

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	張 光元
論文題目	Development of liver suction-mediated naked plasmid DNA delivery system for <i>in vivo</i> gene therapy (インビボ遺伝子治療を目的とした肝臓吸引に基づくプラスミド導入システムの開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>In vivo hepatocyte-targeted delivery of nucleic acid-based drugs such as plasmid DNA and siRNA would be promising for unraveling the intricate genetic and epigenetic mechanisms associated with hepatic diseases. Indeed, various transfection methods such as utilization of recombinant viral vectors or non-viral carriers with the corresponding genes help understanding of biological processes and pathways of diseases and further lead to development of novel therapeutics. However, a fundamental problem associated with the application of these technologies is development of delivery methods that carry genetic material into target cells in a manner that is efficient, nontoxic, and does not interfere with normal cellular functions. Various physical methods of naked nucleic acid transfer in vivo can bypass many of the side effects linked to viral or non-viral techniques. The other advantages are convenience of preparation, ease of handling, and lack of toxicity associated with the transfection reagents. If the devices were mounted on the head of endoscope tip, these methods could be minimally invasive and useful for <i>in vivo</i> gene delivery.</p> <p>In this study, I have developed a novel gene transfection system, i.e., suction-mediated gene transfer device in combination of a new multiple suction port with adequate attachment surface and a computer system for suction pressure control. After optimizing treatment conditions, the system was applied to CpG-free vector based plasmid DNA aiming at long-term transgene expression in mice. Therapeutic effects of hepatic transfection of CpG-free interleukin-22 (IL-22) plasmid DNA were further evaluated in a T-cell activation-induced acute hepatitis mouse models.</p> <p>Chapter 1. Transfection efficiency and safety of liver suction-mediated naked plasmid DNA delivery system</p> <p>At first, I installed a computer system to the device for controlling the suction pressure and investigated the effects of the suction conditions on the efficiency of hepatic transfection with a naked plasmid DNA encoding luciferase in mice. Using the well-controlled system, effects of the magnitude and waveform of the suction pressure and suction repeats were analyzed in terms of the luciferase expression level in mice liver. The liver suction at a pressure of -5 kPa was effective with the minimal hepatic damage determined by serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in mice. Additionally, the results indicated that the suction pressure waveform affects the luciferase expression level and at the optimal conditions, a single wave of suction is sufficient for transfection to the target site of the liver. Thus, the suction-mediated system developed was proved to give good hepatic gene transfection with minimal liver damage.</p> <p>In order to further improve the efficacy of this new gene delivery system, I next designed a new system denoted as a multiple suction device which has a suction port with variety of</p>			

numbers and area of suction windows. The results indicated that, in comparison to sequential suction of different portions of liver surface for enlarging transfection area, the new suction device gave more effective transfection and higher expression level. The developed multiple suction-mediated system was thus demonstrated to provide high hepatic gene transfection efficiency without any hepatic damage at 48 hours after suction treatment.

Chapter 2. Application of the liver suction-mediated transfection method to therapeutic gene delivery

Removal of CpG sequences from plasmid DNA is reported to enable sustained expression so that its combination with hepatocyte delivery technology should lead to development of new gene therapy for liver diseases. Taking the most effective conditions for the suction-mediated device in Chapter 1, the possibility of long term expression with a CpG-free vector in combination with this novel method was investigated. In the first step, it was confirmed that hepatocytes were the major cell population transfected by suction-mediated transfection of CpG-free vector. Next, *in vivo* transfection with plasmid DNA encoding luciferase of CpG-free vector was compared with transfection of plasmid DNA with Immediate-early Cytomegalovirus virus promoter (pCMV) based vector for clarifying long-term expression efficiency of the combination of CpG-free vector and suction-mediated hepatic gene delivery. Contrary to transient 3 days expression obtained by pCMV-based vector, 40 days sustained expression was observed for CpG-free vector of luciferase gene, suggesting that this method would have a great potential for therapy of hepatocyte-related diseases.

IL-22 was reported to play a protective role in T cell-mediated hepatitis and work as a survival factor for hepatocytes. According to the preliminary result, CpG-free plasmid DNA encoding IL-22 was constructed and used for transfection with suction-mediated system aiming at prevention of T-cell activation-induced hepatitis injury. The administration of concanavalin A (Con A) at a dose of 10 μ g/g caused significant elevations of serum AST and ALT levels at 9 hours post injection in mice, while the transfection of the CpG-free IL-22 plasmid DNA by liver suction-mediated method demonstrated marked decrease in serum AST and ALT levels, suggesting suppression of T cell-mediated hepatitis.

