

氏名	ふもと しょうたろう 麓 伸太郎
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博第546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	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	局所体内動態解析に基づいたガラクトース修飾遺伝子キャリアの遺伝子導入効率改善に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 川 崙 敏 祐

標的細胞に

論文内容の要旨

遺伝子疾患等に対する治療法として *in vivo* 遺伝子治療が注目を集めているが、これを実現するためには標的細胞に標的遺伝子を如何に効率的に送達するかが重要な課題となっている。その方法の一つとして、標的細胞が特異的に発現する受容体を介して遺伝子を導入するアプローチが注目され、さまざまなキャリアの開発が進められている。多くの場合 *in vitro* 培養細胞を使って機能評価がなされているが、*in vivo* 遺伝子導入を実現するには投与部位から標的細胞までに到達するまでの全体のプロセスを考慮する必要がある、血液循環や組織構造に依存する障壁の実体を解明することが不可欠である。これまでに、ガラクトース修飾カチオン性リポソームが肝臓実質細胞への遺伝子デリバリーシステムとして有用であることが示されているが、必ずしもその遺伝子発現効率は十分ではない。そこで申請者は、肝灌流実験系を用いてガラクトース修飾遺伝子キャリアの肝臓組織での局所動態を解析するとともに、遺伝子キャリアと血液成分との相互作用を詳細に検討することによって、各過程における遺伝子キャリアの動態特性を整理した。さらに、得られた情報を基盤にして、ガラクトース修飾カチオン性リポソームの新たな製剤設計を行い、肝臓に対する遺伝子導入効率の改善を行った。

I. ガラクトース修飾カチオン性キャリア・pDNA 複合体の肝局所動態解析

ラット肝灌流実験系を用いて、ガラクトース修飾カチオン性リポソーム・plasmid DNA (pDNA) 複合体の肝局所動態を速度論的に解析した。瞬時投与されたリポソーム・ ^{32}P pDNA 複合体の静脈側流出曲線をモーメント解析した結果、ガラクトース修飾複合体は、未修飾複合体の場合に比べて肝抽出率が高くなることが示された。さらに、2-compartment dispersion model に基づいて速度論的に評価したところ、ガラクトース修飾複合体は、高い組織結合性および内在化速度定数を示すことが明らかとなった。肝臓実質細胞と非実質細胞との移行比 (PC/NPC 比) に関しても、ガラクトース修飾複合体のほうが未修飾複合体に比べ約1.8倍高い値を示し、実質細胞選択性が增大していることが示されたが、そのPC/NPC 比の絶対値は各細胞の血漿接触表面積比よりも小さく、類洞内皮の透過性が制限されていることが示唆された。一方、より小さな複合体を形成するカチオン性高分子のポリエチレンイミンでは、カチオン性リポソームの場合に比べ、高い実質細胞移行性を示したことから、複合体の粒子径が組織移行の重要な因子の一つであることが推察された。

II. ガラクトース修飾カチオン性リポソーム・pDNA 複合体と血液成分との相互作用解析

表面に高い正電荷を持つガラクトース修飾カチオン性リポソーム・pDNA 複合体は、生体内に投与後、血清タンパク、赤血球などの生体成分と相互作用すると考えられる。そこで、複合体と血液成分との相互作用に関して *in vitro* において詳細な検討を行った。carboxyfluorescein 標識 pDNA と rhodamine 標識リポソームとの複合体を全血とインキュベーションしたところ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の解消が観察されたのに対し、先に血清と混合した後、赤血球とインキュベーションした際にはあまり顕著な FRET の解消が認められなかった。また、複合体を全血とインキュベーションした場合には、血清とプレインキュベーションした際に比べ、顕著な pDNA の分解が観察された。これらの結果より、複合体と血清タンパクとの相互作用は極めて強固である一方、複合体が赤血球と相互作用する際には複合体から pDNA が放出され

ることが明らかとなった。また、複合体をマウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を検討したところ、血清とのプレインキュベーションにより遺伝子発現が顕著に増大したことから、マウス体内において赤血球との相互作用による複合体からのpDNAの放出ならびに分解が抑制されたものと推察された。

