



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Extrahepatic gene delivery for cancer treatment and an investigation of factors that affect in vivo functional gene delivery [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	木村, 誠悟
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15313号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89625
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Seigo_Kimura_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 木 村 誠 悟

審査担当者	主査	教 授	原 島 秀 吉
	副査	教 授	前 仲 勝 実
	副査	准教授	山 田 勇 磨
	副査	准教授	黒 木 喜美子

学 位 論 文 題 名

Extrahepatic gene delivery for cancer treatment and an investigation of factors that affect *in vivo* functional gene delivery
(肝臓外組織への遺伝子送達及び機能的遺伝子送達に影響する因子の探索)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

世界初の siRNA 医薬品であるオンパットロや、COVID-19 に対する mRNA ワクチンの登場により、核酸医薬・遺伝子治療の時代が拓かれた。本学位論文は、核酸医薬・遺伝子治療において重要な課題となっている①肝臓外組織への核酸送達法の開発、②従来のスクリーニング法は莫大な時間とコストがかかること、③核酸医薬・遺伝子治療の発現メカニズムの解明、に関して挑戦した意欲的かつ高度な学位論文である。

核酸医薬・遺伝子治療における発現効率の組織/細胞選択性は、主として細胞内過程の違いに起因していることを定量的に示した。特に、遺伝子翻訳過程における違いが最も大きいことを示した。pDNA を脂質ナノ粒子(LNP)に搭載して脾臓の免疫担当細胞へ送達可能なシステムの同定に成功し、その応用としてがんワクチンの開発にも成功した。脾臓選択的な遺伝子送達システムは主として B 細胞とマクロファージに取り込まれた。抗腫瘍効果の誘導においては、B 細胞が主要な役割を果たしていることを解明した。

Transcribed pDNA-バーコードを用いて、種々の脂質ナノ粒子の *in vivo* スクリーニングを high-throughput 化を行い、DOPE 誘導体による作成した新規 LNP のライブラリーを作成し、解析を行った。その結果、細胞取り込みと遺伝子発現の関係には相関が見られず、細胞内動態が重要な役割を果たしていることが示唆された。

肝臓志向性の LNP と脾臓志向性の LNP を作成し、それぞれの遺伝子発現効率が何によって規定されているか検討した。両者の LNP の遺伝子発現と組織移行性を定量した。いずれも、肝臓と脾臓に良く集積していたが、遺伝子発現には 100 倍から 1000 倍の違いが見られた。次に、肝臓と脾臓において pDNA と mRNA の細胞内量と核内量を qRT-PCR で定量し、核移行量、転写効率、翻訳効率を計算した。その結果、翻訳効率には 100 倍の違いが見られたのに対して、核移行効率や転写効率に大きな違いは見られなかった。これらの結果は、遺伝子発現効率の違いは、組織移行性だけによって決まるのではなく、細胞内の過程、特に遺伝子翻訳過程が決定的に重要であることが明らかとなった。さらに、ApoE をノックアウトしたマウス、CD21/35 を抗体でブロックしたマウスを用いることで、内因性の要因 (ApoE と補体) が組織移行性を決めるだけでなく、遺伝子発現効率にも大きな役割を果たしていることが明らかとなった。即ち、肝臓志向性の LNP は ApoE 依存的に効率的な遺伝子発現が見られ、脾臓志向性の LNP は補体依存的に効率的な遺伝子発現を示した。

これらの研究成果は、遺伝子デリバリーの研究分野において、従来から謎であった組織移行性の変動要因と遺伝子発現の変動要因を分子レベルで解明することに成功した画期的研究成果といえ

る。

以上より、本研究は学位論文に十分に値すると考えられる。