

博士論文審査報告書

論文題目

Fabrication of DNA / Apatite
Nano-composite Layer for Gene Transfer
遺伝子導入のためのDNA/アパタイト
ナノ複合層の設計構築

申請者

矢崎	侑振
Yushin	YAZAKI

--

2013年 7月

近年、「細胞」、「増殖・分化因子」、「足場材料」を適切に組み合わせ、機能させることによって、病気や事故などにより失われた臓器や組織の機能を回復させる再生医療が注目されている。その際、組織や臓器の再生、及び機能回復のためには、幹細胞の増殖、分化を制御する必要があるが、そのための手法の一つとして遺伝子導入が挙げられる。従来の遺伝子導入法は、一般に DNA と遺伝子導入剤の複合粒子を細胞が存在する培養液や生体内等の溶液中に分散させる手順で行われる。しかしこの手法では、溶液中における粒子の動態制御が困難なため、遺伝子を導入する場所（位置）をコントロールすることは難しい。したがって、特に *in vivo* 応用においては、粒子の拡散による治療効果の低減や副作用（例えば、非標的細胞への遺伝子導入や、肝臓や肺などへの導入剤の蓄積による障害）が懸念されることになる。同様に粒子の動態制御が困難なことに起因して、遺伝子が細胞に導入されるタイミングの制御、生体内の様に複数の細胞種が存在する系における特定の種類の細胞のみへの遺伝子導入なども困難である。ところで、ハイドロキシアパタイトに代表されるリン酸カルシウムはバイオセラミックスとして広く知られ、臨床応用されてきた。また、分子生物学の分野において、リン酸カルシウムは非ウイルス系遺伝子導入剤として長く用いられてきた。近年、これらの研究が組み合わされ、DNA がナノスケールでリン酸カルシウムに担持された複合層（以下、D-CaP 層）が開発された。この複合層はバイオセラミックス及び遺伝子導入剤の両者の機能を併せ持つ。すなわち、高い生体適合性と、材料表面によって媒介される遺伝子導入機能を有している。もし、この D-CaP 層に課題である遺伝子導入の場所や時期のコントロール能、あるいは特定種の細胞のみへの遺伝子導入能を付加し、リン酸カルシウム系遺伝子導入剤の欠点である遺伝子導入効率を改善できれば、再生医療用材料として大変有望なものになり得ると期待される。

本論文は、(1) D-CaP 層上における場所特異的遺伝子導入法の開発、(2) D-CaP 層への溶解性制御因子担持による遺伝子導入時期のコントロール、(3) D-CaP 層への抗体担持による特定細胞種への遺伝子導入効率の向上、(4) D-CaP 層への脂質担持による遺伝子導入効率の向上、の4点を目的とした研究の成果をまとめたものである。また特に、リン酸カルシウムとしてアパタイトを用いた DNA /アパタイトナノ複合層（以下、D-Ap 層）の設計・構築を試みている。

本論文は 8 章により構成されている。

第 1 章では、本論文の研究背景と目的、そして概要について述べている。アパタイトの形成方法としては、焼結法、プラズマ溶射法、ゾル-ゲル法、アルカリ水熱法などが挙げられるが、本論文ではリン酸カルシウム過飽和溶液（CaP 過飽和溶液）を用いた共沈法により D-Ap 層を高分子基材表面に形成している。DNA を添加した常温・常圧の CaP 過飽和溶液中に表面処理された基材を浸漬すると、CaP 結晶と DNA 分子の共沈反応によって基材表面に D-Ap 層を形成できる。さらに、CaP 過飽和溶液中に DNA とともに各種機能分子（溶解性制御因子、細胞接着性タンパク質、抗体、脂質など）を担持した D-Ap 層を形成できることを示した。本研究で開発した D-Ap 層形成法の利点としては、体液に類似した CaP 過飽和溶液を用いたマイルドな環境で共沈反応を起こすことで、D-Ap 層中の DNA および各種機能分子の生理活性・機能にある

程度保持することができることが挙げられる。また、この共沈形成法によればマトリックスであるアパタイト層の内部にも DNA および機能分子を担持できるので、あらかじめ高分子基材表面に形成したアパタイト層の表面に DNA および各種機能分子を吸着させる表面吸着法に比べて、多量の DNA および機能分子を担持し、徐放能を付与できる。

第 2 章では、DNA/フィブロネクチン/アパタイトナノ複合層（以下、DF-Ap 層）上における場所特異的遺伝子導入、及び分化誘導について述べている。なおフィブロネクチンは細胞接着性タンパク質の一種で、細胞表面に存在するレセプターと結合する性質を有する。このフィブロネクチンを D-Ap 層に担持することで同層表面における細胞接着を促進し、遺伝子導入効率を向上させる効果がある。本章では、異なる遺伝子を担持させた 2 種類の DF-Ap 複合層を 1 つのウェル内で隣接させ、その表面で細胞を培養することにより、それぞれの複合層表面に接着した細胞に、その複合層に担持させた遺伝子のみを場所特異的に導入する手法を確立している。また、それによって隣接した各基板表面に接着した細胞をそれぞれ別の方向に分化誘導できる可能性を示している。本研究で確立した DF-Ap 複合層を用いた遺伝子導入法により、目的の遺伝子を目的の場所の細胞に選択的に導入し、その分化を誘導できることを明らかにした。

