

称号及び氏名 博士（工学） 坂口 奈央樹

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 31 日

論文名 「Design of Complex of Polymer-modified Liposome and Lipoplex for Efficient Gene Delivery
(効率的な遺伝子導入を実現するためのポリマー修飾リポソーム-リポプレックス複合体の設計)」

論文審査委員 主査 河野 健司
副査 坂東 博
副査 長岡 勉

論文要旨

遺伝子導入技術は、細胞内に遺伝子を導入し、その遺伝子にコードされたタンパク質を発現させることを目的とする。このような技術は遺伝子治療、細胞治療、再生医療といった先進医療の確立と発展にかかわる重要な技術である。遺伝子治療においては、治療用遺伝子を標的細胞内に導入し、タンパク質として発現させることによって治療効果を得る治療法であり、先天性疾患や難治性疾患を効果的に治療するため新しい治療法として期待されているが、遺伝子導入技術の発達がその実現への大きな障害となっている。

導入遺伝子がタンパク質として発現するためには、遺伝子が標的細胞の内部の核に送達される必要がある。しかしながら、遺伝子そのものでは自発的に細胞核に到達することはできないため、その到達を促進する運搬体(ベクター)を利用することが必要である。

遺伝子ベクターはウイルスと非ウイルスに大別される。さらに非ウイルスは、物理的、生物的、化学的手法に基づいたベクターや手法に分けられる。組み換えウイルスを用いるウイルスベクターは総じて高い遺伝子導入の能力を有しているが、導入遺伝子の容量に制限があることや、免疫反応の誘導、ベクターの突然変異など安全面に不安を有していることから、特に遺伝子治療などの医療の分野においては、ウイルスを用いない非ウイルスベクターが望まれている。

非ウイルスベクターの構築は、カチオン性脂質やポリカチオンなどを用いた化学的手法に基づいたものが最も古くから研究されており、また最も活発に研究されている。遺伝子とこれらのカチオン性の素子は静電的に複合化し、それぞれリポプレックス、ポリプレックスと呼ばれる微粒子を形成し、遺伝子を運ぶベクターとして機能する。非ウイルスベクターはウイルス由来の素子を用いないため、理論的に免疫の誘導がなく安全であると考えられているが、ウイルスベクターに比べて低い遺伝子導入の能力であることや、細胞に対して強い毒性を有する場合があることなど、改善すべき多数の項目を有している。特に遺伝子導入の効率を向上させることが重要な課題となっている。

非ウイルスベクターによる遺伝子導入のメカニズムは大きく分けて四つの過程を経ることが知られている。

①安定に血中に存在し、標的細胞に到達し、②標的細胞に結合し効率良く取り込まれ、③エンドソームから効率良く脱出し、④核に到達し発現する。これらの過程を効率よく行うことのできる機能をベクターに集積させることにより、高い遺伝子導入活性を有する非ウイルスベクターを構築できるものと考えられる。

複数の機能を有する非ウイルスベクターとして、SucPG 複合体が設計、構築されている。SucPG 複合体は弱酸性環境において、膜融合性を発現する合成ポリマーであるサクシニル化ポリグリシドール (SucPG) を修飾したリポソーム (SucPG 修飾リポソーム) をリポプレックスに静電的に複合化させた構造である。SucPG 複合体は pH 感受性の膜融合により、細胞の食作用の経路であるエンドソームから効率良く脱出し、非ウイルスベクターの主要な失活原因を回避する。また、細胞への効果的な結合と取り込みのために、SucPG 複合体はリガンドとしてトランスフェリンを結合させており、遺伝子導入活性を向上させている。

本論文は、高い遺伝子導入活性を有する非ウイルスベクターの構築を目的とし、SucPG 複合体の導入遺伝子の発現に至る種々の過程の効率化を検討し、高い遺伝子導入活性を有する多機能集積型非ウイルスベクターの構築を行った。

