

| | |
|----------|--|
| 氏名 | かわ 川 上 茂 |
| 学位(専攻分野) | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 論薬博第652号 |
| 学位授与の日付 | 平成13年9月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文題目 | 糖修飾カチオン性リポソームを用いたプラスミドDNAの細胞選択的ターゲティングに関する研究 |
| 論文調査委員 | (主査) 教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 川 寄 敏 祐 |

論 文 内 容 の 要 旨

現在、遺伝子治療においては、安全性の観点から非ウイルス性ベクターの開発が注目されており、中でもカチオン性リポソームは *in vivo* でも高い遺伝子発現を示すことが知られている。しかし、静脈内投与後、肺以外の臓器へ遺伝子を導入することは難しく、カチオン性リポソームを基盤とした細胞選択的な遺伝子導入の方法論の確立が望まれている。これを実現する方法としては、標的細胞表面に特異的に発現しているレセプターに認識されるリガンドを利用する方法が有望と思われる。なかでも、肝臓を構成する各細胞が有する糖鎖認識機構は細胞に固有で比較的厳密な基質認識性を有することから、肝細胞選択的な遺伝子導入への応用が期待されている。しかしながら、糖修飾カチオン性リポソームを用いた遺伝子導入法に関する研究は未だ少なく、情報に乏しいのが現状である。そこで著者は、遺伝子性医薬品の肝細胞選択的送達を目的として、新規ガラクトースおよびマンノース修飾コレステロール誘導体 cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-β-D-thioglycosylethyl) amino) alkyl) formamide (Gal-C4-Chol) および cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-β-D-thiomannosyl-ethyl) amino) alkyl) formamide (Man-C4-Chol) を合成し、本物質により表面を糖修飾したカチオン性リポソームを用いた *in vivo* 細胞選択的遺伝子導入の可能性を検討した。

I. 新規ガラクトース修飾カチオン性リポソームの調製と *in vitro* 遺伝子導入効果の評価

肝実質細胞選択的遺伝子導入ベクターの開発を目的として、アシアロ糖タンパク質レセプターのリガンドとなる Gal-C4-Chol を合成し、ガラクトース修飾カチオン性リポソームを調製した。ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 を用いて細胞への取り込みおよび遺伝子発現機構の検討を行った結果、対照の 3β-[N,N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol (DC-Chol)/dioleoylphosphatidyl-ethanol-amine (DOPE) (6:4) リポソーム/DNA 複合体に比べ、Gal-C4-Chol/DC-Chol/DOPE(3:3:4) リポソーム/DNA 複合体では、有意に高い遺伝子発現および細胞取り込みが認められた。また、過剰量のガラクトース共存下、ガラクトース修飾カチオン性リポソーム/DNA 複合体では遺伝子発現および細胞取り込みに有意な低下が認められ、遺伝子導入がアシアロタンパク質レセプターを介するものであることが確かめられた。

II. ガラクトース修飾カチオン性リポソームを用いた細胞選択的 *in vivo* 遺伝子導入の評価

肝臓実質細胞への *in vivo* 細胞選択的遺伝子導入を目的として、ガラクトース修飾カチオン性リポソーム/DNA 複合体の評価を行った。マウスに複合体を静脈内投与した場合、肝臓での遺伝子発現は Gal-C4-Chol で修飾しても低い値であったが、門脈内投与においては、ガラクトース非修飾リポソーム複合体では肺で、ガラクトース修飾カチオン性リポソーム/DNA 複合体では肝臓で最も高い遺伝子発現が認められ、静脈内投与では最初に通過する肺が障壁になっていることが示唆された。そこで、門脈内投与に条件を固定し、リポソーム脂質組成などの影響を解析した結果、中性脂質として cholesterol を含有するガラクトース修飾カチオン性リポソームは、DOPE を含有するリポソーム複合体より高い遺伝子発現を示した。また、肝構成細胞レベルで遺伝子発現を分離評価した結果、肝実質細胞に選択的であり、さらに、過剰量のガラクトース修飾牛血清アルブミン前投与により本発現は有意に低下した。一方、複合体の電荷比の影響に関しては、電荷比+2.3~3.1 で肝臓選択的な遺伝子発現が認められ、さらに高い電荷比では肺で高い遺伝子発現が認められたことから、複合体の電

荷が臓器間での遺伝子発現のバランスに影響を与えることが示された。

Ⅲ. 新規マンノース修飾カチオン性リポソームの調製と *in vitro* 遺伝子導入効果の評価

次に、マンノースレセプターを介した細胞選択的遺伝子導入ベクターの開発を目的として、マンノースレセプターのリガンドとなる Man-C4-Chol を合成し、マンノース修飾カチオン性リポソームを調製した。マンノースレセプターを高発現しているマウス腹腔マクロファージを用いて遺伝子発現および細胞への取り込み機構の評価を行った結果、対照の DC-Chol/DOPE(6:4)リポソーム DNA 複合体に比べ、Man-C4-Chol/DOPE(6:4)リポソーム/DNA 複合体では、細胞への取り込みは同程度であったものの有意に高い遺伝子発現が認められた。また、過剰量のマンノース共存下、Man-C4-Chol 含有リポソーム/DNA 複合体の細胞取り込みおよび遺伝子発現は有意に低下し、マンノース修飾カチオン性リポソーム/DNA 複合体がマンノースレセプターを介した機構により遺伝子導入を実現することが明らかとなった。

