

学位論文題名

細胞内動態制御による遺伝子ナノキャリアの 機能性亢進と肝臓を標的とした遺伝子デリバリーへの応用

学位論文内容の要旨

序章

効率的な遺伝子キャリアを開発するためには、遺伝子を導入してから発現するまでの、細胞内取り込み、エンドソーム脱出、核移行、転写、翻訳といった様々な細胞内動態素過程を効率よく進むことのできる遺伝子キャリアを設計することが非常に重要であると考えられる。当研究室では、これまでに遺伝子キャリアとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)の開発に取り組んできた。MENDはポリカチオンにより凝縮化されたプラスミドDNAやsiRNAなどの機能性核酸を脂質二重膜が覆う構造をしており、脂質膜を介して様々な機能性素子を修飾する事や、トポロジーを制御することが可能である。

本研究では、機能性素子をMENDに修飾し、細胞内動態を改善することでMENDの機能性亢進を試みた。また、MENDを用いた*in vivo*への遺伝子デリバリーシステムの構築を試みたので、以下に報告する。

【結果および考察】

1. 糖修飾MENDを用いた遺伝子の核移行性促進

非ウイルスベクターにおける遺伝子導入効率の低さの大きな原因の一つとして、外来遺伝子の核移行性が極めて低いことが挙げられ、生体内の90%以上を占めている非分裂細胞を対象とした遺伝子送達において核膜は非常に大きな障壁となっている。この障壁を突破するための戦略として、核移行性シグナル(NLS)を遺伝子キャリアに修飾する方法が有用であると考えられる。本研究では、新規核移行性シグナルとして注目されている糖に着目した。糖修飾脂質(Sugar-Cholesterol)を合成し、MEND脂質膜への糖修飾を行うとともに、分裂細胞および非分裂細胞のモデルとして、ヒドロキシ尿素により細胞周期を同調した細胞を用いて糖修飾MENDの機能評価を行った。

ルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミドDNAを塩基性タンパク質であるプロタミンで凝縮化したのち、膜融合性脂質であるDOPE、膜安定化脂質であるCholesterolおよびSugar-Cholesterol、さらにはリソソームによる分解からの回避が可能な経路であるマクロピノサイトーシスを誘起するためのステアリル化アルギニン8重合体(STR-R8)から構成される脂質膜に封入することで調製したMENDを用いて遺伝子を導入した。遺伝子導入6時間後の遺伝子発現活性を評価した結果、分裂細胞、同調細胞の両方において、糖の種類および修飾密度に依存した遺伝子発現の有意な上昇が認められた。

次に、その遺伝子発現の上昇が糖修飾による遺伝子の核移行性上昇によるかどうかを調べるために、MENDを用いて遺伝子導入した細胞を回収後の細胞内プラスミドDNA量および核内プラスミドDNA量をReal-time PCR法にて測定した結果、糖修飾による遺伝子の核移行量の有意な上昇が認められた。一方、糖修飾により細胞内取り込み量はほとんど変化しなかったことから、糖により遺伝子の核移行過程が促進されたことが示唆された。また、蛍光標識したプラスミドDNAを用いて糖修飾MENDの細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡で解析することで、個々の細胞の核内に局在するプラスミドDNA量を評価した。取得した画像を基に核移行量を定量的に評価した結果、遺伝子定量的結果と同様に、糖修

飾により遺伝子の核移行性が上昇することが示唆された。

以上の結果より、核移行性素子としての糖の有用性が示唆されるとともに、遺伝子の核移行性の促進が、高い遺伝子発現につながるということが示唆された。

2. Tetraethyleneglycol 修飾による遺伝子キャリアの均一性・機能性向上

本研究では、水溶性ポリマーである Tetraethyleneglycol (TEG) を MEND の脂質膜に修飾することで、MEND のサイズ制御および均一化を試みた。まず、TEG を MEND に修飾するために、TEG の Cholesterol 誘導体を用いた。DOPE、Cholesterol、TEG-Cholesterol、STR-R8 を基本脂質組成として、TEG-Cholesterol を異なる密度(0%、20%、40%) で含有する脂質フィルムを調製し、単純水和法にて DNA コア粒子を封入することにより MEND を調製した。TEG を MEND の脂質膜に修飾したところ、修飾密度に依存して粒子サイズが減少し、また粒子の均一性の上昇も認められ、TEG 修飾による小さくかつ均一性を有する粒子の形成が確認された。また、これらの MEND を用いて HeLa 細胞に遺伝子導入を行ったところ、TEG 含量に依存して遺伝子発現が大きく上昇した。TEG-MEND の細胞内動態を解析し、この活性上昇を詳細に調べたところ、細胞内取り込み量および核内での転写効率の上昇が明らかとなり、これらの過程の促進により遺伝子発現効率が上昇したことが示唆された。

