

氏名	こ ばやし なお き 小 林 直 樹
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 547 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 学 専 攻
学位論文題目	In Vivo Plasmid DNA Delivery based on Large-Volume Intravenous Injection (大容量水溶液静脈内投与による in vivo プラスミドDNAデリバリーに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 倉 喜 信 教 授 橋 田 充 教 授 乾 賢 一

論 文 内 容 の 要 旨

In vivo 遺伝子治療は、遺伝子疾患をはじめ種々の難治性疾患に対する治療法として注目されている。目的遺伝子を標的部位に到達させ効率的な遺伝子発現をもたらす遺伝子デリバリーシステムの開発は、in vivo 遺伝子治療を実現する上で不可欠である。抗原性や安全性など種々の問題が指摘されるウイルスベクターに対して、プラスミドDNA (pDNA) は最も単純な非ウイルスベクターとして安全性・汎用性の観点から期待されているが、多くの細胞への遺伝子導入が可能と考えられる血管内投与時には遺伝子発現がほとんど得られない。カチオン性脂質やポリマーなど様々なキャリアの開発が盛んに行われる一方、キャリアを一切用いずpDNAを大容量を水溶液として急速に静脈内投与することで極めて高いレベルの遺伝子発現が得られるハイドロダイナミクス法が報告され、近年非常に注目を集めている。安全で効率的な遺伝子デリバリーシステムや方法論の確立には、pDNAの体内動態・細胞取り込み機構と遺伝子発現との関連を明らかにすることが不可欠であるが、これらに関する情報は極めて乏しいのが現状である。

そこで著者は、ハイドロダイナミクス法を適用したpDNAの体内動態・細胞取り込みに関する検討を行い、効率的な遺伝子デリバリーメカニズムの解明を試みた。さらに、ハイドロダイナミクス法による遺伝子デリバリー技術を治療遺伝子をコードするpDNAなどに応用し、本法を用いた遺伝子治療の可能性を検討した。

I. ハイドロダイナミクス法を適用したプラスミドDNAの体内動態・細胞取り込みメカニズムの解明

ハイドロダイナミクス法による効率的な遺伝子デリバリーメカニズムの解明を目的に、本法を適用した際のpDNAの体内動態・細胞取り込み特性について、通常用いられる用量によるpDNA静脈内投与時と比較・検討した。まず通常の方法によるpDNA静脈内投与後の体内動態・細胞取り込み特性について検討したところ、pDNAは速やかに血中から消失し、スカベンジャーレセプター様の特殊な機構を介して主に肝類洞内皮細胞に取り込まれ分解を受けることが明らかとなった。これに対しハイドロダイナミクス法を適用したpDNAは見かけ同程度の肝取り込みを示したが、通常静脈内投与時に肝取り込みを阻害したポリアニオンの前投与によっても肝取り込み量には影響が見られなかった。さらに、過剰量の非発現pDNAの同時投与によっても遺伝子発現は影響を受けず、ハイドロダイナミクス法によるpDNA肝取り込みが非特異的なものであることが示唆された。また、ハイドロダイナミクス法により細胞膜非透過性のヨウ化プロピジウムの肝細胞内移行および予め肝臓で発現させた green fluorescent protein (GFP) の細胞外流出が起こることが明らかとなり、細胞膜の一時的な透過性亢進が示唆された。さらに、大容量生理食塩水の投与直後にpDNAを通常の方法で静脈内投与することでも遺伝子発現が得られ、そのレベルは投与間隔に依存して低下すること、pDNA投与後初期に肝実質細胞を単離・培養しても非常に高い遺伝子発現が得られることなどから、ハイドロダイナミクス法におけるpDNA細胞内取り込みが主に投与後初期の短時間に起こる可能性が示された。さらに、ポリスチレンマイクロスフィアを用いた検討から本法に適用可能な粒子サイズに関する情報よりも得ることができた。以上の結果より、ハイドロダイナミクス法による遺伝子デリバリーは、一時的に透過性の亢進した細胞膜を介して細胞質へプラスミドDNAが直接導入される非特異的なものであることが示された。

