞毒性をもとにベクター感染の至適濃度を決定した。AdK7 ベクターで膵島細胞に抗アポトーシス蛋白 (FNK) をコードした遺伝子を導入し、過酸化水素で誘導されるアポトーシスの抑制効果を検証した。また、AdK7 ベクター感染後におけるインスリン分泌能への影響を検証した。【結果】AdK7 ベクターによる膵島細胞への遺伝導入効率は、Ad ベクターと比較してすべての MOI 条件(5, 10, 30)下で有意に高かった。遺伝子導入効率はウイルス濃度依存性に上昇したが、MOI = 30 では細胞毒性が生じ、膵島細胞の viability を有意に低下させたため、AdK7 ベクターによる遺伝子導入の至適条件は MOI = 10 とした。過酸化水素処理により FNK 遺伝子非導入群ではカスパーゼ活性が有意に上昇しアポトーシスが誘導された。一方、FNK 遺伝子導入群ではカスパーゼ活性が過酸化水素非処理群と同程度でありアポトーシスが抑制された。また、グルコース刺激試験では FNK 遺伝子導入群は非導入群より高いインスリン分泌能を有していた。【結語】本研究により、膵島細胞シートに対する AdK7 ベクターを用いた FNK 遺伝子導入の至適条件が明らかにされた。本法を用いることにより、インスリン分泌能を障害することなく、過酸化水素処理によって誘導されるアポトーシスを抑制することが可能であった。(1118 文字)	

※日本語で記載すること。1200字以内にまとめること。

学位論文審査結果報告書

平成27年12月22日

大学院医学研究科長様

下記のとおり学位論文の審査を終了したので報告いたします。

【審査結果要旨】

氏名：花山 寛之

学位論文題名：膵島細胞シートへの改良型アデノウイルスベクターを用いた抗アポトーシス遺伝子導入の検討

本研究では、I型糖尿病の細胞移植治療に有益な膵島細胞シートの作成過程において、酸化ストレスに対するアポトーシスを抑制するために、改良型アデノウイルスベクターを用いた抗アポトーシス遺伝子導入による効果を培養細胞レベルで検討した。ラット膵島細胞を培養し、抗アポトーシス作用を持つ Bcl-xL 変異体 (FNK) 遺伝子をコードする改良型アデノウイルス (AdK7) ベクターを細胞に導入し、過酸化水素によるアポトーシスの抑制効果を解析した。FNK 遺伝子の導入により、アポトーシスおよびカスパーゼ活性の誘導が抑えられることが判明し、グルコース刺激試験により FNK 遺伝子の導入はインスリン分泌能を向上させることも明らかとなった。これらの結果から、AdK7 ベクターを用いた FNK 遺伝子導入により、膵島細胞のインスリン分泌能を障害することなく、過酸化水素によって誘導されるアポトーシスを抑制できることが示された。

本研究において、細胞移植治療において問題となっていた、膵島細胞のアポトーシスを防御する新たな遺伝子導入技術が示された。本法の治療への応用に関しては、今後、生体レベルでの検証が必要となるが、その前段階として培養細胞レベルでの効果を証明できたことは極めて重要であり、臨床医学的に価値の高い研究であると評価できる。本研究は未発表論文であるが、近日中に学術雑誌への投稿を予定している。学位論文としてより理解しやすい内容とするために、審査会においていくつかの助言・意見が指摘されたが、審査内容に記載したように、これらの助言・意見に対して、適切な改訂が行われた。したがって、本審査会はこの論文を学位論文に相応しいものと評価する。

論文審査委員	主査	小林 和人
	副査	工藤 明宏
	副査	井上 直和