以上の結果より、TEG は、粒子のサイズ制御や均一化に有用であるだけでなく、MEND の細胞内動態を改善し、遺伝子発現を促進する点からも、非常に有用な素子であることが明らかとなった。

3. 肝臓を標的とした遺伝子送達システムの開発

肝臓は生体の維持に必要な多岐にわたる生理機能を営んでおり、肝硬変やC型肝炎など、従来の薬物治療では根治の困難な様々な疾患に対して、遺伝子治療は極めて有用な治療法となると考えられる。これまでに、肝臓を標的とした遺伝子送達研究は数多く行われていた。しかし、遺伝子キャリアを静脈内投与した場合、肝臓への送達は確認できるが、肝臓における遺伝子発現が低いことが問題であり、実用化に至るような遺伝子キャリアは皆無である。この原因として、肝臓における細胞内動態に問題があると考え、細胞内動態の改善の観点から肝臓において効率的な遺伝子発現を可能とする遺伝子送達システムの開発を試みた。マウスに尾静脈投与した後、肝臓におけるルシフェラーゼ活性を測定する事で遺伝子発現を評価した。まず肝臓への遺伝子送達に適した MEND の基本脂質組成を検討したところ、カチオン性脂質(DOTAP、DOTMA)と Cholesterol から構成される脂質組成が適していることが示唆された。次に、MEND に機能性素子を修飾し、細胞内動態の改善を試みたところ、エンドソーム脱出促進素子である GALA および核移行性促進素子である糖(Maltotriose)の修飾により遺伝子発現活性が大きく上昇した。また、MEND の肝臓移行量を測定し、移行量あたりの発現活性を評価した結果、機能性素子の修飾により発現活性が上昇することが明らかになり、機能性素子による細胞内動態の改善が示唆された。

また、別の新たなアプローチとして、生体適合性を有する MPC ポリマーを用いた肝臓マクロファージによる認識からの回避戦略を試みた。その結果、MEND に MPC および GALA を修飾することで遺伝子発現活性が大きく向上した。また、MPC/GALA MEND による遺伝子発現レベルは市販の *in vivo* 遺伝子導入試薬(*in vivo* jetPEI-Gal)と比較してはるかに優れたものであった。また、血清 ALT 値を測定し肝毒性を評価した結果、*in vivo* jetPEI-Gal においては基準値を超える値を示したのに対して、MEND においては未投与の正常マウスと同等であった。したがって、本研究において構築した MEND は肝臓において高効率かつ低毒性な遺伝子キャリアであることが示唆された。

【まとめ】

1. 遺伝子の核移行性を促進する機能性素子として糖を見出し、遺伝子の核移行性の促進効果により遺伝子発現活性が上昇することが示唆された。
2. TEG を MEND の脂質膜に修飾することで、小さくかつ均一性の高い粒子設計を可能にするとともに、細胞内動態の改善に有用であることが示唆された。
3. 機能性素子を MEND の脂質膜に修飾することで、細胞内動態を改善し、肝臓における遺伝子発現活性を飛躍的に上昇させることに成功した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 島 秀 吉

副 査 教 授 松 田 彰

副 査 准教授 紙 谷 浩 之

副 査 准教授 南 川 典 昭

学 位 論 文 題 名

細胞内動態制御による遺伝子ナノキャリアの 機能性亢進と肝臓を標的とした遺伝子デリバリーへの応用

効率的な遺伝子キャリアを開発するためには、遺伝子を導入してから発現するまでの様々な細胞内動態素過程を効率よく進むことのできるキャリアの設計が非常に重要であると考えられる。

