

(論文内容の要旨)

遺伝子発現解析やプロテオーム解析による様々な疾患の関連遺伝子の同定が進み、遺伝子・分子レベルの知見に基づく論理的な新規薬物治療法の開発が推進されている。こうした潮流の中で、培養細胞に対する遺伝子やオリゴ核酸導入技術は汎用的に利用される基盤技術となり、標的遺伝子の強制発現や発現抑制に基づく疾患機構解明や治療標的分子の同定等に貢献している。一方、疾患状態における生体内の多様な細胞間相互作用を考慮した個体を対象とする研究の進展や、研究成果の遺伝子治療・核酸医薬品への結実には、インビボにおける遺伝子発現制御を目的とした核酸導入技術の開発が必要不可欠である。既にリコンビナントウイルスやカチオン性リポソームを用いた方法が報告されているものの、多くの標的臓器に対して、導入技術の蓄積や副作用等に関する情報の収集は、共に不足している。

プラスミドDNA溶液をマウスに尾静脈内注入後腹部を圧迫すると、顕著な肝障害なく肝臓において導入遺伝子の高効率な発現が得られる現象がこれまでに報告されている。申請者は、本現象の応用による多様な臓器に対する遺伝子発現制御法の確立を目的として、プラスミドDNA並びにsiRNAを対象とした導入による遺伝子発現制御の特性評価、圧力の定量と制御、外来遺伝子発現の支配機構などに関する検討を行うと共に、一般的な核酸導入法において主要な副作用となる炎症反応に対する評価も行い、本方法が有効な核酸導入法であることを示して組織押圧核酸導入法と命名した。

第1章 組織押圧核酸導入法に基づく臓器特異的遺伝子発現制御

腎臓に関してはアルポート症候群等の先天性疾患や糖尿病性腎症に代表される慢性疾患のように根治療法の無い疾患が多く存在し、医学研究並びに医療上重要な臓器となっているが、汎用的に利用可能な遺伝子導入法は確立されていない。従来行われてきたリコンビナントウイルスや合成キャリアを利用した腎臓への遺伝子導入においては、組織細胞との接触時間確保のため比較的長時間の血流遮断が必須であり虚血再灌流傷害の懸念があることから、一過性の細胞膜透過性亢進を導入機構とする物理刺激を利用したプラスミドDNA導入法の確立が有効な戦略と考えられる。プラスミドDNA溶液をマウス尾静脈内注入後、標的臓器（腎臓）に対し、圧力を加える簡便な手技に基づく組織押圧核酸導入法による外来遺伝子発現特性を、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして評価した。その結果、本方法による遺伝子発現は腎臓特異的に広範囲から得られ、そのレベルは高い発現効率が報告されている腎臓に対する電気穿孔法や、リコンビナントアデノウイルス静脈内投与後の肝臓や脾臓での発現に匹敵することが示唆された。この際加えた圧力の定量と制御による遺伝子発現レベルとの相関の検討から、1秒間、1回、約0.6 N/1 cm²程度の低い加圧により安定した高発現が得られることが分かった。また、腎機能の指標である血中尿素窒素やクレアチニン値は非処置群と同等であった。以上、本方法により腎機能に影響を与えることなく、効果的に腎臓特異的に遺伝子発現を得ることが可能であることが示され、合わせて、本方法が脾臓における特異的遺伝子強制発現、また、siRNA導入による腎臓、肝臓、脾臓における配列特異的遺伝子発現抑制に向けて適用を拡大することが可能であることが明らかとなった。

第2章 組織押圧核酸導入法に基づく外来遺伝子発現の支配機構に関する検討

インビボ遺伝子導入に基づく外来遺伝子発現において、体内動態、細胞内取り込み、転写等がその効率に影響を及ぼす重要な素過程であり、各遺伝子導入法ではこれらの段階を制御することによって、遺伝子発現が達成されていると考えられる。そこで、腎臓及び肝臓を対象として、組織押圧核酸導入法に基づく外来遺伝子発現現象における支配機構に関し検討を行った。まず、放射標識体を用いた動態解析により、組織押圧核酸導入法による投与後のプラスミドDNAの臓器分布には通常の静脈内投与と比較して大きな差が無いことが明らかとなった。一方で、組織押圧核酸導入法による遺伝子発現は、押圧のタイミングに依存し、先に押圧しその1分後にプラスミドDNAを静脈内投与した場合の遺伝子発現レベルが顕著に低下したことから、一過性の細胞膜透過性亢進が関与していることが示唆された。また、高水圧遺伝子導入法において、遺伝子高発現へのその活性化の寄与が最近報告された転写因子AP-1構成タンパクの遺伝子であるc-fos、c-junのmRNA量を測定した結果、それぞれ一過性に約20倍、約5倍増加した。以上の結果より、組織押圧核酸導入法においては、主に細胞内取り込み過程並びに転写過程の亢進により高効率な遺伝子導入が達成されるものと考察された。

