

論文内容の要旨

論文題目 Study on Electroporation-based Gene Therapy System for Artery
(エレクトロポレーションを用いる動脈の遺伝子治療システムに
関する研究)

氏名 許 文豪 (コウ ブンホウ)

近年遺伝子工学の進歩に伴い、医学の世界に遺伝子治療法が開発、今日まで治療ができなかった病気の治療に応用可能となってきた。そのため遺伝子治療は医学や科学の研究者に大いに注目されている。遺伝子治療は遺伝子を細胞に導入することによって、遺伝子機能の置き換え、修復を行い病気や遺伝的欠損を治療する治療法である。現在、最も効率が良い遺伝子導入方法として、アデノウイルスや超音波法、エレクトロポレーションによる導入の促進が検討されている。従来行われてきた、アデノウイルスによる遺伝子導入では、遺伝物質はウイルスを担体として細胞膜を通過し、細胞内へ導入される。しかし、アデノウイルスを用いる方法では、ウイルス量を高濃度で使用するため、タンパク質生成への影響や過剰な免疫反応、繰り返す導入を行うことが難しいなどの問題がある。また、ウイルスを担体とできる遺伝子物質サイズは 5 kilobases が上限である。

そのため、ウイルスに代わり副作用の少ないプラスミドを遺伝子の担体に用いる方法として、超音波を用いる方法やエレクトロポレーションによる方法が検討されている。超音波法では、超音波振動により細胞膜の透過性を上げ遺伝子の導入を行う。一方、エレクトロポレーションでは短い電気パルスによって細胞膜が一時的に破壊され小孔が形成される現象を利用し遺伝子の導入を行っている。エレクトロポレーションを利用する方が、超音波に比べ遺伝子導入効率が 7 倍高いという報告がある。

上記3種類の遺伝子導入方法を比較すると、適切な条件下で行えば、エレクトロポレーションが最も遺伝子治療に適した遺伝子導入方法と考えられる。遺伝子導入効率に影響する条件として、導入対象組織の電場分布が報告されている。その為、電極形状、電極位置が遺伝子導入効率に影響すると考えられるが電極形状と位置に関する十分な報告はなく、現状では、電極構成は経験によって決定されている。その上、動脈への遺伝子導入を対象とした適切な電極と電場分布に関する研究が報告されていなかった。また、動脈に電極を当てるには、動脈へのアプローチのしにくさや動脈の細さを考慮しなくてはならず、動脈への遺伝子導入に適した電極の開発も必要とされている。

本研究の目的はエレクトロポレーションによる動脈壁への遺伝子導入システムにおいて、高い遺伝子治療効率、安全な治療、最小限の細胞の損傷、を実現するための適切な条件を明らかにすることである。適切な電極を設計するためにシミュレーションモデルを作成し、電場分布と電流を検討した。さらに、シミュレーションの実用性について検証するために、*In vivo* 実験を行い、その得られた電場、電流、電極の条件の有用性を示した。また、選択的に目的の場所へ導入する方法や遺伝子導入量をさらに増加させる方法の検証を行った。最後に、他の影響する要素、例えば動脈の太さや周りの他の組織、溶液などについて検討した。

三次元 FEM シミュレーションにより、動脈組織での電界分布、及び電界最高値、電流を算出した。シミュレーションに使用した血管組織の伝導性は文献値 1.0 S/m 、プラスミド DNA の伝導性 0.02 S/m は Four-electrode テクニックを使用し測定した。血管サイズは外径 2.0 mm 、厚さ 0.2 mm とし、血管と電極は密着しているものと仮定してシミュレーションを行った。電極形状は、エレクトロポレーション法に広く用いられている針形電極と平板電極を用いた。以前、我々が行った2種類の電極形状、平板電極モデル ($0.5 \times 5 \text{ mm}^2$ と $1.2 \times 5 \text{ mm}^2$ ステンレス) とワイヤブロックモデル (ワイヤ-- 外径 0.2 mm , ブロック-- 外径 1.5 mm) のシミュレーション結果では平板電極モデルの電界はワイヤブロックモデルより強いと示された。そこで、様々な平板電極サイズや印加電圧の大きさ、組織周辺の生理食塩水の有無による電場分布の変化を解析した。陰極は薄くなるほど、電界と電流値が高くなることがわかった。厚さ 0.1 mm の電極モデルでは 100 V/cm の電界と 31 mA 電流が計測された。 0.5 mm の電極モデルでは 90 V/cm 電界、 36 mA 電流が計測された。 10 V 電圧を増やすと 30 V/cm 電界が増えることがわかった。生理食塩水が存在すると、 40 V/cm 電界が増えることが示された。また、電界の強さは電極の中心部ほど低く、外周部ほど高いことが示された。

