



Title	非ウイルスベクター系の遺伝子発現効率上昇を目指した細胞質内遺伝子発現系の開発に関する研究
Author(s)	中川, 哲彦
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41350
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	中 川 哲 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 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	非ウイルスベクター系の遺伝子発現効率上昇を目指した細胞質内遺伝子発現系の開発に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 真弓 忠範 (副査) 教 授 前田 正知 教 授 山元 弘 教 授 土井 健史

論 文 内 容 の 要 旨

難治性疾患に対する「夢の治療法」として期待が持たれていた遺伝子治療は、欧米を中心として数多くの臨床試験がなされるまでに至った。しかしながら、十分な効果が得られたという報告はまだまだ少なく、現段階において遺伝子治療は、研究段階と言わざるを得ないであろう。将来、遺伝子治療が確実に治療手段の一種となるためには、さらに安全でさらに効率よい遺伝子発現系・遺伝子導入ベクターの開発が重要である。

現在、安全性の観点から優れていると言われているのは、非ウイルスベクター系である。しかしながら、臨床応用例は数少なく、臨床応用例のほとんどはレトロウイルスベクターをはじめとしたウイルスベクター系である。これは、従来の非ウイルスベクター系の遺伝子発現効率がウイルスベクター系の遺伝子発現効率の到底足元にも及ばないからである。この原因は、まず、従来の非ウイルスベクター系による細胞内への遺伝子導入効率の低さに起因する。この問題を解消するために種々の合成脂質の開発が行われ、ある程度、導入効率に改善が認められつつあるが、まだまだ十分とは言い難かった。著者らは、センダイウイルスの細胞膜との融合能をリボソームに付与した膜融合リボソームを開発し、リボソームに封入可能な物質であれば、遺伝子、糖、タンパク質によらず、直接かつ効率よく細胞質内へ導入可能であることを明らかとし、遺伝子導入ベクターとして有効であることを示してきた。しかしながら、非ウイルスベクター系が抱えるもう一つの低い遺伝子発現効率を示す原因である plasmid DNA の低い核移行性は、膜融合リボソームを持ってしても解消できない問題である。

非ウイルスベクター共通の問題点である plasmid DNA の核移行性の乏しさを解決する手段として、核移行シグナルを用いた plasmid DNA の核ターゲティングが試みられているが、あまり成果は得られていない。これは核へのターゲティング効率自身の問題と、核膜孔(約50nm)に対して一般的な plasmid DNA (約100nm 以上) が圧倒的に大きいという問題にある。

従って、特に非ウイルスベクター系においては細胞の増殖に関わらず安定な遺伝子発現を可能とする遺伝子発現系の開発を行うことは非常に重要な検討課題となっている。以上の観点から著者は、非ウイルスベクターが抱える問題点を克服する手段として、核移行を必要とせず、細胞質内において遺伝子発現が可能な遺伝子発現系(細胞質内遺伝子発現系)の確立を目指した。本研究では、バクテリオファージの T7 RNA polymerase は、T7 プロモーター配列に高い特異性を示し、T7 プロモーター配列を含む二本鎖 DNA のみを鋳型に、NTP を基質としてプロモーター下流の一本鎖 DNA に相補的な RNA を合成することを利用し、細胞質内で遺伝子発現が可能な T7 発現系の開発を試みた。

その結果、本システムは、*in vitro*のみならず、特に *in vivo* の細胞において有効な遺伝子発現系となり得ることを明らかとした。すなわち本アプローチは、T7 RNA polymerase とそのプロモーター配列を有する plasmid DNA を同時に細胞内に導入 (co-transfection) することにより、通常の核内における遺伝子発現とは完全に独立した形で、細胞質内で遺伝子発現を行わせようとするものである。従って、T7発現系は、細胞の増殖期・非増殖期によらず、また細胞種によるプロモーター活性の違いに煩わされることなく、あらゆる細胞に対して同様な効率で遺伝子発現させ得ることが示唆された。

また、本システムは、遺伝子のみならずタンパク質である T7 RNA polymerase をも同時に細胞質内に導入する必要がある。そこで、遺伝子のみならずタンパク質をも効率よく細胞質内に導入可能な膜融合リポソームを遺伝子導入ベクターとして適用した結果、効率よい細胞内への T7発現系の導入が可能となり、膜融合リポソームと T7発現系の組み合わせにより、*in vivo* 直接遺伝子導入による血管内皮細胞における効率よい遺伝子発現が可能となった。

さて、真の遺伝子治療とは、生体内の情報を受け取り、それに合わせた遺伝子発現を可能とすることにあると考えられる。つまり、最もインテリジェントな材料である細胞に、新たな機能を付加することである。しかしながら、一方で安全性の観点からは、疾病の治療と共に確実に導入遺伝子が生体内から消失することが望まれる。染色体内に導入遺伝子が組み込まれることは、永続的な遺伝子発現が起こることが予想される。疾病の治療には有効であっても、正常な生体にとって不必要なものが産生されることは生体に悪影響を及ぼす危険性がある。

