

京都大学	博士（薬学）	氏名	運敬太
論文題目	超音波応答性マンノース修飾リポソームを用いた細胞選択的核酸送達法の開発に関する研究		
（論文内容の要旨） 臨床応用可能な遺伝子治療法を確立するためには、個々の疾患における標的細胞に対して選択的かつ高効率に核酸医薬品を送達する技術の開発が不可欠である。現在、標的指向性を付与した非ウイルス性キャリアの開発が進められているが、細胞膜透過やエンドソーム脱出などにおける克服すべき多くの障壁により、十分な遺伝子発現効率を達成することが難しい。一方、血管造影剤として臨床応用されているマイクロバブル製剤と超音波照射に基づく細胞穿孔を利用し、核酸医薬品の細胞質内導入量の増大を可能にするソノポレーション法が近年開発されているが、核酸医薬品の生体内投与後の分解や、核酸医薬品とマイクロバブル製剤間での体内動態の違いにより、従来のソノポレーション法では細胞選択的なin-vivo遺伝子発現を得ることが困難である。 申請者は、これら遺伝子導入法における問題の克服を目指して、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を新たに開発し、製剤の静脈内投与と超音波照射を組み合わせることにより、マンノース受容体発現細胞において選択的かつ高効率な遺伝子発現が得られることを見出した。さらに本方法による遺伝子発現増強機構を解明すると共に、DNAワクチンならびに抗炎症治療への応用に関する評価を行った。			
第1章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体による細胞選択的核酸送達 マイクロバブル製剤を用いる従来のソノポレーション法により細胞選択的な核酸送達を達成するためには、核酸医薬品の生体内安定性の改善及び生体内挙動の制御が求められる。そこでまず、プラスミドをマンノース修飾リポソーム複合体として投与し、かつソノポレーション法を併用することによるin-vivo遺伝子発現効率の増強を試みた。その結果、細胞選択的な遺伝子発現量の増大が認められた一方、核酸医薬品とマイクロバブル製剤間の体内動態の違いによる限界も認められた。そこで申請者は、超音波応答性と標的指向性を併せ持つ超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体を新たに開発した。本複合体形成によりプラスミドの血中安定性が改善され、さらに製剤の静脈内投与と超音波照射の併用により、肝臓及び脾臓において高い遺伝子発現を得ることに成功した。また、この遺伝子発現はマンノース受容体発現細胞選択的に認められ、本方法により細胞選択的かつ高効率な遺伝子発現が得られることが明らかとなった。			
第2章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体による遺伝子発現増強機構 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体を用いたin-vivo核酸送達の改善や疾患治療への応用を考える上で、遺伝子発現増強機構の解明は不可欠である。そこで核酸医薬品の標的細胞への移行性、細胞内送達機構ならびに転写活性に着目し、本方法における遺伝子発現増強機構の解明を試みた。体内動態解析の結果、マンノース修			

飾により肝臓及び脾臓内の標的細胞へのプラスミドの移行が顕著に増大することが明らかとなった。また、超音波照射に伴う細胞穿孔により、細胞質内に直接プラスミドが導入されることが示された。さらに転写因子AP-1の発現増強及びNF- κ Bの核内移行の増大が超音波照射に伴い認められた。以上、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体と超音波照射による細胞選択的な遺伝子発現の増強に対し、マンノース修飾による標的細胞への核酸移行量の増大、細胞穿孔による細胞質内への核酸送達の増強ならびに超音波照射に伴う転写活性化という三因子の複合的な関与が示唆された。

第3章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/癌特異抗原発現プラスミド複合体を利用したDNAワクチンによる癌転移・再発抑制

