

氏名	かた くら ひろ みち 片 倉 浩 理
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2742 号
学位授与の日付	平成 16 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	Improvement of retroviral vectors by coating with poly (ethylene glycol)-poly (L-lysine) block copolymer (PEG-PLL) (ポリエチレングリコール-ポリエルリジン・ブロックコポリマーによるレトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率の改善)
論文調査委員	(主査) 教授 松岡雅雄 教授 淀井淳司 教授 和田洋巳

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】レトロウイルスベクターは分裂細胞のみに取り込まれるという特徴があり、癌細胞へ選択的に遺伝子導入を行える利点がある。さらに導入遺伝子はゲノムに取り込まれるため、癌細胞が分裂増殖してもその情報は娘細胞へも伝えられ持続した効果が期待される。一方、アデノウイルスに比較しても感染効率が低く十分な効果が得られなかった。この問題に対し Producer cell の改良、ウイルス回収液の遠心濃縮の工夫、遺伝子導入時にポリカチオンを併用することにより感染効率は改善されてきている。

一般的にレトロウイルスを用いた遺伝子導入を行う場合、ポリブレンがその効率を上げることは良く知られている。しかしポリブレンは細胞毒性が強く vitro での投与は用いることが可能であっても生体に直接投与することは困難であった。そこでレトロウイルスを遠心濃縮する際に、あらかじめポリブレンを混和してレトロウイルスを修飾することを試みたが、遺伝子導入効率は改善しなかった。

PEG-PLL は分子量 12,000 のポリエチレングリコール (PEG) と 48 分子の L-リジンが重合したポリエルリジン (PLL) を結合させた高分子化合物である。DNA と混和することによりポリイオンコンプレックスを形成することにより、遺伝子導入用のデリバリーとして、その遺伝子導入効率はリポフェクションをも凌駕する。様々の薬剤との相互作用によりドラッグデリバリーシステムとして期待されている。PEG-PLL はカチオンとして働くポリリジン残基を保持しているためポリブレンと同様に遺伝子導入効率をあげることが予想される。またポリエチレングリコール残基も保持していることより生体膜親和性がありレトロウイルス膜表面と親和性があると推測された。

本論文でレトロウイルスベクターでの遺伝子導入時に用いて遺伝子導入効率を上げるかにつき検討した。

【方法】NH3T3 細胞株, Lewis lung carcinoma 細胞株, マウス脳初代培養細胞に PEG-PLL 含有培養液中で lac Z 遺伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させた。また、レトロウイルスと PEG-PLL は混合後、4℃, 6000 g, 16 時間遠心にてウイルスをベレットとして上清を廃棄し余剰 PEG-PLL を除去後、細胞に感染させた。レトロウイルス感染 48 時間後に X-Gal 染色にて判定した。PEG-PLL を加えずに同処理をしないものをコントロールとした。

遠心時にウイルスと PEG-PLL がコンプレックスを形成せずに別々に沈殿している可能性を否定するためにシヨ糖密度勾配法を用いてウイルスを精製した。

【結果】PEG-PLL はポリブレン同様レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率を上昇させカチオンとして作用をもつと考えられたが、細胞毒性も認められた。レトロウイルスを遠心処理することにより毒性を低下させることが可能であった。毒性のためポリブレンを用いて遺伝子導入の困難であったマウス脳初代培養細胞でも遺伝子導入効率は改善した。シヨ糖密度勾配法でのウイルス精製により PEG-PLL がウイルス表面に付着していることが明らかになった。

【総論】レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率は PEG-PLL を加えることにより従来の 3 - 7 倍上昇した。毒性を軽減することも可能であり今後の検討により生体への遺伝子導入にも用いることが可能と考えられた。

論文審査の結果の要旨

PEG-PLLは分子量12,000のポリエチレングリコール (PEG) と48分子のL-リジンが重合したポリエリジン (PLL) を結合させた高分子化合物である。PEG-PLLはカチオンとして働くポリリジン残基を保持しているため遺伝子導入効率をあげることが予想される。またポリエチレングリコール残基も保持していることより生体膜親和性がありレトロウイルス膜表面と親和性があると推測された。

PEG-PLLは遺伝子導入効率を上昇させたが、細胞毒性も認められた。レトロウイルスを遠心処理することで効果を保持したまま、毒性を低下させることが可能であった。毒性のためポリブレンを用いて遺伝子導入の困難であったマウス脳初代培養細胞でも遺伝子導入効率は改善した。

本論文はPEG-PLLがレトロウイルスの遺伝子導入効率を上げたことを生物学的データで示そうとしているが、その機序については推論の域を出ていないため、更に検討を加える必要がある。しかし、遺伝子導入効率を上げており、レトロウイルスの調整において遠心操作の段階で用いれば、感染効率をあげると予想され、レトロウイルスの遺伝子導入において有用な方法になる可能性がある。

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認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年1月19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。