

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	張 凱琳
論文題目	Development of histidine-modified gene carriers for improving transfection via enhanced endosomal escape		
(論文内容の要旨)			
<p>Endosomal/lysosomal escape is one of the important issues in the development of nonviral gene carriers. When carriers are taken up by cells with endocytosis, gene would move from endosomes to lysosomes, where gene might be degraded by the enzymes inside. Chitosan is one of the potential carriers with high biocompatibility, and attracts great interest of chitosan in pharmaceutical application as carriers not only for DNA, but also for antibiotics, proteins, peptide drugs or vaccines. However, slow endosomal escape becomes major obstacles in the development of gene carriers using chitosan. One of the strategies to enhance the escaping from endosomes is to use pH buffering moieties. By increasing the pH of endosomes and lysosomes, the H⁺-ATPase pump on the membrane of endosomes and lysosomes would introduce more hydrogen ions inside and cause the increase of the osmotic pressure, resulting in the breakage of the endosomes or lysosomes. Histidine, an amino acid which has pKa around the pH range in endosomes and lysosomes, has the ability to buffer the pH. The biocompatibility of histidine is another advantage as a modification group.</p> <p>In this study, histidine-cysteine methyl ester and lysine-histidine dendrons (KH dendrons) were designed and conjugated to chitosan in order to optimize the gene transfection efficiency of chitosan/plasmid DNA (pDNA) complexes.</p> <p>Chapter 1. Evaluation of histidine-modified chitosan as a endosome-escapable gene carrier</p> <p>At first, the gene transfection efficiency of chitosan/pDNA complexes after histidine modification was evaluated. I designed histidine-cysteine methyl ester dipeptide for conjugation with chitosan. Chitosan and histidine-cysteine methyl ester were linked through disulfide bonds provided by 2-iminothiolane. The complexes were prepared by mixing chitosan or histidine-modified chitosan with pDNA. A broader buffering range of histidine-modified chitosan was observed and the cellular uptake of histidine-modified chitosan (Chi-CH)/pDNA complexes was higher than that of chitosan/pDNA complexes. Although chitosan/tetramethylrhodamine (TMR)-pDNA complexes were trapped in the endosomes or lysosomes in confocal microscopic images, TMR-pDNA was more widely distributed in the cytosol when it was carried by Chi-CH. This result suggests that histidine can help the escape of pDNA with the assistance of the high buffering capacity. The gene expression of Chi-CH/pDNA complexes was higher than that of chitosan/pDNA complexes. These results suggest that histidine modification improves the transfection efficiency of chitosan.</p> <p>Chapter 2. Analysis of endosomal escape with lysine-histidine dendron-modified fluorescent nanoparticles</p> <p>The result of gene transfection efficiency in Chapter 1 suggested that large amount of histidine should be necessary for strong enhancement of endosomal escape. In order to increase the number of conjugated histidine, I designed lysine-histidine dendrons (KH dendrons) for the purpose to increase the number of conjugated histidine. The dendritic structure, which keeps the primary</p>			

amino groups and the imidazole groups in histidine at the same time, has more positive charges for nucleic acid binding and larger buffering capacity for endosomal escape. Therefore, the 2nd, 3rd, and 4th generations of KH dendrons (2GD, 3GD, and 4GD) were synthesized as new endosomal escapable moieties. These KH dendrons were conjugated to AminoSpark680 fluorescent nanoparticles through disulfide bonds. Each generation of KH dendron-modified fluorescent nanoparticles has the similar amount of histidines. The result of pH titration shows that the 4GD-modified fluorescent nanoparticles have the largest buffering capacity compared with other KH dendron-modified fluorescent nanoparticles based on the same amount of fluorescent nanoparticles. Although the buffering capacity of KH dendrons could be measured by pH titration, the relationship between the data obtained from titration and the endosomal escape rate is still needed to be established. The purpose of this study is to develop a new method for the evaluation of endosomal escape of three generations of KH dendrons by live cell imaging. I observed the overlapping ratio of KH dendrons modified-fluorescence nanoparticles and LysoTracker labeled-lysosomes in HeLa cells using time-lapse imaging measured by confocal microscopy. The 4GD-modified fluorescent nanoparticles show the lowest overlapping with lysosomes among non-modified, 2GD-modified, and 3GD-modified fluorescent nanoparticles, which matched the buffering capacity measured by pH titration. This result suggests that 4GD could be a good modification group for efficient endosomal/lysosomal escape.

Chapter 3. Enhancement of gene transfection efficiency by lysine-histidine dendron modified-chitosan

In order to further increase the gene transfection efficiency of chitosan/pDNA complexes, I selected the 4GD to conjugate with chitosan based on the time-lapse imaging data obtained in Chapter 2. Chitosan-dendron (Chi-D) was synthesized by a crosslinker, 2-iminothiolane. The conjugation of KH dendron and chitosan was confirmed by NMR and ninhydrin test. The broader buffering range measured by pH titration was observed in Chi-D compared with chitosan. The stability of pDNA complexes with Chi-D was confirmed by agarose gel electrophoresis. The zeta potential of Chi-D/pDNA complexes was higher than chitosan/pDNA complexes. The gene transfection efficiency of Chi-D/pDNA was about three-fold higher than that of chitosan/pDNA. The intralysosomal pH of HEK293 cells after Chi-D/pDNA administration measured by FITC-Dextran was also higher than that after chitosan/pDNA administration. Chi-D/pDNA complexes show no significant difference from chitosan/pDNA concerning cell damage. Thus, KH dendron modification improved the gene transfection efficiency of chitosan/pDNA complexes.

