氏　　名	Hossein Hosseinkhani（ホセイン　ホセインカーニ）
学位(専攻分野)	博　士（工　学）
学位記番号	工　博　第2199号
学位授与の日付	平成14年11月25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	工学研究科高分子化学専攻
学位論文題目	Design of Non-Viral Polymer Vectors and the Ultrasound Combination to Enhance Gene Transfection （遺伝子導入の増強のための非ウイルス高分子ベクターの設計とその超音波との組み合わせ）
論文調査委員	（主　査） 教授 田畑泰彦　教授 岩田博夫　教授 今中忠行

論文内容の要旨

本論文は，遺伝子治療を目的とした非ウイルスベクターに関して，生体外あるいは生体内における遺伝子の細胞内への導入効率を高めることのできる非ウイルス高分子ベクター（遺伝子運搬キャリア）を設計するとともに，その超音波との組み合わせによる遺伝子の導入効率を増強する方法を論じた結果をまとめたものであって，緒言，本論2編7章，および総括からなっている。

緒言では，遺伝子の導入ベクターとなる材料あるいはその遺伝子導入法の観点から，これまでに研究された遺伝子導入技術について概説し，本研究の目的とその背景，および本論文の概要が述べられている。

第1編では，種々のカチオン化ゼラチンからなる非ウイルスベクターを作製するとともに，この非ウイルスベクターと超音波とを組み合わせることによって，in vitro および in vivo における遺伝子導入の増強について検討した結果をまとめている。

第1章では，ゼラチンのカルボキシル基にエチレンジアミンを化学導入することによって作製した，カチオン化ゼラチンとプラスミド遺伝子との複合体を用いた遺伝子導入に対する超音波の照射時間，周波数，エネルギーなどの条件について検討している。その結果，非ウイルスベクターであるカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成したプラスミド遺伝子をラット胃粘膜細胞培養系へ添加した後，超音波を照射することによって，遺伝子導入の増強できることを明らかにしている。

第2章では，第1章で用いたカチオン化ゼラチンのエチレンジアミンの導入率を変化させることによって，カチオン化度の異なるカチオン化ゼラチンを作製し，超音波との組み合わせによる遺伝子導入に対するカチオン化度の効果について調べている。その結果，エチレンジアミンの導入率が47.8モル%以上の場合に，超音波照射と組み合わせることによって，in vitro におけるラット胃粘膜細胞への遺伝子導入の増強できることを見出している。

第3章では，アミン誘導体として，エチレンジアミン，スペルミジン，およびスペルミンを用いて，ゼラチンのカチオン化に用いるアミン誘導体の種類が超音波を利用した in vitro における遺伝子導入に与える影響について論じている。スペルミンを用いて作製したカチオン化ゼラチンが，ラット胃粘膜細胞に対して最も高い遺伝子導入を示し，この原因として，遺伝子導入に最適な複合体の正電荷，分子サイズ，および優れた Buffering 効果について述べている。

第4章では，第1章から3章までの in vitro における遺伝子導入の増強効果を踏まえて，in vivo における遺伝子導入について検討した結果を論じている。非ウイルスベクターとプラスミド遺伝子との複合体をマウス大腿筋内へ投与した後，超音波を照射することによって，in vivo においても，超音波照射により，遺伝子導入効率とそれにともなう遺伝子発現が増強されることを明らかにしている。

第2編では，in vitro および in vivo における遺伝子導入を増強することのできる新規な非ウイルスベクターの分子設計について論じている。

第5章では，プラスミド遺伝子とキレート残基を導入したデキストランとの金属配位結合の形成とその癌組織へのターゲティングについて論じている。金属配位結合を利用した非ウイルスベクターとプラスミド遺伝子の複合体を担癌マウスの静脈内へ投与した結果，遺伝子導入は癌組織のみに認められ，遺伝子発現を癌組織へターゲティングすることに成功している。

第6章では，肝臓の実質細胞がもつアシアロ糖タンパク質レセプターに対して親和性のあるプルランを用いて，プラスミド遺伝子とキレート残基を導入したプルランとの金属配位結合の形成とその肝臓へのレセプターを介したターゲティングについて論じている。キレート残基導入プルランとプラスミド遺伝子との金属配位複合体をマウスへ静脈内投与したところ，肝臓においてのみ遺伝子発現を増強できることを見出している。

第7章では，細胞接着に重要な役割を果たすアルギニン，グリシン，アスパラギン酸（RGD）配列をもつ非ウイルスベクターを調製し，RGD配列による遺伝子導入効率の増強について検討している。繰り返しRGD配列をもつ合成タンパク質であるPronectin Fとエチレンジアミンとを反応させることによって作製したカチオン化Pronectin Fとプラスミド遺伝子との複合体によるin vitro遺伝子発現を調べたところ，プラスミド遺伝子の細胞内への取り込み量の増大とともに，遺伝子発現の増強できることを明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

本論文は，遺伝子治療を目的として，生体外あるいは生体内における遺伝子の細胞内への導入効率を高めるための非ウイルス高分子遺伝子運搬キャリアの設計とその超音波との組み合わせによる遺伝子の導入効率の増強を目標に研究した成果についてまとめたものであり，得られた主な成果は次の通りである。

1）アミノ基を導入することによって得られたカチオン化ゼラチンとプラスミド遺伝子とのポリイオンコンプレックス複合体を細胞に与えた後，超音波照射することによって，遺伝子導入と遺伝子発現を増強できることを見出した。

2）導入するアミノ基の導入率およびその種類がカチオン化ゼラチンによる遺伝子導入効率に与える影響を検討した。その結果，遺伝子発現には最適なアミノ基導入率と導入するアミノ基の種類，ならびにプラスミド遺伝子との複合体の最適な正電荷，分子サイズ，ならびに優れたBuffering効果が必要であることを明らかにした。

3）カチオン化ゼラチンとプラスミド遺伝子との複合体による遺伝子発現は生体内でも認められ，超音波の照射によって，遺伝子発現が増強した。

4）金属配位結合を介した，プラスミド遺伝子とキレート残基導入デキストランとの複合体を用いることによって，遺伝子発現を癌組織へターゲティングできることを示した。

5）肝臓への親和性をもつプルランにキレート残基を導入したプルラン誘導体とプラスミド遺伝子との金属配位複合体を利用することによって，遺伝子発現を肝臓へのターゲティングすることに成功した。

6）細胞接着に重要な役割を果たすアミノ酸配列をもつカチオン化合成タンパク質と複合体を形成させることによって，プラスミド遺伝子の細胞内への取り込み増大にともなう遺伝子発現が増強できることを明らかにした。

以上，要するに，本論文は，プラスミド遺伝子—水溶性高分子複合体と超音波照射とを組み合わせることによって，ウイルスを用いない遺伝子の導入効率の向上とそれにともなう遺伝子発現の増強に関して重要な知見を得たものであり，学術上，実際上寄与するところが少なくない。よって，本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また，平成14年10月21日，論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果，合格と認めた。