The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	In vivo uterine local gene delivery system using TAT-displaying bionanocapsules
Author(s)	小泉, 花織
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/77536
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	小泉花織
論文題名 Title	*In vivo* uterine local gene delivery system using TAT-displaying bionanocapsules（TAT提示バイオナノカプセルを用いた子宮局所への遺伝子送達システム）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

体内での薬物分布を制御することで、薬物の効果を最大限に高め、副作用を最小限に抑えることを目的とし、近年様々なDrug Delivery System（DDS）が検討されてきた。子宮は経腟的に直接アプローチが可能で、薬剤の局所投与に適した臓器である。子宮内膜はその役割を変化させるために高効率に一過性導入することができるDDSが必要である。現在子宮局所へのDDSとしては子宮内避妊具であるレボノルゲストレル徐放型子宮内避妊システム（LNG-IUS）が存在する。しかし、その他には子宮を標的としたDDSはない。さらに動物モデルを対象とした子宮局所に対するGene Delivery System（GDS）の報告も限られている。

Bio-nanocapsule（BNC）はB型肝炎ウイルスの表面抗原であるLタンパク質を遺伝子組換え酵母で過剰発現することで得られる直径30nmの中空ナノ粒子であり、すでに全世界で30年以上も臨床使用されてきたB型肝炎ワクチンと同様の構造である。本研究ではマウスを用いてBNCを子宮内膜局所のGDSとして至適化、再構築を行うことを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

BNCのLタンパク質のPre-S1領域に存在するヒト肝臓認識部位によりin-vitroおよびin-vivoにおいてヒト肝臓由来細胞もしくは組織に物質を送達できる。本研究ではPre-S1領域およびPre-S2領域の一部（51-159aa）を、Protein AのIgG-Fc結合ドメインに置換したZZ-BNCを用いた。子宮腟内に接着させるために、細胞膜透過ペプチドである塩基性ペプチドであるTATペプチドをZZ-BNCに付加した（TAT-modified ZZ-BNC）。リポソーム融合法により遺伝子をBNC内部に封入し、これを麻酔下に交配後1.5日目のマウスの子宮にBNCを直接投与し検討を行った。

導入24時間後において、Cy7ラベルしたTAT-modified ZZ-BNCはZZ-BNCと比較して明らかに子宮内に多く滞留していることが認められた。導入24時間後におけるluciferase assayにおいて、TAT-modified ZZ-BNC群ではnaked DNA群（5000倍以上）、lipofection群（18倍）に比して有意に高い遺伝子導入効率が認められた。ZZ-BNC群との比較ではばらつきが多く有意差はないものの、1.9倍の遺伝子導入効率を認めた。導入遺伝子の局在は子宮内膜上皮に限局しており、TAT-modified ZZ-BNCそのものは48時間後には子宮内膜より消失していた。子宮局所に導入したTAT-modified ZZ-BNCが血行性に全身へ移行することはなく、導入遺伝子の子宮・胎盤・羊膜・胎児への移行も認められなかった。また、妊娠率、胎児数、胎児発育への影響も認めなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

TAT-BNCは経腟的に子宮に直接導入することで、子宮局所への標的化が可能であり、妊娠を阻害することなく高効率なGDSとして有用であることが示唆された。TATペプチドをin-vivoで用いる一般的な欠点は非特異的な細胞への融合であるが、今回のように局所へ直接投与する方法により、TATペプチドの性質を有効的に活用することができる。今後子宮体癌など新たな細胞表面マーカーの検討により細胞に対して再標的化することを今後の検討課題とする。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）小泉花織

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	木村　正
	副　査	大阪大学教授	金田安史
	副　査	大阪大学教授	土岐祐一郎

論文審査の結果の要旨

子宮は経腟的に直接アプローチが可能な臓器であるにもかかわらずdrug delivery system (DDS)だけでなく、動物モデルを用いたGene Delivery System (GDS) の報告も限られている。子宮を標的とする事でDDSもしくはGDSとして安全性の担保がより求められる。
Bio-nanocapsule (BNC) は、30年以上世界中で使用されてきたB型肝炎ワクチンと同様の構造である中空ナノ粒子で、粒子内に物質を封入し送達する事ができる。本研究ではBNCのヒト肝臓認識部位をprotein A由来の抗体結合ドメインと置換したBNCを作製し、マウスモデルを用いてこれを子宮に対するDDSとして最適化を行った。
膜透過ペプチドであるTATペプチドを付加する事により、BNCはより子宮に滞留し、高い遺伝子導入効率を示した。導入遺伝子は子宮内膜上皮細胞に限局しており、導入されたBNCは48時間後までには消失する事が確認された。この導入により妊娠は阻害されず、胎児数、胎児の大きさにおいても影響を与えない事が示され、これが子宮に対するGDSとして有用である事が示唆された。
一般的にはTATペプチドは強い細胞接着能をもつ一方で、それが非特異的であるがゆえにin-vivoでの応用が難しい。本研究では子宮腟内に直接投与するためにTATペプチドの長所のみを応用する方法の１つを提案した。これはDDSおよびGDSの材料を考える上で興味深い知見であると考えられ、上記の内容は学位に値するものと認める。