

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子ベクターとして機能する高分子ミセル型ナノ構造体に関する研究

指導教官 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月進学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 位高 啓史

1.緒言

近年分子生物学の進歩を背景に、非致死性の加齢疾患、変性疾患に対する遺伝子治療も視野に入り始めている。しかし、その実現に向けて最も大きな問題点のひとつは、遺伝子デリバリーシステムである。遺伝子導入効率の問題から、従来はウイルスベクターを用いる手法が中心であったが、死亡事故の発生等、その安全性には未だ問題点が多い。特に整形外科領域のような非致死性疾患の治療を目的とする場合はこの点は特に大きな障壁となり、安全な非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムへのニーズは非常に大きいと考えられる。

一方、現状の非ウイルス性システムとしては、カチオン性リン脂質と DNA との (lipoplex) およびカチオン性高分子 (ポリマー) との会合体 (polyplex) がこれまで活発に研究されているが、遺伝子導入効率や体内、生理的環境下での安定性に問題があり、*in vivo* ベクターとしての使用には大きな障害が残る状況である。

これらの点を解決すべく、近年新しい型の polyplex 型システムとして、高分子ミセル型ナノ構造体を利用した遺伝子デリバリーが考案された。これは水溶性のポリエチレングリコール (PEG) とカチオン性連鎖であるポリリシン (PLL) とを連結したブロック共重合体 (PEG-PLL) を用い、天然のポリアニオンである DNA と混合することによって調製されるポリイオンコンプレックス (PIC) 型高分子ミセルである。その特徴として、凝縮した分子形態に転移した DNA 分子の周囲を、親水性でフレキシビリティに

富んだ PEG 層が覆うという、二層構造からなる水溶性会合体となっており、粒径は 90 ~100nm、DNA 分子のヌクレアーゼ耐性が非常に高まっていることが分かっている。

本研究は高分子ミセルの遺伝子デリバリーシステムとしての生物学的機能、およびその臨床応用への可能性を明らかにすることを目的に、以下の検討を行った。

2. 培養細胞に対する高分子ミセル型ナノ構造体による遺伝子導入

293 細胞に対する遺伝子導入を行ったところ、高分子ミセルでは、カチオン電荷と pDNA との混合比 (r) によって大きく遺伝子発現が異なり、r=2、クロロキン 100 μ M 存在下では、lipoplex を上回るレベルの遺伝子発現が得られた。また、高分子ミセルと同一のカチオン鎖である PLL と pDNA との complex (Plys-polyplex) を大きく上回る遺伝子発現が得られ、その構造が遺伝子導入に対して有効であることが示された。細胞毒性に関しても、lipoplex, Plys-polyplex とくらべ、高分子ミセルでは、非常に細胞毒性の低いことが示された。lipoplex, Plys-polyplex はいずれもカチオン性の complex であるため細胞に対する毒性が大きくなる一方、高分子ミセルは周囲を PEG で覆われているため、その表面電荷はほぼニュートラルであり、そのため非常に細胞毒性が低い結果となったものと考えられた。

次いで、遺伝子発現を増加させる試薬として、クロロキン同類のヒドロキシクロロキンに関して検討した。293 細胞に対する実験では、遺伝子発現を増加させる効果はヒドロキシクロロキンはクロロキンと同様であり、100 μ M の培地中濃度で最も効果が高かった。一方、両者とも濃度依存性に細胞毒性が見られたが、50 μ M および 100 μ M での添加後 2 時間では、ヒドロキシクロロキンは有意に毒性の低い結果となった。

以上の検討から、最もよい遺伝子発現の得られる可能性が高い条件を用いて、整形外科領域における遺伝子治療への展望として、macrophage、骨芽細胞、Schwann cell の各初代培養株細胞、およびヒト間葉系幹細胞に対する、高分子ミセルを用いた遺伝子導入を行った。いずれの細胞においても、導入効率は細胞種によって異なるものの、レポーター遺伝子の発現が観察された。

3. 生理的環境下における高分子ミセル型ナノ構造体による遺伝子導入

種々の非ウィルス性遺伝子デリバリーシステムにおいて、生理的環境下での安定性は遺伝子導入効率と密接に関連する。高分子ミセル型ナノ構造体は、凝縮された pDNA 周囲を PEG が覆うという 2 層構造を取り、周囲環境に影響されない安定性を持つことが期待される。この評価のため、fluorescein、X-rhodamine の蛍光 2 重標識した pDNA を用い、その complex 内での形態変化を 2 蛍光分子間のエネルギー移動 fluorescence resonance energy transfer (FRET) によって評価する新手法を考案した。

