

審査の結果の要旨

氏名 遠藤 泰輔

細胞治療は機能不全などに陥った疾患部への細胞移植により、低下した機能の補助・回復を試みる治療法であり、現在様々な難病の治療を可能とする手法として期待されている。しかし現実には培養中に移植細胞本来の機能が低下してしまう問題や、移植後の生体組織への生着の問題および生存期間が短いなどの問題があり、細胞治療本来のポテンシャルを引き出すためには移植方法の改善が急務となっている。本研究は、臨床応用可能な細胞治療の基盤となる方法論として、移植細胞の機能維持および生体への生着促進が期待される三次元培養技術の構築と、移植細胞に疾患治療を補助する機能を付与する遺伝子導入用材料の合成法を確立する事を目的として行われたものである。すなわち、三次元細胞培養技術として、サイズ制御された細胞スフェロイドを用い、非ウイルス性遺伝子キャリア用材料を新規に開発し、その作用機序の解明から遺伝子導入条件の最適化までを行っている。以下、各章ごとに本論文の審査結果の概要を述べる。

第一章では、序論として細胞治療および遺伝子治療の現状を最近の研究動向をふまえて述べるとともに、細胞スフェロイドへの遺伝子導入を実現するために遺伝子キャリアに求められる性能について触れ、特に低毒性かつ遺伝子導入効率の高いポリカチオン(PAsp(DET))とそのポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体(PEG-PAsp(DET))の役割、およびPAsp(DET)ホモポリマーとブロック共重合体を混合して用いるブロック/ホモ混合系PEG化ポリプレックスの有用性を述べている。

第二章では、移植用細胞スフェロイド作成方法とそれに対する遺伝子導入方法について、具体的にはラットから採取して作成する初代肝細胞スフェロイドの作成方法、PEG化ポリプレックスを用いた遺伝子導入条件の検討およびスフェロイド移植に向けた遺伝子導入後のスフェロイドの回収方法の検討を行っている。直径100 μ mの円形に細胞接着面がパターン化された基板を用い、二段階肝コラゲナーゼ灌流法により採取した非実質細胞を含む初代肝細胞を播種した結果、一般的にスフェロイド作成の際に用いられるフィーダー細胞を用いずとも均一なスフェロイドが形成可能であることを示している。さらにこの肝細胞スフェロイドに対してPEG-PAsp(DET)ブロック共重合体とhomo-PAsp(DET)ホモポリマーによるブロック/ホモ混合系のポリプレックスによって遺伝子導入を行ったところ、市販遺伝子導入試薬であるFuGENE HDではスフェロイドが崩れ、肝細胞の機能の一つであるアルブミン産生能も失われてしまうのに対し、最適化したブロック/ホモ混合系のポリプレックスではスフェロイドを崩さずに、無投与群と同程度のアルブミン産生を維持したまま導入した遺伝子を高発現させることに成功している。また、パターン基板の細胞接着部位に低温にすると親水化する温度応答性ポリマーで表面処理されたパターン基板を用いることによって、崩れやすい肝細胞スフェロイドに物理的なダメージを与えることなく遺伝子導入後のスフェロイドを回収する事にも成功している。さらに、スフェロイド移植後の細胞機能を評価するため、Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)マウス腫瘍由来の細胞外マトリ

クスを含有するゲル (Martigel™) に肝スフェロイドを移植するという実験を行っている。その結果、パターン基板上と同じように、無投与群と同等のアルブミン産生を維持したまま1ヶ月に渡って外挿遺伝子が高発現し続ける事を示し、これより遺伝子導入されたスフェロイドの細胞移植の実現可能性を論述している。

第三章では、ブロック/ホモ混合系 PEG 化ポリプレックスの弱点である PEG のシールド効果の低下を補うため、新たなポリマーの設計を試みている。PEG 保護層の増強に着目して二分岐型 PEG を導入し、PEG の分子構造の違いによる物性および機能の違いを直鎖型 PEG-PAsp (DET) と比較した結果、二分岐型 PEG-PAsp (DET) と pDNA との電荷量論比において作成されたポリプレックスは直鎖型 PEG-PAsp (DET) を用いた時より効果的にポリプレックスコアを保護できるだけでなく、二分岐型 PEG-PAsp (DET) のみが pDNA との電荷量論比を超え、ポリマーの添加量に応じてポリプレックスに会合するという特異な事実を見出している。この特異な会合挙動は多角的な検証により多層吸着であると結論づけられ、また、この二分岐型 PEG-PAsp (DET) 特有の現象は PEG 鎖同士の立体反発に加え、相溶性の無いカチオン性セグメントとの間に生じる立体的な不適合性により自由エネルギーが増大することが主要な原因であると考察している。さらに、この多層吸着による培地中での安定性の向上およびエンドソーム脱出能の向上により、従来の直鎖型 PEG-PAsp (DET) から形成されるポリプレックスよりも高い遺伝子発現を達成され得ることを示し、遺伝子キャリアの新たな設計指針を確立している。

第四章では、第三章で見出された二分岐型 PEG-PAsp (DET) を新たにブロック/ホモ混合系のシステムに適応し、それを用いることで初代肝細胞スフェロイドへの遺伝子導入を行っている。その結果、どのブロック/ホモ混合比においても二分岐型ブロック/ホモ混合系ポリプレックスで直鎖型ブロック/ホモ混合系ポリプレックスよりも高い遺伝子発現を示すという結果が得られている。また、遺伝子導入効率に優れる PAsp (DET) ホモポリマーを同条件にて適用したところ、遺伝子導入後 15 日でスフェロイドが崩れ、さらにアルブミン産生能も失われてしまう一方で、二分岐型ブロック/ホモ混合系ポリプレックスではホモポリマー単独による遺伝子導入時と同等の発現を示しつつもスフェロイドの形状が保たれ、かつ無投与群と同等のアルブミン産生が1ヶ月維持されることが示されている。したがって肝細胞スフェロイドに対する遺伝子導入には PEG による効果的なシールドが必要不可欠であり、かつ第三章で述べた二分岐型 PEG-PAsp (DET) の特異な性質が非常に有効であることが示されている。

第五章は総括であり、一連の結果を整理するとともに、遺伝子導入された初代肝細胞スフェロイドを用いた細胞治療の開発に関する本研究の意義と将来展望について述べている。

以上、本論文では細胞治療の治療効率向上を目指し、細胞スフェロイド移植を念頭に置いた遺伝子キャリア材料の開発についてまとめられている。初代培養細胞スフェロイドに対しても適用可能な、低毒性かつ高遺伝子発現効率を示す遺伝子キャリア材料は、再生医療や遺伝子治療への応用を通じて、今後のバイオマテリアル分野の発展に資するものと判断される。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。