In conclusion, I have demonstrated the utility of the liver suction-mediated naked plasmid DNA delivery system for *in vivo* gene therapy. The combination of liver suction-mediated transfection and long-term expressing gene drug e.g., CpG-free IL-22 plasmid DNA, would be a valuable approach for hepatic injury therapy caused by T-cell activation.

(論文審査の結果の要旨)

肝細胞へのプラスミドDNAやsiRNAなどの核酸医薬の送達は、肝臓の疾患に関連する複雑な遺伝的或いは後天的な機構の解明に有効であり、実際に、ウイルス性ベクター或いは非ウイルス性遺伝子キャリアを用いた遺伝子導入実験により、疾患の生物学的特性や進展プロセスが明らかにされ新しい治療法の開発に繋がっている。しかし、こうしたアプローチにおける基本的条件として、標的細胞への効率的、安全かつ正常細胞機能を妨げない形での遺伝子導入が挙げられ、これを実現する方法として、さまざまな物理的手法による遺伝子導入法が生まれた。これらの利点としては、調製の簡便さ、操作の容易さ、組織障害性の少なさが挙げられ、例えば、こうした機能を持ったデバイスを内視鏡の先端に搭載すれば侵襲性の低いインビボ遺伝子導入法となることが期待される。

申請者は、このような観点に基づき、組織吸引に基づく遺伝子導入技術を、吸引圧を精密に制御するコンピュータシステムと多孔吸引デバイスと組み合わせ、新規遺伝子導入法を開発した。組織吸引のためのデバイスの形状或いは吸引条件の最適化を行った後、本法を遺伝子の長期発現を目的としてCpG-free型としたプラスミドDNAの導入に応用してその有用性を確認した。さらに、CpG-free型のinterleukin-22 (IL-22) プラスミドDNAを、Tリンパ球の活性化により誘導される急性肝炎モデルマウスの肝臓に遺伝子導入し、治療効果を証明した。

最初に、申請者は組織吸引デバイスに吸引圧制御用のコンピュータシステムを組み合わせ、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とするプラスミドDNAを用いて、マウス肝臓に対する遺伝子導入における吸引条件の影響を検討した。吸引圧に関しては、-5 kPaの吸引圧により、血清中aspartate aminotransferase (AST) とalanine aminotransferase (ALT) 活性の上昇によって示される肝臓への障害を認めることなく、優れた遺伝子導入効果が得られることが示された。また、吸引操作の波形についても、肝臓への障害なしに優れた遺伝子導入が得られる最適条件が求められた。さらに、遺伝子導入効率の一層の向上を目指して、異なった部位を吸引し吸引面積を増やした場合の遺伝子導入効果を、同一部位を複数回吸引した場合と比較した結果、前者が遺伝子発現を著しく増大させることを確認した。本知見に基づき、吸引部(穴)を複数個装着したデバイスを開発し、その適用が肝臓に高い遺伝子発現をもたらしかつ適用48時間後には障害を残さないことを明らかにした。

次に、吸引法による肝臓への遺伝子導入技術の治療用遺伝子への応用について検討した。CpG配列を除いたプラスミドDNAは長期遺伝子発現をもたらすことが報告されている。従って、本研究で得られた新規遺伝子導入法とCpG-free型のプラスミドDNAの組み合わせは、肝臓疾患に対する優れた遺伝子治療の方法論となると考えられる。そこで先ず、本システムにより肝臓におけるルシフェラーゼの40日にわたる長期発現が得られることを確認し、次いでT-cell活性化により惹起される肝炎に対し防御効果を示すことが報告されているIL-22遺伝子のCpG-free型プラスミドDNAによる遺伝子治療の効果を、コンカナバリンA誘発急性肝炎モデルマウスを用いて検討した。本治療により、肝炎モデルマウスでみられる血清AST及びALTレベルの上昇が顕著に抑制され、Tリンパ球の活性化に由来する急性肝炎の発症の抑制が確認された。

以上、申請者はコンピュータ制御と組み合わせた組織吸引に基づく遺伝子導入技術を開発し、これがインビボにおける肝臓への遺伝子導入に極めて有効であることを示した。また本システムを用いて遺伝子の長期発現が得られるCpG-free型のIL-22プラスミドDNAを肝臓に導入することにより、Tリンパ球活性化を原因とする肝炎の治療に成功した。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年8月22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。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降