

学位論文題名

ウイルスベクターと人工ベクターの
細胞内動態素過程の定量的解析

学位論文内容の要旨

【序論】

ガンなどの重篤な疾患に対する遺伝子治療において、安全性の高い人工ベクターの開発は大きな鍵を握ると考えられている。一方、発現効率の低さがネックとなり臨床応用が制限されているのが現状である。

一般的に外来遺伝子の発現には細胞内輸送の様々な過程（細胞膜への結合・取り込み・エンドソーム脱出・核移行・核内転写・翻訳）が律速となり、これらを効率よく突破することが発現効率の高い非ウイルスベクターの開発の成功の鍵である。

しかし、これまでの人工遺伝子ベクターの開発においては、お手本となるウイルスと比べて細胞内動態素過程に関する定量的情報がない為に、手探り状態での開発が強いられてきた。その原因の1つとして最適な評価系が確立されていないことが挙げられる。

本研究では人工遺伝子ベクターの細胞内動態の各素過程をウイルスベクターと定量的に比較する新たな系を開発し、どの素過程が律速であるのか明らかとした。また、ウイルスベクターの代表としてアデノウイルスベクター (Ad) を、人工ベクターの代表として遺伝子導入試薬 LipofectAMINE PLUS (LFN) をモデルとし、非ウイルスベクターの開発へフィードバックさせるため、その差を生み出すメカニズムについても解析を行った。

【結果および考察】

1. Ad および LFN の細胞内動態素過程の定量的解析

Ad および LFN による遺伝子発現のタイムコースを検討した結果、両ベクターともトランスフェクション後 3 時間から遺伝子発現が認められ、以降の両ベクターの発現活性は、ほぼ同程度であったことから、LFN は Ad と同等のスピードで核まで遺伝子を送達することや Ad に匹敵する発現活性を有することが示唆された。

しかし、real time PCR により Dose をルシフェラーゼ遺伝子のコピー数として比較した結果、同程度の活性を示すのに、LFN は Ad に比べて数千から 1 万倍のコピー数が必要であった。この LFN が Ad よりも著しく発現効率が低い原因を追究する為に、Ad と LFN で同程度の遺伝子発現活性を示す Dose (Ad : 200 copies, LFN : 6.7×10^5 copies) における細胞内動態を定量的に比較した。

LFN と Ad の細胞への取り込み過程を比較した結果、取り込み効率は、LFN で Dose の 45% (3.0×10^5 copies), Ad で Dose の 10% (20 copies) であり、取り込み過程は LFN の方が効率的であった。また細胞への結合効率は約 4 倍 LFN の方が高かったが、取り込み速度定数はほぼ同程度であったことから、LFN の高い取りこみ効率は、結合過程に依存することが明らかとなった。

細胞内動態の各素過程を定量化するために、筆者の所属する研究室において開発された共焦点レーザー顕微鏡画像を用いた DNA の細胞内オルガネラ局在率の定量法 (CIDIQ) に real time

PCR を組み合わせることにより、新規の細胞内オルガネラ内の外来遺伝子定量法を開発した。

この定量系を用いて、両ベクターの細胞内動態を比較した結果、エンドソーム脱出効率に関してはほぼ同程度であった。また、核移行率は Ad の方が若干高かったが、その差は約 2 倍程度であり、Ad と LFN の数千倍の Dose の差を説明するのは不可能であった。

さらに両ベクターによる外来遺伝子の核内への局在量を比較した結果、同程度の発現を示すのに LFN の方が、Ad よりも数千倍多くの遺伝子が必要であった。つまり、1 コピーあたりの発現活性は Ad の方が著しく高く、実際の遺伝子発現を核内遺伝子量で除することにより計算される発現効率は約 8000 倍異なることが明らかとなった。

したがって、Ad と LFN の数千倍の発現活性の差を説明する支配要因は細胞内動態ではなく、核内到達後の発現効率であることが示唆された。

3. Ad および LFN の転写過程に関する比較評価

Ad の高い核内移行後の発現活性は、セントラルドグマ（転写・mRNA の核外移行・翻訳）のどの過程への寄与が高いのかを明らかにする為に、両ベクターによる mRNA 発現量を real time RT-PCR を用いて定量的に比較した結果、Ad の方が転写効率が十数倍高いことが示された。この Ad が LFN よりも高い転写効率を示すメカニズムについて解明するために、仮説として両ベクターの核内ダイナミクスに着目し、① DNA 配列の違い、② Ad コアタンパク質の影響、③ 核内転写活性領域への局在、④ 遺伝子ベクターの decondensation、⑤ 核内構造体（核小体・PML-body）への影響、の 5 つの観点から検討を行った。

