



Title	Anti-HB-EGF Antibody-Mediated Delivery of siRNA to Atherosclerotic Lesions in Mice
Author(s)	土田, 翔太
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72491
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 土田 翔太		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査 大阪大学教授	篠木 宏実
副 査 大阪大学教授	松下 麻志	
論文審査の結果の要旨		
<p>これまでの実験動物を用いた先行研究で動脈硬化巣に遺伝子などの核酸送達が有効である事が報告してきた。それらの報告では主にウイルスベクターが使用されてきたが、副作用が問題となっており、安全で効率良く核酸送達可能な非ウイルスベクターの開発が求められている。</p> <p>当研究室ではこれまでに、動脈硬化巣でナノサイズの粒子が集積する事、HB-EGFの発現が増加する事を見出した。また、当研究室が所有するHB-EGF抗体はHB-EGFを介して効率よく細胞内に取り込まれる事を見出した。そこで、本研究ではこのHB-EGF抗体を用いたHB-EGF抗体結合ベクターの開発を行った。</p> <p>その結果、siRNAを標識したHB-EGF抗体結合ベクターはin vitroでHB-EGF発現細胞特異的に細胞内に核酸を送達し、siRNAの標的遺伝子の発現抑制が可能であった。また、動脈硬化モデルマウスを用いた検討において、蛍光分子を修飾したHB-EGF抗体結合ベクターは動脈硬化モデルマウスの血管に有意に集積した。また、siRNAを修飾したHB-EGF抗体結合ベクターは動脈硬化巣においてsiRNAの標的遺伝子の発現抑制を起こし、他の臓器では発現抑制を起こさなかった。</p> <p>これらの結果から、HB-EGF抗体結合ベクターは副作用が少なく、効率良く核酸送達可能な非ウイルスベクターであると考えられ、動脈硬化症に対する遺伝子治療での臨床応用が期待される。以上より、HB-EGF抗体結合ベクターは動脈硬化巣への核酸送達に有用である事が示された。よって本研究は学位の授与に値すると考えられる。</p>		

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	土田 翔太
論文題名 Title	Anti-HB-EGF Antibody-Mediated Delivery of siRNA to Atherosclerotic Lesions in Mice (HB-EGF抗体を用いたマウス動脈硬化巣へのsiRNA送達技術)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>近年、動脈硬化症に対してsiRNAやmiRNA、mRNA、DNAなどの核酸を用いた遺伝子発現制御が治療効果を示す事が示唆されている。しかし、遺伝子発現制御に関して、ウイルスベクターを用いた研究が主に行われてきたが、安全性が問題視されており、安全で効率的に核酸を送達可能な非ウイルスベクターの開発が求められている。当研究室ではこれまでに動脈硬化モデルマウスの大動脈においてナノサイズの粒子が集積する事、ヒト及びマウス動脈硬化巣でHB-EGFの発現が増加する事を見出している。HB-EGFはジフテリア毒素の受容体として知られており、ジフテリア毒素は細胞内に侵入する事が明らかされている。また、ジフテリア毒素と同様に当研究室が所有するHB-EGF抗体も細胞内に侵入する事を見出している。そこで、本研究ではこのHB-EGF抗体を用いてHB-EGF抗体結合ベクターを作製し、in vitro及びin vivoで機能評価を行った。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
1. HB-EGF抗体結合ベクターの調製	
<p>種々のクロスリンカーを用いてHB-EGF抗体にNeutrAvidinを結合させたHB-EGF抗体結合ベクターの作製条件を検討した。その結果、HB-EGF抗体をsulfo-SMCCと、NeutrAvidinを2-iminothiolaneと反応させ、これらの生成物を反応させる事で安定してHB-EGF抗体結合ベクターが調製可能である事を見出した。また、本ベクターの抗原への親和性を表面プラズモン共鳴法で定量評価した所、HB-EGF抗体と比較すると僅かに親和性が低下するものの、本ベクターは十分に強い親和性を保持していた。</p>	
2. in vitroでの評価	
<p>蛍光分子を標識したHB-EGF抗体結合ベクターを作製し、細胞への標的化能をHB-EGF安定発現細胞とその親株で評価した。その結果、HB-EGF抗体結合ベクターは親株に比べて、HB-EGF安定発現細胞に有意に結合した。また、蛍光標識抗マウス抗体を用いて、HB-EGF抗体結合ベクターのHB-EGF安定発現細胞への取り込みを評価した所、本ベクターは24時間で約80%の細胞で完全に取り込まれる事が明らかになった。</p>	
<p>ルシフェラーゼに対するsiRNAを標識したHB-EGF抗体結合ベクターを作製し、in vitroでの核酸送達能をHB-EGF・ルシフェラーゼ共安定発現株、ルシフェラーゼ安定発現株のルシフェラーゼ活性で評価した。その結果、本ベクターはルシフェラーゼ安定発現株のルシフェラーゼ活性には影響を及ぼさないが、HB-EGF・ルシフェラーゼ共安定発現株のルシフェラーゼ活性を有意に低下させる事が明らかになった。この結果から、本ベクターがHB-EGF発現細胞特異的に核酸送達が可能である事が明らかになった。</p>	
3. in vivoでの評価	
<p>HB-EGF抗体結合ベクターはヒトHB-EGFに結合する抗体であるため、マウスHB-EGFをノックアウトし、同じ遺伝子座にヒトHB-EGFとhrGFPをノックインしたhzHB-EGF KIマウスを使用した。このマウスをApoE K0マウスと掛け合わせる事で動脈硬化モデルマウスを作製した。</p>	
<p>蛍光標識HB-EGF抗体結合ベクターをhzHB-EGF KI x ApoE K0マウス及びhzHB-EGF KIマウスに投与し、大動脈への集積能を評価した。その結果、本ベクターがhzHB-EGF KI x ApoE K0マウスの大動脈に集積する事が明らかになった。</p>	
<p>hrGFPに対するsiRNAを標識したHB-EGF抗体結合ベクターをhzHB-EGF KI x ApoE K0マウスに投与し、in vivoでの核酸送達能をhrGFPの発現量で評価した。その結果、本ベクターが動脈硬化巣において有意にhrGFPの遺伝子発現量を低下させる事が明らかになった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
HB-EGF抗体結合ベクターが動脈硬化巣での遺伝子発現の抑制に有用である可能性が示唆された。	