

## 審査の結果の要旨

氏名 張 祎 伟

マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入治療は、ウイルスが不要であることや、導入経路への損傷のリスクを抑えたまま狙った部位に導入できる可能性を持つなど、その侵襲度の低さと空間的な制御性などの観点から新しい遺伝子治療法として注目を集めている。しかし、現状では導入効率が数%程度と低く、導入率を向上させるための導入メカニズムが未だ解明されていないことなどが課題となっている。本論文は、導入メカニズムの解明、特にマイクロバブルと細胞の詳細な相互作用の解明を目指して行われた研究成果についての論文であり、全部で5章から構成されている。

第1章は緒言であり、本論文の背景および目的について述べている。まず、ウイルスベクターを用いた手法、エレクトロポレーション、超音波遺伝子導入など様々な手法を用いた遺伝子導入治療の現状を概観し、超音波及びキャビテーションの生体への相互作用に関する先行研究の結果を紹介している。これらの結果において、導入率の向上には遺伝子導入率と細胞生存率間のトレードオフを克服する必要があることを説明している。また、マイクロバブルを援用した遺伝子導入においては、体外から導入したシェル付きのマイクロバブルと、超音波の印加によって標的の近傍で生成したキャビティそれぞれの振動と圧壊、それぞれの膜透過性や殺細胞効果への寄与を調べる必要があることを指摘すると共に、これらの寄与を独立して計測・評価することを試みる本論文のアプローチ方法を示している。

第2章はレーザを用いたバブル濃度変化の計測からバブルダイナミクスに関して検討した結果を述べている。まず、レーザを用いた濁度計測系を構築し、その校正結果から計測の妥当性を示している。バブル濃度の計測結果に基づいて、シェル付のマイクロバブルが圧壊する音圧やパルス長などの超音波条件を整理し、各遺伝子導入条件でのバブル圧壊に伴うバブル濃度の時間変化のデータを収集するのに成功している。

第3章はキャビテーションノイズの計測からバブルダイナミクスに関して検討した結果を述べている。キャビテーションノイズ計測と2章のバブル濃度変化のデータを組合せることで、シェル付のマイクロバブル及びキャビティそれぞれの遺伝子導入や殺細胞効果に寄与する時相が区別して議論出来ることを明らかにしている。また、遺伝子導入に用いる超音波条件によってキャビテーションノイズのスペクトルの非線形性や周波数成分毎の安定性が大きく異なる

ことを実験的に示し、これらの値がキャビティの振動や圧壊の激しさの指標となることを明らかにしている。

第4章は NIH3T3 細胞への色素 (FITC-Dextran) の導入率と生存率の実験結果に関して述べている。まずシェル付バブルの音圧やパルス長の閾値前後での色素の導入率の急激な変化から、シェル付のバブルに関しては、その体積振動のみでなく、圧壊させることが有効な導入率を得るには必要であることを明らかにしている。次に超音波遺伝子導入の従来手法である GFP の発現をカウントする手法に比べ、色素の導入を用いた手法により計測の信号対雑音比を改善することにより、超音波照射の時間毎の効果を比較する際の時間分解能を分オーダーから 10 秒オーダーに短縮することが可能になったことを示した。この系を用いることにより、照射開始 10 秒以内のシェル付バブルの濃度が高い条件下での導入率や殺細胞効果の計測結果と、シェル付バブルの圧壊後である照射開始 20 秒から 60 秒までのキャビティの存在比が高い条件下での導入率や殺細胞効果の計測結果を比較することが可能となった。これらの比較から、シェル付バブルの圧壊は導入率の向上に寄与し、キャビティの激しい振動や圧壊は殺細胞効果への寄与が高いことを明らかにした。これらの結果からマイクロバブル圧壊時に高効率な導入が行われるが、圧壊後にキャビティの振動や圧壊が起きるために殺細胞効果が高まることから、従来の導入率と細胞生存率のトレードオフの原因となっている可能性を示している。以上の成果は、これまで導入率に限界があると考えられていた超音波遺伝子導入に対して、標的近傍でマイクロバブルを圧壊させる手法の導入や、マイクロバブル濃度を保持するような持続的なマイクロバブルの供給などの新規な手法によって、導入率の限界を克服出来る可能性を示しており、その意義が高いと評価される。

第5章は総括であり、本論文全体のまとめとその意義について述べている。また今後のマイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入の効率向上への展望を述べている。

以上、本論文はマイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入のメカニズムの解明と導入効率向上のための指針を得ることを目指し、シェル付のマイクロバブルとキャビティがそれぞれ導入率と細胞生存率に与える影響が異なることを明らかにしており、マイクロバブルを圧壊させる条件や濃度制御など導入率の限界を克服するための新しい知見を得ており、バイオエンジニアリングや遺伝子治療の発展に大きく貢献するものと考えられる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。