

## [論文の内容の要旨]

論文題目 Gene delivery with biocompatible cationic polymer  
和訳 生体適合性カチオン性ポリマーによる遺伝子導入  
指導教員 清水孝雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

真砂佳代

遺伝子治療は種々の根治不可能な疾患への治療法として注目を集めている。正規の手続きを踏んで行われた遺伝子治療の第一号は、アメリカで 1990 年に行われたレトロウィルスを用いた遺伝子デリバリーによるアデノシンデアミナーゼ欠損症の治療である。以降、遺伝子デリバリーシステムには天然のウィルスを材料として作製したウィルスベクターを用いる手法が中心となっていた。しかし、ウィルスベクターは高い遺伝子導入効率を有する一方、死亡を含む重篤な免疫反応や毒性などの副作用を誘発することが報告されている。当初は予想できなかった副作用が明らかとなり、ウィルスベクターを使用した遺伝子治療の臨床試験が一部中止・制限されたことは記憶に新しい。非致死性の疾患を遺伝子治療の対象とする場合、致死的な副作用は大きな障壁となる。このような背景から安全性の高い非ウィルス性の遺伝子デリバリーシステムの開発が期待されている。

非ウィルス性遺伝子デリバリーシステムは、DNA が天然のアニオン性物質であることを利用し、これにカチオン性物質を結合させてコンプレックスを形成させることを基本原理としている。このコンプレックス形成は DNA を安定化し、デリバリーに有効な諸性能を持たせることができる。現在までに最も活発に研究が行われている非ウィルス性のデリバリーシステムとして、カチオン性脂質と DNA の静電相互作用に基づいて形成される会合

体、すなわち lipoplex がある。カチオン性脂質としてはこれまで数多くのものが検討されているが、いずれも粒子全体をカチオン化し、陰性荷電した細胞膜との相互作用を増強させることで遺伝子導入効率を高めたものが多い。しかし、ウイルスベクターの導入効率には依然及ばないところが最大の問題である。一方、生体高分子分野においても DNA がカチオン性の高分子（ポリマー）と静電相互作用に基づいて会合し、ポリイオンコンプレックス（polyion complex; PIC）と呼ばれる会合体を形成することが知られていた。このような PIC 系を遺伝子デリバリーシステムとして応用する試みは現在注目されており、polyplex 型システムと総称されている。

一般に、遺伝子デリバリーシステムの実用化に向けた評価は、i) レポーター遺伝子導入効率と、ii) 毒性評価の 2 点で行われる。このうち毒性に関しては、in vitro での MTT アッセイ法で評価するのが主流であったが、これだけを判断材料とするのでは不十分との考えから、遺伝子導入後の細胞内の遺伝子発現変化を包括的に評価するといった薬理ゲノミクス的な分析の必要性も現在では提唱されている。こうした新しいアプローチはポリマーゲノミクスやマテリアルゲノミクスとも呼ばれ、臨床応用を視野に入れた遺伝子デリバリーシステムの安全性を判断する際の重要な評価手段と位置付けられつつある。

最近、片岡らは新しい polyplex 型システムとして高分子ミセル型の遺伝子デリバリーシステムを構築した。このデリバリーシステムは、親水・非イオン性連鎖であるポリエチレングリコール（PEG）とポリカチオンのブロック共重合体に、マイナス荷電の DNA を加えることで自発的に形成させたナノメートルサイズの高分子ナノミセル型構造体を活用したものである。遺伝子デリバリーシステムに使用するポリカチオンは、ポリアスパラギン酸の側鎖を種々のアミン化合物で修飾したポリマーライブラリーを作製し、これらの中から遺伝子導入効率と細胞毒性試験の結果をもとに選出した。その結果、側鎖に Diethylenetriamine; (DET:CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) を有するブロック共重合体の PEG-P[Asp(DET)]、および PEG の付かないカチオン性ホモポリマー P[Asp(DET)] が低毒性で、且つ高い遺伝子導入効率を有することを見出した。ところで、側鎖に存在するジエチレントリアミンは中性付近の pH 環境下ではモノプロトン化している。これは市販のカチオン性ポリマー試薬である linear poly (ethylenimine) (LPEI) など低い pKa をもつポリマーが高い遺伝子導入効率を持つこと、即ち、“プロトンスポンジ効果”と同様のメカニズムを期待させる。なお、PEG-P[Asp(DET)] を用いた in vivo 実験では、良好な遺伝子導入効率だけでなく、生体への悪影響も他の遺伝子デリバリーシステムと比べて軽度であることが報告されている。こうした知見は、側鎖である P[Asp(DET)] の安全性確保の観点から MTT アッ