第 3 章では、炭酸イオン、及びフッ化物イオンのドーブによる DF-Ap 層上における遺伝子導入効率、及び導入時期の制御について述べている。本章ではまず、コーティング溶液として用いられる CaP 過飽和溶液中へ NaHCO_3 、あるいは NaF を添加することで、形成される DF-Ap 層に炭酸イオン、あるいはフッ化物イオンをドーブさせる技術を確認している。ここで、炭酸イオンのドーブにより DF-Ap 層の溶解性を向上させ、一方フッ化物イオンのドーブにより DF-Ap 層の溶解性を低下させることができることを示した。そして、得られた各 DF-Ap 層表面で培養した細胞への遺伝子導入効率が、同複合層の溶解性と正の相関を示すことを見出した。すなわち、DF-Ap 層の溶解性を制御することで、その表面における遺伝子導入効率を制御できることを初めて示した。また、DF-Ap 層の溶解性を低下させることで、同複合層表面上で遺伝子導入が起こる時期を遅延させることを示した。以上より、コーティング溶液中への NaF や NaHCO_3 の添加により、同液中で形成される DF-Ap 層の溶解性を制御でき、それにより同複合層表面における遺伝子導入の効率や時期を制御できることを明らかにした。

第 4 章では、DNA/抗体/アパタイトナノ複合層（以下、DA-Ap 層）上における細胞特異的遺伝子導入について述べている。なお、抗体はフィブロネクチンと異なり非常に高い特異性を持って抗原に接着するタンパク質である。本章ではまず、抗体の抗体-抗原反応活性を失活させることなく、DA-Ap 層を形成させる技術を確認している。そして得られた DA-Ap 層表面で培養した細胞のうち、目的の細胞へのみ、遺伝子導入効率を向上させることができることを示した。すなわち、抗体-抗原反応に高い特異性を利用した細胞特異的な遺伝子導入の可能性を見出している。

第 5 章では、DNA/脂質/アパタイトナノ複合層（以下、DL-Ap 層）を用いた高効率、かつ場所特異的遺伝子導入について述べている。本章では、DL-Ap 層への種々の脂質の担持により、遺伝子導入効率を向上させられることを明らかにした。最適な脂質を選定した結果、DL-Ap 層によって、DF-Ap 層と比較しても有意に高い導入効率を達

成している。また、DL-Ap 層を用いて、場所特異的に遺伝子を導入できることも初めて明らかにした。

第 6 章では、DL-Ap 層の形成方法（共沈法、吸着法）の比較、検討について述べている。本章ではまず、共沈法と吸着法のそれぞれの方法で DL-Ap 層を形成している。共沈法により DNA と脂質を DL-Ap 層内部にまで担持させることで、吸着法により作製した同層よりも担持量を増加させ、より長期に渡ってそれらを徐放させることができることを示した。その結果、共沈法により作製した DL-Ap 層による導入効率は、吸着法により作製した同層によるそれと比較して有意に高いことを明らかにした。

第 7 章では、DL-Ap 層形成条件（DNA 添加濃度、脂質 / DNA 比率）の検討について述べている。本章ではまず、種々の DNA 添加濃度、脂質 / DNA 比率の CaP 過飽和溶液を用いて DL-Ap 層を形成している。そして、それぞれ 2 種類の脂質を用いて DL-Ap 層を形成させた結果、脂質ごとに遺伝子導入効率が最大となる複合層形成条件が異なることを明らかにした。

第 8 章は結論である。本章では、本論文の成果を総括し、さらに再生医療や遺伝子治療などへの応用展開の可能性について述べている。

以上要するに、本論文は高機能性の DNA/アパタイトナノ複合層の作製法を確立し、当該複合層への場所特異的遺伝子導入法の開発、当該複合層の溶解性制御による遺伝子導入時期のコントロール法の開発、当該複合層への抗体担持による特定細胞種への遺伝子導入効率の向上、および脂質担持による遺伝子導入効率の向上を実現した研究成果をまとめたものである。これらの成果は、素材物質科学、生体材料工学、遺伝子工学のみならず、再生医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（工学）の学位を受けるに相応しいものであると認める。

2013 年 7 月

審査員

（主査）早稲田大学理工学術院教授 工学博士（早稲田大学） 山崎淳司
早稲田大学理工学術院教授 博士（理学）（大阪市立大学）香村一夫
早稲田大学理工学術院教授 理学博士（東京大学） 内田悦生
独立行政法人産業技術総合研究所主任研究員
博士（工学）（京都大学） 大矢根綾子