

## (論文内容の要旨)

本論文は、多糖からなる遺伝子発現のための非ウイルスキャリアの創製とそのキャリアによる遺伝子改変細胞の移植治療効果について調べ、その研究成果をまとめたものであり、2部8章からなっている。

緒言では、多糖からなる非ウイルスキャリアとプラスミド DNA との複合体の物理化学的および生物学的性質と遺伝子発現レベルとの関係、ならびにそれらの複合体を用いて遺伝子改変した細胞の移植治療効果を調べる実験の必要性を概説し、研究目的とその背景、および本論文の概説が述べられている。

第1部では、多糖キャリアの物理化学的性質および遺伝子導入時の培養方法が遺伝子発現レベルに与える影響について調べている。

第1章では、スペルミンをプルラン、デキストラン、あるいはマンナンへ化学導入したカチオン化多糖を作製した。カチオン化多糖-プラスミド DNA 複合体の見かけの分子サイズおよびゼータ電位は、多糖の種類によらず同程度であった。一方、複合体とのレクチンとの相互作用の強さは多糖の種類に依存した。カチオン化多糖-プラスミド DNA 複合体による遺伝子発現レベルは用いた多糖の種類あるいは細胞の種類に依存することがわかった。

第2章では、異なるアミン化合物をデキストランへ化学導入したカチオン化デキストランを作製した。カチオン化デキストランを酸塩基滴定したところ、その中性領域での pH 緩衝能はアミノ化合物の種類に依存した。カチオン化デキストラン-プラスミド DNA 複合体による遺伝子発現レベルは、アミン化合物の種類に依存することがわかった。

第3章では、分子量の異なるプルランへスペルミンを化学導入したカチオン化プルランを作製した。カチオン化プルラン-プラスミド DNA 複合体の見かけの分子サイズ、ゼータ電位、およびレクチンとの相互作用の強さは、プルランの分子量により変化した。カチオン化プルラン-プラスミド DNA 複合体による遺伝子発現レベルは、プルランの分子量に依存することがわかった。

第4章では、スペルミンの導入率の異なるカチオン化プルランを作製した。カチオン化プルラン-プラスミド DNA 複合体の見かけの分子サイズ、ゼータ電位、およびレクチンとの相互作用の強さは、プルランへのスペルミン導入率により変化した。カチオン化プルラン-プラスミド DNA 複合体による遺伝子発現レベルは、プルランへのスペルミン導入率に依存することがわかった。また、最も高い遺伝子発現レベルを示すスペルミン導入率は、プルランの分子量により異なることがわかった。

第5章では、カチオン化プルラン-プラスミド DNA 複合体を、細胞接着タンパク質とともに培養基材表面へコーティングした。その基材に骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を播種、遺伝子導入を行った (リバーストランスフェクション)。リバーストランスフェクションは、通常の遺伝子導入法と比較して、遺伝子発現レベルおよび期間をそれぞれ有意に増強および延長させることがわかった。

第2部では、カチオン化多糖-遺伝子複合体を用いて遺伝子改変した細胞の治療効果を疾患動物モデルを用いて評価している。

第6章では、カチオン化プルランを用いて抗アポトーシス作用をもつアドレノメデュリン (AM) をコードするプラスミド DNA を MSC へ導入、遺伝子改変した。AM 遺伝子改変 MSC は AM を分泌し、元の MSC に比べて、低酸素条件下でその生存率の高いことがわかった。AM 遺伝子改変 MSC を急性心筋梗塞モデルラットの心筋内へ移植したところ、MSC 移植治療群に比べて、移植治療効果が有意に改善していることがわかった。

第7章では、カチオン化デキストランを用いて抗腫瘍効果をもつ NK4 をコードするプラスミド DNA を、腫瘍部位集積能をもつマクロファージ (M $\phi$ ) へ導入、遺伝子改変した。NK4 遺伝子改変 M $\phi$  から NK4 が分泌されることがわかった。NK4 遺伝子改変 M $\phi$  を腫瘍モデルマウスの尾静脈内へ投与したところ、M $\phi$  は腫瘍組織中へ集積することが確認された。さらに、NK4 遺伝子改変 M $\phi$  投与群では、M $\phi$  投与群と比較して、有意に腫瘍増殖を抑制することがわかった。

第8章では、カチオン化デキストランを用いて抗腫瘍効果をもつ IL-12 をコードするプラスミド DNA を免疫担当細胞である樹状細胞 (DC) へ導入、遺伝子改変した。IL-12 遺伝子改変 DC は IL-12 を分泌していた。IL-12 遺伝子改変 DC を腫瘍モデルマウスの腫瘍内へ投与したところ、DC 投与群と比較して、抗腫瘍免疫反応が活性化され、有意に腫瘍増殖を抑制することがわかった。

以上のことから、多糖より作製した非ウイルスキャリアは、細胞へ効率よく遺伝子導入ができることがわかった。遺伝子発現レベルは、カチオン化多糖の物理化学的性質および生物学的性質だけでなく、細胞培養の方法にも依存することがわかった。カチオン化多糖で遺伝子改変した細胞は、その生物機能が増強されており、各種疾患に対する高い治療効果を示すことがわかった。

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、多糖からなる遺伝子導入のための非ウイルス性キャリアの創製とそのキャリアによる遺伝子改変細胞の治療効果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

多糖およびアミン化合物の種類、多糖の分子量、およびアミン化合物の導入率の異なるカチオン化多糖を作製した。得られたカチオン化多糖を用いて遺伝子導入を行った結果、

1) 多糖の種類(プルラン、デキストラン、およびマンナン)あるいは細胞の種類によって遺伝子発現レベルが異なること、2) アミン化合物の種類が遺伝子発現レベルに影響を与え、スペルミンが最も高い遺伝子発現レベルを示すこと、3) プルランの分子量が遺伝子発現レベルに影響を与え、分子量 47,300 のプルランが最も高い遺伝子発現レベルを示すこと、および 4) 多糖へのアミン化合物の導入率が遺伝子発現レベルに影響を与え、最も高い遺伝子発現レベルを示すスペルミン導入率は、分子量により異なることを明らかにした。また、カチオン化プルラン-遺伝子複合体を、細胞接着タンパク質とともに培養基材表面へコーティングした。その基材に骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を播種する遺伝子導入培養法を行った結果、5) 遺伝子導入培養の方法が遺伝子発現レベルに影響を与えることを明らかにした。

カチオン化多糖を用いた遺伝子改変細胞による移植治療を行った結果、

6) 抗アポトーシス作用をもつアドレノメデュリン遺伝子で改変したMSCは、急性心筋梗塞に対する治療効果を増強すること、7) 抗腫瘍効果をもつNK4遺伝子で改変したマクロファージは、腫瘍に対する治療効果を増強すること、および 8) 免疫反応性の抗腫瘍効果をもつインターロイキン 12 遺伝子で改変した樹状細胞は、腫瘍に対する治療効果を増強することを明らかにした。

以上、本論文は、細胞の遺伝子導入のための非ウイルス性キャリアのデザインおよび遺伝子改変細胞による治療に関して重要な基礎的知見を得たものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学術論文として価値があるものと認める。また、平成 21 年 2 月 23 日、論文内容とそれに関連した事項についての試問を行った結果、合格と認めた。