

氏名	なかむらまさる 中村勝
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第502号
学位授与の日付	平成14年5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	脳毛細血管内皮細胞へのインターフェロン遺伝子デリバリーに関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 橋田 充 教授 高倉喜信 教授 河合明彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

血管内皮細胞は循環血液中に存在する物質の組織への移行バリアーとしての機能に加え、種々の生理学的役割を果たしており、近年遺伝子治療の重要な標的部位の一つと考えられている。とりわけ、脳毛細血管内皮細胞(BMEC)により構成される血液-脳関門(BBB)は、脳組織への薬物の移行を大きく制限しており、これまで生理活性タンパク質などの高分子物質を脳組織へ送達する試みが数多くなされてきたが、未だ有効な方法論は確立されていない。こうした問題を解決する方法の一つとして、BMECに分泌性タンパク質をコードした遺伝子を導入するアプローチがあり、BMECで生理活性タンパク質を発現、分泌させることでBBBを克服し、脳組織へ送達することが可能であると考えられる。そこで著者は、BMEC等の血管内皮細胞を標的とする遺伝子治療実現のための基礎情報を得ることを目的に、各種レポーター遺伝子をコードするプラスミドDNA(pDNA)をモデルとして培養血管内皮細胞における細胞取り込み機構を調べると共に、多様な生物活性を有するインターフェロン- $\beta$ (IFN- $\beta$ )をコードするpDNAを対象に、種々の角度から遺伝子発現特性を評価した。また、遺伝子導入により血管内皮細胞内で産生されたIFN- $\beta$ の細胞内局在や分泌の方向性についても検討を行った。

#### I. BMECにおけるpDNAの取り込み機構および遺伝子発現に関する基礎的検討

最初に、pDNAを単独で適用した際の血管内皮細胞による基本的な取り込み特性と遺伝子発現に関する検討を目的に、BBBのin vitroモデルとして有用性が確立されているウシ脳毛細血管内皮細胞(BMEC)の初代培養系を用いて $^{32}\text{P}$ 標識したpDNAの取り込みを評価し、その顕著な取り込みを明らかにした。また、種々のポリアニオンを用いて結合阻害実験を行った結果、スカベンジャーレセプターの代表的なリガンドであるデキストラン硫酸およびPoly-Iにより有意な結合量の減少が認められたのに対し、レセプターへの親和性を持たないPoly-Cでは阻害効果は観察されなかった。さらに、ルソフェラーゼをコードするpDNAを用いて遺伝子発現を評価した結果、単独で取り込まれた場合にも有意な発現が得られることが示され、取り込み実験の結果と同様にポリアニオンによる阻害が観察された。一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞株(HUVEC)においてはpDNAの取り込みはほとんど認められず、遺伝子発現も低いレベルであった。以上の結果より、pDNAはBMECにおいて特異的に取り込まれ遺伝子発現に至ることが明らかになり、これにはスカベンジャーレセプターに類似した取り込み機構が関与することが示唆された。さらに、カチオン性リポソームと複合体を形成させた場合には、pDNAの取り込み並びに遺伝子発現量が大きく上昇することが示された。

#### II. BMECへのIFN- $\beta$ 遺伝子の導入に関する検討

ヒトおよびマウスIFN- $\beta$ の発現プラスミドを作製し、そのカチオン性リポソーム複合体を調製して、培養日数の異なるBMECを対象に遺伝子導入実験を行った結果、いずれの種のIFN- $\beta$ 遺伝子を用いた場合にも有意な遺伝子発現が観察され、BMECは活性を持ったIFN- $\beta$ を3日間以上にわたり分泌することが示された。また、培養日数が短い増殖状態のBMECにおいては高い遺伝子発現が得られることが示されたが、培養日数の延長に伴い、IFN- $\beta$ 分泌量が顕著に減少する現象が観察された。さらに、増殖期のBMECにヒト型のIFN- $\beta$ を発現させた場合には、細胞増殖の抑制ならびに形態変化が見

られ、IFN- $\beta$ に対する反応が惹起されることが明らかとなった。一方、増殖が停止した状態ではBMECにこのような現象は認められず、BBBのバリアーとしての機能を損なうことなく遺伝子発現が得られる可能性が示された。

