The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	遺伝子導入ベクターとしての膜融合型リポソームを用いた腫瘍免疫遺伝子治療に関する研究
Author(s)	今津, 進
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41977
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

【10】

氏　　名	今津　進（いまづ　すすむ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　15365　号
学位授与年月日	平成12年3月24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	**遺伝子導入ベクターとしての膜融合型リポソームを用いた腫瘍免疫遺伝子治療に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授　真弓　忠範 （副査） 教授　山元　弘　教授　馬場　明道　教授　東　純一

論文内容の要旨

1990年に米国で最初の遺伝子治療が行われて以来、米国をはじめとして世界で3000人を越える患者に遺伝子治療が行われてきた。当初遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患に適応が想定され検討されていたが、現在ではその対象疾患も、単一遺伝子病のみならず、AIDSや癌など重篤で難治性の後天性疾患を含め、あらゆる疾患に対して新しい治療法をもたらすと期待されている。

遺伝子治療において最も重要なことは、標的細胞へ外来遺伝子を導入し安全かつ効率良く遺伝子を発現させるベクター並びにそのシステムの開発である。現在臨床で用いられている遺伝子導入法は、レトロウイルスやアデノウイルス等のウイルスベクターとリポソームを中心とする非ウイルスベクターである。これらのベクターには、一長一短があり、一般にウイルスベクターは、高い遺伝子発現を示すが、その反面、発癌性、免疫原性、野生型ウイルスの出現の可能性など、安全性に関する懸念がぬぐいきれない。一方、非ウイルスベクターは、安全性に優れているが、遺伝子発現効率がウイルスベクターに比べて極端に低いという致命的欠点を有している。このように、現在の遺伝子治療研究では、いくつもの技術的問題に直面しており、実際の臨床においても当初期待されたほどの治療効果を上げることができていない。そのため、最近数年間の遺伝子治療研究の最重要課題として、おのおののベクターの長所を活かし、特定の疾患の治療を目的とした疾患別ベクターの開発や、既存のベクターの機能を越える新たな性能を持ったベクター開発が求められている。

以上のことから、私は非ウイルスベクターであるリポソームにウイルスの膜融合能のみを付与したハイブリッドベクターを理想的なベクターの候補として考え、特にセンダイウイルスを用いた膜融合リポソームを用いて、そのDNAワクチンベクターとしての性質や腫瘍免疫遺伝子治療への応用について検討した。さらに、センダイウイルスを用いた膜融合リポソームに変わる新たなハイブリッドベクター候補としてVesicular Stomatitis Virus（VSV）を利用した安全性の高い新規ベクターの開発を試みた。

これまで著者らは、センダイウイルスの膜融合能を利用した膜融合リポソームを開発し、遺伝子治療用ベクターとしての有効性を報告してきた。しかしながら、膜融合リポソームの遺伝子発現は、安全性を考慮しプラスミドDNAを利用しているため、永続的な発現が必要な先天性遺伝子疾患への応用には問題がある。従って、他の非ウイルスベクターに比べ遺伝子発現効率が高くかつ安全性の高い膜融合リポソームを最大限に利用できる方法として、DNAワクチンへの応用を考えた。ワクチン療法の場合、「微弱な抗原からいかに効率よくワクチン効果を引き出すか」が最

も重要なポイントである。そのためには、抗原提示細胞（APC）などの標的細胞で抗原特異的な免疫を誘導できる抗原遺伝子の発現量と発現期間を確保し、抗原特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）を効率よく活性化できるDNAワクチンベクターの開発が重要である。実際、本研究では、膜融合リポソームが、他の非ウイルスベクターに比べAPCに効率よく抗原発現プラスミドDNAを導入および発現させることができ、CTLを中心とする細胞性免疫、抗体産生を中心とする体液性免疫の両免疫システムを効率よく誘導できることを明らかにした。そこでこれらの知見を基に腫瘍ワクチンへの応用を試みた。モデル腫瘍抗原発現プラスミドDNAを封入した膜融合リポソームをマウスの皮内に投与したところ、投与量、投与回数依存的に腫瘍ワクチン効果が増強し、他のDNAワクチンベクターを用い免疫した群に比べ効率よく抗腫瘍免疫が誘導された。またこの効果は、投与部位の所属リンパ節で遺伝子発現が認められたこと、および抗CD8抗体を腫瘍移植直前に投与したとき抗腫瘍効果が減弱したことから、APCに効率よく遺伝子導入し、抗原特異的CTLを誘導した結果であると考えられた。さらにこのワクチンベクターの特徴として、複数回投与してもブースター効果がマスクされず、ワクチン効果も少なくとも最終免疫12週後においても持続していた。

