



| | |
|--------------|--|
| Title | 対称構造を有する生分解型カチオン性脂質の合成と遺伝子導入ベクターへの応用研究 |
| Author(s) | 余, 蔚 |
| Citation | 大阪大学, 1999, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/41358 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 余 蔚 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 第 14575 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 薬学研究科薬品化学専攻 |
| 学位論文名 | 面对称構造を有する生分解型カチオン性脂質の合成と遺伝子導入ベクターへの応用研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 今西 武 |
| | (副査) 教授 大森 秀信 教授 真弓 忠範 教授 小林 資正 |

論文内容の要旨

遺伝子治療とは、欠損した遺伝子を外部から患者の体内に導入して治療を行おうというものである。この遺伝子治療の実用化の鍵は安全で効率の良い遺伝子導入法の開発にある。現在行われている遺伝子導入法としては、ウイルスベクターを用いる方法がよく知られている。しかし、このウイルスベクター法にはその抗原性や病原性という問題点が残されている。一方、非抗原性、低い毒性、多量のDNAを運ぶ能力、取り扱い易さという観点から、カチオン性リポソーム法がウイルスベクター法に代わる遺伝子導入法として有用であると期待されている。

このカチオン性リポソームを用いた遺伝子導入の有用性は、1987年、Felgnerらによって初めて示された。彼らは、Lipofectin® (DOTMA:DOPE, 1:1) を用いて遺伝子を細胞に導入し、それが高い遺伝子導入効率を有していることを明らかにした。この研究に端を発し、様々なタイプのカチオン性脂質分子が合成され、その遺伝子導入効率について検討が行われている。しかし、これまでに合成してきたカチオン性脂質の多くは、リポソーム化することにより比較的高い遺伝子導入効率を示してはいるものの、細胞毒性及び血清中での不安定性等、臨床応用における問題点がいくつか指摘されており、これらの問題を解決することが今後の課題であるとされている。

著者はこのような背景のもと、新しいカチオン性脂質分子の設計及び合成を行った。すなわち、その設計にあたっては、細胞に対する毒性を極力下げるために、カチオン性脂質は生体構成成分（グリセリン、長鎖脂肪酸、アミノ酸誘導体）を基に合成することとし、さらに生分解性構造とするため疎水性部と親水性部間はエステル結合で結ぶこととした。また、化合物を対称体とすることにより光学異性体の問題をなくし、合成経路を比較的簡潔なものとしている。このようなコンセプトに基づき、脂肪酸部分の構造、及び四級アンモニウム部とグリセリン骨核を結ぶリンカーの長さの異なる合計7種類のカチオン性脂質1の合成を行った。

リポソームの形態としては、トランスフェクションの際に操作が簡便であり、必要なDNA量も少なくてすむSUV (small unilamellar vesicle) を選択し、カチオン性脂質1を天然の中性脂質であるDOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine) とともに、超音波処理法によりリポソーム化した。そのカチオン性リポソームの安定性を、粒度および遺伝子導入効率の経時的变化により検討したところ、このカチオン性リポソームを4℃下で保存した場合には調製後6カ月間は粒径の変化も見られず、遺伝子導入効率もほとんど変化しないことを確認した。さらにこのカチオン性リポソームを用い、ハムスター由来のCHO細胞に対してルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミドの導入を行い、その遺伝子導入効率について検討した結果、今回合成した7種のカチオン性脂質の中で、

脂肪酸部分にオレイン酸を有する1Ab (YKS-220) や 1Ac と DOPE から調製したカチオン性リポソームが優れた遺伝子導入効率を有していることが分かった。また、このカチオン性リポソームを用いた遺伝子導入条件の最適化を試みた結果、YKS-220とDOPEを1:4の割合で混合し調製したリポソームの遺伝子導入効率が最も高いこと、さらにそのリポソームとDNAの複合体が若干正に荷電した場合に効率よく遺伝子が導入されることが分かった。さらに、本法がハムスター由来のCHO細胞の他に、サル由来のCOS細胞、ヒト肝ガン細胞のHepG2細胞等に対しても有効であることを見出した。また、細胞増殖の測定に広く用いられているMTT法を改良したWST-1法を用い、カチオン性リポソームのCHO細胞に対する毒性発現を調べたところ、カチオン性脂質の設計段階に期待した通り、このカチオン性リポソームを高濃度(160 μM)で用いた場合においても細胞毒性が見られないことを確認した。

