

氏 名	きむら つよし 木村 剛
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2 9 5 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	高分子ベクター介在型遺伝子デリバリー機構に関する研究 (主査)
審 査 委 員	教 授 村上 章 教 授 木村 良晴 教 授 山口 政光 助教授 山岡 哲二

論文内容の要旨

21世紀に発展が期待される病気治療法に遺伝子治療法がある。この方法には特定の細胞や組織に遺伝子を効率的に送り込む手法が不可欠である。現在主流である手法は改変したウイルスを用いるものであるが、副作用による事故が相次いでいる。従って免疫原性を示さない非ウイルス遺伝子ベクターの開発が期待されており、本論文はその社会的要請に高分子化学の観点から応える研究に関する。高機能非ウイルスベクターの開発にはいくつかの問題点があり、本論文はそのうち(1)遺伝子導入効率の上昇：細胞による取り込みを改善する分子設計、(2)細胞内移行後の遺伝子発現機構の解明、に焦点を絞っている。

論文は5章からなっている。

第1章では本研究の背景がまとめられている。

第2章では、DNA の細胞内移行性と遺伝子発現との相関の解明を目的とし、カチオン化 poly(vinyl alcohol) (PVA)を 非ウイルスベクターとして用いている。カチオン基の種類と導入率の異なるカチオン化 PVA(PVA1 及び PVA3)を合成し、それらを用いてレポーター遺伝子の細胞内移行性に及ぼす化学構造の影響を検討している。細胞による取り込みおよび核への移行性は、高カチオン化率 PVA で達成され、DNA 分子の細胞内局在の制御を可能にしている。同時に高カチオン化率の PVA3 の場合にのみ遺伝子発現が認められるという結果を得、核移行性以上に重要な因子の存在を示唆している。

第3章では、カチオン性非ウイルスベクターとして、塩基性ポリペプチドを採用している。ポリペプチドの側鎖の化学構造、およびそれらと DNA との複合体の物性が遺伝子発現に及ぼす影響を、遺伝子発現に至る過程の段階的調査により検討している。Poly(L-lysine)を基本として行った細胞への遺伝子導入実験の結果、遺伝子の核への局在を確認し、さらに中性アミノ酸側鎖を持つ Poly(L-lysine)誘導体を用いた場合にのみ高い遺伝子発現を認めている。さらに、ポリペプチド系ベクターでの高効率発現機構を詳細に検討し、遺伝子・ベクター複合体の性質、特に複合体の凝縮性が遺伝子発現に大きな影響を与えることを明らかにしている。

第4章では、新しい遺伝子導入効率評価法の確立を目的として、単一細胞における遺伝子発現効率を測定可能な FACS システムの開発を行っている。すなわち一般的に遺伝子導入効率は多くの細胞を用いて評価されているが、細胞の多様性の観点からは単一細胞における評価が望ましい。本論文では単一細胞ごとの「遺伝子発現効率」すなわち、単位量プラスミド DNA からの遺伝子発現量評価を可能にしている。従来の遺伝子導入実験系では得られない新たな情報を検出するシステムの開発に成功している。

第5章では、最近注目されている dendritic 構造に着目し、その表面電荷の種類や密度と遺伝子導入効率の相関を検討している。Dendritic 表面のカチオン基とヒドロキシル基の割合を制御した dendritic 誘導体を合成し、これらと DNA との複合体の物性を検討することで、Dendritic 表面構造が遺伝子発

現に及ぼす要因に関して考察し、新たな非ウイルス系遺伝子導入ベクターの可能性を提案している。

論文審査の結果の要旨

申請者は21世紀の医療に求められる最も重要な課題、すなわち遺伝子治療に不可欠な遺伝子導入材料の開発に、高分子学の観点から取り組んでいる。欧米ですでに実施されている遺伝子治療の試みのほとんどがウイルス系ベクターを用いているが、過剰免疫反応による事故が相次ぎ、現在進展が沈滞している。こうした背景にあって、申請者の試みは新たな遺伝子治療の展開につながるものとして評価される。さらに現在までに報告されている高分子系遺伝子導入材料は偶然性の高い手法によって開発されてきたが、申請者は遺伝子発現に至る種々の過程を逐一検証し、機構を解明することで材料設計指針を提唱している点も評価される。合成高分子系材料はその改変により多種多様な機能を発揮するが、申請者はカチオン性を付与することで遺伝子との複合体形成を促進し、中性親水基の導入により遺伝子との複合体の凝集性を制御することで遺伝子発現効率を高めることに成功している。これらの結果は、今後の材料開発に大いに寄与するものと評価される。

申請者は従来評価に用いられてきた手法を駆使して機構解明、材料開発を実施する一方で、従来法の問題点を解決する手法の開発も行っている。FACS システムを用いたその手法は、今まで得られなかった遺伝子発現機構に対する詳細な情報を与えることから、今後その重要性を増す可能性が高いものと考えられる。

本論文は審査を経て掲載された以下の2編の論文をもとに構成されている。

(1) T.Yamaoka, T.Kimura, R.Iwase, A.Murakami. Enhanced expression of foreign gene transferred to mammalian cells in vitro using chemically modified poly(L-lysine)s as gene carrier. Chemistry Letters, 2000, 118-119.

(2) T.Kimura, T.Yamaoka, R.Iwase, A.Murakami. Effect of physicochemical properties of polyplexes composed of chemically modified PL derivatives on transfection efficiency in vitro. Macromolecular Bioscience, Vo.2, 437-446 (2002).

以上、本論文は遺伝子治療に不可欠な新規遺伝子導入用高分子材料を作製し、さらに今後の材料設計に対する新たな指針を示しており、学術的価値が高いことを各審査委員が認めた。