II. ハイドロダイナミクス法の治療遺伝子・siRNA デリバリーへの応用

次にハイドロダイナミクス法による効率的な遺伝子デリバリーをインターフェロン (IFN) 遺伝子に応用し、肝転移モデルマウスにおける抗腫瘍効果を検討した。pDNA 静脈投与後、一過性ではあるものの極めて高いレベルの導入遺伝子選択的な IFN- β または IFN- γ が主に肝臓から血中に放出されることが確認された。この時 TNF- α など非特異的なサイトカインの誘導は見られなかった。マウス肝転移モデルに対する IFN 発現 pDNA を静脈内投与による抗腫瘍効果を検討したところ、IFN- β 遺伝子投与群において特に顕著な肝転移結節数の減少と生存日数の延長が認められ、本法の治療への応用の可能性が示された。

また、短い二本鎖 RNA (siRNA) により配列特異的な遺伝子発現抑制が起こる RNA 干渉が近年非常に注目されている。そこで、ハイドロダイナミクス法を siRNA 発現ベクターのデリバリーに応用し、*in vivo* での RNA 干渉の誘導を試みた。siRNA 発現 pDNA およびモデル標的遺伝子であるルシフェラーゼ発現 pDNA をマウスに同時投与することにより、肝臓・腎臓・肺において著大な遺伝子発現抑制効果が認められ、本法が RNA 干渉に基づいた *in vivo* 遺伝子ノックダウンにも応用可能であることが明らかとなった。

以上、著者は pDNA 静脈内投与後の体内動態・細胞取り込み特性に関する検討を行い、ハイドロダイナミクス法による効率的な遺伝子デリバリーメカニズムとの関連を明らかにした。また、ハイドロダイナミクス法がサイトカイン遺伝子などの治療遺伝子や遺伝子発現調節作用を有する siRNA などのデリバリーに応用可能であることを示した。

以上の結果は、遺伝子医薬品の大容量水溶液による経血管デリバリーを利用した *in vivo* 遺伝子治療の実現に向けての有用な基礎的知見となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

In vivo 遺伝子治療は、遺伝子疾患をはじめ種々の難治性疾患に対する治療法として注目されている。目的遺伝子を標的の部位に到達させ効率的な遺伝子発現をもたらす遺伝子デリバリーシステムの開発は、*in vivo* 遺伝子治療を実現する上で不可欠である。抗原性や安全性など種々の問題が指摘されるウイルスベクターに対して、プラスミド DNA (pDNA) は最も単純な非ウイルスベクターとして安全性・汎用性の観点から期待されているが、多くの細胞への遺伝子導入が可能と考えられる血管内投与時には遺伝子発現がほとんど得られない。カチオン性脂質やポリマーなど様々なキャリアの開発が盛んに行われる一方、キャリアを一切用いず pDNA を大容量水溶液として急速に静脈内投与することで極めて高いレベルの遺伝子発現が得られるハイドロダイナミクス法が報告され、近年非常に注目を集めている。安全で効率的な遺伝子デリバリーシステムや方法論の確立には、pDNA の体内動態・細胞取り込み機構と遺伝子発現との関連を明らかにすることが不可欠であるが、これらに関する情報は極めて乏しいのが現状である。

そこで著者は、ハイドロダイナミクス法を適用した pDNA の体内動態・細胞取り込みに関する検討を行い、効率的な遺伝子デリバリーメカニズムの解明を試みた。さらに、ハイドロダイナミクス法による遺伝子デリバリー技術を治療遺伝子をコードする pDNA などに応用し、本法を用いた遺伝子治療の可能性を検討した。