さらに、比較的煩雑なリポソーム化という操作を行わずより簡便な方法、すなわち、カチオン性脂質YKS-220とDOPEのエタノール溶液を、遺伝子導入の際に用いる培地であるOpti-MEM® Iで希釀することで得られるカチオン性脂質粒子についても、その遺伝子導入効率の詳細な検討を行い、YKS-220とDOPEを1:4~1:7の組成比で調製したカチオン性脂質粒子が効率よく遺伝子を導入することを明らかにした。また、このカチオン性脂質粒子とDNAの複合体は、DNAの量を問わず、脂質量が5 nmolの時に、最も高い遺伝子導入効率を示すことが分かった。さらに、種々の培養細胞に対する遺伝子導入を行い、このカチオン性脂質粒子が、CHO細胞、HepG2細胞、COS細胞、ヒト子宮ガン由来のHeLa細胞においても有用であることを明らかにした。これに加えて、Ham's F12培地に10%の牛胎児血清(FBS)を添加した系でのカチオン性脂質粒子の遺伝子導入を、CHO細胞を用いて検討した結果、このカチオン性脂質粒子は血清存在下という条件下においても十分な遺伝子導入効率を示すを見出した。さらに、DMEM培地に0-16%のFBSを添加した系においても、COS細胞に対する遺伝子導入効率を検討し、添加したFBSの濃度が14%以下では遺伝子導入効率の低下は認められないという良好な結果を得ることができた。

このように著者は、両親媒性化合物の会合性、及び細胞への毒性を考慮して、面對称構造を有する生分解型カチオン性脂質YKS-220を設計・合成するとともに、これを用い、カチオン性リポソーム、カチオン性脂質粒子という遺伝子導入ベクターを調製し、これらが優れた遺伝子導入効率、及び低い細胞毒性を有することを明らかにした。

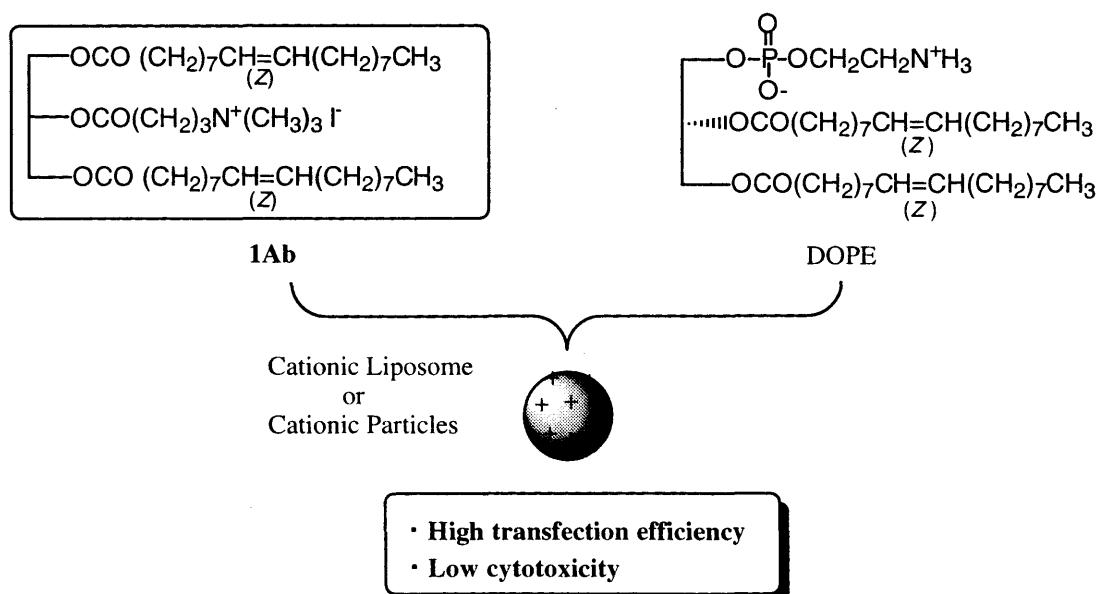


Fig. 1. Schematic representation of this work.

論文審査の結果の要旨

遺伝子導入法の開発は遺伝子治療のみならず広く分子生物学研究などのツールとして大変重要な意義をもっている。

現在ウイルスベクターを利用する方法が最もよく知られているが、安全性などの観点から新規な人工のカチオン性リポソームによる実用性の高い遺伝子導入法の開発に熱い期待が寄せられている。

このような背景の下、申請者は遺伝子導入効率を高めながら、細胞毒性を抑えることを指向した生分解性構造の新しい両親媒性カチオン脂質 YKS-220を設計し、その効率的合成に成功した。本脂質と中性天然脂質 DOPE とを用いてカチオン性リポソームを調製し、このものが4℃で長期間安定に存在し、様々な種類の細胞に遺伝子を導入する優れた能力を有していることを見い出すとともに、予想通り細胞毒性が極めて低いことを明らかにした。

更に、リポソーム化せずに本新規カチオン性脂質 YKS-220を DOPE とともにエタノール溶液とし、これを用いても種々の細胞に遺伝子を効率良く導入する能力を有していることをも明らかにした。

これらの研究成果は博士（薬学）の学位論文として十分に価値あるものと認める。