第1章では、本論文の緒言として、研究の背景と目的および本論文の概要について述べた。

第2章では、3種のカチオン性脂質 DC-cho1, DOTAP, TRX-20 を用いて、SucPG 複合体を形成し、SucPG 複合体の遺伝子導入活性とリポプレックスの性質との相関について検討した。それぞれのカチオン性脂質を含むカチオン性リポソームを用いて調製したリポプレックスはいずれも、SucPG 修飾リポソームの複合化に伴い、粒径の増大とゼータ電位の低下を引き起こし、SucPG 複合体を形成した。これらの遺伝子導入活性を調べたところ、SucPG 修飾リポソームによる遺伝子導入活性の向上はカチオン性脂質により異なり、TRX-20 を用いたリポプレックスによって、その効果は大きく引き出された。SucPG 複合体の遺伝子導入活性は、リポプレックスの物性に影響を受け、TRX-20 を用いたリポプレックスが、SucPG 複合体に適していることを明らかにした。

第3章では、SucPG 複合体の遺伝子導入活性に及ぼす微粒子化の効果について検討した。SucPG 複合体を 5% グルコース水溶液中で調製することにより、200~300nm の粒径をもつ SucPG 複合体を調製することに成功し、従来のリン酸生理食塩水 (PBS) を用いて調製した 800nm 以上の粒径をもつ SucPG 複合体に比べ、小さな粒径の SucPG 複合体を調製した。これらの SucPG 複合体の遺伝子導入活性を調べたところ、粒径の小さな SucPG 複合体は有意に高い遺伝子導入活性を示した。また、細胞によるこれらの SucPG 複合体の取り込み量も小さな粒径の SucPG 複合体が有意に多く、SucPG 複合体は微粒子化により細胞に効率的に取り込まれ、より高い遺伝子導入活性を獲得したものと示唆された。

また、この粒径の小さな SucPG 複合体は血清の存在下において、90%を超える細胞に導入遺伝子の発現を誘起させることに成功し、非常に高い遺伝子導入活性を有していることを明らかにした。

第4章では、SucPG 複合体に導入したリガンドであるトランスフェリンの効果と、SucPG 複合体による種々の細胞への遺伝子導入について検討した。トランスフェリンを導入した SucPG 複合体は導入していないものに比べ、約2倍近く高い遺伝子導入活性と、細胞内部への取り込み量の増大を示し、トランスフェリンが SucPG 複合体のリガンドとして有用であること明らかにした。また、KB細胞 (ヒト鼻咽頭癌) や HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌) などは自身のトランスフェリンレセプターを活発に取り込んでおり、このような細胞に対して、トランスフェリンを導入した SucPG 複合体は特に高い遺伝子発現を誘起できることを明らかにした。

第5章では、新たな pH 感受性膜融合性ポリマーとして、種々の側鎖構造を有するポリグリシドール誘導体 SucPG, GluPG, MGluPG, CHexPG を合成し、ポリマーの分子構造と膜融合性との相関を明らかにし、より優れた性質をもつ pH 感受性膜融合リポソームの調製を検討した。新たに合成したこれらのポリマーは、ポリマー側鎖に含まれる炭素数の多いものほど、より大きな曇点とピレン蛍光強度比の低下を示し、ポリマーの疎水性の増大を示唆した。SucPG, GluPG, MGluPG のポリマーを修飾したポリマー修飾リポソームは中性の pH において、膜融合を示さなかったのに対して、弱酸性の pH においては膜融合性を引き起こし、pH 依存性の膜融合挙動を示した。さらに、疎水性度の高いポリマーを修飾したポリマー修飾リポソームは pH5.0 のエンドソームの内部環境に近い弱酸性の pH においても、裸のリポソームとよく融合し、より大きな膜融合能を示した。これらの結果から、pH 感受性膜融合ポリマーの疎水性の増大が、pH 感受性膜融合性リポソームにより中性に近い pH における膜融合の誘起と、大きな膜融合能を与えることを明らかにした。また、これにより、優れた pH 感受性膜融合リポソームを得た。

第6章では、第5章において調製した優れた膜融合能を有する pH 感受性のリポソームを遺伝子ベクターに応

用し、ベクターの膜融合能の向上と遺伝子発現との相関について検討した。種々の pH 感受性膜融合性リポソームと TRX-20 を含むリポプレックスとを複合化させ、SucPG 複合体、GluPG 複合体、MGluPG 複合体を調製し、その膜融合能や遺伝子導入活性を調べた。いずれの複合体も同様の粒径とゼータ電位を有していたが、pH5.0 などの弱酸性環境における膜融合能は、SucPG 複合体、GluPG 複合体、MGluPG 複合体の順に大きくなった。これらの複合体による HeLa 細胞への遺伝子導入の結果、SucPG 複合体、GluPG 複合体、MGluPG 複合体の順に大きな遺伝子導入活性を示し、弱酸性環境における複合体の膜融合能の向上によって、遺伝子導入活性が増大したこと、さらにこれら複合体の非常に低い細胞毒性を明らかにした。

