

氏名	オラヌット タナケットバイサン Oranuch Thanaketpaisarn
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第584号
学位授与の日付	平成17年9月26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	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	Optimization of Nonviral Gene Delivery System for In Vivo Gene Therapy (In vivo 遺伝子治療実現に向けた非ウイルス型遺伝子デリバリーシステムの最適化に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 辻本 豪三

論 文 内 容 の 要 旨

治療上有効な in vivo 遺伝子治療の実現には、治療用遺伝子を標的部位に有効かつ安全に送達可能なベクターおよび投与方法の開発が必須である。しかしながら、最も安全な遺伝子導入法であるプラスミド DNA (pDNA) の組織・血管内注射では、治療に必要なレベルの遺伝子発現を得ることが困難であることから、遺伝子治療の実現には遺伝子発現の増大が必要不可欠である。癌治療を目的としたインターフェロン遺伝子導入、あるいは血友病に対する遺伝子治療においては、治療タンパク質の循環血中濃度が治療効果を決定する重要な要因であり、遺伝子発現細胞の種類は重要ではない。こうした条件下では、デリバリー効率および発現プロファイルを指標とした遺伝子導入臓器・細胞の選択が可能である。そこで本研究では、制御された電気パルスにより細胞膜に小孔を開けるとともに pDNA などの荷電分子の移動を促進するエレクトロポレーション (EP) 技術を採用し、これによる遺伝子デリバリーの改善ならびに発現の増大を試みた。また代表的な非ウイルスベクターであるカチオン性リポソーム/pDNA 複合体 (リポプレックス) の投与により転写因子 NF- κ B が活性化することを新たに見出し、pDNA に NF- κ B 結合配列を挿入することによる遺伝子発現の増大についても検討した。

I. エレクトロポレーションを利用した臓器特異的 in vivo 遺伝子デリバリー法の開発

肝臓は種々の遺伝性代謝疾患に対する治療標的臓器であるばかりでなく、臓器サイズが大きく血流が豊富であること、さらには細胞特異的ターゲティングに利用可能な細胞表面レセプターが存在することから、分泌タンパク質を対象とした遺伝子導入の標的としても魅力的である。そこで本章では、EP を利用した肝臓への高効率遺伝子デリバリー法の開発を試みた。肝臓選択的遺伝子導入ベクターであるガラクトース修飾カチオン性高分子と pDNA との複合体を静脈内投与したときの肝臓での遺伝子発現は、EP 適用により増大傾向が認められた。しかしながら EP による遺伝子発現の増大は pDNA 単独の場合に顕著であり、ベクター複合体と比較して有意に高い発現が得られた。そこで pDNA 単独投与時の発現特性を詳細に検討したところ、遺伝子発現は肝実質細胞で高く、EP 適用時の血漿中 pDNA 濃度に依存することが明らかとなった。一方、臓器障害性は低いことも示された。放射標識 pDNA を用いた体内動態に関する検討から、EP 適用により肝実質細胞への移行が増大することが明らかとなった。また pDNA を肝臓に注射した場合と比較して約25倍もの多くの細胞での発現が得られ、本投与方法が細胞内タンパク質補充を目的とした遺伝子治療にも有効である可能性が示された。以上より、血液中を循環する pDNA が電気パルスによって細胞内へ移行し、遺伝子発現が得られたものと考えられた。そこでこの方法による他臓器への遺伝子導入について検討したところ、腎臓および脾臓では肝臓同様、pDNA 静脈内投与と EP の組み合わせで高い遺伝子発現が得られた。しかしながら筋肉と皮膚では顕著な遺伝子発現増大は認められず、その一因として毛細血管構造の相違が考えられた。一方、pDNA 局所注射後に EP を適用した場合にはいずれの臓器においても遺伝子発現は増大し、特に筋肉では高い遺伝子発現の持続が観察された。

II. 遺伝子導入に対する生体反応を利用した遺伝子発現効率の増大

遺伝子発現は核に到達した pDNA 量と核での転写効率により決定される。非ウイルスベクターによる遺伝子導入では、

転写活性の高さからサイトメガロウイルス (CMV) プロモータが汎用される。リポプレックス投与時には腫瘍壊死因子などの炎症性サイトカインが産生されるが、これらサイトカインは転写因子 NF- κ B の活性化因子でもある。CMV プロモータには 4 個の NF- κ B 結合配列が存在することから、リポプレックスによる遺伝子発現には NF- κ B 活性化の関与が考えられる。そこで本章では、こうした遺伝子導入に対する生体反応を遺伝子発現効率の増大に利用することを目的に、まず遺伝子導入に対する生体反応の解明を試みた。CMV プロモータを持つ pDNA (pCMV-Luc) からなるリポプレックスを静脈内投与することで肺での遺伝子発現ならびに NF- κ B 活性化が認められた。リポ多糖の前投与により両者は増大し、NF- κ B 活性化と遺伝子発現との間に正の相関が得られた。そこでリポプレックスによる NF- κ B 活性化を最大限利用することを目的に、NF- κ B 結合配列が 5 個連続したフラグメントを pCMV-Luc に挿入することで新規 pDNA を構築した。得られた pCMV- κ B-Luc は NF- κ B との結合性が高く、リポプレックスとして投与することで有意に高い遺伝子発現が得られた。NF- κ B 配列の挿入による遺伝子発現増大効果は結腸癌細胞への遺伝子導入においても認められたことから、NF- κ B が活性化状態にある癌細胞への遺伝子導入にも本新規 pDNA が有効である可能性が示された。