### Ⅲ. IFN- $\beta$ の分泌方向性およびIFN- $\beta$ /GFP融合タンパクの細胞内局在に関する検討

極性を有する血管内皮細胞に導入後に発現されるIFN- $\beta$ の分泌の方向性は治療効果に影響する重要な因子の一つと思われる。そこで、HUVECをトランスウェル上で培養した系を用いてヒトおよびマウスIFN- $\beta$ の分泌方向性を検討した。まず、カチオン性リポソームを利用したトランスフェクションにより各IFN- $\beta$ の安定発現株を樹立し、分泌方向性を解析したところ、いずれのIFN- $\beta$ もapical側およびbasal側の両方向にほぼ均等に分泌されることが示された。これに対し、トランスウェル上に培養したHUVECに対して、apical側あるいはbasal側からpDNAを導入し、一過性にIFN- $\beta$ を発現させる遺伝子導入実験を行った結果、両IFN- $\beta$ 共apical側から導入した場合にはapical側へ、basal側から導入した場合にはbasal側へ優先的にIFN- $\beta$ が分泌されることが示された。以上の結果より、発現様式の違いによりIFN- $\beta$ の分泌方向性が異なること、また一過性に発現させた場合には導入方向選択的な分泌が起こることが明らかとなった。さらにIFN- $\beta$ とgreen fluorescent protein (GFP)の融合タンパク発現プラスミドを構築し、遺伝子導入後の細胞内局在について検討した結果、一過性発現実験におけるapical側優先的な分泌と対応した融合タンパクの細胞内局在が観察され、タンパク合成の段階でも方向選択性が生じている可能性が示された。

以上、著者はBMECおよびHUVECを用いて、pDNAの細胞内導入、発現および分泌の方向性に関して、多面的な検討を行った。これらの知見は、脳毛細血管内皮細胞をはじめとする血管内皮細胞を標的とする、IFN- $\beta$ に代表される分泌性生理活性タンパク質の遺伝子導入に対し、有用な基礎情報を提供するものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

脳毛細血管内皮細胞(BMEC)により構成される血液-脳関門(BBB)は薬物移行を大きく制限しており、生理活性タンパク質などを脳組織へ効率よく送達する方法論は未だ確立されていない。解決法の一つに、BMECに分泌性タンパク質をコードした遺伝子を導入するアプローチがあり、BMECで生理活性タンパク質を発現、分泌させることにより送達が可能になると考えられる。著者は、BMECを標的とする遺伝子治療実現のための基礎情報を得ることを目的に、プラスミドDNA(pDNA)の培養血管内皮細胞における取り込みと遺伝子発現を調べると共に、インターフェロン- $\beta$ (IFN- $\beta$ )をコードするpDNAを対象に遺伝子発現特性を評価し、IFN- $\beta$ の細胞内局在や分泌の方向性についても検討を行った。

最初に、BBBのin vitroモデルとして有用性が確立されているウシBMECの初代培養系を用いて $^{32}\text{P}$ 標識したpDNAの動態を検討し、pDNAが速やかにスカベンジャーレセプター様の機構により取り込まれることを明らかにした。また、ルシフェラーゼをコードするpDNAを用いて、取り込み実験の結果と対応する遺伝子発現を観察した。一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞株(HUVEC)においてはpDNAの取り込みはほとんど認められず、遺伝子発現も低いレベルであった。さらに、カチオン性リポソームとの複合体形成により、pDNAの取り込みと遺伝子発現量が上昇した。

次にヒトおよびマウスIFN- $\beta$ の発現プラスミドを作製し、カチオン性リポソーム複合体の形で培養日数の異なるBMECに遺伝子導入を行った結果、有意な遺伝子発現と分泌が観察されたが、培養日数の延長に伴いIFN- $\beta$ 分泌量は顕著に減少した。また、増殖期のウシBMECにヒト型のIFN- $\beta$ を発現させた場合には、細胞増殖の抑制ならびに形態変化が認められたが、増殖が停止した状態ではBMECにこのような現象は認められず、BBBのバリアー機能を損なうことなく遺伝子発現が得られる可能性が示された。

さらに、極性を有する血管内皮細胞に導入後発現されるIFN- $\beta$ の分泌の方向性が、治療効果を支配する重要な因子となることから、HUVECをトランスウェル上で培養した系を用いてヒトおよびマウスIFN- $\beta$ の分泌方向性を検討した。各IFN- $\beta$ の安定発現株を樹立し分泌方向性を解析したところ、いずれのIFN- $\beta$ もapical側およびbasal側の両方向にほぼ均等に分泌された。これに対し、HUVECにapical側あるいはbasal側からpDNAを導入し一過性にIFN- $\beta$ を発現させた結果、両IFN- $\beta$ 共導入方向に優先的にIFN- $\beta$ が分泌された。以上の結果より、発現様式の違いによりIFN- $\beta$ の分泌方向性が異なること、また一過性に発現させた場合には導入方向選択的な分泌が起こることが明らかとなった。さらにIFN- $\beta$ とgreen fluorescent protein (GFP)の融合タンパク発現pDNAを構築し検討を行った結果、apical側優先的な分泌と対応

した融合タンパクの細胞内局在が観察され、タンパク合成の段階でも方向選択性が生じている可能性が示された。

以上、著者はBMECおよびHUVECを用いて、pDNAの細胞内導入、発現および分泌の方向性に関し多面的な検討を行った。得られた知見は、脳などの毛細血管内皮細胞を標的とする分泌性生理活性タンパク質の遺伝子導入に対して、有用な基礎情報を提供するものと思われる。

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14年5月8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。