

【学位論文審査の要旨】

エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列によらず遺伝子の発現制御を行う機構である。エピジェネティクスでは、核内に存在するDNAとDNAを巻き取るタンパク質であるヒストンの複合体であるクロマチンの構造が重要な役割を担っている。クロマチン構造が弛緩したユークロマチン構造では、露出したDNAに対して酵素や転写因子が作用することにより、遺伝子発現が活性化する。一方、凝縮した状態であるヘテロクロマチン構造では、DNAの遺伝子発現は不活性化する。このようなクロマチン構造の変化は、DNAメチル化、ヒストン修飾などの化学修飾により複雑に制御されている。近年、酸化ストレスや環境要因によりエピゲノム異常が惹起されることでがんやアルツハイマー病、生活習慣病などの疾患が発症することが明らかになってきた。エピジェネティクスはクロマチンへの多数の化学修飾が複雑に絡み合うことで生命現象を制御する機構である。もしその制御を任意に行うことができれば、これまで困難とされてきた難治性疾患や生活習慣病の新しい治療法につながる可能性がある。現在までにエピジェネティクス関連酵素を阻害する低分子薬剤に関する研究が盛んに行われてきた。しかし、複雑に絡み合ったエピジェネティクス修飾の包括的な制御はこれまで検討されてこなかった。

本論文では、包括的なエピジェネティクス制御を可能とする新たな技術であるエピジェネティクス工学を確立し、このエピジェネティクス工学を用いた従来とは全く異なる新しい治療法について検討した。具体的には、クロマチン構造制御が可能な新規エピジェネティクスコントロールキャリア(EpC キャリア)を創製し、これまで治療が困難とされてきた様々な疾患細胞モデルにおけるエピジェネティクス治療の効果について議論した。

本論文の内容をまとめると以下のようなになる。

まず、ヒト骨髄性白血病細胞(HL60)から顆粒球への細胞分化を行うことによる新しい細胞分化治療に関して検討した。具体的には、EpC キャリアを用いたHL60細胞のヒストンアセチル化制御を行い、誘導することを試みた。そのため、ヒストンアセチル化酵素(HAT)を発現するプラスミドDNA(pDNA)とヒストン脱アセチル化を抑制する阻害剤(トリコスタチンA, TSA)を同時封入したEpC キャリアを創出し、強力なヒストンアセチル化制御によるHL60細胞の分化誘導を試みた。EpC キャリアは、pDNAとTSAの共送達によりヒストンアセチル化が効果的に誘導され、さらにEpC キャリアの薬剤徐放効果により、長期的なアセチル化ヒストン量の維持が可能となった。その結果、EpC キャリアを投与したHL60細胞の顆粒球への細胞分化率は、極めて高くなった(約60%)。以上より、EpC キャリアはヒストンアセチル化制御を行うことにより、HL60細胞を顆粒球へ効率的に分化誘導できることを明らかにし、白血病の新しい治療となる可能性を示した。

さらに、酸化ストレス障害によるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の機能不全、およびそれに伴うヒストンアセチル化異常が原因で発症する慢性閉塞性肺疾患(COPD)の治療を試みた。具体的には、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC2)を発現するpDNAと、抗酸化剤であるカチオン性マンガンポルフィリンダイマー(MnPD)を含む新規抗酸化能を有する

EpC キャリアを創製し、酸化ストレス及び炎症性サイトカイン(IL-8)が過剰産生し、治療薬への耐性を示す *in vitro* COPD モデルにおける治療効果を検討した。EpC キャリアは *in vitro* COPD モデルにおいて、HDAC2 発現量の上昇を導き、IL-8 産生量を有意に抑制した。この結果は、EpC キャリアの抗酸化効果と HDAC2 発現の相乗効果によるものである。さらに、EpC キャリアを添加した *in vitro* COPD モデルは、治療薬への感受性の回復が認められ、耐性の解消が示唆された。以上の結果から、EpC キャリアは、抗酸化能による HDAC2 保護効果と遺伝子導入による HDAC 発現上昇の相乗効果により *in vitro* COPD モデルに対して有用な治療効果を示した。

最後に、DNA メチル化やヒストン脱アセチル化により不活化したがん抑制遺伝子、上皮間葉転換(EMT)によるがん転移・浸潤に対し、ヒストンアセチル化制御による新しいがん細胞分化治療を検討した。具体的には、がん細胞である A549 細胞において HAT を発現する pDNA と TSA を含む EpC キャリアによるヒストンアセチル化制御を行い、がん抑制遺伝子の再活性化を介したがん細胞分化制御を検討した。また、*In vitro* 転移がんモデルにおける EMT 抑制を試みた。EpC キャリアは、効率的なアセチル化ヒストン量の上昇を導き、ヒストンアセチル化の増加に伴いがん抑制遺伝子である p53 発現量が向上した。さらに、EpC キャリアを添加したがん細胞はアポトーシスを誘導していることが確認された。これは、ヒストンアセチル化制御によりがん細胞の形質が変化したためである。次に、*in vitro* EMT モデルにおいて、EpC キャリアは、アセチル化ヒストン量の上昇に伴い、間葉系細胞への分化誘導、即ち EMT を抑制した。以上の結果より、EpC キャリアはヒストンアセチル化によりがん細胞の形質変化を誘導し、さらに EMT を抑制することによるがんの転移・浸潤の制御が示され、これまでとは全く異なる新しいがん細胞分化治療に成功した。

以上より、本論文ではエピジェネティクス工学の確立に際し、ヒストンアセチル化制御による細胞分化治療を検討した。従来とは異なる作用機序を有する細胞分化治療は、今後様々な疾患治療分野に対して多大なる知見を与えるものであるため、本学の博士の学位(工学)を授与するに十分な内容を有しているものと判断する。