上述のようにセンダイウイルスの膜融合能を利用した膜融合リポソームは、in vivo直接投与においても高いDNAワクチン効果が得られるなど、次世代ベクターとしての利点を有していることが明らかとなった。しかし、膜融合リポソームを血中内に投与した場合には、シアル酸を介して赤血球とも融合してしまうために溶血を引き起こしてしまう可能性が予想される。したがって、その投与方法は、一時血流を止めるか、少量投与可能な局所投与や血液を介さない臓器還流法が主流となってくる。そこで著者は、in vivo直接投与した際、膜融合リポソームより安全かつ生体内で安定に作用する新規遺伝子導入ベクターを開発する目的で、溶血作用を示さず細胞とのみ効率よく融合するVesicular Stomatitis Virus（VSV）の利用を試みた。VSVとリポソームの融合体（VSV－リポソーム）を開発・精製し、その性質として、細胞傷害性が少なく、赤血球を溶血せず、血漿中で安定に存在できることが明らかとなった。またプラスミドDNAを封入したVSV－リポソームは、血清存在下においてもカチオニックリポソームに比べ効率よく細胞に遺伝子導入・発現させることができることから、全身性に投与できる遺伝子導入ベクターとして利用できる可能性が示唆された。

以上のことから、センダイウイルスおよびVSVを利用した膜融合型リポソームは、ウイルスのもつ特性と高い膜融合活性を保持しており、導入する遺伝子は任意の構造を選択できる。さらには、ウイルス由来の遺伝子は、完全に断片化してあるため安全性も高いという、ウイルスベクター、非ウイルスベクターの長所を併せ持った理想的なベクターであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

現在の遺伝子治療において最も緊急かつ重要な問題点は、細胞傷害性、免疫原性、遺伝子侵襲性がなく安全かつ高い遺伝子導入効率・発現効率を有する新規ベクターを開発することである。本研究では、著者らのグループが新規に開発した、センダイウイルスの細胞膜融合能をリポソームに付与したハイブリッド型ベクターである膜融合リポソームを用いて、遺伝子導入ベクターとしての性質、腫瘍免疫遺伝子治療への応用について検討を行った。さらに、膜融合リポソームは、大量血中投与の場合には溶血を引き起こす事、および血中安定性等に難点がある事から、新たなハイブリッドベクター候補としてVSV（Vesicular Stomatitis Virus）を利用した安全性の高い新規ベクターの開発を試みた。その結果、以下の成果が得られた。

1）膜融合リポソームは、抗原提示細胞に効率よく抗原発現プラスミドDNAを導入・発現させ、MHC class I抗原提示経路に送達できることを明らかにした。

2）膜融合リポソームは、効果的にTh1およびTh2ヘルパーT細胞を誘導することを示した。

3）膜融合リポソームは、細胞性免疫、体液性免疫の両免疫システムを持続的かつ効率よく誘導するDNAワクチンベクターであり、腫瘍免疫に対しても応用可能であることを示した。

4）VSVの膜融合能をリポソームに付与したVSV－リポソームは、溶血作用を示さず、血中安定性にも優れている

ことから、静脈内投与が可能な、新たなハイブリッド型遺伝子導入ベクター開発の可能性を示した。

以上のように、本論文は今後の遺伝子治療基礎研究に対して極めて有効な手法を提供しており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。