

論文審査の結果の要旨

氏名 許 文豪

論文題目「Study on Electroporation-based Gene Therapy System for Artery (動脈へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入に関する研究)」は動脈壁細胞への遺伝子導入技術として、電場刺激による細胞膜の一過性の破壊現象である electroporation を応用した血管壁への遺伝子導入技術を扱ったものである。まず有限要素法を用いた電場シミュレーションにより血管壁内部に発生する電場分布を検討し、電極形状・電極間隔・印加電圧と血管壁内の電場分布の関係を検討し、適切な電極形状を選択した。次に医学部血管外科との共同研究によりウサギ頸動脈をモデルに LacZ プラスミド, luciferase プラスミドを用いた electroporation による血管壁への遺伝子導入実験を行い、シミュレーション結果の妥当性ならびに electroporation による血管壁への遺伝子導入に必要な条件を明らかにした。この結果に基づいて血管の単位体積あたりへの遺伝子導入量を増加させる方法を検討した。最後に実験時に計測された電流注入量を検討し、その平均値がシミュレーションにより推定される値とほぼ符合すること、ならびにその電流値が観測された場合に、比較的大きな遺伝子導入量が観測される傾向が見られたことを示し、実験上遺伝子導入効率に影響する因子を検討した。以上により electroporation を応用した血管壁への遺伝子導入技術に関して、求められる条件、治療装置の基本的な設計指針を示したものである。

本論文は6章からなり、第1章では現在の遺伝子導入技術の現状と問題点、ならびに近年注目されているウィルスを用いない標的部位への選択的な遺伝子導入手法に関する研究を紹介し、electroporation を用いた遺伝子導入の研究の現状を紹介している。そして electroporation による血管壁への遺伝子導入に関する研究は未だ限られていること、これらの研究が実験的検討を主に行われているため、遺伝子導入に必要なとされる客観的な条件が明らかにされていない点を指摘した。第2章では本研究の目的として、血管壁への遺伝子導入を安全に行うための条件を定めることとしている。

第3章では electroporation を応用した血管壁への遺伝子導入での、電極による電場を印加したときの血管壁内での電場分布を検討した。血管壁の内壁に遺伝子導入をすることが求められるため、血管内腔にプラスミド DNA を満たし、血管壁の外側に設置した電極より電圧を印加し、血管内壁に遺伝子導入を行うことを想定している。まずプラスミド DNA 試料の導電率を測定し、文献的に知られている筋肉組織の導電率を用いてシミュレーションを行っている。electroporation を応用した遺伝子導入ではカソード側により多くの遺伝子導入がなされることが報告されており、また本研究でも実験的にこの現象を確認しているが、電極形状について検討した結果、血管壁内に傷害を発生するような過大な電場を形成せず、かつある一定以上の電場を一様に血管内壁に与えるためには、幅の小さい電極をカソードに、幅の広い電極をアノードに置くことが適切であることが示された。また電極の端部の直下に近い部分で電位が大きくなることが示された。電極間隔、印加電圧などによりどのように電場分布が変化するかを検討した。

第4章では、シミュレーション結果に基づいて、ウサギ頸動脈をモデルにして実際に計測システムを用いて行った実験結果を述べている。印加電圧パルス幅を 20msec に固定して実験を行っている。LacZ プラスミドを用いた遺伝子導入部位と電極の位置の解析から、電場シミュレーションで確認された電場強度の大きな部位で遺伝子導入が起きることを確認した。つぎに遺伝子導入量を定量的に検討するために、luciferase プラスミドを用いた electroporation による血管壁への遺伝子導

入実験を行い、印加電圧、電極間距離等の条件を変化させ遺伝子導入量の変化を検討した。シミュレーション結果と実験結果を検討した結果、90-200V/cm程度の電場強度の部位で electroporation による遺伝子導入が起こること、ならびにそれを越える電場強度が発生した場合には、遺伝子導入効率が低下することを明らかにした。

第5章では第4章の結果に基づき、単位体積あたりの遺伝子導入量を増加させる方法として、電極数を増加させる方法、電極を移動させて複数回遺伝子導入を試みる方法を実験的に検討している。電極数を2本にした実験結果では、1本の場合よりかえって遺伝子導入効率が悪くなる結果が得られたが、電場シミュレーション解析によれば、電極の間の空間での電場強度が低下して、前章で示した条件を満たす領域の大きさが小さくなることを考察しており、効率上昇が得られなかった原因であることを示している。また LacZ を用いた実験により、複数回電極位置を変えて電圧を印加して遺伝子導入を行うことが、導入量を増加するためには有効であることを示している。

第6章では実験時に計測された電流注入量を検討している。観測される電流値はばらつきが大きい、その平均値はシミュレーションで推定される値とほぼ一致することを示し、シミュレーションの妥当性を確認している。観測される電流値がばらつく原因としては、電極と血管の不十分な接触、血管周囲に存在する体液などの影響が考えられるが、特に体液の影響に関しては、シミュレーションで生理的食塩水の0.2mm程度の層が血管外壁に存在することを仮定すると、血管壁内の電場分布に大きな変化は無いが、観測される電流量が増大することをしめしている。このような考察から、実験上のアーチファクトとして想定できるデータを除去して観測された電流量と遺伝子導入量の関係を見ると、シミュレーションで予測される程度の電流値が観測された場合に、比較的大きな遺伝子導入量が観測される傾向が見られたことを示している。

最後に第7章で本研究で得られた成果とその意義を考察し、残された課題として本研究では大きな損傷は実験的には観測されなかったものの、電場刺激による血管組織の損傷に関する検討の必要性等を指摘している。第8章で結論を述べている。

従来報告されてきた血管壁への遺伝子導入に関する実験は、大型の電極を使用しその条件は実験的に検討されており、単に電極への印加電圧という観点のみから検討されており、対象とする血管の大きさの変化や、臨床的な要求から電極形状を変化させた場合にどのように治療機器を設計すれば良いかについては、必ずしも明らかではなかった。本研究は、電場シミュレーションという工学的手法と、ウサギ頸動脈をモデルとした遺伝子導入実験という実験的手法を組み合わせ、血管内壁に electroporation による遺伝子導入を起こすための条件を電場強度という一般的なパラメタで表現し、これにもとづいて、遺伝子導入効率を上あげる手法を提案し、その妥当性を一部ではあるが確認している。これにより今後血管内壁への electroporation による遺伝子導入を用いた治療デバイスを設計するための基本的な指針を得たといえる。

本研究は東京大学の近藤啓介、小山博之、宮田哲郎、佐久間一郎との共同研究であるが、本論文の内容は、論文提出者が主体となってシミュレーションを行い、共同研究者らが中心となって実施されたウサギ頸動脈をモデルとした実験結果を、シミュレーションの立場から解析し、遺伝子導入に必要な電場強度条件を定量的に検討し、それに基づいてより多い遺伝子導入を得るための治療デバイスの設計指針を示したもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（科学）の学位を授与できると認める。