Ⅲ. ガラクトース修飾カチオン性リポソーム・pDNA複合体の物性制御による肝実質細胞への遺伝子導入効率の改善

複合体形成時における分散溶媒のイオン濃度は、カチオン性リポソームおよびpDNAの表面電荷については複合体の凝集に影響を与えると考えられる。そこで、溶媒中イオン濃度を精密に設定することによって複合体の物性制御を試み、体内動態および遺伝子発現への影響について検討した。グルコースと塩化ナトリウムからなる等張溶液中における各種ガラクトース修飾複合体の粒子径を測定した結果、低濃度(5mM)の塩化ナトリウム存在下複合体の粒子径は最小となり、そのときの平均粒子径は120nmとなった。また、5mM塩化ナトリウム存在下調製した複合体(電荷制御複合体)の場合には、グルコースのみからなる溶媒で調製した場合に比べ、生理食塩水で希釈した際の凝集速度が小さくなることが示された。肝灌流実験系において両複合体の肝局所動態を評価したところ、電荷制御複合体では組織結合性が顕著に高くなり、肝実質細胞への移行性が増大する傾向にあった。一方、ヒト肝臓癌由来細胞株HepG2を用いた*in vitro*実験を行ったところ、電荷制御複合体においては、高い遺伝子導入効率を得られるとともに、共焦点レーザー顕微鏡像により細胞質へのpDNAの放出が促進されていることが明らかとなった。そこで両複合体をマウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を検討したところ、電荷制御複合体では、遺伝子発現が顕著に増大し、標的の肝実質細胞で特に高い値を示した。以上、複合体の物性を制御することで、組織移行性および細胞内動態を改善し、*in vivo*における遺伝子導入効率を向上することに成功した。

以上、申請者は、ガラクトース修飾遺伝子導入キャリア・pDNA複合体の肝臓内動態および生体成分との相互作用に関する評価を行い、肝臓への*in vivo*遺伝子導入に影響する因子に関して種々の基礎的知見を得た。また、得られた知見に基づき複合体の設計を行い、肝臓における遺伝子発現を改善することに成功した。本研究で得られた知見は、肝臓疾患を対象とした遺伝子治療法の確立において有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

*in vivo*遺伝子治療では、標的細胞に遺伝子を効率的に送達する方法の開発が重要であり、標的細胞に特異的に発現する受容体を介して遺伝子を送達するキャリアの開発が進められている。多くの場合、これらの機能評価は培養細胞系を用いて行われているが、*in vivo*では投与部位から標的細胞までに到達するまでの全体のプロセスを考慮する必要がある、血液循環や組織構造に依存する障壁の実体解明が不可欠である。一方、肝臓実質細胞への遺伝子デリバリーシステムとしてガラクトース修飾カチオン性リポソームが開発されているが、その遺伝子発現効率は十分ではない。そこで申請者は、肝灌流実験系を用いてガラクトース修飾遺伝子キャリアの肝臓組織での局所動態を解析するとともに、遺伝子キャリアと血液成分との相互作用を検討し、各過程における動態特性を整理した。さらに、得られた情報に基づき新規ガラクトース修飾カチオン性リポソームの製剤設計を行なった。

最初に、ラット肝灌流実験系を用いて、ガラクトース修飾カチオン性リポソーム・³²P plasmid DNA(pDNA)複合体の肝局所動態を解析し、ガラクトース修飾複合体が未修飾複合体に比べて高い肝抽出率、組織結合性および内在化速度定数を示すことを明らかにした。また、ガラクトース修飾複合体の方が約1.8倍高い肝臓実質細胞と非実質細胞との移行比(PC/NPC比)を示し実質細胞選択性の増大が示唆されたが、その比の絶対値は各細胞の血漿接触表面積比よりも小さく、類洞内皮の透過性が制限されていること、および複合体の粒子径が組織移行の要因であることが示唆された。

表面に高い正電荷を持つガラクトース修飾カチオン性リポソーム・pDNA複合体は、生体内に投与後、血清タンパク、赤血球などの生体成分と相互作用する。そこで、複合体と血液成分との相互作用に関して検討を行い、carboxyfluorescein標識pDNAとrhodamine標識リポソームとの複合体を全血とインキュベーションすることによる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の解消が、先に血清と混合することにより減弱されることを見出し、赤血球が複合体からのpDNAの放出を促し、血清との相互作用がこれを抑えることを明らかにした。また、血清との相互作用は全血によるpDNAの分解を抑制することを確認した。さらに、複合体をマウス門脈内投与後の肝臓での遺伝子発現が血清とのプレインキュベーションにより顕著に増大することを明らかにし、血清との相互作用が*in vivo*でも同様の影響を与えることを確認した。

次に、調製時の溶媒中イオン濃度の制御による複合体の物性制御を試み、低濃度(5mM)の塩化ナトリウム存在下、調製した複合体(電荷制御複合体)では粒子径が120nmと最小になり、グルコースのみからなる溶媒で調製した場合に比べ生理食塩水希釈による凝集も遅延することを確かめた。また、電荷制御複合体では肝灌流実験系において肝実質細胞への移行性が高く、ヒト肝臓癌由来細胞株HepG2を用いた *in vitro* 実験でも高い遺伝子導入効率を得られることが明らかとなった。さらに、マウス門脈内投与においても肝実質細胞で高い遺伝子発現が得られることを確認し、複合体の物性制御を通じて *in vivo* における遺伝子導入効率を向上させることに成功した。

以上、申請者は、ガラクトース修飾遺伝子導入キャリア・pDNA 複合体の肝臓内動態および生体成分との相互作用に関する評価を行い、肝臓への *in vivo* 遺伝子導入に影響する因子に関して種々の基礎的知見を得た。また、得られた知見に基づき新規複合体の設計を行い、遺伝子発現の改善に成功した。

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16年2月27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。