また、個々の細胞における評価でも、膜融合能の大きな複合体によって、より大きな遺伝子発現の誘起が示されており、これら複合体の膜融合能の向上が細胞レベルで遺伝子発現を増強したことを明らかにした。

第7章では、さらに膜融合能を向上させたベクターとしてCHexPG複合体を調製し、膜融合能と遺伝子導入活性の向上を調べ、高い遺伝子導入活性を有するベクターの構築を検討した。非常に強い膜融合能を有するポリマーであるCHexPGを固定化したCHexPG修飾リポソームを調製するため、ポリマーのリポソーム膜への固定部位として導入する長鎖アルキルに、従来のデカンよりも短いオクチルを採用し、これをCHexPG側鎖の10%に導入したCHexPG-C₈-10を合成した。これを修飾したCHexPG修飾リポソームは、pH6.0以下において非常に強い膜融合能を有するpH感受性の膜融合を示した。CHexPG修飾リポソームを用いて調製したCHexPG複合体はMGluPG複合体よりも弱酸性環境における大きな膜融合と高い遺伝子導入活性を示し、さらに高い遺伝子導入活性を有する非ウイルスベクターの構築に成功した。

また、CHexPG複合体は、非常に高効率に細胞に遺伝子発現を誘起させ、高い遺伝子導入活性をもつ試薬として知られているLipofectamine2000の3倍近い高い遺伝子導入活性を示し、優れた性能を有する有望な非ウイルスベクターであることを明らかにした。

第8章では、本論文で得られた結論の総括を行った。

審査結果の要旨

本論文は、遺伝子治療や再生医療などの先進医療において有用な高活性遺伝子ベクターの構築を目的とし、生体膜との融合活性を発現する合成高分子で修飾したリポソームと、カチオン性脂質とプラスミドDNAの複合体(リポプレックス)との多重複合化によって得られるハイブリッド型複合体をベースとして、遺伝子導入にかかわる細胞内の諸過程を効率よく通過する機能を有する高活性な人工遺伝子ベクターの構築に関する研究結果をまとめたもので、次のような成果を得ている。

- (1) 粒子サイズの異なるハイブリッド型リポプレックス-膜融合性リポソーム複合体を調製し、ハイブリッド型複合体の粒子径の微小化によって、細胞による複合体の取り込みが促進され、遺伝子導入活性の増大に繋がることを示した。
- (2) 鉄運搬タンパク質トランスフェリンをリガンドとしてハイブリッド型リポプレックス-膜融合性リポソーム複合体に結合させることにより、複合体の細胞親和性の増大と細胞内部への取り込みの促進が生じ、ハイブリッド複合体の遺伝子導入効率が構造することを示した。そして、トランスフェリンがハイブリッド型複合体のリガンドとして有用であることを明らかにした。
- (3) 側鎖構造の異なる種々のポリグリンドール誘導体を合成し、それらの高分子構造と膜融合活性との相関を明らかにした。そして、高分子の側鎖の疎水性度を高め高い膜融合活性を有する高分子をリポソームに複合化することによって、高い膜融合能を有するリポソームの開発に成功した。
- (4) ハイブリッド型リポプレックス-膜融合性リポソーム複合体の遺伝子導入活性は、リポソームの膜

融合能と強く相関することを明らかにした。そして、強い膜融合能を有するリポソームを用いることによって、極めて高い遺伝子導入活性を有するハイブリッド型複合体の構築に成功した。

- (5) 強い膜融合活性を有するリポソームを用いて作製されたハイブリッド型リポプレックス-膜融合性リポソーム複合体が、市販の遺伝子導入剤に比べて顕著に高い効率で遺伝子発現に導くことを明らかにし、高性能な人工遺伝子ベクターの構築に成功した。

以上の諸成果は、高活性人工遺伝子ベクターを構築するための新しい方法論を工学の観点から開拓するものであり、遺伝子治療、細胞治療、免疫治療、再生医療などの先進医療技術の確立と発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うために必要な能力と学識を有することを証したものである。