セイ法以外のさらなる追加評価の必要性も生じてきた。

そこで本研究では、まず P[Asp(DET)] の培養細胞に対する遺伝子導入効率と細胞毒性を市販の LPEI を対照試薬として従来法で比較検討した。この評価法では、P[Asp(DET)] は遺伝子導入効率、細胞毒性共に LPEI と差異無く良好な成績を示した。次に、ウミホタルルシフェラーゼ安定発現細胞株である HuH-7-Luc を用いて、P[Asp(DET)] と LPEI の両ポリマーによる遺伝子導入効率と、これに伴う細胞への影響を評価した。具体的には、P[Asp(DET)] または LPEI を用いてレニラルシフェラーゼ遺伝子を細胞へ導入後、この外来性レニラルシフェラーゼと内在性ウミホタルルシフェラーゼの活性を共に測定し、経時的に評価した。その結果、P[Asp(DET)] と LPEI を用いた場合で外来性レニラルシフェラーゼ活性、即ち、導入効率に差異は認められないものの、内在性ウミホタルルシフェラーゼ活性が LPEI を使用した細胞でのみ経時的に減少するという異なったプロファイルが得られた。細胞増殖曲線からも LPEI を使用すると 2 日目以降の細胞増殖に著明な抑制が認められた。これらの現象はポリプレックス自体を除去しても認められたことから、解離した LPEI が細胞内で時間依存的に障害を及ぼすものと推察した。

細胞毒性の観点で P[Asp(DET)] が LPEI より勝っていることは以下の 3 つの実験からも判断した。まず第一に、遺伝子導入の初期過程であるポリプレックスと細胞膜との相互作用時の膜不安定度合を lactate dehydrogenase (LDH) アッセイ法で検討した結果、LPEI で遺伝子導入した細胞は導入後 24 時間まで時間依存性に LDH の漏洩が認められ、細胞障害性が示唆されたが、一方、P[Asp(DET)] の場合の LDH 漏洩は LPEI と比較すると顕著に低いものであった。次に、P[Asp(DET)] と LPEI を用いたレポーター遺伝子導入時の 1 細胞当たりの遺伝子導入コピー数をリアルタイム PCR で定量した。P[Asp(DET)] でのレポーター遺伝子導入量は、導入後 24 時間まで経時的に増加したが、LPEI を使用した場合は 24 時間後付近でコピー数の減少が認められた。この減少は LPEI の毒性により細胞のポリプレックス取り込み能が経時的に減少したことに起因すると推察した。更に、細胞機能への影響をゲノミクスの観点から検討するため、ポリプレックス存在下で培養した細胞内の 11 種類のハウスキーピング遺伝子の発現変動を定量 PCR により評価した。その結果、LPEI 存在下で培養した細胞では遺伝子導入 72 時間後でのハウスキーピング遺伝子発現が明らかに減少していたが、P[Asp(DET)] を用いた細胞では 11 種類全ての遺伝子において顕著な発現変動は認められなかった。

以上の結果は、P[Asp(DET)] が LPEI と比べると明らかに低い細胞毒性を有するカチオン性ポリマーであることを証明し、治療を目的とした遺伝子デリバリーツールとして高

い潜在力を有していることが示唆された。この可能性は、実際に P[Asp(DET)]を用いて機能性遺伝子を初代培養細胞に導入し、その細胞の分化誘導を観察することで更に実証した。caALK6 と Runx2 は両者とも骨形成の分化誘導因子であることが知られている。マウス頭蓋冠より分離した初代培養細胞へ両ポリマーを使用してこれらの遺伝子を導入し、骨分化の特異的マーカーであるオステオカルシンの遺伝子発現を指標に両者を評価した。P[Asp(DET)]で導入した細胞ではオステオカルシン遺伝子の時間依存的な発現増強が確認できたが、LPEI を使用した細胞では 11 日経過後も当該遺伝子の発現は認められなかった。以上の結果から、P[Asp(DET)]が分化誘導など実用的な使用の際に影響を与えない有効な遺伝子デリバリーシステムであることが示された。また同時に、本研究より新規遺伝子デリバリーシステムを評価する場合、従来のレポーター遺伝子導入効率と MTT アッセイ法のみならず、様々な評価法を活用し、多方面から導入効率や安全性を評価することが重要であることが明らかとなった。

Masago, K. , Itaka , K., Nishiyama, N., Chung U., and Kataoka, K.  
Gene delivery with biocompatible cationic polymer: Pharmacogenomic analysis on cell bioactivity  
Biomaterials 28 (2007) 5169–5175