第3章 組織押圧核酸導入法及び他の非ウイルス性核酸導入法における炎症性副作用の評価

近年、インビボ核酸導入が誘導する炎症性副作用が、治療効果や導入遺伝子発現に与える影響が報告され、核酸導入を総合的に評価することの重要性に対して認識が高まっている。そこで、組織押圧核酸導入法が与える炎症性副作用の評価を目的として、炎症性サイトカイン、血球成分の組織への浸潤に関わるケモカインや接着分子の産生について、他の非ウイルス性核酸導入法と比較した。まず、代表的な炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6、IL-12、IFN- γ については、腎臓・肝臓・脾臓を標的とした組織押圧核酸導入法において顕著な産生が見られなかった。一方で、対照とした電気穿孔法においては、TNF- α 、IL-12、IFN- γ レベルは非処置群と同等であったが、IL-6は一過性の顕著な増加を示した。このIL-6産生は電気穿孔法の手技に依存し核酸非依存的であり、従来 Toll-like receptor 依存的な経路が活性化されにくく、炎症性サイトカイン産生が低いと考えられてきた物理刺激による核酸導入においても、的確な評価を行うことによって問題を抽出できることが示された。さらに、組織押圧核酸導入法においてもケモカインMIP-2、接着分子ICAM1、VCAM1のmRNA量の一過性の僅かな上昇が見られたが、これらはカチオン性リポソームやポリエチレンイミンを利用した導入、高水圧遺伝子導入法、電気穿孔法と比較し低度であった。以上、組織押圧核酸導入法が他の非ウイルス性核酸導入法と比較して、炎症性副作用の誘導効果が低いことが明らかとなった。

以上、申請者は、臓器特異的な遺伝子発現の制御を目的として、新しい技術である組織押圧核酸導入法の開発に取り組み、系統的な検討から、本方法が、(i)簡便な手技、(ii)臓器特異的で高効率かつ広範囲への核酸導入、(iii)低い炎症性副作用という特性を兼ね備えた有効な核酸導入法であることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

近年、遺伝子発現解析やプロテオーム解析による各種疾患関連遺伝子の同定と得られた知見に基づく治療法の開発が進む中で、生体臓器を標的とする遺伝子やオリゴ核酸導入技術の開発が強く望まれている。しかし、既存の方法では対象臓器が限られ、副作用等に関する情報も十分には得られていない。申請者は、プラスミドDNA溶液をマウスに尾静脈内注入後腹部を圧迫することにより肝臓において導入遺伝子の高効率な発現が得られるとの報告に着目し、本現象を体系的に発展させることによって多様な臓器に対する遺伝子発現制御法を確立することを目的として、遺伝子発現制御の特性評価、圧力の定量と制御、外来遺伝子発現の支配機構などに関する検討と副作用となる炎症反応に対する評価を行い、本方法が有効な核酸導入法であることを証明して組織押圧核酸導入法と命名した。

腎臓は治療上極めて重要な臓器であるが、汎用的に利用可能な遺伝子導入法は確立されておらず、従来法では長時間の血流遮断が必須で虚血再灌流傷害の懸念があることから、一過性の細胞膜透過性亢進を導入機構とする物理刺激を利用したプラスミドDNA導入法の確立が有効な戦略と考えられる。そこで、組織押圧核酸導入法を腎臓に適用し外来遺伝子発現特性を評価した結果、遺伝子発現は腎臓特異的に広範囲から得られ、その発現効率は腎臓に対する電気穿孔法やリコンビナントアデノウイルス静脈内投与後の肝臓や脾臓での発現に匹敵することを確認した。また、操作、加える圧力と遺伝子発現レベルとの相関の検討から、1秒間、1回、約0.6 N/1 cm²程度の低い加圧が、最適条件となることを見出した。さらに、本方法は臓器機能に影響を与えず、多くの臓器に適用可能で、siRNA導入による配列特異的遺伝子発現抑制にも有用であることも明らかとなった。次に、インビボ遺伝子導入においては体内動態、細胞内取り込み、転写等が素過程となり、これらの制御によって遺伝子発現が達成されることが考えられることから、腎臓及び肝臓を対象として、組織押圧核酸導入法に基づく遺伝子導入の支配機構に関する検討を行った。放射標識体を用いた動態解析により、組織押圧核酸導入法による投与後のプラスミドDNAの臓器分布には通常の静脈内投与と比較して大きな差が無いことを確かめ、一方、組織押圧核酸導入法による遺伝子発現では、押圧のタイミングが重要で先に押圧しその1分後にプラスミドDNAを静脈内投与した場合の遺伝子発現レベルが顕著に低下したことから、一過性の細胞膜透過性亢進の関与が示唆された。また、高水圧遺伝子導入法において、活性化の寄与が最近報告された転写因子AP-1構成タンパクの遺伝子であるc-fos、c-junのmRNA量を測定した結果、それぞれ一過性に約20倍、約5倍増加していることを見出し、組織押圧核酸導入法においては、主に細胞内取り込み過程並びに転写過程の亢進により高効率な遺伝子導入が達成されるものと結論した。最後に、近年、インビボ核酸導入が誘導する炎症性副作用が治療効果や導入遺伝子発現に影響を与えることが報告されていることから、組織押圧核酸導入法による炎症性サイトカインや血球成分の組織への浸潤に関わるケモカインや接着分子の産生を調べ、代表的な炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6、IL-12、IFN- γ については、腎臓・肝臓・脾臓を標的とした組織押圧核酸導入法において顕著な産生が見られなかったのに対し、電気穿孔法においてはIL-6の顕著な増加が認められたことから、炎症性

副作用の誘導効果が低いことを明らかにした。

以上、申請者は、臓器特異的な遺伝子発現の制御を目的として、新しい技術である組織押圧核酸導入法の体系的な開発に取り組み、本方法が、簡便な手技、臓器特異的で高効率かつ広範囲への核酸導入、低い炎症性副作用という特性を兼ね備えた有効な核酸導入法であることを証明した。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成21年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。