

氏 名	はしもと ともこ 橋本 朋子
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5 7 3 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 25 日
学位授与の要件	京都工芸繊維大学学位規則第 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	Studies on intracellular transcription of transgene delivered by polymeric gene carriers (高分子キャリアーによる遺伝子導入と細胞内転写効率に関する研究)
審 査 委 員	(主査)教授 村上 章 教授 山口政光 教授 田嶋邦彦 国立循環器病センター研究所生体工学部長 山岡哲二

論文内容の要旨

難治性疾患に対する治療法の一つとして期待されている遺伝子治療を実現するためには、安全でかつ効率よい遺伝子の導入システムが必須であり、近年、さまざまな遺伝子キャリアーが精力的に研究されている。一方、治療に用いる遺伝子としては、細胞内で有用タンパクを生成するプラスミド DNA 以外にもアンチセンス核酸や siRNA などの機能性核酸分子の研究の進歩がめざましい。これらを細胞内に送達するシステムの重要性がより高まっているなか、1999 年以降、ウイルス由来のキャリアーを用いた臨床試験において死亡事故例が報告された。そのために、幅広い疾患に対して安全な遺伝子治療を確立するためには、より生物学的安全性が高く、発現効率に優れる非ウイルス性キャリアーの開発が急務となってきた。

非ウイルス性高分子キャリアーによる遺伝子導入効率は未だ満足できるものではなく、さらなる高効率キャリアーの分子設計が重要であるが、導入されたプラスミド DNA 分子の細胞内での挙動、あるいは、プラスミド DNA と高分子キャリアーとの複合体(ポリプレックス)が転写に預かるメカニズムは解明されていない。本論文では、非ウイルス性高分子キャリアーの様々な特性が、その細胞内挙動や被転写効率に与える影響を、詳細かつ定量的に解明することが目的とされている。特に、これまで定量されたことのない単一の生細胞内における被転写効率を実測するためにマイクロインジェクション法を用いた新たな定量化システムの構築に取り組み、細胞質から核へのポリプレックスの移行効率、および、核内での転写効率を定量化することに成功している。このシステムを利用して、導入遺伝子の転写効率とキャリアー分子の分子量との関係を明らかにするとともに、これを利用した新たな遺伝子キャリアー設計の指針が提唱されている。

第一章において、マイクロインジェクション法により細胞内に送達された遺伝子量はローダミンラベル化デキストランプローブにより定量化され、また、遺伝子の発現量はグリーンフルオレセインプロテイン(EGFP)の蛍光強度で定量されている。単一細胞内での両蛍光強度は、通常の落射型倒立蛍光顕微鏡システムと画像解析プログラムにより実測されている。本章では、特に分子量の異なるポリリジンとポリアルギニンをキャリアーとした場合の遺伝子発現効率について検討されている。求められた単細胞あたりの転写効率は、いずれのポリペプチドの場合にも分子量の増加に伴って低下し、高分子量領域では完全に

抑制された。しかしながら、時間の経過と共に高分子量のポリアルギニンを用いた場合には、転写効率が回復することが見出されている。一方、いずれのポリペプチドの場合も、細胞への取り込みやポリプレックス形成能、またコンパクションの程度に大きな差異がないことから、一般的な遺伝子導入法でポリリジンに比べ、ポリアルギニンの遺伝子導入効率が高いのは、核内転写効率の差異によるものであることが示唆された。

第二章では、第一章で得られた知見をもとに新たなキャリアーの開発が試みられている。すなわち、細胞内への遺伝子送達には高分子量のキャリアーが有利であり、核内での転写効率は低分子量キャリアーが有利であることから、初期には高分子量体キャリアーでありながら、細胞内で特異的に低分子へと変化する新規なオリゴペプチドキャリアーが設計されている。具体的には、細胞内の切断酵素フューリン (furin) の認識配列「RXXR」を繰り返し配列にもち、十分なポリプレックス形成能を有し、また細胞内でのみ切断されるオリゴペプチド (Fur-X) である。17～25 残基のオリゴマーではプラスミド DNA との十分なポリプレックス形成が確認されたが、切断後の低分子量モデルペプチドはポリプレックス形成能を示していない。従って、細胞内でキャリアーが低分子化することでポリプレックスが崩壊すると期待される。また、無細胞系でポリプレックスをフューリンにより処理することでポリプレックスからプラスミド DNA が解離することも確認された。Fur-X を用いて遺伝子導入効率 (Luciferase 活性) を測定した結果、フューリン認識配列を有するオリゴペプチド (Fur-3;(RKRKKR)₄C) でのみ有意な発現効率が向上した ($P<0.001$)。このように、細胞内でのキャリアーの特異的な低分子化がより高い遺伝子発現につながる事が明らかとされている。第三章では、第二章とは逆に、実際には低分子量体キャリアーでありながら、細胞に取り込まれる際には高分子量体として振る舞う分子設計が試みられている。具体的には、分子間ミセルを形成する両親媒性オリゴペプチドが設計されている。疎水性セグメントとしてオリゴロイシンを、また、核酸分子結合するセグメントとして、オリゴリジン、オリゴアルギニン、および第二章で開発した Fur-X が選択されている。オリゴロイシン鎖長が 4～12mer の疎水化オリゴペプチドが評価され、ロイシン数が 12 個のペプチドでのみ会合体の形成が確認されている。さらに、その臨界ミセル濃度 (CMC: 0.16 g/L) 以上の条件でのみ、遺伝子発現の向上が確認されている。一方、疎水基を持たないペプチドでは、いずれの条件においても、遺伝子発現は確認できなかった。すなわち、このような両親媒性ペプチド分子が会合体を形成することで高分子量キャリアーとして振る舞い、発現効率の向上につながったと考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、難治性疾患に対する治療法の一つとして期待されている遺伝子治療を実現するための工学的戦略の研究に取り組んだ。治療遺伝子としては、細胞内で有用タンパクを生成する DNA 以外にアンチセンス核酸や siRNA などの機能性核酸分子が日々進歩を遂げている。一方、これら核酸分子を運ぶ高効率キャリアーの重要性がより高まっているなか、1999 年以降、ウイルス由来のキャリアーを用いた臨床試験において事故例が数例報告された。そのために、幅広い疾患に対する安全な遺伝子治療を進展させるためには、より生物学的な危険性が低く、また高い送達効率を有する非ウイルス性キャリアーの開発が急務となった。しかしながら、非ウイルス性高分子キャリアーの細胞内での挙動は未解明な点が多く、導入遺伝子の発現効率は低い水準にとどまっている。申請者は、非ウイルス性高分子キャリアーの細胞内挙動および発現に与えるキャリアー物性の影響を解明することが必須であると考えた。そこで、細胞内挙動の中でも、これまで不可能であった生きた単一細胞内における転写効率実測システムの構築に取り組み、マイクロインジェクション法を利用することで、細胞質から核への移行効率と核内での転写効率を定

