

氏名	かわ ばた けん じ 川 端 健 二
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 394 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 薬 学 専 攻
学位論文題目	In vivo 遺伝子治療を目的としたプラスミド DNA の各種細胞への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 河 合 明 彦 教 授 伊 藤 信 行

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年、治療上有用なタンパク質をコードした遺伝子を各種細胞に導入することにより治療を行う遺伝子治療が種々の難治性疾患の治療法として注目され、導入効率に優れるウイルスベクターを用いた *ex vivo* 法を中心に活発に検討が進められている。しかしながら、より簡便かつ安全性、経済性に優れた治療を実現するためには、非ウイルスベクターを用い、これを直接投与することで遺伝子発現を可能とする *in vivo* 遺伝子導入法の確立が必要と考えられているが、そのために必要な遺伝子の体内動態などに関する生物薬剤学的情報は極めて乏しいのが現状である。そこで著者はプラスミド DNA 遺伝子のモデルとして取りあげ、遺伝子医薬品のデリバリーシステムの合理設計に必要な基礎的情報を得ることを目的に、全身投与時の基本的体内動態および遺伝子発現について検討を行った。さらに、局所投与による生理活性タンパクの遺伝子導入の可能性について種々の標的細胞を対象に検討した。

#### I. プラスミド DNA およびそのカチオン性リポソーム複合体の全身投与時の体内動態と遺伝子発現

最初に基本となる全身投与時の体内動態特性を調べるために、モデルプラスミド DNA クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ発現ベクター pCAT の <sup>32</sup>P 放射標識体を用い、マウス静脈内投与後の安定性と臓器分布を薬動学的手法により解析し、遺伝子発現との関連を検討した。解析の結果、pCAT は生体内で速やかに分解されると共に、循環血液中から肝血流速度にほぼ匹敵する速度で効率良く肝臓に取り込まれることが明らかとなったが、肝臓を含む主要臓器において遺伝子発現は認められなかった。また、コラゲナーゼ処理により肝臓構成細胞間での分布を調べた結果、pCAT は主として非実質細胞に取り込まれることが示され、さらに、取り込みがポリイノシン酸やデキストラン硫酸などの前投与により著しく阻害されるのに対しポリシチジン酸では阻害されなかったことより、pCAT がポリアニオンの立体構造を特異的に認識するスカベンジャーレセプターを介して肝非実質細胞により除去される可能性が示唆された。以上の結果より、全身投与による遺伝子導入の実現にはプラスミド DNA の安定性の改善とポリ

アニオンとしての動態特性の制御が必須と考えられたので、次に *in vitro* トランスフェクションに繁用されているカチオン性リポソームを取りあげ、デリバリーシステムとしての利用を試みた。pCAT との間に静電的相互作用に基づく複合体を形成させマウスの静脈内に投与した結果、pCAT が安定化され、同時に肝臓および肺に主に移行することが明らかとなったが、遺伝子発現に関しては、肺、心臓、腎臓、脾臓において発現が観察されたものの肝臓では認められなかった。肝取り込みの機構を検討した結果、複合体が微粒子として貪食を受けることが示唆され、これが肝臓で遺伝子発現が得られない原因の一つであることが推察された。以上より未修飾あるいはカチオン性リポソーム複合体の形で全身投与された pCAT の投与後初期の分布動態と遺伝子発現の関係が明らかとなり、見かけの分布パターンに加え組織レベルの移行機構が重要な役割を果たすことが示唆された。

## II. マウス腫瘍組織へのインターフェロン遺伝子導入

遺伝子治療の重要な標的疾患の一つである悪性腫瘍に対して、サイトカイン遺伝子を直接腫瘍組織へ導入することで治療を行うためのデリバリーシステムの開発に関する基礎的検討を行った。サイトカインの中でも免疫賦活作用の大きいインターフェロン (IFN) を選び、2種のタイプの異なるマウス由来の癌細胞、すなわち付着細胞である膀胱癌細胞株 MBT-2 および浮遊細胞である繊維肉腫細胞株 Meth A を対象に遺伝子導入を試みた。予備検討において、マウス皮下に移植された MBT-2 腫瘍はそれ自身内在的に IFN- $\beta$  を分泌しており、腫瘍増殖がこの IFN- $\beta$  によりある程度抑制されることが示されたので、これと区別するため高い免疫賦活作用の期待できる IFN- $\gamma$  の遺伝子を選び、カチオン性リポソームを利用して腫瘍局所に投与した結果、MBT-2 固形腫瘍、Meth A 腹水癌ともに IFN- $\gamma$  が発現され、*in vivo* 局所投与による抗腫瘍免疫誘導の可能性が示された。

