

学位論文題名

特異的リガンドを有する多機能性エンベロープ型
ナノ構造体の構築と遺伝子デリバリーへの応用

学位論文内容の要旨

【はじめに】

ウイルスベクターは高い遺伝子導入能力を有しており、これまで臨床用の遺伝子ベクターとして広く用いられてきたが、近年の遺伝子治療における医療事故などのため、病原性のない非ウイルス性の人工遺伝子ベクター開発の必要性が高まっている。そのため、私はウイルスの高度な遺伝子送達システムを手本とし、核まで効率よく遺伝子を送達するための多様な仕掛けを組み込んだ新しい人工遺伝子ベクターである多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) を設計した。MEND は、エンベロープ型ウイルスの構造的特徴を取り入れ、凝縮化された DNA コアとそれを囲む脂質エンベロープから構成される。さらにエンベロープ上に多様な機能性素子を搭載することが可能である。したがって、本学位論文は 1) MEND の構築方法の開発: SUV* fusion 法の確立、と 2) MEND の機能評価、から構成されている。

【1.MEND の構築方法の開発: SUV* fusion 法の確立】

MEND の構築は次の 5 つのステップからなる。すなわち 1) DNA の凝縮、2) 界面活性剤/脂質混合ミセルの相互作用、3) 界面活性剤除去、4) 精製、5) 機能素子による表面修飾である。

まず、種々の条件において PLL による DNA の凝縮化を検討し、100 nm 以下でカチオンチャージを有する DNA コアパーティクルの調製条件 (N/P ratio = 2.4) を見出した¹⁾。次に、プラスミド DNA のパッケージング法として広く知られている Cullis らの detergent dialysis 法²⁾で DNA コアのパッケージを試みたが失敗した。そこで界面活性剤濃度を下げ、ミセルが形成されない条件を検討したところ、パッケージに成功した。本研究で見出したパッケージング条件、すなわち界面活性剤濃度が CMC 以下では、ミセルではなく、界面活性剤を含むリボソーム SUV*が存在しているため、この SUV*が fusion することにより 100 nm サイズの粒子をパッケージすることが可能になったと推測された。このことから、我々が確立したパッケージング方法を SUV* fusion 法 (特願 2004-360640) と命名した³⁾。

【2.MEND の機能評価】

MEND によって核まで遺伝子を送達するための戦略を以下のように立案した。すなわち 1) PEG によって血清成分との相互作用を避け、2) 特異的リガンドであるトランスフェリン(Tf)リガンドによってレセプターを介したエンドサイトーシスにより細胞に取りこませ、3) 膜融合ペプチド GALA によってエン

ドソーム脱出を誘起し⁴⁾ DNA コアをサイトソルに脱出させる。4) 核移行性を付与した DNA コアを核へ送達することで目的遺伝子を発現させる。

この戦略を実現するために、SUV* fusion 法によって作成した MEND に種々の機能素子を搭載し、機能評価を行った。ショ糖密度勾配分画による精製により得られた MEND を Tf 及びコレステロール化 GALA 及び PEG 化 GALA (Chol-GALA, PEG-GALA) で修飾することにより Tf/GALA 修飾 MEND を構築した。Tf のみの MEND はエンドソームから DNA コアを放出できなかったが、GALA を導入することにより DNA は効率よいエンドソーム脱出に成功した。しかしながら、有意な遺伝子発現は認められなかった。細胞内動態解析の結果、DNA コアは核膜を突破できていないことが推測された。そこで、DNA 凝縮化ポリカチオンを PLL から、核移行性が期待される protamine に代えたところ、有意な遺伝子発現がみとめられた。おそらく NLS 様の配列を有する protamine の核移行能によって高い発現効率を得られたものと推察された。Tf-MEND に Chol-GALA 及び PEG-GALA を修飾することにより、遺伝子発現活性は 10 倍増大した。ところが、Chol-GALA と PEG-GALA の併用によって遺伝子発現量は 100 倍に増大した。このことから 2 種類の GALA が協奏的に働いていることが推測された⁵⁾。次に、血清存在下における MEND の遺伝子発現活性を評価した。naked DNA 及び DNA コアパーティクル (protamine/DNA) 複合体は、血清の存在により発現活性が消失した。しかしながら、MEND の活性は、若干の低下が認められたが、有意な発現活性が保持された。このことから、PEG を有するエンベロープがバリアとして働き血清成分による DNA コアパーティクルの分解を防いでいる事が示唆された。

【結論】

本研究において、私は 1) 独自のアセンブル技術である SUV* fusion 法を開発することによって MEND の基本構築に成功した。2) MEND に特異的リガンド Tf 及びエンドソーム脱出素子 GALA を搭載することにより、効率よいエンドソーム脱出能力と高い遺伝子発現能力を有する新しい人工遺伝子ベクター MEND の開発に成功した。

【参考文献】

- 1) Kogure K, Moriguchi R, Sasaki K, Ueno M, Futaki S, Harashima H. *J Control Release* **98**:317-23 (2004).
- 2) Wheeler JJ, Palmer L, Ossanlou M, MacLachlan I, Graham RW, Zhang YP, Hope MJ, Scherrer P, Cullis PR. *Gene Ther* **6**:271-81 (1999).
- 3) Sasaki K, Kogure K, Chaki S, Kihira Y, Ueno M, Harashima H, *Int J Pharm* **296**:142-50 (2005).
- 4) Kakudo T, Chaki S, Futaki S, Nakase I, Akaji K, Kawakami T, Maruyama K, Kamiya H, Harashima H. *Biochemistry* **43**:5618-28 (2004).
- 5) Sasaki K, Chaki S, Kogure K, Hamada H, Ueno M, Futaki S, Harashima H, submitted for publication.