量化することに成功した。このシステムを利用して、導入遺伝子の転写効率とキャリアー分子の分子量との関係の詳細が明らかになり、高分子量キャリアーとして細胞内に取り込まれ、細胞内で特異的に低分子量化する新たな遺伝子キャリアーの設計を発想するに至った。

得られた知見をもとに、細胞内にのみ存在するフューリン酵素に切断されるオリゴペプチドを設計した。本キャリアーとDNAとからなるポリプレックスは、細胞内フューリンの働きにより大きくその転写効率が向上することを発見した。さらに、疎水性セグメントを有したキャリアー分子が分子間会合体を形成することで高分子量キャリアーとして働く新たなオリゴペプチドシステムを設計し、その高い遺伝子発現効率を確認した。このように、細胞内挙動、特に核での転写効率を実測するシステムは、今後の効率のよい非ウイルス性キャリアーの発展に非常に大きな意味をもつと期待される。

本論文は、審査を経て掲載された、いずれも申請者が筆頭著者である以下の2編の論文と投稿準備中の1編の論文をもとに構成されている。

- (1) T. Hashimoto, Y. Tachibana, H. Nozaki, O. Mazda, T. Niidome, A. Murakami, and T. Yamaoka. “Intracellular Enzyme-responsive Fragmentation of Nonviral Gene Carriers Leads to Polyplex Destabilization and Enhanced Transgene Expression” *Chemistry Letters*, **38**, 718-179. (2009)
- (2) T. Hashimoto, R. Iwase, A. Murakami, and T. Yamaoka. “Self-assemblies of enzymatically degradable amphiphilic oligopeptides as nonviral gene carrier” *Polymer Degradation and Stability*, **94**, 1349–1353. (2009)
- (3) T. Hashimoto, T. Kawazu, T. Nagasaki, A. Murakami, and T. Yamaoka. “Quantitative evaluation of transcription efficiency in living cells” *In preparation for Journal of Controlled Release*

さらに、研究成果は、以下に示した参考論文として報告され、また国際会議においてもその内容は高い評価を受けている。

- (4) T. Hashimoto, A. Murakami, and T. Yamaoka. “An enhanced site-specific transcription efficiency of DNA/polypeptide-vector polyplexes” *Nucleic Acids Symposium Series*, **48**, 235-236. (2004)
- (5) T. Hashimoto, A. Kobori, A. Murakami, and T. Yamaoka. “The destabilization of polyplexes facilitates intranuclear transcription efficiency” *Nucleic Acids Symposium Series*, **49**, 365-367. (2005)
- (6) T. Hashimoto, A. Mahara, A. Kobori, A. Murakami, and T. Yamaoka. “Various properties of polymeric carriers improve the transfection efficiency” *Nucleic Acids Symposium Series*, **50**, 333-334. (2006)
- (7) T. Hashimoto, O. Mazda, A. Murakami, and T. Yamaoka. “Molecular design of non-viral gene carriers aiming at facilitated transcription efficiency” *Proceedings of Pacificchem 2005*, 195. (2005)
- (8) T. Hashimoto, A. Murakami, and T. Yamaoka. “A direct quantification of the intracellular transcription in the non-viral gene delivery system” *Proceedings of 2007 TERMIS North America*, 1548. (2007)

以上、本論文は、新たな遺伝子治療用高分子キャリアーの分子設計を可能にし、今後の低毒性高効率キャリアーの開発に重要な指針を示したことから、その学術的価値が高いことを各審査委員が認めた。