Osaka University Knowledge Archive

Title	膜融合リポソームの開発と遺伝子治療等への応用に関する研究
Author(s)	水口, 裕之
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3110026
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【13】

氏　　名	水口裕之（みずぐち ひろゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　12457　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	**膜融合リポソームの開発と遺伝子治療等への応用に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　真弓　忠範 （副査） 教　授　馬場　明道　　教　授　前田　正知　　教　授　溝口　　正

論文内容の要旨

近年の分子細胞生物学の著しい発展により，数多くの疾病の遺伝子レベルでの病因解析がなされつつあり，それらの疾病に対して，遺伝子のレベルで根本から治療を行う遺伝子治療が現実味を帯びたものとなってきている。これは薬物治療の観点からみれば，細胞の機能を遺伝子のレベルで付加・修復させることによって生理活性物質などを産生させ，細胞による疾病の治療を行うという意味で，いうなればCell Therapyともいうべき新しい概念による薬物治療法の開発にもつながるものである。

しかし，このような治療法の開発には，細胞に傷害を及ぼすことなく，細胞内に自由に，効率よく遺伝子をはじめとする蛋白質，ペプチドなどの高分子物質を導入する技術を開発する必要がある。そこで本研究では，様々な物質を効率よく細胞内に導入することができるベクターである一枚膜膜融合リポソームの開発を行った。膜融合リポソームはセンダイウイルスのエンベロープ蛋白質を膜表面に有したリポソームであり，センダイウイルスが細胞に感染する際の細胞膜との融合能をそのまま付与した粒子である。

膜融合リポソームはセンダイウイルスとリポソームを37℃で反応させ，融合させることにより作製し，比重の差を利用することにより両者の反応物から未反応のセンダイウイルスとリポソームを除き，膜融合リポソームを完全精製した。精製した膜融合リポソームの平均粒子径は，センダイウイルス（332nm）とリポソーム（304nm）が1：1の比で融合したと考えられる379nmであり，電子顕微鏡で観察すると，その膜表面にはセンダイウイルスのスパイク蛋白質を有していた。単独では全く毒性を示さないが，一分子でも細胞質内に導入されれば細胞を死滅させることができるジフテリア毒素フラグメントA（DTA）の細胞毒性を指標にして膜融合リポソームの膜融合活性を検討したところ，膜融合リポソームは様々な種，組織由来の細胞に対して，効率よく物質導入できることが明らかとなった。

さらに，DTAは細胞質内へ送達するための適切なdelivery systemが開発されれば，強力な抗癌剤となりうるものと考えられることから，DTAを封入した膜融合リポソームの癌治療への応用について検討を行った。その結果，マウスのSarcoma－180（S－180）腹水癌および固形癌の検討において，DTA封入膜融合リポソームの投与によって，顕著な腫瘍退縮効果が得られた。DTAを封入した通常のリポソームや，空の膜融合リポソームの投与においては全く抗腫瘍効果が得られないことから，膜融合リポソームはin vivoの癌細胞に対しても融合能を示し，DTAを細胞質内に導入したものと考えられた。

この様に，膜融合リポソームは細胞質内への物質導入のための優れたベクターと考えられたので，次にプラスミッ

ドDNAを本リポソームに封入し，膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての性質，特徴について，現在非ウイルスベクターとして広く用いられているカチオニックリポソームのリポフェクチンと比較検討を行った。プラスミッドDNA封入膜融合リポソームはカチオニックリポソーム・DNA複合体と比較し，高い遺伝子発現効率，短時間での遺伝子導入，遺伝子導入時に細胞傷害性を全く伴わないといった特徴を示した。また，膜融合リポソームによる遺伝子導入は，血清存在下においても導入効率減少等の影響を受けず，これらの性質を反映して，マウスのS－180腹水癌に対する直接のin vivo遺伝子導入では，膜融合リポソームはカチオニックリポソームと比較し，1000倍以上の高い効率を示した。