Ⅳ. マンノース修飾カチオン性リポソームを用いた細胞選択的 *in vivo* 遺伝子導入の評価

電荷比+2.3で調製したマンノース修飾カチオン性リポソーム/DNA 複合体は、マウスに静脈内投与後、肝臓において最も高い遺伝子発現を示した。そこで静脈内投与後の遺伝子発現を構成細胞レベルで検討した結果、対照の未修飾カチオン性リポソーム複合体に比べ肝臓非実質細胞により選択的な遺伝子発現が認められ、また、これは過剰量のマンノース修飾牛血清アルブミン前投与により有意に低下した。以上より、マンノース修飾カチオン性リポソームが肝臓の非実質細胞に選択的な遺伝子キャリアーとして働き、さらに、標的細胞が類洞内腔に存在することから静脈内投与でも有効であることが示唆された。

以上、本研究で新規に開発した糖修飾カチオン性リポソームが、アジアロ糖タンパク質レセプターまたはマンノースレセプター介在性エンドサイトーシスを利用した細胞選択的遺伝子キャリアーとして有用であることが明らかとなった。また、*in vivo*での細胞選択的遺伝子導入における投与経路および複合体の物理化学的要因の影響を明らかにした。これらの知見は、今後のカチオン性リポソームを用いた遺伝子治療の開発に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

現在、遺伝子治療においては安全性の高い非ウイルス性ベクターの開発が求められ、なかでもカチオン性リポソームは *in vivo*においても高い遺伝子発現を示すことから臨床応用が期待されている。しかし、カチオン性リポソームを静脈内投与で用いた場合、遺伝子発現は肺にのみ高く他臓器への遺伝子導入は困難なため、カチオン性リポソームを基盤とする細胞選択的な遺伝子導入法の開発が重要な課題と考えられる。著者は、肝臓の構成細胞が有する糖鎖認識機構が細胞特異的に発現した比較的に厳密な基質認識性を有することに着目し、遺伝子性医薬品の肝細胞選択的送達を目的として、新規ガラクトースおよびマンノース修飾コレステロール誘導体 cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-β-D-thioglycosylethyl)amino)alkyl)formamide(Gal-C4-Chol) および cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-β-D-thiomannosylethyl)amino)alkyl)formamide(Man-C4-Chol) を合成し、両物質により表面を糖修飾したカチオン性リポソームの有用性を評価した。最初に、肝実質細胞選択的遺伝子導入ベクターの開発を目的として、肝実質細胞上に高発現しているアジアロ糖タンパク質レセプターのリガンドとなる Gal-C4-Chol を合成し、新規ガラクトース修飾カチオン性リポソームを調製した。ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 を用いて細胞への取り込みおよび遺伝子発現機構の検討を行った結果、Gal-C4-Chol リポソーム/DNA 複合体では、有意に高い遺伝子発現および細胞取り込みが認められ、また、過剰量のガラクトース共存下これらが有意に低下したことから、遺伝子導入がアジアロ糖タンパク質レセプターを介するものであることが確かめられた。また、マウスに複合体を門脈内投与すると肝臓で最も高い遺伝子発現が認められ、さらにこれが肝実質細胞に選択的であることおよび過剰量のガラクトース修飾牛血清アルブミン前投与により抑制されることを明らかにした。次に、マンノースレセプターにリガンドとして認識される Man-C4-Chol で表面修飾を施したリポソームを調製し、マウス腹腔マクロファージを用いて遺伝子発現および細胞への取り込み機構の評価を行った結果、Man-C4-Chol リポソーム/DNA 複合体が有意に高い遺伝子発現を示し、また過剰量のマンノース共存下複合体の細胞取り込みおよび遺伝子発現が有意に低下したことから、マンノースレセプターを介する機構により遺伝子導入が実現されていることが明らかとなった。さらに、本 DNA 複合体はマウスに静脈内投与後肝臓において最も高い遺伝子発現を示し、これが肝臓非実質細胞により選択的であることも確かめられた。

以上、本研究で新規に開発した糖修飾カチオン性リポソームが、アシアロ糖タンパク質レセプターまたはマンノースレセプター介在性エンドサイトーシスを利用した細胞選択的遺伝子キャリアーとして有用であることが明らかとなった。また、*in vivo*での細胞選択的遺伝子導入における複合体の物理化学的要因の影響を明らかにした。これらの知見は、今後のカチオン性リポソームを用いた遺伝子治療の開発に有用な基礎的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13年7月9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。