

# 学位論文

プラスミド DNA/キトサン/コンドロイチン硫酸  
三元複合体による *in vitro* と *in vivo* での遺伝子導入

2013 年度

萩原 健司

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	萩原 健司
主 論 文 題 目： プラスミド DNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体による <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> での 遺伝子導入				
(内容の要旨) pDNA/キトサン複合体をアニオン性高分子であるコンドロイチン硫酸で被覆し、物理化学的な安定性と遺伝子発現活性の向上を目指した pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を開発した。三元複合体のキャラクタリゼーション、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での遺伝子導入を行ない、コンドロイチン硫酸を被覆剤として使用することの意義を検討した。				
<b>第一章</b> 遺伝子治療の歴史的背景および現状についてまとめ、本研究を行うことの意義と目的について述べた。				
<b>第二章</b> pDNA/キトサン複合体と、様々な分子量および硫酸化度のコンドロイチン硫酸によって被覆された三元複合体のキャラクタリゼーションを行った。至適なコンドロイチン硫酸で被覆された三元複合体は、血中や生体組織中において高い安定性があることが期待された。複合体の細胞内取り込み機構および細胞内輸送経路を解析した結果、三元複合体はマクロピノサイトーシスで細胞内に取り込まれ、プロトンスポンジ効果でエンドソームから細胞質中に脱出し、複合体の状態を維持して核内に移行していることが明らかになった。				
<b>第三章</b> pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を凍結乾燥製剤に応用し、さらに <i>in vivo</i> での遺伝子発現活性を評価した。三元複合体は、凍結乾燥後冷凍保存し使用直前に再水和する「凍結乾燥-再水和型」製剤としての利用が適していることが見出された。 <i>in vivo</i> で腫瘍形成マウスモデルの自殺遺伝子治療を行ったところ、三元複合体は有意に高い抗腫瘍効果を発揮し、さらに凍結乾燥-再水和三元複合体も同等の効果を有することが認められた。				
<b>第四章</b> pDNA/キトサン複合体と三元複合体の凝縮度の違いが転写効率・翻訳効率に与える影響について調べた。コンドロイチン硫酸で被覆することにより粒子の凝縮度が緩やかになることが示唆された。複合体の細胞内動態の定量的解析の結果、コンドロイチン硫酸による被覆は、細胞内部への取り込み量を有意に向上させる効果がある一方、核移行効率はわずかに低下させることが明らかになった。mRNA レベルでの遺伝子発現活性評価により、pDNA/キトサン複合体と比較して三元複合体の転写効率は有意に向上することが分かった。				
<b>第五章</b> 本研究の結論をまとめた。				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number 81147542	SURNAME, First name HAGIWARA, Kenji
Title Gene delivery by pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>		
Abstract <p>Plasmid DNA (pDNA) /chitosan/chondroitin sulfate (CS) ternary complexes were developed to enhance physicochemical stability and transfection efficiency of pDNA/chitosan complexes. Physicochemical characters such as particle size, zeta potential, and morphology, and transfection abilities <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> were examined for ternary complexes.</p> <p><b>Chapter 1</b> Historic background and current situation of gene therapy were summarized, and research significance for this study was stated.</p> <p><b>Chapter 2</b> Plasmid DNA/chitosan complexes covered with six kinds of CSs having different sulfation degrees and molecular weights were physicochemically characterized. Ternary complexes covered with appropriate CS showed particle size of around 180 nm and zeta potential of -40 mV with unique globular structure. They also showed high stabilities in the conditions where blood proteins or erythrocytes exists. Ternary complexes were uptaken via macropinocytosis, escaped from endosomes by proton sponge effect, and entered into nucleus without dissociation of pDNA, chitosan, and CS.</p> <p><b>Chapter 3</b> The effects of coating pDNA/chitosan complexes with CS on stability in freeze-dry rehydration processes and cell transfection ability <i>in vivo</i> were investigated. Freeze-dried ternary complexes showed sufficient cell transfection ability <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>. In addition, ternary complexes significantly suppressed tumor growth and showed histopathologically high anti-tumor effect by intratumoral injection to tumor-bearing mice.</p> <p><b>Chapter 4</b> Transcription or translation efficiency and gene expression activity of pDNA complexes were analyzed in connection with difference of compaction strength of the complexes. As a results of fluorescence quenching assay and quantification analyses using realtime-PCR, it was suggested that CS coating loosened the compaction of pDNA and chitosan, causing a significant enhancement of transcription efficiency.</p> <p><b>Chapter 5</b> The major findings of the study was summarized.</p>		