



Title	細胞内動態制御戦略に基づく機能性材料を用いた肝臓標的遺伝子デリバリーシステムの開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鷓川, 真実
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第11413号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/55303
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Masami_Ukawa_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏名 鵜川 真実

学位論文題名

細胞内動態制御戦略に基づく機能性材料を用いた
肝臓標的遺伝子デリバリーシステムの開発

遺伝子の欠損・異常はさまざまな疾患の原因となり、従来の低分子医薬では治療が困難であった。遺伝子治療は、正常な遺伝子の補充や異常な遺伝子の修復などによって不足している遺伝子産物を補うことが出来るため、これらの疾患の画期的な治療法として期待されている。

遺伝子治療を成功させるためには、遺伝子を目的の細胞へ送り届けるための遺伝子ベクターが必要である。遺伝子ベクターは大別して、遺伝子改変したウイルスを用いたウイルスベクターと、リポソーム(脂質小胞)やポリマーなどを用いた非ウイルスベクターに分類できる。ウイルスベクターは安全性に問題があることが報告されており、非ウイルスベクターが注目されている。しかし、現状では非ウイルスベクターはウイルスベクターと比較して機能の面で劣り、さらなる改良が必要である。

本研究室では、非ウイルスベクターとして「多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND: Multifunctional Envelope-type nano device)」の開発を行ってきた。MENDは、治療遺伝子を含むプラスミドDNAをポリカチオンと凝縮化させたコアを脂質エンベロープで封入した構造をしており、脂質エンベロープにさまざまな機能性素子を修飾することが可能である。

本研究では、肝臓への遺伝子導入による遺伝子治療を目指し、肝臓標的型 MENDの開発を行った。肝臓を標的とした従来の非ウイルスベクターは、アニオン性を有する細胞膜・エンドソーム膜との融合性を高めるため、主にカチオン性表面電荷のものが用いられてきた。しかし、カチオン性表面電荷のベクターは、肝臓以外の臓器、主に肺や脾臓においても遺伝子を発現させてしまうという問題点が存在した。一方、siRNA デリバリーの分野では、肝臓を標的とした核酸送達システムとして中性電荷の脂質ナノ粒子である SNALP (Tekmira's LNP)が成功を収めている。SNALP においては、中性電荷のベクターで最も問題となるエンドソーム脱出を、pH 応答性脂質を表面に織り込むことによって解決している。pH 応答性脂質は、エンドソーム内 pH においてカチオン性を帯び、エンドソーム膜との相互作用によるエンドソームからの脱出を促進する機能を有する。そこで、本研究では中性の表面電荷を有する MEND の開発や、その機能の評価を行った。

第一章では、本研究室において *in vivo* 肝臓で高い遺伝子発現活性が得られていた中性電荷のベクターである MPC/GALA-MEND について、MPC ポリマー修飾による細胞内動態改善メカニズムの検討を行った。その結果、細胞内取り込み、遺伝子の脱被覆、核移行後遺伝子発現効率について MPC ポリマーによる改善がみられた。それ自身は中性の電荷を有する MPC ポリマーの修飾により GALA 修飾 MEND のゼータ電位の低下がみられたことから、MEND 表面における GALA のトポロジーが MPC ポリマーによって変化したことが示唆された。その結果、GALA の膜融合活性が上昇し、エンドソーム脱出に伴う脱被覆が促進し、細胞質に放出される脂質成分が減少したことにより、核移行後の遺伝子発現の阻害が抑

制されたと考えられる。細胞内取り込みの上昇は、MPC ポリマーそれ自身の細胞膜透過性によることが示唆された。これは遺伝子発現活性の向上には寄与したが、この細胞内取り込み促進作用は肝臓特異的なものではないと考えられるため、前述のカチオン性脂質の問題点の一つである臓器選択性の改善には役立たなかったと考えられる。そこで、MPC ポリマーの修飾なしに中性電荷となる脂質組成の MEND を構築することとした。

第二章では、pH 応答性脂質様物質 (ssPalmM-MEND) を用いて中性電荷の MEND を作製した。このとき、人工遺伝子ベクターのもう一つの弱点である遺伝子発現持続性の乏しさを克服するため、分子内に非メチル化 CpG 配列を含まないプラスミド DNA (CpGfree-Luc, 以下 CpG⁻と表記) を封入した。その結果、第一章の MPC/GALA-MEND や、本章において比較対象として用いたカチオン性 MEND の R8/GALA-MEND では、CpGfree-Luc を封入した場合でも遺伝子発現活性の持続はみられなかったが、ssPalmM-MEND を用いた場合には遺伝子発現活性が 2 週間程度持続した。一方、CpG 配列を含むプラスミド DNA (pcDNA3.1(+)-Luc, 以下 CpG⁺と表記) では ssPalmM-MEND を用いた場合でも持続性はみられなかった。これらのプラスミド DNA を封入した ssPalmM-MEND の持続時間は、それぞれ類似した構造のプラスミド DNA をハイドロダイナミクス法で投与した場合の持続時間の報告とほぼ一致しており、ssPalmM-MEND はプラスミド DNA の遺伝子発現持続能を阻害しない担体として有用であることが示唆された。また、遺伝子発現の持続性をもたない MEND を投与した場合でも、肝臓内遺伝子量は持続性を有する MEND と有意な差はなく、肝臓内に導入された遺伝子がサイレンシングを受けていることが示唆された。ssPalmM-MEND (CpG⁺) や、R8/GALA-MEND (CpG⁻) を投与したマウスにおいて、それぞれに特徴的な炎症性サイトカイン産生が起きたことから、遺伝子のサイレンシングに免疫反応が関わっている可能性が示唆された。一方、遺伝子発現持続性を有した ssPalmM-MEND (CpG⁻) は、炎症性サイトカインの産生がみられず、肝毒性の指標となる AST, ALT 値も低かったことから、安全性の高い遺伝子ベクターであることが示唆された。

第三章では、第二章で構築した ssPalmM-MEND の改良を行った。改良戦略として、ポリカチオンを用いずにパッケージングを行うこととした。第二章において、ベクター内のカチオン性成分が遺伝子発現のサイレンシングに関わっていることが示唆されたほか、DNA/ポリカチオンから成るコアのサイズが MEND のサイズを制限し、ヒト肝類洞血管内皮のフェネストラの通過に支障が生じるおそれがあるからである。第二章の MEND 作製に用いたエタノール希釈法において、DNA が不溶となるエタノール濃度の段階を通過することを利用し、その段階における塩濃度を調整し、不溶化した DNA の粒子径を制御することによって ssPalmM 脂質エンベロープに封入することに成功した。また、脂質組成を変化させることにより、ヒトへの適用に適した 100 nm 以下の粒子径を有する MEND や、従来の protamine コア MEND よりも 10 倍程度遺伝子発現活性の高い MEND を作製することに成功した。

以上、肝臓において持続的な遺伝子発現を可能とする MEND の開発に成功し、持続性に関わる生体反応や、ベクター構成成分の条件について知見が得られた。また、ssPalmM-MEND をポリカチオンを用いずに作製する方法を開発し、この方法を用いることにより、より高機能な MEND を作製できることが明らかとなった。