学位論文審査の要旨

主査	教授	原島	秀吉
副査	教授	井関	健
副査	助教授	紙谷	浩之
副査	助教授	菅原	満

学位論文題名

特異的リガンドを有する多機能性エンベロープ型 ナノ構造体の構築と遺伝子デリバリーへの応用

ウイルスベクターは臨床用の遺伝子ベクターとして広く用いられてきたが、近年の遺伝子治療における医療事故などのため、病原性のない非ウイルス性の人工遺伝子ベクター開発の必要性が高まっている。佐々木健太郎は、遺伝子を核まで効率よく送達するための多様な仕掛けを組み込んだ新しい人工遺伝子ベクターである多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) を構築し、その機能解析を行うことを研究目標に設定した。MEND は、エンベロープ型ウイルスの構造的特徴を取り入れ、凝縮化された DNA コアとそれを囲む脂質エンベロープから構成されるナノ構造体である。エンベロープ上に多様な機能性素子を搭載することにより、細胞内動態の制御が可能となり、さらに遺伝子導入機能を有する MEND の開発に成功した。

1. MEND の構築方法の開発: SUV* fusion 法の確立

MEND の構築は次の 5 つのステップからなる。すなわち 1) DNA の凝縮, 2) 界面活性剤/脂質混合ミセルの相互作用, 3) 界面活性剤除去, 4) 精製, 5) 機能素子による表面修飾である。

まず、100 nm 以下でカチオンチャージを有する DNA コアパーティクルの調製条件 (N/P ratio = 2.4) を見出した¹⁾。次に、プラスミド DNA のパッケージング法として広く知られている Cullis らの detergent dialysis 法²⁾ で DNA コアのパッケージを試みたが失敗した。そこで界面活性剤濃度を下げ、ミセルが形成されない条件を検討したところ、パッケージに成功した。界面活性剤濃度が CMC 以下では、ミセルではなく、界面活性剤を含むリポソーム SUV* が存在しているため、この SUV* が fusion することにより 100 nm サイズの粒子をパッケージすることが可能になったと推測された。そこで、この新しいパッケージ方法を SUV* fusion 法 (特願 2004-360640) と命名した³⁾。

2. MEND の機能評価

MEND によって核まで遺伝子を送達するための戦略を以下のように立案した。すなわち 1) PEG に

よって血清成分との相互作用を避け、2) 特異的リガンドであるトランスフェリン(Tf)リガンドによってレセプターを介したエンドサイトーシスにより細胞に取りこませ、3) 膜融合ペプチド GALA によってエンドソーム脱出を誘起し⁴⁾ DNA コアをサイトゾルに脱出させる。4) 核移行性を付与した DNA コアを核へ送達することで目的遺伝子を発現させる。

この戦略を実現するため、まず最初に MEND を Tf 及びコレステロール化 GALA 及び PEG 化 GALA (Chol-GALA, PEG-GALA) で修飾することにより Tf/GALA 修飾 MEND を構築した。Tf のみの MEND はエンドソームから DNA コアを放出できなかったが、GALA を導入することにより DNA の効率よいエンドソーム脱出に成功した。しかしながら、有意な遺伝子発現は認められなかった。そこで、DNA 凝縮化ポリカチオンを PLL から、NLS 様の配列を有する protamine に代えたところ、有意な遺伝子発現がみとめられ、protamine の核移行能によって高い発現効率が得られたものと推察された。Tf-MEND に Chol-GALA 及び PEG-GALA を修飾することにより、遺伝子発現活性は 10 倍増大し、Chol-GALA と PEG-GALA の併用によって遺伝子発現量は 100 倍に増大した。このことから 2 種類の GALA が協奏的に働いていることが推測された⁵⁾。次に、血清存在下における MEND の遺伝子発現活性を評価した。naked DNA 及び DNA コアパーティクル (protamine/DNA) 複合体は、血清の存在により発現活性が消失した。しかしながら、MEND の活性は、若干の低下が認められたが、有意な発現活性が保持された。このことから、PEG を有するエンベロープがバリアとして働き血清成分による DNA コアパーティクルの分解を防いでいる事が示唆された。

結論

本研究において、佐々木健太郎は 1) 独自のアSEMBル技術である SUV* fusion 法を開発することによって MEND の基本構築に成功した。2) MEND に特異的リガンド Tf 及びエンドソーム脱出因子 GALA を搭載することにより、効率よいエンドソーム脱出能力と高い遺伝子発現能力を有する新しい人工遺伝子ベクター-MEND の開発に成功した。以上の研究成果につき主査、副査で審査した結果、博士(薬学)を授与するに十分値すると判断した。

参考文献

- 1) Kogure K et al., *J Control Release* **98**:317-23 (2004).
- 2) Wheeler JJ et al., *Gene Ther* **6**:271-81 (1999).
- 3) Sasaki K et al., *Int J Pharm* **296**:142-50 (2005).
- 4) Kakudo T et al., *Biochemistry* **43**:5618-28 (2004).
- 5) Sasaki K et al., submitted for publication.