超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体を用いた遺伝子導入法では、癌免疫療法の標的細胞である樹状細胞への選択的かつ高効率な遺伝子導入が可能となるため、DNAワクチンとしての応用が期待できる。そこで癌特異抗原発現プラスミドを用いて作成した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体を用いたDNAワクチン効果の評価を行った。超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体と超音波照射の併用により免疫誘導を行った脾臓細胞においては、標的癌細胞特異的な細胞傷害性T細胞の誘導効果が認められ、さらに長期的な増殖抑制効果が固形腫瘍ならびに転移性腫瘍に対して示された。以上、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/プラスミド複合体と超音波照射を利用したDNAワクチンは、癌転移・再発に対する治療法になり得る可能性が示された。

第4章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/ICAM-1 siRNA複合体を利用した細胞間接着因子の発現抑制に基づく抗炎症治療

炎症反応の発生初期においては、細胞間接着因子(ICAM-1)が肝臓の血管内皮細胞上に発現誘導され、好中球の組織内浸潤に関与する。そこで超音波応答性マンノース修飾リポソーム/siRNA複合体と超音波照射を用いてICAM-1 siRNAを肝臓の血管内皮細胞内に送達し、ICAM-1発現を抑制することによる抗炎症効果を評価した。検討の結果、肝臓の血管内皮細胞内にICAM-1 siRNAを送達することで、リポポリサッカライド処理や虚血再灌流操作に伴い肝臓において惹起される急性炎症時のICAM-1発現や炎症性サイトカイン産生ならびに肝毒性の指標となるALT及びAST活性の増大を顕著に抑制できることが示され、超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したICAM-1 siRNA送達が、肝臓における急性炎症の抑制に有効であることが明らかになった。

以上、申請者はマンノース受容体認識機構ならびに超音波照射に伴う細胞穿孔を利用して、脾臓の樹状細胞や肝臓の血管内皮細胞に対して選択的かつ高効率な核酸送達を可能にする核酸導入法を開発した。また、癌特異抗原発現遺伝子やICAM-1 siRNAの標的細胞への送達に本方法を利用することで、優れた治療効果が得られることを明らかにした。以上の知見は、今後の治療上有用な核酸送達法の開発に対し、重要な基礎的情報になるものと考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子治療において、標的細胞に対して選択的かつ高効率に核酸医薬品を送達する技術の開発は重要な課題である。現在、標的指向性を付与した非ウイルス性キャリアの開発が進められているが、細胞膜透過やエンドソーム脱出などの過程における多くの障壁により、十分な遺伝子発現効率は得られていない。申請者は、糖修飾を利用した細胞特異的送達技術と、マイクロバブル製剤と超音波照射に基づくソノポレーション法を組み合わせた新規遺伝子送達技術を開発し、その評価と機構の解析および臨床応用の可能性の検討を行った。

最初にマンノース修飾リポプレックスを用いた細胞特異的な遺伝子送達法に、マイクロバブル製剤を用いる既存のソノポレーション法を組み合わせることにより、マウス *in vivo* 実験において、マンノース受容体発現細胞で選択的かつ高効率な遺伝子発現が得られることを証明した。次に本効果をより簡便な投与手技において実現するために、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を新たに開発し、肝臓の血管内皮細胞や脾臓の樹状細胞における高効率な遺伝子発現を確認した。また、本効果にはマンノース修飾による標的細胞への核酸移行量の増大、細胞穿孔による細胞質内への核酸送達の増大ならびに超音波照射に伴う転写活性化という三因子が複合的に関与することを示した。さらに、DNAワクチン療法への応用の可能性を検討した結果、癌特異抗原発現プラスミドを用いて免疫誘導を行ったマウス脾臓細胞において標的癌細胞特異的な細胞傷害性T細胞の誘導が認められ、長期的な増殖抑制効果が固形腫瘍ならびに転移性腫瘍に対して得られた。また、ICAM-1 に対する siRNA を肝臓血管内皮細胞に標的細胞に本方法を用いて送達させることで、急性炎症に対して優れた治療効果が得られることを明らかにした。以上の知見は、遺伝子治療における有用な核酸送達法の開発に対し、重要な基礎的情報を与えるものである。

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。

さらに、平成23年2月23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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降