

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 真砂 佳代

本研究は、遺伝子を効率的に送達するデリバリーシステムの生体内における適合性の評価を目的とし、新規合成されたポリマー系 P[Asp(DET)]の細胞に及ぼす影響を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト肝癌細胞株(HuH-7)とマウス初代培養細胞を用いて、新規ポリマーである P[Asp(DET)]の遺伝子導入効率と細胞毒性を市販ポリマーである LPEI と比較した。遺伝子導入効率と MTT アッセイによる毒性評価では両ポリマー間に差違は無かった。

2. ホタルルシフェラーゼ(Luc)を安定発現している HuH-7-Luc に対して、P[Asp(DET)]と LPEI を用いてウミシイタケルシフェラーゼ(RL)の遺伝子を導入し、両ルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。遺伝子導入した RL は両ポリマーで同等の発現効率を認めた。一方、内在の Luc は、遺伝子導入に P[Asp(DET)]を用いた細胞では発現変動は見られなかったが、LPEI で導入した細胞では2日目以降から細胞毒性に起因すると思われる発現減少が認められた。

3. 遺伝子導入の初期過程であるポリマーと細胞膜との相互作用時に膜障害が起こるかどうかを 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に比べ P[Asp(DET)]を用いた細胞の LDH 漏洩は顕著に低かった。続く導入過程の評価として、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 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 ではコピー数の取り込み量が減少した。更に、LPEI 存在下で培養した細胞では、遺伝子導入72時間後に調べた主要なハウスキーピング遺伝子に関し、その発現が明らかに減少していたが、P[Asp(DET)]を用いた細胞では顕著な発現変動は認められなかった。これらは細胞内に取り込まれた LPEI の時間依存的な毒性によると推察された。

4. マウス頭蓋冠より分離した初代培養細胞に、両ポリマーを使用して骨分化誘導遺伝子 (Runxs2 と caALK6 遺伝子) を導入した。当該遺伝子はどちらのポリマーを使用した細胞にも導入されたにもかかわらず、導入後11日目に骨分化のマーカであるオステオカルシンの発現を認めたのは P[Asp(DET)]で導入した細胞だけであった。

以上、本論文は P[Asp(DET)]が細胞の分化機能などに影響を与えない実用的な遺伝子デリバリーシステムであること、また、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、様々な評価法で導入効率や安全性を評価することが重要であることを示したものである。本研究は従来と異なった観点で新規遺伝子デリバリーシステムの適合性を評価する重要性を示し、今後の遺伝子治療の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。