まず、PEG-PLL と pDNA による高分子ミセルの形成、およびミセル溶液へのアニオンの添加による pDNA の放出に伴って、FRET による蛍光スペクトル変化が観察された。さらに、他の lipoplex、Plys-polyplex においてもスペクトル変化は同様に見られ、fluorescein、X-rhodamine それぞれの蛍光強度比を計測することにより、complex の評価が可能であった。

血清中での各 complex の安定性評価のため、20%血清の存在下での蛍光測定を経時的

に行くと、高分子ミセルでは $r=1, 2$ とも、血清存在下においても約 12 時間に渡り蛍光強度比はほぼ一定に保たれた。一方 Plys-polyplex では数時間のうちに変化が生じ、lipoplex では血清添加直後より急激な変化を示した。各 complex を血清中で preincubation した後遺伝子導入に用いると、lipoplex では遺伝子発現には大きな減少を生ずる一方、ミセルではその影響は軽微であり、FRET によって観察される血清中での安定性と非常によく相関した。

一方、高分子ミセルの血清中での安定性は、PLL と pDNA との混合比(r)に関係しない結果となったが、遺伝子導入効率は混合比によって大きく異なった。この原因として、血清中に incubation した各 complex から pDNA を抽出し、電気泳動を行ったところ、 $r=1, 2$ によって pDNA の topology が大きく異なる結果となった。 $r=2$ ミセルでは血清中での incubation 後も super coiled pDNA が良好に保たれたのに対し、 $r=1$ では super coil のバンドは消失し、大部の pDNA は linear まで変性され、 $r=1$ ミセルにおける遺伝子導入効率の低さは、この pDNA の topology の違いが原因となっている可能性が考えられた。一方、lipoplex では意外なことに、pDNA topology は極めて安定に保たれ、血清存在下における lipoplex の遺伝子導入効率の減少は、内包される pDNA の変性では説明できなかった。

次に、標識 pDNA を用いて調製した各 complex を用いて、細胞への取り込みをフローサイトメトリーにて解析したところ、血清中での preincubation 後、lipoplex では取り込みが大きく減少した。これが血清存在下での lipoplex での遺伝子発現減少の原因と考えられ、この取り込みの変化は lipoplex の巨大粒子化が原因となっているものと推測された。一方、ミセルでは細胞の取り込みにはほとんど変化が見られず、血清中での安定性および血清存在下での優れた遺伝子導入能と非常によく相関した。

4. 考察

高分子ミセル型ナノ構造体は、生理的環境下での安定性に非常に優れることが確認された。その安定性は、生理的環境下での遺伝子ベクターとしての機能とも密接に関係しており、高分子ミセルが *in vivo* の遺伝子デリバリーに対して、非常に有効な手段となりうることを確認された。一方、高分子ミセルによって得られる遺伝子導入効率は、現状ではウィルスベクターに及ばない。これを改善する目的で用いたヒドロキシクロロキンは、その遺伝子発現に対する効果は従来からのクロロキンと同程度であり、一方細胞毒性はクロロキンよりやや低かった。ヒドロキシクロロキンは、実際に関節リウマチ等の疾患治療として全身投与されている薬剤であり、これと高分子ミセルによるデリバリーを組み合わせることにより、効率的な遺伝子導入を達成することは、十分検討に値する手段と考えられる。

今後の展開として、ブロック共重合体のカチオン部分にポリリシン以外の機能性分子を用いることが考えられ、プロトンスポンジ効果を持つポリエチレンジアミン等を用いたブロック共重合体によって、効率よい遺伝子導入の実現が期待される。また、粒子外殻への機能性分子 (リガンド) の連結により、特定のレセプターを持つ標的細胞、組織への指向性を持たせることが可能と考えられる。また、工学的手法による scaffold との組み合わせ等によって、ティッシュエンジニアリングへの応用の可能性も視野に入る。以

上のように、新しい *in vivo* 遺伝子デリバリーシステムとして、高分子ミセル型ナノ構造体は今後大きく発展する可能性を秘めているものと考えられた。