以上、本研究では非ウイルス型遺伝子デリバリーシステムによる遺伝子発現効率を増大するために、EP を利用した臓器特異的 in vivo 遺伝子デリバリー法を開発し、その発現特性を明らかにした。また、リポプレックス投与により肺で NF- κ B が活性化することを見出し、この活性化を利用可能な新規 pDNA を開発することで、リポプレックス投与時の肺や癌細胞など NF- κ B が活性化状態にある細胞での遺伝子発現を増大することに成功した。これらの知見は非ウイルス型遺伝子デリバリーシステムの最適化による in vivo 遺伝子治療の実現に向けて有益な知見を提供するものとする。

論文審査の結果の要旨

治療上有効な in vivo 遺伝子治療の実現には、治療用遺伝子を標的部位に有効かつ安全に送達可能なベクターおよび投与方法の開発が必須である。最も安全な遺伝子導入法であるプラスミド DNA (pDNA) の組織・血管内注射では、治療に必要なレベルの発現を得ることが困難であるため、遺伝子治療の実現には遺伝子発現の増大が必要不可欠である。申請者は、遺伝子発現を増大可能な方法として、電気パルスにより細胞膜に小孔を開けるとともに pDNA などの荷電分子の移動を促進するエレクトロポレーション (EP) を採用し、これによる遺伝子デリバリーの改善ならびに発現の増大を試みた。

肝臓は遺伝性代謝疾患の治療標的臓器であることに加えて、臓器サイズが大きく血流が豊富であることから、分泌タンパク質を対象とした遺伝子導入の標的としても魅力的である。そこで肝臓での遺伝子発現に及ぼす EP の影響についての検討から、EP は、肝細胞選択的遺伝子導入ベクター複合体に適用する場合と比較して、pDNA 単独と併用することで大幅に遺伝子発現を改善することが示された。その発現特性を詳細に検討したところ、遺伝子発現は肝実質細胞で高く、EP 適用時の血漿中 pDNA 濃度に依存すること、また EP 適用により肝実質細胞への移行が増大することも明らかとなった。pDNA を肝臓に注射した場合と比較して約 25 倍もの多くの細胞での発現が得られたことから、本投与方法が細胞内タンパク質補充を目的とした遺伝子治療にも有効な投与方法になる可能性が示された。さらに、他臓器への遺伝子導入についての検討から、本投与方法が腎臓および脾臓に対しても有効であることが見出された。

代表的な非ウイルスベクターであるカチオン性リポソーム/pDNA 複合体 (リポプレックス) の投与時には腫瘍壊死因子などの炎症性サイトカインが産生されるが、これらのサイトカインは転写因子 NF- κ B の活性化因子でもある。非ウイルスベクターによる遺伝子導入に汎用されるサイトメガロウイルス (CMV) プロモータには NF- κ B 結合配列が存在することから、リポプレックスによる遺伝子発現には NF- κ B 活性化の関与が考えられる。そこで申請者は、遺伝子導入時の生体反応を利用することによる遺伝子発現の増大を目的に、まず CMV プロモータを持つ pDNA (pCMV-Luc) からなるリポプレックスの静脈内投与により肺で NF- κ B が活性化すること、また NF- κ B の活性化と遺伝子発現との間に正の相関があることを明らかにした。次に、この NF- κ B 活性化を最大限利用するために、NF- κ B 結合配列を挿入した新規 pDNA (pCMV- κ B-Luc) を開発し、これをリポプレックスとして投与することで有意に高い遺伝子発現を得た。NF- κ B 配列の挿入による遺伝子発現増大効果は結腸癌細胞への遺伝子導入においても認められたことから、NF- κ B が活性化状態にある癌細胞への遺伝子導入にも本新規 pDNA が有効である可能性を示した。

以上、申請者は、非ウイルス型遺伝子デリバリーシステムによる遺伝子発現効率を増大するために、EP を利用した臓器

特異的 *in vivo* 遺伝子デリバリー法の開発に成功するとともに、リポプレックス投与による肺での NF- κ B 活性化を有効に利用可能な新規 pDNA を開発することで、リポプレックス投与時の肺や癌細胞など NF- κ B が活性化状態にある細胞での遺伝子発現を増大することに成功した。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年9月12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。