本論文は、機能性素子で多機能性エンベロップ型ナノ構造体（以下、MENDと略）を機能修飾し、細胞内動態を改善することでMENDの機能性亢進を行なった。さらに、MENDの機能を拡張し、*in vivo* 遺伝子送達システムの構築に成功した。

第一章では、外来遺伝子の核移行性促進を目指して、糖修飾MENDの開発を行った。非ウイルス性遺伝子キャリアの遺伝子導入効率が低い原因の一つとして、外来遺伝子の核移行性が極めて低いことが挙げられる。この障壁を突破する戦略として、核移行性シグナル（NLS）を遺伝子キャリアに修飾する方法が有用であると考え、本研究では、新規NLSである糖に着目した。糖のcholesterol誘導体を用いることで、MENDの糖修飾を行った。分裂細胞、および非分裂細胞のモデルとしてヒドロキシ尿素により細胞周期を同調した細胞を用いて、糖修飾MENDの機能評価を行った。まず、遺伝子導入効率を評価した結果、分裂細胞、同調細胞の両方において、MENDの糖修飾により遺伝子導入効率が有意に上昇することが明らかになった。次に、糖修飾MENDの細胞内動態を解析した結果、MENDを糖修飾することにより遺伝子の核移行性が有意に上昇することが示された。以上の結果より、核移行性素子としての糖の有用性を示すと共に、遺伝子の核移行性の促進が高い遺伝子導入効率につながることを明らかにした。

第二章では、水溶性ポリマーであるtetraethyleneglycol (TEG) でMENDを修飾することで、MENDのサイズ制御および均一化を試みた。まず、MENDをTEGで修飾するために、TEGのcholesterol誘導体を用いた。TEGでMENDを修飾したところ、サイズが小さくかつ均一性を有する粒子の形成を確認した。それに加えて、TEG修飾MENDを用いてHeLa細胞に遺伝子導入を行った結果、

TEG 含量に依存して遺伝子発現が大きく上昇した。さらに、TEG-MEND の細胞内動態を解析し、この活性上昇機構を詳細に調べたところ、細胞内取り込み効率および核内転写効率の上昇に起因することが明らかとなった。

第三章および第四章では、肝臓への遺伝子送達システムの確立を目指し、*in vivo* 遺伝子送達用 MEND の開発に取り組んだ。肝臓疾患に対する遺伝子治療は極めて有用な治療法になると考えられる。しかしながら、遺伝子キャリアを静脈内投与した場合に、肝臓における遺伝子発現は極めて低いのが現状である。この原因として、肝臓常在性マクロファージによる貪食や、肝実質細胞による分解が考えられる。従って、従来の遺伝子キャリアは標的部位である実質細胞核への送達能力に乏しいものと考えられる。

第三章では、肝実質細胞における細胞内動態に問題があると考え、肝臓で効率的な遺伝子発現を可能とする MEND の開発を試みた。まず、肝臓への遺伝子送達に適した MEND の基本脂質組成を検討し、カチオン性脂質と cholesterol から構成される脂質組成が適していることを見出した。次に、MEND に機能性素子を修飾し、細胞内動態の改善を試みた結果、エンドソーム脱出素子である GALA および核移行性素子である糖 (maltotriose) の修飾により遺伝子導入効率を大きく上昇させることに成功した。

第四章では、肝臓マクロファージによる認識回避を目指して、生体適合性を有する MPC ポリマーを用いた戦略を検証した。その結果、MEND に MPC および GALA を修飾することで遺伝子導入効率が大きく向上することに成功した。第四章後半では、本研究で開発された MEND の遺伝子導入効率および肝傷害を評価することで遺伝子キャリアとしての有効性および安全性の両面を評価した。その結果、市販の遺伝子導入試薬を含む他の *in vivo* 遺伝子キャリアと比較して、MEND は高効率かつ低毒性な遺伝子キャリアであることが示された。

以上、著者は、多機能性エンベロップ型ナノ構造体(MEND)を細胞内動態の観点から、エンドソーム脱出、核移行という2大バリアーを突破する革新的技術の開発に成功した。本研究は、遺伝子治療や再生医療など21世紀にその実現が期待されている革新的医療の実現に大きく貢献するものと確信する。

よって、著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。