

氏 名	あお やま てる よし 青 山 輝 義
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2608 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Improvement of technology for non-viral gene delivery system using DNA-cationized gelatin complex (カチオン化ゼラチンを用いた非ウイルス性ベクター遺伝子発現効率の改善)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 清 水 章 教 授 小 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

先天性遺伝子疾患や悪性腫瘍などをターゲットとする遺伝子治療に向けてウイルス性および非ウイルス性ベクターの開発が精力的になされている。ウイルス性ベクターは高い遺伝子発現効率をもつが日常的臨床応用に供するにはいくつかの障害がある。一方、非ウイルス性ベクターはウイルス性ベクターにくらべて、抗原性や細胞毒性は低く、医療材料として用いられてきた実績からも汎用性は高いと考えられる。さらに導入する遺伝子サイズにも制限はなく、化学的修飾も比較的容易である。このようにウイルス性ベクターにくらべて多くの利点があるものの、その遺伝子発現効率はきわめて低いといわざるをえない。今研究では非ウイルス性の遺伝子ベクターの低い発現効率を改善するために、ドラッグデリバリーシステムの技術を用いて二つのアプローチを試みた。すなわち、物理的刺激(超音波)と遺伝子徐放システムである。

1. 物理刺激(超音波)による遺伝子発現効率の増強効果

非ウイルス性ベクターとしては、食品ならびに医薬品の使用の歴史より生体安全性が高いと考えられる生体吸収性高分子のゼラチンを用い、これにアミノ基を導入してカチオン化ゼラチンを作製した。LacZ 遺伝子をもつ pSV-LacZ とカチオン化ゼラチンの複合体水溶液を DDY マウスの大腿筋に注射後、各時間経過後に超音波を照射した。一定期間後、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。超音波照射群で β -ガラクトシダーゼ活性は有意に上昇し、2日目まで遺伝子発現は増強した。超音波を照射しない群では、12時間後以後はほとんど発現量に変化は見られなかった。

超音波の照射による生物学的な影響は、温熱作用、キャビテーション現象、直接の機械的な作用の3つに分けることができる。この遺伝子導入実験系では温熱作用ではなく、細胞膜の透過性を亢進させるキャビテーション現象が主要なメカニズムではないかと考えられる。

2. 徐放システムを用いた遺伝子発現の改善と治療効果

ゼラチンマイクロスフェアをプラスミド DNA の徐放担体として用いて、局所における発現の改善を試みた。ラジオアイソトープによる検討ではゼラチンの生体内分解と共にプラスミド DNA が徐放されたことが示され、pSV-LacZ による発現の検討ではプラスミド DNA 単独に比べて発現期間が有意に延長していた。さらにこのシステムを用いて、マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MMP-1) をコードする遺伝子をもつプラスミド DNA (pCMV-MMP-1) を、糖尿病モデルマウスの腎硬化症の予防効果を検討した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、ゼラチンマイクロスフェアのみ、pCMV-MMP-1 溶液、pCMV-MMP-1 含有ゼラチンマイクロスフェアを C57Bl6 マウス腎皮膜下に投与後、7日目にストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内注射して糖尿病を誘導した。STZ 注後、28日目にマウスを犠牲させ、腎機能および組織切片を評価した。pCMV-MMP-1 含有ゼラチンマイクロスフェア投与群では、血中尿素窒素は PBS 投与群に比べ有意に改善し、マッソントリクローム染色による観察ではマウス腎組織の線維化も抑制された。マウス腎組織中のハイドロキシプロリン定量によると、pCMV-MMP-1 投与群と pCMV-MMP-1 含有ゼラチンマイクロスフェア投与群で、PBS 投与群に比べ組織中の線維量が有意に少なかった。非ウイルス性ベクターであるカチオン化ゼラチンによるプラスミド DNA の遺伝子発現効率を超

音波、徐放システムで改善させることができた。徐放システムでは腎硬化症の治療実験においても有効性が確認された。

この二つの技術は生体安全性、非侵襲性、毒性、コストの面などで有利であり、遺伝子治療の臨床応用に向けた有望な手段であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、遺伝子治療に用いるベクターとして非ウイルス性ベクターであるカチオン化ゼラチンを用い、ドラッグデリバリーシステムの技術を利用して二つのアプローチ、すなわち、物理的刺激（超音波）と遺伝子徐放システムによって遺伝子発現効率の改善を試みたものである。

まず、LacZ 遺伝子をもつ pSV-LacZ とカチオン化ゼラチンの複合体水溶液をマウス大腿筋に注射後、超音波を照射し、一定期間後、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。超音波照射群で β -ガラクトシダーゼ活性は有意に上昇し、2日目まで遺伝子発現は増強した。超音波を照射しない群では、12時間後以後はほとんど発現量に変化は見られなかった。

次にゼラチン粒子をプラスミド DNA の徐放担体として用いて、局所における発現効率の改善を試みた。ラジオアイソトープによる検討ではゼラチンの分解と共にプラスミド DNA が徐放されたことが示され、発現の検討ではプラスミド DNA 単独に比べて発現期間が有意に延長していた。さらにこのシステムを用いて、マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MMP-1) の遺伝子をもつプラスミド DNA を、糖尿病モデルマウスの腎硬化症の予防効果を検討した。予防群では血中尿素窒素は非投与群に比べ有意に改善し、組織学的検討、腎組織中 I 型コラーゲン量でも線維化の抑制が認められた。

以上の研究は、非ウイルス性ベクターの遺伝子治療へ向けての有用性および臨床応用への実現性を高めるのに寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年2月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。