ハイドロダイナミクス法による効率的な遺伝子デリバリーメカニズムの解明を目的に、本法を適用した際の pDNA の体内動態・細胞取り込み特性について、通常用いられる用量による pDNA 静脈内投与時と比較・検討した。まず通常の方法による pDNA 静脈内投与後の体内動態・細胞取り込み特性について検討したところ、pDNA は速やかに血中から消失し、スカベンジャーレセプター様の特殊な機構を介して主に肝類洞内皮細胞に取り込まれ分解を受けることが明らかとなった。これに対しハイドロダイナミクス法を適用した pDNA は見かけ同程度の肝取り込みを示したが、通常の方法による肝取り込みを阻害したポリアニオンの前投与によっても肝取り込み量には影響が見られなかった。さらに、過剰量の非発現 pDNA の同時投与によっても遺伝子発現は影響を受けず、ハイドロダイナミクス法による pDNA 肝取り込みが非特異的なものであることが示唆された。また、ハイドロダイナミクス法により細胞膜非透過性のヨウ化プロビジウムの肝細胞内移行および予め肝臓で発現させた green fluorescent protein (GFP) の細胞外流出が起こることが明らかとなり、細胞膜の一時的な透過性亢進が示唆された。さらに、大容量生理食塩水の投与直後に pDNA を通常の方法で静脈内投与することでも遺伝子発現が得られ、そのレベルは投与間隔に依存して低下すること、pDNA 投与後初期に肝実質細胞を単離・培養しても

非常に高い遺伝子発現が得られることなどから、ハイドロダイナミクス法におけるpDNA細胞内取り込みが主に投与後初期の短時間に起こる可能性が示された。さらに、ポリスチレンマイクロスフィアを用いた検討から本法に適用可能な粒子サイズに関する情報よりも得ることができた。以上の結果より、ハイドロダイナミクス法による遺伝子デリバリーは、一時的に透過性の亢進した細胞膜を介して細胞質へプラスミドDNAが直接導入される非特異的なものであることが示された。

次にハイドロダイナミクス法による効率的遺伝子デリバリーをインターフェロン (IFN) 遺伝子に応用し、肝転移モデルマウスにおける抗腫瘍効果を検討した。pDNA 静脈投与後、一過性ではあるものの極めて高いレベルの導入遺伝子選択的なIFN- β またはIFN- γ が主に肝臓から血中に放出されることが確認された。この時TNF- α など非特異的なサイトカインの誘導は見られなかった。マウス肝転移モデルに対するIFN発現pDNAを静脈内投与による抗腫瘍効果を検討したところ、IFN- β 遺伝子投与群において特に顕著な肝転移結節数の減少と生存日数の延長が認められ、本法の治療への応用の可能性が示された。

また、短い二本鎖RNA (siRNA) により配列特異的な遺伝子発現抑制が起こるRNA干渉が近年非常に注目されている。そこで、ハイドロダイナミクス法をsiRNA発現ベクターのデリバリーに応用し、*in vivo*でのRNA干渉の誘導を試みた。siRNA発現pDNAおよびモデル標的遺伝子であるルシフェラーゼ発現pDNAをマウスに同時投与することにより、肝臓・腎臓・肺において著大な遺伝子発現抑制効果が認められ、本法がRNA干渉に基づいた*in vivo*遺伝子ノックダウンにも応用可能であることが明らかとなった。

以上、著者はpDNA静脈内投与後の体内動態・細胞取り込み特性に関する検討を行い、ハイドロダイナミクス法による効率的遺伝子デリバリーメカニズムとの関連を明らかにした。また、ハイドロダイナミクス法がサイトカイン遺伝子などの治療遺伝子や遺伝子発現調節作用を有するsiRNAなどのデリバリーに応用可能であることを示した。以上の結果は、遺伝子医薬品の大容量水溶液による経血管デリバリーを利用した*in vivo*遺伝子治療の実現に向けての有用な基礎的知見となるものと考えられる。

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24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。