

| | |
|----------|---|
| 氏名 | かな たに いさお 金 谷 勲 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (医 学) |
| 学位記番号 | 医 博 第 3078 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 19 年 3 月 23 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 | Efficient gene transfer by pullulan-spermine occurs through both clathrin- and raft/caveolae-dependent mechanisms (プルランスペルミンによる効率の良い遺伝子導入はクラスリン依存性およびラフト/カベオラ依存性の両方の経路による) |
| 論文調査委員 | (主 査) 教 授 清 水 章 教 授 小 柳 義 夫 教 授 武 藤 誠 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 遺伝子治療は次世代の医療として期待されているが、遺伝子導入のためのウイルスベクターはそれ自体の病原性や免疫原性が問題になっている。一方、非ウイルスベクターは安全性に優れるものの遺伝子導入効率が低い。そこで、本研究では多糖誘導体からなる新しい非ウイルスベクターを開発し、その有効性および機序を調べた。

【方法】 天然の多糖であるプルランの側鎖にスペルミンを導入した誘導体（プルランスペルミン）を作製した。各種細胞株に対する遺伝子導入効率は、ルシフェラーゼ遺伝子導入によるルシフェラーゼアッセイと GFP 遺伝子導入によるフローサイトメトリー法により測定し、毒性はテトラゾリウム塩（WST-8）法により評価し、これらを市販のカチオニックリポソーム（リポフェクタミン2000）と比較した。また、エンドサイトーシス阻害剤のうち、クラスリン介在性経路の阻害剤であるクロロプロマジン、ラフト-カベオラ介在性経路の阻害剤であるメチルβシクロデキストリンおよびフィリピンを用いて遺伝子導入効率の変化を調べた。さらに、蛍光標識したプルランスペルミンおよびプラスミド DNA を用いて遺伝子導入を行うことにより、細胞内での局在を調べた。最後に、膀胱癌細胞株 T24 に対して野生型 p53 遺伝子を導入、抗腫瘍効果を調べた。

【結果】 プルランスペルミンによる遺伝子導入効率はリポフェクタミン2000に比べて10倍から100倍高いものであった。リポフェクタミン2000による遺伝子導入がラフト-カベオラ介在性経路を阻害した時のみ低下したのに対し、プルランスペルミンによる遺伝子導入はクラスリン経路あるいはラフト-カベオラ経路のいずれを阻害しても低下した。プルランスペルミンおよびプラスミド DNA は核周辺に輸送され、一部のプラスミド DNA は核内に移行していた。以上の結果より、プルランスペルミンとプラスミド DNA の複合体がクラスリンおよびラフト-カベオラの両方を介した多種類のエンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、核周辺に集積、DNA のみが核内に移行するという機序が示唆された。また、プルランスペルミンによる野生型 p53 遺伝子導入により T24 の増殖は有意に抑制された。

【結語】 多糖誘導体からなる非ウイルスベクターは安全性、有効性ともに優れ、次世代遺伝子治療におけるツールとして期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

遺伝子治療は次世代の医療として期待されているが、遺伝子導入のためのウイルスベクターはそれ自体の病原性や免疫原性が問題になる。一方、非ウイルスベクターは安全性に優れるものの遺伝子導入効率が低い。本研究では多糖誘導体からなる新しい非ウイルスベクターを開発し、その有効性および機序を検討している。

まず天然の多糖であるプルランから誘導体（プルランスペルミン）を作製し、これを用いて各種膀胱癌細胞株に遺伝子導入を行い、その導入効率と毒性を評価した。その結果、プルランスペルミンによる遺伝子導入効率は市販のカチオニックリポソーム（リポフェクタミン2000）と比較して10倍から100倍高く、毒性も低いものであった。

次いで、各種阻害剤・蛍光物質を用いた実験により遺伝子導入の機序を検討した。この結果、プルランスペルミンとプラスミド DNA の複合体がクラスリンおよびラフトーカベオラの両方を介した多種類のエンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、核周辺に集積、DNA のみが核内に移行するという機序が示唆された。最後に、膀胱癌細胞株 T24 に対して野生型 p53 遺伝子を導入、抗腫瘍効果を調べたところ、プルランスペルミンによってのみ T24 の増殖は有意に抑制された。このことから、プルランスペルミンによる遺伝子導入は安全性、有効性ともに優れ、遺伝子治療におけるツールとして期待できるものであることが示された。

以上の研究は多糖誘導体ベクターによる遺伝子導入の機序の解明に貢献し、次世代の医療と言われる遺伝子治療の発展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みとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成19年1月31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。