In conclusion, chitosan modified with histidine makes stable complexes with pDNA and shows high gene transfection efficiency comparing with original chitosan. The improvement of buffering capacity provided by histidines would be the factor which enhances the endosomal/lysosomal escape, and increases the possibility of gene to enter nuclei and expression.

(論文審査の結果の要旨)

非ウイルス性キャリアを用いた遺伝子導入において、目的遺伝子を効率よく細胞へ導入するためには、細胞内への取り込み過程、酵素による分解、エンドソームからの脱出、核への移行など種々の障害を克服しなければならない。現在開発されているキャリアの多くは、エンドサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれるため、エンドソーム、リソソームへの移行過程における酵素分解が目的遺伝子の導入効率の低下の原因となる。申請者は、優れた生体親和性を有し遺伝子導入キャリアとしてヒトへの応用が期待されるものの遺伝子導入効率の低さが問題となるキトサン(Chi)を対象として、生体親和性を保持しながらエンドソームからの脱出効率を高めることを目的に、側鎖にイミダゾイル基を有し酸性条件下において水素イオンを捕捉することによりエンドソーム内への水素イオンおよび塩化物イオンの流入を促進し浸透圧を上昇させてエンドソーム膜を不安定化させるヒスチジン(His)を修飾分子として各種修飾体を合成し、プラスミドDNA(pDNA)との複合体を調製して遺伝子導入改善効果の評価およびその機構解析を行った。

最初に、ChiにHisを直接結合させる方法の開発に取り組み、システイン(Cys)とHisのジペプチド(C-H)を合成後Chiに結合させた(Chi-CH)。未修飾のChi pH 7.4では溶解しなかったが、Chi-CHは10 mg/mlまで溶解させることができた。また、滴定法により各種修飾率のChi-CHの緩衝能を評価した結果、CH修飾率が高いほど強い緩衝能が認められた。A/P比2~30におけるプラスミドDNA(pDNA)との複合体は安定で、HEK293細胞におけるホタル由来 luciferase を発現する pCMV-Luc による遺伝子発現量は、未修飾 Chi と比較して chitosan-CH との複合体が有意に高かった。

次に、pDNA との静電的相互作用および、より高い緩衝能の付加に必要なヒスチジンの1級アミノ酸を保存し、かつ1段階でより効率的にヒスチジン修飾を行うために、lysine-His dendrons (KH-D) を固相合成法により合成した。Chiに4世代のKH-Dを結合させKH-D修飾Chi(Chi-D)を得た。結合体は、滴定法による緩衝能評価において高い緩衝能を示し、HEK293細胞に対する遺伝子導入効率は、Chi-Dとの複合体がChi-CHの約13倍であった。またChi-Dによる遺伝子発現はプロトンポンプ阻害剤 bafilomycin A1により強く抑制され、HD修飾による遺伝子導入効率の増大にHis修飾によるエンドソームからの脱出促進が関与することが示唆された。

KH-Dでは末端のヒスチジンの第一級アミンとイミダゾールは結合に使われないため、核酸との結合に必要な正電荷および、エンドソームからの脱出を促進する高い緩衝能を保持することが期待できる。そこで、KH-Dの効果を細胞内の動態のレベルで確認するために、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる蛍光微粒子をKH-Dで修飾し、蛍光顕微鏡で経時的に粒子の動態を追跡し、画像データ解析によりエンドソーム脱出促進効果の評価を行った。世代数に応じた緩衝能を示す2, 3, 4世代のKH-D修飾蛍光微粒子を、同濃度含有する培地中でエンドソーム膜をLAMP-1-SGFPで標識したHeLa細胞を培養し、1 frame/5 min で生細胞イメージングを行ったところ、3, 4世代ではエンドソームから細胞質へ分

散する様子が観察された。そこで、得られた画像に対して、NIH Image J (plug in JACoP) を用いて、KH-D 修飾蛍光微粒子のエンドソーム脱出の定量的解析を行った結果、2 世代のKH-D で修飾した場合はエンドソーム内に滞留するのに対し、3, 4 世代の KH-D では、蛍光微粒子がより早くエンドソームから細胞質へ脱出したことが定量的に示された。

以上、申請者は Chi に対し、His をジペプチドまたは dendron の形で導入することにより、pDNA の遺伝子発現効率を増大させることができることを明らかにした。さらに、これらの効果が、エンドソームからの pDNA 複合体の脱出の促進に基づくことを示した。これらの知見は今後の遺伝子導入キャリアの開発の有用な情報を与えるものである。

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 年 月 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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：平成 年 月 日以降