核内マイクロインジェクション法により、Ad genome または pDNA の発現効率を比較した結果、両 DNA 間で著しい違いは認められなかったことから、転写への DNA 配列の影響は小さいことが示唆された。さらに、Ad コアタンパク質および核内構造体の転写への寄与は低いことも示唆された。

一方、free 型 DNA のみを検出することができる fluorescence in situ hybridization (FISH) を用いて両ベクターの free 型 DNA 量を比較した結果、Ad の方が decondensation 効率の高いことが明らかとなり、さらに LFN の場合、pDNA は核内にランダムに存在していたのに対して、Ad の場合、free 型 DNA の全てが転写活性領域に局在していた。このことから、Ad は LFN よりも decondensation 能力並びに転写活性領域へのターゲティング能が高いことが、両者の転写効率の差の支配要因である可能性が示唆された。

4. Ad および LFN の転写後の過程に関する比較評価

タンパク質発現量を細胞内 mRNA 量で除することにより、mRNA の核外移行および翻訳効率を算出した結果、Ad の方が数百倍高いことが明らかとなった。この差を生み出すメカニズムを解明するために、表面が正に帯電している LFN は Ad に比べて mRNA と強く相互作用することに着目し、mRNA-LFN complex 形成による mRNA の核外移行または翻訳過程における影響を検討した。mRNA の核外移行効率を核内 mRNA を定量することにより評価したところ、両ベクター間で著しい違いは認められなかった。一方、翻訳過程への影響を in vitro 翻訳系を用いて検討した結果、LFN は Ad に比べて、顕著にタンパク質合成を抑制し、さらに細胞系を用いた検討においても同様の結果を示した。このことから、LFN は細胞質において、合成された mRNA とベクターが相互作用することにより Ad に比べて翻訳過程が著しく阻害されることが示唆された。

【結語】

本研究は、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの細胞内動態の素過程を定量的に評価する系を新たに開発することにより、両者を直接比較することに初めて成功した。

今回用いた LFN においては、Ad に比べて同程度の細胞内動態を誇り、核移行後の発現活性に差があることが明らかとなった。今後 in vivo に適応できるベクター開発には、Ad あるいは LFN と同程度の核輸送を達成する事は不可欠であり、細胞内輸送の観点からも開発を進める必要

があるが、今回新たな課題として、核内移行後の転写・翻訳活性も改善することが、Ad に匹敵するベクター開発へ繋がると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 島 秀 吉
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 助 教 授 紙 谷 浩 之
副 査 助 教 授 松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

ウイルスベクターと人工ベクターの 細胞内動態素過程の定量的解析

人工のデリバリーシステムは、遺伝子発現効率が低い事がボトルネックとなっており、臨床応用が制限されているのが現状である。本博士論文では、強力な遺伝子効率を誇るアデノウイルスをレファレンスにとり、現在の人工ベクターの弱点を細胞内動態の観点から明らかとしている。その結果、高い遺伝子発現を誇る人工ベクターである LipofectAMINE PLUS においてさえ、アデノウイルスと同等のレベルのトランスフェクション活性を示すために必要な DOSE は数千倍必要である事が示された。新規に確立した細胞内局在の定量法と定量的 PCR を駆使し、両者の細胞内動態を比較した結果、LipofectAMINE PLUS はアデノウイルスと同程度の効率で核へ遺伝子を送達する事が可能であり、両者の数千倍の遺伝子発現効率の違いは、細胞内動態ではなく核へ送達した後の過程に起因する事を明らかとしている。さらに、細胞内、核内に存在する mRNA 量を定量化する事により、核内到達後の遺伝子発現効率の違いは、mRNA の核外移行には起因しない事や、核内転写効率で 20 倍、翻訳効率で 400 倍アデノウイルスの方が優れている事を明らかとしている。さらに、イメージング技術を駆使する事により、核内転写においては、遺伝子の人工ベクターからの解離過程が、また、翻訳過程においては、ベクターと RNA の相互作用が関与する事を突き止めている。

以上、本研究は、人工ベクターの問題点を細胞内動態から定量的に示した初めての例であり、極めてオリジナリティーの高い研究である。さらに、メカニズムにも言及し、核内のべ

クターからの decondensation と、RNA との結合性という、今後の人工ベクター開発を行う上での指針を明確に示した極めて重要な研究成果である。以上の結果から、本研究は博士（薬学）の学位を授与するに十分値すると認めた。