血管への遺伝子導入の可能性とシミュレーション結果の有用性を確認するため、*in vivo* ウサギ実験を行った。まず初めに、平板電極とワイヤブロック電極の比較実験を行った。次に、電圧、パルス幅、パルス数を変化させ適切な条件を明らかにした。定性実験では、*lacZ* プラスミド DNA を組織に導入された部位を示すマーカーとして使用した。微視解析では平板電極、電圧 30 V で *lacZ* マーカーによる組織の染色を確認した。しかし、ワイヤブロック電極では電圧が 70 V も必要であり、*lacZ* マーカーによる組織の染色も少なかった。実験の結果、陰極での染色が多く確認された。また、電極の四角形が組織に転写されていた。四角形のサイズは電極のサイズより若干大きかった。*In vivo* 実験結果とシミュレーション結果を比較することで遺伝子導入に必要な最低電界強度は 90 V/cm であるということがわかった。印加電圧が 50 V 以上では *lacZ* マーカーによる染色は少なかった。50 V はシミュレーションによると電界強度 150 V/cm である。定量的実験として、導入量の定量分析が可能な *luciferase* プラスミド DNA を使用して同様な実験を行った。*LacZ* プラスミド DNA と *luciferase* プラスミド DNA の結果より、30~40 V が遺伝子導入に適した電圧と仮定される。*In vivo* 実験で、厚さ 0.1 mm 電極は 5.0×10^6 RLU/mg、厚さ 0.5 mm 電極では 1.5×10^6 RLU/mg の *luciferase* プラスミド DNA の導入を確認し、電極厚さに関するシミュレーションの妥当性を確認した。

遺伝子導入量を増やすためにダブル電極(平板電極を 2 枚並列したもの)を設計し、シミュレーションと実験を行った。シミュレーションによると 2 枚の 0.1 mm 平板電極を電極間隔 1.0 mm で配置したものが、電界強度が一番いいことが示された。しかし、電極内の電解強度が弱く、1 枚の 0.1 mm 平板電極より遺伝子導入に必要な電界強度を示す領域が少ないことが確認された。実験結果でも、 2.6×10^6 RLU/mg しか *luciferase* プラスミド DNA が導入されなかった。そこで別の方法として、同一部位に 2 回エレクトロポレーションを行った。その際、陰極に多く入る性質を生かすため、1 回目と 2 回目で電極の正負を逆転させた。厚さ 0.5 mm 電極を使用して実験を行ったところ、血管組織全体に *lacZ* プラスミド DNA マーカーの染色を確認した。

シミュレーション結果から電極形状と印加電圧は組織内の電流密度に影響することが分かった。シミュレーションの結果と *in vivo* 実験において測定した電流から、遺伝子導入の正否が判断できると考えられる。印加電圧と電流の関係は、シミュレーションと実験の結果がほぼ一致した。厚さ 0.5 mm 電極を使用して、印加電圧 30 V の場合、電流 36 mA で導入効率が高く、印加電圧 40 V では 48 mA が導入に適切な電流であった。この結果から、印加電圧はそれ自身、導入効率に影響があることが分かった。しかし、電流量も大切な導入条件だと考えられる。

エレクトロポレーションにおいて、動脈細胞への遺伝子導入のための適切な条件を検討した。LacZ プラスミド DNA を使用して、動脈細胞にエレクトロポレーションによる遺伝子導入を確認した。また、30 V 以下や 40 V 以上では、lacZ プラスミド DNA の導入量の減少が確認され、導入に適した印加電圧は 30~40 V だと言ったことがわかった。導入箇所としては、lacZ プラスミド DNA 使用した実験で遺伝子導入による染色が電極の形を示したことから、シミュレーションの結果より、電界強度が強くなりやすい電極端部に遺伝子導入がし易いことがわかった。このことから、電極端部の強い電場が遺伝子導入に必要な条件だと考えられる。導入対象組織周辺の、他の組織や溶液など外部条件は、主に導入効率に影響することがわかった。また、シミュレーションにより生理食塩水が組織周辺に存在するとき、40 V/cm 電界強度が増加することが確認された。電極形状も遺伝子導入に得一驚があり、電極サイズや位置によって、電界強度、電界分布、電流が変わることが示された。薄い電極は電界が強くなり、導入量も高くなった。シミュレーションと実験より、遺伝子導入に必要な電界強度条件が示されたが、その際、電流は遺伝子導入効率に影響することが示された。特に、必要な電界強度が発生しても、電流が足りなければ導入効率に影響がある点には注意が必要だと考えている。しかし、当然のことながら、電圧、電極サイズや電極位置によって、必要な電流も変わる。

今後は、エレクトロポレーションによって遺伝子治療の安全性と効率の向上のためにも、さらに適切な条件を明らかにしていく必要がある。