本研究により提示した、T7プロモーターと T7 RNA polymerase との組み合わせによる細胞質内遺伝子発現系は、上記の問題を克服できる。すなわち、細胞質内遺伝子発現系を確立することは、導入遺伝子を核移行させるのではなく、細胞質内に局在化させることにより遺伝子発現を上昇させ得る。また、現段階において、T7発現系による遺伝子発現は、細胞質内における T7 RNA polymerase 量に依存しているが、将来の分子生物や遺伝子工学の進歩に伴い、生体内の情報に依存した細胞質内遺伝子発現系が可能になることが期待される。

本研究において、細胞の増殖性を問わず、一過性でしかも高い遺伝子発現が得られる細胞質内遺伝子発現系の開発を行ったが、この様に最終的には確実に分解してくれるという安全性と共に、薬物としての遺伝子発現期間を自由にコントロールでき得るテクノロジーが今後必要となってくると思われる。薬物として導入された plasmid DNA が経日的に確実に分解されていくということは、安全性の観点から非常に有利な点であると考えられる。今後は、細胞質内において、如何に plasmid DNA を安定に保つようにするかといった、細胞内徐放などの技術を組み入れるなど、安定な遺伝子発現が得られる DDS の開発が重要になってくるものと考えられる。このような細胞質内遺伝子発現系は、細胞質内で遺伝子を安定化させ得る DDS 製剤等の開発と共に、将来の非ウイルスベクターを用いた遺伝子治療にとって非常に有意義なシステムとなり得るものと期待される。

論文審査の結果の要旨

現在の遺伝子導入ベクターは、ウイルスベクター、非ウイルスベクターに大別される。ウイルスベクターは、ウイルス感染能力を利用しているため、(1)細胞への導入効率が非常に高く、(2)核への移行も良好であるという利点を有している。しかしその反面、ウイルス遺伝子を利用するために、(3)導入遺伝子の大きさに制限があること、(4)ウイルス由来のタンパク質が細胞内で新たに合成されること、(5)発癌性、免疫原性、細胞毒性や野生型ウイルスの出現の可能性など、安全性の面での危惧が拭いきれない。一方、人工脂質などを用いた陽電荷リポソーム (カチオニックリポソーム) に代表される一般的な非ウイルスベクターは安全性に優れている点でその将来性が期待されている。しかし、非ウイルスベクターにおいて認められる共通の問題は、未だ細胞内に導入した遺伝子の核への移行性の乏しさに起因した遺伝子発現効率の低さにある。そのため、この遺伝子の核移行性に関する問題を解決するために、核移行シグナルを利用した遺伝子の核へのターゲティングといったアプローチが試みられてきているが、未だ十分とは言いがたい。これは核へのターゲティング効率自身の問題と、核膜孔 (約50-80nm) に対して一般的な plasmid DNA (約100nm 以上) が圧倒的に大きいと言う問題にある。従って核膜が消失する増殖中の細胞で遺伝子発現をさせているのが現状である。そこで著者は、非ウイルスベクターが抱える問題点を克服する手段として、核移行を必要とせず、細胞質内に

において遺伝子発現が可能な遺伝子発現系（細胞質内遺伝子発現系）の確立を目指した。その結果、

1. T7プロモーター配列を有する plasmid DNA と T7 RNA polymerase との共導入により、核移行を必要とせず細胞質内で遺伝子発現可能な細胞質内遺伝子発現系（T7発現系）を可能とした。
2. 通常の遺伝子発現に核移行を必要とする plasmid DNA とは異なり、T7発現系では非増殖性の細胞においても増殖中の細胞と同程度の遺伝子発現が認められた。
3. T7 RNA polymerase 存在下で T7 RNA polymerase を発現する plasmid DNA (pT7 AUTO 2) を用いることにより、T7系の遺伝子発現効率の増強ならびに発現期間の延長が認められた。
4. マウスの脳内への遺伝子導入を行った結果、T7発現系が、*in vivo* の細胞においても従来の核移行を必要とする plasmid DNA と比較して高い遺伝子発現効率を示した。

以上の様に、T7プロモーター配列を有する plasmid DNA と T7 RNA polymerase との組み合わせにより、遺伝子の核移行を必要としない、細胞質内遺伝子発現系が可能となった。細胞質内遺伝子発現系は、非増殖性細胞が大多数を占める *in vivo* の細胞に対して特に有効な遺伝子発現系であると考えられ、将来の非ウイルスベクター系における遺伝子導入法として非常に有効な技術となり得るものと期待される点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考えられる。