## III. Caco-2 細胞を用いた消化管組織への遺伝子導入に関する基礎的検討

分泌性の生理活性タンパク質をコードした遺伝子を極性をもつ消化管上皮細胞に導入・発現させることができれば、消化管管腔内あるいは全身へのタンパク質のデリバリーの有力な方法論になると考えられる。そこで、消化管上皮細胞のモデルとして、ヒト大腸癌由来で通常の培養条件下で小腸上皮細胞様に分化することが知られている Caco-2 細胞を選び、IFN 遺伝子を用いて生理活性タンパク質の分泌制御の可能性について検討した。まず、遺伝子導入によりマウス IFN 安定発現株を樹立し IFN の分泌の方向を検討した結果、生合成された IFN は Caco-2 細胞の分化程度に関わらず頂側膜側と側底膜側から均等に分泌されてくることが明らかとなった。一方、二本鎖 RNA poly I: poly C とカチオン性リポソームとの複合体を用いて Caco-2 細胞およびそのマウス IFN 安定発現株にヒト IFN を誘導させた場合には、未分化の状態では両側への分泌が見られたのに対し、十分に分化した Caco-2 細胞では IFN が方向選択的に放出されることが示された。以上の結果より、消化管上皮細胞への遺伝子導入が消化管管腔内あるいは全身へのタンパク質デリバリーの方法論となり得ることが示され、さらに細胞内で合成されたタンパクの輸送機構が、安定に分泌される場合と外界からの刺激により誘導分泌される場合とで異なる可能性も示唆された。

以上、プラスミド DNA の全身投与あるいは局所投与によるタンパク質医薬品デリバリーの可能性について検討した。これらの結果は、*in vivo* 遺伝子治療を目的とした遺伝子デリバリーシステムを開発するための有用な基礎的知見になるものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

近年、ウイルスベクターを用いる遺伝子治療と並んで、非ウイルスベクターを用いる *in vivo* 遺伝子導入法が注目を集めているが、その実現に必要な遺伝子の体内動態などに関する生物薬学的情報は乏しい。著者はプラスミド DNA を遺伝子のモデルとして用い、遺伝子医薬品のデリバリーシステムの合理設計に必要な基礎的情報を得ることを目的として、全身投与時の基本的体内動態および遺伝子発現について検討を行った。また、局所投与による生理活性タンパク質の遺伝子導入の可能性について、種々の細胞を対象に検討した。最初に基本となる全身投与時の体内動態特性を調べるために、モデルプラスミド DNA クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ発現ベクター pCAT の  $^{32}\text{P}$  放射標識体を用い、マウス静脈内投与後の安定性と臓器分布を薬動学的手法を用いて解析した結果、pCAT が血液中で速やかに分解されると共に肝血流速度に近い速度で肝臓に取り込まれること、さらに本取り込みが肝非実質細胞に存在するポリアニオンの立体構造を特異的に認識するスカベンジャーレセプターを介する可能性があることが示唆された。一方、肝臓を含む何れの主要臓器においても、遺伝子の発現は認められなかった。以上の結果より、全身投与による遺伝子導入の実現にはプラスミド DNA の安定性の改善とポリアニオンとしての動態特性の制御が必要と考えられたので、次にカチオン性リポソームをキャリアーとして用いマウスに静脈注射した結果、pCAT が安定化されると共に主として肝臓および肺に集積するものの遺伝子発現は肝臓以外の臓器でのみ認められ、肝臓では pCAT とリポソームの複合体が貪食を受けるため遺伝子発現に至らないことが明らかとなった。次に、遺伝子治療の重要な標的疾患のひとつである悪性腫瘍に対して、サイトカイン遺伝子を直接導入することにより治療を行うためのデリバリーシステムの開発に関する基礎的検討を目的として、インターフェロン- $\gamma$  の遺伝子をカチオン性リポソームを用いて腫瘍局所に投与した結果、遺伝子発現が認められ、*in vivo* 局所投与による抗腫瘍免疫誘導の可能性が示唆された。一方、分泌性の生理活性タンパク質をコードした遺伝子を極性を持つ消化管上皮細胞に導入・発現させることができれば、消化管腔内あるいは全身へのタンパク質デリバリーの有力な方法になると考えられる。そこでヒト大腸癌由来で小腸上皮細胞様に分化する Caco-2 細胞を用い、インターフェロン遺伝子を用いて生理活性タンパク質の分泌制御の可能性について検討した結果、消化管上皮細胞への遺伝子導入がタンパク質デリバリーの方法論となり得ることが示され、さらにタンパク質分泌の制御の可能性を示す知見も得られた。

以上、著者はプラスミド DNA の全身投与あるいは局所投与によるタンパク質医薬品デリバリーの可能性について検討し、有用な基礎的知見を得た。

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 9 年 3 月 3 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。