

学位論文 博士 (工学)

レーザー誘起応力波による遺伝子導入法を用いた
脊髄損傷モデルラットの運動機能改善

2012 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

安藤 貴洋

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 第 号	氏 名	安藤 貴洋
主 論 文 題 目： レーザー誘起応力波による遺伝子導入法を用いた 脊髄損傷モデルラットの運動機能改善			
(内容の要旨) 脊髄損傷は、交通事故やスポーツ外傷などに伴って脊柱に強い外力が加わり、脊髄実質が損傷する病態である。現在、日本には約 10 万人の患者がいるとされているが、若年層の患者も多く、長年にわたる麻痺による日常生活の不自由と精神的負担を余儀なくされている。しかし、神経組織の再生能の低さから現在までに脊髄損傷によって失われた機能を回復するための有効な治療法は確立されていない。期待される治療法の一つとして、遺伝子治療が近年注目を集めている。ただし中枢神経系を対象とするため、根幹技術となる遺伝子導入技術には特に高い安全性、精密性、および時間的制御性が求められる。それに加えて、脊髄は管状の椎骨で囲まれた神経組織であるため、生体深部まで治療遺伝子を導入できる技術が必要である。 レーザーを用いる遺伝子導入法は、エネルギーの空間的・時間的制御性が高いことに加えて、光ファイバを用いることにより、臨床現場において操作性に富む経カテーテル的遺伝子治療を実現できるといった特長を備えている。中でも、固体材料へのパルスレーザー照射によって発生するレーザー誘起応力波(laser-induced stress wave, LISW)を用いた遺伝子導入法は、一度の適用で導入できる細胞数が多く、応力波が光よりも散乱が少なく生体内を伝搬するため深部組織への適用が可能である。 本研究は、LISW による遺伝子導入技術を用いた脊髄損傷の遺伝子治療を目的として行われたものである。本論文は次の 6 章で構成されている。 第 1 章は序論である。最初に脊髄損傷に対する現行の治療法と期待されている遺伝子治療について概説する。次いで、遺伝子治療の根幹技術となる遺伝子導入法の研究動向と技術的課題を明確にした上で、本研究の目的と意義を述べている。 第 2 章では、LISW の発生および伝搬理論について述べた後、脊髄の模擬組織を用いて行った LISW の伝搬特性計測の結果と考察を示している。脊髄への標的部位選択的な遺伝子導入を達成するために必要な圧力伝搬特性が得られていることを明らかにした。 第 3 章では、健常ラットの脊髄組織を対象とした、LISW によるレポーター遺伝子の導入結果について述べる。その遺伝子発現の特性から、発現効率のレーザーパラメータ依存性、発現部位の標的性、発現細胞種、さらに本遺伝子導入技術の安全性を評価した。 第 4 章では、第 3 章で得られた遺伝子発現特性に基づき、脊髄損傷モデルラットを対象にグリア瘢痕の形成を抑制する遺伝子を導入し、その運動機能に関する評価した。グリア瘢痕形成の一端を担う中間径フィラメントタンパク質の抑制効果に加えて、組織学的な評価を行い、遺伝子治療後の機能改善を多角的に検証した。 第 5 章は、LISW による脊髄損傷の遺伝子治療技術を臨床現場で応用するための、光ファイバを用いた経カテーテル的遺伝子導入デバイスの開発について述べている。 第 6 章は本研究の結論である。本研究の成果を総括し、今後の展望を述べている。			

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Integrated Design Engineering	Student Identification Number	SURNAME, First name ANDO, Takahiro
Title <p style="text-align: center;">Laser-induced stress wave-driven gene transfection for restoration of locomotive function after spinal cord injury in rats</p>		
Abstract <p>Spinal cord injury (SCI) refers to damage to the spinal cord resulting from traffic accidents, falls, sports or other accidents. SCIs cause loss of autonomic, sensory and motor functions, and recovery of these functions cannot be expected due to the difficulty in tissue regeneration of the central nervous system (CNS). Thus, SCI patients are left with serious residual disabilities, such as respiratory difficulty, chronic pain, and neurologic decline, leading to a considerable decrease in quality of life. Unfortunately, no effective therapeutic treatment for SCI has been established. As a promising treatment for SCI, gene therapy has been attracting much attention. For successful gene therapy of SCI, however, it is necessary to develop a safe and efficient method for delivering foreign therapeutic genes into the injured spinal tissue with high spatiotemporal accuracy. In addition, the method requires the ability to treat deep-located tissue, because a spinal cord is protected and surrounded by a vertebral column.</p> <p>Laser-mediated gene transfer has a great potential to achieve targeted gene transfection because of the high spatial controllability of laser energy. Furthermore, since laser energy can be transmitted through an optical fiber, catheter-based gene transfer may come into practical use. Lasers have been mainly used for direct irradiation of cells or tissue to perforate the cell membrane for gene delivery. However, this approach is not applicable to deep tissues, because the optical penetration depth is limited. Gene can also be transferred by use of laser-induced stress waves (LISWs) which are generated by irradiating a solid target with nanosecond pulsed laser. By using LISWs, many cells can be transfected simultaneously and deeper tissues can be treated, since the stress waves can propagate much more efficiently in the optically highly scattering tissues than the laser light. These characteristics are greatly advantageous to LISWs to treat SCI, because local gene expression is required especially in the CNS to avoid unnecessary gene expression in the uninjured sites. The goal of this dissertation is to achieve therapeutic treatment of SCI by using LISW-mediated gene transfection. This dissertation consists of six chapters.</p> <p>Chapter 1 presents an overview of existing therapeutic strategies for SCI, including gene therapy. Next, the technical development of gene transfection methods and the potential issues are reviewed, and then the objective of this study is described.</p> <p>Chapter 2 describes the physics of the generation and propagation of LISWs, and measurement of the physical characteristics of LISWs in phantoms mimicking the acoustic properties of spinal cord.</p> <p>Chapter 3 describes the experiment of reporter gene transfer to rat spinal cords. Properties of the gene expression such as the dependence of transfection efficiency on the laser parameters, site-selectivity of gene expression, and the safety of LISW-driven gene delivery into the spinal cord are presented.</p> <p>Chapter 4 presents the transfer of silencing genes for glial scar formation into the injured spinal cords of rats to study the restorative effect of locomotive function after trauma. The experimental results for promoting axonal growth, such as silencing of the glial proteins and decrease of the cavity area in the injured spinal cords, are described.</p> <p>Chapter 5 describes the development of an optical fiber-based gene transfer system for endoscopic application of LISW-mediated gene therapy of SCI.</p> <p>Chapter 6 is the conclusion of this dissertation. The results of this study are summarized and the future perspective is given.</p>		