

氏 名	やま うち ふみ お 山 内 文 生
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2618 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 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	工 学 研 究 科 高 分 子 化 学 専 攻
学位論文題目	Loading of Plasmid DNA on Surfaces and Gene Transfer to Mammalian Cells from the Surface (表面へのプラスミド DNA の担持とその細胞内への取り込みに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岩 田 博 夫 教 授 田 畑 泰 彦 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、基板表面へのプラスミド DNA の担持、ならびにその表面からの哺乳類細胞内への DNA の取り込みに関する研究を行い、DNA 担持表面からの遺伝子導入法を確立しようとしたものであって、序論、本編 5 章、ならびに概要からなっている。

序論では、ポストゲノム研究や再生医療研究における大規模遺伝子機能解析の現状と問題点、ならびに細胞レベルの遺伝子機能解析を網羅的に行うための遺伝子導入アレイの有用性について述べ、より簡便で高効率な遺伝子導入アレイの開発の意義を論じている。DNA 担持表面からの細胞への高効率な遺伝子導入を実現するためには、基材表面への DNA 担持、表面からの DNA の放出、細胞への DNA の導入の各段階において表面上で起こる現象を理解し、表面—DNA—細胞の相互作用を最適化することが必要であると指摘し、また、大規模な遺伝子機能解析をアレイを用いて行うためには、多種類の DNA を配列固定するための基板表面の設計が重要であると述べている。

本編第 1 章から第 3 章では、基材表面への DNA の担持方法、および細胞への導入方法に関する基礎研究の結果についてまとめている。

第 1 章では、カチオン性脂質—DNA 複合体と DNA との交互吸着による担持方法、ならびにマイクロパターン化自己組織化単分子膜をもつ金基板を用いることで、高効率かつ部位を限局した遺伝子導入が可能になることを見出している。交互吸着法を用いることによってカチオン性脂質—プラスミド DNA 複合体を、細胞への導入活性ならびに細胞内における発現活性を損なうことなく基板表面に担持できることが示された。

第 2 章では、DNA 担持金電極表面上の細胞に電気パルスを印加し、エレクトロポレーションによって DNA を細胞に導入する手法を開発している。第 1 章で述べられた遺伝子導入アレイでは、遺伝子導入のためにカチオン性脂質を用いており、初代培養細胞への遺伝子導入効率の低さ、細胞に対するカチオン性脂質の毒性の問題、遺伝子導入の時期が制御できないなど、改良すべき点が存在していた。本章で確立された方法では、これらの問題を回避し、遺伝子導入の部位と時期の両者を制御することが可能になることを実証している。

第 3 章では、第 2 章で用いられた金電極基板の表面における蛍光消光の問題を解決するため、蛍光の消光が起こり難い透明半導体電極（インジウム—スズ酸化物）を DNA 担持用基板とした。基板作製法とエレクトロポレーション条件を最適化し、DNA 担持透明半導体電極を用いた細胞への遺伝子導入法を確立している。

これらの基礎研究の結果を元に、第 4 章および第 5 章では、それぞれ遺伝子機能を効率よく解析するための遺伝子導入アレイ、ならびに血管内治療に用いられる遺伝子導入用デバイスへの応用に関する研究結果をまとめている。

第 4 章では、多種類の遺伝子が搭載された遺伝子導入アレイを用いて、胚性幹細胞の分化制御遺伝子の探索を試みている。その結果、血管前駆細胞から血管内皮細胞への分化を促進する転写因子を見出すことができた。本章により、遺伝子導入アレイを用いた細胞レベルでの効率的な機能遺伝子スクリーニング法の有効性を実証している。

第5章では、第1章で確立されたDNA担持表面からの遺伝子導入法を利用し、遺伝子を疾患部位に局所的に導入し、発現させる技術の基礎的検討を行った結果をまとめている。本章では、血管狭窄部の拡張術に用いるステントのモデル表面にカチオン性脂質-DNA複合体とDNAを交互に吸着させ、その表面上で血管内皮細胞を培養する実験を行い、DNA担持表面からの血管内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを示している。さらに、カチオン性脂質-DNA複合体とDNAの交互吸着構造によって担持DNAのヌクレアーゼによる分解が抑制できることが示され、血管内での使用にとって有利であると考察している。本章により、局所的かつ長期間の遺伝子発現を実現できる遺伝子担持ステントの開発における本手法の有効性を示している。

概要では、本編5章について、得られた成果を要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、基板表面へのプラスミドDNAの担持、ならびにその表面からの哺乳類細胞内へのDNAの取り込みに関する研究を5章にまとめたものである。得られた主な成果は次のとおりである。

- 1) カチオン性脂質-DNA複合体とDNAとの交互吸着による担持方法、ならびにマイクロパターン化自己組織化単分子膜をもつ金基板を用いることで、高効率かつ部位を限局した遺伝子導入が可能になることを見出した。
- 2) DNAを担持した金電極基板表面上の細胞に電気パルスを印加し、エレクトロポレーションによってDNAを細胞に導入する手法を確立した。この方法により、遺伝子導入の部位と時期の両者を制御することが可能になった。
- 3) 金電極基板の表面における蛍光消光の問題を解決するため、蛍光の消光が起こり難い透明半導体電極（インジウムスズ酸化物）をDNA担持用基板とする細胞へのエレクトロポレーション法を確立することができた。
- 4) 多種類の遺伝子が搭載された遺伝子導入アレイを用いることで、胚性幹細胞由来血管前駆細胞から血管内皮細胞への分化を促進する転写因子を見出した。この結果より、生物学研究における遺伝子導入アレイを用いた遺伝子スクリーニング法の有用性が示された。
- 5) 血管狭窄部の拡張術に用いるステントのモデル表面に、カチオン性脂質-DNA複合体とDNAの交互吸着法によりDNAを担持させ、この表面からの血管内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを示した。これによって、局所的かつ長期間の遺伝子発現を実現できる遺伝子担持ステントの開発における本手法の有用性が示された。

以上のように本論文は、遺伝子機能の大規模解析を可能にする遺伝子導入アレイのみならず、遺伝子の局所導入が可能な生体内治療デバイスに関する研究において学術上、実際に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18年1月20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。