以上の結果より，膜融合リポソームは特にin vivo遺伝子治療のための優れたベクターであると考えられたことから，ヒト腫瘍壊死因子α（Tumor necrosis factor－α；TNF－α）遺伝子を用いた固形癌に対するin vivo遺伝子治療についての検討を行った。癌に対する遺伝子治療は労力，費用，簡便さなど全ての点から，in vivo直接遺伝子導入による方法が望ましいことは自明の理であるが，in vivo遺伝子治療において抗腫瘍効果が期待できるベクターやシステムの開発が非常に困難なため，将来的重要研究課題となっている。そこで本研究では，ヒトTNF－α遺伝子を封入した膜融合リポソームを腫瘍支配動脈に投与し，腫瘍組織上流の血管や腫瘍血管にTNF－αを産生させることによって，腫瘍増殖の抑制を期待するという戦略のもとで実験を行った。S－180細胞をマウスのfootpadに移植し，TNF－α遺伝子封入膜融合リポソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈に投与した。その結果，投与部位の動脈血管，およびS－180腫瘍組織にTNF－αの発現が認められ，S－180の増殖は顕著に抑制された。この腫瘍増殖抑制効果は，抗TNF－α中和抗体の投与によって消失すること，ルシフェラーゼ遺伝子を封入した膜融合リポソームの投与によっては全く抗腫瘍効果が認められないことから，確かにin vivoで導入し，発現されたヒトTNF－αによりS－180の退縮が得られたものと考えられた。さらに，TNF－αはS－180細胞に対する直接の細胞傷害作用は示さないこと，抗マウスCD4，CD8抗体の投与によってTNF－α遺伝子導入による抗腫瘍効果が完全に消失したことから，腫瘍の退縮には宿主のT細胞の働きが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。腫瘍細胞のみならず腫瘍血管内皮細胞をもターゲットとしうる本アプローチは，固形癌に対するin vivo遺伝子治療に対して全く新しい方法論を提示できたものと思われ，今後の癌遺伝子治療に一つの指針を与えるものと考えられた。

以上，効率の良い細胞内への物質運搬体である膜融合リポソームを開発し，蛋白質や遺伝子導入ベクターとしての有用性を明らかとした。

論文審査の結果の要旨

近年，遺伝子治療を初めとして，細胞機能を人工的に修飾することによって新たな機能性細胞を創り出し，それを疾病治療に応用しようとする試みが精力的に行われ，21世紀における新しい治療法として注目されている。

この目的のためには，細胞になんら傷害をおよぼす事なく，細胞内に遺伝子を始めとする種々生理活性物質を自由に，効率よく導入する技術を開発する必要がある。現在使用されているウイルスベクターは遺伝子しか細胞内導入できないうえ，カチオニック・リポソームは導入効率や細胞障害性の点などで問題を残している。

そこで著者は，センダイウイルスが膜融合により自身の遺伝子を細胞内に導入し，感染を成立させていることに着目し，リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与することによって，リポソーム封入物質を効率よく細胞内に送達でき得ると考え，種々の検討を行うことにより以下の結果を得た。

1）センダイウイルスと一枚膜リポソームを融合させることにより，センダイウイルスのエンベロープ蛋白質を膜表面に持った膜融合リポソームを作製し，その完全精製に成功した。

2）ジフテリア毒素フラグメントAをマーカーとして利用した検討により，膜融合リポソームはin vitroおよびin vivoの細胞に安全に，効率よく封入物質を導入できることを明らかにした。

3）プラスミッドDNAを封入した膜融合リポソームは，非ウイルスベクターとして広く用いられているカチオニック・リポソームのリポフェクチンと比較して，1000倍以上の効率で細胞内に遺伝子導入できることを示した。本事実は，膜融合リポソームがin vivo遺伝子治療のための優れたベクターであることを示している。

4）固形癌に対する遺伝子治療として，ヒト腫瘍壊死因子（TNF－α）の遺伝子を膜融合リポソームを用いて腫瘍組織上流の血管内皮細胞および腫瘍血管内皮細胞に導入し，産生されたヒトTNF－αによって著しい抗腫瘍効果が得られるという新しい戦略を提示した。

以上の成果は，21世紀における新しい治療法として注目されているGene Therapyさらには Cell Therapyの分野における画期的な方法論を提示しており，博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。